

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

## DISSERTATION

Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Quantifizierung  
der Adhäsion von *Moraxella catarrhalis* an pulmonalen  
Epithelzellen und Etablierung eines neuen Fluoreszenz-  
basierten Adhäsionsassays

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Krishna Nand Tiwari  
aus Garhmalpur, Indien

Gutachter: 1 Priv.-Doz. Dr. H. Slevogt  
2 Priv.-Doz. Dr. med. B. Siegmund  
3 Prof. Dr. med. C. Grohé

Datum der Promotion am 16.05.2010

Inhalt	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	5
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	7
<b>1 Einleitung</b>	
1.1 Bedeutung der COPD für die Weltgesundheit	9
1.2 Symptome Pathogenese und WHO Klassifikation der COPD	9
1.3 Verlauf mit Emphysem	11
1.4 Bedeutung der Bakterien für die COPD	12
1.5 <i>Moraxella catarrhalis</i> ; Krankheitsbilder und historische Betrachtungen	13
1.6 Virulenzfaktoren von <i>M. catarrhalis</i>	13
1.7 Bronchialepithel als Barriere und Bestandteil der angeborenen Immunität der Lunge	14
1.8 Adhäsion von <i>M. catarrhalis</i> an humanes Bronchialepithel	15
1.9 Bisher bekannte Adhäsionsassays	16
1.10 Ziel der Studie	18
<b>2 Materialien</b>	
2.1 Substanzen	19
2.2 Pufferlösungen	20
2.3 Farbstoffe	20
2.4 Zelllinien und Kulturmedien	20
2.5 Bakterienstämme	21
2.6 Spezielle Geräte, Zubehör (Messapparaturen)	22
2.7 Antikörper	23
<b>3 Methoden</b>	
3.1 <i>M. catarrhalis</i> Stämme	23
3.2 Zellkultur	24
3.3 Der Mikroskopie-basierte Adhäsionsassay	25
3.4 Der colony forming unit (cfu)-basierte Adhäsionsassay	25
3.5 Der Autoaggregationsassay	26
3.6 Der Fluoreszenz-basierte Adhäsionsassay	26

3.7 Konfokalmikroskopie von <i>M. catarrhalis</i> Adhäsion an die Epithelzellen	28
3.8 Statistische Auswertungsmethode	28
<b>4 Ergebnisse</b>	
4.1 Quantifizierung der Adhäsion von verschiedenen <i>M. catarrhalis</i> Stämmen an die BEAS-2B Zellen mittels dem cfu-basierten und dem Mikroskopie-basierten Adhäsionsassays	29
4.2 Autoaggregation und unterschiedliche Adhäsionsmuster der <i>M.</i> <i>catarrhalis</i> Stämme ATCC 25238 und O35E, mit BEAS-2B Zellen inkubiert	32
4.3 Vergleich der Quantifizierung der <i>M. catarrhalis</i> Adhäsion an den Epithelzelllinien: BEAS-2B, HEp-2 and A549 Zellen mittels des cfu-basierten bzw. des Mikroskopie-basierten Adhäsionsassays	35
4.4 Validierung des Fluoreszenz-basierten Adhäsionsassays	38
4.5 Bestimmung der Adhäsion von <i>M. catarrhalis</i> an BEAS-2B Zellen mittels des Fluoreszenz-basierten Adhäsionsassays	41
4.6 Vergleich der Ergebnisse der drei Adhäsionsassays	44
4.7 Vergleich der Adhäsion der UspA1-defizienten <i>M. catarrhalis</i> Mutante O35E.1 und des hitzeinaktivierten O35E Stammes mit der Adhäsion des O35E Wildstammes an BEAS-2B Zellen bestimmt mit allen drei Adhäsionsassays	45
<b>5 Diskussion</b>	
5.1 Die Bedeutung der Adhäsion des pathogenen Keims ( <i>M. catarrhalis</i> ) an den humanen Respirationstrakt	47
5.2 Die Bedeutung der Konfluenz für die Adhäsion von Bakterien	47
5.3 Limitationen des cfu-basierten Assays	48
5.4 Der Fluoreszenz-basierte Adhäsionsassay	49
5.5 Die Bedeutung des OMP UspA1 für die Adhäsion von <i>M.</i> <i>catarrhalis</i> an Epithelzellen	50
5.6 Ausblicke auf die zukünftige molekular-medizinische Forschung für COPD-Therapieansätze	51

### Abkürzungsverzeichnis

A549	Type II Alveoläre karzinogene Bronchialzellen
AK	Antikörper
ATCC	American Type Culture Collection™
BEAS-2B	Humane Bronchialepithelzelllinie
BHI-Agar	<i>brain-heart-infusion agar</i>
CEACAM	<i>carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule</i>
Cfu	<i>Colony forming units</i> (Kolonie-bildende Einheiten)
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> (Chronisch obstructive Lungenerkrankung)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ETI	Sojabohnen-Trypsininhibitor
FCS	<i>fetal calve serum</i> (Fötales Kälberserum)
FEV <sub>1</sub>	Forciertes Einsekunden-Volumen
GM-CSF	<i>granulocyte-monocyte colony-stimulating factor</i> (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)
HEp-2	Cervixkarzinom abgeleitete HeLa-Sublinie
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N -2-ethansulfonsäure, Puffersubstanz
ISI	Integrated signal intensity

LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
MID	<i>M. IgD binding protein</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MAB	<i>Mouse Antibody</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
OD	<i>Optical Density</i> (optische Dichte)
OMP	<i>Outer membrane protein</i> ( Oberflächenprotein)
PBS -/-	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Kalzium und Magnesium
PFA	Paraformaldehyd
RFI	relative fluorescence intensity
ROS	Reactive oxygen species
SDS	„Sodium-Dodecyl-Sulfat“
SEM	scanning electron microscope
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEM	transmission electron microscope
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	„unit“, Einheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
Usp1	„ubiquitous surface protein 1“
Usp2	„ubiquitous surface protein 2“
VC	Vitalkapazität

WHO	World Health Organisation
-----	---------------------------

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung wichtiger Adhäsionsmoleküle für die Bindung von *M. catarrhalis* an humane Epithelzellen.

Abb. 2 Quantifizierung der Adhäsion unterschiedlicher *M. catarrhalis* Stämme an BEAS-2B Zellen mit dem Mikroskopie-basierten (A) und dem cfu-basierten (B) Adhäsionsassay.

Abb. 3 Gezeigt ist die jeweilige Autoaggregationsfähigkeit der *M. catarrhalis* Stämme O35E und ATCC 25238 in Suspension durch Messung der optischen Dichte der Suspensionslösung über die Zeit.

Abb. 4: Die beiden konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen die unterschiedlichen Adhäsionsmuster der *M. catarrhalis* Stämme O35E (A) und ATCC 25238 (B) an BEAS-2B Zellen nach einstündiger Inkubation.

Abb. 5: Darstellung der Quantifizierung der Adhäsion der *M. catarrhalis* Stämme ATCC 25238 (weisse Säule) und O35E (schwarze Säule) an den Epithelzelllinien BEAS-2B, HEp-2 und A549 gemessen mit dem Mikroskopie-basierten Adhäsionsassay (Abb. 5A) und dem cfu-basierten Adhäsionsassay (Abb. 5B).

Abb. 6: Messprinzip der Quantifizierung von adhärenenten Bakterien mittels Immundetektion des *M. catarrhalis* spezifischen Oberflächenmembranproteins UspA1

Abb. 7: Quantifizierung der Adhäsion von *M. catarrhalis* an Epithelzellen visualisiert und quantifiziert mittels des Fluoreszenz-basierten Adhäsionsassays.

Abb. 8: Charakterisierung der Adhäsionsfähigkeit der UspA1 defizienten Mutante *M. catarrhalis* Stamm O35E.1 und dem hitzeinaktivierten *M. catarrhalis* Stamm O35E (HI) durch den Mikroskopie-basierten, den cfu-basierten und den Fluoreszenz- basierten Adhäsionsassay im Vergleich zum Wildtyp O35E.



## **1 Einleitung**

### **1.1 Bedeutung der COPD für die Weltgesundheit**

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine häufige und epidemiologisch sowie gesundheitsökonomisch außerordentlich bedeutsame Erkrankung, die weltweit den vierten Platz auf der Liste der häufigsten Todesursachen einnimmt. Etwa vier Millionen Menschen leiden derzeit in Deutschland an einer COPD, wobei die Prävalenz weiter ansteigt. Die COPD ist ein bedeutendes und wachsendes globales Gesundheitsproblem. Es wird für das Jahr 2020 vorausgesagt, dass die COPD die dritt-häufigste Todesursache in der Welt sein wird [Herold G. 2009, Barnes P.J. et al. 2003]. Es gibt keine gegenwärtige Therapie, die die Progression der Erkrankung aufzuhalten vermag [Barnes P.J. et al. 2003]. Jedoch gibt es wegen der enormen Belastung der Krankheit und der zu erwartenden hohen Gesundheitskosten, ein zunehmendes Interesse an den zugrunde liegenden zellulären und molekularen Strukturen und an einer Suche nach neuen Therapiestrategien. Deshalb kam es zur Gründung der *Global Obstructive Lung Disease Initiative* (GOLD), um international die Erforschung der COPD zu organisieren und in den Mittelpunkt des Interesses zu setzen.

### **1.2 Symptome, Pathogenese und WHO Klassifikation der COPD**

Im Verlauf der COPD kommt es häufig zu schwerwiegenden Folgeerscheinungen, wie z. B. einem Cor pulmonale oder einer partiellen oder globalen respiratorischen Insuffizienz. Zu den Hauptkriterien der COPD gehört die chronische Bronchitis. Hauptsymptome sind ein chronischer Husten, Auswurf und Atemnot, anfangs nur unter körperlicher Belastung und später im fortgeschrittenen Stadium auch unter Ruhebedingungen [Herold G. 2009, Murphy T.F. et al. 2000]. Die Erkrankung ist definiert, wenn bei einem Patienten in zwei aufeinander folgenden Jahren, während mindestens drei aufeinander folgenden Monaten pro Jahr, Husten und Auswurf bestanden hat [GOLD, 2005]. Die Faktoren, die eine chronische Bronchitis verursachen, sind unterteilt in exogene und endogene Faktoren.

Exogene Faktoren und hauptsächliche Ursache der COPD sind das Zigarettenrauchen. Bei 90% der Erkrankten handelt es sich um Raucher oder Ex-Raucher. Weitere Faktoren wie Luftverschmutzung und rezidivierende Atemwegsinfekte spielen ebenfalls eine ursächliche Rolle. Auch konstitutionelle Faktoren wie eine bronchiale

Überempfindlichkeit oder genetische Faktoren spielen für die Pathogenese der Erkrankung eine Rolle [Barnes P.J. et al. 2003]. Patienten mit COPD zeigen eine signifikante Beeinträchtigung in deren Immunabwehrsystem. Dieses wird durch eine Schädigung der Zilien tragenden Bronchialepithelzellen durch den Tabakrauch verursacht und hat eine vermehrte Sekretion von zähflüssigem Bronchialschleim, auch Dyskrinie genannt, sowie eine Hemmung der normalen Drainage zur Folge. Zusätzlich kommt es zu einer Beeinträchtigung der Phagozytenfunktion von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, welches eine suffiziente Elimination von eingedrungenen Mikroorganismen erschwert. Im Verlauf kommt es zu einer weiteren Verminderung der lokalen Immunantwort des Wirts, was eine zunehmende Kolonisierung der Atemwege mit Bakterien zur Folge hat.

Für die Diagnose einer COPD empfiehlt GOLD folgende Untersuchungen:

Ausführliche Anamnese insbesondere im Hinblick auf die Exposition gegenüber Risikofaktoren (Tabakrauch, Umweltbelastungen, berufliche Exposition). Patienten mit chronischem Husten und Auswurf sowie einer Exposition gegen die o.g. Risikofaktoren sollten auf eine Einschränkung ihrer Lungenfunktion getestet werden.

Für die weitere Diagnose und die Bestätigung einer COPD ist die Spirometrie der Goldstandard. Bei der Diagnose der COPD stützt man sich zum einen auf die Symptomatik und zum anderen auf die Lungenfunktion. Bei der Einteilung der Schweregrade von I leicht, II mittelgradig bis III schwer orientiert man sich an den Empfehlungen von GOLD (siehe Tabelle. 1)

Stadium	Merkmale
0: Gefährdet	Chronischer Husten und Sputumproduktion, Spirometrie der Lungenfunktion ist normal
I: Leichte COPD	Leichte Behinderung der Ventilation ( $FEV_1/FVC < 70\%$ aber $FEV_1 \geq 80\%$ vom Sollwert) mit oder ohne chronische Symptome. Betroffene sind sich häufig nicht bewusst, dass ihre Lungenfunktion nicht normal ist.
II. Moderate COPD	Verschlechterung der Ventilation ( $FEV_1/FVC < 70\%$ , aber $50\% \leq FEV_1 < 80\%$ vom Sollwert) und Fortschreiten der Symptome, Kurzatmigkeit nach körperlicher Anstrengung
III: Schwere COPD	Fortschreitende Ventilationsstörung ( $FEV_1/FVC < 70\%$ , aber $30\% \leq FEV_1 < 50\%$ vom Sollwert). Gesteigerte Kurzatmigkeit und wiederholte Exazerbationen, die die Lebensqualität des Patienten stark beeinflussen.
IV: Sehr schwere COPD	Schwerste Ventilationsstörung ( $FEV_1/FVC < 70\%$ , aber $FEV_1 < 30\%$ vom Sollwert) oder schwere chronische respiratorische Ausfälle. Lebensqualität wird noch weiter eingeschränkt und Exazerbationen können lebensbedrohlich sein.

Tab.1: Einteilung der unterschiedlichen Stadien der COPD nach GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease)

Bei Grad I leiden die Patienten unter Dyspnoe, Husten und Auswurf bei starker körperlicher Belastung. Bei Grad II gibt es zunehmende Dyspnoe, produktiver Husten auch im Ruhestadium. Grad III ist gekennzeichnet durch respiratorische Insuffizienz mit Cor pulmonale [GOLD, 2005].

Die Atemwegsbeschränkung bei der COPD ist im Gegensatz zum Asthma bronchiale nach Gabe von Bronchialdilatoren nicht oder nur wenig reversibel. Die Atemwegsobstruktion nimmt gewöhnlich einen progressiven Verlauf. Sie ist assoziiert mit einer abnormalen inflammatorischen Antwort auf schädliche Partikel und Gase.

Für die COPD Pathogenese von besonderer Bedeutung ist, dass sich der Atemfluss durch eine irreversible oder allenfalls nur partiell reversible Kontraktion der Bronchialmuskulatur bei der Ausatmung pathologisch verlängert [Herold G. 2009]. Dieses ist wiederum auf einen fortschreitenden entzündlichen Prozess im Bronchialsystem, einhergehend mit Schwellung, vermehrter Produktion von Schleim zurückzuführen [Barnes P.J. et al. 2003].

### **1.3 Verlauf mit Emphysem**

Als Folge dieser Erkrankung kann es ausserdem zu einer anhaltenden Überblähung der Alveolen mit der Folge einer Emphysementwicklung kommen. Der Mechanismus der Emphysementstehung wird auf proteolytische und anti-proteolytische Faktoren zurückgeführt, die im Rahmen der chronischen Inflammation freigesetzt werden. Es kommt dabei zu einem Ungleichgewicht zu Gunsten der proteolytisch-enzymatischen Prozesse [Senior R. M. und Anthonisen N.R. 1998]. Das Lungenemphysem ist durch eine Vergrößerung der Lufträume und Zerstörung des Lungenparenchyms, einen Verlust der Lungenelastizität und Verschießen der kleinen Atemwege gekennzeichnet. Nicht bei allen COPD-Patienten kommt es zu einer Emphysementstehung. Diese kennzeichnet häufig schwere COPD-Stadien mit Zerstörung des Lungenparenchyms und den somit zustande kommenden Verlust der Compliance (Dehnbarkeit) der Lunge. Dieses hat zur Folge, dass es zu einer Erhöhung des Atemwegswiderstands in den kleinen Bronchiolen kommt [Barnes et al. 2003]. Es kommt daraufhin zu einem fibrotischen Umbau der Alveolarsepten. Im Verlauf der Erkrankung kann es auch zu einer pulmonalen Hypertonie und wegen der anhaltenden Rechtsherzbelastung zu der Ausbildung eines Cor pulmonale kommen [Herold G. 2009].

#### **1.4 Bedeutung der Bakterien für die COPD**

Im Verlauf der COPD kommt es häufig zu bakteriell bedingten Exazerbationen. Die Mehrheit dieser Exazerbationen, ca. 60% wird verursacht durch bakterielle Infektionen [Murphy et al. 2000]. Patel et al. untersuchten 29 Patienten mit COPD. Davon waren 15 Patienten mit möglichen pathogenen Keimen kolonisiert (51.7%). Die Anteile der verschiedenen Bakterien wurde analysiert, auch mehrfache Infektion möglich, deshalb Summe der Prozent-Werte größer als 100. Hauptsächliche Erreger sind: *Haemophilus influenzae* (ca. 53.3%), *Streptococcus pneumoniae* (ca. 33.3%), *Haemophilus parainfluenzae* (20%), *Moraxella catarrhalis* (20%) und *Pseudomonas aeruginosa* (20%), [Patel I.S. et al. 2002]. In Sputumisolaten bei COPD exazerbierten Patienten wurden potentielle pathogene Bakterien identifiziert. *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* [Sethi S. et al. 2002]. Dabei nimmt *M. catarrhalis* hinter *H. influenzae* die zweite Stelle als Auslöser der bakteriell bedingten Exazerbation der COPD ein. In einer Kohorten-Studie an 104 Patienten [Murphy TF et al. 2005] konnte gezeigt werden, dass *M. catarrhalis* ungefähr 10% aller COPD-Exazerbationen verursacht. Außerdem kommt es zu einer Kolonisation der unteren Atemwege bei von 5% bis zu 32% der COPD- Patienten mit diesem Erreger. Auf Basis von Schätzungen ergibt sich, dass *M. catarrhalis* in den USA für etwa 2 bis 4 Millionen Exazerbationen jährlich verantwortlich ist [Murphy TF et al. 2005]. Es gibt zunehmend Hinweise dafür, dass es auch einen Zusammenhang zwischen Infektionen mit *M. catarrhalis* und der Progression der COPD Erkrankung gibt [Wilkinson et al. 2003; Rosell et al. 2005].

