

**Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Die Bedeutung von CEACAM1 für die *Moraxella*
catarrhalis-induzierte TLR2-vermittelte Aktivierung des
respiratorischen Epithels**

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

**vorgelegt von
Solveig Zabel, geb. Dietel
Tierärztin
aus Potsdam**

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3314

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar Wieler
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Norbert Suttorp
Dritter Prüfer: Univ.-Prof. Dr. Barbara Kohn

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Moraxella catarrhalis, Bacterial Outer Membrane Proteins (MeSH),
Respiratory Diseases, Respiratory Mucosa/immunology (MeSH),
1-Phosphatidylinositol 3-Kinase/metabolism (MeSH), Cell Adhesion
Molecules (MeSH), Toll-Like Receptor 2 (MeSH), Signal Transduction
(MeSH)

Tag der Promotion: 09.10.2009

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: 978-3-86664-687-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

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 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhalt

Abbildungen.....	III
Tabellen.....	V
Abkürzungen.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Zielsetzung.....	3
1.2 Fragestellung.....	3
2 Schrifttum.....	4
2.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)	4
2.2 <i>Moraxella catarrhalis</i>	5
2.2.1 <i>Allgemeines</i>	5
2.2.2 <i>Virulenzfaktoren</i>	6
2.3 Die angeborene Immunabwehr (Innate Immunity).....	8
2.3.1 <i>Pattern recognition receptors (PRRs)</i>	8
2.3.2 <i>Zytokine, Chemokine, IL8</i>	9
2.4 Toll-like Rezeptoren	10
2.4.1 <i>Einteilung und Expression</i>	10
2.4.2 <i>Funktion</i>	10
2.5 CEACAM Rezeptoren	12
2.5.1 <i>Einteilung und Struktur</i>	13
2.5.2 <i>Expression und Funktion</i>	15
2.6 Signaltransduktion	17
2.6.1 <i>Die CEACAM1-Signalkaskade</i>	18
2.6.2 <i>Die TLR2-Signalkaskade</i>	18
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Material	23
3.1.1 <i>Zelllinien und Zellkultur</i>	23
3.1.2 <i>Bakterienkultur</i>	26
3.1.3 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	29
3.2 Methoden	43
3.2.1 <i>Zellbiologische Methoden</i>	43
3.2.2 <i>Mikrobiologische Methoden</i>	46
3.2.3 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	48
3.2.4 <i>Statistik</i>	59
4 Ergebnisse.....	60
4.1 Expression und Lokalisation der CEACAM Rezeptoren auf humanem pulmonalen Epithel	60
4.2 Expression von TLR2 auf humanem pulmonalen Epithel.....	62
4.3 Expression von TLR2 und CEACAM1 nach Stimulation mit <i>M. catarrhalis</i> auf pulmonalen Epithelzellen	63
4.4 Kolokalisation von CEACAM1 und TLR2 in HEK293 Zellen.....	64
4.5 TLR2-vermittelte Aktivierung von NF- κ B und IL8 durch <i>M. catarrhalis</i>	65
4.6 Die UspA1-CEACAM1-Interaktion hat einen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion von <i>M. catarrhalis</i> an pulmonalen Epithelzellen.....	67

4.7 Die Interaktion von <i>Moraxella</i> -UspA1 und CEACAM1 reduziert die IL8-Sekretion pulmonaler Epithelzellen.....	68
4.8 Gen-Silencing von CEACAM1 führt zu einer Verstärkung der <i>M. catarrhalis</i> -induzierten IL8-Sekretion.....	69
4.9 Die Hemmung der <i>Moraxella catarrhalis</i> -induzierten NF- κ B-Aktivierung durch CEACAM1 erfolgt über dessen ITIM-Domäne.....	71
4.10 Die Bindung von UspA1 an CEACAM1 führt zu dessen Tyrosinphosphorylierung und zur Rekrutierung von SHP1	73
4.11 Gen-Silencing von SHP1 führt zu einer Verstärkung der <i>M. catarrhalis</i> -induzierten IL8-Sekretion, Gen-Silencing von SHP2 hat dagegen keinen Einfluss.....	74
4.12 Stimulation pulmonaler Epithelzellen mit <i>M. catarrhalis</i> führt zur Phosphorylierung von TLR2	76
4.13 Durch spezifische Inhibition der PI3 Kinase wird die <i>M. catarrhalis</i> -induzierte NF- κ B-Aktivierung bzw. IL8-Sekretion gehemmt	77
4.14 Die UspA1-CEACAM1-Interaktion führt zur Rekrutierung von SHP1 an TLR2 ..	79
4.15 Die SHP1-TLR2-Assoziation hat eine Aufhebung des p85-TLR2-Signalkomplexes zur Folge	80
4.16 Die UspA1-CEACAM1-induzierte SHP1-Rekrutierung kontrolliert die PI3K-abhängige Phosphorylierung von Akt (S437)	81
4.17 Die Bindung der <i>Neisseria</i> -spezifischen Oberflächenproteine (Opa) an CEACAM1 hemmt ebenfalls die TLR2-abhängige Immunantwort pulmonaler Epithelzellen ..	83
5 Diskussion	88
5.1 Diskussion der Ergebnisse	88
5.1.1 CEACAM-Expression auf pulmonalem Epithel.....	88
5.1.2 <i>Moraxella catarrhalis</i> und CEACAM1	89
5.1.3 Tyrosinphosphorylierung und Signaltransduktion von CEACAM1.....	90
5.1.4 <i>M. catarrhalis</i> und TLR2 auf pulmonalem Epithel.....	91
5.1.5 Signaling von TLR2.....	92
5.1.6 CEACAM1 und TLR2.....	94
5.1.7 Weitere mögliche Liganden für CEACAM1 und TLR2.....	95
5.2. Diskussion der eingesetzten Materialien und Methoden	96
5.2.1 Auswahl der Zellen	96
5.2.2 Auswahl der Bakterien.....	96
5.2.3 Transfektionsversuche.....	97
5.3 Ausblick	99
6 Zusammenfassung / Summary	101
6.1 Zusammenfassung.....	101
6.2 Summary	102
7 Referenzen	104
8 Anhang	121
8.1 Publikationen	121
8.2 Danksagung.....	122
8.3 Selbständigkeitserklärung	123

Abbildungen

- Abb. 2-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *M. catarrhalis*
- Abb. 2-2: Toll-like Rezeptoren und ihre wichtigsten Liganden
- Abb. 2-3: Die CEACAM-Gruppe der humanen CEA-Familie
- Abb. 2-4: MyD88-abhängige TLR2-Signalkaskade
- Abb. 2-5: PI3Kinase-abhängige TLR2-Signalkaskade
- Abb. 4-1: Expression von CEACAM1, 6, 7 und CEA auf pulmonalem Epithel
- Abb. 4-2: Expression von TLR2 auf pulmonalem Epithel
- Abb. 4-3: Zeitabhängige Expression von TLR2 und CEACAM1 auf pulmonalem Epithel nach Stimulation mit *M. catarrhalis*
- Abb. 4-4: Kolo-kalisation von TLR2 und CEACAM1 auf transfizierten HEK293 Zellen
- Abb. 4-5: Dosisabhängige Aktivierung der TLR2-vermittelten NF- κ B-Aktivierung bzw. IL8-Freisetzung durch *M. catarrhalis*
- Abb. 4-6: Adhäsion von *M. catarrhalis* an pulmonalen Epithelzellen
- Abb. 4-7: Auswirkungen der UspA1-CEACAM1-Interaktion auf die IL8-Sekretion pulmonaler Epithelzellen
- Abb. 4-8: CEACAM1-Abhängigkeit der *M. catarrhalis*-induzierten IL8-Sekretion pulmonaler Epithelzellen
- Abb. 4-9: Bedeutung der ITIM-Domäne von CEACAM1 für die Hemmung der *M. catarrhalis* induzierten Aktivierung von NF- κ B
- Abb. 4-10: UspA1-vermittelte Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1 sowie Rekrutierung von SHP1 an den aktivierten Rezeptor
- Abb. 4-11: SHP1-Abhängigkeit der *M. catarrhalis*-vermittelten IL8-Sekretion
- Abb. 4-12: *M. catarrhalis*-vermittelte UspA1-unabhängige Tyrosinphosphorylierung von TLR2
- Abb. 4-13: Einfluß der spezifischen Hemmung der PI3Kinase auf die *M. catarrhalis*-induzierte NF- κ B-Aktivierung bzw. IL8-Sekretion
- Abb. 4-14: UspA1-abhängige Rekrutierung von SHP1 an TLR2
- Abb. 4-15a: UspA1-abhängige Aufhebung des p85-TLR2-Komplexes
- Abb. 4-15b: CEACAM1- bzw. SHP1-abhängige Aufhebung des p85-TLR2-Komplexes
- Abb. 4-16a: UspA1- und PI3 Kinase-abhängige Phosphorylierung von Akt
- Abb. 4-16b: SHP1-Abhängigkeit der Akt-Phosphorylierung
- Abb. 4-17a: Adhäsion des *Neisseria*-spezifischen Oberflächenproteins Opa B an pulmonale Epithelzellen

Abb. 4-17b: Opa-abhängige Hemmung der TLR2 vermittelten IL8-Sekretion pulmonaler Epithelzellen

Abb. 4-17c: Einfluss der Opa-CEACAM1-Interaktion auf die TLR2-vermittelte IL8-Sekretion pulmonaler Epithelzellen

Abb. 4-17d: Auch die durch Opa hervorgerufene Hemmung der TLR2-vermittelten NF- κ B-Aktivierung verläuft über die ITIM-Domäne von CEACAM1

Tabellen

- Tab. 2-1: Expression der verschiedenen humanen CEACAM Rezeptoren
- Tab. 3-1: Kultur- und Stimulationsmedien der primären Bronchialepithelzellen
- Tab. 3-2: Kultur- und Stimulationsmedien der A549 Zellen
- Tab. 3-3: Kultur- und Stimulationsmedien der HEK293 Zellen
- Tab. 3-4: Kultur- und Stimulationsmedien der Beas2B Zellen
- Tab. 3-5: Wachstums- und Selektionsmedien für die Kultur von *M. catarrhalis*
- Tab. 3-6: Wachstums- und Selektionsmedien für die Kultur Opa-exprimierender *E. coli*
- Tab. 3-7: Puffer für die PCR
- Tab. 3-8: Zusammensetzung des Mastermixes für die RT-PCR
- Tab. 3-9: Zusammensetzung des Mastermixes für die PCR
- Tab. 3-10: Zusammensetzung des Agarosegels für die Gelelektrophorese
- Tab. 3-11: PCR-Primersequenzen
- Tab. 3-12: Primäre und sekundäre Facs-Antikörper
- Tab. 3-13: Transfektionsreagenzien
- Tab. 3-14: Transfektionsplasmide
- Tab. 3-15: SiRNA-Sequenzen
- Tab. 3-16: Puffer und Lösungen für die Konfokalmikroskopie
- Tab. 3-17: Primäre und sekundäre Antikörper für die Konfokalmikroskopie
- Tab. 3-18: IL8 Elisa-Puffer
- Tab. 3-19: Antikörper für den IL8 Elisa
- Tab. 3-20: Puffer und Lösungen für den Western Blot
- Tab. 3-21: Western Blot Gele (SDS-Page)
- Tab. 3-22: Primäre und sekundäre Antikörper für den Western Blot
- Tab. 3-23: Antikörper für die Immunpräzipitation
- Tab. 3-24: Antikörper für den Adhäsionsassay
- Tab. 3-25: Assay Kits für den Biolumineszensassay
- Tab. 3-26: Stimulanzen
- Tab. 3-27: Inhibitoren
- Tab. 3-28: Verbrauchssubstanzen
- Tab. 3-29: Verbrauchsmaterialien
- Tab. 3-30: Geräteübersicht
- Tab. 3-31: PCR-Konditionen

Abkürzungen

β-Gal	β-Galaktosidase
2N H ₂ SO ₄	2 normale Schwefelsäure
A. bidest/tridest	zweifach/dreifach destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection™
A549	Typ II alveoläre karzinogene Bronchialzellen
AK/Ab	Antikörper, engl.: <i>antibody</i>
Akt	Serin/Threonin-Kinase (Proteinkinase B)
ATP	Adenosintriphosphat
Beas2B	humane Bronchialepithelzelllinie
BEGM	engl.: <i>bronchial epithelial cell growth medium</i>
BHI-Agar	engl.: <i>brain heart infusion agar</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CEA	engl.: <i>carcinoembryonic antigen</i>
CEACAM	engl.: <i>carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule</i>
cfu	engl.: <i>colony forming units</i> ; Kolonie-bildende Einheiten
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	engl.: <i>chronic obstructive pulmonary disease</i> ; Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CpGs	Cytosin- und Guanin-reiche DNA-Abschnitte
DMEM	engl.: <i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: <i>desoxyribonucleinacid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotide
ds/ss RNA	engl.: <i>double/single stranded RNA</i> ; doppelsträngige/einzelsträngige RNA
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	engl.: <i>ethylendiamintetraacetic acid</i> ; Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA	engl.: <i>ethylenglycoldiamintetraacetic acid</i> ; Ethylenglykoldiamintetraessigsäure
Elisa	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ; Enzym gekoppelter Immunadsorptionstest
ETI	Sojabohnen-Trypsininhibitor
Facs	engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i> ; Durchflusszytometrie
FCS	engl.: <i>fetal calve serum</i> ; fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-5-isothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	engl.: <i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	engl.: <i>granulocyte-monocyte colony-stimulating factor</i>
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HBS	engl.: <i>HEPES buffered saline</i> ; HEPES gepufferte Salzlösung
HEK	engl.: <i>human embryonal kidney cell</i> ; humane embryonale Nierenepithelzelllinie
HMV-OMP	engl.: <i>high molecular weight-outer membrane protein</i>
HSP 60	Hitzeschockprotein 60
Ig	Immunglobulin
IKK	Inhibitor κ B-Kinase
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IRAK	Interleukin Rezeptor-assoziierte Kinase
ITAM	engl.: <i>immunoreceptor tyrosin-based activation motif</i>
ITIM	engl.: <i>immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif</i>
I κ B	Inhibitor κ B
kB	kilo Basenpaare
kDa	Kilodalton
LB Medium	Luria-Bertani Medium
Lbp	Laktoferrin bindendes Protein
LOS/ LPS	Lipooligosaccharid/ Lipopolysaccharid
LRR	engl.: <i>leucine rich repeat</i> ; Leucin-reiche Wiederholungen

Ly294002	[2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one]
<i>M. catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase
MCP-1	engl. : <i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MHV	murines Hepatitisvirus
MID	engl.: <i>Moraxella IgD binding protein</i> ; <i>Moraxella</i> IgD- bindendes Protein
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i> ; Boten RNA
MyD88	myeloid Differenzierungsfaktor 88
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nukleärer Transkriptionsfaktor-κB
NH ₃	Ammoniak
Nod	engl.: <i>nucleotide-binding oligomerization domain protein</i>
OD	optische Dichte
OMP	engl.: <i>outer membrane protein</i> ; Oberflächenprotein
Opa Protein	engl.: <i>opacity-associated protein</i>
Pam ₃ CSK ₄	Pam ₃ Cys-Ser-(Lys) ₄ trihydrochlorid
PAMP	engl.: <i>pathogen-associated molecular pattern</i> ; Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	engl.: <i>phosphat buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PG	Peptidoglykan
PI3K	Phosphoinositid-3 Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly I:C	Poly Inosine:Cytosine
PRR	engl.: <i>pattern recognition receptor</i> ; Keimbahn-kodierter Muster-erkennender Rezeptor
PSG	engl.: <i>pregnancy-specific glycoprotein</i>
PVP	Polyvinylpyrolidon

RLT	PCR-Lysepuffer
RLU	engl. : <i>relative light units</i> ; relative Lichteinheiten
RNA	engl.: <i>ribonucleinacid</i> ; Ribonukleinsäure
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur/ Reverse Transkriptase
SDS	engl.: <i>sodium dodecylsulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFM	serumfreies Medium
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
TAB	TAK1-bindendes Protein
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK1	engl.: <i>transforming growth factor β activating kinase 1</i>
Tbp	Transferrin bindendes Protein
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethyl-ethylethylendiamin
TGE	Tris-Base-Glycin-EDTA
TIR	Toll-/IL-1 Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRAF6	Tumornekrosefaktor Rezeptor-assoziiertes Faktor 6
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tris-HCL	Tris-Salzsäure
TSA	Trypsininhibitor
U	engl.: <i>units</i> ; Einheiten
U/min	Umdrehungen pro Minute
UspA1	engl. : <i>ubiquitous surface protein A1</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
wt	Wildtyp

1 Einleitung

Im menschlichen Respirationstrakt spielt die angeborene Immunität (engl.: *innate immunity*) eine wichtige Rolle für die Eliminierung eindringender Pathogene. Für die Erkennung der Mikroorganismen sind die sogenannten keimbahnkodierten Rezeptoren (engl.: *pattern recognition receptor*; PRR), welche nach Ligandenbindung eine inflammatorische Immunantwort auslösen können, von großer Bedeutung. Einer der wichtigsten PRRs für die Erregerabwehr in der Lunge ist der Toll-like Rezeptor 2 (TLR2). Die Ligandenbindung an TLR2 führt über zwei verschiedene Signalkaskaden unter anderem einen Phosphoinositid-3 Kinase (PI3K)-abhängigen Signalweg zur Aktivierung von NF- κ B, was wiederum eine verstärkte Transkription und Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie z.B. dem Interleukin 8 (IL8) zur Folge hat. IL8 ist für die Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten als Immunantwort auf eine bakterielle Infektion des respiratorischen Epithels von entscheidender Bedeutung. Es ist bekannt, dass eine verringerte IL8-Sekretion im Respirationstrakt eine gesteigerte Persistenz der Erreger zur Folge hat. Eine Vielzahl von Pathogenen wird über diese TLR2-vermittelte Entzündungskaskade erkannt und eliminiert; einige Erreger jedoch, wie z.B. *Moraxella catarrhalis* können trotz vorhandener Immunabwehr in der normalerweise sterilen Umgebung des unteren Respirationstraktes kolonisieren, nahezu ohne eine Entzündung oder Erkrankung hervorzurufen.

M. catarrhalis ist ein human-spezifischer Erreger, der aus dem unteren Respirationstrakt von bis zu 32 % aller Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (engl.: *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) isoliert werden kann und für etwa 25 % der COPD-Exazerbationen verantwortlich gemacht wird. Die meisten Infektionen mit *M. catarrhalis* bleiben auf die Schleimhäute beschränkt, weshalb der Interaktion dieses Erregers mit dem respiratorischen Epithel im Hinblick auf die Entstehung von Infektion oder Kolonisierung eine besondere Bedeutung zukommt. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass *M. catarrhalis* auf respiratorischem Epithel eine deutliche TLR2-abhängige Immunantwort induziert. Die Mechanismen, die der Erregerpersistenz von *M. catarrhalis* trotz vorhandener Gewebeimmunität im Respirationstrakt zugrunde liegen, sind jedoch noch weitgehend ungeklärt.

Neben *M. catarrhalis* gibt es weitere Pathogene wie *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae*, die im menschlichen Organismus kolonisieren und nur bei einigen Individuen zu entzündlichen Reaktionen führen. Allen diesen Bakterien ist gemeinsam, dass sie mittels untereinander nicht verwandter Oberflächenmoleküle (*M. catarrhalis*: *ubiquitous surface protein A1* (UspA1), *Neisseria meningitidis*: *opacity-associated protein* (Opa), *Haemophilus*

influenzae: P5) spezifisch an CEA (engl.: *carcinoembryonic antigen*)-verwandte Zelladhäsionsmoleküle (engl.: *CEA-related cell adhesion molecules*, CEACAMs) binden können. Der am besten untersuchte Vertreter der CEACAM-Familie ist das CEACAM1. Es wird auf einer Vielzahl von Geweben exprimiert darunter auch auf der apikalen Seite respiratorischer Epithelzellen. Neben Aufgaben für die Zelladhäsion und -proliferation sind für CEACAM1 verschiedene inhibitorische Funktionen in der Regulation der T Zell-Aktivität beschrieben worden. Diese werden nach Ligandenbindung durch Phosphorylierung des *immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif* (ITIM) von CEACAM1 und anschließende Rekrutierung der zytosolischen Protein-Tyrosinphosphatase SHP1 (engl.: *src homology domain-containing cytosolic protein tyrosin-phosphatase 1*) vermittelt.

Ein wichtiges Zielmolekül von SHP1 ist die p85 Untereinheit der PI3 Kinase. Es wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von SHP1 an die Zellmembran PI3 Kinase-abhängige Signalkaskaden des T Zell-, des Somatostatin- und des Insulinrezeptors im Sinne negativer Feedback-Mechanismen inhibieren kann. Dies lässt die Hypothese zu, dass auch die PI3 Kinase-abhängige Immunantwort des TLR2 negativ beeinflussbar sein könnte. Da hierdurch möglicherweise ein Mechanismus CEACAM bindender Bakterien dargestellt wird, im unteren Respirationstrakt zu kolonisieren, ist die Erforschung möglicher Interaktionen zwischen der TLR2- und der CEACAM1-Signalkaskade von besonderem Interesse.

1.1 Zielsetzung

Die Frage, warum *M. catarrhalis*, *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae* trotz offensichtlich vorhandener Immunabwehr im menschlichen Organismus kolonisieren können, ist bisher völlig ungeklärt. Ziel dieser Arbeit ist es, mögliche Mechanismen für diese Beobachtung zu untersuchen. Dafür werden zuerst die Expressionsmuster humaner CEACAM Rezeptoren auf pulmonalem Epithel dargestellt und anschließend mögliche Einflüsse der spezifischen Bindung von *M. catarrhalis* an CEACAM1 auf die TLR2-abhängige Immunantwort bestimmt. Außerdem wird untersucht, auf welchem Weg eine Beeinflussung der TLR2-Signalkaskade stattfindet und welche Signalmoleküle hierbei eine Rolle spielen.

1.2 Fragestellung

1. Welche CEACAM Rezeptoren werden auf der Oberfläche von respiratorischen Epithelzellen exprimiert?
2. Wird die *M. catarrhalis*-vermittelte TLR2-abhängige Immunantwort durch gleichzeitige Bindung des Erregers an CEACAM1 beeinflusst?
3. Welcher Mechanismus führt nach Ligandenbindung zur Verminderung der TLR2-vermittelten Immunantwort?

2 Schrifttum

2.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

Die COPD (engl.: *chronic obstructive pulmonary disease*) ist eine multifaktoriell bedingte chronische Erkrankung der Lunge, gekennzeichnet als obstruktive Ventilationsstörung, die sich in Kombination mit chronischer Bronchitis und Lungenemphysem in einer messbaren Behinderung der forcierten Ausatmung manifestiert (Whitsett 2002).

Die Erkrankungshäufigkeit hat in den letzten Jahren immer stärker zugenommen, allein in Deutschland sind derzeit etwa vier Millionen Menschen betroffen. Die COPD gilt weltweit als die vierthäufigste Todesursache, sie stellt also ein beträchtliches Gesundheitsproblem dar (WHO Report 2004).

Als Hauptrisikofaktor für die Entstehung der Erkrankung gilt Tabakrauch, jedoch auch die zunehmende Luftverschmutzung oder berufliche Expositionen spielen eine wichtige Rolle (Barnes 2004).

