

**Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité-Universitätsmedizin Berlin
Eingereicht über das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Regulation der Expression und Sekretion von CEACAM8 durch Granulozyten und
deren Rolle auf humanen pulmonalen Epithelzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

**vorgelegt von
Lena Kerneck (geborene Opp)
Tierärztin
aus Hamburg**

**Berlin 2013
Journal Nr: 3709**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar Wieler
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hortense Slevogt
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Heidrun Gehlen

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Inflammation, immune response, respiratory system, neutrophils, glycoproteins,
tyrosine, toll-like receptors (MeSH), Cell Adhesion Molecules (MeSH)

Tag der Promotion: 24.09.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-539-8

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Abbildungen	IV
Tabellen	V
Abkürzungen.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Zielsetzung.....	2
1.2 Fragestellung.....	2
2 Schrifttum	4
2.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)	4
2.1.1 Definition	4
2.1.2 Epidemiologie	4
2.1.3 Risikofaktoren.....	4
2.1.4 Pathogenese	4
2.2 Die Rolle von Granulozyten in der COPD	5
2.3 Zytokine, Chemokine, Interleukin 8 und NF- κ B	6
2.3.1 Zytokine	6
2.3.2 Chemokine	6
2.3.3 Interleukin 8 und NF- κ B.....	6
2.4 Die Rolle von Bakterien in der COPD	7
2.5 <i>Moraxella catarrhalis</i>	7
2.5.1 Allgemeines	7
2.5.2 Virulenzfaktoren	8
2.6 <i>Haemophilus influenzae</i>	9
2.6.1 Allgemeines	9
2.6.2 Virulenzfaktoren	9
2.7 Die CEACAMs	9
2.7.1 CEACAM1	10
2.7.2 CEACAM8	11
2.8 Die angeborene Immunabwehr	12

2.8.1 <i>Pattern recognition receptors</i>	12
2.8.2 Granulozyten.....	13
2.9 <i>Toll-like</i> Rezeptoren	14
2.9.1 TLR2.....	15
2.10 Signalkaskaden	16
2.10.1 TLR2-Signalkaskade	16
2.10.2 CEACAM1 Signalkaskade	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Material.....	18
3.1.1 Zelllinien und Zellkultur	18
3.1.2 Bakterienkultur	21
3.1.3 Molekularbiologische Methoden	23
3.2 Methoden	47
3.2.1 Zellbiologische Methoden	47
3.2.2 Mikrobiologische Methoden.....	50
3.2.3 Molekularbiologische Methoden	52
3.2.4 Statistik	59
4 Ergebnisse	61
4.1 PMA (Phorbol-Myristat-Acetat)-aktivierte Phenotypen der humanen Granulozyten zeigen sowohl eine erhöhte Expression des CEACAM8 Rezeptors auf der Zelloberfläche als auch eine vermehrte Sekretion des löslichen CEACAM8	61
4.2 Regulation von Sekretion und Expression von CEACAM8 durch humane Granulozyten wird unterschiedlich reguliert durch TLR7 und TLR9.....	64
4.3 Die PMA und TLR9 abhängige Sekretion von löslichem CEACAM8 durch humane Granulozyten wird durch den Aktin Inhibitor Cytochalasin D gehemmt.....	68
4.4 Lösliches CEACAM8 bindet an zellgebundenes CEACAM1 und hemmt somit die TLR2-induzierte Immunantwort auf NHBE Zellen	70
4.5 Die Bindung von CEACAM8 an CEACAM1 auf pulmonalem Epithel vermittelt die Inhibition der TLR2-abhängigen Immunantwort	72
4.6 Einfluss der Anwesenheit von CEACAM8 für die CEACAM1-vermittelte Reduktion der durch Bakterien vermittelten Immunantwort in A549-Zellen.....	75

4.7 Die CEACAM8-vermittelte Inhibition der TLR2-getriggerten epithelialen Immunantwort wird über die SHP1-vermittelte Inhibition des PI3K/AKT Signalweges vermittelt.....	77
4.8 Klinische Daten: Eine hohe Anzahl an Granulozyten in der humanen Bronchoalveolären Lavage (BAL) korreliert mit der Anwesenheit von löslichem CEACAM8	80
5 Diskussion	83
5.1 Diskussion der Ergebnisse.....	83
5.1.1 CEACAM8 Sekretion durch aktivierte Granulozyten.....	83
5.1.2 CEACAM8 Expression auf aktivierten Granulozyten.....	84
5.1.3 CEACAM8 in humaner BAL	84
5.1.4 Interaktion zwischen <i>M. catarrhalis</i> bzw. <i>H. influenzae</i> und CEACAM1	85
5.1.5 CEACAM1-vermittelte Inhibition der TLR2-Immunantwort.....	86
5.2 Diskussion der eingesetzten Materialien	87
5.2.1 Auswahl der Zellen.....	87
5.2.2 Auswahl der Bakterien.....	87
5.3 Ausblick	88
6 Zusammenfassung/Summary	89
6.1 Zusammenfassung	89
6.2 Summary.....	89
7 Referenzen.....	91
8 Anhang	101
8.1 Publikationen	101
8.2 Danksagung	102
8.3 Selbstständigkeitserklärung	103

Abbildungen

- Abb. 2.1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Moraxella catarrhalis*
- Abb. 2.2:** Struktur und Aufbau von CEACAM1
- Abb. 2.3:** Struktur und Aufbau von CEACAM8
- Abb. 4.1a:** Expression von CD62L durch PMA-aktivierte Granulozyten
- Abb. 4.1b:** Expression von CEACAM8 durch PMA-aktivierte Granulozyten
- Abb. 4.1c:** Sekretion von CEACAM8 durch PMA-aktivierte Granulozyten
- Abb. 4.1d:** Sekretion von Interleukin 8 durch PMA-aktivierte Granulozyten
- Abb. 4.2a:** Regulation der Expression von CEACAM8 durch humane Granulozyten
- Abb. 4.2b:** Regulation der Sekretion von CEACAM8 durch humane Granulozyten
- Abb. 4.2c:** Regulation der Sekretion von Interleukin 8 durch humane Granulozyten
- Abb. 4.2d:** Regulation der Sekretion von CEACAM8 durch Bakterien
- Abb. 4.2e:** Regulation der Expression von CEACAM8 durch Bakterien
- Abb. 4.3a:** Hemmung der PMA-induzierten CEACAM8 Sekretion
- Abb. 4.3b:** Hemmung der CpG-induzierten CEACAM8 Sekretion
- Abb. 4.4a:** Expression von TLR2 und CEACAM1 auf NHBE Zellen
- Abb. 4.4b:** Reduktion der IL8 Ausschüttung auf NHBE Zellen
- Abb. 4.5a:** Expression von TLR2 und CEACAM1 auf A549 Zellen
- Abb. 4.5b:** Aufhebung des hemmenden Effektes von CEACAM8 auf die IL8 Sekretion durch A549 Zellen
- Abb. 4.5c:** Überlebensrate der A549 Zellen
- Abb. 4.5d, e:** Runterregulierung von CEACAM1 auf A549 Zellen
- Abb. 4.5f:** CEACAM8-vermittelte Hemmung der IL8 Sekretion ist CEACAM1-abhängig
- Abb. 4.6a:** CEACAM1-abhängige Reduktion der durch *Moraxella catarrhalis*-vermittelten Immunantwort
- Abb. 4.6b:** CEACAM1-abhängige Reduktion der durch *Haemophilus influenzae*-vermittelten Immunantwort
- Abb. 4.7a:** CEACAM8-abhängige Phosphorylierung von CEACAM1 und Rekrutierung von SHP1
- Abb. 4.7b:** CEACAM8-abhängige Phosphorylierung von Akt
- Abb. 4.7c:** CEACAM8-abhängige Bindung von p65 und der Polymerase II an den IL8 Promoter

Tabellen

Tab. 3.1:	Zellkultur- und Stimulationsmedien der NHBE Zellen
Tab. 3.2:	Zellkultur-, Stimulations- und Kryokonservierungsmedien der A549 Zellen
Tab. 3.3:	Stimulationsmedium der Granulozyten
Tab. 3.4:	Lösung zur Auftrennung der Granulozyten
Tab. 3.5:	Materialien für die Kultur von <i>Moraxella catarrhalis</i>
Tab. 3.6:	Materialien für die Kultur von <i>Haemophilus influenzae</i>
Tab. 3.7:	Puffer für die PCR
Tab. 3.8:	Mastermix für die RT-PCR
Tab. 3.9:	Mastermix für die PCR
Tab. 3.10:	Zusammensetzung des Agarosegels für die Gelelektrophorese
Tab. 3.11:	PCR-Primer
Tab. 3.12:	Puffer und Lösungen für FACS
Tab. 3.13:	FACS Antikörper
Tab. 3.14:	Transfektionsreagenzien
Tab. 3.15:	siRNA Sequenzen
Tab. 3.16:	ELISA Puffer und Lösungen
Tab. 3.17:	ELISA Antikörper
Tab. 3.18:	Western Blot Puffer und Lösungen
Tab. 3.19:	Western Blot Gele
Tab. 3.20:	Western Blot Antikörper
Tab. 3.21:	Immunpräzipitation/ Ko-Immunpräzipitation Puffer und Lösungen
Tab. 3.22:	Immunpräzipitation/ Ko-Immunpräzipitation Antikörper
Tab. 3.23:	ChIP Puffer und Lösungen
Tab. 3.24:	Aufreinigung der DNA für ChIP
Tab. 3.25:	Mastermix PCR für ChIP
Tab. 3.26:	Antikörper Immunpräzipitation für ChIP
Tab. 3.27:	IL8 Promoterprimer für ChIP
Tab. 3.28:	Cycler Programm CHIP-PCR
Tab. 3.29:	Stimulanzen
Tab. 3.30:	Inhibitoren
Tab. 3.31:	Positive Kontrolle
Tab. 3.32:	Negative Kontrolle
Tab. 3.33:	Verbrauchssubstanzen
Tab. 3.34:	Verbrauchsmaterialien
Tab. 3.35:	Geräte

- Tab. 3.36:** Analysesoftware
- Tab. 3.37:** Polymerase Kettenreaktion
- Tab. 3.38:** Einteilung der Spender in Gruppen anhand der Granulozytenzahl in der
BAL
- Tab. 3.39:** Anwesenheit von CEACAM8 in der BAL
- Tab. 3.40:** Zusammenhang der Granulozytenzahl und der Anwesenheit von
CEACAM8 in der BAL

Abkürzungen

2N H ₂ SO ₄	2 normale Schwefelsäure
A. dest./bidest.	destilliertes/zweifach destilliertes Wasser
A549	alveoläre karzinogene Bronchialzellen
Ak/Ab	Antikörper, engl.: <i>antibody</i>
Akt	Serin/Threonin-Kinase (Proteinkinase B)
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BEBM	Bronchialepithelzell-Basalmedium
BHI	engl.: <i>brain heart infusion</i>
BSA	bovines Serumalbumin
c	Kontrolle
CC1	CEACAM1
CC8	CEACAM8
CD62L	L-Selektin
CD66b	engl.: <i>Cluster of differentiation 66b</i>
CD66a	engl.: <i>Cluster of differentiation 66a</i>
CD	Cytochalasin D
CEA	engl.: <i>carcinoembryonic antigen</i>
CEACAM	engl.: <i>carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule</i>
CHX	Cycloheximide
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
C.I.	engl.: <i>confidence interval</i> ; Konfidenzintervall
cfu	engl.: <i>colony forming units</i> ; Kolonie-bildende Einheiten
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	engl.: <i>chronic obstructive pulmonary disease</i> ; chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CpG	Cytosin Phosphat Guanin
DMEM	engl.: <i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotide
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen
ECL	engl.: <i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	engl.: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ; Ethylenediaminetetraessigsäure
EGTA	engl.: <i>ethyleneglycoldiaminetetraacetic acid</i> ; Ethylenglykoldiaminetetraessigsäure

ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ; Enzym gekoppelter Immunadsorptionstest
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i> ; Durchflusszytometrie
FCS	engl.: <i>fetal calve serum</i> ; fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-5-isothiocyanat
Fl	Flagellin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	engl.: <i>granulocyte-monocyte colony-stimulating factor</i>
GM-6001	Galardin, N-((2R)-2-(Hydroxamidocarbonylmethyl)-4-methylpentanoyl)-L-tryptophan Methylamide
GOLD	engl.: <i>Global Initiative of Obstructive Lung Disease</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
H.i.	<i>Haemophilus influenzae</i>
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HBSS	engl.: <i>HEPES buffered saline solution</i> ; HEPES gepufferte Salzlösung
HCl	Chlorwasserstoff
HRP	engl.: <i>Horse radish peroxidase</i>
IFN γ	Interferon Gamma
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunoglobulin Superfamilie
IKK	Inhibitor κ B-Kinase
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IRAK	Interleukin Rezeptor-assoziierte Kinase
ITIM	engl.: <i>immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif</i>
kDa	Kilodalton
l	engl.: <i>long</i> ; lang
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	engl.: <i>Leucin rich repeats</i>
<i>M. cat.</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
M	Molar
mM	millimolar
MOI	engl.: <i>Multiplicity of infection</i>
MyD88	myeloid Differenzierungsfaktor 88
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid

NaCl	Natriumchlorid
NETs	engl.: <i>neutrophil extracellular traps</i>
NF- κ B	nukleärer Transkriptionsfaktor- κ B
NH ₂	Aminogruppe
NHBE	engl.: <i>normal human bronchial epithelial cells</i>
NP40	Nonidet P-40
<i>NTHi</i>	engl.: <i>non typeable Haemophilus influenzae</i>
OD	optische Dichte
OMPP5	engl.: <i>outer membrane protein P5</i> ; Oberflächenprotein P5
OR	engl.: <i>odds ratio</i> ; Quotenverhältnis
p	engl.: <i>probability</i> ; Wahrscheinlichkeit
P3C	Pam ₃ Cys-Ser-(Lys) ₄ trihydrochlorid, Pam ₃ Cys
PAMP	engl.: <i>pathogen-associated molecular pattern</i> ; Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PB	engl.: <i>phosphat buffer</i> , Phosphatpuffer
PBMCs	engl.: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> ; mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	engl.: <i>phosphat buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphoinositid-3 Kinase
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PMN	engl.: <i>polymorphonuclear leukocytes</i> ; Polymorphonukleäre Leukozyten
Pol	Polymerase
PI:C	Poly Inosine: Cytosine
PRR	engl.: <i>pattern recognition receptor</i> ; Keimbahn-kodierter Muster-erkennender Rezeptor
PSG	engl.: <i>pregnancy-specific glycoprotein</i>
p-Tyr	Phospho-Tyrosin
RIPA	engl.: <i>radio immunoprecipitation assay</i>
RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
R848	Resiquimod 848
ROI	engl.: <i>reactive oxygen intermediates</i>
ROS	engl.: <i>reactive oxygen species</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	engl.: <i>short</i> , kurz

SDS	engl.: <i>sodium dodecylsulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHP1	engl.: <i>src homology domain-containing cytosolic protein tyrosin-phosphatase 1</i>
siRNA	engl.: <i>small interfering RNA</i>
Src-Familie	proto-onkogene Tyrosinkinasefamilie
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N', N' -Tetramethyl-ethylethylendiamin
THi	engl.: <i>typeable Haemophilus influenzae</i>
TIR	<i>Toll</i> -/IL-1 Rezeptor-Domäne
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidine
TNS	engl.: <i>trypsin neutralisation solution</i> ; Trypsin-Neutralisierungslösung
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRAF6	Tumornekrosefaktor Rezeptor-assoziiierter Faktor 6
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
Tris-HCL	Tris-Salzsäure
TSA	Trypsininhibitor
UspA1	engl.: <i>ubiquitous surface protein A1</i>
WB	Western Blot
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp
ZVAD	carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl

1 Einleitung

Neutrophile Granulozyten gehören zu den wichtigsten Komponenten des angeborenen Immunsystems (Craig et al. 2009; El Kebir et al. 2008). Sie spielen vor allem bei bakteriellen Infektionen eine zentrale Rolle (Faurischou und Borregaard, 2003), da sie eindringende Mikroorganismen erkennen und abtöten. Die mukosale Abwehr wird in erster Linie durch die Epithelien der Atemwege gewährleistet. Das angeborene Immunsystem erkennt Mikroorganismen über eine Reihe von keimbahnkodierten Rezeptoren, den PRRs (engl.: *Pattern recognition receptors*) (Janeway et al. 2002). TLR2 (engl.: *Toll-like receptor 2*) ist einer der wichtigsten PRRs für die Erkennung von inhalierten Bakterien in der Lunge (Parker und Prince, 2011). Viele Pathogene werden über den TLR2 vermittelten Signalweg erkannt und beseitigt. Die Ligandenbindung an TLR2 führt über zwei verschiedene Signalkaskaden zur Aktivierung von NF- κ B (engl.: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*). Dies wiederum hat eine verstärkte Transkription und Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie z.B. dem Interleukin 8 (IL8), zur Folge. IL8 ist für die Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten als Immunantwort auf eine bakterielle Infektion des respiratorischen Epithels von entscheidender Bedeutung. Die unterschiedlichen PRRs erkennen die jeweiligen PAMPs (engl.: *pathogen associated molecular patterns*), aktivieren spezifische Signalwege (Akira et al. 2006) und führen somit zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und zur Expression von ko-stimulierenden Molekülen durch Antigen-präsentierende Zellen (Mantovani et al. 2011).

Neutrophile Granulozyten sind neben ihrer aktiven Rolle für die proinflammatorische Immunantwort ebenso dazu in der Lage, Entzündungen zu hemmen, um Gewebeschäden durch überschüssige Entzündungsreaktionen vorzubeugen (Mantovani et al. 2011).

CEACAM8 (engl.: *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8*), auch CD66b genannt, ist ein Mitglied der CEA Genfamilie (engl.: *carcinoembryonic antigen*), welche zu der Immunoglobulin-Superfamilie (IgSF) gehört. Die Carzinoembryonic Antigen (CEA) Genfamilie ist vor allem an Zelladhäsionen beteiligt, die unterschiedliche physiologische und pathologische Prozesse, assoziiert mit der Bindung von Pathogenen, Entzündungsreaktionen, Zellwachstum und Zelldifferenzierung, beeinflussen (Gray-Owen und Blumberg, 2006; Slevogt et al. 2008). CEACAM8 ist über das Glycoprotein GPI (Glykosylphosphatidylinositol) in der Zellwand verankert oder liegt löslich vor und wird ausschließlich von Granulozyten produziert (Schmidt et al. 2012; Singer et al. 2002; Singer et al. 2010). Lösliches CEACAM8 bindet an CEACAM1. CEACAM1, auch CD66a genannt, ist ein weiterer Vertreter der CEA Genfamilie. Es wird unter anderem auf Leukozyten, Endothel- und Epithelzellen (Gray-Owen und Blumberg, 2006) exprimiert. CEACAM1 ist zusammen mit TLR2 auf der Oberfläche von Bronchialepithelzellen lokalisiert. Die Ligandenbindung an

TLR2 führt über zwei verschiedene Signalkaskaden, dem MyD88 (myeloid Differenzierungsfaktor 88) abhängigen Signalweg (Akira et al. 2003) und dem PI3K (Phosphatidylinositid-3 Kinase) abhängigen Signalweg zur Aktivierung von NF- κ B (Arbibe et al. 2000).

Die bereits gezeigte CEACAM1 abhängige ko-inhibierende Funktion von TLR2 (Arbeitsgruppe Slevogt) wird durch das *immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif* (ITIM) von CEACAM1 vermittelt. Diese TLR2-hemmende Funktion bezieht sich nur auf den Phosphatidylinositid-3-Kinase abhängigen Signalweg.

Die Erreger *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae* sind in der Lage, den unteren Respirationstrakt zu besiedeln und spielen somit eine wichtige Rolle in der Erkrankung der COPD (engl.: *chronic obstructive pulmonary disease*) (Slevogt et al. 2007; Sethi et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass *Moraxella catarrhalis* auf respiratorischem Epithel vorwiegend eine TLR2-abhängige Immunantwort induziert (Slevogt et al. 2007). Diese Interaktionen lassen nun den Schluss zu, dass es Mechanismen gibt, bei denen *Moraxella catarrhalis* CEACAM1 nutzt, um die TLR2-vermittelte Entzündungsreaktion zu reduzieren und somit besser in den Atemwegen kolonisieren zu können (Slevogt et al. 2007).

Haemophilus influenzae exprimiert ebenso wie *Moraxella catarrhalis* ein Oberflächenmolekül (*Moraxella catarrhalis*: *ubiquitous surface protein A1* (UspA1), *Haemophilus influenzae*: P5), welches spezifisch an CEACAM1 bindet (Bookwalter et al. 2008) und auch von TLR2 erkannt wird. Dies lässt vermuten, dass sich *Haemophilus influenzae* ebenso wie *Moraxella catarrhalis* die Wirkung von CEACAM1 zu Nutze macht.

Unsere Hypothese ist nun, dass CEACAM8, da es genauso an CEACAM1 bindet, den gleichen Effekt auf den TLR2 vermittelten Signalweg hat wie die CEACAM1 bindenden Oberflächenproteine (engl.: *outer membrane proteine*, OMP) UspA1 und P5 von *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae*.

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Regulation der Expression von membran-assoziiertem und löslichem CEACAM8 zu untersuchen, insbesondere in der Interaktion mit PAMPs, die die *Toll-like* Rezeptoren aktivieren und im Zusammenhang mit Infektionen durch *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae* stehen. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob lösliches CEACAM8 durch Bindung an das epithelial exprimierte CEACAM1 die TLR2-abhängige Immunantwort des Epithels beeinflussen kann.

1.2 Fragestellung

1. Wie werden Expression und Sekretion von CEACAM8 auf humanen Granulozyten reguliert?
2. Ist CEACAM8 in signifikanten Konzentrationen in humaner BAL (Bronchoalveolärer Lavage) nachweisbar und steht die Menge von CEACAM8 im Zusammenhang mit der Menge an Granulozyten in der BAL?
3. Welchen Einfluss hat die Bindung von CEACAM8 an CEACAM1 für die CEACAM1 induzierte Reduktion der TLR2-vermittelten Immunantwort?
4. Führt die Bindung von CEACAM8 an CEACAM1
 - zu einer Phosphorylierung und SHP1 Rekrutierung von CEACAM1?
 - zu einer reduzierten Akt-Phosphorylierung?
 - zu einer reduzierten IL8-Transkription?

2 Schrifttum

2.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

2.1.1 Definition

Die COPD ist eine chronische Lungenerkrankung, die durch obstruktive Bronchitis, Entstehung eines Lungenemphysems (Zakharkina et al. 2011) und eine hohe Morbidität (Murphy et al. 2005) gekennzeichnet ist. Zu den typischen Symptomen zählen Dyspnoe, vermehrte Sputumproduktion (Murphy und Parameswaran, 2009), chronischer Husten, Atemwegsobstruktionen und eingeschränkter Gasaustausch (Nationale Versorgungs-Leitlinie COPD).

2.1.2 Epidemiologie

Weltweit sind circa 64 Millionen Menschen an der COPD erkrankt (*World Health Organisation, WHO*). Die COPD gilt derzeit als vierthäufigste Todesursache weltweit (Pauwels et al. 2001) und ein weiterer Anstieg von Prävalenz, Morbidität und Mortalität ist zu erwarten, so dass laut der „Global Burden of Disease Study“ (GOLD, *Global Initiative of Obstructive Lung Disease*) die COPD im Jahre 2020 die dritthäufigste Todesursache sein wird (Rabe et al. 2007).

2.1.3 Risikofaktoren

Das Rauchen von Zigaretten gilt als der größte Risikofaktor für die Entstehung einer COPD (Sethi et al. 2006), des Weiteren können laut der GOLD aber auch Inhalation von Staub oder Chemikalien, Luftverschmutzung und genetische Dispositionen, wie ein erblich bedingter Mangel an α 1-Antitrypsin, eine Rolle spielen. Die Prävalenz bei Männern ist höher als bei Frauen und bei über 40 jährigen höher als bei unter 40 jährigen (Rabe et al. 2007).

2.1.4 Pathogenese

Die COPD ist durch eine Zerstörung des Lungenparenchyms und durch Infiltration von Entzündungszellen in die Zellwände gekennzeichnet (Decramer et al. 2012). Häufig kommt es zu intermittierenden Verschlechterungen der Symptome, sogenannten Exazerbationen, die meist Folge bakterieller oder viraler Infektionen sind (Murphy und Parameswaran, 2009). Exazerbationen haben einen negativen Einfluss auf Mortalität und Morbidität der Erkrankung (Anzueto et al. 2007). Sie sind durch gesteigerte Entzündungsreaktionen (Drost et al. 2005), einhergehend mit vermehrter Infiltration von Neutrophilen in die Atemwege (Mizgerd et al. 2008), sowie einem Anstieg von Entzündungsmediatoren (Drost et al. 2005), wie IL8 (chemotaktisch wirkend auf Granulozyten) (Di Stefano et al. 2004; Chung et al. 2001) gekennzeichnet. Neutrophile Granulozyten werden von dem Entdecker der Phagozytose als

Zellen *par excellence* gegen Mikroorganismen bezeichnet (Metchnikoff, 1905). Allerdings setzen diese Zellen während der Phagozytose verschiedene Entzündungsmediatoren wie reaktive Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*, ROS) und Proteasen frei, die das umliegende Gewebe schädigen können (Mizgerd et al. 2008; Drost et al. 2005). Durch die chronische Abfolge von immer wiederkehrender Schädigung der Lunge und Reparationsmechanismen wird die Struktur des Lungengewebes geschädigt (Rabe et al. 2007) und es kommt zu irreversiblen Veränderungen der Lungenstruktur, die durch Verdickung und Fibrosierung der Atemwege gekennzeichnet sind (Chung et al. 2001). Diese Veränderungen sind bei COPD Patienten in den proximalen kleinen Atemwegen, aber auch im Lung parenchym und in den Lungengefäßen zu finden.

Die Lunge verfügt über vielfältige Mechanismen des angeborenen Immunsystems, wie die mukoziliäre Clearance, der Sekretion von antimikrobiellen Polypeptiden und Immunglobulin A (IgA), um eindringende Erreger abzuwehren und zu eliminieren. So ist es zu erklären, dass die tiefen Atemwege und das Lungengewebe beim lungengesunden Menschen steril sind (Sethi und Murphy, 2008). Werden diese Immunmechanismen, z.B. durch Rauchen, gestört, kann es zu einer dauerhaften pathologischen Kolonisierung der unteren Atemwege mit Bakterien kommen (Sethi et al. 2006). Die ständige Anwesenheit der Pathogene in den Atemwegen verstärkt die chronische Entzündungsreaktion und führt damit zu einer Verschlechterung des Verlaufes der Erkrankung. Außerdem steigt durch die Kolonisierung die Gefahr von Exazerbationen (Sethi et al. 2006). Häufig wird daher vom Circulus Vitiosus gesprochen (Sethi und Murphy, 2008).

2.2 Die Rolle von Granulozyten in der COPD

Die Entzündungsreaktion auf bakterielle Infektionen der tiefen Atemwege ist durch einen gesteigerten Einstrom neutrophiler Granulozyten (engl.: *polymorphonuclear leukocytes*, PMN) gekennzeichnet (Craig et al. 2009). Daher sind diese auch in der bronchoalveolären Lavage von COPD Patienten vermehrt zu finden (Chung et al. 2001). Sie spielen aufgrund ihrer Fähigkeit Mediatoren abzugeben, so wie Elastasen, Metalloproteasen und Sauerstoffradikale, welche die Pathogene abtöten, aber andererseits auch Entzündung und Gewebeschäden verursachen, vor allem in der Pathogenese der COPD eine wichtige Rolle (Chung et al. 2001; Mizgerd et al. 2008). In die Lunge infiltrierte Neutrophile von Patienten mit chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen exprimieren vermehrt Chemokinrezeptoren, welche in zirkulierenden Neutrophilen entweder gar nicht oder nur sehr schwach vertreten sind (Hartl et al. 2008). Rekrutierung neutrophiler Granulozyten wird durch die Lungenzellen gelenkt. Chemokine der Lungenzellen stimulieren die Chemotaxis und beeinflussen die gerichtete Bewegung der Neutrophilen. Durch koloniestimulierende Faktoren (engl.: *Colony stimulating factors*) werden die Produktion von Neutrophilen und das Freiwerden aus dem

hämatopoetischen Gewebe vermittelt (Burns et al. 2003). Am Ort der Entzündung kommt es zur Akkumulation von neutrophilen Granulozyten (Mizgerd et al. 2008; El Kebir et al. 2008).

2.3 Zytokine, Chemokine, Interleukin 8 und NF- κ B

2.3.1 Zytokine

Zytokine sind extrazelluläre Signalproteine, die in der Regel leichter als 80 kDa sind, von unterschiedlichen Zelltypen produziert werden und an Zell-zu-Zell Kontakten beteiligt sind. Zytokine werden in der Regel nicht alleine, sondern zusammen mit anderen Zytokinen produziert und deren Wirksamkeit wird durch die hohe Affinität zu Oberflächenrezeptoren auf den Zellen vermittelt. Die Gruppe der Zytokine wird unterteilt in Wachstumsfaktoren, proinflammatorische, antiinflammatorische, von T-Zellen abgeleitete und chemotaktische Zytokine (diese werden dann auch Chemokine genannt) (Chung et al. 2001).