Die Frequenz der Exazerbationen erhöht den Schweregrad der COPD. In einer Arbeit von Tumkaya et al konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Kolonisierung der unteren Atemwege mit einer Atemwegsinfektion assoziiert ist, welche bei stabilen Patienten den Charakter und die Häufigkeit der Exazerbationen moduliert [Tumkaya M. et al. 2006]. Dieser Zusammenhang zwischen bakterieller Kolonisierung, bronchiale Infektion und der Häufigkeit von Exazerbationen ist von großer Bedeutung für das Verständnis der COPD-Pathogenese [M. Tumkaya et al. 2006].

#### **1.5 *M. catarrhalis* - Krankheitsbilder und historische Betrachtungen**

*M. catarrhalis* ist ein wichtiger Krankheitserreger des menschlichen Respirationstraktes [Barnes P.J. et al. 2003, Boyle F.M., Georgiou P. R. et al. 1991, Catlin B. W. 1990]. Es handelt sich um ein gram-negatives, aerobes, oxidase-positives diplokokkoides Bakterium. Es wurde erstmalig im Jahre 1896 unter dem Namen *Mikrococcus catarrhalis* beschrieben, wurde aber auch unter dem Namen *Neisseria catarrhalis*, und *Branhamella catarrhalis* bekannt [N. Rikitomi et al. 1991]. *M. catarrhalis* galt lange als harmloser Saprophyt des oberen Respirationstraktes. Erst seit Mitte der 90ziger Jahre wird seine pathogenetische Bedeutung zunehmend erkannt.

*M. catarrhalis* ist ein häufiger Erreger der Otitis media im Kindesalter, verursacht darüber hinaus Bronchitiden und Pneumonien. Bei Erwachsenen ist er der zweithäufigste Erreger der infektexazerbierten COPD und spielt als Erreger von Laryngitiden, Bronchitiden und Pneumonien besonders bei Patienten mit chronischen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Bei immunsupprimierten Patienten können Infektionen mit *M. catarrhalis* zu septischen Verläufen, Osteomyelitiden und Arthritiden führen [Miravittles M. 2002].

*M. catarrhalis* kolonisiert häufig im oberen Respirationstrakt. Die Kolonisierungsrate liegt zwischen 28-100% im ersten Lebensjahr bei Kindern. Bei Erwachsenen ist die Kolonisationsrate 1-10% [Murphy et al. 2005]. Die Übertragung erfolgt wahrscheinlich per Tröpfcheninfektion durch kontaminiertes Sekret [Miravittles M. 2002]. *M. catarrhalis* ist ein ausschließlich humanpathogenes Bakterium. Die Antibiotikatherapie gegen *M. catarrhalis* Infektionen war bis vor 20 Jahren in Bezug auf Resistenzbildung unproblematisch. Später wurden  $\beta$ -lactamase-bildende Spezies isoliert mit Resistenz gegen Penicillin und Cephalosporin. Die Möglichkeit der Entwicklung multiresistenter Spezies der *M. catarrhalis* macht die Erforschung neuer Therapieansätze wie z. B. Vakzine (Impfungen) und neue Antibiotika notwendig. Insbesondere ist es wichtig Wechselwirkungen zwischen Erreger und pulmonalem Epithel genauer zu untersuchen.

### **1.6 Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis***

Die wichtigsten Virulenzmechanismen von *M. catarrhalis* sind die Adhäsion und Kolonisation des Bronchialepithels des Respirationstraktes. Diese wird durch Oberflächenproteine des Bakteriums, sog. *outer-membrane-proteins* (OMPs) vermittelt. Die am besten untersuchten OMPs sind das *ubiquitous surface protein* (Usp) UspA1, das UspA2, UspA2H sowie das OMP CD, und das OMP E [Aebi et al. 1998, McMichael

2000]. Diese OMPs vermitteln hauptsächlich die Adhäsion des Bakteriums am respiratorischen Epithel.

Zweitens wird die Adhäsion durch das Endotoxin LOS (Lipooligosaccharid) vermittelt [Hu W.G. et al. 2001]. Die ebenfalls in der äusseren Membran enthaltenden Lipopolysaccharide (LPS) unterscheiden sich durch die Länge und Komplexität der Saccharidkette von den Lipooligosacchariden (LOS) gram-negativer Erreger.

Die LOS enthalten kürzere Saccharidketten als die LPS. Bei LPS sind die Saccharidketten relativ lang und kompliziert verzweigt.

Drittens wird die Adhäsion der *M. catarrhalis* durch das Immunglobulin D (IgD)-Bindungsprotein (MID) vermittelt. MID ist ein 200-kDa OMP mit einer hohen Affinität für IgD. MID wird im grössten Teil der *M. catarrhalis* Stämme gefunden. MID-exprimierende *M. catarrhalis* Stämme binden an Typ II Alveolarepithelzellen. [Forsgen A. et al. 2003].

### **1.7 Das Bronchialepithel als Barriere und Bestandteil der angeborenen Immunität der Lunge**

Die Bronchialepithelzellen spielen für den Schutz und bei der Abwehr von Bakterien und exogenen Schadstoffen eine zentrale Rolle.

Sie spielen für die Koordination und Regulation von Abwehrreaktionen und Entzündungsprozessen in den Atemwegen eine zentrale Rolle [Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA 2003]. Als Hauptangriffspunkt für Bakterien bei der Kolonisierung und Infektion besitzen sie hoch spezialisierte primäre und erworbene Abwehrsysteme. Dadurch können inhalierte Erreger schnell erkannt, lokalisiert, abgetötet bzw. unschädlich gemacht und entfernt werden. Dieser Prozess findet in der Regel kontinuierlich statt, ohne dass es zu andauernden oder starken entzündlichen Reaktionen kommt. Bronchialepithelzellen zeigen auf bestimmte Stimuli eine lokale Immunreaktion, durch die die gezielte Produktion von Zytokinen, Chemokinen, Lipid-Mediatoren u.a. orchestriert wird. Sie werden z.B. durch verschiedene Entzündungsmediatoren oder Bestandteile von Bakterien aktiviert und es werden weitere Entzündungszellen rekrutiert, Adhäsionsprozesse eingeleitet und gesteuert und die Aktivität von Entzündungszellen moduliert. Außerdem können sie einem entzündlichen Prozess durch die Freisetzung anti-inflammatorisch wirkender Mediatoren, löslicher Rezeptoren und durch die Inaktivierung pro-inflammatorischer Mediatoren entgegenwirken. Insgesamt ist die inter- und intrazelluläre Kommunikation, die durch die Wechselwirkung zwischen Bakterium und Wirtszelle ausgelöst wird bisher

nur unvollständig verstanden. Es erscheint aussichtsreich, dass die genauere Kenntnis über die Beziehungen von Bakterien und Wirtszelle neue Ansatzpunkte zur therapeutischen Beeinflussung von Infektionen bzw. entzündlicher Reaktionen der Atemwege bieten können.

### **1.8 Adhäsion von *M. catarrhalis* an humanes Bronchialepithel**

Die bakterielle Adhäsion ist definiert als die Bindung von Bakterien an Bronchialepithelzellen, meist über spezifische Rezeptoren. Die Adhäsion von *M. catarrhalis* an die humanen, respiratorischen Epithelzellen ist der erste Schritt zur Etablierung einer Infektion und/oder einer Kolonisierung. Einige bakterielle Virulenzfaktoren sind für die Adhäsion von grosser Bedeutung. Insbesondere LOS und die OMPs M.-IgD-binding Protein (MID) und das UspA1 sind bekannte Adhäsine für *M. catarrhalis*. [Hu E.G. et al. 2000, Hu W.G. et al. 2001, Hu W.G. et al. 2004]. Unter diesen Molekülen ist das Protein UspA1 detailliert charakterisiert worden und hat Aufmerksamkeit als mögliches Vakzin erhalten [Aebi C. et al. 1997, Aebi C. et al. 1998]. Ein anderes *outer membrane protein* der *M. catarrhalis*, das IgD Bindungsprotein (MID), ist vor kurzem von Forsgen et al. identifiziert worden, wie auch die Involvierung in der Adhäsion von *M. catarrhalis* an die Epithelzellen [Forsgen A. et al. 2001, Forsgen A. et al. 2003]. Wenig ist bekannt über die spezifischen Rezeptoren in den Epithelzelloberflächen, welche von *M. catarrhalis* zur Bindung an die humanen respiratorischen Epithelzellen genutzt werden. Bis jetzt sind nur wenige epitheliale Oberflächenmoleküle für *M. catarrhalis* charakterisiert worden, insbesondere das Asialo-GM1 [de Bentzmann S. et al. 1996, Ahmed K. et al. 2002] und das *carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule* CEACAM-1, die in die Adhäsion von *M. catarrhalis* involviert sind [Singer B.B. et al. 2000]. CEACAM-1 ist für die Adhäsion von *M. catarrhalis* an A549 Zellen von wichtiger Bedeutung [Singer B.B. et al. 2000] impliziert worden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das asialoganglioside ganliotetraosylceramide (Asialo-GM1) epithelialer Rezeptor für die Bindung an pharyngealen Epithelzellen von wichtiger Bedeutung ist. [Ahmed K. et al. 2002]. Über die präzisen Mechanismen der *M. catarrhalis* Adhäsion an die humanen Bronchialepithelzellen ist wenig bekannt. Allerdings ist die Adhäsion Grundvoraussetzung für die bakterielle Kolonisierung und Infektion des Bronchialtraktes. Als neuartiger Therapieansatz böte es sich daher an, Rezeptoranaloga als kompetitive Inhibitoren der bakteriellen Inhibition einzusetzen und

damit einer Kolonisierung und/oder Infektion von Bakterien vorzubeugen oder ihr entgegen zu steuern. Die so geartete antiadhäsive Therapie hätte außerdem eine Reduktion der Kontaktintensität zwischen Wirtszellen und Erreger zur Folge [Ofek I. et al. 2003]. Als Voraussetzung für die Erforschung dieses therapeutischen Prinzips ist es wichtig, die Adhäsion von *M. catarrhalis* an Bronchialepithel genauer zu analysieren und quantifizieren zu können.

## Bisher identifizierte Adhäsionsmoleküle

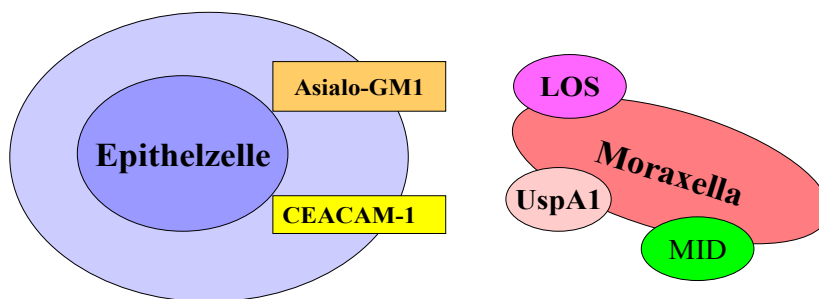


Abb. 1: Schematische Darstellung wichtiger Adhäsionsmoleküle für die Bindung von *M. catarrhalis* an humane Epithelzellen.

### 1.9 Bisher bekannte Adhäsionsassays

In den meisten der Studien über die Adhäsionsmechanismen von *M. catarrhalis* an humane Epithelzellen wurden gewöhnlich zwei Adhäsionsassays verwendet.

**Der colony forming units (cfu) basierte Assay:** Das Prinzip dieses Assays beruht darauf, dass konfluente Epithelzellen mit einer definierten Menge *M. catarrhalis* infiziert werden. Nach einer bestimmten Zeitdauer werden die Zellen gewaschen und trypsiniert und auf Agarplatten aufgetragen. Die Bestimmung der adhärenenten Bakterien erfolgt dann über Auszählung von *M.* Kolonien in cfu, die der Anzahl der adhärenenten Zellen entsprechen [Lafontaine et al. 2000 bzw. Forsgren et al. 2003].

Im Folgenden werden die wichtigsten Arbeiten zur Untersuchung der Adhäsion von *M. catarrhalis* an Epithelzellen mit Hilfe des cfu-basierten Assays aufgezählt:



- Christoph Aebi et al verwendeten für ihre Untersuchungen über die Adhäsion von *M. catarrhalis* an *Chang conjunctival epithelial cells* und Hep-2 Zellen zur Quantifizierung der adhärenen *M. catarrhalis* diese Methode.
- In der Arbeit von Hill et al. 2003 wurde die Adhäsion von *M. catarrhalis* an die Hep-2 Zellen, *Chang conjunctival epithelial cells* und A549 ebenfalls mit diesem Assay zur Identifikation von CEACAM1 als Bindungsrezeptoren untersucht [Hill und Virji, 2003].
- Für die Untersuchungen von Timpe et al. zur Bindung von *M. catarrhalis* an verschiedenen Epithelzelllinien wurde ebenfalls der cfu-basierte Assay verwendet [Timpe J. M. et al. 2003].
- Diese Methode wurde auch von Pearson et al. zur Quantifizierung von *M. catarrhalis* an *Chang-conjunctival epithelial cells* eingesetzt (2002).
- In ihrer Studie über die Bedeutung des MID für die Adhäsion von *M. catarrhalis* an der alveolären Epithelzelllinie A549 haben Forsgen et al. (2003) ebenfalls den cfu-basierten Adhäsionsassay verwendet.

### **Der Mikroskopie-basierte Adhäsionsassay**

Dieser Assay beruht auf dem Prinzip, dass nach Inkubation der Epithelzellen mit *M. catarrhalis* und einem anschließenden Waschschrift die Bakterien angefärbt und mikroskopisch ausgezählt werden. Als Einheit dient dafür Bakterium/Zelle. Dafür dürfen die Zellen nicht konfluent werden, da sonst eine Diskriminierung der einzelnen Zellen nicht möglich ist. In folgenden wichtigen Arbeiten wurde dieser Assay für die Quantifizierung von *M. catarrhalis* an Epithelzellen angewendet.

- Fitzgerald et al. (1999) verwendete diese Methode in ihrer Adhäsionsstudie zur Untersuchung der Adhäsion von *M. catarrhalis* an Hep-2 Zellen. Mikroskopisch bestimmt wurden insgesamt 100 Hep-2 Zellen pro coverslip (Deckplatte) .
- In einer Adhäsionsstudie wurde von Hu Wei-Gang et al. (2004) die Adhäsion von *M. catarrhalis* an *Chang conjunctival epithelial cells* ebenfalls mit dieser Methode untersucht.

### **1.10 Ziel der Studie**

Die Quantifizierung der Adhäsion von *M. catarrhalis* an humanen Epithelzellen wurde bisher mit unterschiedlichen Methoden gemessen, die nicht miteinander verglichen worden sind. Außerdem wurden die in der Literatur publizierten Ergebnisse zur Adhäsionsfähigkeit von *M. catarrhalis* meist nicht an respiratorischen Epithelzellen untersucht, sondern an der zervikalen Epithelzelllinie HeLa oder an den HeLa Subzelllinien Hep-2 Zellen oder *Chang-conjunctival epithelial cells* als Zellkulturmodell untersucht [Diebold Y. et al. 2003, Masters J.R. 2002, Saint Jean M. et al. 2004]. Das Ziel dieser Studie war es daher, die Adhäsionsfähigkeit von *M. catarrhalis* an Bronchialepithelzellen und weiteren Epithelzelllinien mit unterschiedlichen Methoden zu quantifizieren und die damit erzielten Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Dabei galt es zu untersuchen, welches Verfahren für diese Untersuchungen die verlässlichsten Ergebnisse erbringen würde. Außerdem sollte ein neues auf Fluoreszenz-markierte Antikörper basierendes Verfahren an konfluenten Epithelzellen entwickelt und validiert werden und mit den beiden anderen Verfahren verglichen werden.

Konkret ergaben sich daher für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

- 1.) Es sollte ein Vergleich der Ergebnisse der beiden am häufigsten gebräuchlichen Adhäsionsassays des Mikroskopie-basierten und des cfu-basierten Adhäsionsassays vorgenommen werden, indem die Ergebnisse der beiden Adhäsionsassays für die Adhäsion von *M. catarrhalis* an drei verschiedenen Zelllinien miteinander verglichen wurden.
- 2.) Da sich für beide Adhäsionsassays erhebliche, die Resultate verfälschende Limitationen fanden, sollte ein neuer Fluoreszenz-basierter Adhäsionsassay entwickelt und die Ergebnisse, die mit diesem Assay gewonnen wurden mit den Ergebnissen der beiden anderen Assays verglichen werden.
- 3.) Außerdem sollte die Adhäsionsfähigkeit von *M. catarrhalis* an unterschiedliche Epithelzelllinien pulmonalen Ursprungs (A549, BEAS-2B) mit der Adhäsionsfähigkeit Epithelzellen nicht-pulmonalen Ursprungs (Hep-2) anhand dieser drei Methoden verglichen werden.