Der Krankheitsverlauf der COPD ist durch eine progrediente Verschlechterung der Lungenfunktion und eine zunehmende Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens gekennzeichnet. Häufig erleiden die Patienten wiederkehrende Episoden mit Verschlechterung der respiratorischen Symptome – sogenannte akute Exazerbationen, die mit einer Zunahme der Morbidität und Mortalität verbunden sind (Sethi et al. 2000; Patel et al. 2002). 40-60 Prozent dieser Exazerbationen sind auf eine bakterielle Infektion zurückzuführen; häufigste Erreger dafür sind in absteigender Reihenfolge *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* und *Streptococcus pneumoniae* (Murphy et al. 2000; Sethi et al. 2006; Caugant et al. 2007). Auffällig ist, dass sich bei vielen Patienten mit COPD eine Kolonisation der unteren Atemwege mit diesen Erregern nachweisen lässt, deren Ausmaß in direktem Zusammenhang mit einer deutlich verstärkten Entzündung des Respirationstrakts steht (Cabello et al. 1997; Hill et al. 2000; Stockley et al. 2000). Es wird angenommen, dass durch die dauerhafte inflammatorische Immunantwort der Bronchialepithelzellen auf die kolonisierenden respiratorischen Pathogene das Fortschreiten der COPD unterstützt wird, (Circulus vitiosus Hypothese) und die betroffenen Patienten zu deutlich häufigeren Exazerbationen neigen (Patel et al. 2002; Murphy et al. 2000; Sethi et al. 1999).

Es ist anzunehmen, dass die Kolonisierung der unteren Atemwege mit den genannten Erregern für die Pathogenese und das Fortschreiten der COPD eine wesentliche Bedeutung hat. Über die Wechselwirkung dieser Erreger mit dem bronchialen Epithel ist bisher jedoch

wenig bekannt, so dass der Erforschung dieser Interaktion für das Verständnis des Fortschreitens der COPD eine wichtige Rolle zukommt.

2.2 *Moraxella catarrhalis*

2.2.1 Allgemeines

Moraxella catarrhalis, ein gram-negativer, unbekapselter Diplokokkus wurde erstmals 1896 als *Micrococcus catarrhalis* beschrieben; später umbenannt in *Neisseria catarrhalis* und in den 70er Jahren aufgrund neuer Erkenntnisse eingeteilt in die Gattung *Branhamella* als *Branhamella catarrhalis*. Seit 1984 ist das Bakterium unter dem Namen *Moraxella catarrhalis* bekannt (Verduin et al. 2002).

Lange wurde es als nicht pathogenes Mitglied der normalen Flora des Nasopharynx betrachtet und erst in den 90er Jahren als bedeutender Erreger respiratorischer Infektionen erkannt. Das ausschließlich humanpathogene, aerobe Bakterium gilt heute als der zweithäufigste Erreger der infektexazerbierten COPD sowie als dritthäufigster Erreger der Otitis media im Kindesalter (Sethi and Murphy 2001). Neben diesen Erkrankungen verursacht *M. catarrhalis* Bronchitis, Laryngitis und weitere Infektionen des Respirationstraktes.

Die *M. catarrhalis*-induzierte Immunantwort der pulmonalen Epithelzellen ist dabei hauptsächlich Toll-like Rezeptor 2-abhängig und mündet über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL8 und GM-CSF (Slevogt et al. 2006).

Interessanterweise können *Moraxellen* auch die Schleimhäute gesunder Individuen besiedeln (Murphy, T. F. 2006). Bei durchschnittlich 1-5 % der gesunden Erwachsenen können sie im Respirationstrakt nachgewiesen werden (Sethi and Murphy 2001). Patienten mit einer COPD weisen dagegen mit ca. 32 % eine deutlich höhere Besiedlungsrate auf (Murphy et al. 2005) und obwohl im Serum und Sputum einiger der Patienten spezifische Antikörper gegen verschiedene Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis* nachgewiesen wurden, ist der Erreger in der Lage über längere Zeit im Respirationstrakt zu kolonisieren (McMichael, J.C. 2000). Unter welchen Umständen es zu dieser Kolonisierung kommt, welche Mechanismen es den Erregern ermöglichen, die Immunantwort des Wirtes zu umgehen und welche Auswirkungen dies auf das Fortschreiten bzw. die Prognose der COPD hat, ist bisher nicht bekannt.

M. catarrhalis ist Oxidase- und DNase-positiv, kann Nitrat und Nitrit reduzieren und bildet auf Blutagar nicht hämolysierende, runde, grau-weiße Kolonien. Glukose, Maltose, Sucrose, Laktose und Fruktose können durch das Bakterium nicht verstoffwechselt werden (Singh et al. 1997). Die Identifizierung von *M. catarrhalis* gilt als eindeutig, wenn folgende Nachweise vorliegen: ein Positivtest für die Reduktion von Nitrat und Nitrit, für die Produktion von DNase und für die Trybutyryl-esterase (Verduin et al. 2002).

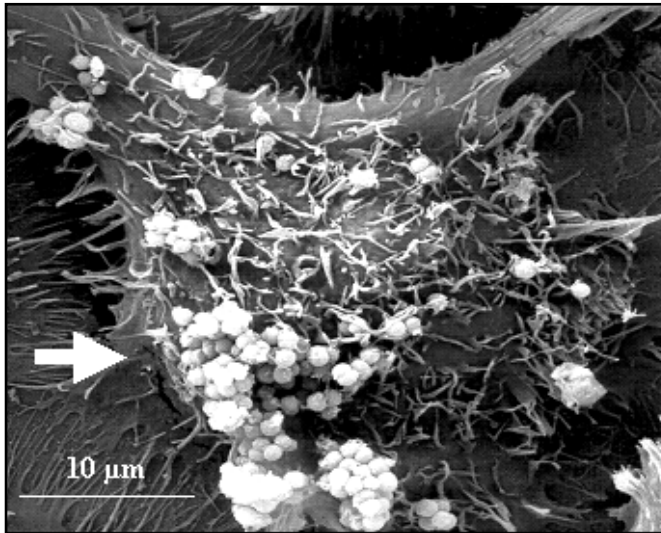


Abb. 2-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *M. catarrhalis*

Die Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Interaktion des *M. catarrhalis*-Stammes O35E mit Beas2B Zellen. Die adhärenierten Moraxellen bilden multizelluläre, traubenförmige Aggregate auf der Zelloberfläche. Die Abbildung stammt aus: Slevogt und Opitz, 2007.

2.2.2 Virulenzfaktoren

Zu den bisher bekannten Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis* gehören in erster Linie Oberflächenproteine (engl.: *outer membrane proteins*, OMPs), Transferrin und Laktoferrin bindende Rezeptoren, *Moraxella*-spezifische Lipooligosaccharide (LOS) und Peptidoglykan (PG). Einige Isolate exprimieren zusätzlich Pili auf der Zelloberfläche.

Am besten untersucht sind bisher die OMPs. Zu ihnen gehören acht Vertreter, benannt von A bis H, mit einem Molekulargewicht von 21 bis 98 kDa, das MID Protein (engl.: *Moraxella IgD binding protein*) sowie zwei etwas später entdeckte HMW-OMPs (engl.: *high molecular weight OMP*), die auch als UspA1 bzw. 2 (engl.: *ubiquitous surface protein A*) bezeichnet werden (Murphy, T.F. 1990; Klingmann and Murphy 1994). Diese beiden Oberflächenproteine sind von besonderem wissenschaftlichen Interesse, da sie sowohl eine humorale mukosale als auch eine systemische Immunantwort beim Menschen induzieren können (McMichael, J.C. 2000; Peng et al. 2005).

Das UspA1 hat ein Molekulargewicht von 120 kDa und ist ein Adhäsion, welches die Bindung des Bakteriums an die Epithelzellen ermöglicht (Lafontaine et al. 2000). Als spezifischer Bindungspartner für UspA1 wurden unter anderem humane CEACAM Rezeptoren beschrieben (Hill and Virji 2003). Weitere Adhärenz-vermittelnde Oberflächenstrukturen sind das UspA2H, ein dem UspA2 verwandtes OMP, LOS und das MID Protein (McMichael, J.C. 2000; Medzhitov and Janeway 2000).

Das UspA2 mit einem geringeren Molekulargewicht von 85 kDa wirkt durch seine Komplementresistenz gemeinsam mit dem LOS der unspezifischen Immunabwehr entgegen (Lafontaine et al. 2000).

Zellwandkomponenten wie Peptidoglykan und LOS Typ A, B und C spielen immunologisch eine wichtige Rolle. Sie stellen hochkonservierte molekulare Muster dar, welche von Rezeptoren der angeborenen Immunität erkannt werden (siehe Kapitel 2.3) (Keller et al. 1992; Hu et al. 2001).

Die Rezeptoren für Transferrin (engl.: *transferrin binding protein A/B*, TbpA/B) und Laktoferrin (engl.: *lactoferrin binding protein A/B*, LbpA/B) sichern die Eisenversorgung des Bakteriums für verschiedene metabolische Prozesse (Karalus and Campagnari 2000).

Bemerkenswert ist außerdem die rasche Entwicklung einer β -Laktam-Resistenz seit Beginn der 90er Jahre, die inzwischen über 95% der *M. catarrhalis*-Isolate aus Europa, den USA und Australien betrifft (Sethi et al. 2005; Verduin et al. 2002).

2.3 Die angeborene Immunabwehr (Innate Immunity)

Das menschliche Immunsystem lässt sich in zwei Untersysteme einteilen: eine angeborene und eine erworbene Immunabwehr. Die phylogenetisch ältere - die angeborene Immunität (engl.: *innate immunity*) - stellt die erste, schnell verfügbare jedoch zum Teil recht unspezifische Immunabwehr des Wirtes gegen eindringende Erreger dar. Diese zügig einsetzende Reaktion des Körpers auf die eindringenden Pathogene umfasst unter anderem die Zytokinsekretion, die Komplementaktivierung, die Phagozytoseaktivität (Janeway and Medzhitov 2002; Sabroe et al. 2002; Tosi, M.F. 2005) sowie die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden (Birchler et al. 2001; Medzhitov, R. 2001). Die Erkennung der Pathogene erfolgt durch eine limitierte Anzahl Keimbahn-kodierter Muster-erkennender Rezeptoren (engl.: *pattern recognition receptors*; PRRs), welche z.B. auf Gewebsmakrophagen, neutrophilen Granulozyten sowie Endothel- und Epithelzellen exprimiert werden.

2.3.1 Pattern recognition receptors (PRRs)

Ein wichtiger Mechanismus der angeborenen Immunität von vielzelligen Organismen besteht darin, die in der Evolution hoch konservierten Strukturen unterschiedlicher Mikroorganismen zu erkennen. Zu diesen Strukturen gehören unter anderem Bestandteile der Zellwand gram-negativer aber auch gram-positiver Bakterien wie z.B. Lipopeptide, Lipoproteine, Lipoteichonsäure oder Lipopolysaccharide (LPS) sowie bakterielle DNA und virale RNA. Diese chemisch sehr unterschiedlichen Strukturen haben mehrere Gemeinsamkeiten: sie werden von den Mikroben, nicht jedoch vom Wirt selbst, gebildet und sind essentiell für das Überleben der Erreger, so dass diese Muster nicht gewechselt werden können. Außerdem sind sie Bestandteil einer Vielzahl von Mikroorganismen (Janeway and Medzhitov 2002; Medzhitov, R. 2001; Janeway and Medzhitov 1998). Eine zentrale Rolle bei der Erkennung dieser Strukturen spielen die *pattern recognition receptors*, die funktionell in sezernierende, endozytierende und signaltransferierende Rezeptoren eingeteilt werden können (Medzhitov and Janeway 2000). Im Folgenden werden ausschließlich die signaltransferierenden PRRs näher betrachtet. Zu diesen gehören in erster Linie die membranständigen Toll-like Rezeptoren, welche die am besten untersuchten PRRs darstellen, sowie zytosolische Rezeptoren wie z.B. die Nod-Proteine (engl.: *nucleotide-binding oligomerization domain-proteins*). Nach Erkennung der Mikroorganismen durch die PRRs werden in aller Regel Signalkaskaden ausgelöst, die unter anderem zur Sekretion verschiedener Zytokine führen.

2.3.2 Zytokine, Chemokine, IL8

Zytokine sind extrazelluläre Signalproteine, die von verschiedenen Zelltypen gebildet werden und in die Zell-Zell-Interaktionen involviert sind. Die Einteilung erfolgt ihrer Funktion entsprechend in proinflammatorische Zytokine, T Zell-gebildete Zytokine, chemotaktische Zytokine (oder auch Chemokine), antiinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren (Chung, K.F. 2001).

Die Chemokine, eine Untergruppe der Zytokine mit bisher bereits über 40 bekannten Vertretern, spielen eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen. Sie unterstützen die Leukozytenmigration in entzündetes Gewebe und bedingen unter anderem die Aktivierung und zum Teil Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von Leukozyten sowie Endothel- und Epithelzellen (Imhof and Dunon 1997; Salmi and Jalkanen 2005).

Ein wichtiger Vertreter der Chemokine ist das Interleukin 8 (IL8). Neben dem MCP-1 (engl.: *monocyte chemoattractant protein 1*), einem weiteren Mitglied der Chemokine, besitzt IL8 die stärkste chemotaktische Wirkung und spielt eine zentrale Rolle bei der Migration von neutrophilen Granulozyten an den Infektionsort (Baggiolini, M. 1998; Huber et al. 1991). Die Expression und Sekretion von IL8 ist für eine Vielzahl von verschiedenen Zellen beschrieben (Hoffmann et al. 2002) und wird durch Zytokine wie Interleukin 1 β (IL1 β) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) (Baggiolini and Clark-Lewis 1992; Brasier et al. 1998; Mukaida et al. 1998), bakterielle Komponenten (Aihara et al. 1997), virale Produkte (Mastonarde et al. 1998; Murayama et al. 1997) sowie Zellstress (DeForge et al. 1993; Sonada et al. 1997) ausgelöst.

Es konnte gezeigt werden, dass auch eine Infektion humaner Bronchialepithelzellen mit *M. catarrhalis* zur Expression bzw. Sekretion von IL8 führt (Slevogt et al 2006).

2.4 Toll-like Rezeptoren

Toll wurde erstmalig 1985 als entscheidendes Gen für die dorsoventrale Achsenbildung in der Ontogenese der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben (Anderson et al. 1985; Hashimoto et al. 1988). Es kodiert für einen Typ 1 transmembranären Rezeptor mit einer leuzinreichen extrazellulären Domäne (engl.: *leucine rich repeats*, LRRs). Die intrazelluläre Domäne des Toll-Proteins weist Sequenzhomologien zu der zytoplasmatischen Domäne des IL1 Rezeptors auf und wurde daher Toll-/IL1 Rezeptor-Domäne (TIR) genannt (Gay and Keith 1991). Aufgrund dieser Ähnlichkeit wurde schon sehr zeitig eine immunologische Funktion von Toll vermutet, die in einer Untersuchung an *Drosophila*-Mutanten mit defektem Toll-Rezeptor bestätigt werden konnte (Lemaitre et al. 1996).

1997 entdeckte Medzhitov das erste humane Toll-Homolog, welches heute als Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) bekannt ist (Medzhitov et al. 1997). Schnell wurden weitere Proteine identifiziert, welche alle einheitliche Strukturen aufweisen (LRR-Domäne, Toll-Homologie-Domäne und TIR-Domäne) und somit als Gruppe der Toll-like Rezeptoren klassifiziert werden konnten (Röck et al 1998). Ligandenbindung an die TLR führt ebenso wie die Bindung von IL1 an den IL1 Rezeptor zur Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors- κ B (NF- κ B) und der MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-kinasen)-Kaskaden (Belvin and Anderson 1996; Takeda and Akira 2005), wodurch die Expression verschiedener Gene, die an immunologischen, inflammatorischen und apoptotischen Prozessen beteiligt sind, induziert wird.

2.4.1 Einteilung und Expression

Bis heute sind elf verschiedene TLR indentifiziert, von denen zehn im humanen System konserviert sind. Sie werden in Zellen der angeborenen (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen) und erworbenen Immunität (murierte dendritische Zellen) (Janssens and Beyaert 2003; Janeway and Medzhitov 2002) sowie in Endothel- und Epithelzellen in unterschiedlichen Ausprägungen und Mustern exprimiert (Takeda et al. 2003).

Dabei sind TLR1, 2, 4, 5, 6 und 10 an der Zellmembran und TLR3, 7, 8 und 9 intrazellulär am Endosom lokalisiert (Takeda and Akira 2005; Takeda et al. 2003; Akira et al. 2001).

2.4.2 Funktion

Die Toll-like Rezeptoren dienen der schnellen Erkennung eindringender Pathogene und der Induktion erster Abwehrmechanismen. Sie erkennen hoch konservierte Motive von

Pathogenen (engl.: *pathogen associated molecular pattern*, PAMP). Dem TLR-System kommt damit eine wichtige Rolle in der Unterscheidung von körperfremden und körpereigenen Stoffen zu (Janeway and Medzhitov 2002). Diese Unterscheidung ist jedoch nicht vollständig, da von einigen TLR auch endogene Liganden wie z.B. Hitzeschockproteine oder synthetische Substanzen wie Imidazoquinoline erkannt werden (Ohashi et al. 2000). Völlig ungeklärt ist außerdem wie eine Unterscheidung von Pathogenen und ebenfalls PAMP tragenden Kommensalen möglich ist, denn nur eine Bindung von pathogenen Erregern scheint eine TLR-vermittelte Aktivierung von entsprechenden Entzündungskaskaden hervorzurufen.

Allen TLR ist gemeinsam, dass sie für die Signaltransduktion Homo- oder wie im Fall von TLR2 Heterodimere mit anderen TLR bilden können, wodurch vermutlich die Ligandenspezifität der Rezeptoren erhöht wird (Beutler, B. 2004).

Die wichtigsten Liganden der humanen TLRs sind in der folgenden Abbildung zusammengestellt.

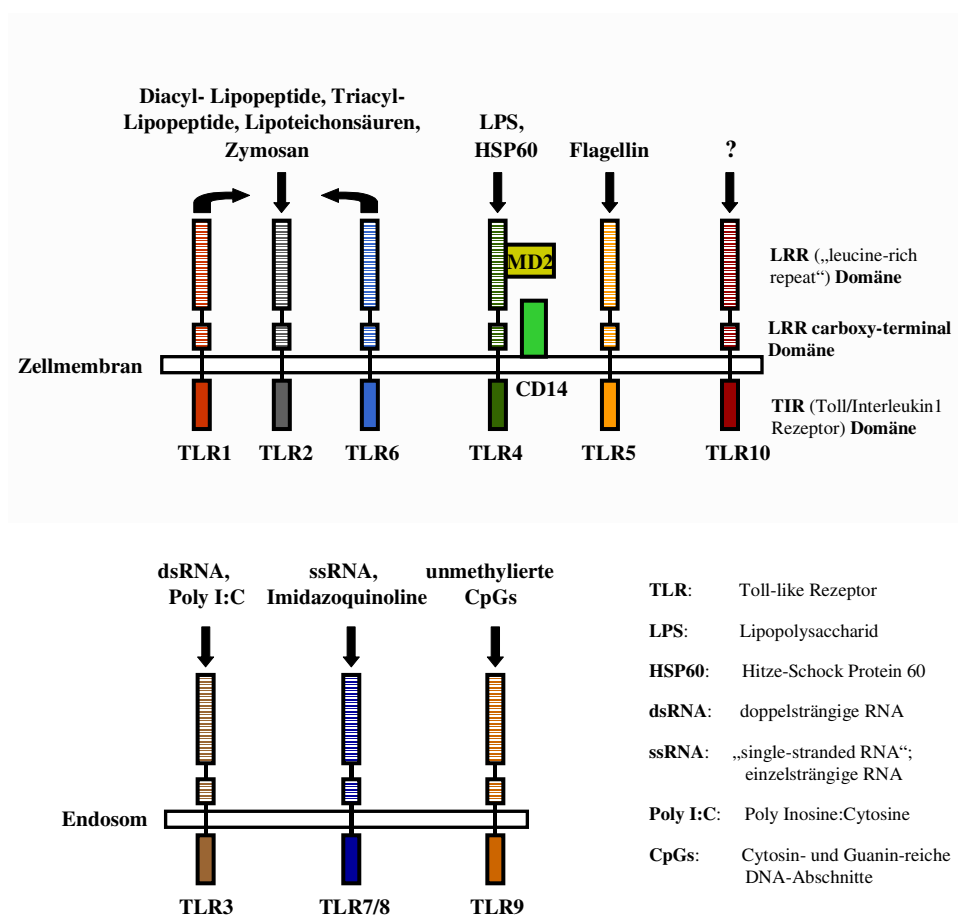


Abb. 2-2: Toll-like Rezeptoren und ihre wichtigsten Liganden

Die Darstellung zeigt die bis jetzt identifizierten humanen Toll-like Rezeptoren, ihren allgemeinen strukturellen Aufbau und ihre wichtigsten Liganden. Die Abbildung wurde modifiziert nach: Takeda and Akira, 2005.

2.5 CEACAM Rezeptoren

Mitte der 70er Jahre entdeckten Gold und Freedman das Carcinoembryonic Antigen (CEA) in humanen Kolonkarzinomzellen. Es wurde zum namensgebenden Mitglied der CEA-Familie, einer Unterfamilie der Immunglobulin-Superfamilie. Die Benennung des CEA resultiert aus der Erstbeschreibung dieses Proteins als ein onkofetales Antigen: exprimiert im Embryo, nicht vorhanden in gesunden Erwachsenen und wieder auftauchend in Tumoren (Gold and Freedman 1965). Trotzdem neuere Untersuchungen gezeigt haben, dass sich auch im gesunden Organismus CEA findet, dient es weiterhin als allgemein akzeptierter Tumormarker für postoperative Verlaufskontrollen bei Kolorektal-, Bronchial- und Mammakarzinomen. Abgespaltenes CEA kann über Lymph- und Blutgefäße vom Gewebe in die Blutbahn gelangen, wo seine Serumkonzentration gut mit der Größe des Tumors korreliert (Graham et al. 1998; Carriquiry and Pineyro 1999).

Im Laufe der Zeit wurden weitere verwandte Moleküle identifiziert, so dass die CEA-Familie heute mindestens 29 verschiedene Gene bzw. Pseudogene enthält (Olsen et al. 1994; Beauchemin et al. 1999). Bisher wurden einzelne dieser Gene in verschiedensten Spezies gefunden. Am besten untersucht sind jedoch die Mitglieder der CEA-Familie von Mensch, Maus und Ratte (Zhou and Hammarström 2001; Zhou, G.Q. 2001).

Entsprechend der Sequenzhomologien wurde die CEA-Genfamilie in drei Untergruppen eingeteilt: die PSG- (engl.: *pregnancy-specific glycoprotein*), die CEACAM- (engl.: *CEA-related cell adhesion molecule*) Untergruppe und eine Gruppe von einigen Pseudogenen, für die bisher noch keine cDNA identifiziert werden konnte .

Die PSGs werden vor allem in der Plazenta während der Schwangerschaft exprimiert. Ihre Funktion besteht wahrscheinlich in der Regulation und Aufrechterhaltung des privilegierten Immunstatus der Plazenta während der Schwangerschaft (Wessells et al. 2000).