2.3.2 Chemokine

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die etwa 8 bis 10 kDa schwer sind. Bisher sind mehr als 50 Vertreter bekannt (Chung et al. 2001).

Chemokine können in inflammatorische und homöostatische Chemokine eingeteilt werden. Inflammatorische Chemokine werden auf entzündeten Geweben exprimiert und sind wichtig für das Heranlocken von Leukozyten, homöostatische Chemokine hingegen sorgen für die Erhaltung der physiologischen Vorgänge und der Immunkontrolle durch Leukozyten (Hartl et al. 2008).

2.3.3 Interleukin 8 und NF- κ B

Interleukin 8 (auch CXC, *chemokine ligand 8* genannt) wurde 1987 von Yoshimura und Kollegen als erstes Chemokin beschrieben (Chung et al. 2001). IL8 wird während der Immunantwort des angeborenen Immunsystems freigesetzt (Yona et al. 2010) und spielt eine entscheidende Rolle bei Wachstum, Aktivierung und Rekrutierung von humanen Granulozyten (Slevogt et al. 2008), wobei es eine chemotaktische Wirkung auf alle Granulozyten hat (Chung et al. 2001). Durch IL8 wird die Expression von Integrinen auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten induziert und viele weitere neutrophile Aktivitäten, so wie der respiratorische Burst, Exozytose von spezifischen Granulaten und Abgabe von Proteasen, stimuliert (Drewniak et al. 2010). IL8 ist vermehrt im Sputum von COPD Patienten zu finden (Chung et al. 2001).

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine entscheidende Rolle in der Expression von IL8 (El Kebir et al. 2008). NF- κ B vermittelt die Expression vieler Entzündungsmediatoren und ist

somit für die entzündliche Reaktion im Rahmen der COPD von besonderer Bedeutung. In Lungengeweben von Patienten ist er vermehrt nachweisbar (Sethi et al. 2006).

2.4 Die Rolle von Bakterien in der COPD

Die bakterielle Besiedelung der Atemwege spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der COPD (Wedzicha und Seemungal, 2007). Pathogene Bakterien kolonisieren die Atemwege von circa 30 % bis 40 % der COPD Erkrankten (Parameswaran et al. 2011). In den Atemwegen von COPD Patienten sind vorallem *Non Typeable Haemophilus influenzae* (NTHI) und *Moraxella catarrhalis* (*M.cat*) in hohen Konzentrationen zu finden (Sethi et al. 2007). Bakterien sind verantwortlich für etwa 50 % der akuten Exazerbationen (Sethi und Murphy, 2008). Daher ist die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Atemwege und in das Lungenparenchym ein essentieller Mechanismus der Lunge zur Abwehr und Eliminierung von Bakterien (Craig et al. 2009).

2.5 *Moraxella catarrhalis*

2.5.1 Allgemeines

Moraxella catarrhalis ist ein Gram-negativer, unbeweglicher, aerober Diplokokkus, der auf Blutagar nicht hämolysierende, runde Kolonien bildet und darüber hinaus Oxidase, Katalase und DNase produziert. Das Bakterium gehört zur Ordnung der *Pseudomonadales* und zur Familie der *Moraxellaceae*. Früher wurde *Moraxella catarrhalis* als harmlose Kommensale des oberen Respirationstraktes betrachtet, doch seit 1970 ist es als Pathogen des Respirationstraktes, speziell in der COPD bekannt (Murphy und Parameswaran, 2009).

Moraxella catarrhalis ist ein bedeutsamer Erreger der *Otitis media* bei Kindern, bei Erwachsenen spielt das Bakterium bei Erkrankungen des unteren Respirationstraktes eine wichtige Rolle (Murphy und Parameswaran, 2009). Es handelt sich um den zweithäufigsten Erreger von bakteriell induzierten Exazerbationen bei COPD Patienten, gleich hinter *Haemophilus influenzae* (Merck Manuals, 2009). Insgesamt ist *Moraxella catarrhalis* für etwa 10 % bis 15 % der Exazerbationen verantwortlich (Sethi et al. 2002). Es kolonisiert den unteren Respirationstrakt von bis zu 32 % der Erwachsenen COPD-Patienten (Mizgerd et al. 2008). Hill und Virji haben gezeigt, dass *Moraxella catarrhalis* an CEACAM1, ein auf Atemwegsepithelien exprimierter Rezeptor, bindet (Hill und Virji, 2003). Diese Interaktion ist bedeutsam für die Adhäsion von *Moraxella catarrhalis* an pulmonalem Epithel (Slevogt et al. 2006).

Moraxella catarrhalis adhärert an NHBE Zellen (engl.: *normal human bronchial epithelial cells*) und an A549 Zellen (pulmonalen Epithelzellen) (Slevogt et al. 2007) und ist auch in der Lage, in Zellen einzudringen (Murphy und Parameswaran, 2009; Slevogt et al. 2007). *Moraxella catarrhalis* induziert vor allem die TLR2-abhängige Immunantwort (Slevogt et al. 2008).

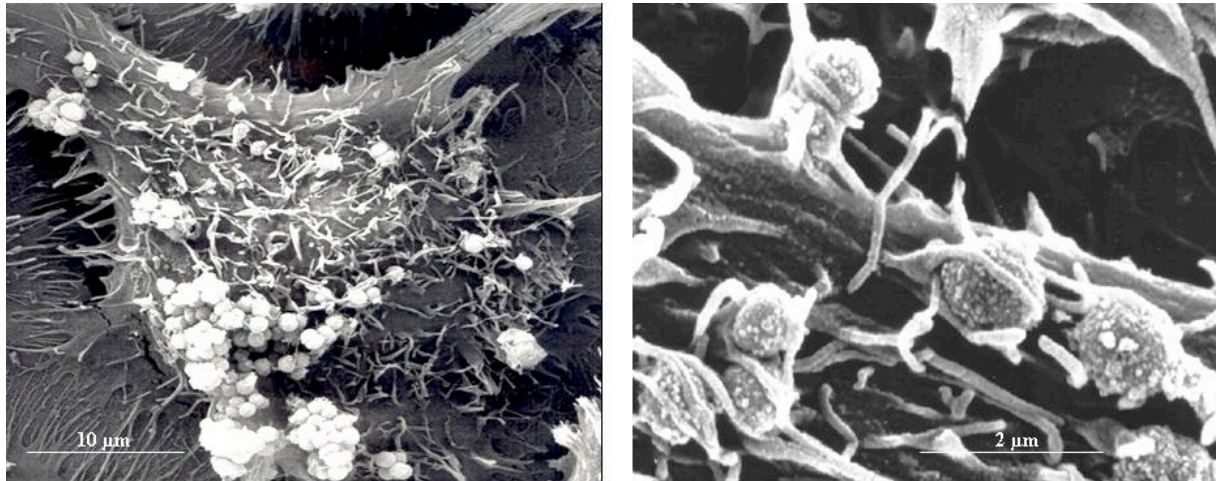


Abb.: 2.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Moraxella catarrhalis* (Slevogt et al. 2007)

Auf dieser elektronenmikroskopischen Aufnahme ist der enge Kontakt zwischen Moraxellen und den humanen bronchialen Epithelzellen zu sehen. Die Moraxellen bilden multizelluläre, traubenförmige Aggregate auf der Zelloberfläche (Slevogt et al. 2007).

2.5.2 Virulenzfaktoren

Unterschiedliche Oberflächenproteine von *Moraxella catarrhalis* vermitteln die Adhäsion an das respiratorische Epithel (Slevogt et al. 2007). Die Interaktion von pulmonalen Epithelzellen mit *Moraxella catarrhalis* führt zu einer proinflammatorischen Immunreaktion, die unter anderem durch die Aktivierung von NF- κ B vermittelt wird. Folge dieser Aktivierung ist die Sekretion einer Vielzahl von Entzündungsmediatoren, so wie IL8 und GM-CSF (engl.: *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*) (Slevogt et al. 2006).

Zu den Virulenzfaktoren von *Moraxella catarrhalis* gehören unter anderem Oberflächenproteine, unter diesen ist das 250 bis 300 kDa schwere Adhäsion UspA1 (Voges et al. 2010), welches zahlreich vorliegt, als Ligand für CEACAM1 dient und somit für die Interaktion mit dem Lungenepithel zuständig ist (Agnew et al. 2011; Hill und Virji 2003).

2.6 *Haemophilus influenzae*

2.6.1 Allgemeines

Haemophilus influenzae ist ein Gram-negatives, unbewegliches, kokkoides Stäbchenbakterium. Das Bakterium bildet auf Kochblutagar kleine, runde, nicht hämolysierende Kolonien. *Haemophilus influenzae* ist verantwortlich für lokale und systemische Infektionen. Es gibt bekapselte (engl.: *typeable Haemophilus influenzae*, *THi*) und nicht bekapselte (engl.: *non-typeable Haemophilus influenzae*, *NTHi*) Stämme (Hill et al. 2001). In dieser Arbeit wurde ausschließlich der nicht bekapselte Stamm verwendet, da nur dieser als wichtiges Pathogen für die bakteriell induzierten Infektionen bei COPD Patienten eine Rolle spielt. *NTHi* ist in der Lage, an das respiratorische Epithelium zu adhären, welches für dessen Kolonisation und Infektion von grosser Bedeutung ist. Dieser Erreger ist für etwa 20 % bis 30 % der Exazerbationen in der COPD verantwortlich (Moghaddam et al. 2011; Sethi et al. 2002) und somit die häufigste Ursache für bakterielle Exazerbationen in der COPD (Avadhanula et al. 2006), darüber hinaus spielt er auch eine wichtige Rolle in der klinisch stabilen Phase der COPD (Sethi et al. 2006).

2.6.2 Virulenzfaktoren

Haemophilus influenzae verursacht Infektionen durch Anheftung an das Epithel der Atemwege (Avadhanula et al. 2006). *Haemophilus influenzae* hat mehrere Oberflächenproteine, eines davon ist das 37 kDa schwere OMPP5 (Hill et al. 2001). Mit diesem ist es ebenso wie *Moraxella catarrhalis* in der Lage an CEACAM1 zu binden (Gray-Owen und Blumberg, 2006; Bookwalter et al. 2008). Daher spielt CEACAM1 eine wichtige Rolle für die pathologische Kolonisation und Pathogenese von *Haemophilus influenzae* (Hill et al. 2001), genauso wie auch für *Moraxella catarrhalis*.

2.7 Die CEACAMs

1965 wurde das *Carcinoembryonic* Antigen von Gold und Freedman, ursprünglich als Tumormarker, entdeckt und wurde so zum namensgebenden Mitglied der CEA-Genfamilie (Gold und Freedman, 1965). Die CEA-Genfamilie gehört zu der Immunoglobulin-Superfamilie und wird unterteilt in die CEACAMs und die PSGs (engl.: *pregnancy specific glycoproteins* (Habilitationsschrift B. Singer). Lokalisiert sind die CEACAMs auf Chromosom 19 (Thompson et al. 1991; Gray-Owen und Blumberg, 2006).

CEACAMs werden auf unterschiedlichen humanen Geweben, wie z.B. dem Lungengewebe, exprimiert (Hill und Virji, 2003). Die CEA-Genfamilie ist vorwiegend an Zelladhäsionen beteiligt (Zhao et al. 2004). Durch homophile und heterophile Bindungen werden unterschiedliche physiologische und pathologische Prozesse beeinflusst, die mit der Bindung

von Pathogenen, Entzündungsreaktionen, Zellwachstum und Zelldifferenzierung assoziiert sind (Gray-Owen und Blumberg, 2006; Slevogt et al. 2008). Alle Mitglieder der CEACAM Familie besitzen Domänen, die den Immunoglobulin V und C Domänen ähnlich sind, eine NH₂ endende IgV-ähnliche Domäne (auch N-Domäne genannt) und null bis sechs IgC2-ähnliche Domänen (auch A- und B-Domänen genannt) (Thompson et al. 1991; Kuroki et al. 2001). CEACAMs sind durch einen Glykosylphosphatidylinositol Anker an der Membran gebunden, haben eine transmembranäre Region mit einem zytoplasmatischen Teil (Thompson et al. 1991) oder sind lösliche Glykoproteine (Habilitationsschrift B. Singer). Die N-Domäne aller Mitglieder der CEACAM Familie ist zu 70 % bis 90 % gleich aufgebaut (Kuroki et al. 2001). Durch Spleißen der Gene entstehen Unterschiede in Ig-Domänen sowie in den zytoplasmatischen Anteilen, wodurch sich eine große Vielfalt der CEA-Familie ergibt (Dissertation Zabel, 2009).

2.7.1 CEACAM1

CEACAM1 (auch bekannt als BGP, C-CAM und CD66a) wird von Leukozyten, Endothelzellen und Epithelzellen (Gray-Owen und Blumberg, 2006) und einigen Krebszellen (Jiang und Barclay, 2010) exprimiert und ist normalerweise an Zell-zu-Zell Kontakten, Differenzierung von Epithelien, Vaskularisation und T-Zellproliferation beteiligt (Voges et al. 2010). CEACAM1 ist auf bronchialen Epithelzellen mit TLR2 ko-lokalisiert (Schaar et al. 2011; Slevogt et al. 2007). CEACAM1 kann sowohl homophile Bindung zu CEACAM1, heterophile Bindung zu CEACAM8 (Singer et al. 2010) als auch Bindung zu den Oberflächenproteinen von *Moraxella catarrhalis* (UspA1) und *Haemophilus influenzae* (OMPP5) eingehen (Gray-Owen und Blumberg, 2006). CEACAM1 spielt somit eine wichtige Rolle in der Beziehung zwischen Wirt und Mikroorganismus (Hill et al. 2001). Bindungen werden über die IgV-ähnliche Ektodomäne, die sogenannte N-Domäne, vermittelt (Lobo et al. 2009). Es wird angenommen, dass CEACAM1 das Urgen der CEA-Genfamilie ist aus dem alle anderen CEACAMs entstanden sind, da es als einziges ein homologes Gen in Maus, Ratte und weiteren Spezies besitzt und alle vorhandenen Immunoglobulindomänen (N-, A-, und B-Domäne) aufweist (Singer et al. 2010).

CEACAM1 wird in einer Vielzahl von Spleißingvarianten (alternatives Spleißen der Gene auf Proteinebene) exprimiert (Greicius et al. 2003). Im Menschen existieren 11 Spleißingvarianten (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Es tritt auf mit einer, drei oder vier extrazellulären Domänen und mit zwei unterschiedlichen zytoplasmatischen Domänen, einer L- und einer S-Domäne (Lobo et al. 2009). Bei der S-Domäne handelt es sich um die kurze (engl.: *short form*; CEACAM1-S), bei der L-Domäne um die lange Form (engl.: *long form*; CEACAM1-L). Die lange Form besitzt mindestens ein ITIM mit zwei Tyrosinresten (Gray-Owen und Blumberg, 2006), welches inhibitorische Effekte vermittelt. Die kurze Form besitzt dieses Motiv nicht.

Die Anzahl an CEACAM1 Rezeptoren und das Verhältnis von langer zu kurzer Form variiert je nach Typ und Zustand der Zelle (Gray-Owen und Blumberg, 2006).

CEACAM1 gilt als Aktivierungs-Marker für neutrophile Granulozyten und verzögert dessen Apoptose. Die CEACAM1 Expression korreliert mit granulozytischer Differenzierung (Pan et al. 2010).

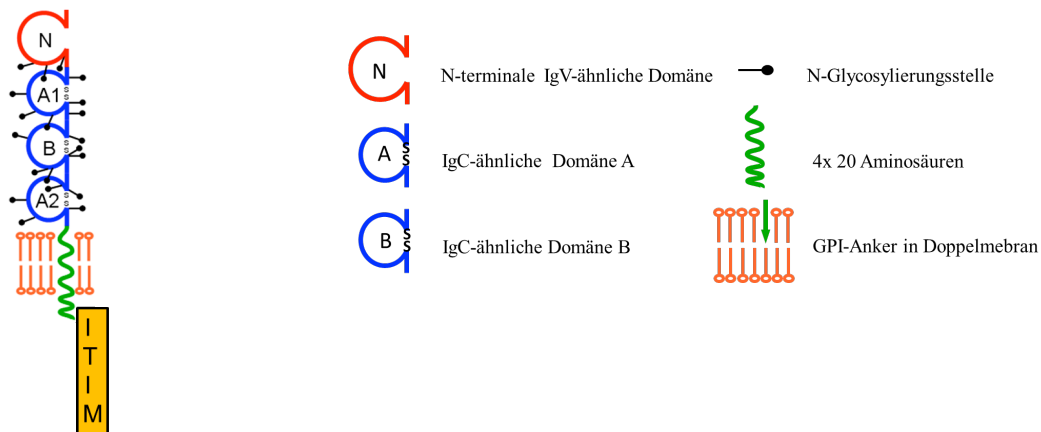


Abb 2.2: Struktur und Aufbau von CEACAM1

Hier wird der strukturelle Aufbau von CEACAM1 gezeigt (Zimmermann, W., CEA-Homepage, 2011).

2.7.2 CEACAM8

CEACAM8 (auch CD66b, NCA-95 und CD67 genannt) ist ein 95 kDa schweres Glykoprotein (Zhao et al. 2004) und wird ausschließlich von Granulozyten des Menschen (Gray-Owen und Blumberg, 2006) und von denen einiger Primaten exprimiert (Zhao et al. 2004). CEACAM8 ist entweder in der Zellmembran durch das Glycoprotein GPI verankert oder liegt ohne Verankerung als lösliche Form (engl.: *soluble*) vor (Schmidt et al. 2012; Singer et al. 2010). Gelagert wird CEACAM8 in speziellen Vesikeln der Granulozyten und wird somit als Marker für Vesikel Exozytosen vorgeschlagen (Jog et al. 2007) und dient als Granulozyten-spezifisches Aktivierungsantigen (Thompson et al. 1991).

Im Gegensatz zu anderen CEACAMs ist CEACAM8 weder in der Lage homophile Bindungen auszuüben (Kuroki et al. 2001) noch dient es als *Pattern Recognition Rezeptor* für bakterielle Proteine (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Lösliches CEACAM8 ist allerdings in der Lage eine heterophile Bindung mit CEACAM1 einzugehen (Singer et al. 2010; Jiang und Barclay, 2010). Dies lässt den Schluss zu, dass CEACAM8 eine Rolle in der Bindung zwischen Granulozyten und Epithelien, die CEACAM1 exprimieren, spielt (Zhao et al. 2004).

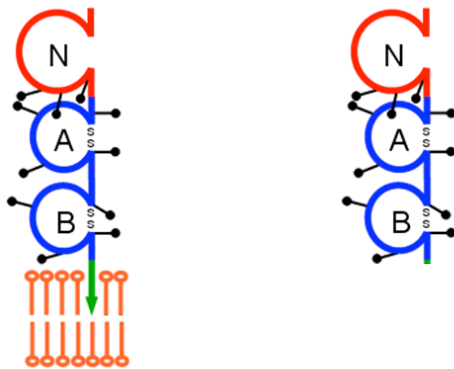


Abb 2.3: Struktur und Aufbau von CEACAM8

Diese Abbildung zeigt den strukturellen Aufbau von GPI verankertem CEACAM8 (links) und löslichem CEACAM8 (rechts) (Zimmermann, W., CEA-Homepage, 2011).

2.8 Die angeborene Immunabwehr

Das Immunsystem von Säugetieren und damit auch das von Menschen besteht aus dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Das angeborene Immunsystem der Atemwege steht an erster Stelle der Abwehr des Körpers gegen bakterielle Pathogene (Bals und Hiemstra, 2004) und wird durch Phagozytose (Akira et al. 2006), Zytokinsekretion und den Einstrom von Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und weiteren Faktoren wie der Komplementaktivierung, vermittelt. Das angeborene Immunsystem ist in der Lage Mikroorganismen über eine Reihe von PRRs zu erkennen. Durch das angeborene Immunsystem der Lunge, welches aus Schleimhautbarriere, mukoziliärer Clearance und Sekretion von antimikrobiellen Proteinen und Peptiden (Lysozyme, Lactoferrin, *Secretory leukocyte protease inhibitor*) besteht, werden die unteren Atemwege vor dem Eindringen von Pathogenen geschützt (Parameswaran et al. 2011).

2.8.1 Pattern recognition receptors

Hierbei handelt es sich um Keimbahn kodierte Rezeptoren, die bestimmte strukturelle Komponenten von Mikroorganismen, z.B. Lipopeptide, Lipoproteine, Lipoteichonsäure oder Lipopolysaccharide (LPS) erkennen (Mantovani et al. 2011; Kondo et al. 2012). Diese Bestandteile werden PAMPs genannt (Kawai und Akira, 2010). Die unterschiedlichen PRRs erkennen die jeweiligen PAMPs, aktivieren spezifische Signalwege (Akira et al. 2006) und führen somit zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und zur Expression von ko-stimulierenden Molekülen durch Antigen-präsentierende Zellen (Mantovani et al. 2011). Zu den PRRs gehören unter anderem *Toll-like* Rezeptoren, die am

besten charakterisierten PRRs (Kondo et al. 2012) und nukleotid-bindende NOD Proteine (engl.: *nucleotide-binding oligomerization domain proteins*) (Mizgerd et al. 2008).

2.8.2 Granulozyten

Granulozyten spielen als Effektorzellen des angeborenen Immunsystems bei bakteriellen Infektionen der Atemwege eine bedeutende Rolle (El Kebir et al. 2008).

Sie gehören den Leukozyten an und werden in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten eingeteilt (Keatings und Barnes, 1997), wobei im peripheren Blut neutrophile Granulozyten den größten Anteil darstellen (Radsak et al. 2004). Im Blutaussstrich sind Granulozyten an deren charakteristischen zytoplasmatischen Granula zu erkennen, die während der Entwicklung produziert werden (Galli et al. 2011). Diese Granula werden unterteilt in sogenannte primäre, sekundäre und tertiäre Granula und sekretorische Vesikel, in denen sich proteolytische und bakterizide Proteine, mobilisierbare Zell-Oberflächenproteine und Adhensionsmoleküle befinden (Faurischou und Borregaard, 2003; Jog et al. 2007). CEACAM8 ist in ruhenden Granulozyten vor allem in den sekundären Granula zu finden (Zhao et al. 2004). Die sekretorischen Vesikel werden aus der Plasmamembran, die Granula aus dem Golgiapparat gebildet (Jog et al. 2007).

Die Produktion der Granulozyten wird unter anderem durch GM-CSF kontrolliert (Zhao et al. 2004). Neutrophile Granulozyten werden im Knochenmark produziert (Galli et al. 2011), im Entzündungsgeschehen adhären sie ans Endothel der Gefäße und wandern mit Hilfe der Chemotaxis durch die Membran der Gefäße zum Ort der Entzündung (Radsak et al. 2004; Jog et al. 2007). Die Adhäsion an das Gefäßendothel wird unter anderem durch das Selektin CD62L vermittelt (Schmidt et al. 2012).

Neutrophile Granulozyten sind an Aktivierung und Regulierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems beteiligt (Zhao et al. 2004). Sie sind meist die ersten Abwehrzellen am Infektionsort (Janke et al. 2008) und sind vor allem gegen Bakterien und Pilze wirksam (Drewniak et al. 2010). Sie spielen daher eine wichtige Rolle in der Pathogenese bakterieller Infektionen (Mantovani et al. 2011). Neutrophile Granulozyten können Pathogene mittels Phagozytose, Freisetzen von lytischen Enzymen sowie antimikrobiellen Substanzen (Radsak et al. 2004) und dem Produzieren von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (engl.: ROI; *reactive oxygen intermediate*; dies sind Sauerstoffradikale, die bei der Phagozytose produziert werden und die ausschlaggebend sind für die antimikrobielle Aktivität von Neutrophilen Granulozyten) eliminieren (El Kebir et al. 2008). Auch sind stimulierte Granulozyten in der Lage Chromatin Netze (engl.: *neutrophil extracellular traps* (NETs)) zu bilden, um Pathogene besser einzufangen und mit Hilfe antimikrobieller Proteine abtöten zu können (Brinkmann et al. 2004; Brinkmann und Zychlinsky, 2007). Neutrophile Granulozyten werden unter anderem durch Anwesenheit von IL8, IFN- γ , Hitze Schock Proteinen (Radsak et al. 2004) sowie durch die Bindung von Antikörper- oder Komplement-

opsonisierten Partikeln aktiviert (Janke et al. 2008). Granulozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche und intrazellulär diverse *Pattern Recognition Receptors*, inklusive nahezu aller *Toll-like* Rezeptoren (Mantovani et al. 2011). Darüberhinaus exprimieren sie Rezeptoren der *carcinoembryonic cell adhesion molecules* aus der Familie der Immunglobulin Superfamilie. Eine Expression von CEACAM1, 3, 4, 6 und 8 (Gray Owen und Blumberg, 2006) wurde dabei auf den Granulozyten nachgewiesen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression einiger CEACAM Moleküle auf Neutrophilen durch die Aktivierung von Granulozyten beeinflusst wird (Kuroki et al. 2001). Eine direkte Aktivierung von Granulozyten erfolgt über die Ligandenbindung der auf Granulozyten exprimierten TLRs (Janke et al. 2008) oder PRRs (Radsak et al. 2004). Die Aktivierung von Granulozyten zeigt sich unter anderem in dem *respiratory burst*. Dabei handelt es sich um die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen im Zytoplasma neutrophiler Granulozyten bei der Phagozytose. Ein weiteres Zeichen der Aktivierung von Granulozyten ist die reduzierte Expression des als Markers verwendeten Selektins CD62L auf der Oberfläche von Granulozyten (Janke et al. 2008). Das Selektin gehört zur Familie der Zelladhäsionsmoleküle und ist unter anderem an dem Übertritt der Granulozyten in das entzündliche Gewebe beteiligt (Yang et al. 2011). Darüber hinaus ist eine Aktivierung von Granulozyten durch Sekretion von Chemokinen und Zytokinen und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen gekennzeichnet (Drewniak et al. 2010), letztere sind für die Kommunikation der Zellen untereinander und mit dem Endothel essentiell.

Die von neutrophilen Granulozyten produzierten Proteinase und reaktiven Sauerstoffspezies führen allerdings nicht nur zur Beseitigung von Pathogenen, sondern auch zur Zerstörung des umliegenden Gewebes (El Kebir et al. 2008) und diese Zerstörung führt zur Pathogenität einiger Erkrankungen.

In der letzten Zeit ergaben immer mehr Untersuchungen, dass Granulozyten nicht nur für die Generierung einer pro-entzündlichen Reaktion bedeutsam, sondern dass sie darüber hinaus auch aktiv am Rückgang der Entzündungsreaktion beteiligt sind. So wird z.B. durch die Produktion antiinflammatorischer Moleküle und Faktoren (wie z.B. Interleukin 4 und 10) die Reparatur von umliegenden Geweben gefördert und somit die Entzündungsreaktion gehemmt (Mantovani et al. 2011).

2.9 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren, die die bislang am besten charakterisierten PRRs darstellen, sind in der Wirtsabwehr gegen mikrobielle Pathogene essentiell. Sie erkennen spezifische Komponenten von Pathogenen (Akira et al. 2003) und spielen somit eine äußerst wichtige Rolle in der angeborenen und erworbenen Immunabwehr (Kondo et al. 2012).

Mitte der 90er Jahre wurden *Toll-like* Rezeptoren entdeckt. TLRs sind Typ I transmembranäre Proteine mit einer leuzinreichen extrazellulären (LRR engl.: *leucine-rich-repeat*) und einer zytoplasmatischen Domäne, die homolog zu der des Interleukin-1 (IL-1) Rezeptors ist und daher Toll/IL-1R Homologe (TIR) Domäne genannt wird (Takeda und Akira, 2005). Diese Rezeptoren beinhalten die Signal Moleküle, MyD88, IL-1 Rezeptor-assoziierte Domäne Kinase (IRAK), TNF-Rezeptor assoziierter Faktor (TRAF) 6, mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinase und den Nuklear Faktor NF- κ B (Akira, 2003). NF- κ B vermittelt die Transkription von Adhensionsmolekülen, Chemokinen, koloniestimulierenden Faktoren und anderen Zytokinen, die wichtig für die Entzündungsreaktion sind (Mizgerd et al. 2008).

Unterschiedliche TLRs rekrutieren unterschiedliche Kombinationen dieser Adaptermoleküle um spezifische Immunantworten auszulösen (Akira, 2003).

Bisher sind 10 TLRs in Menschen und 12 in Mäusen bekannt (Kawai und Akira, 2010). TLRs werden in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe, bestehend aus TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11, wird auf Zelloberflächen exprimiert und erkennt vor allem mikrobielle Zellwandbestandteile, wie Lipide, Lipoproteine und Proteine. Die andere Gruppe, deren Mitglieder TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind, wird in intrazellulären Vesikeln (Endoplasmatisches Retikulum, Endosomen, Lysosomen, Endolysosomen) exprimiert und erkennt mikrobielle Nukleinsäuren (Kawai und Akira, 2010).