## **2 Materialien**

## 2.1 Substanzen

### Produkt

### Hersteller

ETI (Sojabohnen-Trypsininhibitor)	Böhringer, Mannheim
Medium HAM's F12	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
PBS+/+ (mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom AG, Berlin
PBS-/-	PAA Laboratories, Wien
Penicillin/Streptomycin	Biochrome AG, Berlin
Trypsin-EDTA	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
EGF (Endothelial Growth Factor)	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Wien
L-Glutamin	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
Medium Keratinozyte-SFM	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
Medium D-MEM	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
3% PFA & 0.2N HEPES	Sigma
Triton X-100 Lösung	Sigma, Alderlich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Albumin BSA (Bovine serum albumin)	Sigma, Alderlich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

### Coating-Lösung

Keratinozyten-SFM	ad 100ml	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
Vitronektin 50 µg/ml	0,1 ml	Sigma, Deisenhofen
Fibronektin 1 µg/ ml	1,00 ml	Sigma, Deisenhofen
BSA (Bovine serum albumin) 100 mg/dl	1,0 ml	Sigma, Deisenhofen

## 2.2 Pufferlösungen

PBS (1×) mit 10% FCS (pH=7,0)	PAA Laboratories, Wien
FCS	PAA Laboratories, Wien
Odyssey Blocking Buffer 50 %	Licor inc.
Tris HCL pH 7,4	Sigma

### PBS-Stammlösung (20 ×)

NaHPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	29,25 g	Merk, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,90 g	Merk, Darmstadt
NaCl	100 g	Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000 ml	

Tween 20	Sigma, Deisenhofen
NaHCO <sub>3</sub>	Merk, Darmstadt
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merk, Darmstadt

## 2.3 Farbstoffe

SYTO 63 / IRDye 700	Molecular Probes Leiden, Niederlande
May-Grunwald- Giemsa Färbung nach Papenheim	Sigma, München
IRDye 800	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

## 2.4 Zelllinien und Kulturmedien

### BEAS-2B Zellkulturmedium

Die humane bronchiale Epithelzelllinie BEAS-2B, die mit einem SV 40 Virus transformiert wurde, wurde uns freundlicherweise von C. Harris, National Institute of Health, Bethesda USA zur Verfügung gestellt [Reddel, R. R et al. 1988]. Die Zellen wurden in Keratinocyte- SFM (Gibco BRL, Life Technology, Paisley, UK) mit Zusatz von 200 mM L- Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 0,4 µl/ml Amphotericin (Bohringen Mannheim), 1 mg/ml (250µl Aliquot) Adrenalin, einem (Rinderhypophysenextrakt 25mg Aliquot (PBE), sowie mit recombinantem epidermalen Wachstumsfaktor 2,5µg Aliquot (rEGF) (Gibco invitrogen Corporation) und dem Zusatz von Retinolsäure 1mg/ml (*all trans retinoic acid* von Sigma) kultiviert. Die Zellen wurden in der Zellpassage 10 bis 35 verwendet.

### A549-Zellkulturmedium

Die A549 Epithelzellen (Typ II Alveolarzellkarzinom Epithelzelllinie) wurden von American Type Culture Collection (ATCC, Manasas VA, USA) erworben und in HAMs F12 Medium (PAA Laboratories, Parsching, Austria) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum, 200 mM L- Glutamin, und 100 µg/ ml Streptomycin kultiviert.

#### Hep-2 Zellkulturmedium

Hep-2 Zellen (ATCC, CCL- 23) wurden in Waymouth´s Medium unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum ohne Antibiotika kultiviert.

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen T 75 (Falcon, Corning star, Wiesbaden, Deutschland) gezüchtet und bei Erreichen der Konfluenz gesplittet und in Kultivierungsgefäße mit unterschiedlicher Well- Anzahl umgesetzt.

## **2.5 Bakterienstämme**

### ***M. catarrhalis***

Bakterien vom Stamm *M. catarrhalis* ATCC 25238 (Serotyp A) wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC, Manasas VA, USA) gekauft. Der Wildtyp Stamm *M. catarrhalis* O35E (Serotyp A) und die isogene UspA-1 defiziente Mutante O35E (O35E.1) wurde uns freundlicherweise von Eric Hansen (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas Texas USA) zur Verfügung gestellt.

BHI-Agarplatte (Falcon, Corning star, Wiesbaden)

Brain- Heart Infusion, von der Firma (Difco Laboratories, BD Heidelberg) mit Zusatz von 5% erhitztem Schafsblut.

### **Gefriermedium**

Brain-Heart-Infusion-Medium (Vorkultur)	500,00 µl	BD Bioscience
Glycerol 99 %ig	500,00 µl	Sigma

## **2.6 Spezielle Geräte, Zubehör (Messapparaturen)**

Zellkulturflaschen T75	Falcon, Corning star, Wiesbaden
Petrischalen 10 cm Durchmesser	Nunc, Dänemark
Well-Platten (mit 6 / 8 / 24 Vertiefungen)	Nunc, Dänemark
Zentrifuge 48 RC, Rotanta RPC	Hettich
Zellkultur Inkubator HERA CELL 240	Hereaus
Sterilbank Laminair HB 2448 Model 1.2	Hereaus
Mikroskop BX 60	Olympus, Hamburg
Laborwaage	Sartorius
Thermomixer comfort	Eppendorf
UVICON Spektrophotometer 922	Bio-Tek Kontron Instruments
Drehschüttler REA x2	Heidolph
MS2 Minishaker (Vortexer)	IKA®
Systec V-65 (Sterilisator)	Heraeus
<i>Odyssey infrared imaging system</i>	LI-COR Inc.
Laser <i>scanning</i> Mikroskop LSM 5 Pascal	Zeiss, Jena, Deutschland
pH-Meter 765 Calcimatic	Knick
8 Wells Chamberslide- Platte (Glasobjektträger)	Falcon, Becton Dickinson and Company, Le Pout De Claix, France
Zeiss- Mikroskop	Axiophot Jena, Deutschland
Plastikröhrchen	Falcon, Corning star, Wiesbaden, Germany

## 2.7 Antikörper

Name	Herkunft	Literatur
Monoklonaler Antikörper (mAb) 24B5	Eric Hansen ( University of Texas Southern Medical Center, Dallas Texas, USA)*	Der monoklonale Antikörper, bindet spezifisch an das Oberflächen Antigen (UspA-1) der <i>M. catarrhalis</i> Isolate [Cope et al. 1999]
Mab 8E7	Xin- Xing Gu (National Institute on Deafness and other Communication Disorders Rockville Maryland, USA)*	Der monoklonale Antikörper, 8E7 bindet ganz spezifisch an die Lipooligosacharide (LOS) des O35E, Serotyp A. [HU WG et al. 2001]
Polyklonaler Anikörper (Pab) MID	Kristian Riesebeck (Malmö University Hospital, Lund University, Malmö , Sweden)*	Der polyklonale Antikörper ist gerichtet gegen das kurze Immunglobulin D (IgD)-bindende Protein (MID 764-913) [Forsgren A. et al. 2003]
CD 66/CEACAM MAb, YTH 71.3.2	Serotec, Oxford, UK gekauft	Der Ratte- Antikörper bindet an den CEACAM 1- Rezeptor [siehe Dokumentation, Serotec,Oxford]
Anti-Asialo-GM1	WAKO Chemical, (Neuss Germany)	Polyklonale Kaninchen-Antikörper spezifisch für Asialo - GM1 [Ahmed K et al. 2002]
Kontroll Pabs	Sigma München, Deutschland	Unspezifische Mäuse, Ratten und Kaninchen- Antikörper siehe SIGMA Dokumentation

\*) Wir danken den in der Literatur erwähnten Arbeitsgruppen für die freundliche zur Verfügungstellung der o.g. Antikörper.

### 3 Methoden

#### 3.1 *M. catarrhalis* Stämme

Die *M. catarrhalis* – Stämme wurden langfristig als Glycerinstocks bei  $-80^{\circ}$  C, bzw. in speziellem Gefriermedium bei  $-20^{\circ}$  C gelagert. Bei Bedarf wurden sie auf Agarplatten ausgestrichen oder in BHI- Medium angeimpft und über Nacht bei  $37^{\circ}$  C inkubiert.

### 3.2 Zellkultur

Die BEAS-2B Zellen wurden in Anwesenheit von 10 ml des entsprechenden Zellkulturmediums in T75-Zellkulturflaschen 3 bis 4 Tage im Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Die nun konfluenten Zellen wurden je nach Verwendungszweck in Petrischalen, 6-Well-, oder 24-Well-Platten bzw. auf TC-Chamberslides™ (Glasobjektträger, 8 Kammern) gesplittet. Alle Kulturgefäße wurden mit *coating*-Lösung für mindestens 30 min. vorbehandelt, um den Zellen bessere Adhäsionsmöglichkeiten zu schaffen. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS/- gewaschen, mit 2 ml 0,5% Trypsin-EDTA abgelöst und mit 10 ml Medium restlos abgelöst. Diese Zellsuspension wurde bei 12000 U/min für 5 min zentrifugiert und danach das Pellet mit 200 µl des Trypsininhibitors ETI resuspendiert. Die entsprechende Menge an Zellkulturmedium wurde zugesetzt und die Zelllösung auf die vorbehandelten Kulturgefäße verteilt.

Die A549-Zellen und die HEP-2 Zellen wurden bis auf die Vorbehandlung der Kulturflaschen in gleicher Weise wie die BEAS-2B Zellen kultiviert.

#### Infektion von humanen Zellen (BEAS-2B, A549, HEP-2)

Die Monolayer der entsprechenden Zelllinien wurden über Nacht auf antibiotikafreies Zellkulturmedium gesetzt. Am nächsten Tag wurden die Moraxellen mit einer Öse von der Agarplatte abgenommen und in Zellkulturmedium suspendiert. Anschließend wurde die Konzentration der Bakterien mittels Messung der optischen Dichte (OD)-Bestimmung bei 405 nm bestimmt. (OD = 0,3 entspricht  $1 \times 10^6$  cfu / ml). Zur Infektion der Monolayer wurde nun eine MOI („multiplicity of infection“) von 0,1, 1 oder 10 Bakterien pro Zelle für die Infektion des Zelllayers mit der entsprechenden Bakteriensuspension berechnet, zusätzlich wurde bei den Experimenten zur MOI Abhängigkeit der Adhäsion eine MOI von 1:100 und 1:500 verwendet. Die Bakteriensuspension wurde auf die Monolayer gegeben und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> für die entsprechende Versuchszeit inkubiert. Für einige Experimente wurde die berechnete Bakteriensuspension vor ihrem Einsatz zunächst entweder bei 95 °C für 30 min Hitzeinaktiviert bzw. für 45 min UV-Licht inaktiviert.



### **3.3 Der Mikroskopie-basierte Adhäsionsassay**

Für die mikroskopische Quantifizierung der Adhäsion von *M. catarrhalis* an Epithelzellen wurde eine modifizierte von Hu et al., 2001 beschriebene Methode verwandt. Je  $1 \times 10^4$  Zellen wurden auf Chamberslides (Glasobjektträger) gepflanzt und über 24- 48 Stunden im Brutschrank kultiviert, bis sie eine Konfluenz von etwa 50% erreicht hatten. Anschliessend wurden die Zellen mit *M. catarrhalis* infiziert und bei 37 °C inkubiert und nach Pappenheim angefärbt. Die Präparate wurden dann mikroskopisch untersucht und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte durch eine am Mikroskop vorgenommene Auszählung der adhärenen Bakterien pro Zelle von insgesamt 50 Zellen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert der adhärenen Bakterien /Zelle  $\pm$  Standard Abweichung angegeben. Alle Experimente wurden dreimal wiederholt.

### **3.4 Der colony forming unit (cfu)-basierte Adhäsionsassay**

Der cfu.-basierte Adhäsionsassay wurde nach der Beschreibung von Lafontaine et al., 2000 bzw. Forsgren et al., 2003 durchgeführt. Je  $5 \times 10^4$  Zellen wurden pro Well einer 24 Well-Platte bepflanzt und bis zur Konfluenz der Zellen über 2-3 Tage im Brutschrank kultiviert. 12-15 h vor dem Experiment wurden die Zellen auf antibiotikafreies Zellkulturmedium umgesetzt. Anschliessend wurden sie mit unterschiedlichen MOI *M. catarrhalis* für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die nicht-adhärenen Bakterien durch 5-malige Waschung mit PBS bei Raumtemperatur entfernt. Die Ablösung des Epithelzelllayers von dem Plattenboden erfolgte durch eine 10-minütige Zugabe von 250  $\mu$ L Trypsin pro Well. Die Zellen wurden dann in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und über 1 Minute bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext. Zur Ermittlung der Keimzahl in der Zellsuspension wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, im Anschluß je 100  $\mu$ L der Verdünnungen auf BHI-Platten ausplattiert und über 12 Stunden im Inkubator bebrütet. Für die Berechnung der Keimzahl wurden die auf der BHI-Platte gewachsenen Einzelkolonien ausgezählt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Aus den Werten wurden Mittelwerte errechnet und als cfu/ Well dokumentiert. Alle Versuche wurden dreimal wiederholt.

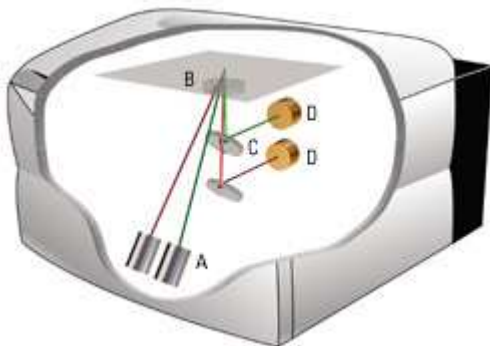
### 3.5 Der Autoaggregationsassay

Über Nacht auf *brain heart infusion* (BHI) Agar kultivierte *M. catarrhalis* Kolonien wurden abgelöst und in 2 ml PBS resuspendiert. Anschliessend wurde mittels OD Bestimmung in mehreren 15 ml Falcon Röhrchen Bakteriensuspensionen mit gleicher Bakterienanzahl zugegeben, die initial auf eine  $OD_{405} = 1.0-1.2; \sim 10^8-10^9$  Zellen/ml abgeglichen waren. Diese Lösungen wurden bei 37 °C unter einer 5% CO<sub>2</sub> Atomsphäre inkubiert. Um Autoaggregation quantitativ zu bestimmen, wurde aus jedem Röhrchen zu einem der Zeitpunkte 0, 30, 60, 120 und 180 min. je 1ml der Überstände abgenommen und die  $OD_{405}$  bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels der Dokumentation der  $OD_{405}$  Änderung über der Zeit. [Zhang, P. et al. 2004]

### 3.6 Der Fluoreszenz -basierte Adhäsionsassay

Zur Quantifizierung der Adhäsion von *M. catarrhalis* an Epithelzellen wurde von uns eine neue Methode unter Verwendung des LiCor® Verfahrens etabliert. Zunächst wurden  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well einer 48 Wellplatte bepflanzt und bis zur Konfluenz der Zellen bei 37°C bebrütet. *M. catarrhalis* wurde 12 h vor dem Experiment auf eine Agarplatte ausgestrichen und im Brutschrank inkubiert. Am Tag der Untersuchung wurden die Bakterien in dem Zellkulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der OD, wurde eine Bakteriensuspension in entsprechender Konzentration hergestellt und bei einer MOI von 0.1, 1 und 10 Bakterien/Zelle in jedes Well zugesetzt. Anschliessend erfolgte die Inkubation über 1 h bei 37 °C. Nach 5-maligem Waschen mit PBS bei Raumtemperatur wurden die nicht-adhärenen Bakterien abgewaschen und die Platte mit (PFA) Lösung für 10 min. fixiert. Zum Abblocken von unspezifischen Antikörperbindungen wurden die Zellen für eine Stunde mit dem Odyssey Blockpuffer und einem Zusatz von 0,05% Tween 20 für 1 h überschichtet. Danach erfolgte die einstündige Inkubation unter Zusatz des primären Antikörpers Mab 24B5 (1µg/ml). Dadurch sollten die adhärenen Bakterien auf der Oberfläche der Zellschicht detektiert werden. Anschliessend wurde der Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und es erfolgte die Detektion des primären mit einem sekundären Antikörper, der mit IRDye 800 markiert ist (Anti-Mausantikörper). Als nächstes wurde der Antikörper durch dreimaliges Waschen von der Zellschicht mit PBS entfernt. Für die Visualisierung der Epithelzellen wurden die Zellen mit dem die Zelle permeabilisierenden Nukleinsäure

Farbstoff SYTO 63 (IRDye 700, Verdünnung 1:10000) für 20 min. inkubiert und anschliessend 2 x mit PBS gewaschen. Die Intensität der Fluoreszenz Emission des mit IRDye 800 markierten Antikörpers und von Syto 63 wurde gleichzeitig visualisiert unter Verwendung von zwei verschiedenen Fluoreszenz-Kanälen bei  $\lambda = 700 \text{ nm}$  und  $800 \text{ nm}$  durch das Odyssey™ Infrared Imaging System visualisiert. Die relative Fluoreszenzintensität (RFI) wurde berechnet aus dem Verhältnis der Intensität der Fluoreszenz-Emission des IRDye 800 Antikörpers zu der Intensität der Fluoreszenz-Emission des IRDye 700/SYTO 63 Farbstoffes. Das Signal des IRDye 800 repräsentiert die Anzahl der markierten adhärennten Bakterien, das Signal des IRDye 700/SYTO 63 repräsentiert die Fläche des konfluenten Epithelzelllayers. Die Intensität der adhärennten *M. catarrhalis* wurde berechnet durch das Verhältnis der integrierten Signalintensitäten (ISI) (Peak-Flächen) der Emissionssignale bei 680 und 780 nm. Alle Versuche wurden dreimal durchgeführt.