Die immunglobulinverwandten Proteine der CEACAM-Unterfamilie, die sich durch ihre posttranslationalen Modifikationen und die verschiedenen Splicingvarianten ihrer Gene unterscheiden, sind in erster Linie Zelladhäsionsmoleküle mit jedoch vielfältigen weiteren Funktionen (Beauchemin et al. 1999).

2.5.1 Einteilung und Struktur

Seit längerer Zeit sind sieben humane Vertreter der CEACAM-Gruppe bekannt: das bilare Glykoprotein (CEACAM1), das unspezifisch kreuzreagierende Antigen (CEACAM6), das Produkt des CEACAM5 Gens (CEA) sowie die CEA-Genmitglieder CEACAM3, 4, 7, 8 (Öbrink, B. 1997).

Alle Mitglieder weisen eine gemeinsame Domänenstruktur auf: einem N-terminalen Signalpeptid folgt stets eine IgV-Domäne sowie eine variable Anzahl von null bis sechs IgC-Domänen. Ein Transmembransegment sowie ein ebenfalls variabler zytoplasmatischer Teil bilden bei CEACAM1, 3 und 4 den C-Terminus. CEA, CEACAM6, 7 und 8 besitzen keine zytoplasmatische Domäne sondern sind über Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) in der Zellmembran verankert (Olsen et al. 1994; Hammarström, S. 1999).

Die Vielfalt der CEA-Familie wird auf Ebene der Proteine durch alternatives Splicen der entsprechenden Gene weiter erhöht. So sind bislang zwölf verschiedene Isoformen des humanen CEACAM1 bekannt, die sich in der Anzahl der Ig-Domänen sowie in der Ausprägung des zytoplasmatischen Anteils unterscheiden (Barnett et al. 1993).

Dieser zytoplasmatische Anteil kann jeweils in einer kurzen (short) Form und in einer langen (long) Form vorliegen, wobei die long-Form des CEACAM1 mindestens eine ITIM-Domäne (engl.: *immunoreceptor thyrosin-based inhibition motif*) die long-Form des CEACAM3 dagegen eine ITAM-Domäne (engl.: *immunoreceptor thyrosin-based activation motif*) trägt.

Zimmermann et al. entdeckten in den letzten Jahren weitere Mitglieder der humanen CEA-Familie: CEACAM 16, 18, 19, 20 und 21 (Zimmermann, W. CEA-homepage). Es ist anzunehmen, dass auch in den nächsten Jahren noch weitere Mitglieder der Proteinfamilie identifiziert werden.

Die Funktionen und Expressionsmuster dieser Rezeptoren sind bisher jedoch kaum untersucht, denn die Aufklärung der Funktion der einzelnen Mitglieder wird durch die Vielzahl, Variabilität und Komplexität der Rezeptorfamilie erschwert.

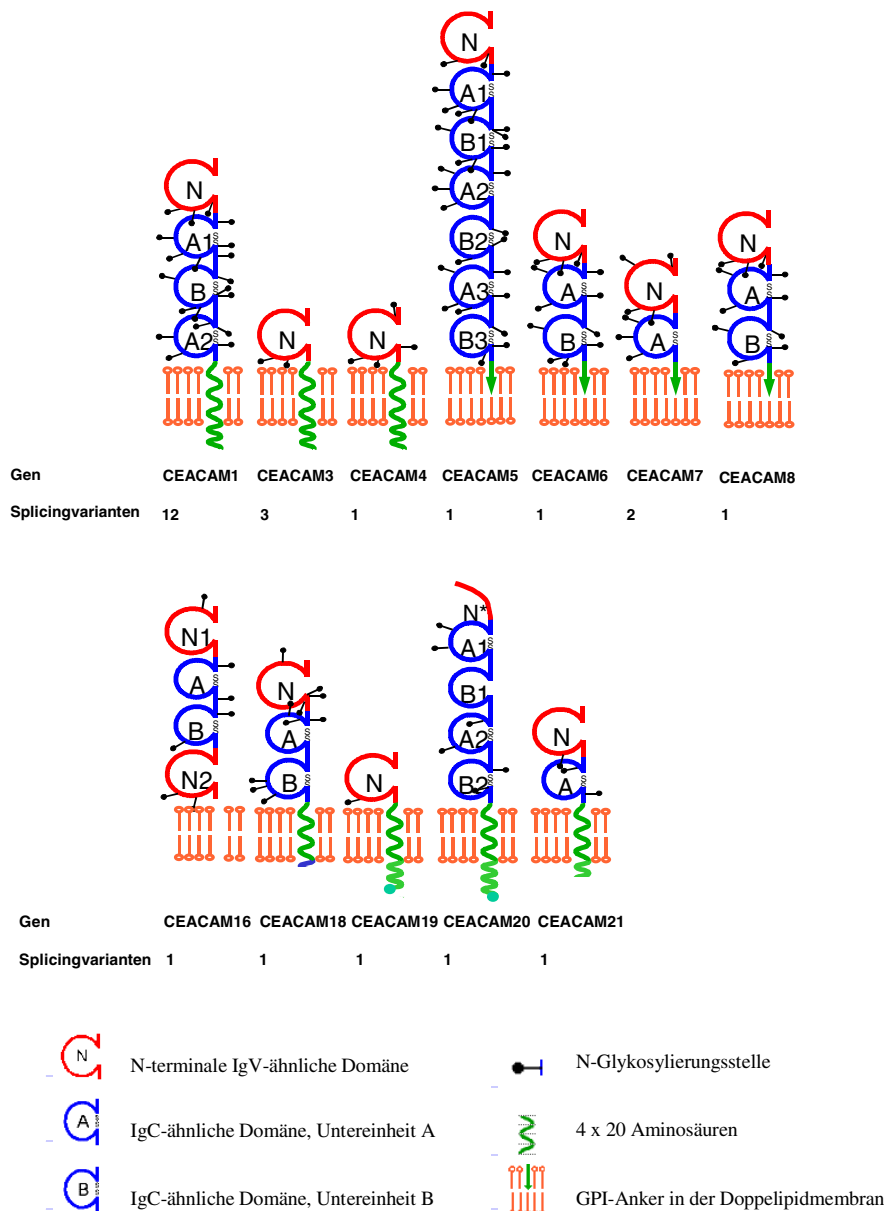


Abb. 2-3: Die CEACAM Gruppe der humanen CEA-Familie

Die Darstellung zeigt den allgemeinen strukturellen Aufbau der zur Zeit identifizierten humanen CEACAM Rezeptoren. Die Abbildung wurde modifiziert nach Beauchemin et al. 1999; Zimmermann, W. CEA-homepage.

Eine weitere Besonderheit der CEACAM-Proteine stellt deren große Anzahl von N-Glykosylierungsstellen dar. Die Glykosylierung variiert je nach Expressionsort erheblich und kann über 50 Prozent des Molekulargewichtes betragen. So bewirkt die heterogene Glykosylierung von CEACAM1 in der SDS-Page ein apparentes Molekulargewicht von bis zu 180 kDa, wobei das Molekulargewicht des Proteingerüsts der langen Isoform nur 48 kDa beträgt (Becker et al. 1993).

2.5.2 Expression und Funktion

Von allen CEACAM Rezeptoren ist CEACAM1 am weitesten im Organismus verbreitet. Es kann auf verschiedensten Epithelzellen, auf Gefäßendothel sowie auf Leukozyten nachgewiesen werden. Die Expression ist in Leber und Bürstensaum des Gastrointestinaltraktes am stärksten (Odin and Öbrink 1987; Odin and Öbrink 1988; Becker et al. 1989; Mowery and Hixson 1991; Godfraind et al. 1995; Prall et al. 1996). Eine ähnlich weite Verbreitung ist nur bei CEACAM6 zu finden (Kodera et al. 1993; Metze et al. 1996; Schölzel et al. 2000). Weitere auf Epithelzellen besonders des Gastrointestinaltraktes aber auch des Nasopharynx und der Lunge exprimierte Vertreter der CEACAM-Familie sind CEA und CEACAM7 (Thompson, J. A. 1995).

Zwar dienen CEACAM1, CEA, und CEACAM6 immer wieder als unspezifische Tumormarker für verschiedene maligne Tumore, darunter Kolon-, Mamma- und Lungenkarzinome, über ihre Expression auf gesundem Gewebe ist jedoch zum Teil noch sehr wenig bekannt (Thompson 1994; Kim et al. 1992; Shi et al. 1994). Auch die Expressionsmuster der anderen CEACAM Rezeptoren sind bisher nicht systematisch untersucht worden.

	Epithel	Endothel	sonstiges
CEACAM1	Ösophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon, Pankreas, Leber, Gallenblase, Prostata, Urogenitaltrakt, Schweiß- und Talgdrüsen	√	Hämatopoetische Zellen, Granulozyten, Leukozyten (B- und T-Lymphozyten, Monozyten), Thrombozyten, dendritische Zellen
CEACAM3	-	-	Granulozyten
CEA	Kolon, Magen, Zunge Ösophagus, Prostata, Urogenitaltrakt Schweißdrüsen, Nasopharynx, Lunge	√	-
CEACAM6	verschiedene Organe, Ähnlich wie CEACAM1	?	Granulozyten, Monozyten
CEACAM7	Kolon	-	-
CEACAM8	-	-	Granulozyten
CEACAM4, 16, 18, 20, 21	?	?	?

Tab. 2-1: Expression der verschiedenen humanen CEACAM Rezeptoren

Die Tabelle zeigt die bisher in der Literatur beschriebenen Expressionsorte der CEACAM Rezeptoren. Grundlage für die Zusammenstellung der Informationen waren folgende Veröffentlichungen: Hanenberg et al. 1994; Fängsmyr et al. 1995; Prall et al. 1996; Kammerer et al. 1998; Kammerer et al. 2001; Kodera et al. 1993; Metze et al. 1996; Schölzel et al. 2000; Majuri et al. 1994; Odin and Öbrink 1987; Odin and Öbrink 1988; Becker et al. 1989; Mowery and Hixson 1991; Godfraind et al. 1995; Thompson, J. A. 1995; Hammarström, S. 1999.

Die Funktionen der verschiedenen Vertreter der CEACAM-Familie sind sehr vielfältig. In erster Linie handelt es sich um Adhäsionsmoleküle (Ocklind and Öbrink 1982; Rojas et al. 1990), die durch homo- oder heterophile Bindung sowie durch Interaktion mit dem Zytoskelett den Zell-Zell-Kontakt vermitteln. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung, in der Angiogenese, der Zellproliferation und -differenzierung, der Tumorgenese, für den Insulinstoffwechsel und für die angeborene und erworbene Immunität (Öbrink, B. 1997; Hammarström, S. 1999; Zimmermann, W. 2002).

Verschiedene Mitglieder der CEA-Familie, vor allem das CEACAM1, sind als zelluläre Rezeptoren für unterschiedliche Pathogene identifiziert worden. CEACAMs sind in polarisierten Epithelien vor allem auf der apikalen Seite der Zellen lokalisiert und damit für die auf Schleimhäuten vorkommenden Bakterien leicht zugänglich (Hammarström, S. 1999). Alle im Folgenden beschriebenen Interaktionen finden mit der sterisch gut erreichbaren N-terminalen IgV-Domäne der CEACAM Rezeptoren statt. Die restlichen Teile des Rezeptorproteins sind aufgrund der starken Glykosylierung als Bindungsstellen weniger gut geeignet.

Die humanpathogenen gramnegativen Bakterien *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoe* besiedeln vor allem die Schleimhäute des Urogenitaltraktes. Hierzu sind sie durch die Expression verschiedener Adhäsine in der Lage, unter ihnen die Gruppe der Opa (engl.: *opacity-associated*) Proteine. Einige der Opa Proteine z.B. das Opa₅₂ binden an CEACAM1, was die Bakterien zur Adhäsion und zum Einschleusen in epi- und endotheliale Zellen befähigt, aber auch die opsonierungsunabhängige Phagozytose durch Granulozyten ermöglicht (Virji et al. 1996; Gray-Owen et al. 1997; Wang et al. 1998). Darüber hinaus binden verschiedene Stämme von *Haemophilus influenzae* an CEACAM1. Das hierbei interagierende Molekül ist das phasenvariable Oberflächenprotein P5 (Virji et al. 2000; Hill et al. 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch das Oberflächenprotein UspA1 von *M. catarrhalis* an CEACAM1 sowie die Typ 1 Fimbrien von *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* an CEACAM1, CEA und CEACAM6 binden können (Hill and Virji 2003; Virji et al. 2000; Leusch et al. 1990, 1991a,b; Sauter et al. 1991). Ein nicht bakterielles Pathogen, das in der Maus ebenfalls CEACAM1 für den Eintritt in die Wirtszelle nutzt, ist das murine Hepatitisvirus (MHV) aus der Gruppe der Coronaviren. Hier erfolgt die Bindung an CEACAM1 über das spike-Glykoprotein des Virus (Dveksler et al. 1993a).

Interessanterweise sind CEACAM Rezeptoren auch an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt. Beispielsweise führte die Aktivierung von CEACAM1 durch *Neisseria gonorrhoea* zu einer Verminderung der Aktivierung und Proliferation von CD4 T-Lymphozyten (Boulten

and Gray-Owen 2002). Ebenso wurde CEACAM1 als inhibitorischer Korezeptor des T Zell-Rezeptors beschrieben (Nagaishi et al. 2006).

2.6 Signaltransduktion

Signaltransduktionskaskaden dienen unter anderem der Fortleitung von Signalen von der Zellmembran in den Zellkern. Diese klassische Signaltransduktion beginnt mit der Erkennung eines Signals durch spezifische Rezeptoren. Die darauf folgende intrazelluläre Signalübermittlung erfolgt via Kinasen-Kaskaden und mündet in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche an die DNA binden und die Expression verschiedener Proteine z.B. von Adhäsionsmolekülen, Rezeptoren, Enzymen oder Zytokinen initiieren. Die Signaltransduktion der Zelladhäsionsmoleküle und anderer Rezeptorproteine findet unter anderem durch folgenden Mechanismus statt: eine reversible Proteinphosphorylierung der Rezeptoren und deren anschließende Interaktion mit zytoplasmatischen Signalproteinen (Hunter, T. 2000). Die Proteinphosphorylierung wird durch die Familie der Proteinkinasen bewirkt. Diese Enzyme können die terminale Phosphatgruppe aus dem ATP auf die Hydroxyl-Seitenketten der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin übertragen. Die Hydrolyse dieser Bindung und die Freisetzung des Phosphates wird durch Proteinphosphatasen katalysiert. Beide Enzymklassen können, basierend auf ihrer katalytischen Spezifität, in Serin/Threonin- und Tyrosin-spezifische Gruppen unterteilt werden. Die Auswirkungen der Proteinphosphorylierungen sind vielfältig. Schon lange ist bekannt, dass Enzymaktivitäten durch Phosphorylierung beeinflusst werden (Krebs and Beavo 1979).

Darüber hinaus wird durch Phosphorylierung auch die Interaktion von Proteinen reguliert. Ein wesentlicher Schritt zur Aktivierung vieler Signaltransduktionskaskaden besteht in der Rekrutierung zytoplasmatischer Proteine an die Membran durch die Bindung an phosphorylierte Rezeptoren. An der Membran können diese Proteine ihrerseits phosphoryliert werden oder selbst auf andere membrangebundene Ziele wirken (Hunter, T. 2000).

2.6.1 Die CEACAM1-Signalkaskade

Zur Aktivierung einer Signalkaskade nach Bindung eines Liganden muss CEACAM1 in der Lage sein, Signale zu empfangen, zu modulieren und weiterzuleiten. Der zyttoplasmatische Anteil des CEACAM1 Rezeptors enthält mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen. Im CEACAM1-S liegt nur das Serin 449 in einer Konsensussequenz für die Proteinkinase C (PKC) vor (Edlund et al. 1998); CEACAM1-L hingegen besitzt mehrere Serin- und Threoninreste, die phosphoryliert werden können. Zusätzlich weist CEACAM1-L zwei Tyrosine auf. Das membrannaher Tyrosin 459 liegt in einer ITIM-Domäne. Außerhalb dieses ITIMs liegt das Tyrosin 486. ITIMs und ITAMs werden in einer Vielzahl von Membranrezeptoren gefunden, wie z.B. dem T- und B Zell-Rezeptor, Fc γ RIIB, CD22 und Interleukinrezeptoren. Nach ihrer Phosphorylierung binden ITIMs und ITAMs Proteinkinasen bzw. -phosphatasen, deren Aktivierung zur Stimulation oder Termination von Signalwegen führt (Daeron et al. 1995; Burshtyn et al. 1997; Öbrink, B. 1997). Das Tyrosin 459 des CEACAM1 Rezeptors wird durch die Tyrosinkinase des Insulinrezeptors und die Kinasen der src-Familie, C-src, lyn und hck phosphoryliert (Margolius et al. 1990; Brummer et al. 1995; Skubitz et al. 1995). Daten über die Phosphorylierung des Tyrosin 486 liegen bisher nicht vor.

Nach seiner Tyrosinphosphorylierung kann CEACAM1 eine Reihe von Substraten binden. Hier sind vor allem die Proteinkinasen c-src, lyn und hck und die Proteinphosphatasen SHP1 und SHP2 zu nennen (Brummer et al. 1995; Skubitz et al. 1995; Beauchemin et al. 1997; Huber et al. 1999).

Die funktionelle Bedeutung der Tyrosinreste in der zyttoplasmatischen Domäne des CEACAM1 wurde in mehreren Studien untersucht und obwohl die Bedeutung dieser Phosphorylierung für verschiedene Funktionen wie z.B. den inhibitorischen Effekt des CEACAM1 auf die Stimulation der Zellproliferation durch Insulin (Poy et al. 2002a) klar gezeigt werden konnte, ist ihre Regulation zum Teil nicht vollständig geklärt.

2.6.2 Die TLR2-Signalkaskade

Die Ligandenbindung an Toll-like Rezeptoren erfolgt über ihre extrazelluläre leucinreiche Domäne (engl.: *leucine-rich-repeat*; LRR) und führt nach entsprechender Signalweiterleitung unter anderem über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zur Expression verschiedener Gene, die an immunologischen, inflammatorischen und apoptotischen Prozessen beteiligt sind.

Die Signalweiterleitung erfolgt über zwei voneinander unabhängige Kaskaden: eine MyD88-abhängige und eine PI3 Kinase-abhängige Signalkaskade. Beide Wege werden im Folgenden kurz dargestellt, wobei die PI3 Kinase-abhängige Kaskade für die vorliegende Arbeit die wesentliche Rolle spielt.

2.6.2.1 Der MyD88-abhängige Signalweg

Die Bindung eines Liganden an den Toll-like Rezeptor 2 induziert die Rekrutierung der intrazellulären TIR (Toll-/IL1 Rezeptor)-Domäne an eine homologe Domäne in dem TLR2-Adaptermolekül MyD88 (engl.: *myeloid differentiation factor 88*). Im Anschluss folgt eine Aktivierung der IRAK (engl.: *interleukin receptor-associated kinase*), welche wiederum an ihr Adaptermolekül TRAF6 (engl.: *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*) bindet. Über ein weiteres Adapterprotein TAB (engl.: *TAK1-binding protein*) kommt es zur Aktivierung der TAK (engl.: *transforming growth factor β activating kinase*), einer MAPKKK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase). TAK aktiviert dann sowohl die MAPK-Kaskade, als auch die I κ B-Kinase (IKK), worüber der kanonische NF- κ B-Weg aktiviert wird (Aderem and Ulevitch, 2000; Ninomiya-Tsuji et al., 1999; Takeda et al., 2003; Takeda and Akira, 2005).

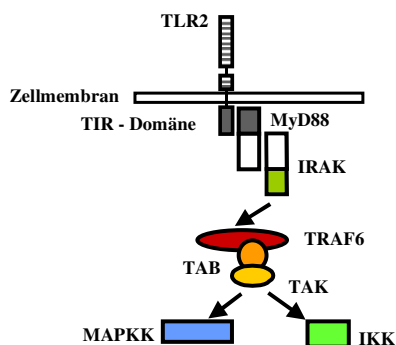


Abb. 2-4: MyD88-abhängige TLR2-Signalkaskade

Durch die Bindung eines Liganden an den TLR2 mit seiner intrazellulär gelegenen TIR-Domäne (Toll-/IL1 Rezeptor-Domäne) kommt es mit Hilfe von Adaptermolekülen (MyD88, *myeloid differentiation factor 88*; TRAF, *tumor necrosis factor receptor-associated factor*; TAB, *TAK1-binding protein*) zur Aktivierung von Kinasen (IRAK, *interleukin receptor-associated kinase*; TRAF, *tumor necrosis factor receptor-associated factor*; TAK, *transforming growth factor β activating kinase*), was in der Induktion zweier Signalwege, des kanonischen NF- κ B-Wegs durch IKK (I κ B-Kinase) und der MAP-Kinasen-Kaskaden durch MAPKKK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase) führt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Aderem and Ulevitch, 2000; Takeda and Akira, 2005.

2.6.2.2 Der PI3 Kinase-abhängige Signalweg

Die Phosphoinositid-3 Kinase (PI3K) ist ein Heterodimer, bestehend aus einer regulatorischen p85-Untereinheit und einer katalytischen p110-Untereinheit, welches konstitutiv in den meisten menschlichen Zellen exprimiert wird. Die TLR2-induzierte Signalkaskade über die PI3K verläuft MyD88-unabhängig (Arbibe et al. 2000). Es wurde gezeigt, dass die direkte Interaktion der p85-Untereinheit der PI3K mit TLR2 für die Aktivierung von NF- κ B von wesentlicher Bedeutung ist (Arbibe et al. 2000; Chun and Prince 2006; Ruse and Knaus 2006).

Ligandenbindung an TLR2 führt zu dessen Aktivierung, was eine Phosphorylierung der p85-Untereinheit der PI3K zur Folge hat. Diese Phosphorylierung dient der Aktivierung der PI3K und mit Hilfe der p110-Untereinheit wird die Serin/Threoninkinase Akt aktiviert, was im weiteren Verlauf in einer NF- κ B-Freisetzung mündet (Arbibe et al. 2000).

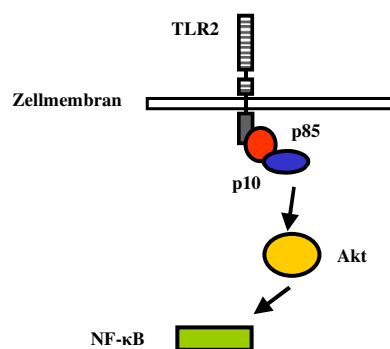


Abb. 2-5: PI3 Kinase-abhängige TLR2-Signalkaskade

Ligandenbindung und somit Aktivierung von TLR2 führt zur Aktivierung der PI3 Kinase über Phosphorylierung ihrer regulatorischen Untereinheit p85. Mit Hilfe der katalytischen Untereinheit p110 wird anschließend die Serin/Threoninkinase Akt aktiviert. Die Abbildung wurde modifiziert nach Arbibe et al. 2000.