Ligandenbindung an die TLRs führt zur Aktivierung von NF- κ B, der mitogen-assoziierten Protein Kaskaden (MAPKs) und *interferon response* Faktoren (Drewniak et al. 2010), und somit zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Takeda und Akira, 2005) und Typ1 Interferonen. Dies ist entscheidend für Wirtsabwehr gegen Mikroorganismen (Kondo et al. 2012). Ebenso wird durch die Aktivierung der TLRs die Funktion von Granulozyten stimuliert (Drewniak et al. 2010). Jeder TLR Rezeptor hat individuelle Funktionen bezüglich der PAMP Erkennung und Immunantwort (Kawai und Akira, 2010). Jedoch könnte die übersteigerte Aktivierung des TLR Signalweges verantwortlich für Autoimmunerkrankungen und chronische Entzündungen sein (Kondo et al. 2012).

2.9.1 TLR2

TLR2 wird an der apikalen Oberfläche von bronchialen Epithelzellen exprimiert und ist durch eine intrazytoplasmatische Toll-IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne charakterisiert. TLR2 ist besonders wichtig für die Erkennung von inhalierten Bakterien in der Lunge und für die Aktivierung der angeborenen Immunantwort (Parker und Prince, 2011). TLR2 erkennt viele unterschiedliche mikrobielle Bestandteile, unter anderem auch Peptidoglykan von Gram-positiven Bakterien, Lipoproteine und Lipopeptide unterschiedlicher Bakterien (Takeda und Akira, 2005).

TLR2 formt Heterodimere mit TLR1 oder TLR6. Pam₃Cys wird bevorzugt von einem Heterodimer, geformt aus TLR1 und TLR2, erkannt (Akira, 2003).

Die Produktion von Entzündungsmediatoren wird vorwiegend durch TLR2 Agonisten ausgelöst (Kawai und Akira, 2010). Da TLR2 bei diversen Erkrankungen der Lunge, wie zum Beispiel bei der COPD, hochreguliert ist, scheint es eine besondere Rolle in dem Entzündungsgeschehen von Atemwegen zu spielen. (Slevogt et al. 2008).

2.10 Signalkaskaden

2.10.1 TLR2-Signalkaskade

Eine Stimulation der *Toll-like* Rezeptoren durch bakterielle Bestandteile löst die Expression verschiedener Gene aus, die an der Immunantwort beteiligt sind (Takeda und Akira, 2005). Die Liganden binden über die extrazelluläre leuzinreiche Domäne an TLRs (Zabel, Dissertation, 2010). Bindung von Liganden ermöglicht die Dimerisation der TLRs. Einige TLRs bilden Heterodimere, wie TLR2 mit TLR1 oder mit TLR6, andere formen Homodimere. Durch diese Dimerisation wird die Aktivierung des Signalweges ausgelöst. Die TIR Domäne steht am Anfang dieses Weges (Takeda und Akira, 2005). Die Signalweiterleitung erfolgt über die MyD88 und die PI3 Kinase-abhängige Signalkaskade. Beide Kaskaden verlaufen unabhängig voneinander (Zabel, Dissertation, 2010) und führen über die Bindung an TLR2 zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Arbibe et al. 2000).

Die Rekrutierung der p85 Untereinheit der PI3 Kinase spielt eine wichtige Rolle in der TLR2 induzierten NF- κ B Aktivierung. Durch diese Aktivierung wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie unter anderem IL8, vorangetrieben (Slevogt et al, 2008).

2.10.1.1 MyD88-abhängiger Signalweg

Der MyD88-abhängige Signalweg ist vergleichbar zu der Signalweiterleitung durch IL-1 Rezeptoren. MyD88 verfügt über eine C-terminale TIR Domäne und eine N-terminale Enddomäne (auch *Death* Domäne genannt) (Takeda und Akira, 2005). Bei Bindung eines Liganden an TLR2, dimerisiert dieser und MyD88 kann rekrutiert werden (Akira et al. 2006). MyD88 bindet an den zytoplasmatischen Teil des TLR über deren N-Domänen. IRAK-4 (engl.: *interleukin receptor-associated kinase*) wird durch MyD88 rekrutiert und führt so zu der Phosphorylierung von IRAK-1. Das so aktivierte IRAK-1 bindet an TRAF6 (engl.: *tumor necrosis factor receptor-associated factor*), und führt zu der Aktivierung von zwei unterschiedlichen Signalwegen. Der eine führt zur Aktivierung der MAP Kinasen, der andere, NF- κ B-Weg, zur Aktivierung des IKK Komplexes, welcher zur Aktivierung von NF- κ B führt (Takeda und Akira, 2005). NF- κ B ist zuständig für die Expression von Zytokinen (Akira et al. 2006).

2.10.1.2 PI3 Kinase-abhängiger Signalweg

Neben dem MyD88 abhängigen Signalweg, gibt es noch einen parallel verlaufenden Weg, der ebenso zur Aktivierung von NF- κ B führt, den PI3 Kinase abhängigen Signalweg. PI3K besteht aus einer katalytischen Untereinheit (p110) und dem regulatorischen Polypeptid p85. Diese p85 Untereinheit bindet an Rac1. Nach Bindung eines Ligandes, formt die Rac1 GTPase einen Signalkomplex, welcher Rac1, die TLR2 zytoplasmatischen Domäne und die p85 Untereinheit der PI3K enthält. Nach Ligandenbindung wird TLR2 aktiviert und somit p85 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zur Aktivierung von PI3 und diese wiederum über die Serin/Threoninkinase zur Aktivierung der Protein Kinase Akt. Akt wird an zwei Stellen phosphoryliert. Phosphoryliertes Akt führt zur Aktivierung von NF- κ B, der dann in den Kern transloziert und dort die Genexpression proinflammatorischer Mediatoren induziert. Am Ende steht die Freisetzung von IL-8 (Arbibe et al. 2000).

2.10.2 CEACAM1 Signalkaskade

Wir haben gezeigt, dass CEACAM1 zusammen mit TLR2 auf der Oberfläche von Epithelien der Bronchien lokalisiert ist. Die Bindung von CEACAM1 an das Oberflächenprotein UspA1 von *Moraxella catarrhalis* reduziert die TLR2-induzierte Immunantwort, die durch das Pathogen vermittelt wird (Schaar et al. 2011; Slevogt et al. 2007; Slevogt et al. 2008). Bindet ein Ligand, so ist CEACAM1-L in der Lage SHP1 und SHP2 zu rekrutieren (Gray-Owen und Blumberg, 2006).

Der zytoplasmatische Teil von CEACAM1 kann an den Tyrosin-Resten des ITIM phosphoryliert werden (Gray-Owen und Blumberg, 2006) und dies führt zur Bindung von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen. Proteinkinasen der src-Familie sowie Proteinphosphatasen wie das SHP1 (Tyrosin Phosphatase SRC Homologon (SH2)-Domäne, die das SHP1 enthält) können so rekrutiert werden (Huber et al. 1999). Dieses wiederum löst über Hemmung der Phosphorylierung von p85a, einer regulierenden Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), einen negativen Feedback Mechanismus aus (Slevogt et al. 2008).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien und Zellkultur

3.1.1.1 Normale humane Bronchialepithelzellen

Die NHBE-Zellen (engl.: *normal human bronchial epithelial cells*) wurden von Lonza Colone GmbH, Deutschland bezogen. Es handelt sich hierbei um Zellen, die die Lunge oberhalb der Bifurkation der Trachea auskleiden. Sie wurden von der ersten bis zur achten Passage eingesetzt.

3.1.1.2 Alveolarzellkarzinom-Zelllinie (A549)

Die A549-Zellen (engl.: *adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells*) wurden von DSMZ GmbH, Braunschweig bezogen. Dabei handelt es sich um eine Zelllinie, deren Ursprungszellen aus einem Lungenadenokarzinom eines 58-jährigen Kaukasiers isoliert wurden. Es wurden die Passagen 3 bis 30 verwendet.

3.1.1.3 Humane Granulozyten

Humane Granulozyten wurden im Institut für Mikrobiologie und Hygiene von gesunden Spendern nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Spender mittels Vacutainer-Sicherheitsblutentnahme-Set entnommen. Das Projekt ist von der Ethikkommission der Charité bewilligt worden.

3.1.1.4 Medien für Zellkultur und Kryokonservierung

Primäre Bronchialepithelzellen	Zusammensetzung	Hersteller
Stimulationsmedium/ Zellkulturmedium		
Bronchialepithelzell-Basalmedium (BEBM)	500 ml	Lonza
Epidermaler Wachstumsfaktor	0,5 ml	Lonza
Insulin	0,5 ml	Lonza
Transferrin	0,5 ml	Lonza

Epinephrin	0,5 ml	Lonza
Tri-Jodthyronin	0,5 ml	Lonza
Rinderhypophysenextrakt	2,0 ml	Lonza
All trans Retinolsäure	0,5 ml	Lonza
Hydrokortison	0,5 ml	Lonza
Gentamicin Sulfat	0,5 ml	Lonza
Amphotericin-B	0,5 ml	Lonza

Tab. 3.1: Zellkultur- und Stimulationsmedien der NHBE Zellen

A549 Zellen	Zusammensetzung	Hersteller
Stimulationsmedium		
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	500,00 ml	Gibco
Zellkulturmedium		
Dulbeccos Modified Eagle Medium	500,00 ml	Gibco
Fetales Kälberserum (FCS) * ¹	10,00 %	Gibco
Glutamin, 200 mM	1 %	PAA
Kryokonservierungsmedium		
Fetales Kälberserum (FCS) * ¹	10,00 %	Gibco
Glutamin, 200 mM	1 %	PAA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10,00 %	ROTH

Dulbeccos Modified Eagle Medium		Gibco
---------------------------------	--	-------

Tab. 3.2: Zellkultur-, Stimulations- und Kryokonservierungsmedien der A549 Zellen

Granulozyten	Zusammensetzung	Hersteller
Stimulationsmedium		
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	500,00 ml	Gibco
Fetales Kälberserum (FCS) * ¹	10,00 %	Gibco
Glutamin, 200 mM	1 %	PAA

Tab. 3.3: Stimulationsmedium der Granulozyten

Granulozyten	Zusammensetzung	Hersteller
Lösung für die Auftrennung		
Ficoll-Plaque TM Plus	15,00 ml	GE Healthcare
Dulbeccos PBS	15,00 ml	PAA
Dextran Lösung		
Dextran D-4876	3 g	Sigma
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	50,00 ml	Gibco
Fetales Kälberserum (FCS)* ¹	10,00 %	Gibco

Tab. 3.4: Lösung zur Auftrennung der Granulozyten

3.1.2 Bakterienkultur

3.1.2.1 *Moraxella catarrhalis* Stämme BBH18wt und BBH18.1

Der Wildtypstamm BBH18 und die *Ubiquitous surface protein A1* (UspA1) defiziente Mutante BBH18.1 wurden uns freundlicherweise von Christian Riesbeck, *Lund University*, Lund, Schweden, zur Verfügung gestellt.

3.1.2.2 *Haemophilus influenzae* Stämme Hi1128wt und Hi1128f-

Der Wildtypstamm Hi1128wt und die Protein5 (P5) defiziente Mutante Hi1128f- wurden uns freundlicherweise von Lauren Bakaletz, *The Research Institute at Nationwide Children's Hospital*, Columbus, Ohio, USA, zur Verfügung gestellt.

3.1.2.3 Medien für die Bakterienkultur

<i>M. catarrhalis</i>	Zusammensetzung	Hersteller
Brain-Heart-Infusion (BHI) Medium*²		
BHI-Pulver	37,00 g	BD Biosciences
A. bidest. ad	1000,00 ml	
Brain-Heart-Infusion Kryomedium		
Brain-Heart-Infusion-Medium* ²	500,00 µl	
Glycerol (99,5 %ig)	500,00 µl	Fluka Biochemika
Columbia Agar Platte		Becton Dickinson

Tab. 3.5: Materialien für die Kultur von *Moraxella catarrhalis*

<i>Haemophilus influenzae</i>	Zusammensetzung	Hersteller
Brain-Heart-infusion (BHI) Medium* ²		
BHI-Pulver	37,00 g	BD Biosciences
A.bidest. ad	1000,00 ml	
Brain-Heart-Infusion Kryomedium		
Brain-Heart-Infusion-Medium* ²	500,00 µl	
Glycerol (99 %ig)	500,00 µl	Fluka Biochemika
Wachstumsmedium		
BHI Medium* ²	15 ml	
NAD- (Nicotinamide Adenine Dinucleotid)	10 µg/ml	MP Biomedicals
Hemin	10 µg/ml	Sigma
Selektionsagar		
Kochblutagar		Merck
Chloramphenicol	2 µg/ml	Sigma
NAD- (Nicotinamide Adenine Dinucleotid)	10 µg/ml	MP Biomedicals
Hemin	10 µg/ml	Sigma

Tab. 3.6: Materialien für die Kultur von *Haemophilus influenzae*

3.1.3 Molekularbiologische Methoden

3.1.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die RNA-Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem RNA Isolationskit der Firma 5Prime.

PCR-Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Lysepuffer		
Perfect Pure lysis solution		5Prime
TBE Puffer, 5x		
Tris Base	54,0 g	ROTH
Borsäure	27,5 g	ROTH
EDTA	3,7 g	ROTH
A. dest. ad	1000,00 ml	
Ladepuffer 6x		
Xylen-Cyanol (blau)	125 mg	BioRad
Glycerol	15 ml	Fluka Biochemika
A. dest. ad	50 ml	

Tab. 3.7: Puffer für die PCR

Mastermix RT-PCR	Zusammensetzung	Hersteller
HC-RT Reverse Transkriptionskit		Applied Biosystems
RT-Puffer, 10x	2,0 µl	Applied Biosystems
dNTP-Mix, 25x	0,8 µl	Applied Biosystems
Random Primer, 10x	2,0 µl	Applied Biosystems
MultiScribe RT	1,0 µl	Applied Biosystems
A. bidest.	4,2 µl	B. Braun

Tab 3.8: Mastermix für die RT-PCR

Mastermix PCR	Zusammensetzung	Hersteller
Reaktionspuffer S, 10x	2,5 µl	New England Biolabs
dNTP's, 10 mM	0,5 µl	Promega
Primer Vorwärts (0,5 µg/µl)	0,1 µl	Metabion
Primer Rückwärts (0,5 µg/µl)	0,1 µl	Metabion
NEB Taq Polymerase (1U/µl)	0,5 µl	New England Biolabs
A. bidest.	16,3 µl	B. Braun

Tab. 3.9: Mastermix für die PCR

Agarosegel	Zusammensetzung	Hersteller
TBE Puffer, 1x	150 ml	
Agarose	2,25 g	Promega
Gel Red Nucleic Acid Stain	3 μ l	BioTium

Tab. 3.10: Zusammensetzung des Agarosegels für die Gelelektrophorese

PCR Primer	Vorwärts-Sequenz	Rückwärts-Sequenz	Annealing-Temperatur	Zyklen	Hersteller
CEACAM1 S/L	5' - gCA ACA ggA CCA CAg TCA AgA CgA	RV L 5' gTg gTT ggA gAC TgA ggg TTT g RV S 5' Tgg AgT ggT CCT gAg CTg CCg	64°C	31-34	Metabion
GAPDH	5'-CCA CCC ATg gCA AAT TCC ATg gCA	5' -TCT AgA Cgg Cag gTC Agg TCC ACC	60°C	22-24	Metabion

Tab. 3.11: PCR-Primer

3.1.3.2 FACS

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
Blockpuffer A549 Zellen		
Dulbeccos PBS	100,00 ml	PAA
Fetales Kälberserum (FCS)* ¹	10 %	PAA

Waschpuffer A549 Zellen		
Dulbeccos PBS	100,00 ml	PAA
Tween	0,2 %	ROTH
Fixierlösung A549 Zellen		
Formaldehyd	2 %	ROTH
Dulbeccos PBS	2 ml	PAA
Waschpuffer Granulozyten		
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	100,00 ml	Gibco
Fetales Kälberserum (FCS)* ¹	3 %	PAA
Annexin V FITC Kit		Mitenyi Biotec
Annexin V FITC	1:10	
Propidium Jodid	1:100	
Annexin-Bindepuffer, 20x	25,00 ml	

Tab. 3.12: Puffer und Lösungen für FACS

Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
primäre Antikörper			
CEACAM1 (mAB, 18/20)	Maus	50 µg/ml	Singer, B.B., Institut für Anatomie, Essen

CEACAM8 (6/40c)	Maus	100 µg/ml	Singer, B.B., Institut für Anatomie, Essen
CD62L anti human	Maus	100 µg/ml	BD Pharmingen
anti-TLR2 (mAB)	Maus	10 µg/ml	Acris
Sekundäre Antikörper			
FITC-gekoppelter anti-Maus F(ab)2	Ziege	1:50	Invitrogen
PE-gekoppelter anti-Maus	Ziege	1:50	eBioscience

Tab. 3.13: FACS Antikörper

3.1.3.3 Transiente Transfektion von A549 Zellen

Transfektionsreagenzien	Hersteller
Amaya Cell Line Nucleofektor Kit	Lonza
Solution V	Lonza

Tab. 3.14: Transfektionsreagenzien

siRNA	Vorwärts-Sequenz	Rückwärts-Sequenz	Hersteller
CEACAM1 smart pool	Unbekannt	Unbekannt	Thermo Scientific Dharmacon
Kontroll siRNA #2	Unbekannt	Unbekannt	Ambion

Tab. 3.15: siRNA Sequenzen

3.1.3.4 ELISA

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
IL6/8 ELISA		
Carbonatpuffer 0,1 M; pH 9,5		
Natriumhydrogencarbonat	4,20 g	ROTH
Natriumcarbonat	1,78 g	ROTH
A. bidest. ad	500,00 ml	
Blockierungspuffer		
Dulbeccos PBS	90,00 ml	Biochrom
Fetales Kälberserum (FCS)* ¹	10,00 ml	Gibco
Waschpuffer		
Dulbeccos PBS	1000,00 ml	Biochrom
Tween20	0,05 %	ROTH
Substratlösung/TMB Substrat/Reagent Set		BD Bioscience
Stopplösung (2 N H₂SO₄)		
H ₂ SO ₄ (97 %ig)	27,47 ml	ROTH
A. bidest. ad	500,00 ml	
CEACAM8 ELISA		
Blockierungspuffer		

Dulbeccos PBS	1000,00 ml	Biochrom
Bovines Serumalbumin (BSA)	3 %	ROTH
Waschpuffer		
Dulbeccos PBS	1000,00 ml	Biochrom
Tween20	0,05 %	ROTH
Verdünnungspuffer		
Dulbeccos PBS	1000,00 ml	Biochrom
Bovines Serumalbumin (BSA)	1,5 %	ROTH
Substratlösung TMB X-tra		Biotrend
Stopplösung (2 N H₂SO₄)		
H ₂ SO ₄ (97 %ig)	27,47 ml	ROTH
A. bidest. ad	500,00 ml	

Tab. 3.16: ELISA Puffer und Lösungen

*¹ Das verwendete FCS wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren für 30 min bei 56 °C erhitzt.

*² Das BHI-Medium wurde bis zur vollständigen Auflösung der BHI-Pulvers auf einen Rührschüttler gestellt und anschließend im Dampfsterilisator für 20 min bei 121 °C sterilisiert.

Antikörper	Konzentration	Hersteller
IL6/8 ELISA		
Capture Antikörper anti humanes IL8	1:250	BD Bioscience
Detektionsantikörper anti humanes IL8	1:250	BD Bioscience

Capture Antikörper anti humanes IL-6	1:250	eBioscience
Detektionsantikörper anti humanes IL6	1:250	eBioscience
CEACAM8 ELISA		
Kaninchen anti-CEA (Dako)	5 µg/ml	Biomol
Detektionantikörper für CC8 Klon 6/40c IgG1	10 µg/ml	Singer, B.B., Institut für Anatomie, Essen
HRP-Antikörper Ziege anti Maus HRP	1:10.000	Santa Cruz SC2005

Tab. 3.17: ELISA Antikörper

3.1.3.5 Western Blot

Western-Blot Puffer und -Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
Phosphoproteinwaschpuffer		
Natriumorthovanadat, 200 mM	5,00 ml	Fluka Biochemika
Natriumpyrophosphat 75 mM	100,00 ml	Fluka Biochemika
Natriumfluorid 0,5 M	100,00 ml	Serva
Dulbeccos PBS ad	500,00 ml	Biochrom
Waschpuffer		
Tween 20	0,05 %	Sigma
Dulbeccos PBS ad	500,00 ml	Biochrom
Lyse Puffer		
Tris-HCl, 500 mM	100 µl	ROTH

Nonidet P-40	1 %	Fluka Biochemika
Inhibitoren Cocktail, 100x	10 µl	Calbiochem
Phosphostop	100 µl	Roche
Phosphoproteinwaschpuffer ad	1000,00 ml	
Bradford Reagenz, 5x	500,00 ml	Serva
Strippingpuffer	500,00 ml	Thermo Scientific
Gel-Ladepuffer nach Lämmli		
Tris-HCl, pH 6,8	1,0 ml	ROTH
Glycerol	0,80 ml	Fluka Biochemika
SDS, 10 %ig	1,60 ml	ROTH
Bromphenolblau, 1 %ig	0,40 ml	Sigma
β-Mercaptoethanol, 1 %ig	10,00 µl	ROTH
A. bidest. ad	5,00 ml	
Gelelektrophoresepuffer, 5x		
Tris-Base	15,00 g	ROTH
Glycin	72,00 g	ROTH
SDS	5,00 g	ROTH
A. bidest. ad	1000,00 ml	
Blotpuffer, 10x		

Tris Base	30,00 g	ROTH
Glycin	144,00 g	ROTH
Methanol	20 %	Merck
A. bidest. ad	1000,00 ml	
Blockpuffer		
Milchpulver	5 %	Fluka Biochemika
Dulbeccos PBS (1x) ad	500,00 ml	Biochrom
Sammelgelpuffer, pH 6,8		
Tris-HCl	6,00 g	ROTH
A. bidest. ad	100,00 ml	
Trenngelpuffer, pH 8,8		
Tris-HCL	18,15 g	ROTH
A. bidest. ad	100,00 ml	
Ponceau-S-Proteinfärbung		
Ponceau S	0,10 g	Sigma
Essigsäure, 100 %ig	5,00 ml	Merck
A. bidest. ad	250,00 ml	
Marker		
Protein Kaleidoscope	0,50 ml	BioRad

Cruz Marker		Santa Cruz
Substrat		
ECL (<i>enhanced chemiluminescence</i>)		Thermoscientific/Pierce
Entwicklerlösung		Agfa
Fixierlösung		Agfa

Tab 3.18: Western Blot Puffer und Lösungen

Western-Blot-Gele	Zusammensetzung	Hersteller
Sammelgel		
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1,00 ml	ROTH
SDS, 10 %ig	40,00 µl	ROTH
Bis-Acrylamid, 40 %ig	534,00 µl	Serva
TEMED	10,00 µl	Serva
Ammoniumpersulfat, 10 %ig	40,00 µl	ROTH
A. bidest. ad	4,00 ml	
Trenngel		
Trenngelpuffer (pH 8,8)	2,50 ml	ROTH
SDS, 10 %ig	100,00 µl	ROTH
Bis-Acrylamid, 40 %ig	2,50 ml	Serva
TEMED	5,00 µl	Serva

Ammoniumpersulfat, 10 %ig	50,00 µl	ROTH
A. bidest. ad	10,00 ml	

Tab.3.19: Western Blot Gele

Primäre Antikörper	kDa	Spezies	Konzentration	Hersteller
Aktin	43	Ziege	1:1000	Santa Cruz
Phospho-Akt (Ser473)	60	Kaninchen	1:500	Cell Signaling Technology
β-Tubulin	55	Kaninchen	1:10.000	Abcam
Sekundäre Antikörper				
Anti-Kaninchen IgG	/	Ziege, gekoppelt an HRP	1.10.000	Santa Cruz
Anti-Ziege-IgG	/	Maus, gekoppelt an HRP	1:10.000	Santa Cruz

Tab. 3.20: Western Blot Antikörper

3.1.3.6 Immunpräzipitation/Co-Immunpräzipitation

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
CEACAM-Lysepuffer		
NP-40	1 %	Fluka Biochemika
SDS	0,1 %	ROTH
Tris-HCL, 500 mM	10,00 ml	ROTH
Natriumphosphat 50 mM	10,00 ml	ROTH

EDTA, 250 mM	0,4 ml	ROTH
EGTA, 250 mM	0,4 ml	ROTH
Natriumfluorid, 1 M	5,00 ml	Serva
A. dest. ad	100,00 ml	
frisch dazu geben:		
CEACAM-Lysepuffer	890,00 ml	
Proteinaseinhibitor Cocktail Set I, 100x	10 µl	Calbiochem
Phosphostop	100 ml	Roche
Waschpuffer		
Tris-HCL, pH 7,5	50 mM	ROTH
Natriumchlorid (NaCl)	150 mM	ROTH
Triton X-100	1 %	Fluka Biochemika
Natriumdesoxycholat	0,5 %	Fluka Biochemika
Lämmli-puffer		
Blockpuffer		
Milchpulver	5 %	Fluka Biochemika
Dulbeccos PBS (1x) ad	500,00 ml	Biochrom
Protein G-Agarose	30 µl/Probe	Millipore

Tab. 3.21: Immunpräzipitation/ Co-Immunpräzipitation Puffer und Lösungen

Primäre Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
CEACAM1 (mAB 18/20)	Maus	5 µg/Probe	B.B Singer, Institut für Anatomie, Essen
p-Tyr (mAB 4G10)	Maus		Millipore
SHP1 (clone 1SHO1)			Calbiochem
Sekundärer Antikörper			
HRP anti Maus	Ziege		Jackson Immunoresearch

Tab. 3.22: Immunpräzipitation/ Co-Immunpräzipitation Antikörper

3.1.3.7 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
Protein A-und G-Agarose	40 µl/Probe	Millipore
RNase A	1 µl/Probe	Sigma
Proteinase K	5 µl/Probe	Novagen
ChIP-RIPA Puffer		
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane PH 7,1	10 mM	ROTH
Natriumchlorid (NaCl)	150 mM	ROTH
Nonidet P-40	1 %	Fluka Biochemika
Desoxycholat	1 %	Fluka Biochemika
SDS ultrapure	0,1 %	ROTH
A. dest. ad	1000,00 ml	

Lysepuffer		
ChIP-RIPA Puffer	50 ml	
Proteinase-Inhibitor Cocktail Set I (100x)	500 µl	Calbiochem
High Salt Puffer		
Natriumchlorid (NaCl)	2 M	ROTH
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane pH 7,5	10 mM	ROTH
Nonidet P-40	1 %	Fluka Biochemika
Desoxycholat	0,5 %	Fluka Biochemika
EDTA	1 mM	Fluka Biochemika
A. dest. Ad	500,00 ml	
TE-Puffer		
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane pH 7,5	10 mM	ROTH
EDTA	1 mM	Fluka Biochemika
A. dest. ad.	100,00 ml	
Eluierungspuffer		
TE-Puffer	30,00 ml	
SDS ultrapure	1 %	ROTH
Ladepuffer, 6x		
Xylen-Cyanol (blau)	125 mg	BioRad

Glycerol	15,00 ml	Fluka Biochemika
A. dest. ad	50,00 ml	
Fixierlösung		
Formaldehyd	1 %	ROTH
PBS	10,00 ml	PAA
Neutralisierungslösung		
Dulbeccos PBS	500,00 ml	PAA
Glycin	0,125 M	ROTH

Tab. 3.23: ChIP Puffer und Lösungen

Aufreinigung der DNA	Zusammensetzung	Hersteller
PCR Purifikation Kit		Qiagen
PB-Puffer	500 µl	
PE-Puffer	700 µl	
EB-Puffer	Input: 200 µl PolIII: 50 µl P65: 30 µl	

Tab. 3.24: Aufreinigung der DNA für ChIP

Mastermix PCR	Zusammensetzung je Probe	Hersteller
A. dest. Ampuwa	16,15 µl	Fresenius
Taq Puffer (10x)	2,5 µl	5Prime

dNTP 10mM	0,5 µl	Promega
Vorwärts-Primer, 100 µM	0,1 µl	Metabion
Rückwärts-Primer, 100 µM	0,1 µl	Metabion
Perfect Taq plus Polymerase	0,25 µl	5Prime
Template	5 µl	

Tab. 3.25: Mastermix PCR für ChIP

Antikörper Immunpräzipitation	Spezies	Konzentration	Hersteller
P65 (c-20)	Kaninchen	200 µg/ml	Santa Cruz
Pol II (N-20)	Kaninchen	200 µg/ml	Santa Cruz

Tab. 3.26: Antikörper Immunpräzipitation für ChIP

Promoter- primer	Vorwärts- sequenz	Rückwärts- sequenz	Annealing Temperatur	Zyklen	Hersteller
IL8	5'-AAG AAA ACT TTC GTC ATA CTC CG-3'	5'-TGG CTT TTT ATA TCA TCA CCC TAG-3'	60 °C	Input: 34 PolII /p65: 38	TIB Molbiol

Tab. 3.27: IL8 Promoterprimer für ChIP

ChIP-PCR Cycler Programm	Temperatur in °C	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95	5 min	1
Denaturierung	95	30 s	-
Annealing	Variabel	30 s	Variabel