Odyssey infrared imaging system von LiCor Inc. besitzt zwei IR Detektionskanäle deren Strahlenverlauf durch einen halbdurchlässigen Spiegel C getrennt wird und dann von den zwei IR Detektoren D registriert. (Graphik entnommen der Dokumentation des Herstellers (LiCor Inc).

Gemessen wird die Signalintensität des fluoreszierenden Lichts, das der Farbstoff abstrahlt. Im LiCor-Gerät wird die Signalintensität durch einen Detektor gemessen und als RFI-Wert angezeigt. (*relative Fluorescence Intensity*), d. h. die integrierte Fluoreszenz-Intensität des IRdye800 (repräsentiert die Bakterien) bezogen auf die integrierte Fluoreszenz-Intensität des IRdye700 (repräsentiert die bronchialepithelzellen).

### **3.7 Konfokalmikroskopie von *M. catarrhalis* Adhäsion an die Epithelzellen**

Mittels Konfokalmikroskopie wurde die Morphologie der adhärennten Bakterienkolonien und der Epithelzellen visualisiert.  $1 \times 10^4$  BEAS-2B Zellen wurden vor dem Experiment auf Glasplättchen in einer 24Well Platte ausgesät und bebrütet. Nach Erreichen der Konfluenz wurden sie mit unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen infiziert und über eine Stunde inkubiert. Nach 5-maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 20 min. mit 3% Paraformaldehyd Lösung fixiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 30 min. mit PBS plus Zusatz von 5% unspezifischem Serum, 1% BSA und 0,05% Tween 20 überschichtet, um unspezifische Bindungen von Antikörpern an die Zellen zu blockieren. Die Inkubation des primären Antikörpers (Mab 24B5, Verdünnung 1 $\mu$ l/ml) erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Zellen wurden dann in PBS gewaschen und mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (F(ab)<sub>2</sub> goat anti-mouse Alexa 488 conjugated Antibody, Molecular Probes) in einer Verdünnung von 1:6000 über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und es wurde eine F- Actinfärbung des Zytoskeletts [Erickson H. P. 2001] durchgeführt mit dem Phalloidin Farbstoff Alexa 546 (Molecular Probes) in einer Verdünnung von 1:200 für 30 min. Eine Kontrollfärbung wurde ohne Inkubation mit dem primären Antikörper durchgeführt. Die Auswertung und die Fotodokumentation erfolgte mit einem Laser Scanning Mikroskop LSM 5 Pascal.

### **3.8 Statistische Auswertungsmethode**

Die two-way ANOVA Methode wurde verwendet um die Effekte des Odyssey blocking Puffers, der MOI der hinzugefügten *M. catarrhalis* pro Well, der Detektionsmethoden und der Konzentration der Bakterien pro Well zu bestimmen. Bei Auftreten von signifikanten Unterschieden wurden die Mittelwerte mit der one-way ANOVA Methode verglichen, um sowohl die Effekte der Detektionsmethoden für jede hinzugefügte Bakterienkonzentration als auch die Effekte der hinzugefügten Bakterienkonzentrationen für jede Detektionsmethode zu bestimmen. Die one-way ANOVA Methode wurde ausserdem verwendet, um die Adhäsion von *M. catarrhalis* bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen miteinander zu vergleichen. Bei einem p-Wert ( $p < 0.05$ ) wurde eine statistische Signifikanz angenommen. Um die Variation der

einzelnen Untersuchungsergebnisse des cfu-basierten Assays und des Mikroskopie-basierten Assays zu quantifizieren, wurde die Adhäsion von *M. catarrhalis* an den Zellen bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen in jeweils drei verschiedenen Experimenten bei jeweils doppeltem Versuchsansatz wiederholt. Der Variationskoeffizient in Prozent wurde für verschiedene Assays berechnet. ( $SD\% = \text{Standardabweichung} \times 100 / \text{Mittelwert}$ ; engl.: standard deviation). Die Fehlerbalken der Balkendiagramme in den graphischen Darstellungen entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Quantifizierung der Adhäsion von verschiedenen *M. catarrhalis* Stämmen an die BEAS-2B Zellen mittels dem cfu-basierten und dem Mikroskopie-basierten Adhäsionsassay

Um einen Vergleich der Ergebnisse des Mikroskopie-basierten Adhäsionsassays mit dem cfu-basierten Adhäsionsassay zu ermöglichen, wurde mit beiden Assays eine Quantifizierung der Adhäsion der *M. catarrhalis* Stämme ATCC 25238 und O35E an der pulmonalen Epithelzelllinie BEAS-2B unter gleichen Stimulationsbedingungen durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit der eingesetzten Bakterienmenge pro Zelle zu erzielen, wurde die MOI (*Multiplicity of Infection*) berechnet. Mit der MOI, der Vielfachheit der Infektion, wird das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Agenzien wie Bakterien zu deren Zielzellen beschrieben. Für die Infektion der Zellen wurde die MOI dieser Kultur berechnet, indem die Konzentration der Bakterien in der Suspension in cfu/ml durch die Anzahl der Zellen pro Well (Vertiefung in einer Zellkulturplatte) dividiert wurde. Beispielsweise wurden bei einer MOI von 1 zur Infektion  $1 \times 10^6$  cfu/ml Bakterien eingesetzt, wenn pro Well  $5 \times 10^5$  Zellen gezählt wurden und 500  $\mu$ l Bakteriensuspension in Zellkulturmedium eingesetzt werden.

Die Resultate, die mit dem Mikroskopie-basierten Assay erzielt wurden zeigten, dass die Adhäsion der *M. catarrhalis* Stämme O35E und ATCC 25238 an den BEAS-2B Zellen von der Dosis der eingesetzten Bakterien (MOI) abhängig ist (Abb. 2A und 2B). Mit Erhöhung der MOI erhöhte sich auch die Zahl der adhärenenten Bakterien und erreichte ein Plateau bei einem MOI von 100. Bei dieser MOI wurde ein Durchschnitt von  $39.9 \pm 3,4$  Bakterien von Stamm O35E, und  $34,5 \pm 2,8$  Bakterien von Stamm

ATCC 25238 pro BEAS-2B Zelle gezählt. Der Variationskoeffizient (VK) der für die Ergebnisse von insgesamt drei unabhängigen Messungen der Adhäsion der *M. catarrhalis* Stämme ATCC 25238 und O35E berechnet wurde, lag bei einer Infektion mit *M. catarrhalis* mit einer MOI von 1:100 bei 8,2 % bzw. 8,4%. Da bei dieser Methode die Quantifizierung der Bakterien durch die mikroskopische Auszählung der adhärenen Bakterien pro Zelle erfolgt, erfordert dieses eine einschichtige, lediglich subkonfluente Zellschicht, Konfluenz 50-60%, um die einzelnen Epithelzellen für die Auszählung voneinander differenzieren zu können. Bei einer vollständig konfluenten Zellschicht ist die Unterscheidung der einzelnen Zellen nicht mehr möglich.

Die Resultate des cfu-basierten Assays bestätigten die dosisabhängige Adhäsionsfähigkeit des *M. catarrhalis* Stamm O35E an die BEAS-2B Zellen (Abb. 2B). Im Vergleich zu den Ergebnissen des Mikroskopie-basierten Adhäsionsassays (Abb. 2A) zeigten die Resultate des cfu-basierten Assays für die Adhäsion des ATCC 25238 Stammes allerdings deutlich grössere Abweichungen zwischen den einzelnen Messungsergebnissen. Im Falle der mit dem cfu-basierten Adhäsionsassays gewonnenen Ergebnisse gab es auch einen signifikanten Unterschied zwischen der Variationsbreite der einzelnen Messwerte in Abhängigkeit von dem untersuchten Bakterienstamm. Dabei war die Variationsbreite und der dazu berechnete Variationskoeffizient der Messergebnisse der Adhäsion des ATCC 25238 Stamm im Vergleich zu dem O35E Stamm signifikant grösser (Abb. 2B). Durch diese grosse Variationsbreite zwischen den einzelnen Messwerten, ist die Aussagekraft der Ergebnisse für den ATCC 25238 Stamm durch dieses Verfahren deutlich eingeschränkt.

Um auszuschließen, dass die Trypsinbehandlung und/oder das „vortexen“ (mischen) einen schädigenden Effekt auf die Bakterien gehabt haben könnte, möglicherweise diese dadurch abgetötet wurden, und damit den Effekt bedingt haben könnten, haben wir beide in BEAS-2B Medium suspendierte Bakterienstämme einmal mit und einmal ohne Trypsinbehandlung und mit bzw. ohne „vortexen“ auf ihre Wachstumseigenschaften hin untersucht. Nach dem Auftragen der bakteriellen Suspension auf BHI Agarplatten haben wir keine signifikanten Unterschiede der Wachstumseigenschaften (Anzahl der cfu/ml) zwischen beiden unterschiedlich behandelten Bakteriensuspensionen (mit und ohne Trypsinbehandlung) gefunden.

Deshalb ist ein Effekt der Trypsinbehandlung auf die Bakterienstämme auszuschliessen (Daten nicht gezeigt).

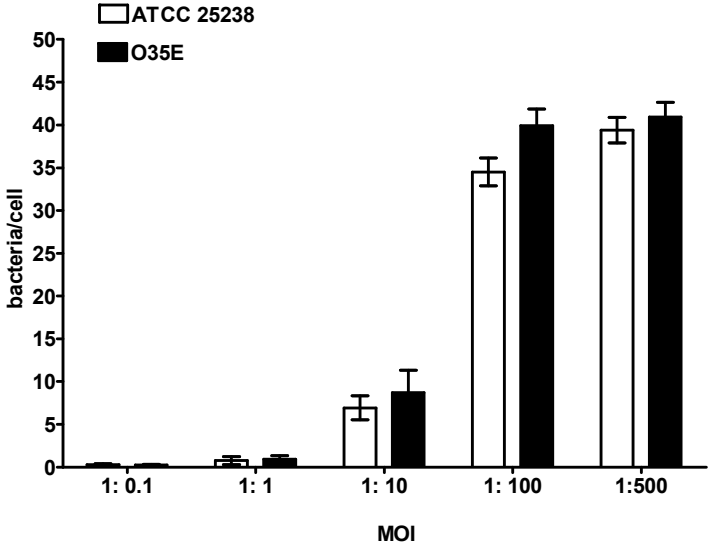


Abb. 2A

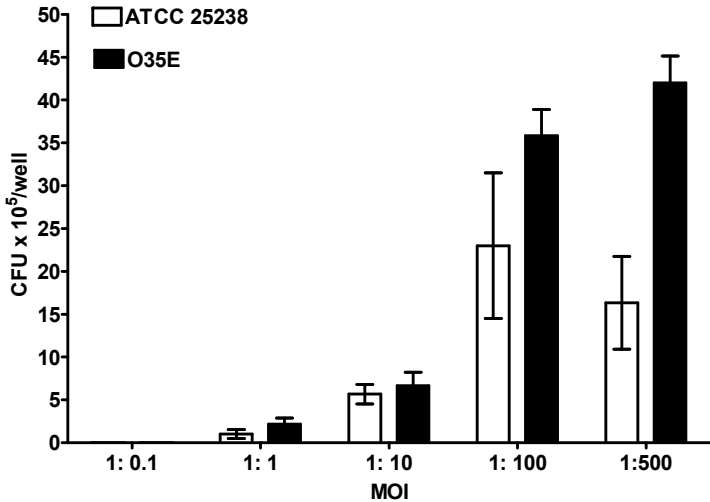


Abb. 2B

Abb. 2 Quantifizierung der Adhäsion unterschiedlicher *M. catarrhalis* Stämme an BEAS-2B Zellen mit dem Mikroskopie-basierten (A) und dem cfu-basierten (B) Adhäsionsassay.

Abb. A: Adhärenente Bakterien (*M. catarrhalis* Stamm O35E oder ATCC 25238) gemessen als gezählte Bakterien pro Zelle nach Inkubation der BEAS-2B Zellen bei den gezeigten Bakterienkonzentrationen (MOI 0,1 – 500) Abb. B: Adhärenente Bakterien (*M. catarrhalis* Stamm O35E oder ATCC 25238) gemessen als cfu/Well nach Inkubation der BEAS-2B Zellen bei den gezeigten Bakterienkonzentrationen (MOI 0.1 – 500) Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

#### **4.2 Autoaggregation und unterschiedliche Adhäsionsmuster der *M. catarrhalis* Stämme ATCC 25238 und O35E, mit BEAS-2B Zellen inkubiert**

Es wurde beschrieben, dass bei der Anwendung des cfu-basierten Assays aufgrund des Phänomens einer bakteriellen Autoaggregation die reale Menge der adhärenenten Bakterien höher sein kann, als die tatsächlich gemessene. [Blay Le et al. 2004]. Dabei bezeichnet die Autoaggregation die Bildung von multizellulären Bakterien-*Clustern* in reinen Bakteriensuspensionen, die durch Interaktionen und Zusammenlagerung der Bakterien untereinander entstehen [Donnenberg und Whittam 2001].

Daher stellten wir die Hypothese auf, dass die verschiedenen *M. catarrhalis*-Stämme O35E und ATCC 25238, eine unterschiedlich stark ausgeprägte Autoaggregation aufweisen, was die Unterschiede in der Variationsbreite der Messergebnisse zwischen diesen beiden Stämmen erklären könnte.

Um unsere Hypothese eines unterschiedlichen Autoaggregationsverhaltens beider *M. catarrhalis* Stämmen zu überprüfen, wurden die Bakterienstämme von O35E und ATCC 25238 in einem Medium suspendiert und die OD<sub>405</sub> (Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm) über die Zeit dokumentiert. Eine schnelle Abnahme der OD<sub>405</sub> über die Zeit ist hinweisend auf ein starkes Aggregationsverhalten der Bakterienstämme, die sich am Boden des Gefäßes zu *Clustern* zusammenlagern. Bei beiden Stämmen war eine deutliche Abnahme der OD<sub>405</sub> über die Zeit und damit eine vergleichbar starke Autoaggregationsfähigkeit zu beobachten siehe Abb. 3. Somit konnte eine unterschiedlich stark ausgebildete Autoaggregation als Ursache des Unterschiedes der Varianzbreite der Ergebnisse zwischen den Stämmen ausgeschlossen werden.



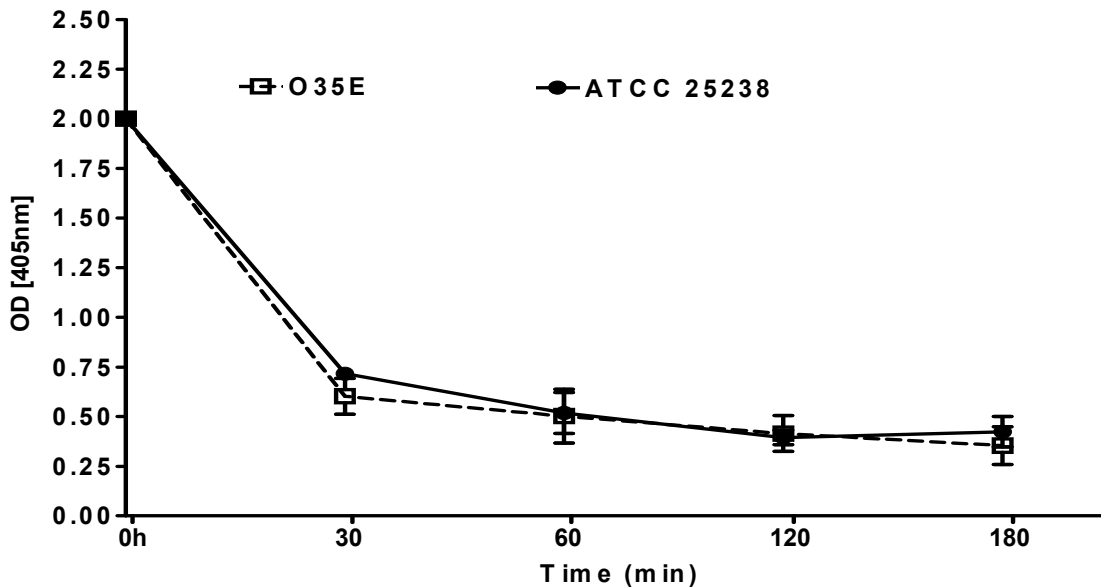


Abb. 3 Gezeigt ist die jeweilige Autoaggregationsfähigkeit der *M. catarrhalis* Stämme O35E und ATCC 25238 in Suspension durch Messung der optischen Dichte der Suspensionslösung über die Zeit.

Bei dem Mikroskopie-basierten Adhäsionsassay, durch den nicht nur die Anzahl der Bakterien, sondern auch die Morphologie der adhärierenden Bakterien auf den Zellen beurteilt werden kann, konnten wir Bakterienstamm- abhängige Unterschiede in den Adhäsionsmustern der Bakterien auf der Oberfläche der Epithelzellen zwischen den Stämmen ATCC 25238 und O35E beobachten. Der Stamm ATCC 25238 zeigte dabei eine deutliche Tendenz auf den Epithelzellen grössere Aggregate, bestehend aus vielen Bakterien zu bilden, wohingegen der O35E Stamm ein diffuseres Adhäsionsmuster an der Oberfläche von BEAS-2B Zellen zeigte.