2.6.2.3 Korezeptoren von TLR2

Die Signalkaskade von TLR2 ist bereits gut untersucht. Welchen Einflüssen jedoch ihre Regulation unterliegt ist zum Teil noch unklar. Underhill stellte fest, dass die gleichzeitige Ligation des Dektin1 Rezeptors mit beta-1,3 Glykanen von Pilzen eine signifikante Steigerung der TLR2-vermittelten Zytokinproduktion zur Folge hat. Er führt dies auf den aktivierenden Einfluss der ITAM-ähnlichen Domäne des Dektin1 Rezeptors zurück und konnte eine Abhängigkeit zu deren Phosphorylierung nachweisen (Underhill, D.M. 2007). Außerdem wurde vor kurzem in Mausfibroblasten gezeigt, dass dort die Bindung von *Staphylococcus aureus* an einen ITIM tragenden Ig-like Rezeptor zur Hemmung der TLR2-vermittelten Zytokinfreisetzung führt (Nakayama et al. 2007). Wie diese Interaktionen jedoch genau ablaufen, konnte bisher nicht geklärt werden.

Bisher ist von verschiedenen Korezeptoren bekannt, dass sie ihre hemmenden oder aktivierenden Wirkungen durch Kolo-kalisation mit den entsprechenden Rezeptoren erzielen. Dabei bringen sie z.B. die Rezeptor-assoziierten Tyrosinphosphatasen SHP1 und SHP2 in räumliche Nähe zu ihren Substraten, welche dann durch Dephosphorylierung von Phosphotyrosinresten Einfluss auf deren Signalkaskaden nehmen können. In diesem Zusammenhang wurde z.B. der FcRIIB Rezeptor beschrieben, der durch Antigen-Antikörperkomplexe mit dem B Zell-Rezeptor koaggregiert und dann inhibitorisch wirkt (Coggeshall, K.M. 1998).

Für TLR2 konnte in der Vergangenheit bereits eine Heterodimerisierung mit den Toll-like Rezeptoren 1 und 6 gezeigt werden. Weder TLR1 noch TLR6 wurden bisher als singular aktiv Rezeptoren beschrieben, jedoch erkennen TLR2/TLR1-Heterodimere diacetylierte Lipopeptide (Takeuchi et al. 2002) während TLR2/TLR6-Heterodimere triacetylierte Lipopeptide erfassen (Takeda et al. 2003). In Überexpressionsversuchen konnte gezeigt werden, dass TLR2 und TLR1 im Gegensatz zu TLR2 und TLR6 nach Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae* die TLR2-vermittelte NF-κB-Freisetzung synergistisch verstärken (Schmeck et al. 2006).

All diese Ergebnisse führen zu der Frage, ob eventuell auch CEACAM1 in der Lage ist, über seine ITIM-Domäne einen hemmenden Einfluss auf die TLR2-vermittelte NF-κB-Freisetzung auszuüben. Interessanterweise konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass die in der CEACAM1-Signalkaskade bedeutsame Proteinphosphatase SHP1 unterschiedliche negative PI3K-abhängige Rückkopplungsmechanismen initiiert: so hemmt sie unter anderem die PI3K-abhängige Signalkaskade des T Zell-, des Somatostatin- und des Insulinrezeptors (Nagaishi et al. 2006; Bousquet et al. 2006; Dubois et al. 2006). Ob CEACAM1 tatsächlich

als eine Art Korezeptor von TLR2 fungiert und durch welche Mechanismen diese mögliche Funktion vermittelt wird, soll in der folgenden Arbeit geklärt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien und Zellkultur

3.1.1.1 Primäre Bronchialepithelzellen

Die primären Bronchialepithelzellen wurden von gesunden Spendern mittels Bronchialbürstenprobe in der Klinik für Infektiologie m. S. Pneumologie, Charité Berlin im Rahmen einer bronchoskopischen Untersuchung gewonnen und in Zellkulturgefäßen angezüchtet. Sie wurden in der ersten bis dritten Passage eingesetzt. Alle Personen haben vorher schriftlich ihre Einwilligung zu der Untersuchung und der Materialgewinnung gegeben. Die Studie ist von der Ethikkommission der Charité genehmigt worden.

3.1.1.2 Alveolarzellkarzinom-Zelllinie (A549)

Die A549 Zellen wurden von der American Type Culture Collection™ ATCC, Rockville, USA bezogen. Es handelt sich um Zellen, die ursprünglich aus einem Lungenadenokarzinom isoliert wurden und Eigenschaften von Alveolarepithelzellen des Typs II besitzen (Lieber et al. 1976). Für die Versuche wurden Zellen in den Passagen 10 bis 35 verwendet.

3.1.1.3 Humane embryonale Nierenepithelzelllinie (HEK 293)

Die HEK293 Zellen wurden bei der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (Braunschweig) erworben und sind eine permanente Linie primärer humaner embryonaler Nierenzellen (HEK; Nummer: ACC 305; Kennzeichnung: 293). Die Zellen sind mit Adenovirus Typ 5 DNA transformiert (Graham et al. 1977). Sie wurden zwischen Passage 10 und 30 eingesetzt.

3.1.1.4 Humane Bronchialepithelzelllinie (Beas2B)

Die humane Bronchialepithelzelllinie Beas2B wurde uns freundlicherweise von C. Harris, NIH, Bethesda, MD zur Verfügung gestellt. Die Ursprungszellen wurden durch Biopsie einer gesunden Spenderlunge entnommen und durch Transfektion mit einem Adenovirus hybrid 12-SV40 (Ad12SV40) immortalisiert (Reddel et al. 1988). Ohne Zugabe von Serum bleiben die Beas2B Zellen undifferenziert. Sie wurden zwischen Passage 7 und 25 eingesetzt.

3.1.1.5 Medien für Zellkultur und Kryokonservierung

Primäre Bronchialepithelzellen	Zusammensetzung	Hersteller
Stimulationsmedium		
Bronchialepithelzell-Basalmedium (BEGM)	500 ml	Clonetics, Cambrex
Epidermal growth factor	0,5 ng/ml	Clonetics, Cambrex
Insulin	5 µg/ml	Clonetics, Cambrex
Transferrin	10 µg/ml	Clonetics, Cambrex
Epinephrin	0,5 µg/ml	Clonetics, Cambrex
Tri-Jodthyronin	6,5 ng/ml	Clonetics, Cambrex
Bovine pituitary extract	52 µg/ml	Clonetics, Cambrex
All trans Retinolsäure	0,1 ng/ml	Clonetics, Cambrex
Zellkulturmedium		
Gentamycin	50 µg/ml	Clonetics, Cambrex
Amphotericin B	50 ng/ml	Clonetics, Cambrex
Nystatin	20 µl	Sigma
Cyprofloxacin	10 µl	Sigma
BEGM-Stimulationsmedium ad	100 ml	
Adhäsionsflüssigkeit		
Kollagen	400 µl	Vitrogen100
Essigsäure	31,6 ml	Merck

Tab. 3-1: Kultur- und Stimulationsmedien der primären Bronchialepithelzellen

A549 Zellen	Zusammensetzung	Hersteller
Stimulationsmedium		
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	500,00 ml	Gibco
Zellkulturmedium		
Dulbeccos Modified Eagle Medium	500,00 ml	Gibco
FCS*	10,00 %	Gibco
Kryokonservierungsmedium		
FCS*	10,00 %	Gibco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10,00 %	Sigma
Dulbeccos Modified Eagle Medium		Gibco

Tab. 3-2: Kultur- und Stimulationsmedien der A549 Zellen

HEK293 Zellen	Zusammensetzung	Hersteller
Stimulationsmedium		
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	500,00 ml	Gibco
Zellkulturmedium		
Dulbeccos Modified Eagle Medium	500,00 ml	Gibco
FCS*	10,00 %	Sigma
Glutamin (200 mM, 100 x)	5,00 ml	Gibco
Kryokonservierungsmedium		
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10,00 %	Sigma
Zellkulturmedium		

Tab. 3-3: Kultur- und Stimulationsmedien der HEK293 Zellen

*Das für das Zellkulturmedium verwendete FCS wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren für eine Dauer von 30 min auf 56 °C erhitzt.

Beas2B Zellen	Zusammensetzung	Hersteller
Zellkultur- und Stimulationsmedium		
Keratinocyte SFM	500,00 ml	Gibco
Epithelial Growth Factor	2,50 µg	Gibco
Bovine pituitary extract	25,00 mg	Gibco
Glutamin (200 mM, 100 x)	5,00 ml	Gibco
Epinephrin-Hydrochlorid (1 mg/ml)	250,00 µl	Sigma
All trans Retinolsäure (1 mg/ml)	50,00 µl	Sigma
Adhäsionsflüssigkeit		
Keratinocyte SFM	100,00 ml	Gibco
Bovines Serumalbumin (BSA) (100 mg/ml)	1,00 ml	Sigma
Fibronectin (1 mg/ml)	1,00 ml	Sigma
Vitronectin (50 µg/ml)	0,10 ml	Sigma
Kryokonservierungsmedium		
Keratinocyte SFM	10,00 ml	Gibco
Polyvinylpyrolidon (PVP)	1,00 %	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	7,50 %	Sigma

Tab. 3-4: Kultur- und Stimulationsmedien der Beas2B Zellen

3.1.2 Bakterienkultur

3.1.2.1 *Moraxella catarrhalis* Stämme *O35E*, *O35E.1*

Der Wildtypstamm *O35E* (Serotyp A) sowie die Ubiquitous surface protein A1 (UspA1) defiziente Mutante *O35E.1* wurden freundlicherweise von Eric Hansen, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas Texas, USA zur Verfügung gestellt.

3.1.2.2 *Escherichia coli* (OpA B, OpA J)

Für die Aufreinigung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurde der kompetente *E. coli* Stamm *DH5 α* TM (Invitrogen) eingesetzt.

Die für die Stimulation der Zellen verwendeten *E. coli* wurden uns freundlicherweise von Peter van der Ley (Laboratory of Vaccine Research, National Institute of Public Health and Environment, RIVM Bilthoven, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um den *E. coli* Stamm *CE1265*. In diesen wurde ein pMR5 Plasmid mit den *Neisseria meningitidis*-H44/76-Oberflächenproteinen Opa B128 bzw. Opa J129 codierenden Sequenzen transformiert und die Mutanten durch ihre zusätzlich erworbene Chloramphenicolresistenz selektiert.

3.1.2.3 Medien für die Bakterienkultur

<i>M. catarrhalis</i>	Zusammensetzung	Hersteller
Brain-Heart-Infusion (BHI) Medium		
BHI-Pulver	37,00 g	BD Bioscience
A. bidest. ad	1000,00 ml	
Brain-Heart-Infusion Kryomedium		
Brain-Heart-Infusion-Medium (Vorkultur)	500,00 μ l	
Glycerol (99 %ig)	500,00 μ l	Sigma
Brain-Heart-Infusion Agar*		
Agar	7,50 g	Beckton Dickinson
defibriniertes Schafsblut	5,00 %	Dibco
BHI-Medium ad	1000,00 ml	
Brain-Heart-Infusion Selektionsagar*		
Kanamycin	20,00 mg	Sigma
BHI-Agar ad	1000,00 ml	

Tab. 3-5: Wachstums- und Selektionsmedien für die Kultur von *M. catarrhalis*

<i>E. coli</i>	Zusammensetzung	Hersteller
Luria-Bertani (LB) Medium		
Trypton (enzymatisch hydrolysiert aus Casein)	10,00 g	Fluka
Hefeextrakt	5,00 g	Sigma
Natriumchlorid	5,00 g	Roth
A. bidest. ad	1000,00 ml	
Luria-Bertani Kryomedium		
Luria-Bertani Medium (Vorkultur)	500,00 µl	
Glycerol 99 %ig	500,00 µl	Sigma
Luria-Bertani Agarplatten* (<i>E. coli</i> Stamm CE1265)		
Agar	15,00 g	Beckton Dickinson
Luria-Bertani Medium ad	1000,00 ml	
Luria-Bertani Selektionsagarplatten* (<i>E. coli</i> Stamm DH5αTM)		
Ampicillin	50,00 mg	Sigma
Luria-Bertani Agar ad	1000,00 ml	
Luria-Bertani Selektionsagarplatten* (<i>E. coli</i> Opa B128, Opa J129)		
Chloramphenicol	25,00 mg	Sigma
Luria-Bertani Agar ad	1000,00 ml	

Tab. 3-6: Wachstums- und Selektionsmedien für die Kultur Opa-exprimierender *E. coli*

*Nach Fertigstellung der Medien wurden diese für 10 min bei 115 °C autoklaviert und anschließend bei 4 °C gelagert. Die Zugabe des Schafblutes, des Kanamycins, des Chloramphenicols und des Ampicillins erfolgte nach dem Abkühlen des Mediums unter 42 °C.

3.1.3 Molekularbiologische Methoden

3.1.3.1 PCR

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen entsprechend der Herstellerangaben.

PCR- Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Lysepuffer		
RLT	1,00 ml	Qiagen
β-Mercaptoethanol	0,01 %	Sigma
TAE Puffer, pH 8,0		
Tris Base	4,84 g	Sigma
Eisessig (100 %ig)	1,14 ml	Merck
EDTA (0,5 M)	2,00 ml	Roth
A. bidest. ad	1000,00 ml	

Tab. 3-7: Puffer für die PCR

Mastermix (RT-PCR)	Zusammensetzung je Probe	Hersteller
AMV-Reverse Transkriptase (1U/μl)	0,75 μl	Promega
AMV-RT Puffer (5x)	4 μl	Promega
RNAsin (Rnase Inhibitor)	0,75 μl	Promega
Random Hexamer Primer	1 μl	Pharmacia Biotech
Nukleotide (100 mM)	2 μl	Promega
A. bidest.	variabel	

Tab. 3-8: Zusammensetzung des Mastermixes für die RT-PCR

Mastermix (PCR)	Zusammensetzung je Probe	Hersteller
RED Taq-Puffer (10x)	2,5 μl	Sigma
RED Taq DNA-Polymerase (1U/μl)	0,75 μl	Sigma
Nukleotide (100 mM)	0,5 μl	Promega
Vorwärts- und Rückwärtsprimer (0,5 μg/μl)	0,25 μl	TIB MOLBIOL
A. bidest.	15,5 μl	

Tab. 3-9: Zusammensetzung des Mastermixes für die PCR

Agarosegel	Zusammensetzung	Hersteller
TAE Puffer, pH 8,0		
Tris Base	4,84 g	Sigma
Eisessig (100 %ig)	1,14 ml	Merck
EDTA (0,5 M)	2,00 ml	Roth
A. bidest. ad	1000,00 ml	
Agarosegel (2%)		
Agarose	2 g	Promega
TAE-Puffer (1x)	100 ml	
Ethidiumbromid	4 µl	Sigma

Tab. 3-10: Zusammensetzung des Agarosegels für die Gelelektrophorese

PCR	Vorwärts - Sequenz	Rückwärts - Sequenz	Annealing - Temperatur	Zyklen	Hersteller
CEACAM1-4L	5'- gCAACA ggACCACAg TCAAgACgA	5'- gTTtgg gAgTCAgAg gTTggTg	60 °C	28	TIB MOLBIOL
CEA (CEACAM5)	5'- AgCAAg CTACAAATg TgAAACCC	5'- gCTggA AAgTCCCAT TgACAA	60 °C	30	TIB MOLBIOL
CEACAM6	5'- TCAAtg ggACgTTCC AgCAAT	5'- ACTCCA ATCgTgAtg CCgAC	60 °C	30	TIB MOLBIOL
CEACAM7	5'- ACAACT TCAATCCgg TggAgA	5'- CgCTgA gTAGAACgA gggTC	60 °C	30	TIB MOLBIOL
TLR2	5'- gCCAAA gTCTTgATT gATTgg	5'- TTgAAg TTCTCCAgC TCCTg	63 °C	28	TIB MOLBIOL
GAPDH	5'- CCACCC ATggCAAAT TCCATggCA	5'- TCTAgA CggCaggTC AggTCCACC	60 °C	22	TIB MOLBIOL

Tab. 3-11: PCR-Primersequenzen

3.1.3.2 Facs

primäre Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
CEACAM1 (mAB, 18/20)	Maus	50 µg/ml	Singer, B.B., Institut für Anatomie, Essen
CEA (clone Col-1)	Maus	50 µg/ml	ZytoMed Systems
CEACAM6	Maus	50 µg/ml	Genovac
CEACAM7 (Bac2)	Maus	50 µg/ml	Genovac
anti-TLR2 (mAB, clone 17)	Maus	10 µg/ml	Santa Cruz Biotechnologies
sekundäre Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
FITC-gekoppelter anti-mouse F(ab) ₂	Ziege	1:40	Invitrogen

Tab. 3-12: Primäre und sekundäre Facs-Antikörper

3.1.3.3 Transiente Transfektion von HEK293 und A549 Zellen

Transfektionsreagenzien	Hersteller
CalPhos Mammalien Transfection Kit	BD Bioscience
Superfect Transfection Reagent	Qiagen
Solution V	Amaya

Tab. 3-13: Transfektionsreagenzien

Plasmid	DNA-Menge /Well (CalPhos Kit)	DNA-Menge /Well (Superfekt)	Herkunft
pcDNA3 hTLR2	0,025 µg	2 µg	Tularik Inc., San Francisco
GFP-tagged-TLR2	-	2 µg	Heine, H., Institut für Immunologie und Zellbiologie, Borstel
pRc/CMV- CEACAM1-4L (wt) clone a	0,025 µg	2 µg	Zimmermann, W., München
pRc/CMV- CEACAM1-4L Y459F #3 clone b	0,025 µg	-	Zimmermann, W., München
pRc/CMV- CEACAM1-4L Y486F #11 clone a	0,025 µg	-	Zimmermann, W., München
pGL3-Luciferase- Reporterplasmid	0,05 µg	-	Hippenstiel, S., Medizinische Klinik m. S. Infektiologie, Charité, Berlin
RSV- β-Galaktosidase- Plasmid	0,05 µg	-	Hallatschek, W., Institut für Mikrob. und Hygiene, Charité, Berlin

Tab. 3-14: Transfektionsplasmide

SiRNA	Vorwärts-Sequenz	Rückwärts-Sequenz	Hersteller
CEACAM1	5´- CGU AUU GGU GUG AGG UCU Utt	5´- AAG ACC UCA CAC CAA UAC Gtc	Ambion
SHP1	5´- GCA GGA GGU GAA GAA CUU Gtt	5´- CAA GUU CUU CAC CUC CUG Ctt	Ambion
SHP2	5´- CGG CAA GUC UAA AGU GAC Ctt	5´- GGU CAC UUU AGA CUU GCC Gtc	Ambion
Kontroll SiRNA	5´- UUC UCC GAA CGU GUC ACG Utt		MWG-Biotech AG

Tab. 3-15: SiRNA Sequenzen

3.1.3.4 Konfokalmikroskopie

	Zusammensetzung	Hersteller
Fixierungsmedium		
PFA	3 %	Merck
Waschpuffer		
Dulbeccos PBS (1x)		PAA
Verdünnungsmedium		
Tween 20	0,05 %	Sigma
BSA	1 %	Sigma
Dulbeccos PBS (1x)	20 ml	PAA
Permeabilisierungsmedium		
Triton X 100	1 %	Boeringer
Verdünnungsmedium		
Blockpuffer		
Ziegenserum	5 %	PAA
Verdünnungsmedium		
Eindeckelmedium		Beckmann Coulter

Tab. 3-16: Puffer und Lösungen für die Konfokalmikroskopie

primäre Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
CEACAM1 (mAB 18/20)	Maus	2 µg/ml	Singer, B.B., Institut für Anatomie, Essen
sekundäre Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
Alexa546 anti-Maus- IgG	Ziege	1:8000	Invitrogen
Alexa488 anti-GFP	Kaninchen	1:1000	Invitrogen

Tab. 3-17: Primäre und sekundäre Antikörper für die Konfokalmikroskopie

3.1.3.5 Elisa

Lysepuffer	Zusammensetzung	Hersteller
RIPA-Puffer		
Tris HCl; pH 7,5	50 mM	Sigma
Natriumchlorid	150 mM	Sigma
Triton X-100	1 %	Boeringer
Natriumdeoxycholat	0,5 %	Merck
Proteaseinhibitor Cocktail Set III	10,00 µg/ml	Calbiochem
PhosSTOP Phosphataseinhibitor	10,00 µg/ml	Roche
Carbonatpuffer 0,1 M; pH 9,5		
Natriumhydrogencarbonat	4,20 g	Merck
Natriumcarbonat	1,78 g	Merck
A. bidest. ad	500,00 ml	
Blockpuffer		
Dulbeccos PBS (1x)	45,00 ml	PAA
FCS	5,00 ml	Gibco
Waschpuffer		
Dulbeccos PBS (1x)	1000,00 ml	PAA
Tween20	0,05 %	Sigma
Substratlösung /TMB Substrat Reagent Set		
Wasserstoffperoxid	50,00 %	BD Bioscience
Peroxidase-konjugierte AffiniPure F(ab') ₂ Fragmente		Jackson Immuno research
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	50,00 %	BD Bioscience
Stopplösung (2 N H₂SO₄)		
H ₂ SO ₄ (95-97 %ig)	27,47 ml	Merck
A. bidest. ad	500,00 ml	

Tab. 3-18: Elisa-Puffer

Antikörper	Konzentration	Hersteller
Capture Antikörper anti humanes IL8	1 :250	BD Bioscience
Detektionsantikörper anti humanes IL8	1 :250	BD Bioscience
Rabbit anti-human TLR2	0,5 µg/Well	Lifespan Biosciences
Anti-p85α	0,5 µg/Well	Santa Cruz

Tab. 3-19: Antikörper für den Elisa

3.1.3.6 Western Blot

Western-Blot-Puffer und -Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
Phosphoproteinwaschpuffer		
Natriumorthovanadat (98 %ig, 200 mM)	5,00 ml	Sigma
Natriumpyrophosphat (150 mM)	50,00 ml	Sigma
Natriumfluorid (99 %ig, 1 M)	50,00 ml	Sigma
Dulbeccos PBS (1x) ad	500,00 ml	PAA
Lyse-Puffer zur Proteinextraktion		
Tris-HCl, pH 7,4	50,00 mM	Sigma
EDTA	1,00 mM	Roth
EGTA	1,00 mM	Sigma
PMSF	1,00 mM	Sigma
Antipain, Leupeptin, Pepstatin	je 10,00 µg/ml	Sigma
Nonidet® P-40 (99 %ig)	1,00 %	Fluka
Natriumfluorid	50,00 mM	Sigma
Natriumpyrophosphat	5,00 mM	Sigma
SDS	0,10 %	Serva
Natriumpervanadat (Natriumorthovanadat + H ₂ O ₂)	2 mM	Merck
Bradford Reagenz		
BioRad Protein Assay	20,00 %	BioRad
A. bidest.	80,00 %	