Elongation	72	1 min	-
Elongation	72	10 min	1

Tab. 3.28: Cyclor Programm ChIP-PCR

3.1.3.8 Stimulanzen

Stimulanzen	Konzentration	Hersteller
A549 Zellen		
Pam ₃ Cys	100 ng/ml	Enzo
BBH18.wt	MOI 5-50	
BBH18.1	MOI 5-50	
NTHi1128.wt	MOI 10-100	
NTHi1128f-	MOI 10-100	
NHBE Zellen		
Pam ₃ Cys	1 µg/ml	Enzo
Granulozyten		
GM-CSF	50 ng/ml	ImmunoTools
CpG	100 µg/ml	Invivogen
Lipopolysacharid (LPS)	100 ng/ml	Enzo Life Sciences
Flagellin (Fl)	1 µg/ml	Sigma
Pam ₃ Cys (P3C)	10 µg/ml	Enzo

Phorbol Myristat Acetat (PMA)	20 ng/ml	Sigma
PolyIC (P:IC)	100 ng/ml	Imgenex
Resiquimod-848 (R848)	10 µg/ml	Enzo
Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF α)	5 ng/ml	R&D Systems

Tab. 3.29: Stimulanzen

3.1.3.9 Inhibitoren

Inhibitoren	Konzentration	Hersteller
Ag18/20	50 µg/ml	B.B. Singer, Institut für Anatomie, Essen
CEACAM8	100 ng/ml; 1 µg/ml	B.B. Singer, Institut für Anatomie, Essen
Pan Caspase fmk Inhibitor Z-VAD	10 µM	R&D
Cycloheximide (CHX)	1 µg/ml	Sigma
Cytochalasin D (CD)	0,5 µg/ml	Calbiochem
Pan-MMP Inhibitor GM-6001	10 µM	Calbiochem

Tab. 3.30: Inhibitoren

3.1.3.10 Positive Kontrolle

Kontrolle	Konzentration	Hersteller
Pervanadat	4 mM	Sigma

Tab. 3.31: Positive Kontrolle

3.1.3.11 Negative Kontrolle

Kontrolle	Konzentration	Hersteller
Rat CEACAM1-Fc	100 ng/ml	B.B. Singer, Institut für Anatomie, Essen

Tab. 3.32: Negative Kontrolle

3.1.3.12 Verbrauchssubstanzen

Substanz	Verwendungszweck	Hersteller
Ampuwa Spüllösung	Ansetzen von Lösungen	Fresenius
Dulbeccos PBS	Waschpuffer	PAA
Trypsin/EDTA	Ablösen der Zellen	PAA
TNS	Trypsin Neutralisations Lösung PBEC	Lonza
HBSS	Waschpuffer PBEC	PAA

Tab. 3.33: Verbrauchssubstanzen

3.1.3.13 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Verwendungszweck	Hersteller
6-, 12-, 24-, 48-Loch-Platten	Zellkultur	BD Falcon
48-Lochplatten, BioCoat	Zellkultur, PBEC	BD Biosciences
F96-Immuno Plate (Maxisorb)	IL8-Elisa	Nunc
Blutentnahmeröhrchen, Heparin	Blutentahme	BD
Einmalimpfösen	Ausplattieren von Bakterien	ROTH

Einmalpipetten, steril	Transfektion von A549 Zellen mit Si-RNA	Lonza
Film	Western Blot	Thermoscientific/Pierce
Filterpapier, Whatman	Western Blot	VWR
Hybond ECL Membran	Proteintransfer (Western Blot)	Amersham Pharmacia Biotech
Kunststoffküvetten	Messung der optischen Dichte im Photometer	Serva
Kryoröhrchen, Nalgene	Einfrieren Zellen/ Bakterien	Thermo Scientific
Nukleofector Küvetten	Transfektion von A549 Zellen mit Si-RNA	Lonza
Multistepper-Aufsätze (Ritips Professional)		ROTH
Pasteurpipetten	Absaugen von Flüssigkeiten	Brand
PCR Gefäße	PCR	Eppendorf
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)		TPP
Pipettenspitzen	Pipettieren	Eppendorf
Pipettenaufsätze	20 µl/ 100 µl/ 200 µl/ 1000 µl	Eppendorf
Polystyrene Röhrchen	FACS	BD Falcon
Spritze, 20 ml	Sterilfiltrieren von Flüssigkeiten	B.Braun
Sterilfilter, 0,20 µm	Sterilfiltrieren von Flüssigkeiten	ROTH
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)		Eppendorf
Urinbecher	Zellkultur	Sarstedt
Vacutainer Kanülenhalter	Blutentnahme	BD

Vacutainer-Sicherheitsblutentnahme-Set	Blutentnahme	BD
Wattestäbchen, steril	Ausplattieren Haemophilus	MedChrom
Zellkulturflaschen (T75)	Zellkultur	Falcon
Zellkulturflaschen (T75), BioCoat	Zellkultur, PBEC	BD Bioscience
Zellkulturflaschen (T25)	Zellkultur	TPP
Zellschaber	Abschaben der Zellen	Sarstedt
Zellkulturröhrchen (15/50ml)	Zellkultur	BD

Tab. 3.34: Verbrauchsmaterialien

3.1.3.14 Geräte

Methoden	Verwendungszweck/ Methode	Hersteller
Dampfsterilisator	Sterilisieren von Flüssigkeiten	H+P Labortechnik
Digitalkamera Camedia C-4040 200M	Abfotografieren der Gele	Olympus
Dunkelbox, UV-Tisch, Ethidiumbromidfilter	Dokumentation von Agarose Gelen	Syngene
ELISA Reader, Spectra Fluor Plus	Auslesen der ELISA Platten	Tecan
FACSCalibur Instrument	FACS-Messung	BD Biosciences
Fuji LAS3000 imaging system	Dokumentation der Blots	Fujifilm
Gelelektrophoresesystem	PCR	Febicon
Gelhalterungssystem	PCR	Febicon
Gelhalterungssystem	Western Blot	BioRad

Gelgießstand, Gel Caster	Western Blot	BioRad
Glasplatten	Western Blot	BioRad
Heizblock	Erhitzen, erwärmen	Eppendorf
Inkubator Hera Cell150	Zellkultur	Heraeus
Kämme	Western Blot	BioRad
Kühlzentrifuge GS-15R	Zellkultur	Beckman
Laborwaage	Erstellen von Lösungen	Sartorius
Laufkammer	Western Blot	BioRad
Mikroskop Wilovert S	Zellkultur	Hund Wetzlar
Multipette plus	Pipettieren	Eppendorf
Nukleofektor II	Transfektion A549 Zellen	Lonza
PH-Meter, Seven easy	Einstellung der pH-Werte	Mettler Toledo
Pipetboy Comfort	Pipettieren	IBS Integra Biosciences
Plattenzentrifuge 5403		Eppendorf
Pumpe	Absaugen von Flüssigkeiten	Integra Vacusafe
Rotierrad	Mischen von Proben	Rettberg Laborbedarf- Glasapparatebau
Sonifier, Branson 250	Aufschließen, Zerkleinern von DNA	G.Heinemann Labortechnik
Spektralphotometer	Bestimmen der Optischen Dichte	Eppendorf
Stauschlauch	Blutentnahme	

Sterilbank Hera Safe	Zellkultur	Hereaus
Sterilbank Antair BSK	Bakterienkultur	Hereaus
Thermocycler T3	Verdau	Biometra
Tischzentrifuge 5415C		Eppendorf
Wärmebad	Erwärmen von Flüssigkeiten	GFL
Vortexer, Vortex Genie2	Mischen von Proben	Scientific Industries
Zentrifuge GS-6	Bakterienkultur	Beckmann

Tab. 3.35: Geräte

3.1.3.15 Analysesoftware

Analysesoftware	Hersteller
GraphPad Prism, Version 5.0	GraphPad
CellQuest Pro	BD Biosciences
Magellan Data Analysis Software	Tecan
7300 Real-Time PCR System SDS Software	Applied Biosystems
Syngene	Imgen Technologies
SPSS software version 19	IBM
Fuji Image Gauge 3.45 Software	Fujifilm

Tab. 3.36: Analysesoftware

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien und sterilfiltrierten Lösungen durchgeführt. Alle Materialien und Geräte wurden vor und nach Benutzung mit 70 %igem Ethanol desinfiziert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C mit 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %.

Je nach Anforderung wurden die Medien vor Verwendung im 37 °C warmen Wasserbad angewärmt.

3.2.1.1 Kultivierung von A549 Zellen

Die A549-Zellen wurden bis zu 80 %iger Konfluenz in Zellkulturflaschen (T₇₅) kultiviert. Dann wurden die Zellen alle drei bis vier Tage in 6- und 48-Loch-Zellkultur-Platten, sowie in 25 cm² Flaschen in gewünschter Dichte ausgesät.

Hierfür wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen wurden einmal mit 10 ml PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden gelöst haben und anschließend in entsprechender Menge Zellkulturmedium resuspendiert. Die Stimulation der Zellen erfolgte 3 Tage nach 100 %iger Konfluenz. Hierfür wurde zwei Stunden vor der Stimulation auf FCS-freies Stimulationsmedium umgefüttert.

3.2.1.2 Kultivierung von normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBE)

Die NHBE-Zellen wurden in vorbeschichteten Zellkulturflaschen (T₇₅) kultiviert, es wurde jeden Tag ein Mediumwechsel durchgeführt.

Bei 80 %iger Konfluenz wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit HBSS gewaschen und mit 2,5 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C vom Boden gelöst. Anschließend wurde die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 5 ml TNS (Trypsin-Neutralisierungslösung) abgestoppt, die Zellsuspension in ein Zellkulturrohrchen überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 2,5 ml Zellkulturmedium resuspendiert.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 2,6x10⁵ Zellen pro Zellkulturflasche (T₇₅) und 1x10⁴ Zellen pro Well (48er Lochplatte) ausgesät und bis zur Konfluenz (100 %) kultiviert. Zwei Stunden vor der Stimulation erfolgte erneut ein Mediumwechsel.

3.2.1.3 Isolierung und Stimulation von Granulozyten

Eine entsprechende Menge humanes Blut wurde in dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene von gesunden Spendern in einem geschlossenen System und unter Verwendung von Heparin Röhren entnommen.

Das Vollblut wurde nach Umfüllung in 50 ml Zellkulturröhrchen mit 4 ml Dextran-Lösung und 8 ml PBS versehen und vorsichtig geschwenkt. Dextran vernetzt die Erythrozyten und beschleunigt somit die Erythrozytensedimentation. Nach 45 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die in der oberen Phase enthaltenen Zellen abgenommen und die in die untere Phase sedimentierten Erythrozyten verworfen.

Nach einmaligem Waschen der oberen Phase und Zentrifugieren bei 600 g für 5 Minuten und Raumtemperatur, wurde das sedimentierte Zellpellet in 15 ml PBS resuspendiert und sehr langsam über die gleiche Menge Ficoll geschichtet, für 35 Minuten bei 1300 g und Raumtemperatur ohne Bremse und bei geringer Beschleunigung zentrifugiert. Durch den entstandenen Dichtegradienten wandern die Granulozyten und die restlichen Erythrozyten nach unten durch die Ficoll-Schicht, die PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) verbleiben aufgrund ihrer geringeren Dichte zwischen Plasma und Ficoll.

Nach Entnahme von PBMCs, Ficoll und Plasma erfolgte bei den Granulozyten mittels destillierten Wassers ein Osmoschock, um zurückgebliebene Erythrozyten zu lysieren. Nach einmaligem Waschen der Zellen und Überführung in ein frisches Zellkulturgefäß, wurden die Zellen, wie im Folgenden beschrieben, gezählt. Es wurden jeweils 6×10^6 Zellen pro Zellkultur-Röhren in 500 μ l Stimulationsmedium ausgesät.

Alle Granulozyten wurden in FACS Röhren zunächst für 90 Minuten mit 50 ng/ml GM-CSF vorstimuliert und anschließend für eine Stunde mit den entsprechenden Inhibitoren oder direkt mit den jeweiligen Stimulanzen für 1 Stunde bzw. 14 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

80 % konfluente Zellen wurden zur Kryokonservierung, wie bei der Kultivierung beschrieben, vom Boden der Zellkulturflasche (T₇₅) abgelöst und in Zellkulturmedium resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 200 g und 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 3 ml Kryokonservierungsmedium resuspendiert und anschließend zu je 1 ml in Kryoröhren überführt. Die Kryoröhren wurden für mindestens 24 Stunden in einer Isopropanol-Kryobox auf -80 °C schonend abgekühlt, um Schäden durch Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden (Dissertation Zabel, 2009).

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

3.2.1.5 Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37 °C unter Schwenken aufgetaut. Nach vollständigem Auftauen wurde die Zellsuspension tröpfchenweise in 10 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium in eine Zellkulturflasche (T₇₅) gegeben. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt.

3.2.1.6 Bestimmung der Zellzahlen

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen, wie oben beschrieben, gewaschen, von der Zellkulturflasche abgelöst und in Zellkulturmedium resuspendiert. 20 µl dieser Zellsuspension wurden auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Um die Zellzahl zu ermitteln, wurden die Zellen von vier Großquadraten gezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Aus der Zellzahl, dem Verdünnungsverhältnis und der Kammertiefe errechnete sich dann die Zellzahl pro ml Zellsuspension:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{ausgezählte Zellen aus vier Großquadraten}}{4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante} (10^4)}$$

3.2.1.7 Gewinnen und Bearbeiten der bronchoalveolären Lavage

Die Gewinnung der Bronchoalveolären Lavages erfolgte in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt für Infektiologie und Pneumologie, der Charité Berlin im Rahmen einer bronchoskopischen Untersuchung von 165 Individuen. Alle Individuen wurden zuvor aufgeklärt und haben in die Untersuchung eingewilligt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité genehmigt. Alle Proben wurden uns als übrig gebliebenes Material ohne persönliche Informationen oder klinische Daten zur Verfügung gestellt.

Mittels zehnminütiger Zentrifugation bei 300 g wurde der Zellüberstand gewonnen, zur weiteren Bearbeitung in 2 ml Reaktionsgefäße umgefüllt und erneut bei 16.000 g zentrifugiert. Die Lagerung, bis zur weiteren Auswertung mittels CEACAM8 ELISA, erfolgte bei -80 °C. Die in der BAL enthaltenen Zellen wurden in PBS resuspendiert und mittels Hemochromozytometer Kammern gezählt. Die Zellen wurden luftgetrocknet und mittels May-Grünwald und Giemsa gefärbt. Mindestens 300 kernhaltige weiße Blutkörperchen wurden in jeder Zytozentrifugation Aufbereitung gezählt (Meyer et al. 2012).

Anhand der Zahl der Granulozyten erfolgte dann eine Gruppeneinteilung in drei Gruppen. In der ersten Gruppe befanden sich alle Spender, insgesamt 83 Personen, bei denen eine normale Granulozytenzahl (0,5 - 3,9 %) in der BAL festgestellt wurde. Die zweite Gruppe bestand aus 43 Personen, die eine leicht erhöhte Granulozytenzahl (4 - 14,9 %) in der BAL hatten und in die dritte Gruppe wurden alle Spender, insgesamt 39 Personen, eingeordnet, bei denen eine stark erhöhte Granulozytenzahl (15-95 %) festgestellt wurde.

3.2.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.2.1 Bakterienkultur

Alle Arbeiten mit Bakterienkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien und Geräten. Alle verwendeten Materialien und Geräte wurden vor und nach Gebrauch mit Decosept desinfiziert.

3.2.2.2 Lagerung, Anzucht und Stimulation von *Moraxella catarrhalis*

Anfertigung der Bakterienstöcke

Die Moraxellen wurden auf Columbia-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach circa 12 Stunden wurde der gesamte Bakterienrasen mit einer sterilen Impföse von der Agarplatte genommen, in 500 µl BHI (engl.: *brain heart infusion*) Medium plus 500 µl Glycerol eingerieben, in Kryoröhrchen überführt und bei -20 °C gelagert.

Zur längerfristigeren Lagerung wurden die Bakterien in 100 % Glycerol eingerieben und bei -80 °C gelagert.

Anzucht

Bei Bedarf wurden aus diesen -20er Aliquots mittels einer Impföse Bakterien entnommen, über die gesamte Blutagarplatte ausgestrichen und für 12 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde etwa ein Viertel des Bakterienrasens abgenommen und in 25 ml BHI Medium resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde unter Schütteln und Anwesenheit von Sauerstoff bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert. Die Moraxellen erreichen so eine mittlere logarithmische Wachstumsphase, in welcher sie optimale Infektionseigenschaften besitzen (Dissertation H. Haarmann, 2011). Anschließend wurde die Suspension bei 2000 g für 5 Minuten zentrifugiert, das BHI Medium vollständig abgesaugt und das Bakterienpellet in 2 ml PBS resuspendiert.

In einem Spektralphotometer erfolgte dann bei einer Wellenlänge von 405 nm die Ermittlung der optischen Dichte der Bakteriensuspension (OD₄₀₅ 0,3 entspricht 1x10⁶ cfu/ml; engl.: *colony forming units*).

Stimulation

Für die Stimulation wurden die Moraxellen wie oben angezüchtet und die entsprechende Menge an Bakteriensuspension wurde dem Zellkulturmedium hinzugegeben. In der Regel wurden die Zellen mit einer MOI (engl.: *Multiplicity of infection*) von 5 bis 50 stimuliert. Für die Zeit der Stimulation wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.2.3 Lagerung, Anzucht und Stimulation von *Haemophilus influenzae*

Anfertigung der Bakterienstöcke

Die Haemophilen wurden auf Schoko Agar Platten mit 2 µg/ml Chloramphenicol ausgestrichen und für 12 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde die gesamte Bakterienmenge von der Agar Platte abgenommen und in BHI Medium mit 2 µg/ml Chloramphenicol, Hemin und NAD- (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) eingerieben und bei 37 °C unter Schütteln und Anwesenheit von Sauerstoff inkubiert. Nach etwa vier Stunden wurde diese Bakteriensuspension für 5 Minuten bei 2000 g zentrifugiert und dann das BHI Medium vollständig abgesaugt. Die Zellpellets wurden dann in 500 µl BHI Medium plus 500 µl Glycerol resuspendiert und in Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

Anzucht

Zur Anzucht wurde mittels einer sterilen Impföse Bakterienmaterial aus den -80 °C Stocks entnommen und auf Schoko Agar Platten ein fraktionierter Ausstrich angefertigt. Die Platten wurden dann bei 37 °C und 5 % CO₂ für 12 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde eine entsprechende Menge an Bakterienkulturen mit einem sterilen Wattestäbchen von der Platte entnommen und in BHI Medium mit Hemin und NAD- eingerieben und für drei Stunden bei 37 °C und unter Anwesenheit von Sauerstoff schüttelnd inkubiert.

Nach anschließender Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 1-2 ml sterilem PBS (engl.: *phosphat buffered saline*; Phosphat-gepufferte Salzlösung) resuspendiert und die Bakterienmenge in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt (OD₆₀₀ 0,15 entspricht 1x10⁸ cfu/ml).

Stimulation

Nach der Anzucht wurde für die Stimulation zu dem Zellkulturmedium die entsprechende Menge an Bakteriensuspension hinzugegeben.

In der Regel wurden die Zellen mit einer MOI von 10 bis 100 stimuliert. Für die Zeit der Stimulation wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.2.4 Einsatz der Kontrollen

Als Positivkontrollen dienten Pam₃Cys und Pervanadat. Diese wurden zum Zeitpunkt der Stimulation in entsprechender Konzentration in das Stimulationsmedium gegeben.

Als Negativkontrolle dienten ratCEACAM1 und das entsprechende Stimulationsmedium ohne Stimulantien.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Diese Methode dient als Nachweis des erfolgten CEACAM1 Knockdowns in A549 Zellen.

Aufreinigung der RNA

Nach Stimulation von 2×10^5 A549 Zellen in 12-Loch-Zellkultur-Platten wurde das Stimulationsmedium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und anschließend die Zellen mit 400 μ l Lysepuffer lysiert. Die Isolierung der RNA erfolgte im Anschluss mit Hilfe des RNA Isolationskits der Firma 5Prime nach Herstellerangaben.

Um Gehalt und Reinheit der RNA zu ermitteln, wurden 4 μ l der RNA-Probe mit 196 μ l Aqua bidest. vermischt und es erfolgte eine Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm im Spektralphotometer. Als Nullwert wurde die optische Dichte von A. bidest. (zweifach destilliertes Wasser) ohne RNA gemessen.

Die RNA-Konzentration errechnete sich wie folgt:

$$OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnung}(25)/1000 = \text{RNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Die Reinheit der RNA konnte mit Hilfe folgender Formel ermittelt werden.

$$\frac{OD_{260} \text{ (Optimum RNA Absorption)}}{OD_{280} \text{ (Optimum Protein Absorption)}}$$

Lag dieser Quotient zwischen 1,5 und 2,0 konnte die RNA als rein angesehen werden.

Reverse Transkriptase

Pro Probe wurde 1 μ g RNA mit A. bidest. auf 10 μ l Endvolumen aufgefüllt. Es wurden nun 10 μ l des RT-Mastermixes pro Probe hinzu gegeben und die Reaktion im Thermocycler für 10 Minuten bei 25 °C gestartet. Dann wurden die Proben für 120 Minuten bei 37 °C und anschließend für 5 Sekunden bei 85 °C erhitzt. Pro Probe mit enthaltener cDNA wurden nun 80 μ l A. bidest. gegeben und die Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

Polymerase Kettenreaktion

Zu 5 μ l der cDNA wurden 20 μ l des zuvor angesetzten PCR Mastermixes gegeben und dann im Thermocycler folgende Reaktionsschritte durchlaufen:

Reaktionsschritte	CEACAM1		GAPDH	
	Temperatur °C	Dauer	Temperatur °C	Dauer
Denaturierung	95	3 min	95	3 min
Denaturierung	95	15 sec	95	15 sec
Hybridisierung	64	15 sec	60	15 sec
Polymerisation	72	45 sec	72	45 sec
Extension	72	5 min	72	5 min
Zyklen (ab Schritt 2-4)	31-34	22-24		

Tab. 3.37: Polymerase Kettenreaktion

Als Kontrolle diente das Referenz-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase). Gleich starke Anwesenheit von GAPDH weist auf eine gleichmäßige cDNA Konzentration.

Elektrophorese

Unter Kontrolle wurde die Agarose mittels Mikrowelle in dem TBE (TRIS-Borat-EDTA Puffer) bis zur vollständigen Auflösung erhitzt. Nach Abkühlen und Zugabe von 3 µl *GelRed* wurde die Agarose in die Gelhalterung gegossen. 12 µl der Proben wurden nun mit je 2 µl Ladepuffer versehen und genauso wie 12 µl des 1:3 vorverdünnten Markers, nach Erhärten des Gels und Entfernen der Käbme in die Taschen des Gels pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte mittels Elektrophorese bei 100 V bis 120 V für circa 30 Minuten.

Die Gele wurden anschließend unter UV-Licht mit einer Digitalkamera abfotografiert.

3.2.3.2 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie können Eigenschaften von Zellen ermittelt werden.

Um nachzuweisen, ob sich CEACAM8 und L-Selektin (CD62L) auf der Oberfläche der Zellen befindet, wurden 2×10^6 humane Granulozyten nach einmaligem Waschen in Waschpuffer mit dem entsprechenden primären Antikörper für 60 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit dem entsprechenden sekundären

Antikörper für eine halbe Stunde im Dunkeln ebenfalls bei 4 °C inkubiert und anschließend zweimal gewaschen.

Um die Oberflächenexpression von TLR2 und CEACAM1 nachzuweisen, wurden 2×10^5 NHBE- bzw. A549-Zellen nach Fixierung in Formaldehyd einmal in Blockpuffer gewaschen und anschließend für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert. Dann wurden die Zellen zweimal gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Waschpuffer und anschließendem einmaligem Waschen in PBS erfolgte die Analysierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Die Hintergrundfluoreszenz wurde mittels Fluorochrom (FITC) bzw. Phycoerythrin (PE) gekoppelter Sekundärantikörper ohne Verwendung spezifischer Primärantikörper bestimmt.

Mit Hilfe des Annexin V-Fitc Kits von Miltenyi Biotec wurden lebende, apoptotische und nekrotische Zellen ermittelt. Phosphatidylserin befindet sich bei intakten Zellen auf der Innenseite der Zellmembran und kann somit nicht angefärbt werden. Bei apoptotischen Zellen ist Phosphatidylserin vermehrt auf der Außenseite der Zellmembran zu finden und wird so von fluoreszenzkonjugiertem Annexin V gebunden, bei nekrotischen und spätapoptotischen Zellen wird das Innere der Zelle durch Störung der Zellmembran zugänglich und sowohl Annexin V als auch Propidiumiodid können in die Zelle eindringen. Annexin V bindet an Phosphatidylserin und Propidiumiodid an DNA im Zellkern (Dissertation Werdehausen, 2009). Das Kit wurde den Herstellerangaben entsprechend angewendet.

Alle Messungen wurden mit dem FACSCalibur durchgeführt und mit der CellQuest Pro Software der Firma BD Biosciences analysiert.

3.2.3.3 Transiente Transfektion von A549-Zellen

1×10^6 A549 Zellen wurden mit Hilfe des Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V transient transfiziert, um die Translation von CEACAM1 zu unterbinden. Die Zellmembran wird bei diesem Verfahren vorübergehend durch Spannungspulse durchlässig gemacht (sogenannte Elektroporation), so dass die siRNA in die Zelle gelangen kann. Die siRNA bindet innerhalb der Zelle an die mRNA des Zielproteins und verhindert so die Translation (Dissertation S. Zabel, 2009).

Es wurde ein Zellpelett mit 1×10^6 Zellen in 100 µl Solution V und 2 µg siRNA resuspendiert, in eine Küvette pipettiert und laut Herstellerangaben nukleofektiert (Programm G16, Nucleofector, Amaxa). Anschließend wurden die Zellen mittels Einmalpipette in vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt und in entsprechende Zellkultur Lochplatten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

Die Zellen wurden zum Zeitpunkt des maximalen Knockdowns, nach 96 Stunden, stimuliert. Dieser Zeitpunkt wurde mittels FACS- und PCR-Analyse ermittelt.

3.2.3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

IL8 ELISA

Um die Sekretion von IL8 zu vergleichen, wurden überkonfluente A549-Zellen (circa 5×10^4 Zellen) und konfluente NHBE-Zellen (circa 4×10^4 Zellen) in 48-Loch-Zellkultur-Platten mit Pam₃Cys allein, in Kombination mit CEACAM8 und jeweils mit und ohne Präinkubation mit Ag18/20 stimuliert. Alle Stimulationen erfolgten in Dreierbestimmungen. Die Zellkulturüberstände wurden nach 16 Stunden Inkubationszeit abgenommen, in Reaktionsgefäße überführt und entweder direkt im ELISA gemessen oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C weggefroren.

Die Durchführung des ELISAs erfolgte anhand der Herstellerangaben des IL8-ELISA-Detection Kits.

Am Vortag der ELISA-Messung wurden 100 µl des IL8-Capture-Antikörpers in Carbonatpuffer pro Loch auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um unspezifische Bindungen abzubinden, wurde am nächsten Tag nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer, pro Vertiefung 200 µl des Blockpuffers für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Lochplatte gegeben.

Um das in den Proben enthaltene IL8 zu quantifizieren, wurde dieses in Blockpuffer so gelöst, dass eine Standardreihe angelegt werden konnte. Der höchste Standardwert wies eine Konzentration von 200 pg/ml auf, alle folgenden Standardwerte wurden in Blockpuffer jeweils 1:1 verdünnt, endend mit dem Nullstandard ohne IL8. Die Zellkulturüberstände wurden nun abhängig vom Zelltyp in Blockpuffer verdünnt (A549 Zellen 1:200 und NHBE Zellen 1:100) und nach dreimaligem Waschen zusammen mit dem Standard aufgetragen. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur und viermaligem Waschen, wurde der Detektionsantikörper zusammen mit der Enzymreagenz in Carbonatpuffer aufgetragen. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde siebenmal gewaschen und das Substrat für die enzymatische Farbreaktion für 10-30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde nach Kontrolle der Färbung des Standards mit 50 µl Stopplösung abgestoppt und im Plattenlesegerät bei 450 nm analysiert.

CEACAM8-ELISA

Zur Untersuchung des löslichen CEACAM8 in Abhängigkeit unterschiedlicher Stimulationen, wurden Granulozyten nach Vorstimulation mit GM-CSF, Inkubation mit den jeweiligen Inhibitoren und Stimulanzen für 10 Minuten bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, erneut bei 16.000 g und 4 °C für 35 Minuten zentrifugiert und in frische Reaktionsgefäße umgefüllt. Die Zellkulturüberstände wurden entweder direkt im ELISA gemessen oder bei -20 °C weggefroren.

Die Bronchoalveoläre Lavage wurde ebenfalls bei 16.000 g zentrifugiert, in frische 2 ml Reaktionsgefäße umgefüllt und genauso wie die Granulozyten im CEACAM8 ELISA gemessen.

Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde mit je 50 µl anti-CEA Antikörper in PBS für zwei Stunden beschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde für zwei Stunden 300 µl Blockpuffer pro Vertiefung auf die Platte gegeben, um die unspezifischen Bindungen abzubinden. Um das in den Proben enthaltene CEACAM8 zu quantifizieren, wurde ein Standard mit CEACAM8 in Verdünnungspuffer so angelegt, dass sich eine Standardreihe mit folgenden Konzentrationen ergab: 15 ng/ml, 10 ng/ml, 7,5 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0 ng/ml. Nach dreimaligem Herunterwaschen des Blockpuffers wurden Standard und unverdünnte Proben jeweils in Duplikaten aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen für 2,5 Stunden 100 µl des Detektionsantikörpers für CEACAM8 in Verdünnungspuffer aufgetragen. Nach erneutem dreimaligen Waschen und Zugabe von 100 µl des HRP (engl.: *Horse radish peroxidase*) Antikörpers in Verdünnungspuffer, wurde ein letztes Mal viermal gewaschen. Nun erfolgte durch Zugabe von 100 µl Substrat pro Loch im Dunkeln eine enzymatische Farbreaktion. Diese wurde nach etwa 5-10 Minuten durch Zugabe von 20 µl Schwefelsäure abgestoppt und die Auswertung des ELISA erfolgte im Plattenlesegerät bei 450 nm.

3.2.3.6 Western Blot

Extraktion des Gesamtproteins

Um die Phosphorylierung der Kinase Akt zu untersuchen, wurden überkonfluente A549 Zellen (4×10^5) in 6-Loch-Zellkultur-Platten mit Pam₃Cys alleine und in einer Kombination mit CEACAM8 stimuliert. Nach 30 Minuten wurden die Platten auf Eis gestellt, das Stimulationsmedium abgesaugt und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in je 100 µl kaltem Lysepuffer vom Boden abgeschabt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße bei 16.000 g und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Protein befindet sich im Überstand der Zelllysate.

Proteinbestimmung nach Bradford

Das in den Proben befindliche Gesamtprotein wurde mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt. „Der Assay beruht auf der Verschiebung des Coomassie®-Absorptionsmaximums von 470 nm nach 595 nm nach Proteinbindung in saurem Medium“ (Gebrauchsanweisung Bradford Reagent, 5x, Serva Elektrophoresis GmbH). Nach fünfminütiger Inkubation von 5 µl der Proteinlösung in 1000 µl der Bradfordlösung, wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und die Gesamtproteinmenge errechnet.

Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page)

Die Proben wurden 8 Minuten in Lämmli-puffer bei 95 °C im Heizblock gekocht, um die Proteine zu denaturieren. Das SDS lagert sich an die Proteine an und verdeckt deren Eigenladung, somit sind alle Proteine gleichmäßig negativ geladen. Pro Probe wurde nun 40 µg in die Taschen des vorbereiteten Gels aufgetragen.

Die Proteinauftrennung erfolgte in sechsprozentigem Sammel- und zehnprozentigem Trenngel bei 25 mA für 1 Stunde. Zur Quantifizierung der Proteingröße liefen Marker von BioRad und Santa Cruz mit.

Western Blot

Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und luftblasenfrei auf eine Hybond-Nitrozellulosemembran gelegt. Auf jede Seite dieser Membran wurden je zwei Lagen Whatman-Filterpapier und ein in Blotpuffer getränkter Schwamm gelegt, dieses Sandwich wurde in die Blotvorrichtung gespannt. Zum Proteintransfer wurde die Blotvorrichtung in die Blotkammer gestellt und anschliessend mit Blotpuffer aufgefüllt. Der Blotvorgang lief bei 100 V gekühlt für eine Stunde. Im Anschluss wurde zur Kontrolle des Proteintransfers eine Ponceau-Färbung durchgeführt. Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockpuffer schwenkend inkubiert. Dann wurde über Nacht der entsprechende erste Antikörper bei 4 °C und schwenkend inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach 10 minütigem dreimaligem Waschen in Waschpuffer der entsprechende zweite Antikörper für eine Stunde ebenfalls schwenkend inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde auf die Membran eine ECL (engl.: *enhanced chemiluminescence*) Lösung für 5 Minuten gegeben. ECL wird durch das an den sekundären Antikörper gebundene HRP so umgesetzt, dass es leuchtet und somit den Film belichtet. Bei allen durchgeführten Western Blots wurden Aktin oder β-Tubulin als Referenzprotein eingesetzt, so konnte die gleichmäßige Beladung mit Protein kontrolliert werden

3.2.3.7 Immunpräzipitation/Co-Immunpräzipitation

Um die Phosphorylierung von CEACAM1 und die vermutete Verbindung zu SHP1 zu bestätigen, wurden 4×10^5 überkonfluente A549 Zellen in 6-Loch-Platten für 5 Minuten mit Pam₃Cys, Pam₃Cys in Kombination mit CEACAM8 und Pervanadat als Positivkontrolle stimuliert. Als negative Kontrolle wurde ratCEACAM1-Fc anstelle von CEACAM8 verwendet. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Platten auf Eis gestellt, das Stimulationsmedium abgesaugt, die Zellen mit je 100 µl kaltem CEACAM-Lyse Puffer lysiert und anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zur sofortigen Weiterverwendung wurden die Zelllysate auf Eis gelagert und die DNA durch zehn Ultraschallimpulse aufgeschlossen. Größere zelluläre Bestandteile wurden mittels Zentrifugation bei 18.600 g für

20 Minuten bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde der entsprechende Primär-Antikörper zugegeben und dann für eine Stunde bei 4 °C im Drehrad rotiert. Nach Zugabe von Protein-G-Agarose wurden die Proben über Nacht bei 4 °C rotiert. Am nächsten Tag wurden die Antikörper-Protein-Komplexe durch Zentrifugation für 20 Sekunden bei 300 g abgetrennt und durch dreimaliges Waschen in kaltem Waschpuffer von Fremdprotein entfernt und anschließend in Lämmli-puffer für 10 Minuten bei 95 °C im Heizblock gekocht, um die Proteine nun von den Agarose Beads zu lösen.

Die folgende SDS Page und der Western Blot erfolgten so wie im oben beschriebenen Western Blot, mit einigen, im folgenden beschriebenen Unterschieden.

Pro Probe wurde nun 15 µl in die Taschen des vorbereiteten Gels aufgetragen. Die Proteinauftrennung erfolgte in vierprozentigem Sammel- und siebenprozentigem Trenngel bei 100 V für zweieinhalb Stunden. Die Tyrosin-Phosphorylierung von CEACAM1, Co-Präzipitation von SHP1 und Präzipitation von CEACAM1 wurden durch Zugabe der entsprechenden Primärantikörper (Phospho-Tyr-spezifischer Antikörper, Anti-SHP1- und Anti-CEACAM1-Antikörper) bestimmt. Diese wurden über Nacht bei 4 °C schwenkend inkubiert. Nach einstündiger Inkubation mit dem HRP-gekoppelten zweiten Antikörper, wurden die Blots mit ECL entwickelt und anschließend durch ein Bildgebungssystem von Fuji dokumentiert und analysiert.

3.2.3.8 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Mit dieser Methode kann festgestellt werden, ob Proteine an bestimmte Teile der DNA binden.

Um herauszufinden, ob bestimmte Transkriptionsfaktoren an die DNA binden, wurden A549 Zellen bis zur Überkonfluenz in T₂₅-Flaschen angezchtet und mit Pam₃Cys alleine bzw. mit einer Kombination von Pam₃Cys und CEACAM8 stimuliert und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das Stimulationsmedium abgesaugt und die Zellen mit 1 %igem Formaldehyd versehen. Dadurch konnte die zu diesem Zeitpunkt bestehende Protein-Chromatin-Bindung fixiert werden. Nun wurde die Wirkung mit 0,125 M Glycin neutralisiert, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in PBS vom Boden der Zellkulturflasche geschabt. Nach Überführung der Zellen in 15 ml Zellkulturröhrchen und 5 minütiger Zentrifugation bei 200 g, wurden dieselben in 1 ml Lysepuffer sanft resuspendiert und bei 4 °C gelagert. Um die DNA zu fragmentieren, wurden die auf Eis gelagerten Zelllysate für je 4 Minuten beschallt und anschließend für 20 Minuten bei 4 °C und 16.000 g zentrifugiert. Die Lysate wurden nun in neue Reaktionsgefäße zu je 50 µl für den Input und zu je 250 µl für die Immunpräzipitation aliquotiert. Nach Zugabe von je 10 µl des entsprechenden Antikörpers gegen den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor, wurden die Proben über Nacht bei 4 °C rotiert. Um den Antikörper-Transkriptionsfaktor-

Komplex zu binden, wurden am nächsten Tag 100 μ l eines Protein A/G Agarose und ChIP-RIPA-Puffer (engl.: *radio immunoprecipitation assay*) Gemisches zu den Proben gegeben, dann erneut für 1-2 Stunden rotiert und anschließend für 1 Minute bei 200 g zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde zweimal mit ChIP-RIPA-Puffer gewaschen, einmal mit High Salt Puffer, erneut einmal mit ChIP-RIPA und anschließend mit TE-Puffer (Tris-EDTA). Zuletzt wurden die Proteine von den Beads durch Zugabe von Eluierungspuffer und 15 minütiger Inkubation im Schüttler bei 30 °C und 1200 rpm gelöst. Nach erneutem Zentrifugieren wurden 50 μ l der gelösten Proteine abgenommen und zu 150 μ l Te-Puffer mit 0,5 % RNase gegeben. Die Proben für den Input wurden ebenfalls mit je 150 μ l Te-Puffer plus 0,5 % RNase und 1 % SDS versehen und alle Ansätze bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 % Proteinase K pro Probe wurden diese zunächst für 12 Stunden bei 37 °C, dann für 6 Stunden bei 65 °C verdaut und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Aufreinigung der DNA laut Herstellerangaben des PCR Purifikation Kits von Qiagen. Amplifiziert wurde die DNA in einer IL8-Promoter-Primer-PCR.

3.2.4 Statistik

Für die statistische Auswertung der ELISA und FACS Darstellungen wurde das Programm *Prism 5.0* von *Graph Pad*[®] verwendet. Die Auswertung erfolgte anhand des *one-way ANOVA* (engl.: *analysis of variance*, Varianzanalyse) und des *Newman-Keuls post-Tests*. Alle gezeigten Versuche wurden mindestens dreimal erfolgreich und unabhängig voneinander durchgeführt.

Die Western-Blot, Immun-, Co-Immunpräzipitationen und PCR-Analysen wurden ebenfalls mindestens dreimal erfolgreich durchgeführt und es wurde jeweils ein repräsentatives von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen als Abbildung ausgewählt.

Die 165 zufällig gesammelten BAL Proben wurden mittels eines CEACAM8 ELISAs auf Anwesenheit von CEACAM8 getestet. Die Anzahl der Granulozyten in der BAL wurde ermittelt. Alle vorhandenen Daten wurden in einem Excel-Arbeitsblatt zusammengetragen. Die Daten wurden in eine SPSS Datenbank übertragen und dann analysiert mittels der SPSS Software Version 19 IBM. Der Pearson Chi Quadrat Test wurde benutzt, um Unterschiede in den kategorischen Variablen mit zwei Variablen zu untersuchen und die logistische Regressionsanalyse wurde verwendet, um die kategorischen Variablen mit mehr als zwei Variablen zu untersuchen.

Das Quotenverhältnis (engl.: *Odds Ratio*, OR) besagt, wie stark zwei Merkmale miteinander zusammen hängen. In diesem Fall bezieht sich die Rechnung auf die Zusammenhänge der Merkmale CEACAM8 positiv zu sein und erhöhte Granulozyten zu haben. Für diese Berechnung wurde eine univariable logistische Regressionsanalyse eingesetzt. Ist die OR genau 1, bedeutet dies, dass es keinen Unterschied in den Odds gibt. Ist die Zahl größer 1,

sind die Odds der ersten Gruppe größer. Um zu bestimmen, wie präzise die Errechnung der OR ist, wurde darüber hinaus ein 95 %iges Konfidenzintervall (95 % C.I. für OR) bestimmt, welches angibt, dass 95 % der errechneten Werte wahr sind (Wikipedia; Leitlinien.de). Eine multivariable logistische Regressionsanalyse wurde verwendet, um die Einwirkungen einer Variablen auf das Ergebnis anzupassen.

Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p < 0,05$) als statistisch signifikant angesehen und im Falle von graphischen Darstellungen mit einem Stern markiert.

4 Ergebnisse

4.1 PMA (Phorbol-Myristat-Acetat)-aktivierte Phenotypen der humanen Granulozyten zeigen sowohl eine erhöhte Expression des CEACAM8 Rezeptors auf der Zelloberfläche als auch eine vermehrte Sekretion des löslichen CEACAM8.

Für alle Granulozytenversuche gilt Folgendes: Die aus dem Blut gesunder Individuen isolierten Granulozyten (6×10^6 Granulozyten pro Ansatz) wurden vor der Stimulation mit GM-CSF für 90 Minuten vorstimuliert. GM-CSF ist in der Lage, humane Granulozyten auf das Auswandern zu Chemokinen vorzubereiten, sogenanntes *primen* (Hartl et al. 2008; Chung et al. 2001) und begünstigt deren Rekrutierung, Aktivierung und ein verlängertes Leben (Mantovani et al. 2011). GM-CSF spezifische Beeinflussung der Expression bzw. Sekretion wurden zuvor ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Die vorstimulierten Zellen gelten als Negativkontrolle (c; engl.: *control*).

Anschliessend wurden die vorstimulierten Granulozyten mit PMA stimuliert. PMA induziert die Freisetzung von CEACAM8 durch humane Granulozyten (Kuroki et al. 1992). Zunächst wurde der funktionelle Effekt der PMA Aktivierung auf humanen Granulozyten nachgewiesen. Ein Zeichen der Aktivierung von Granulozyten sind Degranulationsprozesse, die durch die verringerte Expression von CD62L auf der Oberfläche der Zellen widergespiegelt werden (Janke et al. 2008; Hayashi et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch den Abfall von CD62L (L-Selektin) (Abb. 1a) und den Anstieg von CEACAM8 auf der Oberfläche der Granulozyten (Abb. 1b) gezeigt werden.

Frisch isolierte und vorstimulierte Granulozyten wurden mit PMA stimuliert. Dabei konnte eine Stunde nach PMA Stimulation der Granulozyten eine signifikante Abnahme der CD62L Expression auf der Zelloberfläche beobachtet werden (Abb. 1a). Anschließend wurde der Zellüberstand der stimulierten Zellen mittels ELISA untersucht und es konnte gezeigt werden, dass PMA stimulierte Granulozyten eine signifikante Erhöhung der CEACAM8 Sekretion aufweisen (Abb. 1c). Als ebenso beweisend für eine Aktivierung der Granulozyten zeigte sich der deutliche Anstieg an IL8 (Abb. 1d).

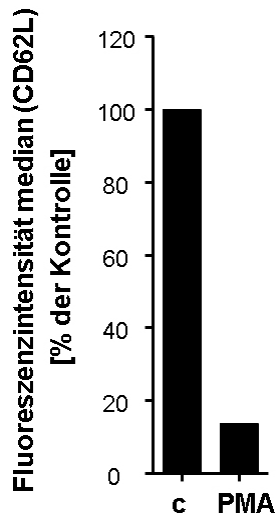


Abb. 1a: Expression von CD62L durch PMA-aktivierte Granulozyten

In allen Versuchen mit Granulozyten wurden dieselbigen mit 50 ng/ml GM-CSF für 90 min vorinkubiert. GM-CSF dient als Kontrolle (c). Die Expression von CD62L auf 1×10^6 humanen Granulozyten wurde nach einer Stunde Inkubation mit 20 ng/ml PMA mittels FACS Analyse ermittelt. Bei dem abgebildeten Graphen handelt es sich um eine repräsentative von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Fluoreszenzintensität wird in Prozent zur Kontrolle angegeben.

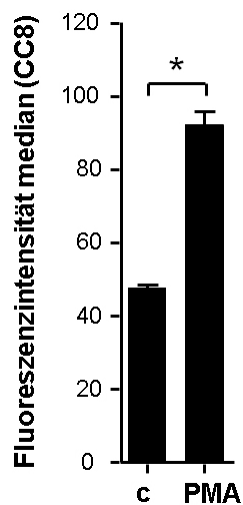


Abb. 1b: Expression von CEACAM8 durch PMA-aktivierte Granulozyten

Die Expression von CEACAM8 wurde auf den wie in Abb. 1a stimulierten humanen Granulozyten mittels FACS Analyse gemessen. Es handelt sich hier um eine Vereinigung von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Signifikante Unterschiede in der CEACAM8 Expression ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Die Hintergrundfluoreszenz wurde mit Hilfe entsprechender Immunglobuline an Stelle spezifischer primärer Antikörper bestimmt.

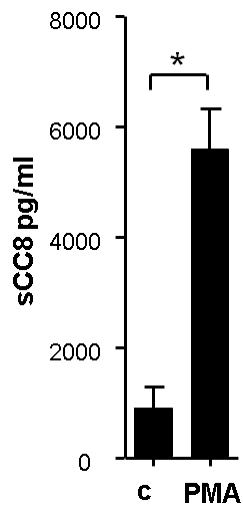


Abb. 1c: Sekretion von CEACAM8 durch PMA-aktivierte Granulozyten

Lösliches CEACAM8 humaner Granulozyten wird nach einer Stunde Stimulation mit PMA (20 ng/ml) mittels ELISA ermittelt. Signifikante Unterschiede in der CEACAM8 Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

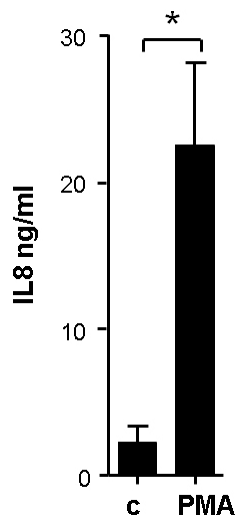


Abb. 1d: Sekretion von Interleukin 8 durch PMA-aktivierte Granulozyten

Interleukin-8 (IL8) wird mittels ELISA im Überstand der wie in Abbildung 1c stimulierten humanen Granulozyten quantifiziert. Beide Graphen zeigen eine Vereinigung von insgesamt vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen, in denen die einzelnen Werte jeweils als Duplikate gemessen wurden. Signifikante Unterschiede in der IL8 Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

4.2 Regulation von Sekretion und Expression von CEACAM8 durch humane Granulozyten wird unterschiedlich reguliert durch TLR7 und TLR9

Als nächstes wurde die Auswirkung unterschiedlicher *pattern recognition receptors* auf die Sekretion und Expression von membrangebundenem und löslichem CEACAM8 untersucht.

Toll-like Rezeptoren haben eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr gegen unterschiedliche Bakterien (Slevogt et al. 2007). Die TLR-Liganden, mit denen die Granulozyten hier stimuliert wurden, lassen sich in hohen Konzentrationen in bronchoalveolären Lavages von Patienten mit COPD nachweisen (Hartl et al. 2008). Darüber hinaus spielt auch TNF α eine wichtige Rolle in der COPD (Chung et al. 2001). Laut Hayashi et al. 2003 sind alle TLR-Rezeptoren bis auf TLR3 auf Granulozyten exprimiert, wobei es bezüglich der Anwesenheit von TLR3 und TLR7 auf Granulozyten unterschiedliche Meinungen in der Literatur gibt (Hayashi et al. 2003; Hartl et al. 2008). TLR7 detektiert kurze einzel- und doppelsträngige RNA, TLR8 erkennt einzelsträngige RNA und TLR9 unmethylierte CpG Motive in der DNA. R-848 ist ein *small molecule* Ligand für TLR7 und TLR8 (Janke et al. 2008). Granulozyten werden laut Janke direkt und selektiv durch TLR8 aktiviert, nicht aber durch TLR7 (Janke et al. 2008).

Vorstimulierte humane Granulozyten wurden mit den Agonisten für TLR2 (Pam₃Cys (P3C)), TLR3 (Poly:IC (P:IC)), TLR4 (LPS), TLR5 (Flagellin), TLR7/8 (Resiquimod-848 (R848)), TLR9 (unmethylierte CpG) und TNF α (TNF) für eine Stunde bzw. 14 Stunden stimuliert. PMA diente als Positivkontrolle. Nach einer Stunde Stimulationszeit konnte keine signifikante Änderung der CEACAM8 Sekretion bzw. Expression bewiesen werden (Daten nicht gezeigt), allerdings wurde nach 14 Stunden ein deutlicher Anstieg sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Zellüberstand festgestellt. Wie in Abbildung 2a dargestellt ist, wurde die Expression von membrangebundenem CEACAM8 auf der Oberfläche der Granulozyten neben PMA durch Resiquimod-848, dem Agonisten für TLR7/8, reguliert. Die Freisetzung des löslichen CEACAM8 wurde im Gegensatz dazu durch unmethylierte CpG gesteuert, und ist somit TLR9 abhängig (Abb. 2b). Der CpG-vermittelte Anstieg von CEACAM8 überschritt sogar den durch PMA vermittelten Effekt.

Übereinstimmend mit den bisherigen Ergebnissen, stieg IL8 im Überstand der Granulozyten bei Stimulation mit CpG und R848 ebenfalls signifikant an. TNF α , Pam₃Cys und LPS übten auch einen erkennbaren, jedoch keinen signifikanten Effekt auf die IL8 Sekretion aus (Abb. 2c).

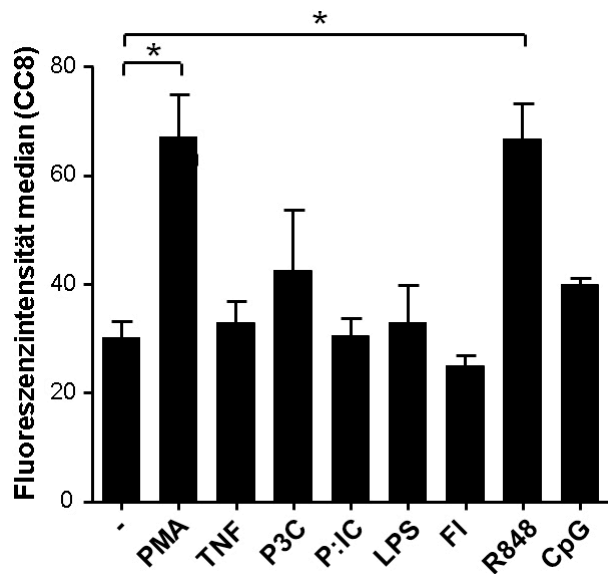


Abb. 2a: Regulation der Expression von CEACAM8 durch humane Granulozyten

Exprimiertes CEACAM8 wurde auf der Zelloberfläche von humanen Granulozyten nach 14 Stunden Stimulation im FACS gemessen. Die Granulozyten wurden vorinkubiert mit GM-CSF (-) und stimuliert mit 20 ng/ml Phorbol Myristat Acetat (PMA), 5 ng/ml Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF), 10 µg/ml Pam3Cys (P3C), 100 ng/ml PolyIC (P:IC), 1 µg/ml Flagellin (FI), 10 µg/ml Resiquimod-848 (R 848), 100 µg/ml unmethylierte CpG enthaltende oligonukleotide Sequenzen (CpG), 10 µg/ml Peptidoglycan (PGN) und 10 µg/ml Muramyl Dipeptide (MDP).

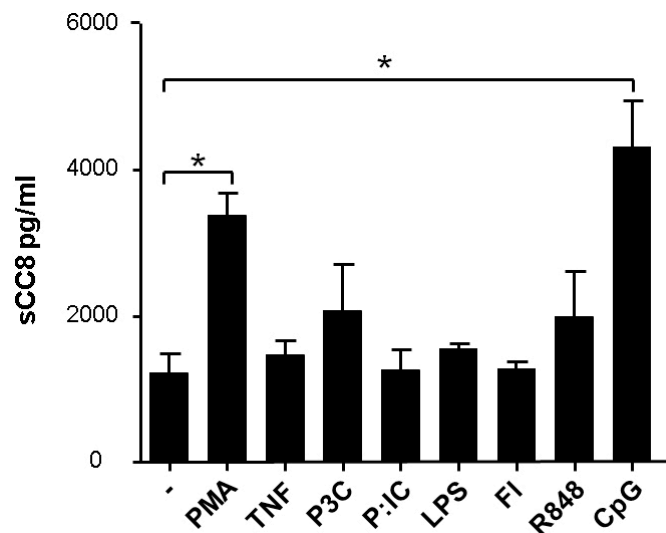


Abb. 2b: Regulation der Sekretion von CEACAM8 durch humane Granulozyten

Lösliches CEACAM8 wurde im Überstand von den wie in Abbildung 2a behandelten Granulozyten quantifiziert. Bei beiden Abbildungen handelt es sich um eine Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Signifikante Unterschiede in der CEACAM8 Expression und Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

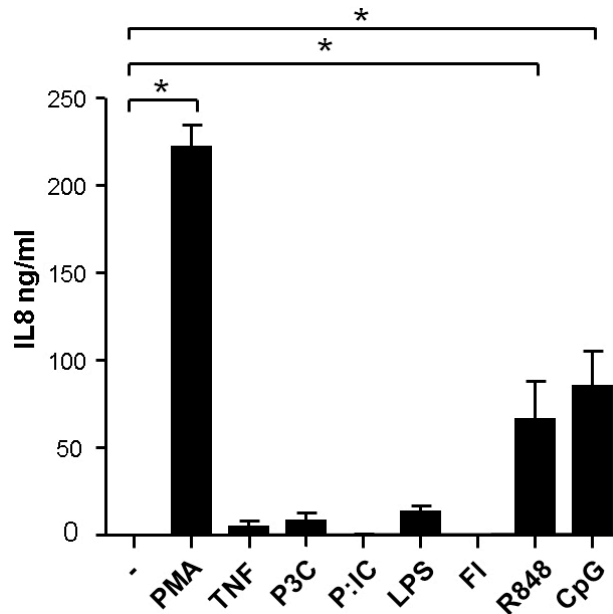


Abb. 2c: Regulation der Sekretion von Interleukin 8 durch humane Granulozyten

Mit Hilfe eines ELISAs wurde Interleukin-8 (IL8) im Überstand von den wie in Abbildung 2a behandelten Granulozyten quantifiziert. Es handelt sich bei der gezeigten Abbildung um eine Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen, bei denen die Einzelwerte jeweils als Duplikate gemessen wurden. Signifikante Unterschiede in der IL-8 Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Anhand dieser Ergebnisse wurde deutlich, dass die Expression und Sekretion von CEACAM8 auf unterschiedliche Weise reguliert wurde. Die CEACAM8-Expression war TLR8 abhängig, die CEACAM8-Sekretion hingegen abhängig von TLR9.

Da *M. catarrhalis* und *H. influenzae* wichtige Pathogene in den menschlichen Atemwegen sind, wurde als Nächstes untersucht, ob diese Bakterien ebenfalls Einfluss auf die Expression, bzw. Sekretion von CEACAM8 haben. Wie in den nachfolgenden Abbildungen zu erkennen, hat weder *M. catarrhalis* noch *H. influenzae* Einfluss auf die Expression von CEACAM8 auf der Zelloberfläche (Abb. 2d), jedoch einen entscheidenden Einfluss auf die Sekretion von CEACAM8 in den Zellüberstand. Die Sekretion verläuft dosisabhängig (Abb. 2e).