Um den Unterschieden bei der Variationsbreite der Messergebnisse für die Quantifizierung der *M. catarrhalis* Stämme an BEAS-2B Zellen, die im cfu-basierten Assay gemessen wurden weiter nachzugehen, haben wir dieses Phänomen möglicher Unterschiede in den Adhäsionsmustern der *M. catarrhalis* Stämme mittels Konfokalmikroskopie näher untersucht. Nach einstündiger Inkubation mit *M. catarrhalis* fanden wir, dass der Bakterienstamm O35E diffus auf den Epithelzellen verteilt an der Zelloberfläche der BEAS-2B Zellen adhärerte (Abb. 4A), wohingegen der Bakterienstamm ATCC 25238 ein anderes Bindungsmuster an der Epitheloberfläche zeigte. Hier fanden sich vermehrt traubenartige Zusammenlagerungen der Bakterien

(Bakterienaggregate) auf der Oberfläche der Zellen (Abb. 4B). Die Ausbildung dieser Bakterienaggregate auf der Oberfläche der Zellen führt wahrscheinlich dazu, dass wenn diese suspendiert und dann auf Agar aufgetragen werden, eine verringerte Anzahl von zu zählenden Kolonien auf der Agarplatte wachsen und es ausserdem zu einer grösseren Streubreite kommt. Unsere Daten geben daher einen deutlichen Hinweis dafür, dass der Unterschied in den Adhäsionsmustern zwischen den beiden Stämmen von *M. catarrhalis* an die Epithelzelloberfläche die Ursache dafür sein könnte, dass beim cfu-basierten Assay für den Stamm ATCC 25238 eine reduzierte Adhäsion und eine erhöhte Variation zwischen den Ergebnissen mit einem erhöhten Variationskoeffizient bis zu 80% gemessen wurden.

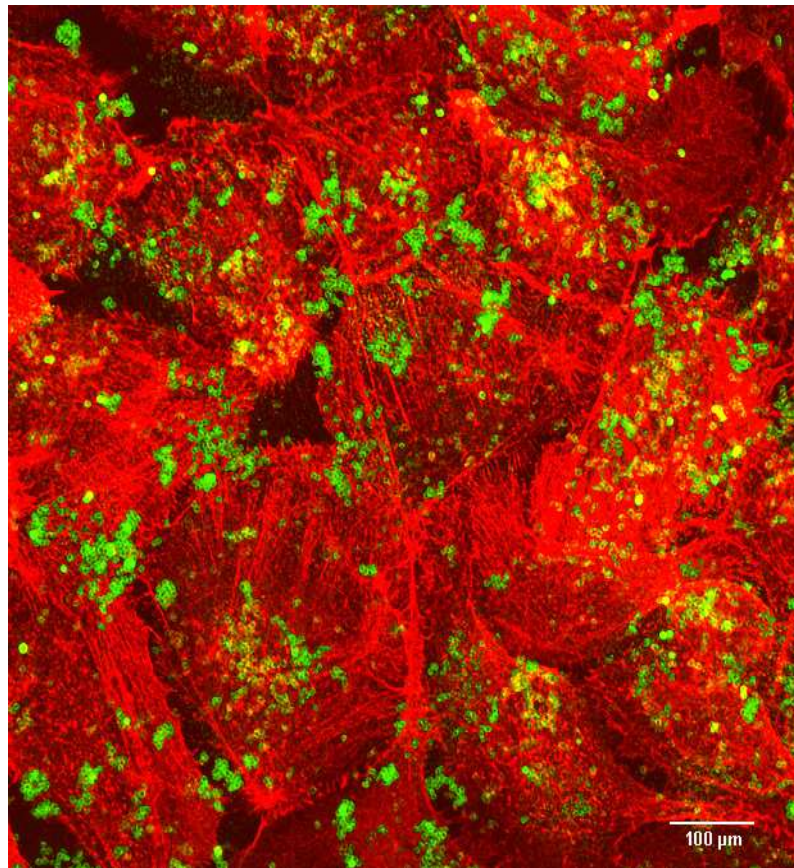


Abb. 4A

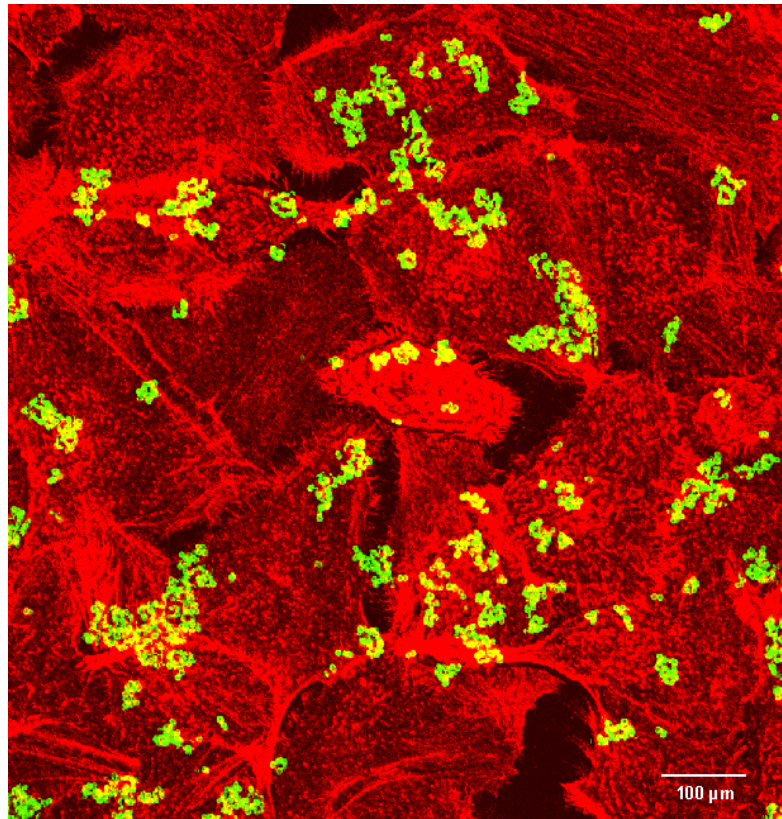


Abb. 4B

Abb. 4: Die beiden konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen die unterschiedlichen Adhäsionsmuster der *M. catarrhalis* Stämme O35E (A) und ATCC 25238 (B) an BEAS-2B Zellen nach einstündiger Inkubation. Die *M. catarrhalis* Stämme sind grün gefärbt, das F-Actin des Zytoskelett der BEAS-2B Zellen wurde rot gefärbt. Abb. A: Die Bakterien des O35E Stamms zeigen ein diffuses Adhäsionsmuster mit einer relativ gleichmäßigen Verteilung der adhärenenten Bakterien auf der Zelloberfläche. Abb. B: Die adhärenenten Bakterien des ATCC 25238 Stamms bilden vermehrt multizelluläre Aggregate.

#### 4.3 Vergleich der Quantifizierung der *M. catarrhalis* Adhäsion an den Epithelzelllinien: BEAS-2B, HEP-2 und A549 Zellen mittels des cfu-basierten bzw. des Mikroskopie-basierten Adhäsionsassays

Die Adhäsion von *M. catarrhalis* wurde an humanen Epithelzellen meistens unter Verwendung der HeLa Sublinie Hep-2 und der Lungenkarzinom Zelllinie A549 als

Zellkulturmodell untersucht [Aebi et al. 1998, Forsgren et al. 2003, Lafontaine et al. 2000, Lafontaine et al. 1995]. Häufig wurde in diesen Studien die Adhäsion an nur einer Zelllinie untersucht. Darüber hinaus kolonisiert *M. catarrhalis* auf der Bronchialschleimhaut, sodass Zelllinien, die von Bronchialepithel abstammen als *in vitro* Model für Infektionen mit *M. catarrhalis* von vornehmlicher Bedeutung sind.

Deshalb untersuchten wir, ob es Unterschiede in der Adhäsionsfähigkeit von *M. catarrhalis* zwischen den verschiedenen hauptsächlich untersuchten Zelllinien und der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B gibt. Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse musste dabei auch in Betracht gezogen werden, dass es durch die Verwendung verschiedener Adhäsionsassays, Zelllinien-bedingt zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen könnte. Deshalb quantifizierten wir die Adhäsionsfähigkeit beider *M. catarrhalis* Stämme an diese verschiedenen Zelllinien unter Verwendung beider Adhäsionsassays (Abb. 5A und B).

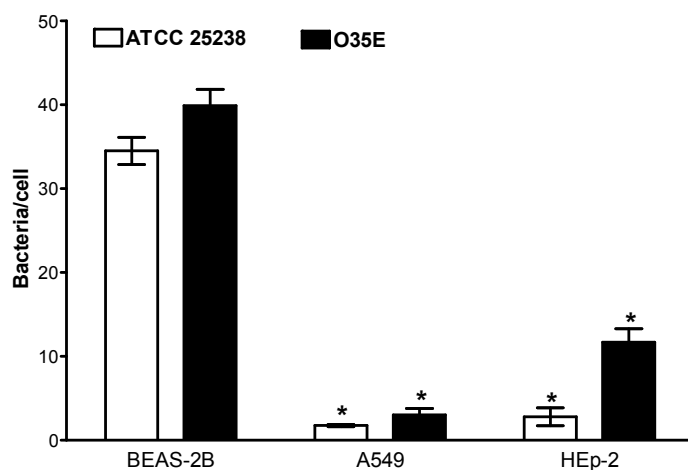


Abb. 5A

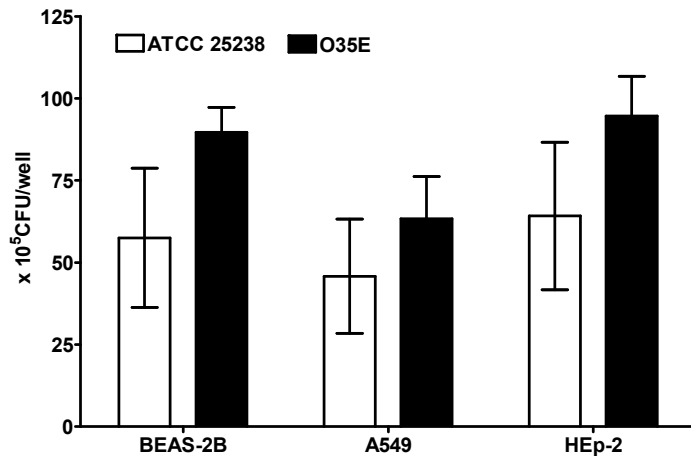


Abb. 5B

Abb. 5: Darstellung der Quantifizierung der Adhäsion der *M. catarrhalis* Stämme ATCC 25238 (weisse Säule) und O35E (schwarze Säule) an den Epithelzelllinien BEAS-2B, HEp-2 und A549 gemessen mit dem Mikroskopie-basierten Adhäsionsassay (Abb. 5A) und dem cfu-basierten Adhäsionsassay (Abb. 5B). \*P<0.05.

Bei Anwendung des Mikroskopie-basierten Assays gab es für das Adhäsionsverhalten für beide Stämme von *M. catarrhalis* signifikante Unterschiede bei den verwendeten Zelllinien, BEAS-2B, HEp-2 und die A549 Zellen (Abb. 5A).

Unter Verwendung dieses Assays war die Adhäsion von beiden *M. catarrhalis* Stämme an HEp-2 und A549 Zellen signifikant geringer, verglichen mit der Menge der adhärenenten Bakterien an den BEAS-2B Zellen.

Während  $39,9 \pm 3,4$  Bakterien / Zelle von Stamm O35E und  $34,5 \pm 2,8$  Bakterien von Stamm ATCC 25238 an BEAS-2B adhärirten, adhärirten ungefähr 75% weniger *M. catarrhalis* an HEp- 2 Zellen (Abb. 5A). Die Bakterien des *M. catarrhalis* Stammes O35E an die HEp-2 Zellen betrug  $11,6 \pm 1,8$  Bakterien / Zelle und der Mittelwert für Bakterien von Stamm ATCC 25238 an die HEp-2 Zellen betrug  $5,6 \pm 2,3$  Bakterien/ Zelle (Abb. 5A). Die Adhäsion von Bakterien beider *M. catarrhalis* Stämme an die A549 Zellen war verglichen mit der Adhäsion an den BEAS-2B Zellen um 85% reduziert. (Adhärenz von *M. catarrhalis* Stamm O35E  $4,4 \pm 1,7$  Bakterien/ A549 Zelle, und Stamm ATCC 25238:  $1,7 \pm 1,8$  Bakterien/ A549 Zelle) (Abb. 5A).

In einer weiterführenden Untersuchung konnten wir ausschließen, dass die Unterschiede des Adhäsionsverhaltens der Bakterien auf veränderte Wachstumseigenschaften der Bakterien im Kulturmedium zurückzuführen war. Dieses wurde geprüft, indem gleiche Konzentrationen von Bakterien in den unterschiedlichen Zellkulturmedien suspendiert wurden. Die Bakteriensuspensionen würden anschließend für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden je 100µl Bakteriensuspension auf einer Agarplatte ausgestrichen und über 12 Stunden inkubiert. Das Wachstum der Bakterien, gemessen in cfu/ml war für alle drei Kulturmedien vergleichbar und wies keine Unterschiede auf (Daten nicht gezeigt).

Demgegenüber gab es bei Anwendung des cfu-basierten Adhäsionsassays keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Adhäsionsfähigkeit beider *M. catarrhalis* Stämme an allen drei Zelllinien (Abb 5B). Allerdings zeigte sich auch bei den Messergebnissen des cfu-basierten Assays dieser Versuchsreihen wieder die hohe Varianz der Versuchsergebnisse des ATCC 25238 Stammes, sodass hier die Aussagekraft der Ergebnisse eingeschränkt wird.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle sagen, dass der cfu-basierte Adhäsionsassay sowie auch der Mikroskopie-basierte Assay methodisch bedingte Limitationen zeigten, die jeweils die Validität der Messergebnisse einschränkten.

Daher entwickelten wir einen Fluoreszenz-basierten Adhäsionsassay, der spezifische Antikörper für *M. catarrhalis* verwendet, welche eine genaue Quantifizierung der Adhäsion von *M. catarrhalis* am konfluenten Epithelzellmonolayer erlaubt.

#### **4.4 Validierung des Fluoreszenz-basierten Adhäsionsassay**

Um die Einschränkungen des Mikroskopie-basierten und cfu-basierten Assays zu überwinden, entwickelten wir einen neuen Adhäsionsassay mit einem neuen Messprinzip.

Der Fluoreszenz-basierter Adhäsionsassay sollte folgende Bedingungen erfüllen:

- Die bakterielle Adhäsion sollte auf konfluenten Monolayer bestimmt werden.
- Die Quantifizierung der bakteriellen Adhäsion sollte auf die epitheliale Zelloberfläche bezogen werden können.
- Die Adhäsionsmessung sollte nicht auf der Bestimmung von *colony forming units* /Well beruhen, sodass das Ergebnis nicht durch eine mögliche Bildung von Zell/Bakterienaggregaten verfälscht wird.

- Ausserdem sollte die Bestimmung der Adhäsion von abgetöteten Bakterien oder Bakterienbestandteilen möglich sein, weil das Testprinzip nicht auf der Viabilität der Bakterien beruht.

Das Messprinzip dieses neuen Assays basiert auf der quantitativen immunchemischen Detektion der adhärenen Bakterien durch eine sogenannte „*Double-Sandwich*“, Immundetektion unter Verwendung eines spezifischen primären Antikörpers, der gegen das Oberflächenmembranproteine UspA1 von *M. catarrhalis* gerichtet ist, der über einen Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper Zweitantikörper nachgewiesen wird. Abbildung 6 zeigt den schrittweisen Aufbau eines solchen „*Sandwiches*“.

In dieser Arbeit wurde eine neuere Methode der Detektion der gebundenen Antikörper mittels eines Li-Cor Odyssey™ Gerät angewandt. In dieser Methode diente der Antigen-spezifische Erstantikörper der Identifikation des gesuchten Proteins und wurde dann durch einen sekundären fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper direkt über Fluoreszenzanregung mittels eines Diodenlasers detektiert. Zur Durchführung des immunchemischen Nachweises wurden die Epithelzellen zunächst mit *M. catarrhalis* über 1 h infiziert und 5 mal mit PBS gewaschen. Dieser Schritt ist mit der Infektion der Zellen im Rahmen des cfu-basierten und des Mikroskopie-basierten Assays vergleichbar. Anschliessend wurden die Zellen mit PFA 3% fixiert und gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit Blockierungslösung (Li-Cor Blocking Buffer, 1:2 mit PBS) versetzt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach der Inkubation der Membran für 60 min. bei Raumtemperatur mit einer Verdünnung des Erstantikörpers in Blockierungslösung, zusätzlich versetzt mit 0,25%-TWEEN-20, wurden die nicht gebundenen Antikörper durch viermaliges Waschen für 5 min. mit PBS entfernt. Die Reaktion mit dem Zweitantikörper erfolgte anschließend in einer 1:1000 Verdünnung in gleicher Blockierungspuffer-Zusammensetzung wie bereits beim Erstantikörper beschrieben. Wiederum wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch viermaliges Waschen für 5 min. mit PBS entfernt. Im Anschluss wurde die Fluoreszenz auf der Nitrozellulosemembran mit Hilfe des Odyssey™ Scanners angeregt, gemessen und anschließend mit der dazugehörigen Software ausgewertet.

Um die gemessenen Signalintensitäten mit einem Mass für die epitheliale Oberfläche ins Verhältnis setzen zu können, sollten die Epithelzellen mit einem Farbstoff gleichmässig angefärbt werden, der Licht einer weiteren Wellenlänge emittiert, was bei

gleichzeitiger Detektion durch einen zweiten Kanal des LiCor Gerätes gemessen werden kann.

Dafür wurden der Fluoreszenz gelabelte Farbstoffe Phalloidin zur Anfärbung von Aktin und der rot-fluoreszierende Eukaryoten-spezifisch bindende Nukleinsäurefarbstoff SYTO 63 getestet.