Western-Blot-Puffer und -Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
Gelladepuffer nach Lämmlli		
Tris-HCl, pH 6,8 (0,5 M)	1,00 ml	Sigma
Glycerol	0,80 ml	Sigma
SDS (10 % w/v)	1,60 ml	Serva
Bromphenolblau (1 % w/v)	0,40 ml	Pharmacia Biotech
β-Mercaptoethanol (1 % v/v)	0,40 ml	Sigma
A. bidest. ad	5,00 ml	
Gelelektrophoresepuffer		
Tris-Base	3,00 g	Sigma
Glycin	14,40 g	Merck
SDS (10 % w/v)	1,00 g	Serva
A. bidest. ad	1000,00 ml	
Blotpuffer		
Tris-Base	3,00 g	Sigma
Glycin	14,40 g	Merck
Methanol	20,00 %	Merck
A. bidest. ad	1000,00 ml	
Blockpuffer		
Ody Blocking Buffer	50,00 %	LI-COR
Dulbeccos PBS (1x)	50,00 %	PAA
Ponceau-S-Proteinfärbung		
Ponceau S	1,00 g	Sigma
Essigsäure (100 %ig)	50,00 ml	Merck
A. bidest. ad	1000,00 ml	

Tab. 3-20: Puffer und Lösungen für den Western Blot

Western-Blot-Gele	Zusammensetzung	Hersteller
Sammelgel		
Tris-HCl (0,5 M), pH 6,8	2,50 µl	Sigma
SDS (10 % w/v)	100,00 µl	Serva
Bis-Acrylamid (40 %ig, Ratio 19:1)	1,33 ml	Serva
TEMED	10,00 µl	R&D Systems
Ammoniumpersulfat (10 %ig)	50,00 µl	Serva
A. bidest. ad	10,00 ml	
Trenngel (10 %ig)		
Tris-HCl (1,5 M), pH 8,8	2,50 ml	Sigma
SDS (10 % w/v)	100,00 µl	Serva
Bis-Acrylamidlösung (40 %ig, Ratio 19:1)	3,35 ml	Serva
TEMED	5,00 µl	R&D Systems
APS (10 %ig)	3,35 ml	Serva
A. bidest. ad	10,00 ml	

Tab. 3-21: Western Blot Gele (SDS-Page)

primäre Antikörper	kDa	Spezies	Konzentration	Hersteller
SHP1	90	Kaninchen	1:1000	Calbiochem
SHP2	70	Kaninchen	1:1000	R&D Systems
Phosphotyrosin (mAB 4G10)		Maus	1:1000	Upstate Biotechnology
CEACAM1 (mAB 18/20)	120 - 160	Maus	1:1000	Singer, B.B., Institut für Anatomie, Essen
TLR2 (N-17): sc8689	90	Ziege	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Akt	80	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
p-Akt pS437	60	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
Aktin	42	Ziege	1:1000	Santa Cruz

sekundäre Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
Anti-Maus-IgG	Ziege, gekoppelt an IRDye 800	1:2000	LI-COR
Anti-Maus-IgG	Ziege, gekoppelt an Cy5.5	1:2000	LI-COR
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege, gekoppelt an IRDye 800	1:2000	LI-COR
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege, gekoppelt an Cy5.5	1:2000	LI-COR
Anti-Ziege-IgG	Maus, gekoppelt an IRDye 800	1:2000	LI-COR

Tab. 3-22: Primäre und sekundäre Antikörper für den Western Blot

3.1.3.7 Immunpräzipitation

Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
Anti-CD66acd	Ratte	2 µg/ml	Serotec
Anti-TLR2	Maus	2 µg/ml	eBioscience

Tab. 3-23: Antikörper für die Immunpräzipitation

3.1.3.8 Adhäsionsassay

Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
CEACAM1 (mAB 18/20)	Maus	20 µg/ml	B.B. Singer, Institut für Anatomie, Essen
Kontroll-AK (mAB 5.4)	Maus	20 µg/ml	B.B. Singer Institut für Anatomie, Essen

Tab. 3-24: Antikörper für den Adhäsionsassay

3.1.3.9 Biolumineszensassay

Assay Kit	Hersteller
Luciferase Assay System	Promega
β-Gal Reporter Gene Assay	Roche

Tab. 3-25: Assay Kits für den Biolumineszensassay

3.1.3.10 Stimulanzen

Stimulanz	Konzentration	Hersteller
Pam ₃ CSK ₄	100 ng/ml	Alexis
Pervanadat (Orthovanadat + H ₂ O ₂)	4 mM	Merck

Tab. 3-26: Stimulanzen

3.1.3.11 Inhibitoren

Inhibitor	Konzentration	Hersteller
LY 294002 (Ly)	10 µM	Biomol
Wortmannin (Wort)	50 nM	Biomol

Tab. 3-27: Inhibitoren

3.1.3.12 Verbrauchssubstanzen

Substanz	Verwendungszweck	Hersteller
1 kB DNA-Ladder	Hilfe bei der Detektion der gesuchten Bande (PCR)	Invitrogen
Dulbeccos PBS (1x)	Waschpuffer	PAA
ETI	Trypsininhibitor (30 mg/ml, Beas2B)	Roche
Recombinant Protein molecular weight marker	Hilfe bei der Detektion der gesuchten Bande (WB)	Amersham life science
Trypsin/EDTA (1x)	Ablösen der Zellen	Gibco
TSA	Trypsininhibitor (primäre Bronchialepithelzellen)	Clonetics, Cambrex

Tab. 3-28: Verbrauchssubstanzen

3.1.3.13 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Verwendungszweck	Hersteller
24-, 6-Loch-Platten	Zellkultur	Falcon
Einmalimpfösen	Ausplattieren von Bakterien	Roth
F96-Immuno Plate (Maxisorb)	IL8-Elisa	Nunc
Hybond-ECL-Membran	Proteintransfer (WB)	Amersham Bioscience
Kunststoffküvetten	Protein- und Bakterien-Konzentrationsmessung im Photometer	Serva
Nukleofektorküvetten	Transfektion von A549 Zellen mit siRNA	Amaya
Pasmid Midi Kit	Plasmidaufreinigung	Qiagen
Pasteurpipetten (230 mm)		Brand
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)		Falcon
Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)		Falcon
Protein Agarose G	IP	Upstate
Quarzküvetten Typ 105.200	RNA- und Plasmid DNA-Messung	Helma
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)		Eppendorf
Röhren (5 ml, 75 x 12 mm Ø)	Lumineszenzmessung (Reportergenassay)	Sarstedt
Thermowell™ Tubes (0,5 ml)	DNase- und RNase-freie Reaktionsgefäße (RT-PCR)	Costar
Whatman Filterpapier	Proteintransfer (WB)	Whatman
Zellkulturflaschen (T75)	Zellkultur	Falcon
Zellkulturschalen (10 cm)	Zellkultur, Gießen von Agarplatten	Falcon
Zellschaber		Costar

Tab. 3-29: Verbrauchsmaterialien

3.1.3.14 Geräte

Methoden/Produkt	Verwendungszweck/Methoden	Hersteller
AxioCam MRm Kamera	Fotografieren der konfokalmikroskopischen Bilder	Zeiss
Axioskop2 mot, Objektiv, PlanNeoFluar X 100; NA 1.4	Konfokalmikroskopie	Zeiss
BioRad Gelelektrophorese System	Gelelektrophorese (WB /PCR)	BioRad
BlotSystem	Proteintransfer (WB)	Transblot
CAMEDIA C-4040 200M	Digitalkamera (PCR)	Olympus
Elektrophoresekammer SUB-CELL GT	PCR	Bio-RAD
Ethidiumbromidfilter	Aufsatz für Olympus Kamera (PCR)	
FACScan Instrument	Facs-Messung	BD Biosciences, San Diego, CA
Gelhalterungssystem	Vorrichtung zum Gießen der Gele (PCR)	BioRad
Gießvorrichtung	Einspannen der Glasplatten (WB)	BioRad
Kühlzentrifuge J2 HS		Beckmann
Laborwaage		Sartorius
Lumat LB 9501	Messung der Lumineszenz (Reportergenassay)	Berthold
Mastercycler Gradient	RT-PCR und PCR	Eppendorf
Mastercycler Personal	RT-PCR und PCR	Eppendorf
Membran Vakuumpumpe		Vacubrand
Mikroskop BX 60		Olympus
Mini-Q-Anlage	Herstellung von Aqua bidest.	Millipore Corporation
MS2 Minishaker (Vortexer)		IKA [®]
Nukleofektor 1	Transfektion von A549 Zellen mit SiRNA	Amaya Biotechnologies
Odyssey Infrared Imager	Dokumentation (WB)	LI-COR
PH-Meter 526		WTW
Platereader MR 5000	Auslesen der Elisa Platten	Dynatech
Polymax 1040	Schwenken der Membranen	Heidolph Instruments
RCT basic	Magnetrührer (WB)	Ika-Labortechnik

Method/Produkt	Verwendungszweck/Method	Hersteller
Spektrophotometer 922		Uvicon
Sterilbank Laminair HB 2448		Hereaus
TFX-20M GIBCO BRL UV Transluminator	Darstellung der Banden im PCR Gel	Life Technologies™
Thermomixer Comfort	Erhitzen der Proteine auf 95 °C (WB/IP)	Eppendorf
Tischzentrifuge Mikro 24-48R		Hettich
Unitwist 400	Anzucht von <i>E. coli</i>	Uniequip
Zellkulturinkubator		Hereaus
Zentrifuge 48 RC, Rotana RPC		Hettich

Tab. 3-30: Geräteübersicht

3.1.3.15 Analysesoftware

Bio-Imaging-Control, argus X1, Version 2, Biostep GmbH

ImageProPlus, Version 5.0, Media Cybernetics

Infrared Odyssey Imaging System Application Software Version 1.2

GraphPad Prism, Version 5.0

CellQuest, BD Biosciences, San Diego, CA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

Die im Folgenden beschriebenen 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.

Materialien oder Geräte, die mit humanem oder transfiziertem Zellmaterial Kontakt hatten, wurden anschließend 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 %.

Alle Medien und Lösungen wurden vor Verwendung auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt.

3.2.1.1 Kultivierung von A549 Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (T₇₅). Die konfluenten Zellen wurden je nach Verwendungszweck in die jeweiligen Zellkulturgefäße in gewünschter Dichte ausgesät. Dafür wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mittels 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst und in entsprechender Menge Zellkulturmedium resuspendiert. Die Suspension wurde in die Kulturgefäße verteilt. 24 h vor der Stimulation wurden die Zellen auf Stimulationsmedium ohne FCS-Zusatz umgesetzt.

3.2.1.2 Kultivierung von Beas2B Zellen

Vor Aussaat der humanen Bronchialepithelzellen (Beas2B) wurden alle Zellkulturgefäße für 30 min bei 37 °C mit Adhäsionsflüssigkeit inkubiert.

Die Subkultivierung der Zellen erfolgte nach Ausbildung eines Monolayers in den Zellkulturflaschen (T₇₅). Dafür wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Um die Zellen abzulösen, wurde jede Zellkulturflasche mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C inkubiert. Durch leichtes Klopfen an der Flasche wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst, anschließend in 10 ml PBS aufgenommen, in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei Raumtemperatur und 172 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 200 µl Trypsininhibitor resuspendiert.

Danach wurden die Zellen in 40 ml Zellkulturmedium aufgenommen, gleichmäßig verteilt und im Verhältnis 1:4 in den entsprechend vorbehandelten Zellkulturgefäßen ausgesät.

Bis zur Ausbildung eines Monolayers erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel.

3.2.1.3 Kultivierung von primären Bronchialepithelzellen (pBEC)

Vor Aussaat der primären Bronchialepithelzellen wurden alle Zellkulturgefäße für 30 min bei 37 °C mit Adhäsionsflüssigkeit inkubiert. Die frisch gewonnenen Bronchialepithelzellen wurden für 10 min bei Raumtemperatur und 800 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bis zur Konfluenz in kleinen Zellkulturflaschen (T₂₅). Ein Mediumwechsel wurde alle vier Tage durchgeführt.

Für die Subkultivierung wurden die Zellen zuerst mit 5 ml PBS gewaschen, dann mit 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C bis zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde abschließend sofort mit 1,5 ml TSA gestoppt, die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur 5 min mit 800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in der gewünschten Menge Zellkulturmedium bis zu einem Verhältnis von 1:5 resuspendiert und in den Kulturgefäßen verteilt. Vor der Stimulation wurden die Zellen auf Stimulationsmedium umgesetzt.

3.2.1.4 Kultivierung von HEK293 Zellen

Die Kultivierung der HEK293 Zellen erfolgte bis zu einer Konfluenz von 75 bis 85 % in T₇₅-Zellkulturflaschen. Zur Subkultivierung der humanen embryonalen Nierenepithelzellen wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, anschließend mit ebenfalls 10 ml PBS pro T₇₅-Flasche vom Boden abgespült, in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei Raumtemperatur und 172 g zentrifugiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 auf neue Zellkulturflaschen verteilt bzw. in einer Konzentration von 6×10^4 Zellen/Vertiefung einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Die Transfektion der HEK293 Zellen erfolgte nach drei Tagen bei einer Konfluenz zwischen 50 und 75 % .

3.2.1.5 Bestimmung der Zellzahlen

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen, wie bei der Subkultivierung beschrieben, gewaschen, von der Kulturschale abgelöst und zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und 20 µl dieser Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Für jede Bestimmung wurden die Zellzahlen von jeweils 16 Kleinquadraten summiert, um die Zellzahl über einem Großquadrat zu erhalten. Alle Zellzahlbestimmungen wurden als Duplikate angelegt und die Mittelwerte errechnet. Aus der Zellzahl und dem Verdünnungsverhältnis wurde dann die Zellzahl pro ml Suspension wie folgt ermittelt:

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

3.2.1.6 Kryokonservierung

Die A549, die HEK293 und die Beas2B Zellen wurden zur Kryokonservierung, wie bei der Subkultivierung beschrieben, vom Boden der Kulturschale abgelöst. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 172 g wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit 1 ml der jeweiligen Zelllinie entsprechendem Medium zur Kryokonservierung resuspendiert und in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt (ca. $2-3 \times 10^5$ Zellen pro Kryoröhrchen). Die Kryoröhrchen wurden zunächst in einer Ethanol-Kryobox auf -80 °C schonend abgekühlt, um Schäden durch Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden. Anschließend wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff (-196 °C) umgelagert.

3.2.1.7 Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff direkt in ein Wasserbad von 37 °C gegeben und vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium gegeben und 5 min bei 172 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen (T_{75}) ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit frischem Zellkulturmedium versorgt.

3.2.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.2.1 Bakterienkultur

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten. Alle mit Bakterien in Kontakt getretenen Materialien oder Geräte wurden anschließend mit Descosept (Dr. Schumacher GmbH) desinfiziert. Materialien, welche mit den Bakterien in Kontakt getreten waren und bakterienhaltige Flüssigkeiten wurden im Anschluss autoklaviert.

3.2.2.2 Lagerung und Anzucht von *Moraxella catarrhalis*

Alle Stimulationen der Zellen mit den verschiedenen *M. catarrhalis*-Stämmen erfolgten aus einem jeweils vorher angelegten Glycerolstock.

Zur Gewinnung der Bakterienstöcke wurden die Moraxellen auf mit 5 % Schafblut angereicherten BHI-Agarplatten ausgestrichen (*O35E.1* auf entsprechendem Agar mit Kanamycinlösung zur Selektion versetzt) und für etwa zwölf Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Mehrere Einzelkolonien wurden auf neue Agarplatten überführt und erneut für 12 h inkubiert. Am folgenden Tag wurden alle gewachsenen Kolonien mit einer sterilen Impföse in 1 ml Kryomedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

Die Bakterien für den täglichen Gebrauch wurden jeden Monat neu aus dem -80 °C-Bakterienstock entnommen, nach oben beschriebenem Verfahren kultiviert und bei -20 °C eingefroren.

Bei Bedarf wurde aus diesen Aliquots eine Impföse Bakterien entnommen, auf entsprechendem Agar ausgestrichen und für 12 h inkubiert. Danach wurden einige einzeln wachsende Kolonien abgenommen und in 25 ml BHI-Medium resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde unter Schütteln bei 37 °C für ca. 2 h inkubiert. Die Moraxellen erreichen so eine mittlere logarithmische Wachstumsphase, in welcher sie optimale Infektionseigenschaften besitzen. Anschließend wurde die Suspension bei 4000 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Bakterienpellet in dem Stimulationsmedium der zu bearbeitenden Zellen aufgenommen. Mit Hilfe eines Spektralphotometers wurde dann bei einer Wellenlänge von 405 nm die optische Dichte der Bakteriensuspension ermittelt (OD₄₀₅ 0,3 entspricht 1 x 10⁶ cfu/ml).

3.2.2.3 *Stimulation der Zellen mit Moraxella catarrhalis*

Für die Stimulation wurde das sich auf den Zellen befindliche Medium abgesaugt und durch ein entsprechendes Volumen bakterienhaltiges Stimulationsmedium ersetzt.

Die für die Versuche notwendigen Konzentrationen wurden durch 1:10-Verdünnungsreihen mit Stimulationsmedium eingestellt, wobei meist Bakterienkonzentrationen von 10^5 oder 10^6 cfu/ml, für die Immunpräzipitation auch von 10^7 cfu/ml (engl.: *colony forming units/ml*; koloniebildende Einheiten/ml) zum Einsatz kamen. Die stimulierten Zellen wurden für die jeweilige Versuchszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.2.4 *Lagerung und Anzucht von Escherichia coli*

Alle Stimulationen der Zellen mit den verschiedenen *E.coli*-Stämmen erfolgten aus einem jeweils vorher angelegten Glycerolstock.

Die verschiedenen *E.coli*-Stämme wurden auf dem entsprechenden LB-Selektionsagar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium, versetzt mit Selektionsantibiotikum, überführt. Die Vorkulturen wurden bis zum Zeitpunkt einer deutlichen Trübung des Mediums bei 37 °C unter Schütteln kultiviert (ca. 6-8 h).

500 µl der Vorkultur wurde mit 500 µl sterilem 99 %igem Glycerol versetzt und dann bei -80 °C gelagert. Bei erneutem Bedarf wurden die Vorkulturen aus diesem Glycerolstock angelegt, indem mit einer sterilen Öse etwa stecknadelkopfgroße Teile in wiederum 5 ml des LB-Mediums überführt wurden.

Für die Hauptkulturen wurden jeweils 100 µl der Vorkultur in 50 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum gegeben und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 4000 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in dem entsprechenden Stimulationsmedium aufgenommen. Mit Hilfe eines Spektralphotometers wurde dann bei einer Wellenlänge von 620 nm die optische Dichte der Bakteriensuspension ermittelt (OD₆₂₀ 1,0 entspricht 1×10^9 cfu/ml).

3.2.2.5 Stimulation der Zellen mit *Escherichia coli*

Zur Stimulation wurde das sich auf den Zellen befindliche Medium abgesaugt und durch ein entsprechendes Volumen Stimulationsmedium mit einer Bakterienkonzentration von 10^7 cfu/ml ersetzt. Für den Adhäsionsassay wurden die Bakterien mit 800 U/min für 30 min auf die Zellen aufzentrifugiert. Die stimulierten Zellen wurden für die jeweilige Versuchszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.2.6 Einsatz der Kontrollen

3.2.2.6.1 Negativkontrollen

Als Negativkontrolle wurde zeitgleich das gleiche Volumen des entsprechenden Stimulationsmediums ohne Bakterien eingesetzt.

3.2.2.6.2 Positivkontrollen

Die als Positivkontrolle dienenden Substanzen Pam₃CSK₄ und Pervanadat wurden zum Zeitpunkt der Stimulation in den entsprechenden Konzentrationen in das Stimulationsmedium verbracht.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Aufreinigung der RNA

Die in 6-Loch-Zellkulturschalen stimulierten Zellen wurden nach Entfernung des Stimulationsmediums mit 175 µl Lysepuffer lysiert und im Anschluss die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) entsprechend des Protokolls des Herstellers isoliert.

Dazu wurde das Zellysate in Schreddersäulen überführt und für 2 min bei 22000 g zum Homogenisieren zentrifugiert. Das Lysat wurde mit 175 µl 70 %igem Ethanol gut vermischt, in Zentrifugationssäulen verbracht und 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Filter erst mit 700 µl RW1-Waschpuffer und dann durch zweimaliges Zentrifugieren (jeweils 15 s bei 8000 g) mit 500 µl RPE-Waschpuffer von Verunreinigungen befreit. Die im Filter haftende RNA wurde durch Zugabe von 30 µl RNase freien Wassers aus dem Filter durch einminütiges Zentrifugieren bei 8000 g ausgewaschen.

Die Ermittlung des RNA-Gehaltes erfolgte über die Messung der optischen Dichte in Quarzküvetten (198 µl A. tridest. + 2 µl RNA Probe) mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der RNA-Gehalt wurde mit folgender Formel berechnet:

$$OD_{260} \times 4 = \text{RNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Die Verunreinigung der RNA mit Proteinen kann aus dem Verhältnis OD_{260} (Optimum RNA Absorption) und OD_{280} (Optimum Protein Absorption) bestimmt werden. Als rein wurden RNA-Proteinquotienten zwischen 1,7 und 1,9 angesehen.

Reverse Transkriptase Reaktion (RT Reaktion)

Pro Ansatz wurde 1 µg RNA eingesetzt. Die Probe wurde mit A. bidest. auf ein Endvolumen von 11,5 µl verdünnt. Als Negativkontrolle diente das gleiche Volumen A. bidest. ohne RNA. Vor Zugabe des Mastermixes wurden die Proben für 5 min bei 70 °C im Thermocycler denaturiert, anschließend je Ansatz 8,5 µl des RT-Mastermixes hinzugegeben und die Reaktion bei 42 °C für 60 min gestartet. Durch ein fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C wurde die Reverse Transkription gestoppt und die cDNA mit 80 µl A. bidest. verdünnt.

Nicht direkt für die Reverse Transkriptase verwendete RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

Nicht direkt für die PCR eingesetzte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion

Je Ansatz wurden 5 µl der mittels RT erhaltenen cDNA mit 20 µl des PCR-Mastermixes in dünnwandigen 0,5 µl Reaktionsgefäßen vermengt. Als Kontrolle wurde pro durchgeführter RT eine PCR mit den Primern für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Dieses Gen wird in eukaryoten Zellen konstant exprimiert („*house keeping gene*“). Gleich starke GAPDH-Banden zeugen von einer gleichmäßigen cDNA-Konzentration in den verschiedenen Ansätzen.

Die optimale Annealingtemperatur der verwendeten Primer wurde mittels Gradienten-PCR in einem Gradienten-Thermocycler der Firma Eppendorf bestimmt. Die Durchführung der Gradienten-PCR entspricht einer normalen Polymerase-Kettenreaktion, mit dem Unterschied, dass alle Ansätze für die verschiedenen Temperaturen aus derselben Probe stammen.

	CEACAM1, CEA, CEACAM6	CEACAM7	TLR2	GAPDH
Denaturierung (0,5 min)	94 °C	94 °C	94 °C	94 °C
Hybridisierung (2 min)	60 °C	58 °C	55 °C	60 °C
Polymerisation (2 min)	72 °C	72 °C	72 °C	72 °C
Extension (5 min)	72 °C	72 °C	72 °C	72 °C
Zyklen	28 Zyklen	30 Zyklen	28 Zyklen	25 Zyklen

Tab. 3-31: PCR - Konditionen

Elektrophorese

Die Agarose und der TAE-Puffer wurden bis zum vollständigen Lösen in einer Mikrowelle erhitzt, anschließend mit Ethidiumbromid versetzt und in eine mit entsprechenden Kämmen als Platzhalter für 20 Geltaschen bestückte Gelhalterung gegossen. Nach dem Erkalten wurden die PCR-Produkte sowie ein 1kB DNA-Marker in die einzelnen Taschen in der Elektrophoresekammer aufgetragen und die DNA durch Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V für 1 bis 2 h aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte mit einer Olympus Kamera mit vorgeschaltetem Ethidiumbromidfilter unter UV-Licht.