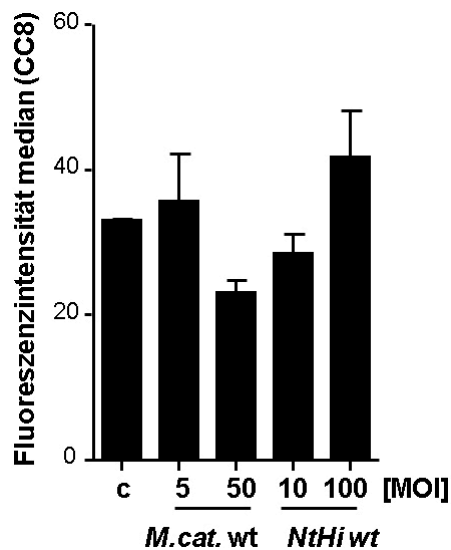


Abb. 2d: Regulation der Expression von CEACAM8 durch Bakterien

Die Menge an exprimiertem CEACAM8 auf der Oberfläche von humanen Granulozyten wurde mittels FACS nach 14 Stunden Stimulation mit 5 bzw 50 MOI *Moraxella catarrhalis* (*M.cat. wt*, BBH18) und 10 bzw 100 MOI *Haemophilus influenzae* (*NtHi wt*, 1128) gemessen. Hier gezeigt ist eine Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Signifikante Unterschiede in der CEACAM8 Expression ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

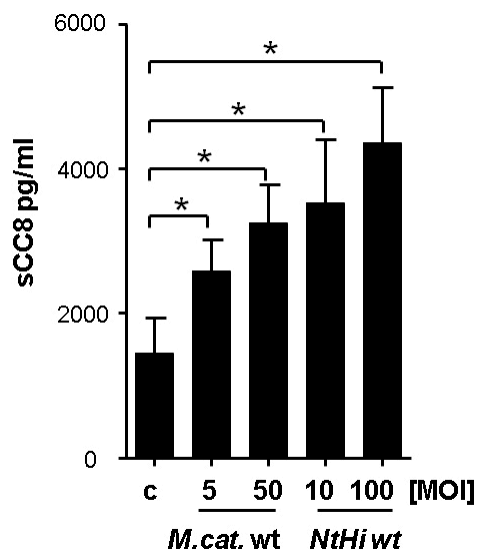
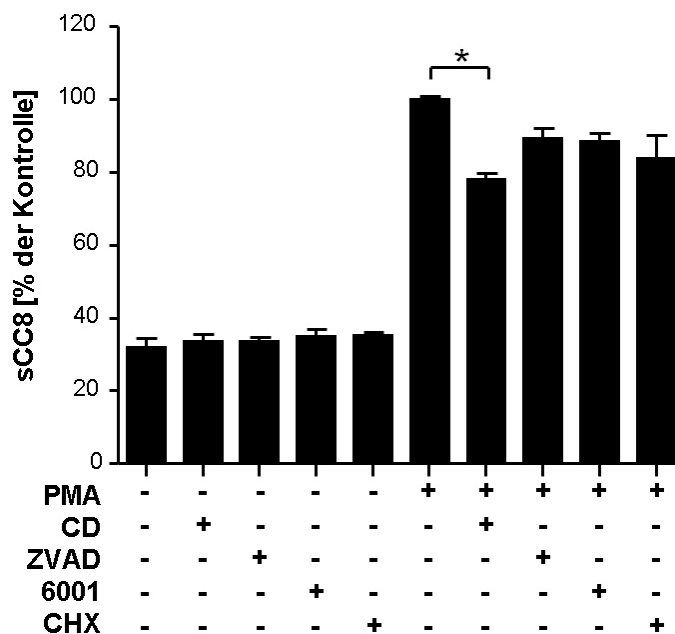


Abb. 2e: Regulation der Sekretion von CEACAM8 durch Bakterien

Lösliches CEACAM8 wurde im Überstand von den wie in Abb 2d stimulierten Granulozyten mittels ELISA nachgewiesen. Hier gezeigt ist eine Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Signifikante Unterschiede in der CEACAM8 Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

4.3 Die PMA und TLR9 abhängige Sekretion von löslichem CEACAM8 durch humane Granulozyten wird durch den Aktin Inhibitor Cytochalasin D gehemmt

Es wurde bereits beschrieben, dass CEACAM8 in speziellen Vesikeln der neutrophilen Granulozyten gelagert wird (Kuroki et al. 1995; Zhao et al. 2004) und es ist ebenso untersucht, dass CEACAM8 aus diesen Vesikeln mittels PMA Stimulation freigesetzt wird (Kuroki et al. 1992). Um herauszufinden, ob lösliches CEACAM8 zusätzlich auf andere Weise aus dem Zellinnern freigesetzt wird, wurden unterschiedliche Transportwege untersucht. Mögliche Transportwege für CEACAM8 wären die Protein-Neo-Synthese (dies ließe sich verhindern durch Cycloheximide), die durch Metalloproteinasen oder Kaspasen verursachte Teilung der Membran oder durch Transport von sekretorischen Vesikeln. Granulozyten wurden für diesen Versuch vor Stimulation mit PMA für eine Stunde mit Cytochalasin D, Pan Caspase Inhibitor Z-VAD, Pan-MMP Inhibitor GM-6001 und mit Cycloheximiden inkubiert. Verglichen wurde hier die Sekretion von CEACAM8 der nur mit PMA stimulierten Zellen mit dem Effekt der zuvor inkubierten und dann PMA stimulierten Zellen. In der folgenden Abbildung wird deutlich, dass alleine Cytochalasin D einen hemmenden Einfluss auf die PMA vermittelte Freisetzung von CEACAM8 ausübte, die sich signifikant im Vergleich zur Stimulation mit PMA alleine unterschied. Alle anderen Inhibitoren scheinen keine Auswirkung auf die Sekretion zu haben. Cytochalasin D blockiert



Produktion und Transport von sekretorischen Vesikeln.

Abb. 3.a: Hemmung der PMA-induzierten CEACAM8 Sekretion

Lösliches CEACAM8 wurde nach einer Stunde Stimulation mit 20 ng/ml PMA im Überstand von humanen Granulozyten mittels ELISA quantifiziert. Die Zellen wurden vor der Stimulation eine Stunde inkubiert mit 0,5 µg/ml Cytochalasin D (CD), 10 µM Pan Caspase fmk Inhibitor Z-VAD (ZVAD), 10 µM Pan-MMP Inhibitor

GM-6001 (6001) und 1 µg/ml Cycloheximide (CHX). Es handelt sich bei dem abgebildeten Graphen um eine Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen, bei denen die Einzelwerte jeweils als Duplikate gemessen wurden. Signifikante Unterschiede in der CEACAM8 Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Nachfolgend wurde untersucht, ob Cytochalsain D ebenso in der Lage ist, die TLR9 abhängige Sekretion von CEACAM8 zu minimieren. Um dies heraus zu finden, wurde der Versuch ähnlich aufgebaut wie in der Abbildung zuvor, nur wurden die Zellen nach Inkubation mit Cytochalsin D nicht mit PMA, sondern mit dem TLR9 Liganden CpG stimuliert. Es wird klar, dass die TLR9 abhängige Sekretion von CEACAM8 ebenfalls signifikant durch Cytochalsin D gehemmt wird (Abb. 3b).

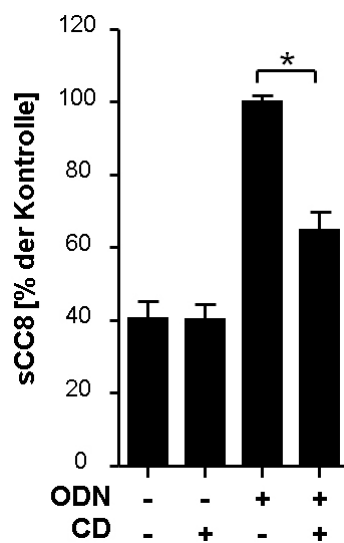


Abb. 3b: Hemmung der CpG-induzierten CEACAM8 Sekretion

Lösliches CEACAM8 wurde nach einer Stunde Stimulation mit 100 µg/ml unmethylierten CpG enthaltenden oligonukleotiden Sequenzen (CpG) im Überstand von humanen Granulozyten quantifiziert. Die Zellen wurden vor der Stimulation für eine Stunde mit 0,5 µg/ml Cytochalsin D (CD) inkubiert. Der abgebildete Graph zeigt eine Zusammenfassung von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, bei denen die Einzelwerte jeweils als Duplikate gemessen wurden. Signifikante Unterschiede in der CEACAM8 Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass CEACAM8 aktiv aus den sekretorischen Vesikeln von humanen Granulozyten freigesetzt wird. Diese Freisetzung verläuft TLR9 abhängig.

4.4 Lösliches CEACAM8 bindet an zellgebundenes CEACAM1 und hemmt somit die TLR2-induzierte Immunantwort auf NHBE Zellen

Die Expression von TLR2 und CEACAM1 auf NHBE Zellen wurde bereits von Slevogt beschrieben (Slevogt et al. 2008). Da diese aber entscheidend für die nachfolgenden Versuche war, wurde erneut die Anwesenheit dieser beiden Rezeptoren auf der Oberfläche von NHBE Zellen nachgewiesen. Unstimulierte NHBE Zellen wurden hierfür mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde nachgewiesen, dass sich sowohl TLR2 als auch CEACAM1 in umfangreicher Menge auf der Oberfläche von NHBE Zellen befindet (Abb. 4a).

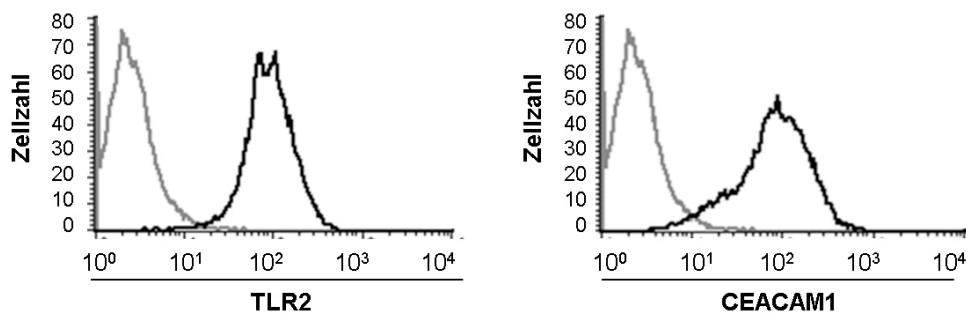


Abb. 4a: Expression von TLR2 und CEACAM1 auf NHBE Zellen

Die Anwesenheit von Toll-like-Rezeptor-2 (TLR2) und CEACAM1 (dunkle Linien) auf der Oberfläche von NHBE Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Bei den hellen Linien handelt es sich um einen Isotyp Kontroll Antikörper. Die hier gezeigte Abbildung ist eine repräsentative von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Pam₃Cys induziert bekannterweise die Synthese von Interleukin 8. Wie von Slevogt bereits gezeigt, hat die Ligation von CEACAM1 mit UspA1 von *Moraxella catarrhalis* eine hemmende Wirkung auf die TLR2 vermittelte Immunantwort in Bronchialepithelzellen (Slevogt et al. 2008). Unsere Hypothese ist nun, dass CEACAM8 durch Bindung an CEACAM1 die Immunantwort ebenso wie das UspA1 von *Moraxella catarrhalis* beeinflusst. Es wurde hier der funktionelle Effekt der Bindung von löslichem CEACAM8 (CEACAM8-Fc) an zellgebundenes CEACAM1 auf NHBE Zellen bezüglich der TLR2 abhängigen Immunantwort untersucht. Dazu wurde die produzierte Menge an IL8 und IL6 im Überstand der Zellen, die nur mit Pam₃Cys stimuliert wurden, mit denen verglichen, die mit einer Kombination aus Pam₃Cys und CEACAM8 stimuliert wurden. In Abb. 4b und 4c ist dargestellt, dass die Anwesenheit von löslichem CEACAM8 die Pam₃Cys induzierte Immunantwort deutlich hemmt. Sowohl die IL8- als auch die IL6-Antwort wird durch CEACAM8 signifikant reduziert (Abb. 4b und 4c). Als Kontrolle wurde der Überstand von unstimulierten und nur mit CEACAM8 inkubierten Zellen gemessen (Abb. 4b).

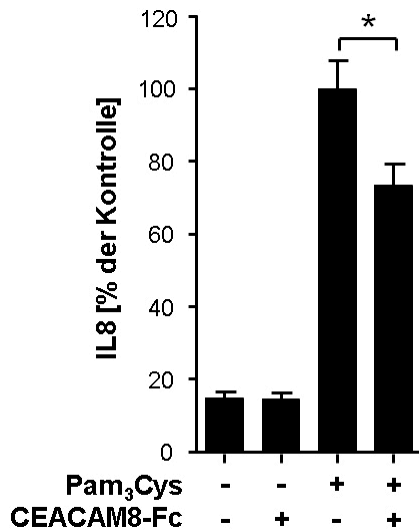


Abb. 4b: Reduktion der IL8 Ausschüttung auf NHBE Zellen

Interleukin 8 wurde nach 16 Stunden Stimulation mit Pam₃Cys alleine und einer Kombination aus Pam₃Cys und CEACAM8 (beide 100 ng/ml) im Überstand von NHBE Zellen quantifiziert. Als Kontrolle wurde der Überstand unstimulierter Zellen verwendet. Signifikante Unterschiede in der IL8 Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

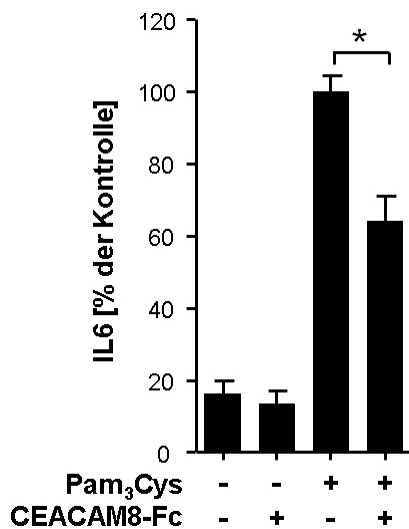


Abb. 4c: Reduktion der IL6 Ausschüttung auf NHBE Zellen

Interleukin 6 wurde nach 16 Stunden Stimulation mit Pam₃Cys alleine und einer Kombination aus Pam₃Cys und CEACAM8 im Überstand von NHBE Zellen quantifiziert. Bei den gezeigten Abbildungen handelt es sich um eine Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen, bei denen die Einzelwerte jeweils als Triplikate angelegt waren. Signifikante Unterschiede in der IL6 Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

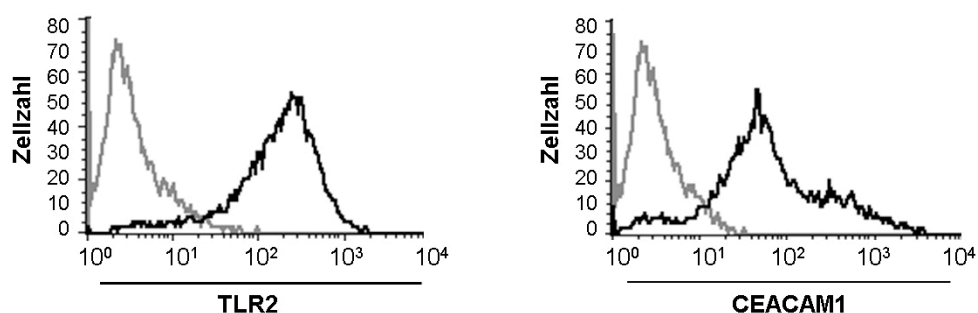
Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass lösliches CEACAM8 in der Lage ist, die TLR2-abhängige Entzündungsreaktion in humanen Bronchialepithelzellen zu reduzieren.

4.5 Die Bindung von CEACAM8 an CEACAM1 auf pulmonalem Epithel vermittelt die Inhibition der TLR2-abhängigen Immunantwort

Um die regulatorische Funktion von CEACAM1 für die TLR2 vermittelte Immunantwort auf pulmonalem Epithel näher zu untersuchen, wurde im Folgenden gezielt die RNA in A549 Zellen mittels Gen-Inaktivierung beeinflusst. Da NHBE Zellen sehr empfindlich auf diese Transfektion reagieren, wurden A549 Zellen für die folgenden Versuche verwendet. Diese Zellen haben eine bessere Überlebensfähigkeit während der Transfektion (Daten nicht gezeigt) und wurden bereits erfolgreich für ähnliche Versuche verwendet (Slevogt et al. 2007; Slevogt et al. 2008).

Wie bereits in der Literatur beschrieben, wurde CEACAM1 (Hill und Virji, 2003) ebenso wie TLR2 (Slevogt et al. 2007) auch in der vorliegenden Arbeit auf A549 Zellen sowie auf NHBE Zellen nachgewiesen. Wie in Abbildung 5a gezeigt, wird TLR2 und CEACAM1 auf der Oberfläche von A549 Zellen exprimiert. Die Menge der CEACAM1 Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen variiert je nach Zelltyp und Phase von Wachstum und Aktivierung (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Da auf A549 Zellen die Expression von CEACAM1 mit zunehmender Dichte der Zellen steigt (Singer et al. 2010), wurden die Zellen nach Konfluenz noch weitere zwei Tage inkubiert, bevor sie stimuliert wurden.

Hier ist ebenso wie in dem vorherigen Versuch mit NHBE Zellen zu sehen, dass lösliches CEACAM8 in der Lage war durch Bindung an CEACAM1 die TLR2-induzierte Immunantwort signifikant zu reduzieren (Abb. 5b). Als Kontrolle wurde der Überstand von unstimulierten und von nur mit CEACAM8-inkubierten Zellen gemessen (Abb. 5b). Um zu beweisen, dass die Bindung von CEACAM8 an CEACAM1 ausschlaggebend für diese Reduktion der IL8 Antwort ist, wurde CEACAM1 eine Stunde vor der Stimulation mit dem spezifischen Antikörper 18/20 geblockt. CEACAM8 konnte so nicht mehr binden und der



inhibitorische Effekt wurde aufgehoben, wie aus der Abbildung 5c ersichtlich wird.

Abb. 5a: Expression von TLR2 und CEACAM1 auf A549 Zellen

Die Anwesenheit von Toll-like-Rezeptor-2 (TLR2) und CEACAM1 (dunkle Linien) auf der Oberfläche von A549 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Bei den hellen Linien handelt es sich um einen Isotyp-Kontroll Antikörper. Die hier gezeigte Abbildung ist eine repräsentative von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

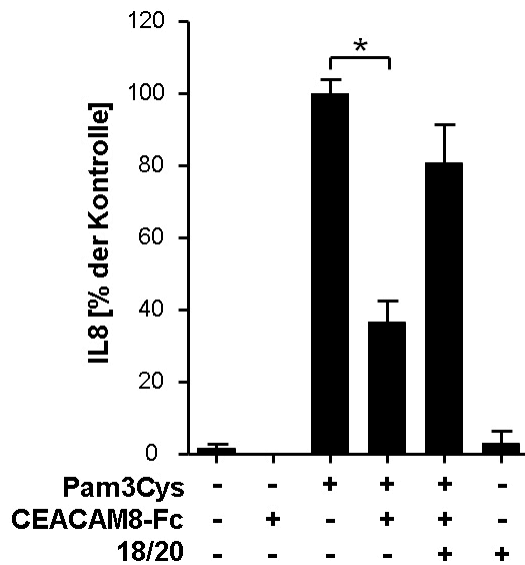


Abb. 5b: Aufhebung des hemmenden Effektes von CEACAM8 auf die IL8 Sekretion durch A549 Zellen
 IL8 wurde im Überstand von A549-Zellen bestimmt. Die Zellen wurden für eine Stunde mit einem spezifischen Antikörper (18/20) zur Blockierung des CEACAM1 Rezeptors vorinkubiert und anschließend für 16 Stunden mit Pam₃Cys und einer Kombination aus Pam₃Cys und CEACAM8 stimuliert. Die IL8 Sekretion nach Stimulation mit Pam₃Cys diente als Kontrolle. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen, bei denen die einzelnen Werte je als Triplikate angelegt waren. Signifikante Unterschiede in der IL8 Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Um auszuschliessen, dass der durch lösliches CEACAM8 vermittelte hemmende Effekt auf die Immunantwort durch erhöhtes Zellsterben verursacht wird, wurde die Überlebensrate der A549 Zellen nach Stimulation ermittelt. Dies geschah mittels Färbung der Zellen mit Annexin V-FITC und Propidium Iodid (zuvor beschrieben) und anschließender Durchflusszytometrie (Abb. 5c).

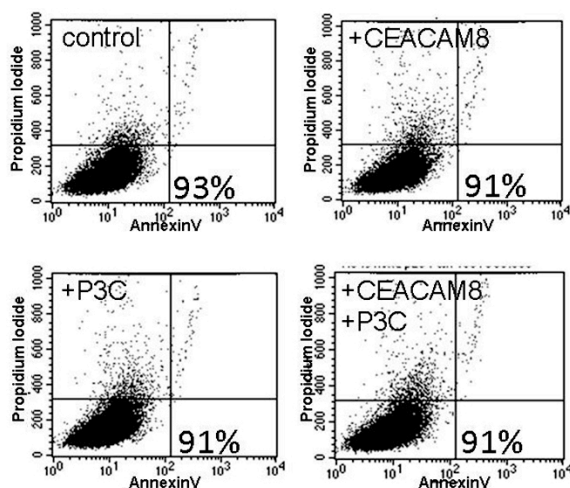


Abb. 5c: Überlebensrate der A549 Zellen

Der Anteil an lebenden A549-Zellen nach 16 Stunden Stimulation mit Pam₃Cys (P3C) und Pam₃Cys und CEACAM8 zusammen (jeweils 100 ng/ml) im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurde mittels einer Propidiumiodid / Annexin-V Färbung und anschließender Durchflusszytometrie ermittelt.

Es wurde deutlich, dass weder Pam₃Cys noch CEACAM8 jeglichen Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen hatte. Abbildung 5c zeigt, dass die Prozentzahl an lebenden Zellen bei allen Stimulantien vergleichbar mit den unstimulierten Zellen war.

Mit Hilfe von synthetischen, kurzen interferierenden RNA Molekülen ist es möglich, spezifische Gene gezielt zu inaktivieren (engl.: *gene silencing*). Mit dem Ziel das Gen für CEACAM1 in A549 Zellen auszuschalten, wurden die Zellen zunächst mit CEACAM1-spezifischer siRNA inkubiert und nachgewiesen, dass die CEACAM1-siRNA, nicht aber die Kontroll siRNA (c-si) zu deutlich weniger CEACAM1 Expression auf der Zelloberfläche (Abb. 5d) und einem ebenso deutlichen Abfall der CEACAM1-mRNA (Abb. 5e) führte. A549 Zellen wurden nach 48, 72 und 96 Stunden mittels Durchflusszytometrie und PCR untersucht und der optimale Zeitpunkt des *Knockdowns* bei 96 Stunden festgestellt.

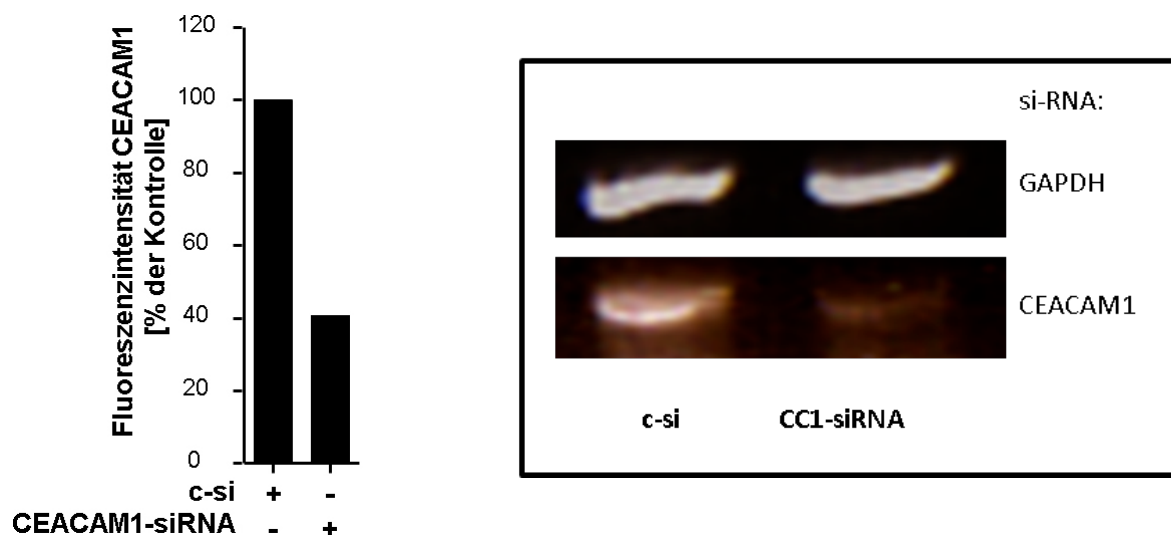


Abb. 5d und 5e: Runterregulierung von CEACAM1 auf A549 Zellen

Der Zeitpunkt der optimalen Runterregulierung von CEACAM1 auf der Oberfläche von A549-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie (Abb. 5d, links) und durch die semiquantitative Bestimmung der entsprechenden mRNA (Abb. 5e, rechts) ermittelt. Es wurden Zellen zu drei verschiedenen Zeitpunkten (48h, 72h, 96h) nach der Nukleofektion untersucht. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einer nicht-kodierenden Kontroll siRNA (c-si) transfiziert. Die gezeigte Abbildung ist eine repräsentative von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen zum Zeitpunkt von 96 Stunden.

A549 Zellen wurden nach 96 Stunden Transfektion mit Kontroll-si-RNA bzw. CEACAM1 si-RNA wie in den zuvor erfolgten Versuchen für weitere 16 Stunden mit Pam3Cys bzw. einer Kombination aus CEACAM8 und Pam3Cys stimuliert. Die mit der Kontroll-si-RNA transfizierten Zellen zeigten den bereits bekannten hemmenden Effekt auf die IL8 Immunantwort vermittelt durch CEACAM8, wohingegen die mit der CEACAM1-si-RNA transfizierten Zellen keinen Abfall der IL8 Sekretion zeigten (Abb. 5f).

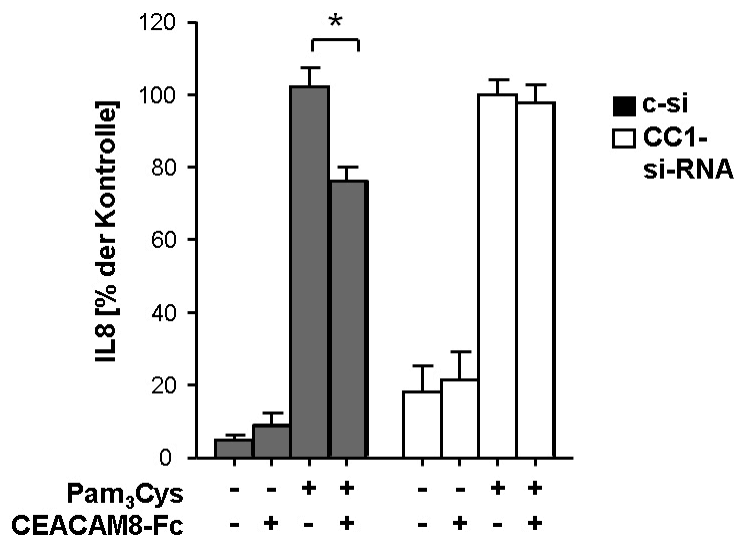


Abb. 5f: CEACAM8-vermittelte Hemmung der IL8 Sekretion ist CEACAM1-abhängig

Interleukin 8 wurde im Überstand von CEACAM1 (CC1) siRNA transfizierten (96h) und anschließend für 16 Stunden mit Pam₃Cys und einer Kombination aus Pam₃Cys und CEACAM8 (jeweils 100 ng/ml) stimulierten A549-Zellen bestimmt. Dargestellt ist eine Zusammenfassung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen, bei denen die Einzelwerte je als Triplikate angelegt waren. Signifikante Unterschiede in der IL8 Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Diese Ergebnisse bestätigen erneut, dass die Bindung von löslichem CEACAM8 an zellgebundenes CEACAM1 die TLR2 induzierte Immunantwort in pulmonalen Epithelzellen negativ beeinflusst.

4.6 Einfluss der Anwesenheit von CEACAM8 für die CEACAM1-vermittelte Reduktion der durch Bakterien vermittelten Immunantwort in A549-Zellen

In dieser Arbeit wurde der *Haemophilus* Stamm *NTHi 1128+* und dessen P5 defiziente Mutante *NTHi 1128-* und die *Moraxella* Stämme *BBH18wt* und *BBH18.ΔUspA1* verwendet. Es wurde bereits beschrieben, dass Bindung von CEACAM1, exprimiert auf A549 Zellen, an das UspA1 auf *Moraxella catarrhalis* bindet und somit die TLR2 abhängige IL8 Produktion reduziert (Slevogt et al. 2008). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass lösliches

CEACAM8 in Abwesenheit von UspA1 die *Moraxella catarrhalis* induzierte Immunantwort hemmen kann (Abb. 6a).

A549 Zellen wurden für 16 Stunden mit *Moraxella catarrhalis* und dessen UspA1 defizienten Mutante mit und ohne Anwesenheit von löslichem CEACAM8 inkubiert. Im Anschluss wurde IL8 im Überstand dieser Zellen mittels ELISA quantifiziert.

Den vorherigen Ergebnissen der Arbeitsgruppe Slevogt entsprechend, führte die Infektion mit dem Wildtyp von *M. catarrhalis* zu einer deutlich geringeren IL8 Produktion verglichen mit der Infektion durch die UspA1 defizienten Mutante. Die Zugabe von CEACAM8 in Abwesenheit von UspA1 führte ebenso zu einer reduzierten IL8 Sekretion. CEACAM8 und die UspA1 defiziente *M. catarrhalis* Mutante hemmen die IL8 Produktion in gleichem Maße (Abb. 6a).

Mit dem Wissen, dass das P5 Protein von *Haemophilus influenzae* ebenfalls an CEACAM1 bindet (Hill et al. 2001), konnte angenommen werden, dass die Bindung von P5 an CEACAM1 ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die TLR2 induzierte IL8 Produktion haben könnte. Demzufolge wurden A549 Zellen ebenfalls für 16 Stunden mit *H. influenzae*, dessen P5 Mutante und CEACAM8 inkubiert und IL8 wurde im Überstand der Zellen quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Zellen ebenso wie in dem vorherigen Versuch durch Anwesenheit von CEACAM8 in der IL8 Sekretion gehemmt wurden. Darüber hinaus resultierte die Zugabe des Wildtyps von *Haemophilus influenzae* aber in einem noch stärkeren Abfall der IL8 Sekretion als bereits durch CEACAM8 Zugabe (Abb. 6b).