Da Stimulationen der Zellen Änderungen des Zytoskeletts bzw. auch der Zellform bewirken können, sollte zunächst geprüft werden, ob sich nach Einsatz der Farbstoffe die Farbintensität der Zellen im Anschluss an Stimulationen ändern. Zytoskeletale Veränderungen wurden durch Inkubation der Zellen mit dem, die Mikrofilament zerstörende Substanz, Cytochalasin D (10mM) induziert. Um auszuschließen, dass es durch eine Stimulation mit einem pro-inflammatorischen Stimulus zu Veränderungen des Färbesignals kommt, haben wir die Zellen nach einer Inkubation mit Tumor Nekrose Faktor (TNF) $\alpha$  (50 $\mu$ M) und nach einer Infektion der Zellen mit *M. catarrhalis* bei unterschiedlichen MOI untersucht. Nach diesen verschiedenen Vorbehandlungen zeigte sich, dass sich die Signalintensitäten der Epithelzellen, die mit Phalloidin markiert worden waren deutlich abschwächt, während die gleichermassen vorbehandelten Zellen, die mit Syto 63 gefärbt worden waren, vor und nach der Stimulation keine Signalunterschiede zeigten (Daten nicht gezeigt). Daher ist Syto 63 als Markierungssubstanz der Epithelzelloberfläche gut geeignet und wurde zur Bestimmung der Zelloberfläche/Well in den nach folgenden Experimenten verwendet. Die jeweiligen Signalintensitäten der adhärierenden Bakterien wurden daraufhin auf das Syto 63 Signal normalisiert.



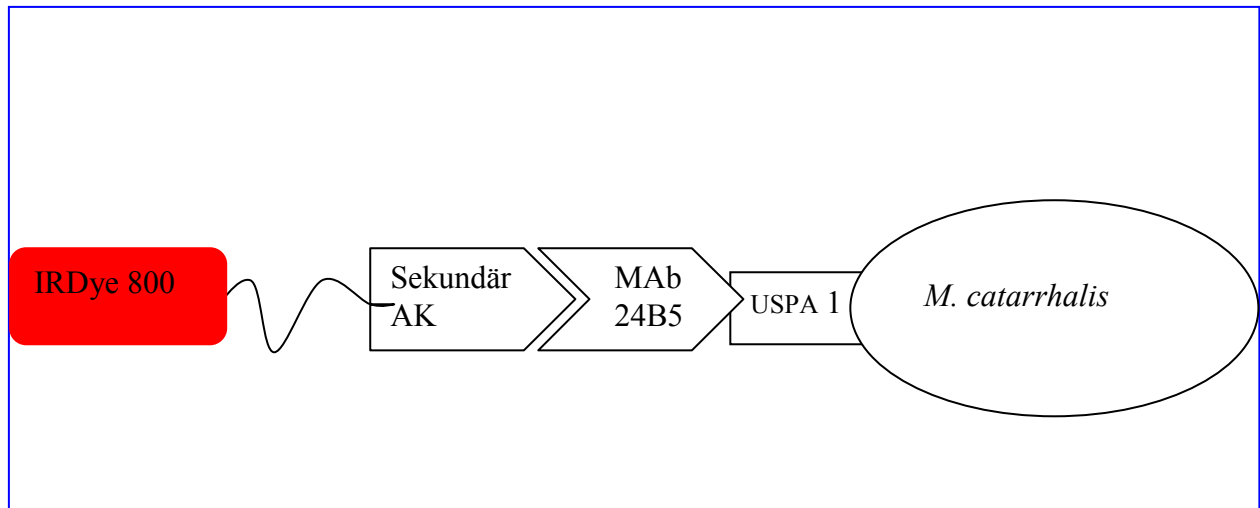


Abb. 6: Messprinzip der Quantifizierung von adhärenenten Bakterien mittels Immundetektion des *M. catarrhalis* spezifischen Oberflächenmembranproteins UspA1. Die am konfluenten Epithelzelllayer gebundenen Bakterien werden mittels spezifischem Antikörper detektiert und mit einem sekundären Fluoreszenz- gelabelten Antikörper markiert.

#### 4.5 Bestimmung der Adhäsion von *M. catarrhalis* an BEAS-2B Zellen mittels des Fluoreszenz-basierten Adhäsionsassays

Anschliessend untersuchten wir die dosisabhängige Adhäsion der *M. catarrhalis* Stämme O35E und ATCC 25238 an die BEAS-2B Zellen durch Anwendung dieses neuen Fluoreszenz-basierten Adhäsionsassays (Abb. 7A und 7B). Nach der Inkubation mit beiden *M. catarrhalis* Stämmen kam es zu einer signifikanten Erhöhung des RFI (*relative fluorescence intensity*) Wertes mit ansteigender Bakteriendosis und war bei einem MOI von 100 für beide *M. catarrhalis* Stämme um das 3-fache verglichen mit dem Kontrollwert angestiegen (Abb. 7A und 7B). Ausserdem war die Variabilität der Messergebnisse pro Versuchsreihe für beide Stämme vergleichbar. Der dafür errechnete Variationskoeffizient (VK) betrug für den Stamm O35E 34% bzw. für den Stamm ATCC 25238 27%.

Anschließend wurde die Zeitabhängigkeit der Adhäsion von beiden *M. catarrhalis* Stämmen an BEAS-2B Zellen untersucht. Wie in Abb. 7C dargestellt kam es eine Stunde nach Inkubation zu einem Maximum des Signals der adhärierenden Bakterien für beide Stämme an die BEAS-2B Zellen. Danach zeigte sich keine signifikante weitere Zunahme der Adhäsion bis 12 h nach der Infektion. Weiterhin untersuchten wir durch Anwendung des neuen Fluoreszenz-basierten Assays die Adhäsionsfähigkeit von *M. catarrhalis* an den verschiedenen Epithelzellen HEp-2, BEAS-2B und A549. Nach

einstündiger Inkubation mit den Bakterien gab es keinen signifikanten Unterschied in der Adhäsionsfähigkeit von *M. catarrhalis* zwischen den drei Zelllinien (Abb. 7D).

Um einen Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Adhäsionsassays zu ermöglichen, wurden für die Adhäsionsmessungen von *M. catarrhalis* an die BEAS-2B Zellen wieder dieselben Stimulationsbedingungen unter Verwendung gleicher MOI eingesetzt.

(Die linearen Korrelationskoeffizienten der direkten Korrelation zwischen beiden Methoden, der Fluoreszenz-basierten und der Mikroskopie-basierten wurden aus den Messdaten berechnet. ( $R^2$  für O35E = 0.822 [R=0.90] und  $R^2$  für den ATCC 25238 Stamm = 0.68 [R=0.82])

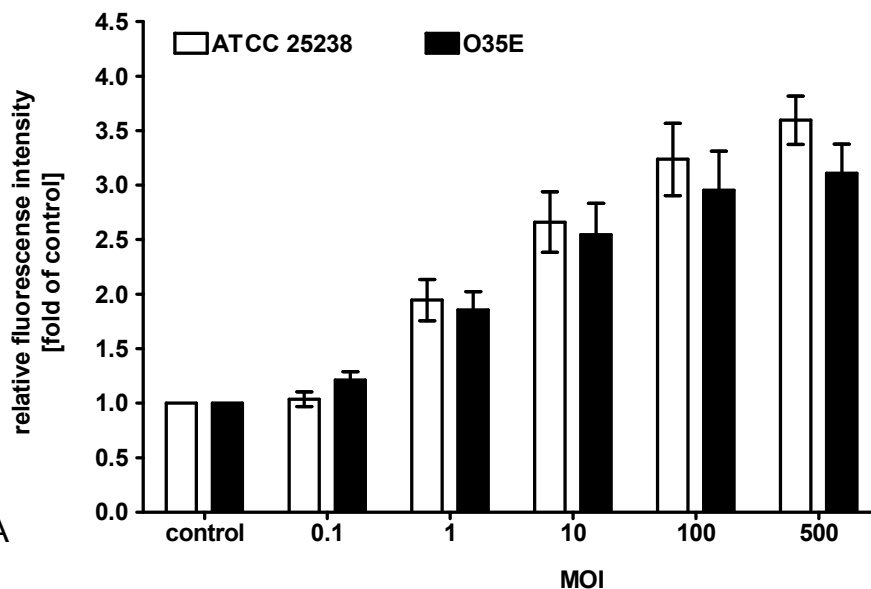


Abb. 7A

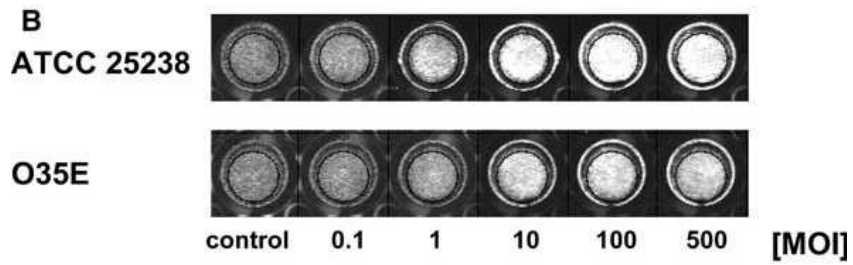


Abb. 7B

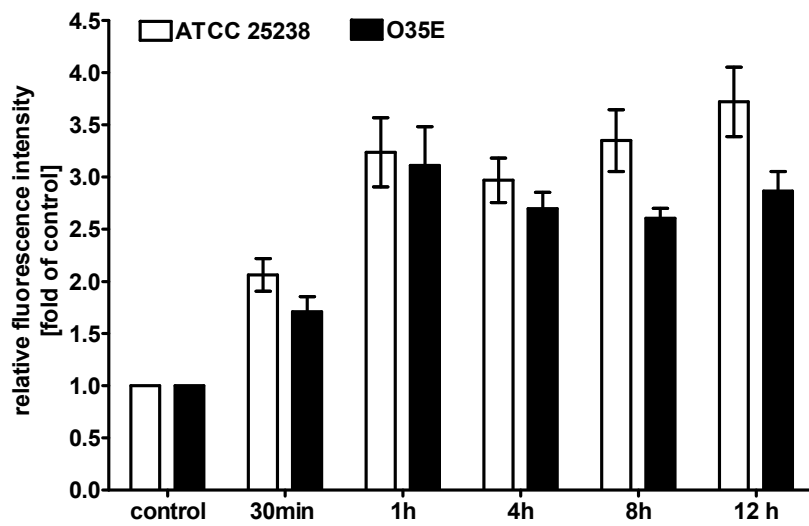


Abb. 7C

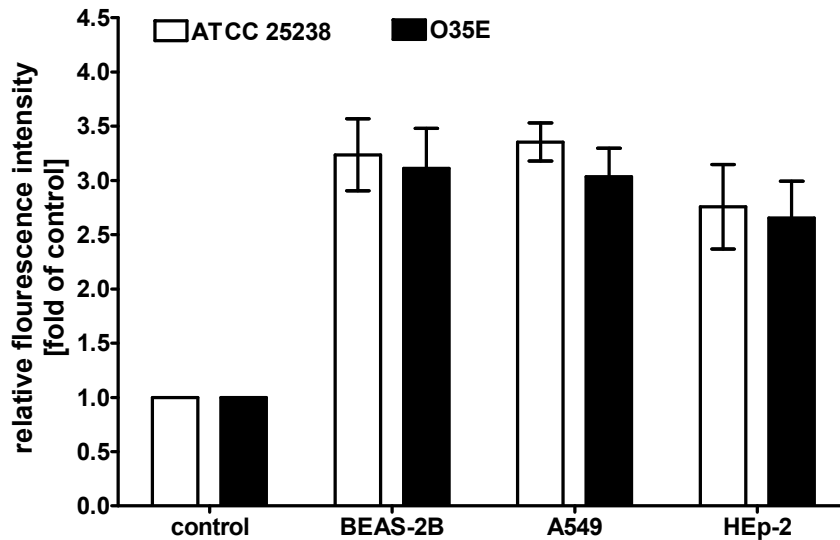


Abb. 7D

Abb. 7: Quantifizierung der Adhäsion von *M. catarrhalis* an Epithelzellen visualisiert und quantifiziert mittels des Fluoreszenz-basierten Adhäsionsassays A) Die BEAS-2B Zellen wurden mit *M. catarrhalis* infiziert und die adhärenenten Bakterien wurden visualisiert und quantifiziert durch Immundetektion unter Verwendung des Odyssey *infrared imaging system*. B) Repräsentative Fluoreszenzbilder der adhärenenten Bakterien an konfluenten BEAS-2B Zellmonolayer. C) Zeitlicher Verlauf der Adhäsion von *M. catarrhalis* an konfluente BEAS-2B Zellmonolayer (MOI 1:100 für 30 min., 1, 4, 8, 12 h) Quantifizierung wie A. C) Vergleich der Adhäsionsfähigkeit von *M. catarrhalis* an die Epithelzelllinien BEAS-2B, HEp-2 und A549.

#### 4.6. Vergleich der Ergebnisse der drei Adhäsionsassays

Um einen Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Adhäsionsassays zu ermöglichen, wurden für die Adhäsionsmessungen von *M. catarrhalis* an die BEAS-2B Zellen wieder dieselben Stimulationsbedingungen unter Verwendung gleicher MOI eingesetzt. Um die Ergebnisse des Fluoreszenz-basierten Assays mit denen des Mikroskopie-basierten Assays zu vergleichen, wurden die linearen Korrelationskoeffizienten der direkten Korrelation zwischen den Resultaten beider Methoden, der des Fluoreszenz-basierten und des Mikroskopie-basierten aus den Messdaten berechnet. Der Korrelationskoeffizient  $R^2$  betrug für die konzentrationsabhängige Adhäsion von *M. catarrhalis* Stamm O35E = 0.822 [R=0.90] und für den ATCC 25238 Stamm  $R^2 = 0.68$  [R=0.82]. Damit konnte zwischen den Ergebnissen beider Methoden ein signifikanter positiver linearer Zusammenhang nachgewiesen werden.

Um den Schwellenwert für den Fluoreszenz-basierten Assay zu bestimmen, wurde die relative Fluoreszenzintensität (RFI) für verschiedene Infektionskonzentrationen der *M. catarrhalis* pro Zelle verglichen. Bei einer MOI von 0.1 fanden wir keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, wohl aber gab es bei einer MOI von 0.1 im Vergleich zu einer MOI von 1 einen signifikanten Unterschied im RFI Wert. Die Resultate des Mikroskopie-basierten Assays hatten ergeben, dass bei einer MOI von 0,1 durchschnittlich 0,3 Bakterien je Stamm /Zelle adhärten und bei einer Infektionsdosis von MOI= 1 durchschnittlich 1 Bakterien/Zelle für O35E und 0.98 für ATCC 25238 pro BEAS-2B Zelle adhärten. Aus diesen Daten lässt sich abschätzen, dass der Schwellenwert für den Fluoreszenz-basierten Assay bei 1 Bakterium/Zelle liegt.

#### **4.7 Vergleich der Adhäsion der UspA1-defizienten *M. catarrhalis* Mutante O35E.1 und des hitzeinaktivierten O35E Stammes mit der Adhäsion des O35E Wildstammes an BEAS-2B Zellen bestimmt mit allen drei Adhäsionsassays**

Alle drei Methoden wurden angewandt und miteinander verglichen (Abb. 8). Die Anwendung des Fluoreszenz-basierten Assays ist limitiert auf Adhäsionsexperimente mit *M. catarrhalis* Stämmen die UspA1 exprimieren, da die Bakterien mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen UspA1 detektiert werden. Um einen alternativen spezifischen Antikörper zur *M. catarrhalis* Detektion zu finden, testeten wir Mab 8E7 gerichtet gegen *M. catarrhalis* LOS und den anti-MID<sup>764-913</sup> Antikörper, der gegen das IgD-bindende Protein von *M. catarrhalis* (MID) gerichtet ist. Aber beide zeigten ein signifikantes unspezifisches Hintergrundsignal auf Epithelzellen und konnten deshalb nicht für diesen Zweck verwendet werden. Daten nicht gezeigt.

Um die Spezifität des Antikörpers Mab 24B5 zu bestätigen, wurde die Adhäsionsfähigkeit der UspA1 defizienten *M. catarrhalis* Mutante O35E.1 an die BEAS-2B Zellen mit dem Wildtyp-Stamm O35E verglichen. Weil wir den anti-UspA1 spezifische primären Antikörper Mab 24B5 für die spezifische Detektion von *M. catarrhalis* bei dem Fluoreszenz-basierten Assay verwendeten, konnten bei diesem Assay Bakterien vom Stamm O35E.1 nicht detektiert werden, was gleichzeitig auch dessen Spezifität bewies (Abb. 8). Bei der Anwendung von sowohl des Mikroskopie-basierten als auch des cfu-basierten Assays konnten wir keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante bezüglich der Adhäsion der Bakterien an die BEAS-2B Zellen finden (Abb. 8).

Um den möglichen Einfluss bakterieller Oberflächenproteine auf die Adhäsionsfähigkeit zu untersuchen, inkubierten wir BEAS-2B Zellen mit einem hitzeinaktivierten O35E Stamm. Die erhaltenen Resultate unter Verwendung aller drei Assays zeigen, dass Hitzeinaktivierung zum vollständigen Verlust der Bindungsfähigkeit von *M. catarrhalis* an BEAS-2B Zellen führt. Da Hitzeeinwirkung überwiegend eine Denaturierung von proteinhaltigen Strukturen zur Folge hat, lässt sich vermuten, dass die bakteriellen adhäsiven Proteine maßgeblich an der Adhäsion von *M. catarrhalis* beteiligt sind (Abb. 8). Die Adhäsion der hitzeinaktivierten Bakterien an Epithelzellen konnte nicht mittels des cfu-basierten Assays untersucht werden, weil dieser Assay lebende Bakterien zur Koloniebildung benötigt.