3.2.3.2 Facs

Um die Expression von TLR2 und CEACAM1 an der Zelloberfläche nachzuweisen wurden 2×10^5 primäre Bronchialepithel- bzw. A549 Zellen für 1 h mit jeweils 10 µg/ml des entsprechenden Antikörpers (gelöst in eiskaltem PBS mit 3 % FCS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach Zentrifugation zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und eine weitere Stunde mit einem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Die Hintergrundfluoreszenz wurde mit Hilfe entsprechender Immunglobuline an Stelle spezifischer primärer Antikörper bestimmt. Zur Quantifizierung apoptotischer Zellen wurden Phosphatidylserinreste auf der Plasmamembran der Zellen mittels fluoreszeinkonjugiertem Annexin V und Propidium-Jodid (Becton Dickinson) entsprechend den Herstellerangaben angefärbt.

Die Messung erfolgte mit dem FACScan, die Bearbeitung der Analyseergebnisse mit der CellQuest-Software der Firma BD Biosciences.

3.2.3.3 Transfektion von HEK293 und A549 Zellen

3.2.3.3.1 Transferierung, Vermehrung und Aufreinigung von Plasmiden in kompetenten *E. coli*

Für die Transformation der Plasmide in *E. coli DH5 α* wurden 50 μ l dieser kompetenten Bakterienzellen mit 1 μ g Plasmid-DNA für 30 min auf Eis und anschließend für 1 min bei 42 °C inkubiert. Der Ansatz wurde nun mit 500 μ l LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Jeweils 100 μ l wurden auf entsprechendem LB-Selektionsagar ausplattiert.

Die Kultivierung der plasmidtragenden *E. coli* erfolgte wie bereits unter 3.2.2.4 beschrieben. Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde das HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen) eingesetzt. Dabei wurde durch die im Folgenden beschriebenen Schritte das Plasmid aus den *E. coli* isoliert. Alle benötigten Puffer sind in dem Kit enthalten.

Zuerst wurde das Plasmid-tragende Bakterienpellet bei 6000 g für 20 min abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das *E. coli*-Pellet wurde in 6 ml RNase-haltigem Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Lyse der *E. coli* erfolgt durch die Zugabe und vorsichtiges Mischen von 6 ml Lysepuffer. Während der fünfminütigen Inkubationszeit wurde der Filtereinsatz vorbereitet. In diesen wurde nach Zugabe von 6 ml Neutralisationspuffer das Gesamtvolumen für eine zehnminütige Inkubationszeit überführt. Währenddessen wurde durch 4 ml Equilibationspuffer eine weitere Filtereinheit (Tip) vorbereitet. Das *E. coli*-Lysat wurde nun mit Hilfe eines Stempels durch den Filter in den equilibrierten Tip gedrückt. Nachdem das Lysat den Filter passiert hatte, wurde dieser mit 20 ml Waschpuffer von Verunreinigungen befreit. Der Durchfluss wurde verworfen und die Plasmid-DNA mit 5 ml Elutionspuffer aus dem Filter ausgewaschen. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml 70 %igem Isopropanol präzipitiert, und nach einer fünfminütigen Inkubationszeit wurde das Präzipitat mit einer 20 ml Spritze durch den QUIA Präzipitator gedrückt. Durch mehrfaches „Luftspülen“ wurde der Präzipitator von Flüssigkeitsresten befreit, bevor die Plasmid-DNA mit 500 μ l TE-Puffer aus dem Präzipitator isoliert wurde. Die Plasmid-DNA-Konzentrationen wurden, wie bereits bei der PCR-RNA Messung beschrieben, durchgeführt und bewertet.

3.2.3.3.2 Transiente Transfektion von bakteriellen Plasmiden in HEK293 Zellen

Zur Transfektion der Epithelzellen im Stadium der Proliferation wurden die HEK293 Zellen drei Tage vor der Transfektion mit einer Dichte von 6×10^4 Zellen pro Vertiefung in einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und in 0,5 ml Zellkulturmedium bis zu einer Konfluenz von etwa 50 % kultiviert.

Transiente Transfektion mit Hilfe der Kalziumphosphatpräzipitations-Methode

Bei Transfektion mit Hilfe der Kalziumphosphatpräzipitations-Methode (CalPhos™ Mammalian Transfection Kit, Pharmingen) bilden sich Kristalle aus Kalziumphosphat und DNA, welche von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden können.

Je nach Fragestellung wurden 25 ng des leeren Expressionsvektors pcDNA3, des pcDNA3 hTLR2 Plasmids und der CEACAM Plasmide in unterschiedlicher Kombination pro Vertiefung eingesetzt. Zusätzlich erfolgte eine Kotransfektion von 50 ng des pGL3-Luziferase-Reporter-Plasmids zur Bestimmung der NF- κ B-Aktivität und 50 ng des RSV- β -Galaktosidase-Plasmids zur Normalisierung der Transfektionseffizienz.

Dafür wurden die entsprechenden Plasmide pro Ansatz mit 3,1 μ l einer 2 molaren Kalziumlösung versetzt, mit A. bidest. auf ein Gesamtvolumen von 25 μ l aufgefüllt und im Anschluss 1:1 (v:v) in HBS (engl.: *HEPES buffered saline*) geträufelt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben (Endvolumen 550 μ l).

Transiente Transfektion mit Hilfe des Superfekt-Transfektion-Kits

Die Transfektion von HEK293 Zellen mittels Superfektreagenz (Quiagen) liefert eine für einige Folgeversuche (z.B. Konfokalmikroskopie) unbedingt nötige höhere Transfektionseffizienz als die Kalziumphosphatpräzipitations-Methode. Die Transfektion erfolgte laut Herstellerempfehlung.

Hierzu wurden je Vertiefung 1 μ g TLR2- und 1 μ g CEACAM1-Expressionsplasmid mit 5 μ l Superfekt-Transfektionsreagenz versetzt. Dieser Ansatz wurde mit DMEM Zellkulturmedium ohne Zusätze auf 60 μ l aufgefüllt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit 350 μ l Zellkulturmedium je Loch neu gefüttert und die Plasmidsuspension dazugegeben.

Nach 4 h wurden die mittels Kalziumphosphatpräzipitations-Methode bzw. Superfektreagenz transfizierten Zellen mit PBS gewaschen und über Nacht in Zellkulturmedium kultiviert. Die Stimulation bzw. Fixierung erfolgte 24 h nach der Transfektion.

3.2.3.3 Transiente Transfektion von small interfering RNA (siRNA) in A549 Zellen

SiRNAs sind in Zellen natürlich vorkommende Moleküle, die ein post-transkriptionelles, sequenzspezifisches Ausschalten verschiedener Proteine durch RNA-Interferenz ermöglichen. Die transiente Transfektion von A549 Zellen mit siRNA erfolgte mit Hilfe des Amaxa Cell Line Nucleofektor Kit V. Bei diesem Transfektionsverfahren wird die Zellmembran der zu transfizierenden Zellen durch einen elektrischen Impuls kurzzeitig permeabilisiert, wodurch das Eindringen der siRNA ermöglicht wird. Die siRNA bindet innerhalb der Zelle an die mRNA des Zielproteins und verhindert so die Translation.

Hierzu wurden je eine Million A549 Zellen als zentrifugiertes Pellet in 100 μ l Nucleofektionslösung V resuspendiert und mit 2 μ g der entsprechenden siRNA versetzt. Diese Suspension wurde anschließend entsprechend der Herstellerangaben nukleofektiert (Programm G16; Nucleofektor1, Amaxa Biotechnologies). Die Zellen wurden danach sofort in vorgewärmtes Zellkulturmedium gegeben und auf die entsprechenden Zellkulturgefäße verteilt.

Der Zeitpunkt des optimalen Knock-down der Ziel-mRNA bzw. des -proteins wurde mittels PCR bzw. Western Blot ermittelt und die Zellen in den folgenden Versuchen zu diesem Zeitpunkt stimuliert.

3.2.3.4 Konfokalmikroskopie

Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wird bei der Konfokalmikroskopie mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops das Objekt Punkt für Punkt in einer dünnen, schrittweise verschieblichen Fokusebene aufgenommen. Dadurch ist eine exakte räumliche Verteilung und semiquantitative Analyse von Fluoreszenzfarbstoffen möglich.

Die HEK293 Zellen wurden auf Glasplättchen in 24-Loch-Platten bis zu einer Konfluenz von ca. 50 % kultiviert und anschließend mit einem TLR2-GFP-gekoppelten- und einem CEACAM1-Expressionsvektor mittels Superfekt-Transfektions-Kit transient kotransfiziert.

Die Fixierung der Epithelzellen erfolgte am nächsten Tag mit in PBS gelöstem dreiprozentigem Paraformaldehyd (PFA) für 20 min. Danach wurden die Zellen für 15 min mit jeweils 200 μ l Permeabilisierungsmedium inkubiert. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, erfolgte anschließend eine 30 minütige Inkubation mit Blockpuffer, bevor der erste Antikörper (18/20; mouse anti CEACAM1) über Nacht

eingesetzt wurde. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor 546, goat anti mouse) erfolgte in einer abgedunkelten Kammer für 1 h bei Raumtemperatur.

Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Zellen jeweils dreimal mit PBS gewaschen.

Die einzelnen Glasplättchen wurden zum Schluss mit Eindeckelmedium auf Objektträger aufgebracht und mit Nagellack fixiert.

Die Auswertung der Proben erfolgte mittels eines motorisierten Axioskops mit angeschlossener Digitalkamera, die Bildbearbeitung über die ImageProPlus 5.0 Software.

3.2.3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Elisa)

3.2.3.5.1 IL8-Elisa

Konfluente, zum Teil transient transfizierte, HEK293, A549 und primäre Bronchialepithelzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von *M. catarrhalis* (O35E, O35E.1) bzw. *E. coli* (Opa B, Opa J) sowie Pam₃Cys mit und ohne Präinkubation spezifischer Antikörper für 16 h inkubiert. Die Zellüberstände wurden nach Ablauf der Stimulationszeit in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, für 10 min bei 4 °C und 2500 g zentrifugiert und in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Alle Stimulationen erfolgten in 24-Loch-Zellkulturschalen, der Elisa wurde entsprechend der Herstellerangaben des IL8-Elisa-Detection Kits durchgeführt.

Dazu wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten für 16 h mit einem in 0,1 molarem Carbonatpuffer gelösten IL8-Capture-Antikörper bei 4 °C inkubiert.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Mikrotiterplatte anschließend nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für eine Stunde mit jeweils 200 µl Blockpuffer je Vertiefung inkubiert.

Die zuvor gewonnen Überstände wurden im Verhältnis 1:250 (v:v) in Blockpuffer verdünnt.

Zur Quantifizierung des in den Proben enthaltenen IL8 wurde eine Standardreihe angelegt. Das Referenz IL8 wurde in Blockpuffer so verdünnt, dass der höchste Standardwert eine Konzentration von 200 pg/ml aufwies. Die Standardwerte wurden bis zum niedrigsten Standardwert (3,1 pg/ml) jeweils im Verhältnis 1:1 (v:v) mit Blockpuffer verdünnt. Als Nullstandard diente der Blockpuffer ohne IL8.

Nach dreimaligem Waschen wurden je 100 µl der Standardwerte respektive der Proben als Dupliketts aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundenes Probenmaterial wurde danach durch fünfmaliges Waschen entfernt und 100 µl Detektionsantikörper/Meerrettichperoxidase Konjugat je 1:250 (v:v) in Blockpuffer gelöst für eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Bevor die Substratlösung mit 100 µl/Loch aufgetragen wurde, wurde die Platte ein letztes Mal in sieben Schritten gewaschen. Die enzymatische Farb-reaktion erfolgte im Dunklen und wurde nach 20 min durch Zugabe von 50 µl Stopplösung (2N H₂SO₄) abgestoppt.

Die Auswertung erfolgte in einem Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Die in den Proben gemessenen optischen Dichten wurden anhand der Standardkurve quantifiziert und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. In die Auswertung gelangten nur Ergebnisse, welche sich innerhalb des linearen Bereichs der Standardkurve befanden.

3.2.3.5.2 p85-Sandwich-Elisa

Konfluente, zum Teil transient mit spezifischer siRNA transfizierte, A549 Zellen wurden mit *M. catarrhalis* (O35E, O35E.1, 10⁵ cfu/ml) für 1 bzw. 5 min inkubiert. Um eine Assoziation zwischen TLR2 und der p85-Untereinheit der PI3Kinase nachzuweisen, wurden 96-Loch Maxisorp Elisa-Platten über Nacht bei 4 °C mit 0,5 µg/Loch eines Rabbit anti-human TLR2 Antikörpers, gelöst in Blockpuffer, inkubiert. Nachdem die Platten mit PBS gewaschen wurden, wurden sie bei Raumtemperatur mit 3 %igem BSA, gelöst in PBS, für 1 h geblockt. Die Zellen wurden in dieser Zeit in RIPA Puffer (mit Protease-Inhibitor Cocktail Set III und PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor versetzt) lysiert, anschließend bei 4 °C für 15 min bei 12000 g zentrifugiert und im Verhältnis 1:20 mit einer 1 %igen BSA/ PBS-Lösung verdünnt. Je Vertiefung wurden 100 µl dieses Lysats bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und für weitere 4 h bei Raumtemperatur mit einem anti-p85α Antikörper (1 µg/Loch) gelöst in je 100 µl 1 %iger BSA/ PBS-Lösung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten erneut viermal gewaschen und dann für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur mit entsprechenden Peroxidase-konjugierten AffiniPure F(ab')₂ Fragmenten inkubiert. Nach dem letzten Waschen wurde die Enzymreaktion mit Hilfe von 150 µl Tetramethylbenzidine als Substrat sichtbar gemacht. Diese Reaktion wurde nach 30 min durch Zugabe von jeweils 20 µl 2 N H₂SO₄ gestoppt. Die Auswertung erfolgte in einem Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm. Für alle Proben erfolgte eine Dreifachbestimmung.

3.2.3.6 Western Blot

Extraktion des löslichen Gesamtproteins

Die stimulierten oder transfizierten A549 Zellen wurden auf Eis gestellt, das Stimulationsmedium abgesaugt und zweimal mit eiskaltem Phosphoproteinwaschpuffer gewaschen. Der Waschpuffer wurde restlos abgesaugt und die Zellen in 100 bzw. 200 µl Lysepuffer je nach Größe der Vertiefung gelöst und mit Hilfe eines Plastikschabers abgekratzt. Im Anschluss wurde das Lysat in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 4 °C und 25000 g zentrifugiert. Die das Gesamtprotein enthaltenden Überstände wurden in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert.

Proteinbestimmung nach Bradford

Das im Zellysate vorhandene Gesamtprotein wurde mit Hilfe des BioRad Protein-Assays nach Bradford quantifiziert. Bei diesem Verfahren wird ausgenutzt, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue sein Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verlagert, wenn er basische und aromatische Aminosäuren bindet.

Nach fünfminütiger Inkubation von 5 µl der Proteinlösung in 995 µl der 1:5 in Aqua dest. verdünnten Farbstofflösung wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und anschließend die entsprechende Gesamtproteinmenge berechnet.

Zwei Küvetten mit 1 ml der 1:5 verdünnten Farbstofflösung ohne Protein dienten zur Eichung des Spektralphotometers.

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

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Lysate 1:1 in Mercapto-haltigem 1 x Lämmli-Puffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C schüttelnd inkubiert. Die Proteinauftrennung erfolgte in einem sechsprozentigen Sammel- bzw. zehnprozentigen Trenngel bei 100 mV für 3 h und 15 min. Es wurden jeweils 100 µg Protein je Geltasche aufgetragen. Zur Größenbestimmung lief in jedem Gel ein Proteinmarker (Full Range Rainbow Molecular Weight Marker, 1 - 250 kDa) parallel mit.

Western Blot

Das Gel wurde nach erfolgter Elektrophorese vorsichtig aus der Elektrophoresekammer entnommen und luftblasenfrei auf eine Hybond-Nitrozellulosemembran aufgelegt. Um die Trenngel-Membranvorrichtung wurde ein Sandwich gebildet, in dem zwei puffergetränkte Lagen 3M-Whatman-Filterpapiere je Seite und die Blotvorrichtung gemäß Herstellerangaben

verwendet wurden. Zum Proteintransfer wurde das Sandwich in die Blotkammer eingesetzt und zusammen mit eiskaltem Blotpuffer bei 100 V, 4 °C für 1 h und 30 min geblottet. Um den Transfererfolg zu beurteilen, wurde die Membran reversibel mit Ponceau-S gefärbt. Anschließend wurde sie mit A. bidest. gewaschen, bis das Ponceau-S vollständig entfernt war.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Nitrozellulosemembran mit Blockpuffer 1 h bei Raumtemperatur unter leichten Schwenkbewegungen inkubiert. Danach wurde sie über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechenden primären Antikörper in Blockpuffer mit 0,1 % Tween20-Zusatz inkubiert. Nach dreimaligem, jeweils fünfminütigem Waschen (PBS + 0,1 % Tween20) wurde für 1 h bei Raumtemperatur ein gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichteter Antikörper eingesetzt (1:2000 in Blockpuffer verdünnt). Diese sekundären Antikörper wurden schließlich durch zweimaliges Waschen mit PBS + 0,1 % Tween20 und nochmaliges doppeltes Waschen mit PBS von der Blotmembran entfernt.

Die am primären Antikörper gebundenen mit IRDye800 oder Cy5.5 markierten sekundären Antikörper wurden mit einem speziellen lasergestützten Detektionssystem (Odyssee Infrared Imaging System) detektiert und mit einer entsprechenden Software nach den Herstellervorgaben bearbeitet.

3.2.3.7 Immunpräzipitation

Für die Durchführung der Immunpräzipitation wurden die Zellen wie im Kapitel Western Blot (3.2.3.6) lysiert. Nach der Bestimmung des Gesamtproteingehaltes mittels BioRad Protein-Assay nach Bradford wurde das Lysat auf einen einheitlichen Proteingehalt von 1 mg/200 µl mit Phosphoproteinwaschpuffer eingestellt. Zu jedem Ansatz wurde im Anschluss 1 µg der entsprechenden Antikörper gegeben, und die Proben wurden anschließend für 15 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Danach wurden jeweils 30 µl Protein Agarose A und G Beads pro Ansatz zugefügt und die Suspensionen zwei weitere Stunden bei 4 °C rotiert. Die an die Agarose gebundenen Antikörper-Proteinkomplexe wurden durch Zentrifugation (1 min; 20000 g) sedimentiert und durch dreimaliges Waschen mit jeweils 1000 µl Phosphoproteinwaschpuffer von Fremdprotein befreit. Jeder Waschschrift wurde durch erneutes Zentrifugieren unterbrochen. Nach dem letzten Waschen wurde der Überstand gründlich entfernt und die gebundenen Proteine durch Zugabe von 50 µl Lämmli-puffer und fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C von den Beads gelöst. Anschließend folgte eine letzte Zentrifugation und 10 µl Überstand pro Ansatz wurden auf das vorbereitete Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese, der Blotvorgang und die Antikörperdetektion erfolgten wie im Kapitel Western Blot (3.2.3.6) beschrieben.

3.2.3.8 Adhäsionsassay

Die A549 und die primären Bronchialepithelzellen wurden in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte ausgesät, für 5 Tage inkubiert und anschließend wie bereits beschrieben mit *M. catarrhalis* (O35E, O35E.1) bzw. *E. coli* (wt, Opa B) in einer Konzentration von 1×10^7 cfu/ml für 1 h stimuliert. Die in diesem Versuch verwendeten Antikörper wurden bereits eine Stunde vor der Bakterienstimulation vorinkubiert. Um am Ende der Inkubationszeit nicht adhärenente Bakterien zu entfernen, wurden die Zellen fünf mal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Epithelzellen mit Hilfe von je 250 μ l Trypsin aus den Vertiefungen gelöst und die Zellsuspensionen in 1,5 ml Röhrchen überführt. Nach kräftigem Vortexen wurden je 100 μ l der einzelnen Proben auf LB- bzw. schafblutsupplementierten BHI-Agar gegeben. Nach 12 h Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die koloniebildenden Einheiten je Platte ausgezählt. Der gesamte Versuch erfolgte im Doppelansatz.

3.2.3.9 Biolumineszenzassay (Luziferase- und β -Galaktosidase-Reporterassay)

Die zuvor transfizierten und dann stimulierten HEK293 Zellen wurden nach Ablauf der Stimulationszeit von 4 h mit 200 μ l Reporter-Lysepuffer (1:5 in Aqua dest. verdünnt) lysiert und für 20 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Für die Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden 5 μ l Zellextrakt in ein Messröhrchen gegeben und in der Messkammer des Luminometers platziert. Die Chemilumineszenz wurde durch Zugabe von 20 μ l Luziferin-Reaktionsgemisch des Luziferase-Assay-Systems je Probe für 5 s gemessen.

Für die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurde der „ β -Gal-Reporterassay Chemilumineszenz-Kit“ eingesetzt. Dafür wurden 5 μ l des jeweils gleichen Zellextrakts wie bei der Luziferase-Aktivitätsmessung in ein Messröhrchen gegeben und mit 10 μ l einer 1:100 in Assay diluent verdünnten Lösung A für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Chemilumineszenzreaktion wurde durch Zugabe von 5 μ l Lösung B (Enhancer:Initiation im Verhältnis 1:6) je Probe unmittelbar vor der Messung ausgelöst. Die Messung erfolgte im Luminometer über einen Zeitraum von 5 s.

Die erhaltenen Luziferase-Werte wurden zur Normalisierung der Transfektions-Effizienzen durch die β -Galaktosidase-Werte dividiert und als relative Lichteinheiten (engl.: *relative light units*; RLU) angegeben.

3.2.4 Statistik

Alle gezeigten Versuche wurden mindestens dreimal erfolgreich durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des „One way ANOVA“- und des „Newmann Keuls post“-Tests. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p < 0,05$) als signifikant betrachtet und mit einem Stern markiert. Zur Erstellung der Balkendiagramme und für die Berechnung der Mittelwerte, Mittelwertabweichungen und Signifikanzen wurde das Programm PRISM5.0 (GraphPad Prism ®) verwendet.

Für die Darstellung der Konfokalmikroskopie, der Facs-, Western Blot- sowie PCR-Analysen wurden jeweils repräsentative Abbildungen von mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen mit dem gleichen Ergebnis gewählt.

4 Ergebnisse

4.1 Expression und Lokalisation der CEACAM Rezeptoren auf humanem pulmonalen Epithel

Die Expressionsmuster humaner CEACAM Rezeptoren im Gastrointestinaltrakt sind bereits gut untersucht, wohingegen über die Verteilung in der Lunge nur sehr wenig bekannt ist. Im Gegensatz zu CEACAM3 und 8, die bisher nur auf Granulozyten beschrieben wurden, wurden CEACAM1, 6, 7 und CEA bereits auf verschiedenen Epithelien außerhalb des Respirationstraktes nachgewiesen. Aus diesem Grund beschränkt sich die systematische Untersuchung der Expression von CEACAM Rezeptoren auf pulmonalen Epithelzellen in dieser Arbeit auf diese vier Vertreter der CEACAM-Familie.