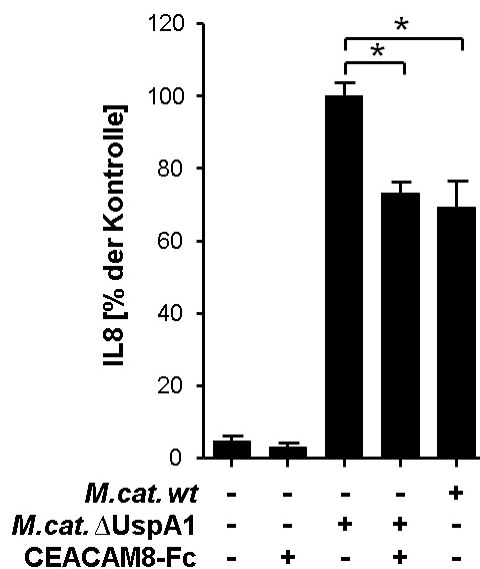


Abb. 6a: CEACAM1-abhängige Reduktion der durch *Moraxella catarrhalis*-vermittelten Immunantwort

Mittels ELISA wurde die IL8-Konzentration nach 16 Stunden Stimulation mit den *Moraxella*-Stämmen *M.cat.wt* und der UspA1 defizienten Mutante *M.cat.ΔUspA1* und einer Kombination aus *M.cat.ΔUspA1* und CEACAM8 (100 ng/ml) im Überstand von A549-Zellen mittels ELISA quantifiziert.

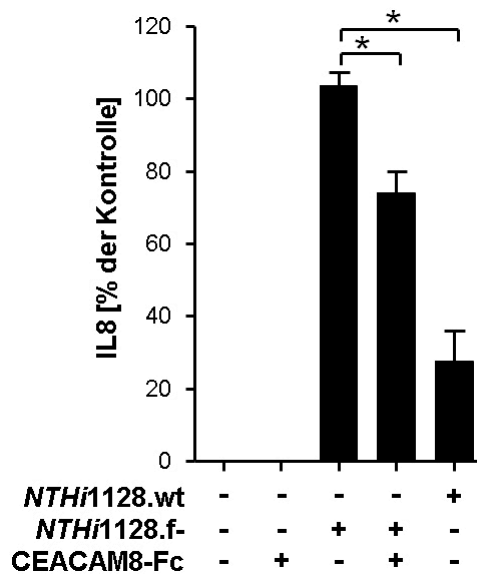


Abb. 6b: CEACAM1-abhängige Reduktion der durch *Haemophilus influenzae*-vermittelten Immunantwort

Interleukin 8 wurde nach 16 Stunden Stimulation mit den *Haemophilus* Stämmen *NTHi1128.wt* und der P5 defizienten Mutante *NTHi1128.f-* und einer Kombination aus *NTHi1128.f-* und CEACAM8 (100 ng/ml) im Überstand von A549-Zellen quantifiziert.

IL8 Sekretion nach Stimulation der Zellen mit der nicht an CEACAM1 bindenden Mutante dient als Kontrolle (c) (Abb. 6a und 6b). Es handelt sich um eine Zusammenfassung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen, bei denen die Einzelwerte jeweils als Triplikate angelegt waren. Signifikante Unterschiede in der IL8 Konzentration ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet (Abb. 6a und 6b).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Anwesenheit von löslichem CEACAM8 in A549 Zellen die TLR2-abhängige Immunantwort reduziert. Dieser hemmende Effekt ist vergleichbar zu dem bereits von unserer Arbeitsgruppe gezeigten Effekt der Interaktion von CEACAM1 mit dem UspA1 von *M. catarrhalis* bzw. dem P5 Protein von *H. influenzae*.

4.7 Die CEACAM8-vermittelte Inhibition der TLR2-getriggerten epithelialen Immunantwort wird über die SHP1-vermittelte Inhibition des PI3K/AKT Signalweges vermittelt

Es wurde bereits gezeigt, dass CEACAM1 die Phosphatase SHP1 in einer ITIM abhängigen Art an das zytoplasmatische Ende binden kann (Gray-Owen und Blumberg, 2006) und im Speziellen die Interaktion von UspA1 und CEACAM1 zu einer Rekrutierung von SHP1 führt, welches wiederum zu einer Hemmung des PI3 Kinase Signalweges führt (Slevogt et al. 2008). Um zu zeigen, dass auch die Bindung von CEACAM8 an CEACAM1 zu einer Phosphorylierung von CEACAM1 und zu einer SHP1 Rekrutierung führt, wurde der folgende Versuch durchgeführt.

A549 Zellen wurden nach 5 Minuten Inkubation mit Pam₃Cys und einer Kombination aus Pam₃Cys und löslichem CEACAM8 lysiert. Die Zellen wurden anschliessend mit einem spezifischen CEACAM1 Antikörper immunpräzipitiert und mit SHP1- bzw. Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern im Western Blot analysiert. CEACAM8 alleine bzw. in der Anwesenheit von Pam₃Cys führte zu einer Tyrosin Phosphorylierung und zu einer SHP1 Rekrutierung von CEACAM1, wohingegen die alleinige Zugabe von Pam₃Cys keinerlei Auswirkungen hatte. Lösliches Ratten-CEACAM1 (RatCEACAM1-Fc), welches nicht an CEACAM1 binden kann, wurde verwendet, um den stimulierenden Effekt des Fc Teils der CEACAMs auszuschliessen (Singer et al. 2002). Als Positivkontrolle für die Phosphorylierung diente Pervanadat. Zum Nachweis der Anwesenheit von CEACAM1 in den Proben, wurde parallel ein Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen CEACAM1 durchgeführt (Abb. 7a).

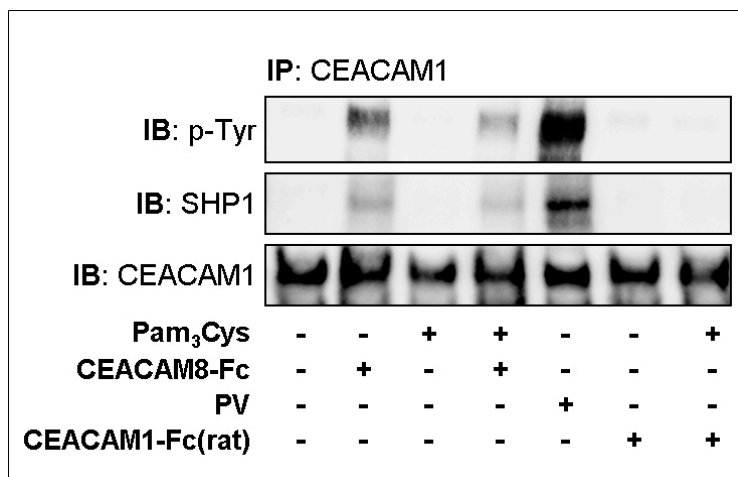


Abb. 7a: CEACAM8-abhängige Phosphorylierung von CEACAM1 und Rekrutierung von SHP1

A549-Zellen wurden nach 5 Minuten Stimulationszeit mit Pam₃Cys und einer Kombination aus Pam₃Cys und CEACAM8 (jeweils 100 ng/ml) lysiert. Anschließend wurden CEACAM1 immunpräzipitiert und die Zellen mit SHP1- bzw. Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern im Western Blot analysiert. Als Positivkontrolle für die Phosphorylierung wurde 4 mM Pervanadat (PV), als Negativkontrolle wurde ratCEACAM1 (100 ng/ml) verwendet. Die gezeigte Abbildung ist eine repräsentative von vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Abbildung 7a bestätigt, dass die Bindung von CEACAM8 an CEACAM1 vergleichbar zu der in der Literatur beschriebenen Bindung von CEACAM1 an UspA1 zu einer Phosphorylierung und SHP1 Rekrutierung von CEACAM1 in A549-Zellen führte. Die Phosphorylierung der Kinase Akt an ihrem Serin Rest an der Position 473 (Ser 473) ist abhängig von der Aktivierung von der PI3 Kinase. Anhand der Messung von Akt 473 kann man dementsprechend die Aktivierung der PI3 Kinase ermitteln (Slevogt et al. 2008). Es ist bereits in unserer Arbeitsgruppe gezeigt worden, dass die Phosphorylierung der PI3 Kinase durch die Bindung von UspA1 an CEACAM1 reduziert wird.

Um zu zeigen, dass die Bindung von CEACAM8 an CEACAM1 ebenfalls zu einer reduzierten Akt Phosphorylierung führt, wurden A549 Zellen für 30 Minuten mit Pam₃Cys und Pam₃Cys zusammen mit CEACAM8 inkubiert und anschliessend wurde die Phosphorylierung der Akt im Western Blot nachgewiesen.

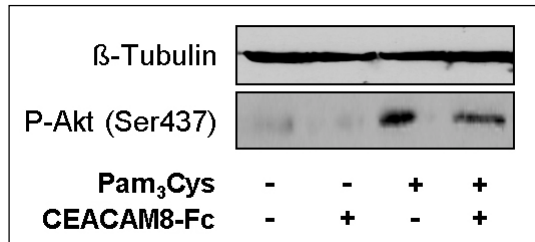


Abb. 7b: CEACAM8-abhängige Phosphorylierung von Akt

Nach 30 Minuten Inkubation mit Pam₃Cys und einer Kombination aus Pam₃Cys und CEACAM8 (beide 100 ng/ml) wurde die Phosphorylierung von Akt in A549-Zell-Lysaten im Western Blot nachgewiesen. Als Referenzprotein wurde β-Tubulin eingesetzt. Es handelt sich um eine repräsentatives von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Um herauszufinden, ob die CEACAM1-CEACAM8 vermittelte Inhibierung der IL8 Produktion auf einer veränderten NF-κB Aktivierung beruht, wurde die Pam₃Cys induzierte Bindung der Untereinheiten p65 und RNA Polymerase II an den IL8 Promoter untersucht.

Nach einer Stunde Stimulation mit Pam₃Cys und einer Kombination aus Pam₃Cys und CEACAM8 wurden A549-Zell-Lysate mit Antikörpern gegen den Transkriptionsfaktor p65 und die Polymerase II inkubiert. Durch eine ChIP Analyse wurde die Bindung von p65 und Polymerase II an den IL8-Promoter nachgewiesen. In den mit Pam₃Cys und CEACAM8 stimulierten Zellen wurde ein deutlicher Abfall der Bindung von p65 und der Polymerase II an den IL8 Promoter festgestellt (Abb. 7c).

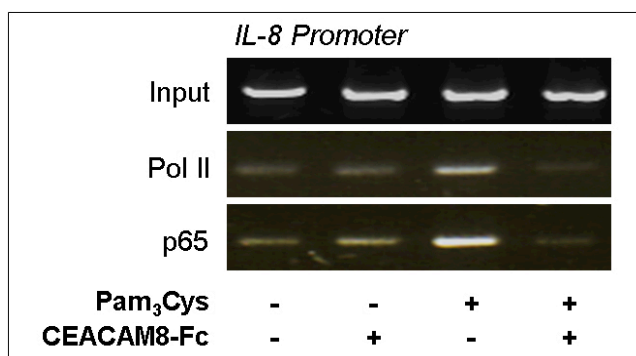


Abb. 7c: CEACAM8-abhängige Bindung von p65 und der Polymerase II an den IL8 Promoter

Nach einer Stunde Stimulation mit Pam₃Cys und einer Kombination aus Pam₃Cys und CEACAM8 (je 100 ng/ml) wurden A549-Zell-Lysate mit den entsprechenden Antikörpern gegen den Transkriptionsfaktor p65 und die Polymerase II inkubiert. Durch eine Promoter-Primer-PCR wurde die Bindung von p65 und Polymerase II an den IL8-Promoter in A549-Zell-Lysaten nachgewiesen. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Bindung von CEACAM1 an CEACAM8 umfassenden Einfluss auf die TLR2 induzierte Immunantwort hat. Nicht nur die IL8-Sekretion wurde gehemmt, auch führt die Anwesenheit von CEACAM8 zu einer Phosphorylierung und SHP1 Rekrutierung von CEACAM1, zur Reduktion der Akt Phosphorylierung und zu einer reduzierten Bindung von p65 und der Polymerase II an den IL8 Promoter.

4.8 Klinische Daten: Eine hohe Anzahl an Granulozyten in der humanen bronchoalveolären Lavage korrelierte mit der Anwesenheit von löslichem CEACAM8

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von löslichem CEACAM8 in der BAL und der Anzahl von Granulozyten darzustellen, wurden humane BALs untersucht. Bei 165 Spendern wurden aus unterschiedlichen diagnostischen und therapeutischen Gründen Bronchoskopien durchgeführt. Die Granulozytenzahlen wurden im Vergleich zur Gesamtzellzahl ermittelt und anhand dieser wurden die Spender in drei Gruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe befanden sich alle Spender mit 0,5 bis 3,9 % Granulozyten (insgesamt 83 Personen), die zweite Gruppe beinhaltete alle Spender mit 4,0 bis 14,9 % Granulozyten (insgesamt 43 Personen) und in die dritte Gruppe wurden alle Spender mit 15,0 bis 95,0 % Granulozyten (insgesamt 39 Personen) eingeschlossen.

Gruppenbezeichnung	Anzahl der Granulozyten in %
Granulozytenzahl normal	0,5-3,9
Granulozytenzahl mittel	4,0-14,9
Granulozytenzahl hoch	15,0-95,0

Tab. 3.38: Einteilung der Spender in Gruppen anhand der Granulozytenzahl in der BAL

Mit Hilfe der Patientendaten der 165 Spender wurde der Anteil der Granulozyten an der Gesamtzellzahl (in %) in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) jeden Spenders ermittelt und anhand dieser wurden die Spender in drei Gruppen eingeteilt. Erste Gruppe: alle Spender mit 0,5 bis 3,9 % Granulozyten, zweite Gruppe: alle Spender mit 4,0 bis 14,9 % Granulozyten, dritte Gruppe: alle Spender mit 15,0 bis 95,0 % Granulozyten.

Unterschiedliche Zellzahlen in der BAL wurden durch Zytozentrifugation ermittelt. Die Zellüberstände wurden mit Hilfe eines CEACAM8 ELISAs auf Anwesenheit von löslichem CEACAM8 untersucht.

Diese Untersuchungen ergaben, dass in den BALs von Individuen mit einer hohen Granulozytenzahl wahrscheinlicher messbares CEACAM8 enthalten ist, als in den BALs mit normalen bzw. mittleren Granulozytenzahlen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass 31,3 % (bzw. 26 Individuen) der ersten Gruppe, 41,9 % (18 Individuen) der zweiten Gruppe und 82,1 % (32 Individuen) der dritten Gruppe CEACAM8 positiv waren. Es wird deutlich, dass die Gruppe der hohen Granulozytenzahlen mit 82,1 % deutlich mehr CEACAM8 positive Proben enthielt.

Granulozyten (% der kernhaltigen Zellen in der BAL)	Normal (0-3,9 %)	Mittel (4-14,9 %)	Hoch (\leq15 %)
CEACAM8 (j)	26 / 31,3 %	18 / 41,9 %	32/ 82,1 %
CEACAM8 (n)	57 / 68,7 %	25/ 58,1 %	7/17,9 %

Tab. 3.39: Anwesenheit von CEACAM8 in der BAL

Innerhalb der zuvor eingeteilten und oben definierten Gruppen, wurde die Anwesenheit von CEACAM8 (j=ja; n=nein) in der BAL ermittelt. Die Anwesenheit von CEACAM8 wurde in den Überständen der BALs mittels eines CEACAM8 ELISAs bestimmt.

Nun wurde ermittelt, ob die oben beschriebenen Unterschiede der einzelnen Gruppen auch signifikant und wahrscheinlich sind. Die Wahrscheinlichkeit der einzelnen Gruppen CEACAM8 in der BAL zu haben, wurde anhand der Odds Ratio (OR) mit Hilfe des Chi Quadrat Testes (Daten nicht gezeigt) ermittelt. Die Validität dieser OR wurde durch ein 95 %iges Vertrauensintervall (engl.: *confidential interval*, C.I) ermittelt, darüber hinaus wurde die Signifikanz (P) dieser Ergebnisse ermittelt. In der Tabelle 3.40 ist dargestellt, dass die bereits erwähnten deutlichen Unterschiede bezüglich der Korrelation von CEACAM8 und erhöhter Granulozytenzahl sowohl signifikant als auch wahrscheinlich sind (Erklärung der Zahlen siehe Material und Methodenteil).

	P Wert	OR	95 % C.I für OR
hoch vs normal	<0,0001	10,022	3,914 - 25,661
mittel vs normal	0,241	1,578	0,736 - 3,385

mittel/hoch vs normal	<0,0001	3,675	1,897 - 7,117
hoch vs mittel	0,0002	6,3	2,0 – 20,5
hoch vs normal/mittel	0,0001	5,4	2,0 – 15,7

Tab. 3.40: Zusammenhang der Granulozytenzahl und der Anwesenheit von CEACAM8 in der BAL

Die einzelnen Gruppen, aufgeteilt nach ihrer prozentualen Granulozytenzahl in der BAL, wurden untereinander bezüglich der Anwesenheit von CEACAM8 verglichen. Die Wahrscheinlichkeit der einzelnen Gruppen CEACAM8 in der BAL zu haben wurde anhand der Odds Ratio (OR) mit Hilfe des Chi Quadrat Testes ermittelt. Die Validität dieser OR wurde durch ein 95 %iges Vertrauensintervall (engl.: *confidence interval*, C.I) ermittelt und darüber hinaus wurde auch die Signifikanz (P) dieser Ergebnisse ermittelt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit dem Anstieg des prozentualen Anteiles von Granulozyten in der BAL ebenso die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von löslichen CEACAM8 in der BAL anstieg, so dass CEACAM8 daher für die epitheliale Interaktion mit CEACAM1 eine wichtige Bedeutung zukommen könnte.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse

5.1.1 CEACAM8-Sekretion durch aktivierte Granulozyten

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass aktivierte Granulozyten CEACAM8 sezernieren.

Die Freisetzung des CEACAM8 wurde zumindestens teilweise TLR9 abhängig durch CpG-Oligonukleotide gesteuert. Bei CpG handelt sich um Motive, die charakteristisch für bakterielle DNA sind. Es ist bekannt und wurde von uns erneut bestätigt, dass CpG-DNA die IL8 Sekretion in den Zellüberstand und L-Selektin (CD62L) Abgabe von der Zelloberfläche von Granulozyten induziert (El Kebir et al. 2008). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass CpG-DNA die Phagozytoseaktivität der Granulozyten steigern kann (El Kebir et al. 2008).

Im Rahmen einer Infektion der Atemwege führt das Eindringen von Erregern zu der Auslösung einer Immunreaktion, die darauf abzielt, die Erreger abzutöten und zu eliminieren (Mizgerd et al. 2008). Ein wichtiger Faktor der Immunreaktion ist auch das Beenden des entzündlichen Prozesses, wenn dieser nicht mehr benötigt wird (Mantovani et al. 2010). Andernfalls kann es zur Zerstörung von Gewebe und zu autoimmunen Reaktionen kommen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass bakterielle DNA auch nach erfolgter Abtötung von Bakterien in Geweben so wie auch in den Atemwegen verbleiben kann (El Kebir et al. 2008; Radsak et al. 2004; Schwartz et al. 1997). Daraus lässt sich folgern, dass das alleinige Abtöten von Bakterien nicht ausreichend ist, die pro-entzündliche Immunantwort aufzulösen. Das heißt, dass die Auflösung der Aktivierung von Granulozyten und den umliegenden Geweben noch weitere Faktoren benötigt (El Kebir et al. 2008).

Es wurde bereits beschrieben, dass Granulozyten nicht nur an der Aktivierung der Entzündungsreaktion beteiligt sind, sondern auch bei ihrem Rückgang eine Rolle spielen. Denn wie schon erwähnt, kann die Aktivität von neutrophilen Granulozyten zu chronischen Entzündungen und somit zur Pathologie unterschiedlicher Erkrankungen führen (Mantovani et al. 2011). Granulozyten sind vermutlich nicht nur an dem passiven, sondern auch an dem aktiven Rückgang der Entzündungsreaktion beteiligt (Mantovani et al. 2011). Die passive Komponente besteht vor allem in dem schnellen Absterben und Eliminieren nach erfolgreichem Abtöten der Bakterien (Mantovani et al. 2011). Ein aktiver Rückgang der Entzündungsreaktion wird unter anderem durch die Produktion gewisser Lipid Mediatoren vermittelt (Serhan et al. 2008), die ein weiteres Einwandern von Granulozyten zum Ort der Entzündung verhindern. Auch wird durch sogenannte Resolvine die weitere Migration verhindert. Darüber hinaus wird die Produktion von Chemokinen und Cytokinen blockiert (Serhan et al. 2008). Die hier beobachtete Induktion der CEACAM8 Sekretion von Granulozyten als Folge der Erkennung bakterieller DNA könnte einen Mechanismus

darstellen, die pro-entzündliche Aktivierung von Granulozyten zu beenden, nachdem die Erreger erfolgreich abgetötet wurden.

5.1.2 CEACAM8 Expression auf aktivierten Granulozyten

Die Expression von CEACAM8 auf der Oberfläche von Granulozyten wird im Gegensatz zur Sekretion nicht TLR9 abhängig, sondern durch Resiquimod-R848 TLR7/8-abhängig gesteuert. Damit wird deutlich, dass Sekretion und Expression von CEACAM8 durch Granulozyten unterschiedlich geregelt sind. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Sekretion nicht als Folge einer Expression von CEACAM8 entsteht, sondern dass es sich um zwei unabhängig voneinander verlaufende Prozesse handelt.

Zeichen aktivierter Granulozyten ist eine vermehrte Expression von CEACAM8 auf der Oberfläche und die Aggregation der Granulozyten untereinander. Von Schmidt und seiner Arbeitsgruppe wurde bewiesen, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen dieser CEACAM8 Expression und der Aggregation von Granulozyten gibt. Es besteht die Annahme, dass die CEACAM8 Moleküle sich untereinander vernetzen (sogenanntes *cross linking*) (Schmidt et al. 2012). Da CEACAM8 aber nicht zu homophiler Bindung in der Lage ist, geschieht das mittels zwischengeschalteter Antikörper. Bei diesen Antikörpern könnte es sich zum Beispiel um andere Mitglieder der CEACAM Familie handeln (Schmidt et al. 2012). Vermehrte Expression von CEACAM8 könnte also zu einer gesteigerten Vernetzung der Granulozyten untereinander führen und somit das Abfangen von Pathogenen steigern.

Die Wanderung von Granulozyten aus den Gefäßen zum Ort der Entzündung spielt eine entscheidende Rolle im Entzündungsgeschehen. In der Arbeit von Schmidt et. al wurde weiter gezeigt, dass CEACAM8, neben Selektinen und Integrinen, entscheidend zur Adhäsion an das Endothel beitragen könnte. Somit würde eine gesteigerte Expression von CEACAM8 auf Granulozyten zu einer verbesserten Adhäsionsfähigkeit führen (Schmidt et al. 2012). Da die Expression durch TLR7 reguliert wird, muss in weiteren Arbeiten geklärt werden, ob dieser Mechanismus insbesondere im Rahmen viraler Infektionen eine Rolle spielen könnte, die zum Teil über diesen TLR Rezeptor erkannt werden (Akira et al. 2006)

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass lösliches CEACAM8 mit CEACAM1 auf Lungenepithelien interagiert. Es sollte in weiteren Arbeiten untersucht werden, ob auch CEACAM8, welches auf Granulozyten exprimiert wird, mit CEACAM1 auf Endothelien interagieren kann und so einen modulierenden Einfluss auf die endotheliale Inflammation haben könnte.

5.1.3 CEACAM8 in humaner BAL

Es wurde bereits beschrieben, dass die Inflammation der Atemwege bei COPD Patienten mit einer erhöhten Anzahl an Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage einhergeht (Keatings et al. 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sekretiertes CEACAM8

in der BAL mit einer höheren Anzahl an Granulozyten assoziiert ist. Neutrophile Granulozyten, die stimuliert werden, verlassen die Zirkulation um zum Ort der Entzündung zu gelangen, welches wichtig für die Bekämpfung von Pathogenen ist, aber auch Gewebeschäden verursacht (Mantovani et al. 2011). Wie bereits oben beschrieben, haben neutrophile Granulozyten auch eine antiinflammatorische Komponente. Die Freisetzung von CEACAM8 durch aktivierte Granulozyten könnte also ein weiterer wichtiger Mechanismus sein, die Immunantwort zu reduzieren, das Einwandern weiterer Granulozyten zu unterbinden, und somit Gewebeschäden zu minimieren.

Da CEACAM8 mit einer erhöhten Anzahl an Granulozyten assoziiert ist, ist es möglich, dass sich die Messung von löslichem CEACAM8 in der BAL als Marker für granulozytäre Entzündungsreaktionen eignen könnte. Möglicherweise könnte hier eine Stadiumabhängigkeit vorliegen, so dass der Wert erst nach erfolgreicher Erregerabwehr ansteigt.

Da in der vorliegenden Arbeit Restmaterial von Patienten verwendet wurde, und die Proben bezüglich der Diagnose der Patienten anonymisiert waren, konnte dieser interessanten Fragestellung an dieser Stelle nicht weiter nachgegangen werden.

5.1.4 Interaktion zwischen *M. catarrhalis* bzw. *H. influenzae* und CEACAM1

Es wurde bereits beschrieben, dass das Oberflächenprotein UspA1 von *Moraxella catarrhalis* ebenso wie das Oberflächenprotein p5 von *Haemophilus influenzae* an CEACAM1 binden kann.

Von unserer Arbeitsgruppe wurde 2008 beschrieben, dass *Moraxella catarrhalis* in der Lage ist, durch Bindung mit seinem Oberflächenmolekül UspA1 an CEACAM1 auf pulmonalen Epithelzellen, die TLR2 abhängige Immunantwort zu senken (Slevogt et al. 2008). Hier wurde nun gezeigt, dass CEACAM8 ebenso wie das UspA1 von *Moraxella catarrhalis* in der Lage war, durch Bindung an CEACAM1 die TLR2-abhängige Immunantwort zu inhibieren.

Für das P5 Protein von *Haemophilus influenzae* war dieses bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch dieses CEACAM1 bindende Molekül in der Lage ist, die TLR2 vermittelte, *Haemophilus influenzae* induzierte Immunreaktion pulmonaler Epithelzellen zu hemmen.

Mechanismen, die die Immunantwort reduzieren, können für Bakterien von grossem Wert sein, denn so können sie der Erkennung durch das Immunsystem, bzw. der Immunantwort entkommen (Carlin et al. 2009). Für die CEACAM1 bindenden Pathogene *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae* könnte die Expression von UspA1 und p5 eine funktionelle Mimikry des granulozytären Mechanismus der CEACAM8 Sekretion darstellen, um die TLR2-abhängige Immunantwort zu reduzieren und somit dem Immunsystem zu entweichen. Dies führt zu einer erleichterten Kolonisierung der Bakterien in den Atemwegen (Lu et al. 2012).

5.1.5 CEACAM1-vermittelte Inhibition der TLR2-Immunantwort

Es konnte in dieser Studie erstmals gezeigt werden, dass durch die Interaktion von CEACAM8 mit CEACAM1 die TLR2-abhängige Immunantwort pulmonaler Epithelzellen gehemmt wird.

Die TLR2 Signalweiterleitung erfolgt nach Ligandenbindung über zwei unterschiedliche, voneinander unabhängige Wege: die MyD88-abhängige und die PI3 Kinase-abhängige Signalkaskade (Takeda und Akira, 2005; Arbibe et al. 2000). Beide Wege führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und münden schließlich in der Freisetzung von IL8. Von unserer Arbeitsgruppe wurde bereits beschrieben, dass der CEACAM1 vermittelte inhibitorische Effekt PI3 Kinase abhängig verläuft (Slevogt et al. 2008).

In der vorgestellten Studie wurden die einzelnen Schritte dieses Signalweges in Anwesenheit von CEACAM8 untersucht, um zu beweisen, dass die Bindung von CEACAM8 an CEACAM1 ebenso wie von UspA1 PI3 Kinase-abhängig ist (Slevogt et al. 2008).

Es ist bekannt, dass die SHP1- vermittelte Dephosphorylierung der p85-Untereinheit der PI3 Kinase zu deren Inaktivierung und somit zur Unterbrechung der Signalkaskade führt (Cuevas et al. 2001). Dieser Mechanismus wurde von Slevogt et al. 2008 auf die CEACAM1-TLR2-Interaktion übertragen und in dieser Arbeit schließlich ebenso für die CEACAM8-CEACAM1 Bindung bewiesen.

Die Inkubation von Lungenepithelzellen mit CEACAM8 und die so vermittelte Bindung von CEACAM8 an CEACAM1 führte zur Phosphorylierung und SHP1 Rekrutierung von CEACAM1, zur Reduktion der Akt Phosphorylierung und zu einer reduzierten Bindung von p65 und der Polymerase II an den IL8 Promoter. Die PI3 Kinase wird somit unterbrochen. Die daraus resultierende IL8 Freisetzung wird zwar gehemmt, aber nicht vollständig verhindert, da der MyD88-Weg unabhängig von dieser Inhibition weiter aktiviert wird.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass es durch Bindung von löslichem CEACAM8 zu einer Tyrosinphosphorylierung des CEACAM1 auf pulmonalem Epithel kommt.