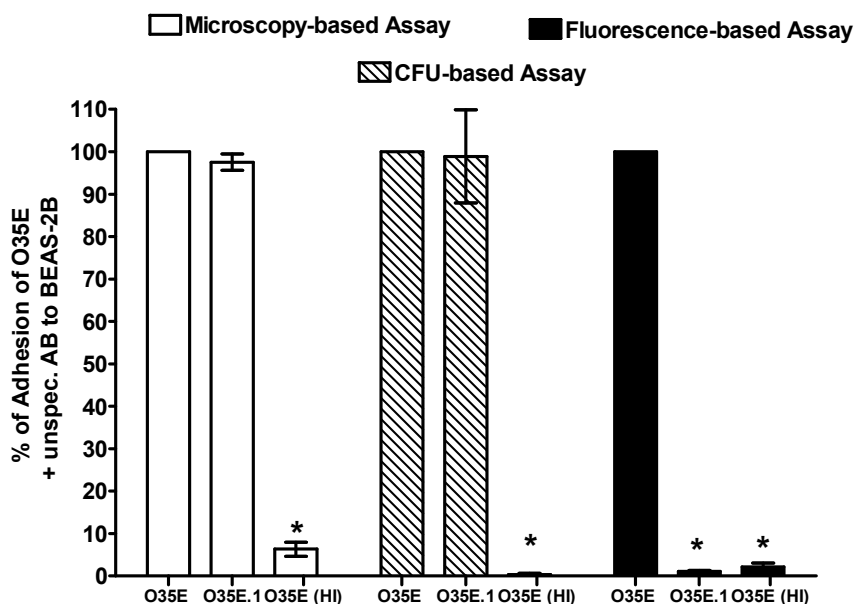


Abb. 8

Abb.8: Charakterisierung der Adhäsionsfähigkeit der UspA1-defizienten Mutante des *M. catarrhalis* Stamms O35E.1 und dem Hitze-inaktivierten *M. catarrhalis* Stamm O35E (HI) durch den Mikroskopie-basierten, den cfu-basierten und den Fluoreszenz-basierten Adhäsionsassay im Vergleich zum Wildtyp O35E. Die adhärenenten Bakterien wurden quantifiziert durch Anwendung aller drei Adhäsionsassays und die Werte wurden bezogen auf die Adhäsionsintensität des O35E Stamms, der auf 100% gesetzt wurde. Hitze-inaktivierte Bakterien konnten nicht mit dem cfu-basierten Assay untersucht werden, da dieses Assay lebende Bakterien zur Kolonienbildung benötigt. \*  $p > 0,05$

## 5 Diskussion

### 5.1 Die Bedeutung der Adhäsion des pathogenen Keims (*M. catarrhalis*) an den humanen Respirationstrakt

Die bakterielle Adhäsion an der Schleimhaut des humanen Respirationstraktes ist von fundamentaler Bedeutung für die Pathogenese *M. catarrhalis*-induzierter Infektionen. [McMichael JC und Green BA (2003), Murphy TF, Sethi S, Niedermann MS (2000), Sethi S (2000), Sethi S, Murphy TF (2001), Sethi S, Evans N, Grant BJB, Murphy TF (2002)]. Daher ist es von grosser Bedeutung, die zugrunde liegende bakteriellen Adhäsine und epithelialen Rezeptoren genauer zu untersuchen. Da sich die Expression bakterieller Rezeptoren auf Epithelzellen unterschiedlicher Herkunft unterscheiden [Cope L.D. et al. 1999 und Lafontaine E.R. et al. 1999], ist es für die Wahl der Zellkulturmodelle wichtig, Epithelzellen zu untersuchen, die ihren Ursprung im humanen Respirationstrakt haben.

Interessanterweise wurde die Adhäsion von *M. catarrhalis* bisher überwiegend an Epithelzellen untersucht, die nicht dem Respirationstrakt zuzuordnen waren, wie z. B., die Zervikalkarzinomzellen der HeLa Sublinie HEP-2 [Fitzgerald M. et al. 1999] und der HeLa Sublinie Chang-conjunctival Zellen [Hu W. et al. 2001]. Die Untersuchung der *M. catarrhalis* Adhäsion an humanen pulmonalen Epithelzellen (Lungenkarzinomzellen A-549) waren die Ausnahme [Holm MM, et al. 2003 und Forsgen A. et al. 2003]. Bronchialepithelzellen wurden in nur einem Fall verwendet bei [Rikitomi N. et al. 1997]. Daher haben wir diese Untersuchungen an den pulmonalen Epithelzellen A-549 und BEAS-2B durchgeführt und mit der HEP-2 Zelllinie verglichen. Hierbei zeigten sich Methoden-abhängig Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien.

### 5.2 Die Bedeutung der Konfluenz für die Adhäsion von Bakterien.

Die Zählung der adhärenenten Bakterien an den Epithelzellen beim Mikroskopie-basierten Adhäsionsassay benötigt Zell-Monolayer in einem subkonfluenten Zustand von 50%. Die Unterscheidbarkeit und Erkennbarkeit einzelner Epithelzellen ist bei einer höheren Konfluenz nicht möglich. Mit diesem Adhäsionsassay fanden sich zwischen den BEAS-2B Zellen auf der einen Seite und den A549 und HEP-2 Zellen auf der anderen Seite signifikante Adhäsionsunterschiede. Diese Unterschiede waren weder mit Hilfe des cfu-basierten noch mit Hilfe des Fluoreszenz-basierten Assays nachweisbar. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass die Konfluenz der Zellen für diese Unterschiede eine wichtige

Bedeutung haben könnte. Es ist zu vermuten, dass die unterschiedliche Adhäsion an Epithelzellen bei unterschiedlicher Konfluenz sich mit einer variierenden konfluenzabhängigen Expression von Rezeptoren erklären lässt, die für die Adhäsion von Moraxellen von Bedeutung sind. Es ist bekannt, dass in verschiedenen Phasen der Zelldifferenzierung die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle signifikant variiert [Ben Ze'ev A. 1997 und Singer B.B. et al. 2000]. Bei verschiedenen Typen von Carcinoma-Zellen wurden veränderte Eigenschaften und veränderte Expressionsmuster bei mehreren Zelladhäsionsrezeptoren beobachtet [Singer BB, et al. (2000) und Qualtrough D. et al. (2002), Hidaka N. et al. (1998)]. Unsere Daten sprechen dafür, dass die Adhäsion von *M. catarrhalis* an A549 und HEp-2 Zellen, die im Gegensatz zu BEAS-2B Zellen beides Karzinomzellen sind abhängig ist von dem Konfluenzstatus des Epithelzelllayers.

Dieses wurde zum Beispiel für den *M. catarrhalis*-spezifischen Rezeptor CEACAM1 beschrieben, der erst mit zunehmender Konfluenz auf den Zellen exprimiert wird [B.B. Singer et al. 2000]. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Mikroskopie-basierte Adhäsionsassay deutliche Limitationen aufweist, weil die Ergebnisse dieser Messungen möglicherweise durch konfluenzabhängige Unterschiede bei der Expression wichtiger Rezeptoren für die Adhäsion von *M. catarrhalis* beeinflusst werden.

### **5.3 Limitationen des cfu-basierten Assays**

Der cfu-basierte Assay weist erhebliche Limitation bezüglich der Sensitivität der Zelldetektion aufgrund seiner Methodik auf, da er selektive Medien benötigt und die Methode keine Zellen detektiert, die zwar noch infektiös aber nicht mehr kultivierbar sind. Beim cfu-basierten Assay fanden wir geringere cfu Zahlen für den ATCC 25238 Stamm im Vergleich zum O35E Stamm mit einer erheblich grösseren Streuung der Messwerte der Experimente. Dieser Unterschied konnte weder durch den Mikroskopie-basierten noch durch den Fluoreszenz-basierten Assay bestätigt werden. Es ist bekannt, dass der cfu-basierte Adhäsionsassay das Risiko einer Unterschätzung der Adhäsion durch Autoaggregation in sich trägt. [Bieber D. et al. 1998]. Diese haben wir durch unsere Experimente zwar untersucht, kann aber als Ursache ausgeschlossen werden, weil beide Stämme diesen Effekt gleichermassen zeigen. Mittels konfokalmikroskopischer Untersuchungen fanden wir aber, dass sich das Bindungsmuster beider Bakterienstämme auf der Oberfläche der Epithelzellen deutlich unterschied. Während *M. catarrhalis* Stamm O35E bei diffusem Verteilungsmuster nur



sehr geringe Aggregation zeigte, erzeugte der ATCC 25238 Stamm sehr viel grössere Aggregate auf der Oberfläche der BEAS-2B Epithelzellen (Abb. 4A und 4B). Diese unterschiedlichen stammabhängigen Adhäsionsmuster von *M. catarrhalis* an Epithelzellen könnten zu den unterschiedlichen Quantifizierungen bei dem cfu-basierten Assay geführt haben. Diese Aggregatbildungen auf der Zelloberfläche der BEAS-2B Zellen sind möglicherweise die Ursache für die Limitation der stammspezifischen grossen Variationsbreite der Ergebnisse dieses Assays.

#### **5.4 Der Fluoreszenz-basierte Adhäsionsassay**

Bei Anwendung des neu entwickelten Fluoreszenz-basierten Assays zeigten sich keine Unterschiede in der Intensität der *M. catarrhalis* Adhäsion zwischen den drei verschiedenen Zelllinien, die untersucht wurden. Dieser neue Assay beruht im Prinzip auf der Quantifizierung der adhärenen *M. catarrhalis* an Epithelzellen durch einen primären Antikörper, spezifisch für das Oberflächenmolekül UspA1 und folgender Immundetektion durch einen sekundären Antikörper, der mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert ist. Die konfluenten Epithelmonolayer wurden gefärbt und gleichzeitig mit einem zweiten Fluoreszenz-Detektionskanal visualisiert. Der Assay wurde bezüglich möglicher Veränderungen durch Zellfärbung (Zellaktivierung, Zytoskeletveränderungen) untersucht. Außerdem wurde die hohe Spezifität des primären *M. catarrhalis* detektierenden Antikörper bestätigt. Dieses Assay vereinfacht die reproduzierbare und validierte Quantifizierung der bakteriellen Adhäsion an intakte konfluente Epithelzellmonolayer. Die neue Methode ist einfacher in der Durchführung, schließt potentielle Subjektivität aus und erlaubt es mehrere Proben gleichzeitig zu messen.

Fluoreszenz Assays wurden bereits zur Messung anderer biomolekularer Parameter entwickelt, so z. B. Screening der Modulatoren der humanen organischen Aniontransporter OATP1B3 [Baltes Ch. et al. 2006], SARS-coronavirus 3CL Protease-Aktivität [Hamill P. et al. 2006].

Die Vorteile der Fluoreszenz-Signal-Detektion, wie hohe Sensitivität und geringes Signal-Rauschen, lassen es erwarten, dass Fluoreszenz Assays mit hochspezifischen Markern (*fluorescence labeled antibodies*) eine immer grösser werdende Verbreitung in der Labormedizin finden.

## 5.5 Die Bedeutung des OMP UspA1 für die Adhäsion von *M. catarrhalis* an Epithelzellen

Im Weiteren wurde die Spezifität des anti-UspA1 spezifischen Antikörpers Mab 24B5 für die Detektion der adhärenenten *M. catarrhalis* an Epithelzellen durch Messung der Adhäsionsintensität des *M. catarrhalis* Wildtyps O35E und der UspA1 defizienten Mutante O35E.1 mit allen drei Assays bestätigt. Unsere Daten zeigten, dass die UspA1 defiziente Mutante O35E.1 unter Verwendung des anti-UspA1 spezifischen Antikörper nicht mit dem Fluoreszenz-basierten Assay detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte der cfu-basierte Assay und der Mikroskopie-basierte Assay keine Reduktion der Anzahl des adhärenenten *M. catarrhalis* UspA1-defizienten Stamms O35E.1 (Mutante) im Vergleich zum Wildtyp O35E Stamm bei der Bindung an BEAS-2B Zellen. Es wird in der Literatur berichtet, dass das *M. catarrhalis* spezifische UspA1 als wichtiges Adhäsionsmolekül an humanem Epithel dient [Lafontaine E.R. et al. 2000, Aebi C. et al. 1998]. Es wurde ausserdem berichtet [Forsgen et al. 2003 Lafontaine E.R. et al. 2000, Aebi. C et al. 1998], dass das Fehlen der UspA1 Expression die Adhäsion von *M. catarrhalis* Stamm O35E an Chang konjunktivalen Epithelzellen und HEP-2 Zellen reduziert. Im Gegensatz dazu konnten Holm M.M. et al. 2003 keine signifikante Reduktion der Bindung der UspA1 defizienten Mutante O35E.1 an humanen Lungenzellkarzinomzellen A549 oder Mittelohrzellen (HMEE) finden, verglichen mit dem Wildtyp O35E. Unsere Daten weisen ebenfalls darauf hin, dass das UspA1 Molekül nicht signifikant in der quantitativen Bindung von *M. catarrhalis* an Zellen der BEAS-2B Zellen involviert ist.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass der cfu-basierte und der Mikroskopie-basierte Assay erhebliche Nachteile haben, die die Messergebnisse beeinflussen können. Bei dem cfu-basierten Adhäsionsassay benötigt man mehr Zeit und die Quantifizierung der *M. catarrhalis* auf Bronchialepithelzellen ist sehr ungenau. Bei dem Mikroskopie-basierten Adhäsionsassay benötigt man einen subkonfluenten Zellmonolayer und damit ein eingeschränktes Zellkulturmodell das ein aussagekräftiges Ergebnis durch Unterschiede bezüglich der Rezeptorexpression bei Teilkonfluenz ebenfalls beeinträchtigen kann. Der von uns neu etablierte Fluoreszenz-basierte Adhäsionsassay ist daher eine verlässliche und bequeme Alternative zur Quantifizierung der *M. catarrhalis* Adhäsion an konfluenten Epithelzellenmonolayer mit einer guten Reproduzierbarkeit und mit einer niedrigen Nachweisgrenze von einem

Bakterium pro Epithelzelle. Mit dieser neuen Methode können die Beschränkungen basierend auf dem bakteriellen Adhäsionsmuster oder dem Konfluenzstatus der Epithelzellen überwunden werden.

Tabellarischer Vergleich der Vor- und Nachteile des Fluoreszenz-basierten mit dem cfu-basierten Assay und dem Mikroskopie-basierten Assay

<b>Fluoreszenz-basierter Assay</b>	<b>cfu- basierter Assay</b>	<b>Mikroskopie-basierter Assay</b>
geringer Zeitaufwand	hoher Zeitaufwand	mässiger Zeitaufwand
präzise Quantifizierung	Quantifizierung durch mögliche Aggregatbildung der Bakterien ungenau	subjektive Quantifizierung
gute Reproduzierbarkeit	ungenau Validierung	bildgenaue Validierung
Nachweisgrenze bei einem Bakterium/Zelle	Nachweis nur von lebensfähigen Bakterien	Nachweisgrenze bei einem Bakterium/Zelle
Konfluenten Monolayer	Konfluenten Monolayer	Subkonfluenten Monolayer

**5.6. Ausblicke auf die zukünftige molekular-medizinische Forschung für COPD-Therapieansätze**

>Inhibition der Adhäsion pathogener Bakterien und Verhinderung der Internalisierung  
 Durch neue Forschungsansätze könnten Rezeptorenblocker die die Adhäsion verhindern entwickelt werden.

>Inhibition der Aktivierung der intrazellulären Entzündungsmediatoren  
 Entwicklung von Suppressoren, die in die Entzündungsmechanismen eingreifen und schon im Vorstadium die kaskadenartige Aktivierung der Entzündungsmediatoren blockieren. Es gibt einen neuen Therapieansatz, Rezeptoranaloga als anti-adhäsive Agenzien zu verwenden (kompetitive Inhibition). Die anti-adhäsive Therapie und

antiadhäsive Immunität soll zur Reduzierung des Kontaktes zwischen Wirtszellen und pathogene Bakterien führen. Die Adhäsion ist Voraussetzung zur Kolonisierung, die die Entwicklung der COPD zur Folge hat. Wenn man die Adhäsion von Bakterien durch antiadhäsive Agenzien verhindert, verhindert man die Kolonisation und Infektion [Ofek I. et al. 2003]. Daher ist es wichtig die Adhäsion von *M. catarrhalis* an Bronchialepithel zu quantifizieren.

#### >Vakzine

Eine Entwicklung der Vakzine hat große Bedeutung bei der zu erwartenden hohen Inzidenz der COPD und der damit verbundenen sozioökonomischen Konsequenzen. [Gu, X.X. et al. 1998, Hays, J.P. et al. 2003, Hu, W.G. et al. 1999].

Die Entwicklung neuer Vakzine konzentriert sich auf oberflächen-exponierte Antigene, einschliesslich *outer membrane proteins OMPs*, als auch Pili und andere Membran-assoziierte Proteine sowie LOS- Konjugate (*lipooligosaccharide-based-conjugates*) als Vakzin Möglichkeiten [McMichael J.C. und Green B.A. 2003, Gu X.X. et al. 1998, Murphy T.F. 2005]. Durch Blockierung der Adhäsion mit Adhäsion-basierten Vakzinen kann eine Prävention der Infektion erreicht werden. Durch anti-Adhäsion-Immunität reduziert sich der Kontakt zwischen dem respiratorischen Epithel und den pathogenen Bakterien [Ofek I. et al. 2003].