Mit Hilfe der PCR wurde die Expression von CEACAM1-, 6-, 7- und CEA-mRNA in der Alveolarkarzinomzelllinie A549, der virustransformierten Bronchialepithelzelllinie Beas2B, in primären Bronchialepithelzellen sowie in der Nierenepithelzelllinie HEK293 untersucht. Dazu wurde das Zelllysat der entsprechenden unstimulierten Zellen mittels CEACAM1-, 6-, 7- bzw. CEA-spezifischen Primern getestet. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Gesamtmenge an mRNA in den verschiedenen Ansätzen wurde eine PCR mit spezifischen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)-Primern angesetzt.

Die Abbildung 4-1a zeigt hohe mRNA-Level von CEACAM1, 6 und CEA in A549 Zellen und deutlich messbare mRNA-Mengen dieser drei Rezeptoren in primären Bronchialepithelzellen. In den Beas2B Zellen und in der Nierenepithelzelllinie HEK293 war mittels PCR nahezu keine CEACAM-Expression nachweisbar. CEACAM7-mRNA konnte nur in A549 Zellen gefunden werden.

Um festzustellen, welche Zellen CEACAM1, 6, 7 und CEA tatsächlich auf der Zelloberfläche exprimieren, wurden unstimulierte Zellen mittels FACS untersucht.

In Abbildung 4-1b ist zu erkennen, dass nur CEACAM1 in größerer Menge auf der Zelloberfläche von A549 und von primären Zellen exprimiert wird. Beas2B Zellen hingegen zeigen eine sehr niedrige CEACAM1-Expression. Während CEA und CEACAM6 auf allen Zellen in wesentlich geringerer Menge nachgewiesen werden konnten, scheint CEACAM7 überhaupt nicht auf der Zelloberfläche dieser Zellen exprimiert zu werden.

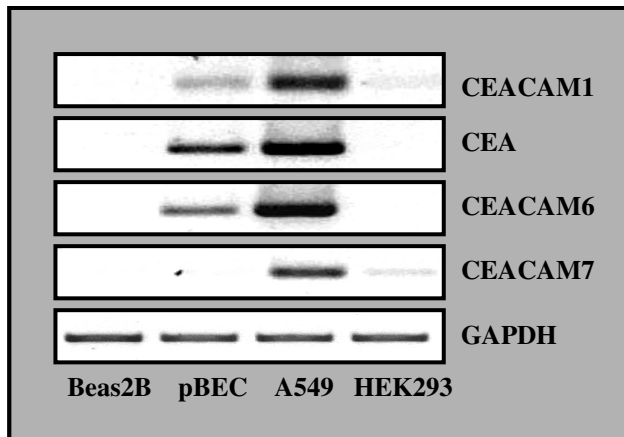
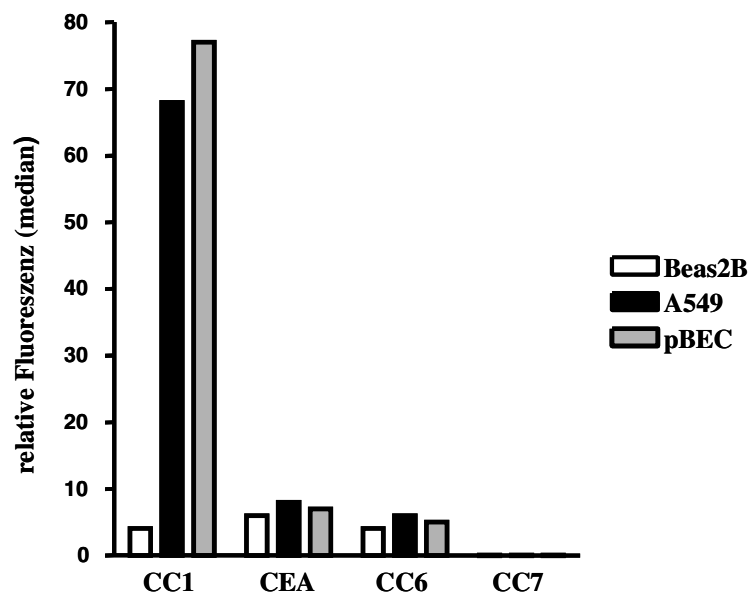


Abb. 4-1: Expression von CEACAM1, 6, 7 und CEA auf pulmonalem Epithel

4-1a: Die Expression der verschiedenen CEACAM Rezeptoren auf Beas2B, A549, HEK293 und primären Bronchialepithelzellen (pBEC) wurde durch die semiquantitative Bestimmung der entsprechenden mRNA ermittelt. Die hier dargestellte RT-PCR ist eine repräsentative Abbildung von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Bestimmung der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) diente der Kontrolle der gleichen Menge an eingesetzter Gesamt-mRNA.



4-1b: Die Quantifizierung von CEACAM1, CEA, CEACAM6 und 7 (CC1, CEA, CC6, CC7,) auf der Oberfläche der verschiedenen pulmonalen Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Facs). Dazu wurden jeweils 2×10^5 Zellen zuerst für eine Stunde mit Hilfe spezifischer Antikörper und anschließend für eine weitere Stunde mit einem entsprechenden FITC-gekoppelten Antikörper inkubiert. Die Hintergrundfluoreszenz wurde mit Hilfe entsprechender Immunglobuline an Stelle spezifischer primärer Antikörper bestimmt. Der hier abgebildete Graph zeigt eine repräsentative Abbildung von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Expression von CEACAM1 auf der Zelloberfläche für die bakterielle Adhäsion und für weitere Pathogen-Wirts-Interaktionen die größte Bedeutung zukommt.

4.2 Expression von TLR2 auf humanem pulmonalen Epithel

Die Expression von TLR2 wurde bereits auf verschiedenen pulmonalen Epithelzelllinien nachgewiesen. Da sie für die folgenden Versuche jedoch von entscheidender Bedeutung ist, wurden die Literaturergebnisse für die in der Arbeit angewendeten Zelllinien nachvollzogen und die Expression von TLR2 auf primären Bronchialepithelzellen neu untersucht.

Hierfür wurden unstimulierte Zellen mit Hilfe TLR2-spezifischer Primer zunächst mittels PCR untersucht. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Gesamtmenge an mRNA in den verschiedenen Ansätzen wurde wiederum eine PCR mit spezifischen GAPDH-Primern angesetzt.

Sowohl in den Zelllinien A549 und Beas2B als auch in den primären Bronchialepithelzellen ließen sich deutliche TLR2-mRNA-Level feststellen (Abb. 4-2a). HEK293 Zellen exprimierten erwartungsgemäß kein TLR2. Mittels Facs wurde die Expression von TLR2 auf der Oberfläche der genannten Zellen bestätigt (Abb.4-2b).

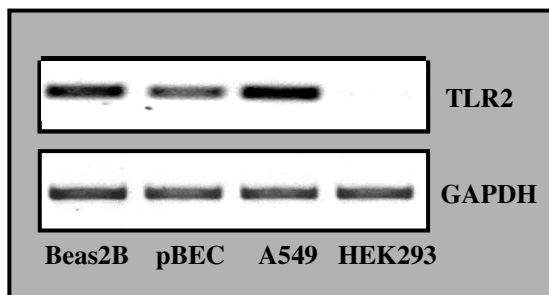
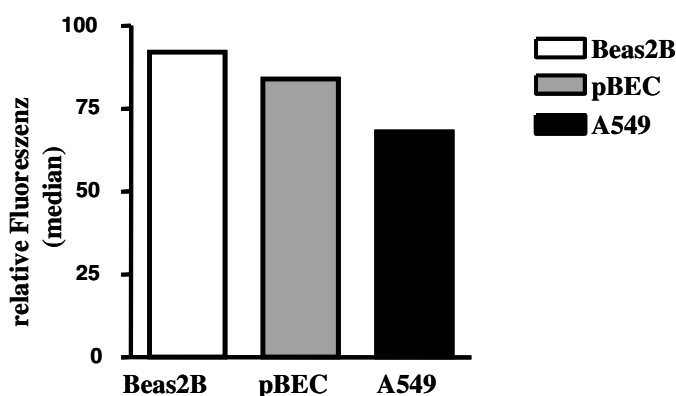


Abb. 4-2: Expression von TLR2 auf pulmonalem Epithel

4-2a: Die Expression von TLR2 auf Beas2B, A549, HEK293 und primären Bronchialepithelzellen wurde durch die semiquantitative Bestimmung der entsprechenden mRNA ermittelt. Die hier dargestellte RT-PCR ist eine repräsentative Abbildung von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Bestimmung der GAPDH diente der Kontrolle der gleichen Menge an eingesetzter Gesamt-mRNA.



4-2b: Die Quantifizierung von TLR2 auf der Oberfläche der verschiedenen pulmonalen Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Facs). Dazu wurden jeweils 2×10^5 Zellen zuerst für eine Stunde mit einem TLR2-spezifischen Antikörper und anschließend für eine weitere Stunde mit einem entsprechenden FITC-gekoppelten Antikörper inkubiert. Die Hintergrundfluoreszenz wurde mit Hilfe entsprechender Immunglobuline an Stelle spezifischer primärer Antikörper bestimmt. Der hier abgebildete Graph zeigt eine repräsentative Abbildung von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Für die weiteren Untersuchungen eines möglichen Zusammenwirkens beider Rezeptoren wurden im Folgenden nur noch die Alveolarkarzinomzelllinie A549 und die primären Bronchialepithelzellen betrachtet, da die Beas2B Zellen zwar TLR2 aber keine nennenswerten Mengen an CEACAM1 exprimierten.

4.3 Expression von TLR2 und CEACAM1 nach Stimulation mit *M.catarrhalis* auf pulmonalen Epithelzellen

Zuerst wurde der Einfluss von *M. catarrhalis* auf die Expression von TLR2 und CEACAM1 auf beiden Zelllinien mittels semiquantitativer PCR untersucht.

Hierzu wurden die Zellen mit *M. catarrhalis* in einer Konzentration von 10^5 cfu/ml über 6, 12 und 24 h stimuliert und anschließend im Vergleich zu unstimulierten Zellen mit Hilfe spezifischer Primer in der PCR untersucht.

Abb. 4-3 zeigt eine deutliche zeitabhängige Expressionssteigerung von TLR2 auf A549 Zellen ab 12 h Stimulation. Die Expression von CEACAM1 auf A549 stieg nach 6 h langsam an.

Auch auf primären Bronchialepithelzellen führte eine Stimulation mit *M. catarrhalis* zu einer zeitabhängigen Expressionssteigerung von TLR2. Die CEACAM1-Expression wurde ebenfalls zeitabhängig gesteigert und erreichte nach 12 h Stimulation ähnlich wie auf den A549 Zellen eine Art Plateau.

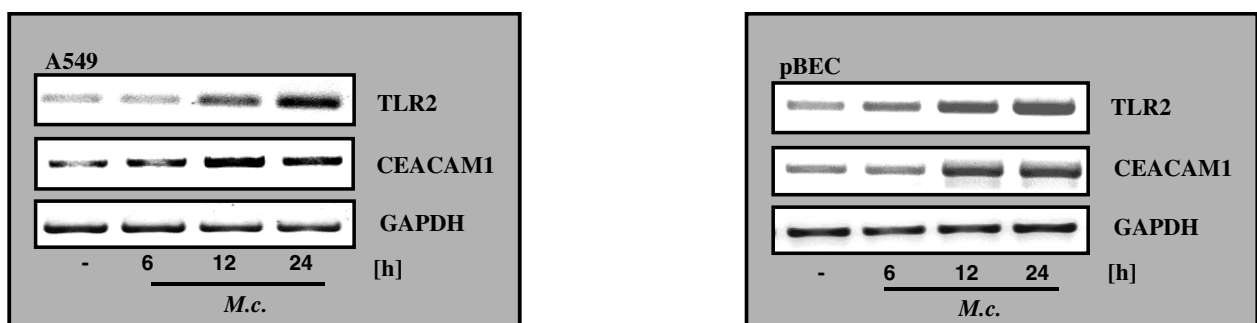


Abb. 4-3: Zeitabhängige Expression von TLR2 und CEACAM1 auf pulmonalem Epithel nach Stimulation mit *M. catarrhalis*

Die zeitliche Abhängigkeit der TLR2- bzw. CEACAM1-Expression auf A549 und primären Bronchialepithelzellen (pBEC) nach *Moraxella (M.c.)*-Stimulation (*O35E*, 10^5 cfu/ml; 6, 12 und 24 h) wurde durch die semiquantitative Bestimmung der TLR2- bzw. CEACAM1-mRNA ermittelt. Die hier dargestellte RT-PCR ist eine repräsentative Abbildung von insgesamt drei unabhängig voneinander angesetzten Stimulationen und daraus resultierenden RT-PCR Ansätzen. Die Bestimmung der GAPDH diente der Kontrolle der gleichen Menge an eingesetzter Gesamt-mRNA.

4.4 Kolokalisation von CEACAM1 und TLR2 in HEK293 Zellen

CEACAM1 und TLR2 werden auf der Oberfläche von A549 Zellen und primären Bronchialepithelzellen stark exprimiert. Um die Lokalisation beider Rezeptoren noch genauer zu bestimmen und eine mögliche Kolokalisation zu untersuchen, wurden transienttransfizierte HEK293 Zellen in der Konfokal-Laser-Mikroskopie untersucht.

Wie bereits gezeigt, exprimieren HEK293 Zellen weder CEACAM1 noch TLR2 auf der Zelloberfläche. Für die Untersuchungen wurden diese Zellen nun mit CEACAM1- und GFP-tragenden TLR2-Expressionsplasmiden transient kotransfiziert, die anschließend mit entsprechenden spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht wurden.

Die Abb. 4-4.I und II zeigen eine deutliche Expression von TLR2 (grün) bzw. CEACAM1 (rot) auf der Zelloberfläche nach der Transfektion. Die Überlagerung beider Bilder (Abb. 4-4.III) liefert eine eindeutige partielle Kolokalisation beider Rezeptoren auf der Zelloberfläche (gelb), die in verschiedenen Schnittebenen (Abb. 4-4.IV) nachvollzogen werden kann.

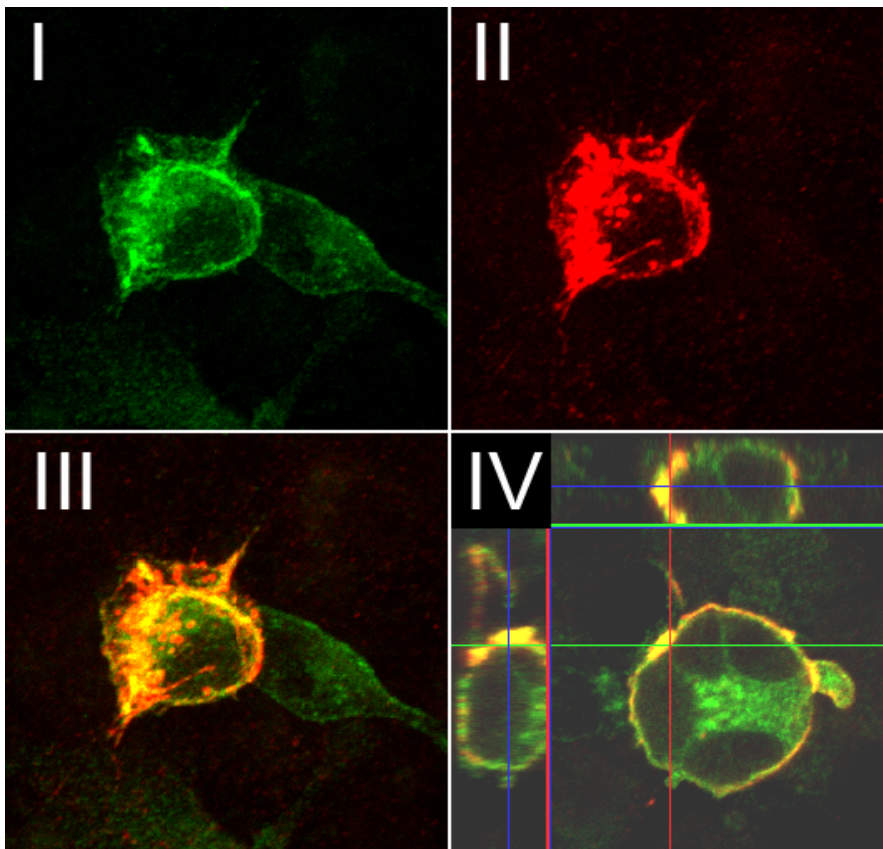


Abb. 4-4: Kolokalisation von TLR2 und CEACAM1 auf transfizierten HEK293 Zellen

Mittels konfokaler Laser-Mikroskopie wurden die Expressionsmuster von TLR2 und CEACAM1 genauer untersucht. Dazu wurden HEK293 Zellen mit CEACAM1- (rot) und GFP-markierten TLR2- (grün) Expressionsplasmiden transient kotransfiziert und anschließend markiert. Die gelben Abschnitte in der Abbildung zeigen eine Überlagerung bzw. Kolokalisation beider Rezeptoren. Die hier dargestellte Abbildung ist eine repräsentative Darstellung von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

4.5 TLR2-vermittelte Aktivierung von NF- κ B und IL8 durch *M. catarrhalis*

M. catarrhalis besitzt „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMP), welche von der angeborenen Immunität durch „pattern recognition receptors“ (PRR) wie z. B. die „Toll-like Rezeptoren“ (TLR) erkannt werden. Für die Erkennung von *M. catarrhalis* kommen, wie bereits erwähnt, hauptsächlich folgende zwei Toll-like Rezeptoren in Frage: zum einen TLR4 und zum anderen TLR2, welcher bakterielle Zellmembranbestandteile wie Lipoteichonsäuren und Peptidoglykane erkennt. Die Bindung der PAMPs an Toll-like Rezeptoren führt zur Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges.

Zur Bestätigung der durch Moraxellen induzierten Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges wurde die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 mit einem NF- κ B-abhängigen Luziferase-Reporter-Konstrukt mittels Kalziumphosphat-Methode transient transfiziert. Um die Aktivität eines Promotors in der Zelle zu untersuchen, kann dieser Promotor vor ein Reportergen kloniert werden. Der Promotor steuert dann die Aktivität dieses Reportergens. In der Regel werden Reportergene eingesetzt, deren Expression mit einfachen Techniken leicht nachzuweisen ist. Dafür eignen sich das β -Galaktosidase- und das Luziferase-Gen. Da HEK293 Zellen kein TLR2 exprimieren, wurde außerdem ein humanes TLR2-Plasmid sowie ein RSV- β -Galaktosidase-Konstrukt zum Abgleich der Transfektionseffizienz („relative light units“; RLU) kotransfiziert. Nach einer Ruhephase von 24 h wurden die Zellen für 5 h mit verschiedenen Konzentrationen von *M. catarrhalis* stimuliert.

In den transfizierten Zellen (siehe Abb. 4-5a) zeigte sich eine deutlich konzentrationsabhängige Aktivierung von NF- κ B, wohingegen untransfizierte Zellen erwartungsgemäß keine Aktivierung zeigten. Schon bei einer Konzentration von 10^4 cfu/ml war eine signifikante Aktivierung von NF- κ B zu erkennen. Der Einsatz von 10^5 cfu/ml entsprach annähernd der durch den synthetischen TLR2-Agonisten Pam₃CSK₄ hervorgerufenen NF- κ B-Aktivität.

Die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges führt unter anderem zur Sekretion des inflammatorischen Zytokins IL8. Werden HEK293 Zellen mit dem oben genannten TLR2 Expressionsplasmid mit Hilfe des Superfekt Transfektions Reagenz (Quiagen) transfiziert, ist aufgrund der besseren Transfektionseffizienz dieses Verfahrens nach Stimulation der Zellen sogar die Sekretion von IL8 im Elisa messbar. Dafür werden die Zellen 24 h nach der Transfektion für 15 h mit *M. catarrhalis* in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert und anschließend die Zellüberstände mittels IL8-Elisa untersucht.

Abb. 4-5b zeigt die dosisabhängige Sekretion von IL8 in transfizierten HEK Zellen. Untransfizierte Zellen sezernierten kein IL8. Die Höhe der IL8-Sekretion korrelierte dabei mit der entsprechenden NF- κ B-Aktivierung.

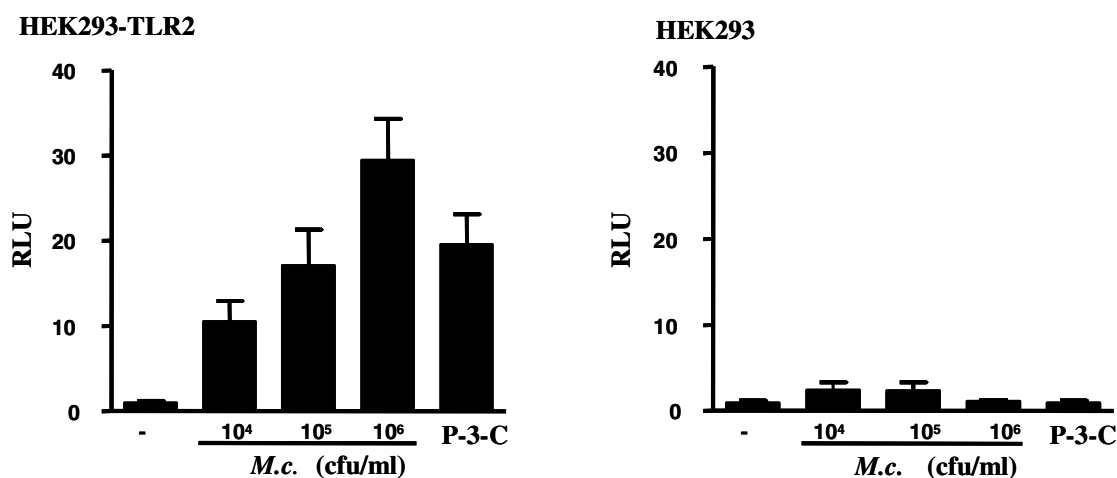
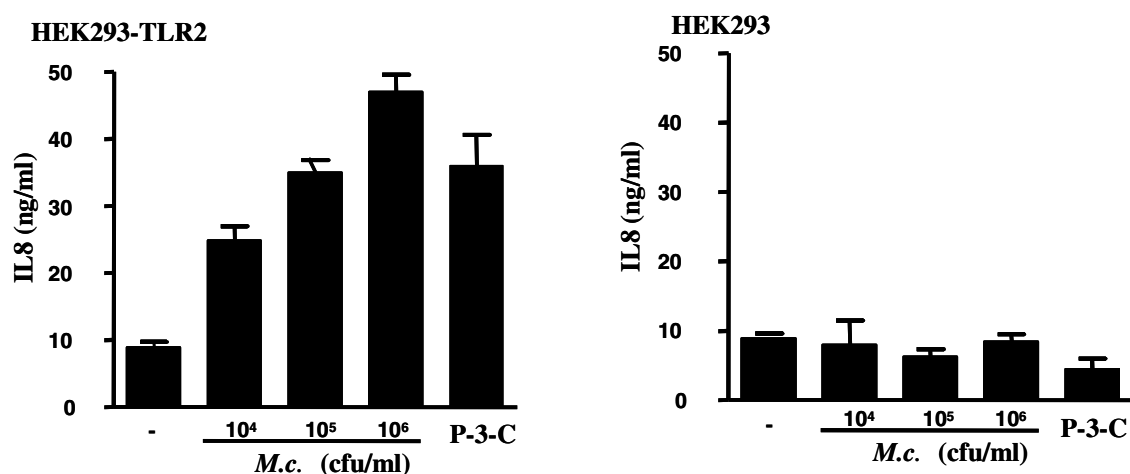


Abb. 4-5: Dosisabhängige Aktivierung der TLR2-vermittelten NF- κ B-Aktivierung bzw. IL8-Freisetzung durch *M. catarrhalis*

4-5a: Die Abbildung zeigt die relative Luziferaseaktivität in den Zelllysaten transient mit TLR2, NF- κ B und β -Gal transfizierter HEK293 Zellen 5 h nach Stimulation mit *M. catarrhalis* (*M.c.*, O35E). Die hier gezeigten RLU („relative light units“); ergeben sich aus dem Quotienten von NF- κ B-Luziferaseaktivität und β -Galaktosidaseaktivität als Maß für die Transfektionseffizienz. Als Positivkontrolle wurden 100 ng/ml Pam₃CSK₄ (P-3-C) eingesetzt. Die Abbildung zeigt die Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen wobei jeder einzelne Wert als Duplikett angelegt war.