Neben der Rolle des ko-inhibierenden Rezeptors (Slevogt et al. 2008) ist TLR2 ebenso involviert in der negativen Regulation der Epithelzell-Proliferation (Kammerer et al. 1998; Kunath et al. 1995). Darüber hinaus hat CEACAM1 eine ko-inhibierende Funktion in T- und B-Zellen (Gray-Owen und Blumberg, 2006; Lobo et al. 2009). Damit übereinstimmend wurde in einigen Studien beschrieben, dass CEACAM1 einen hemmenden Effekt auf die Zytokin-Produktion, -Proliferation und Zytotoxizität in T-Zellen von Mäusen und Menschen hat (Chen et al. 2008). Der hemmende Effekt von CEACAM1 an dem T-Zell Rezeptor wurde ebenfalls als Folge der Interaktion von bakteriellen Opa Proteinen (engl.: *opacity proteins*) auf *Neisseria gonorrhoeae*, mit CEACAM1 beschrieben (Lee et al. 2008). Im Gegensatz dazu haben zwei Studien beschrieben, dass Bindung von CEACAM1 auf PBMCs und T-Zell-Klonen in der Anwesenheit von anti-CD3 eine T-Zell-Aktivierung hervorruft (Greicius et al.

2003; Kammerer et al. 1998). Die zugrunde liegenden Mechanismen dieser T-Zell-Aktivierung wurden bisher jedoch nicht geklärt.

Neuerdings wurden weitere ko-inhibierende Funktionen von CEACAM1, wie z.B. für die G-CSFR vermittelt Granulopoese festgestellt (Pan und Shively, 2010). CEACAM1 beeinflusst darüber hinaus die TLR4 abhängige IL-1 β Produktion in LPS aktivierten Neutrophilen (Lu et al. 2012).

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass CEACAM8 ein funktionell aktiver Ligand von CEACAM1 ist. Es ist daher anzunehmen, dass die Bindung von freigesetztem CEACAM8 an CEACAM1 neben TLR2 noch auf weitere Rezeptoren auf Epithelzellen einen Einfluss haben könnte. Um dieser interessanten Fragestellung nachzugehen, benötigt es weitere Studien.

5.2 Diskussion der eingesetzten Materialien

5.2.1 Auswahl der Zellen

In dieser Arbeit wurden humane Alveolarkarzinomzellen (A549 Zellen) und normale Bronchialepithelzellen (NHBE Zellen) von gesunden Spendern verwendet. Die Anwesenheit der für diese Arbeit wichtigen Rezeptoren TLR2 und CEACAM1 wurde zunächst auf beiden Zelllinien in ähnlichem Ausmaß festgestellt. Primäre Zellen sind keinen *loss-of-function* Versuchen, wie zum Beispiel der Transfection von siRNA zugänglich, da sie hier zu früh absterben. Für diese Untersuchungen haben wir daher auf die Zelllinie A549 zurückgegriffen, mit der wir die entsprechenden Methoden schon etabliert haben, und die sich in Voruntersuchungen als geeignete Vergleichszelllinie herausgestellt hat (Slevogt et al. 2008). Granulozyten von gesunden Spendern wurden am Tag des Versuches frisch entnommen, so wurde sichergestellt, dass es sich um vergleichbare, gesunde Spender handelt. Darüber hinaus wurden so Transportwege und Variationen in der Aufbereitung ausgeschlossen, die möglichen Einfluss auf die Ergebnisse haben könnten.

5.2.2 Auswahl der Bakterien

Bakterien spielen in der Pathogenese der COPD eine entscheidende Rolle. Sie kolonisieren den Respirationstrakt von circa 30 % bis 40 % der COPD Erkrankten (Parameswaran et al. 2011). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Bakterien für ca. 50 % der Exazerbationen in der COPD verantwortlich sind. *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* sind in hohen Konzentrationen in der BAL von COPD Erkrankten zu finden (Sethi et al. 2007).

Es wurde bereits vermutet, dass *Moraxella catarrhalis* eine Strategie entwickelt hat, die TLR2-abhängige Immunantwort zu reduzieren, um die unteren Atemwege besser kolonisieren zu können (Slevogt et al. 2008). Da *Haemophilus influenzae* auch von epithelial exprimierten

TLR2 detektiert wird und eine Immunantwort hervorruft, haben wir auf diese Bakterien vergleichend zurückgegriffen.

5.3 Ausblick

Mantovani et al. haben bereits diskutiert, dass es erneut an der Zeit sei, zu überdenken, Neutrophile als therapeutisches Mittel unter anderem gegen pathogene Entzündungen einzusetzen. Auch Di Stefano schlägt in seinem Review von 2004 vor, dass die COPD Behandlung nicht nur symptomatisch erfolgen sollte, sondern dass man vor allem die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung verstehen und diese bei der Behandlung beachten sollte. Hier ist die Suppression der durch neutrophile Granulozyten vermittelten Entzündungsreaktion ein wichtiger Ansatz. Weiter schlägt Di Stefano vor, neutralisierende Antikörper gegen IL8 zu identifizieren und einzusetzen, da diese die in der Pathogenese der COPD wichtigen Auswirkungen von Granulozyten vermindern könnten. Dieses könnte einen schützenden Effekt auf das Gewebe haben, da die chemotaktisch vermittelte Rekrutierung weiterer Granulozyten und CD8+ Zellen, deren Aktivierung und dadurch vermittelten Degranulation und Freisetzung von neutrophiler Elastase insgesamt vermindert wird (Di Stefano et al. 2004).

Diese antiinflammatorische Funktion der Granulozyten ist möglicherweise von entscheidender Bedeutung für die Kontrolle granulozytärer Entzündungen und wurde in der Vergangenheit noch zu wenig untersucht. Es ist möglich, dass diese antiinflammatorischen Mechanismen auf den Verlauf der COPD positive Effekte haben könnten. Der Einsatz von löslichem CEACAM8 könnte ein weiteres mögliches therapeutisches Mittel im Kampf gegen überschüssende granulozytäre Entzündungsreaktionen, wie bei der COPD vorkommend, sein. So könnte die durch die Granulozyten induzierte Entzündungsreaktion abgeschwächt werden, denn es würde die Beteiligung des Bronchialepithels an der Entzündung gehemmt werden. Unterstützend hierfür wäre die Verabreichung einer wirksamen antibiotischen Therapie. Gewebszerstörungen könnten so verhindert werden und gegebenenfalls könnte eine chronische Entzündung limitiert werden.

Diese Erläuterungen sind derzeit jedoch rein spekulativ und benötigen der weiteren wissenschaftlichen Analyse und Untersuchung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben allerdings einen ersten Hinweis darauf, dass die Freisetzung von CEACAM8 einen antiinflammatorischen Mechanismus von Granulozyten darstellt.

Um die Auswirkung der gesteigerten Expression von CEACAM8 auf der Oberfläche von Granulozyten besser zu verstehen, bedarf es ebenfalls noch weiterer Untersuchungen. Hierbei wäre es vor allem interessant, die Bindung von CEACAM8 exprimierenden Granulozyten an endothelial exprimiertem CEACAM1 zu untersuchen, und die dadurch möglicherweise veränderten Zellfunktionen von Granulozyten und Endothelien darzustellen.

6 Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung

Bakterielle Infektionen der unteren Atemwege sind charakterisiert durch granulozytäre Entzündungsreaktionen. Das *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule* (CEACAM) 8 wird durch humane Granulozyten exprimiert und sezerniert. CEACAM8 bindet an CEACAM1, welches von pulmonalen Epithelzellen exprimiert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CEACAM8 von neutrophilen Granulozyten TLR9 abhängig durch CpG freigesetzt wird, wohingegen die Expression von CEACAM8 TLR 7/8 abhängig durch R848 gesteuert wird. Bei Individuen mit einer hohen Anzahl an Granulozyten in ihrer bronchoalveolären Lavage ($\geq 15\%$) ist es wahrscheinlicher, CEACAM8 nachzuweisen als bei Individuen mit einer mittleren oder niedrigen Granulozytenzahl in der BAL.

Die Bindung von löslichem CEACAM8 an pulmonal exprimiertem CEACAM1 führte zu einer Hemmung der TLR2-induzierten Immunantwort. Diese Hemmung wurde durch Tyrosin Phosphorylierung des *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) von CEACAM1 und durch Rekrutierung der Phosphatase SHP1, welche die TLR2-abhängige Aktivierung des Phosphatidylinosit 3-OH kinase-Akt Kinase Signalweges negativ reguliert, gesteuert.

Durch diese Ergebnisse konnten neue Methoden vorgeschlagen werden, durch die Granulozyten die entzündliche Immunantwort in den Atemwegen mittels Sekretion von CEACAM8 hemmen könnten. Die vorliegende Arbeit hat also gezeigt, dass CEACAM8 zur Auflösung granulozytärer überschüssiger Entzündungsreaktionen dienen und somit Gewebeschäden verhindern könnte.

6.1 Summary

Regulation of the expression and secretion of CEACAM8 by human granulocytes and its role on human pulmonary epithelium

Bacterial lower respiratory tract infections are characterized by neutrophilic inflammation in human airways. The carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM) 8 is expressed in and released by human granulocytes and interacts with CEACAM1 expressed on human airway epithelium.

Here, we demonstrated that CEACAM8 is released by human granulocytes in response to bacterial DNA in a TLR9-dependent manner, whereas expression of CEACAM8 is regulated in a TLR7/8 dependent manner. Individuals with a high percentage of granulocytes in human bronchial lavage fluid ($\geq 15\%$) were more likely to have detectable levels of released CEACAM8 in the BALF than those with a no or moderately elevated granulocyte count.

Interaction of released CEACAM8 with CEACAM1 expressed on human epithelial cells resulted in reduced TLR2 dependent inflammatory responses. These inhibitory effects were mediated by tyrosine phosphorylation of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) of CEACAM1 and by recruitment of the phosphatase SHP-1, which negatively regulated Toll-like receptor 2-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-OH kinase-Akt kinase pathway.

In conclusion, our results suggest a new mechanism by which granulocytes reduce pro-inflammatory immune responses in the human airways via secretion of CEACAM8 in neutrophil-driven bacterial infections. Thus, the released CEACAM8 might serve as granulocytic resolution-associated molecular pattern interacting with CEACAM1 expressed on human bronchial epithelial cells to avoid hyper-inflammation and to prevent tissue damage.

7 Referenzen

Agnew, C., Borodinab, E., Zaccaia, N.R., Connersa, R., Burtona N. M., Vicaryc, J.A., Coled, D.K, Antognozzic, M., Virjib, M. and Brady, R. L., Correlation of in situ mechanosensitive responses of the *Moraxella catarrhalis* adhesin UspA1 with fibronectin and receptor CEACAM1 binding, PNAS, 15174–15178, 2011.

Akira S (2003) Mammalian Toll-like receptors. *Current opinion in immunology* 15: 5-11.

Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O., Pathogen Recognition and Innate Immunity, *Cell* 124, 783–801, 2006.

Anzueto A, Sethi S, Martinez FJ. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2007; 4:554–64.

Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackman N, Godowski PJ, Ulevitch RJ, Knaus UG (2000) Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nature immunology* 1: 533-540.

Avadhanula, V., Rodriguez, C. A., Ulett, G. C., Bakaletz, L.O. and Adderson, E.E., Nontypeable *Haemophilus influenzae* Adheres to Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) on Respiratory Epithelial Cells and Upregulates ICAM-1 Expression, *Infection and Immunity*, Feb. 2006, p. 830–838.

Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* .2004; 23 (2): 327 – 333.

Bookwalter JE, Jurcisek JA, Gray-Owen SD, Fernandez S, McGillivray G, Bakaletz LO (2008) A carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 homologue plays a pivotal role in nontypeable *Haemophilus influenzae* colonization of the chinchilla nasopharynx via the outer membrane protein P5-homologous adhesin. *Infection and immunity* 76: 48-55.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532–1535. [PubMed: 15001782].

Brinkmann, V., Zychlinsky A., Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs, *Nature Reviews Microbiology* 5, 577–582 (1 August 2007) | doi:10.1038/nrmicro1710.

Bradford Reagent, Gebrauchsanweisung, 5x, Serva Elektrophoresis GmbH.

Carlin AF, Uchiyama S, Chang YC, Lewis AL, Nizet V, Varki A.; Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood*. 2009 Apr 2;113(14):3333-6. doi: 10.1182/blood-2008-11-187302. Epub 2009 Feb 4.

Chung, K.F., Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease, *Eur Respir J*, 2001; 18: Suppl. 34, 50s–59s.

Craig A, Mai J, Cai S, Jeyaseelan S (2009) Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infection and immunity* 77: 568-575.

Cuevas BD, Lu Y, Mao M, Zhang J, LaPushin R, Siminovitch K, Mills GB.; Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 2001 Jul 20;276(29):27455-61. Epub 2001 May 3.

Decramer, M., Janssen, W., Miravittles, M., *The Lancet*, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), Update, April 2012.

Di Stefano, A., Capelli A. and Donner, C.F., Role of Interleukin-8 in the Pathogenesis and Treatment of COPD, *Chest* 2004;126;676-678 DOI 10.1378/chest.126.3.676.

Drewniak, A., Tool, A., T., J., Geissler, J., van Bruggen, R., van den Berg, T., K. and Kuijpers, T.W., Toll-like receptor–induced reactivity and strongly potentiated IL-8 production in granulocytes mobilized for transfusion purposes, *Blood*, 2010, 115(22): 4588-4596.

Drost, E.M., Skwarski, K.M., Sauleda, J., Soler, N., Roca, J., Agusti, A., MacNee, W., Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD, *Thorax* 2005; 60:293–300. doi: 10.1136/thx.2004.027946.

El Kebir D, Jozsef L, Filep JG (2008) Neutrophil recognition of bacterial DNA and Toll-like receptor 9-dependent and -independent regulation of neutrophil function. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 56: 41-53.

Faurschou, M.; Borregaard, N.; Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2003 Nov;5(14):1317-27.

Galli, S.J., Borregaard, N., and Wynn, T.A., Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils, *Nature immunology* volume 12 number 11; 2011, 1035-1044.

Gold, P. and Freedman, S.O. (1965). Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* 121, 439-462.

GOLD (Global initiative for chronic obstructive lung disease). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Updated 2009. <http://www.goldcopd.org>.

Gray-Owen, S. D. and Blumberg, R. S., CEACAM1: contact-dependent control of immunity, *Nature Reviews Immunology* 6, 2006, 433-446.

Greicius G, Severinson E, Beauchemin N, Öbrink B, Singer BB (2003) CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *Journal of leukocyte biology* 74: 126-134.

Haarmann, Helge, Dissertation 2011; Die Bedeutung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors für die *Moraxella catarrhalis*-induzierte proinflammatorische Immunantwort in pulmonalem Epithel.

Haas, R. Kobbe, G.; Blutstammzelltransplantation; Bilanz des aktuellen Wissens; Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek; 2012.

Hartl, D., Krauss-Etschmann, S., Koller, B., Hordijk, P.L., Kuijpers, T.W., Hoffmann, F., Hector, A., Eber, E., Marcos, V., Bittmann, I., Eickelberg, O., Griese, M. and Roos, D., Infiltrated Neutrophils Acquire Novel Chemokine Receptor Expression and Chemokine Responsiveness in Chronic Inflammatory Lung Diseases, *J Immunol* 2008;181;8053-8067.

Hayashi F., Means, Terry K., Luster, Andrew D., Toll-like receptors stimulate human neutrophil function, *Blood journal*, doi:10.1182/blood-2003-04-1078, 2003 102: 2660-2669, Prepublished online June 26, 2003; doi:10.1182/blood-2003-04-1078.

Hill, D. J., Toleman, M., A., Evans, D. J., Villullas, S., van Alphen, L. and Virji, M., The variable P5 proteins of typeable and non-typeable *Haemophilus influenzae* target human CEACAM1, *Molecular Microbiology* (2001) 39(4), 850-862.

Hill, D.J. and Virji, M., A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1 *Molecular Microbiology* (2003) 48 (1), 117–129.

Huber M, et al. (1999) The carboxyl-terminal region of biliary glycoprotein controls its tyrosine phosphorylation and association with protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 in epithelial cells. (Translated from eng) *J Biol Chem* 274(1):335-344.

Janeway, C.A., Jr. and Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197-216 (2002).

Janke, M., Poth, J., Wimmenauer, V., Giese, T., Coch, C., Barchet, W., Schlee, M. and Hartmann, Selective and direct activation of human neutrophils but not eosinophils by Toll-like receptor 8, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2008, 9,773.

Jiang L, Barclay AN (2010) Identification of leucocyte surface protein interactions by high-throughput screening with multivalent reagents. *Immunology* 129: 55-61.

Jog NR, Rane MJ, Lominadze G, Luerman GC, Ward RA, McLeish KR (2007) The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1690-1700.

Kammerer, R., Hahn, S., Singer, B., Luo, J.S. and von Kleist, S., Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation; *Eur. J. Immunol.* 1998. 28: 3664–3674.

Kawai, T. and Akira, S., The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors, *Nature immunology*, 2010.

Keatings, V.M. Barnes, P.J. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1997; 155: 449-453.

Kondo T, Kawai T, Akira S (2012) Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends in immunology* 33: 449-458.

Kunath T, Ordonez-Garcia C, Turbide C, Beauchemin N (1995) Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene* 11: 2375-2382.

Kuroki M, Matsuo Y, Kinugasa T, Matsuoka Y (1992) Augmented expression and release of nonspecific cross-reacting antigens (NCAs), members of the CEA family, by human neutrophils during cell activation. *Journal of leukocyte biology* 52: 551-557.

Kuroki M, Yamanaka T, Matsuo Y, Oikawa S, Nakazato H, Matsuoka Y (1995) Immunochemical analysis of carcinoembryonic antigen (CEA)-related antigens differentially localized in intracellular granules of human neutrophils. *Immunological investigations* 24: 829-843.

Kuroki, M., Abe, H., Imakiirei, T., Liao, S., Uchida, H., Yamauchi, Y., Oikawa, S.† and Kuroki, M., 2001; Identification and comparison of residues critical for celladhesion activities of two neutrophil CD66 antigens, CEACAM6 and CEACAM8, *J Leukoc Biol* 70(4):543-550.

Lee, H. S. W.; Ostrowski, M. A. † and Gray-Owen, Scott D.; CEACAM1 Dynamics during *Neisseria gonorrhoeae* Suppression of CD4+T Lymphocyte Activation; *The Journal of Immunology*, 2008, 180: 6827–6835.

Leitlinie.de; Odds ratio; Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin (ÄZQ).

Lobo EO, Zhang Z, Shively JE (2009) Pivotal advance: CEACAM1 is a negative coreceptor for the B cell receptor and promotes CD19-mediated adhesion of B cells in a PI3K-dependent manner. *J Leukoc Biol* 86: 205-218.

Lu R, Pan H, Shively JE (2012) CEACAM1 negatively regulates IL-1beta production in LPS activated neutrophils by recruiting SHP-1 to a SYK-TLR4-CEACAM1 complex. *PLoS pathogens* 8: e1002597.

Mantovani, A., Marco A. Cassatella, M., A., Costantini, C. and Jaillon, S, Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity, *Nature Reviews Immunology*, 2011, 11, 519-531.

Metchnikoff, E., editor. *Immunity in infective diseases*. London: Cambridge University Press; 1905. The mechanism of natural immunity against micro-organisms; p. 175-206.

Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, Drent M, Haslam PL, Kim DS, Nagai S, Rottoli P, Saltini C, Selman M, Strange C, Wood B (2012) An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 185: 1004-1014.

Mizgerd, Joseph P., Acute Lower Respiratory Tract Infection, *N Engl J Med.* 2008 February 14; 358(7): 716–727.

Moghaddam SJ, Ochoa CE, Sethi S, Dickey BF (2011) Nontypeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 6: 113-123.

Murphy, T.F., Brauer, A.L., Grant, B.J.B. & Sethi, S. *Moraxella catarrhalis* in chronic obstructive pulmonary disease: burden of disease and immune response. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 195–199 (2005).

Murphy, T. F., Brauer, A. L., Aebi, C. and Sethi, S., Identification of Surface Antigens of *Moraxella catarrhalis* as Targets of Human Serum Antibody Responses in Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *INFECTION AND IMMUNITY*, June 2005, p. 3471–3478 Vol. 73, No. 6.

Murphy, T.F. and Parameswaran, G.I., *Moraxella catarrhalis*, a Human Respiratory Tract Pathogen, *Clinical Infectious Diseases* 2009; 49:124–31.

Muto, Carlene A., Merck manuals review, 2009, http://www.merckmanuals.com/professional/infectious_diseases/neisseriaceae/moraxella_catarrhalis_infection.html?qt=&sc=&alt.

Nationale Versorgungs-Leitlinie COPD, Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2006.

Pan H, Shively JE (2010) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 regulates granulopoiesis by inhibition of granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Immunity* 33: 620-631.

Parameswaran, G.I., Sethi, S. and Murphy, T., Effects of Bacterial Infection on Airway Antimicrobial Peptides and Proteins in COPD, CHEST 2011; 140(3):611–617.

Parker, D; Prince, A.; Innate immunity in the respiratory epithelium; Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 Aug; 45(2):189-201. doi: 10.1165/rcmb.2011-0011RT. Epub 2011 Feb 17.

Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS; GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Apr;163(5):1256-76. Review.

Rabe, K.F., Hurd, S., Anzueto, A., Barnes, P.J., Buist, S. A., Calverley, P, Fukuchi, Y., Jenkins, C., Rodriguez-Roisin, R., van Weel, C. and Jan Zielinski, J., Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, GOLD Executive Summary, Am J Respir Crit Care Med Vol 176. pp 532–555, 2007.

Radsak MP, Salih HR, Rammensee HG, Schild H (2004) Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival. J Immunol 172: 4956-4963.

Schaar V, de Vries SP, Perez Vidakovic ML, Bootsma HJ, Larsson L, Hermans PW, Bjarrell A, Mörgelin M, Riesbeck K.; Multicomponent *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles induce an inflammatory response and are internalized by human epithelial cells.; Cell Microbiol. 2011 Mar;13 (3): 432-49. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01546.x. Epub 2010 Nov 24.

Schmidt T, Zundorf J, Gruger T, Brandenburg K, Reiners AL, Zinserling J, Schnitzler N (2012) CD66b overexpression and homotypic aggregation of human peripheral blood neutrophils after activation by a gram-positive stimulus. Journal of leukocyte biology 91: 791-802.

Schwartz, D. A.; Quinn, T. J.; Thorne, P. S.; Sayeed, S; Yi, Ae-Kyung and Krieg, A. M.; CpG Motifs in Bacterial DNA Cause Inflammation in the Lower Respiratory Tract; The Journal of Clinical Investigation; Volume 100, Number 1, July 1997, 68–73.

Serhan, C.; Chiang, N. and Van Dyke, T.E. (2008), Resolving inflammation: Dual anti inflammatory and pro-resolution lipid mediators. Nat. Rev. Immunol. 8, 349-361.

Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF (2002) New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 347: 465-471.

Sethi, S., Maloney, L., Grove, L., Wrona, C. & Berenson, C.S. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 991–998 (2006).

Sethi, S.; Sethi, R.; Eschberger, K.; Lobbins, P.; Cai, W.; Grant, B. J. B and Murphy, T.F.; Airway Bacterial Concentrations and Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease; *Am J Respir Crit Care Med* Vol 176. pp 356–361, 2007; Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.200703-417OC on May 3, 2007.

Sethi, S. and Murphy, T. F., Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *N Engl J Med* 2008; 359:2355-65.

Singer BB, Scheffrahn I, Heymann R, Sigmundsson K, Kammerer R, Obrink B (2002) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes. *J Immunol* 168: 5139-5146.

Singer BB, Scheffrahn I, Kammerer R, Suttorp N, Ergun S, Slevogt H (2010) Deregulation of the CEACAM expression pattern causes undifferentiated cell growth in human lung adenocarcinoma cells. *PloS one* 5: e8747.

Singer, B.B., Habilitationsschrift, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg/Essen, Institut für Anatomie, Molekulare Mechanismen und funktionelle Bedeutung von CEACAM1 (Carcino Embryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1) als Ko-Rezeptor in immunologischen Prozessen.

Slevogt H, Schmeck B, Jonat C, et al. *Moraxella catarrhalis* induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 May;290(5):L818-26.

Slevogt, H., Seybold, J., Tiwari, K.N., Hocke, A.C., Jonat C., Dietel, S., Hippenstiel, S., Singer, B.B., Bachmann, S., Suttorp, N. and Opitz, B., *Moraxella catarrhalis* is internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and initiates a TLR2- and partly

NOD1-dependent inflammatory immune response. *Cellular Microbiology* (2007) 9(3), 694–707.

Slevogt, H., Zabel, S., Opitz, B., Hocke, A.C., Eitel, J., Dje N'Guessan, P., Lucka, L., Riesbeck, K., Zimmermann, W., Zweigner, J., Temmesfeld-Wollbrueck, B., Suttorp, N. and Singer, B.B., CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2 – triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells., *Nat. Immunol.* 9, 1270-1278 (2008).

Takeda K., Akira S., Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, Vol. 17, No. 1, pp. 1–14, 2005 The Japanese Society for Immunology doi:10.1093/intimm/dxh186.

Thompson, J.A., Grunert, F., Zimmermann, W. (1991) Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.* 5, 344-366.

Voges, M., Bachmann, V., Kammerer, R., Gophna, U. and Hauck, C.R., CEACAM1 recognition by bacterial pathogens is species-specific, *BMC Microbiology* 2010, 10:117.

Werdehausen, Robert, Dissertation Heinrich-Heine-Universität, 2009, Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung von Signalwegen der Apoptose für die Neurotoxizität von Lidocain.

Wedzicha, J. A., Seemungal, T. A., *The Lancet*, Volume 370, Issue 9589, 1-7 September 2007, Pages 786–796, COPD Exacerbations: defining their cause and prevention.

World health organisation (WHO), Chronic obstructive lung disease (COPD), Fact sheet N°315, November 2011, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs315/en/>.

Yang S, Liu F, Wang QJ, Rosenberg SA, Morgan RA (2011) The Shedding of CD62L (L-Selectin) Regulates the Acquisition of Lytic Activity in Human Tumor Reactive T Lymphocytes. *PLoS ONE* 6(7): e22560. doi:10.1371/journal.pone.0022560.

Yona, S., Hayhoe, R., Avraham-Davidi, Inbal, Monocyte and Neutrophil Isolation and Migration Assays, *Current Protocols in Immunology*, 14.15.1-14.15.14, February 2010.

Zabel, Solveig, Dissertation FU-Berlin, 2009, Die Bedeutung von CEACAM1 für die Moraxella catarrhalis-induzierte TLR2-vermittelte Aktivierung des respiratorischen Epithels.

Zakharkina, T., Koczulla, A.-R., Mardanova, O, Hattesoehl, A. and Bals, R., Detection of microorganisms in exhaled breath condensate during acute exacerbations of COPD, *Respirology* (2011) 16, 932–938.

Zhao L, Furebring M, Xu S, Venge P (2004) Subcellular localization and mobilization of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8 in hman neutrophils. *British journal of haematology* 125: 666-673.

Zhao L., Xu S., Fjaertoft G., Pauksen K., Hakansson L., Venge P., An enzyme-linked immunosorbent assay for human carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8, a biological marker of granulocyte activities in vivo, *Journal of Immunological Methods* 293 (2004) 207-214.

Zimmermann, W., *The Carcinoembryonic antigen Homepage*, 2011.

8 Anhang

8.1 Publikationen

Bernhard B. Singer, Lena Opp, Luis C. Berrocal Almanza, Kertsin Heyl, Annina Heinrich, Hortense Slevogt.

Soluble CEACAM8 secreted by human granulocytes inhibits TLR2-dependent proinflammatory immune response in human bronchial epithelium.

Poster, Septomics Research Center, Jena University Hospital and Friedrich Schiller University Jena

Albert-Einstein-Str. 10, 07745 Jena, Germany, www.septomics.de.

Soluble CEACAM8 Interacts with CEACAM1 Inhibiting TLR2-Triggered Immune Responses

Bernhard B. Singer, Lena Opp, Annina Heinrich, Luis C. Berrocal Almanza, Kerstin A. Heyl, Sabrina Zahradnik, Andreas Weimann, Janine Zweigler, Hortense Slevogt.

PlosONE

Published: April 17, 2014, DOI: [10.1371/journal.pone.0094106](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094106)

8.2 Danksagung

In erster Linie danke ich Frau Prof. Dr. Hortense Slevogt für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Sie hat mich stets in allen Belangen fachlich und moralisch unterstützt und hatte immer ein offenes Ohr für mich.

Ich danke Bernhard B. Singer für die Hilfe bei allen methodischen Fragen. Darüber hinaus bin ich Frau Dr. Janine Zweigner dankbar für Ihre fachliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Wieler danke ich herzlich für die Übernahme des ersten Gutachtens und für die externe Betreuung meiner Arbeit.

Ich danke meiner gesamten Arbeitsgruppe, vor allem Annina Heinrich, Frauke Schreiber, Kerstin Heyl und Luis C. Berrocal Almanza, für die technische Unterstützung und für eine schöne Zeit im Labor.

Bei Herrn Dr. Schumann bedanke ich mich für die Bereitstellung des Labors. Seiner Arbeitsgruppe, vor allem Diana Woellner und Fränzi Creutzburg, verdanke ich eine tolle Arbeitsatmosphäre und exzellente technische Unterstützung.

Meiner Familie und meinem Mann danke ich dafür, dass sie immer für mich da waren und mich in schwierigen Zeiten unterstützt haben.

8.3 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, Lena Kerneck, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne die unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen zur Erstellung meiner Arbeit verwendet habe.

München, den

Unterschrift