## 6 Zusammenfassung

*M. catarrhalis* ist der zweithäufigste Erreger der bakteriell bedingten Exazerbation der COPD. Die Adhäsion ist ein entscheidender Pathogenitätsfaktor von *M. catarrhalis*. Über Interaktionen zwischen Adhäsinen und Rezeptoren ist wenig bekannt. Zur Quantifizierung bakterieller Adhäsion an Epithelzellen wurden bisher ein auf der Auszählung von *colony-forming units* (cfu-basiertes Assay) und ein auf der mikroskopischen Auszählung von adhärenenten Bakterien pro einzelner Zelle basierender Adhäsionsassay (Mikroskopie-basiertes Assay) verwendet. Die simultane Visualisierung und Quantifizierung von Bakterien auf konfluenten Monolayern ist nicht möglich. Ziel dieser Arbeit war es, einen neuen Fluoreszenz-basierten Adhäsionsassay zu entwickeln und mit den o.g. Assays an verschiedenen Zelllinien (Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B, Lungenkarzinomzelle A549, Larynxkarzinomzelle HEP-2) zu vergleichen. Verwendet wurden die *M. catarrhalis* Stämme ATCC 25238 und O35E. Mit dem neuen Fluoreszenz-basierten Assay ließ sich eine Zeit- und Dosisabhängigkeit der Adhäsion beider *M. catarrhalis* Stämme an BEAS-2B Zellen zeigen. Die Ergebnisse des cfu-basierten Assays zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen, was auf Bildung von Bakterienaggregaten auf der Zelloberfläche erklärt werden konnte, die durch Konfokalmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie nachgewiesen werden konnten. Während sich bei der Adhäsion von *M. catarrhalis* an BEAS-2B Zellen kein Unterschied fand, wurden mittels des Mikroskopie-basierten Assays an den einzeln ausgezählten nicht-konfluenten A549 und HEP-2 Zellen signifikant weniger adhärenente *M. catarrhalis* nachgewiesen als mit den anderen Assays, was mit Unterschieden des Oberflächenrezeptorenbesatzes zwischen nicht-konfluenten und konfluenten Zellen dieser Zelllinien erklärt werden kann. Durch die Bildung von Bakterienaggregaten auf Epithelzellen bzw. Unterschiede zwischen konfluenten und nicht konfluenten Monolayern können Ergebnisse des Mikroskopie-basierten und des cfu-basierten Adhäsionsassays verfälscht werden. Der neue Fluoreszenz-basierte Assay kann bakterielle Adhäsion am konfluenten Monolayer valide visualisieren und quantifizieren.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abuhammour W. M., Abdel-Haq N. M., Asmar B. I. und Dajani A. S..** 1999. *M. catarrhalis* bacteremia: a 10-year experience. *South. Med. J.* **92**:1071–1074
- Aebi C., Maciver I., Latimer J. L., Cope L. D., Stevens M. K., Thomas S. E., McCracken, Jr. G. H. und Hansen E. J.** 1997. A protective epitope of *M. catarrhalis* is encoded by two different genes. *Infect. Immun.* **65**:4367-4377.
- Aebi C., Lafontaine E. R., Cope L. D., Latimer J. L., Lumbley S. L., McCracken, Jr. G. H. und Hansen E. J.** 1998. Phenotypic Effect of Isogenic *uspA1* and *uspA2* Mutations on *M. catarrhalis* 035E. *Infect. Immun.* **66**:3113-3119.
- Ahmed K., Suzuki Y., Miyamoto D. und Nagatake T.** 2002. Asialo-GM1 and asialo-GM2 are putative adhesion molecules for *M. catarrhalis* *Medical Microbiology and Immunology.* **191**:5-10.
- Baldes Ch., König P., Neumann D., Lenhof H.-P., Kohlbacher O. und Lehr C.-M.** (2006) Development of a fluorescence-based assay for screening of modulators of human Organic Anion Transporter 1B3 (OATP1B3) *Eur J Pharm Biopharm.* **62**(1):39-43.
- Barnes P. J., Shapiro S.D. und Pauwels R.A.** 2003. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J.* Oct;22(4):672-88. 672-688. DOI: 10.1183/09031936.03.00040703
- Ben Ze'ev, A.** 1997. Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Current Opinion in Cell Biology.* **9**:99-108.
- Bieber D., Ramer S. W., Wu C. Y., Murray W. J., Tobe T., Fernandez R. und Schoolnik G. K.** 1998. Type IV Pili, Transient Bacterial Aggregates, and Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* **280**:2114-2118.
- Boyle F. M., Georghiou P. R., Tilse M. H. und McCormack J. G.** 1991. *Branhamella (M.) catarrhalis*: Pathogenic significance in respiratory infections *MED. J. AUST.* **154**:592-596.
- Catlin B. W.** 1990. *Branhamella-Catarrhalis* - An Organism Gaining Respect As A Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews.* **3**:293-320.
- Cope L. D., Lafontaine E. R., Slaughter C. A., Hasemann C. A., Aebi C., Henderson F. W., McCracken G. H. und Hansen E. J.** 1999. Characterization of the *M. catarrhalis uspA1 uspA2* genes and their encoded products. *Journal of Bacteriology.* **181**:4026-4034.
- Cole P. und Wilson R.** 1989 Host-microbial relationships in respiratory infection. *Chest* **95**: 217-221
- deBentzmann, S., Roger P., Dupuit F., Bajolet-Laudinat O., Fuchey C., Plotkowski M. C. und Puchelle E.** 1996. Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas*

aeruginosa adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**:1582-1588.

**Diebold Y., Calonge M., de Salamanca A. E., Callejo S., Corrales R. M., Saez V., F. Siemasko K. und Stern M. E.** 2003. Characterization of a Spontaneously Immortalized Cell Line (IOBA-NHC) from Normal Human Conjunctiva. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**:4263-4274.

**Erickson H. P.** 2001. Cytoskeleton: Evolution in bacteria. *Nature.* **413**:30.

**Ermer L., Bruckner H., Walmrath D., Grimminger F., Aktories K., Suttrop N., Duncker H. R. und Seeger W.** 1995. Role of Endothelial Cytoskeleton in High-Permeability Edema Due to Botulinum C-2 Toxin in Perfused Rabbit Lungs. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* **12**:L753-L761.

**Fitzgerald M., Murphy S., Mulcahy R., Keane C., Coakley D. und Scott Th. (1999)** Tissue culture adherence and haemagglutination characteristics of *M. (Branhamella) catarrhalis* *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **24** (1999) 105-114

**Forsgren A., Brant M., Karamehmedovic M. und Riesbeck K.** 2003. The immunoglobulin D-binding protein MID from *M. catarrhalis* is also an adhesin. *Infect. Immun.* **71**:3302-3309. doi:10.1128/IAI71.6.3302-3309.2003

**Forsgren A., Brant M., Mollenkvist A., Muyombwe A., Janson H., Woin N. und Riesbeck K.** 2001. Isolation and characterization of a novel IgD-binding protein from *M. catarrhalis*. *Journal of Immunology.* **167**:2112-2120.

**GOLD** Global Initiative on Obstructive Lung Disease. Workshop Report, Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. <http://www.goldcopd.com/Guidelineitem.asp>, 26 Dec 2005]

**Gu X. X., Chen J., Barenkamp S. J., Robbins J. B., Tsai C. M., Lim D. J. und Battey J.** 1998. Synthesis and characterization of lipooligosaccharide-based conjugates as vaccine candidates for *M. (Branhamella) catarrhalis*. *Infect. Immun.* **66**:1891-1897.

**Hamill P., Hudson D., Kao R.Y., Chow P., Raj M., Xu H., Richer M.J. und Jean F.** Development of a red-shifted fluorescence-based assay for SARS-coronavirus 3CL protease: identification of a novel class of anti-SARS agents from the tropical marine sponge *Axinella corrugate* *Biological Chemistry*, 2006, **387**(8):1063-1074 doi: 10.1515/BC.2006.131

**Hays J. P., van der Schee C., Loogman A., Eadie K., Verduin C., Faden H., Verbrugh H. und van Belkum A.** 2003. Total genome polymorphism and low frequency of intra-genomic variation in the *uspA1* and *uspA2* genes of *M. catarrhalis* in otitis prone and non-prone children up to 2 years of age: Consequences for vaccine design? *Vaccine.* **21**:1118-1124.

**Herold G.** Innere Medizin, eBook: <http://www.herold-innere-medizin.de>; ISBN: HEROLD2007; Ausgabetermin 15. November 2006

**Hidaka N., Nagao T., Asoh A., Kondo Y., und Nagao K.** 1998. Expression of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin in bronchioloalveolar carcinoma and conventional pulmonary adenocarcinoma: An immunohistochemical study. *Modern Pathology*. **11**:1039-1045.

**Hill D. J. und Virji M.** 2003. A novel cell-binding mechanism of *M. catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1 *Molecular Microbiology*. **48**:117-129.

**Holm M. M., Vanlerberg S. L., Foley I. M., Sledjeski D. D. und Lafontaine E. R.** 2004. The *M. catarrhalis* porin-like outer membrane protein CD is an adhesin for human lung cells. *Infect. Immun.* **72**:1906-1913.

**Holm M. M., Vanlerberg S. L., Sledjeski D. D. und Lafontaine E. R.** 2003. The hag protein of *M. catarrhalis* strain O35E is associated with adherence to human lung and middle ear cells. *Infect. Immun.* **71**:4977-4984.

**Hu E. G., Chen J., Battey J. F. und Gu X. X.** 2000. Enhancement of clearance of bacteria from murine lungs by immunization with detoxified lipooligosaccharide from *M. catarrhalis* conjugated to proteins. *Infect. Immun.* **68**:4980-4985.

**Hu W. G., Berry J., Chen J. und Gu X. X.** 2004. Exploration of *M. catarrhalis* outer membrane proteins, CD and UspA, as new carriers for lipooligosaccharide-based conjugates. *Fems Immunology and Medical Microbiology*. **41**:109-115.

**Hu W. G., Chen J., Collins F. M. und Gu X. X.** 1999. An aerosol challenge mouse model for *M. catarrhalis*. *Vaccine*. **18**:799-804.

**Hu W. G., Chen J., McMichael J. C. und Gu X. X.** 2001. Functional characteristics of a protective monoclonal antibody against serotype A and C lipooligosaccharides from *M. catarrhalis*. *Infect. Immun.* **69**:1358-1363.

**Lafontaine E. R., Cope L. D., Aebi C., Latimer J. L., McCracken G. H. und Hansen E. J.** 2000. The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *M. catarrhalis* to human epithelial cells in vitro. *Journal of Bacteriology*. **182**:1364-1373.

**Lafontaine E. R., Wagner N. J. und Hansen E. J.** 2001. Expression of the *M. catarrhalis* UspA1 protein undergoes phase variation and is regulated at the transcriptional level. *Journal of Bacteriology*. **183**:1540-1551.

**Le Blay G., Fliss I. und Lacroix C.** 2004. Comparative detection of bacterial adhesion to Caco-2 cells with ELISA, radioactivity and plate count methods. *Journal of Microbiological Methods*. **59**:211-221.



**Lewin A., Freytag B., Meister B., Sharbati-Tehrani S., Schafer H. und Appel B.** 2003 Use of a quantitative TaqMan-PCR for the fast quantification of mycobacteria in broth culture, eukaryotic cell culture and tissue. *J Vet Med Ser B Infect Dis Vet Public Health* 50:505

**Lorenz J. (2001)** Exazerbation der chronischen Bronchitis. S. 31-54. In: *Atemwegsinfektionen in Klinik und Praxis*. 1. Auflage. UNI-MED-Verlatg. Bremen, London, Boston

**Masters J. R.** 2002. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer*. 2:315-319.

**McMichael J. C. und Green B. A.** 2003. Vaccines for *M. catarrhalis* and non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 4:953-958.

**Miravittles M.** 2002. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: when are bacteria important. *Eur Respir.J. Suppl.* 36: 9s-19s

**Murphy T. F., Sethi S. und Niederman M. S.** 2000. The role of bacteria in exacerbations of COPD - a constructive view. *Chest*. 118:204-209.

**Murphy T. F., Brauer A.L., Grant B.J.B. und Sethi S.** 2005 *M. catarrhalis* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Burden of Disease and Immune response. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 195-199, As doi: 10.1164/rccm.

**Murphy T.F.** 2005 Vaccine development for non-typeable *Haemophilus influenzae* and *M. catarrhalis*: progress and challenges. *Expert Review of Vaccines* 4:843-853 doi: 10.1586/14760584.4.6.843

**Murphy T.F.** 2006 The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of COPD. *Curr Opin Infect. Dis* 19:225-230

**Ofek I., Hasty D.L. und Sharon N.** 2003 Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 38: 181-191

**Patel I.S., Seemungal T.A.R., Wilks M., Lloyd-Owen S.J., Donaldson G.C. und Wedzicha J.A.** Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character and severity of COPD-exacerbations *Thorax* 2002;57:759-764

**Pearson M. M., Lafontaine E. R., Wagner N. J., Geme J. W. III und Hansen E. J.** 2002. A hag Mutant of *M. catarrhalis* Strain O35E Is Deficient in Hemagglutination, Autoagglutination, and Immunoglobulin D-Binding Activities. *Infect. Immun.* 70:4523-4533. doi:10.1128/IAL70.8.4523-4533.2002

**Qualtrough D., Hinoi T., Fearon E. und Paraskeva C.** 2002. Expression of CDX2 in normal and neoplastic human colon tissue and during differentiation of an in vitro model system. *Gut*. 51:184-190.

**Reddel R. R., Ke Y., Gerwin B. I., Mcmenamin M. G. Lechner J. F., Su R. T., Brash D. E., Park J. B., Rhim J. S. und Harris C. C.** 1988. 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.* **48**:1904-1909.

**Rikitomi N, Ahmed K und Nagatake T** (1997) M. (*Branhamella*) *catarrhalis* adherence to human bronchial and oropharyngeal cells: the role of adherence in lower respiratory tract infections. *Microbiol Immunol* 41:487

**Rikitomi N., Andersson B., Matsumoto K., Lindstedt R. und Svanborg C.** 1991. Mechanism of adherence of *M. (Branhamella) catarrhalis*. *Scand. J. Infect. Dis.* **23**:559–567.

**Rosell A., Monso, E., Soler, N., Torres, F., Angrill, J. und Riise,G.,** (2005) Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* **165**: 891–897.

**Rubens C.E., Smith S., Hulse M., Chi E.Y. und van Belle G.** Respiratory Epithelial Cell Invasion by Group B Streptococci Infection and Immunity, 1992 p. 5157-5163 Vol.60

**Saint Jean M., Baudouin C., Di Nolfo M., Roman S., Lozato P., Warnet J. M. und Brignole F.** 2004. Comparison of morphological and functional characteristics of primary-cultured human conjunctival epithelium and of Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival cell line. *Experimental Eye Research.* **78**:257-274.

**Schöllhorn K.A.,** thesis 2003, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Akute Exazerbation der chronisch obstruktiven Atemwegserkrankung (COPD): Retrospektiver Vergleich zweier Patientenpopulationen mit bakterieller und nicht bakterieller Ätiologie und Analyse des Erregerspektrums in Abhängigkeit vom Erkrankungsschweregrad nach GOLD-Klassifikation.

**Seemungal T.A.R., Donaldson G.C., Paul E.A., Bestall J.C., Jeffries D.J. und Wedzicha J.A.,** 1998 Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157: 1418-1422

**Senior R.M. und Anthonisen N.R.** 1998 Chronic obstructive pulmonary disease COPD. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157: 139-147

**Sethi S.** 2000. Infectious etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest.* **117**:380S-385S.

**Sethi S., Evans N., Grant B. J. B. und Murphy T. F.** 2002. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *New England Journal of Medicine.* **347**:465-471.

**Sethi S. und Murphy T. F.** 2001. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clinical Microbiology Reviews*. **14**:336-+.

**Singer B. B., Scheffrahn I. und Obrink B.** 2000. The Tumor Growth-inhibiting Cell Adhesion Molecule CEACAM1 (C-CAM) Is Differently Expressed in Proliferating and Quiescent Epithelial Cells and Regulates Cell Proliferation. *Cancer Res*. **60**:1236-1244.

**Timpe J. M., Holm M. M., Vanlerberg S. L., Basrur V. und Lafontaine E. R.** 2003. Identification of a *M. catarrhalis* outer membrane protein exhibiting both adhesin and lipolytic activities'. *Infect. Immun*. **71**:4341-4350. doi:10.1128/IAL71.8.4341-4350.2003

**Tumkaya M., Atis S., Ozge C., Delialioglu N., Polat G. und Kanik. A.** 2006 Relationship between airway colonization, inflammation and exacerbation frequency in COPD. *Respiratory Medicine* 101, 729-737 doi: 10.1016/j.rmed.2006.08.020

**Verduin C.M.M., Hol C., Fleer A., van Dijk H. und van Belkum A.** *M. catarrhalis*: from Emerging to Established Pathogen. *Clin. Microbil. Rev.* 2002, **15**: 125-144.

**Wilkinson T. M., Patel I.S., Wilks M., Donaldson G.C. und Wedzicha J.A.** (2003) Airway bacterial load and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **167**: 1090–1095.

**Zhang P., Chomel B. B., Schau M. K., Goo J. S., Droz S., Kelminson K. L., George S. S., Lerche N. W. und Koehler J. E.** 2004. A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. *PNAS*. **101**:13630-13635.

## Erklärung

„Ich, Krishna Nand Tiwari, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Quantifizierung der Adhäsion von *Moraxella catarrhalis* an pulmonalen Epithelzellen und Etablierung eines neuen Fluoreszenz-basierten Adhäsionsassays, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“