4-5b: Die Abbildung zeigt die Quantifizierung von IL8 im Überstand *Moraxella*-infizierter transient mit TLR2-Expressionsplasmid transfizierter HEK293 Zellen, gemessen 15 h nach der Stimulation mit *M. catarrhalis* (*M.c.*, O35E). Als Positivkontrolle wurden 100 ng/ml Pam₃CSK₄ (P-3-C) eingesetzt. Die hier abgebildeten Graphen zeigen die Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen, in denen die einzelnen Werte je als Duplikett angelegt waren.

4.6 Die UspA1-CEACAM1-Interaktion hat einen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion von *M. catarrhalis* an pulmonalen Epithelzellen

Als nächstes wurde die Rolle der UspA1-CEACAM1-Interaktion für die Adhäsion von *M. catarrhalis* an pulmonale Epithelzellen untersucht. Das Oberflächenprotein UspA1 von *M. catarrhalis* bindet spezifisch an die extrazellulär gelegene N-Domäne von CEACAM1. Um die Bedeutung dieser Bindung für die Adhäsion der Bakterien an die Zellen zu untersuchen, wurden A549 und pulmonale Epithelzellen mit dem *Moraxella*-Wildtyp *O35E* sowie mit der UspA1-defizienten Mutante *O35E.1* stimuliert und die Adhäsion anschließend mittels cfu-basiertem Adhäsionsassay untersucht. Der *Moraxella*-Wildtyp adhärierte sowohl an A549 als auch an primären Zellen sehr gut, wohingegen die Adhäsion der UspA1-defizienten Mutante auf beiden Zellsystemen signifikant verringert war (Abb. 4-6). Wurde die N-Domäne von CEACAM1 durch Präinkubation mit einem spezifischen Antikörper besetzt, konnte die Adhäsion des Wildtyps ebenfalls deutlich reduziert werden. Bei Präinkubation der Zellen mit einem entsprechenden Kontrollantikörper trat dieser Effekt nicht ein.

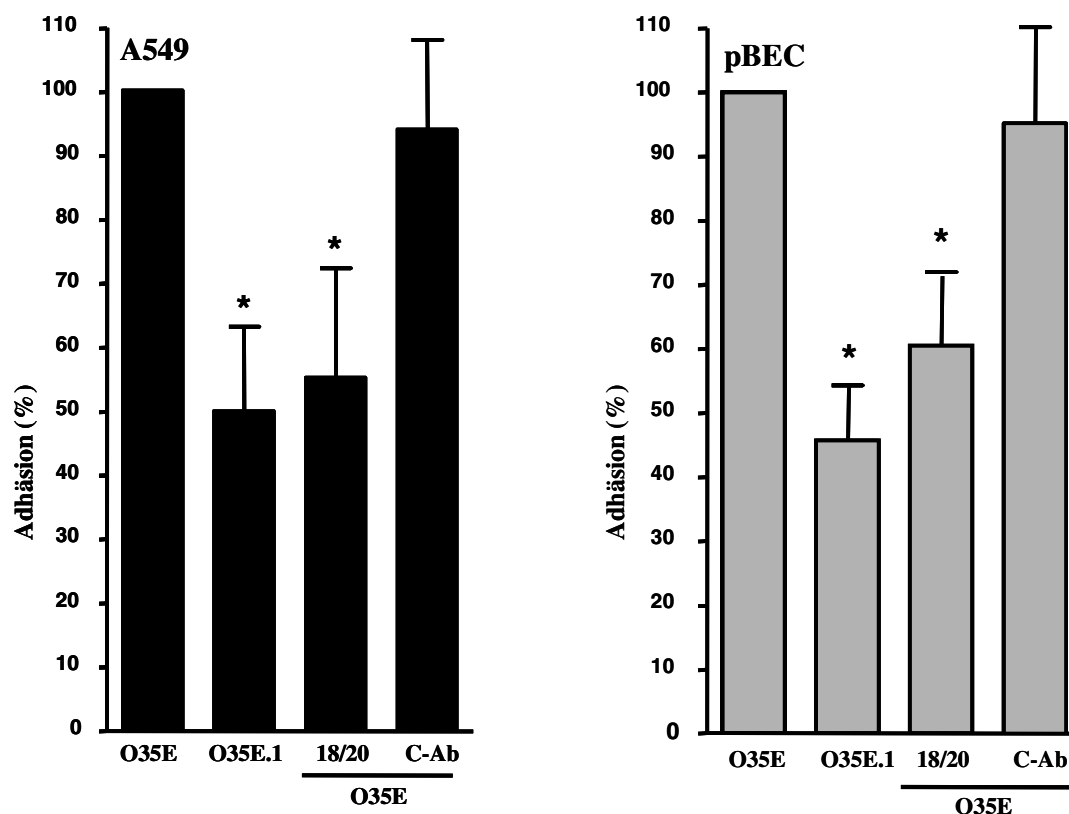


Abb. 4-6: Adhäsion von *M. catarrhalis* an pulmonalem Epithel

Die Adhäsion der beiden *Moraxella*-Stämme *O35E* und *O35E.1* an A549 und pulmonale Bronchialepithelzellen (pBEC) wurde nach Stimulation (10^7 cfu/ml, 1h) und anschließendem gründlichen Waschen der Zellen mit Hilfe eines cfu-basierten Assays untersucht. Die Präinkubation zur Blockierung der N-Domäne erfolgte mit einem spezifischen Antikörper (18/20, 1h). Als Negativkontrolle diente ein entsprechender nicht CEACAM1 bindender Kontrollantikörper (C-Ab). Die hier abgebildeten Graphen zeigen die Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen, in denen die einzelnen Werte je als Duplikett angelegt waren. Signifikante Unterschiede in der Adhäsion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

4.7 Die Interaktion von *Moraxella*-UspA1 und CEACAM1 reduziert die IL8-Sekretion pulmonaler Epithelzellen

Um die funktionelle Bedeutung der *Moraxella*-UspA1-CEACAM1-Interaktion auf A549 und primären Zellen zu untersuchen, wurde die IL8-Antwort beider Zelltypen nach Stimulation mit dem UspA1-exprimierenden *Moraxella*-Wildtyp und der UspA1-defizienten Mutante verglichen.

Die Zellen wurden hierzu für 15 h mit 10^5 cfu/ml der entsprechenden Bakterien stimuliert und anschließend der IL8-Gehalt mittels IL8-Elisa im Zellüberstand bestimmt.

Die Stimulation mit dem *Moraxella*-Wildtyp (*O35E*) führte in beiden Zelltypen zu einer deutlichen IL8-Antwort (Abb. 4-7a). Obwohl wir gezeigt haben, dass die *O35E*-Mutante aufgrund des Fehlens von UspA1 signifikant schlechter an beide Zelltypen bindet, führte die Stimulation der Zellen in gleicher Konzentration über den gleichen Zeitraum zu einer signifikant höheren IL8-Sekretion (Abb. 4-7a). Die IL8-Antwort zeigte sich ebenfalls deutlich erhöht, wenn die Zellen vor der Stimulation mit dem *M. catarrhalis*-Wildtyp mit einem an die N-Domäne bindenden CEACAM1 Antikörper (18/20) vorinkubiert wurden (Abb. 4-7b). Die Vorinkubation mit einem entsprechenden Kontrollantikörper hatte keine Erhöhung der IL8-Sekretion zur Folge.

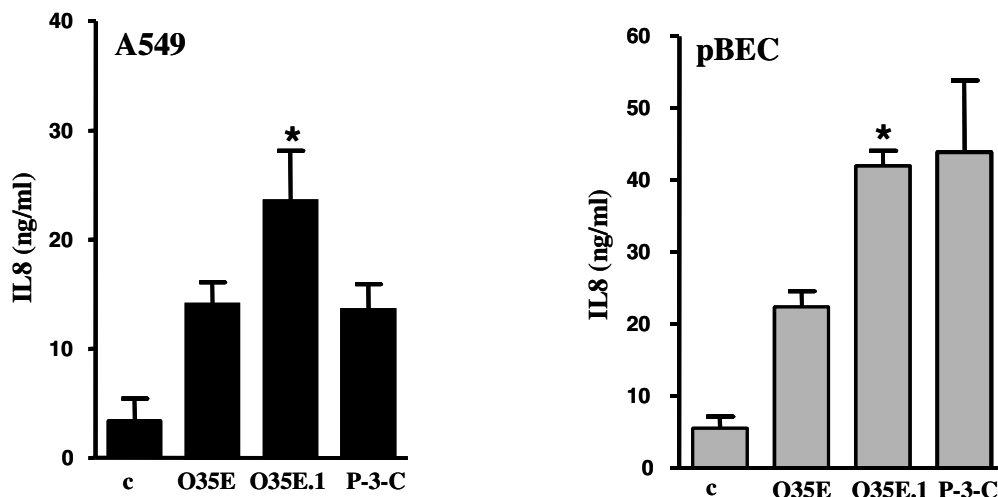
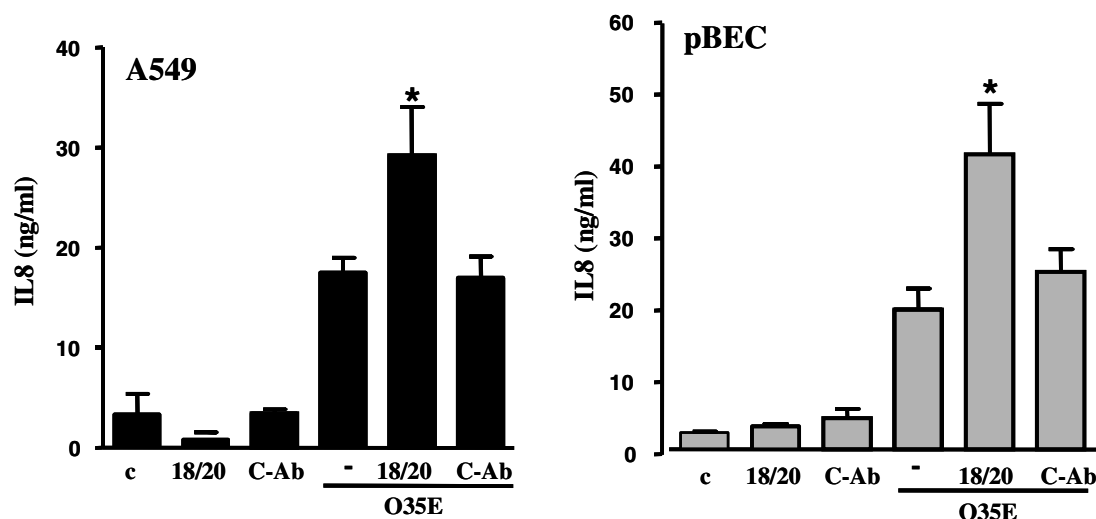


Abb. 4-7: Auswirkungen der UspA1-CEACAM1-Interaktion auf die IL8-Sekretion pulmonaler Epithelzellen

4-7a: Die Abbildung zeigt die Quantifizierung von IL8 im Überstand *Moraxella*-infizierter A549 und primärer Bronchialepithelzellen (pBEC), gemessen 15 h nach der Stimulation mit *O35E* bzw. *O35E.1* (10^5 cfu/ml). Als Positivkontrolle wurden 100 ng/ml Pam₃CSK₄ (P-3-C) eingesetzt.



4-7b: Diese Abbildung stellt ebenfalls die IL8-Sekretion von A549 und primären Bronchialepithelzellen (pBEC) nach 15 stündiger Stimulation mit dem *Moraxella*-Wildtyp (O35E, 10^5 cfu/ml) dar. Zuvor wurden diese Zellen jedoch über eine Stunde mit einem spezifisch an die N-Domäne von CEACAM1 bindenden (18/20) bzw. einem Kontrollantikörper (C-Ab) vorinkubiert.

Die hier abgebildeten Graphen zeigen die Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen, in denen die einzelnen Werte je als Duplikett angelegt waren. Signifikante Unterschiede in der IL8-Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Um mögliche Veränderungen der Zellviabilität als Ursache für die oben beschriebenen Beobachtungen auszuschließen, wurden die stimulierten Zellen im Facs, basierend auf einem Annexin V und Propidiumiodid Assay, auf apoptotische bzw. nekrotische Zellpopulationen untersucht. Für die beschriebenen Stimulationsbedingungen konnte keine Beeinträchtigung der Zellviabilität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

4.8 Gen-Silencing von CEACAM1 führt zu einer Verstärkung der *M. catarrhalis*-induzierten IL8-Sekretion

Die gezielte Gen-Inaktivierung (engl.: *gene silencing*) oder RNA-Interferenz (RNAi) mittels synthetischer, kurzer interferierender RNA-Moleküle (siRNA, engl.: *small interfering RNA*) dient als leistungsfähige experimentelle Methode der funktionellen Genomforschung.

Im Folgenden haben wir dieses Verfahren zur genaueren Untersuchung der regulatorischen Funktion von CEACAM1 für die *M. catarrhalis*-vermittelte IL8-Sekretion auf pulmonalem Epithel angewendet. Da die primären Bronchialepithelzellen sehr empfindlich auf die Transfektion reagierten, wurden für diese Versuche die gut transfizierbaren A549 Zellen verwendet.

Die Zellen wurden mit CEACAM1-spezifischer siRNA behandelt und der Zeitpunkt des optimalen Knock-down mittels PCR bestimmt (Abb. 4-8a). Die Kontroll siRNA hatte keinen Einfluss auf die in der PCR bestimmten CEACAM1-mRNA-Level. Für die anschließenden

funktionellen Untersuchungen wurden die transfizierten Zellen mit *M. catarrhalis* in zwei unterschiedlichen Konzentrationen zum Zeitpunkt des optimalen Silencing (72h) über eine Zeitdauer von 15 h stimuliert.

Bei beiden Konzentrationen zeigten die mit CEACAM1 siRNA vorbehandelten Zellen eine deutlich höhere IL8-Sekretion als die mit Kontroll siRNA behandelten Zellen (Abb.4-8b). Diese Verstärkung fand bei Stimulation mit dem TLR2-Agonisten Pam₃CSK₄ nicht statt.

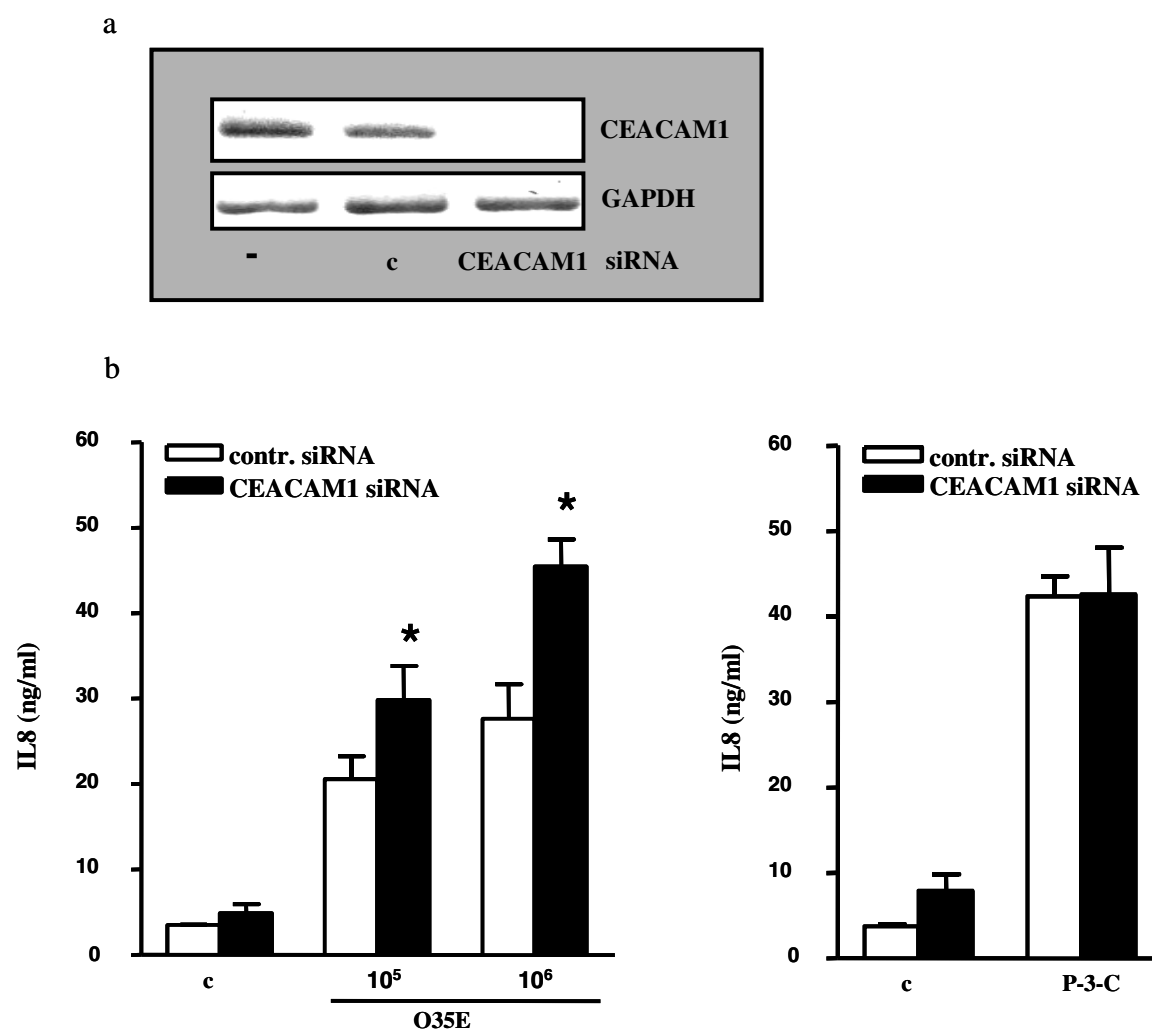


Abb. 4-8: CEACAM1-Abhängigkeit der *M. catarrhalis*-induzierten IL8-Sekretion

4-8a: Der optimale Zeitpunkt der Downregulation von CEACAM1 durch Transfektion spezifischer CEACAM1 siRNA auf A549 Zellen wurde durch die semiquantitative Bestimmung der entsprechenden mRNA ermittelt. Hierzu wurden Proben zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Nukleofektion untersucht (48 h, 72 h und 96 h). Als Kontrolle diente eine nicht kodierende Kontroll siRNA (c). Die hier dargestellte RT-PCR ist eine repräsentative Abbildung von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen zum Zeitpunkt von 72 h nach der Transfektion. Die Bestimmung der GAPDH diente der Kontrolle der gleichen Menge an eingesetzter Gesamt-mRNA.

4-8b: Abbildung b zeigt die Quantifizierung von IL8 im Überstand von CEACAM1 siRNA-transfizierten und anschließend mit *Moraxella* (O35E) infizierten A549 Zellen, gemessen 15 h nach der Stimulation. Als Positivkontrolle wurden 100 ng/ml Pam₃CSK₄ (P-3-C) eingesetzt. Die abgebildeten Graphen stellen die Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen dar, in denen die einzelnen Werte je als Duplikett angelegt waren. Signifikante Unterschiede in der IL8-Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

4.9 Die Hemmung der *Moraxella catarrhalis*-induzierten NF- κ B-Aktivierung durch CEACAM1 erfolgt über dessen ITIM-Domäne

Wie in den vorhergehenden Abbildungen gezeigt, hat die UspA1-CEACAM1-Interaktion einen entscheidenden Einfluss auf die *M. catarrhalis*-vermittelte IL8-Sekretion.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden HEK293 Zellen mit einem Kontrollvektor oder einem CEACAM1-Expressionsplasmid und einem NF- κ B-Luciferase-Reporterplasmid kotransfiziert. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die alleinige Expression von CEACAM1 keine messbare NF- κ B-Aktivierung nach fünfstündiger Stimulation mit dem *Moraxella*-Wildtyp bzw. dem TLR2-Agonisten Pam₃CSK₄ nach sich zog. Im Gegensatz dazu und wie schon in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt (Slevogt et al. 2006), führte die Überexpression der HEK293 Zellen mit TLR2 zu einer deutlichen *M. catarrhalis*- bzw. Pam₃CSK₄-abhängigen NF- κ B-Aktivierung (Abb. 4-9a).

In einem nächsten Schritt stellten wir die Hypothese auf, dass die UspA1-CEACAM1-Interaktion einen inhibitorischen Effekt auf die TLR2-vermittelte Immunantwort hat. Daraufhin führten wir Kotransfektionsversuche mit TLR2 in Kombination mit CEACAM1 Expressionsplasmiden durch. Die transfizierten Zellen wurden wiederum nach 24 h Ruhepause über 5 h mit *M. catarrhalis* (O35E) in einer Konzentration von 10⁵ cfu/ml stimuliert. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Kotransfektion von CEACAM1 die *M. catarrhalis*-induzierte TLR2-vermittelte NF- κ B-Aktivierung deutlich reduziert.

CEACAM1 besitzt in seinem zytoplasmatischen Teil eine ITIM-Domäne, welche eine wichtige Rolle für die CEACAM1-Signaltransduktion spielt. Wird der in dieser ITIM-Domäne liegende Tyrosinrest (Y459) durch Phenylalanin ersetzt (CC1 – Y459F), verliert die Domäne ihre katalytische Funktion. In einem weiteren Schritt haben wir Kotransfektionen der HEK293 Zellen mit TLR2 und einer CEACAM1-Mutante durchgeführt, deren ITIM-Domäne durch eine Mutation an dieser Stelle inaktiviert wurde. Eine Stimulation mit *M. catarrhalis* hatte hier eine signifikant stärkere NF- κ B-Aktivierung im Vergleich zu den nur mit TLR2-transfizierten Zellen zur Folge. Im Gegensatz dazu führte der Einsatz einer Mutante, bei der ein Aminosäureaustausch außerhalb der ITIM-Domäne (CC1 – Y486F) vorgenommen worden war, zu vergleichbaren Ergebnissen wie die Kotransfektion mit dem CEACAM1-Wildtypplasmid (Abb. 4-9b).

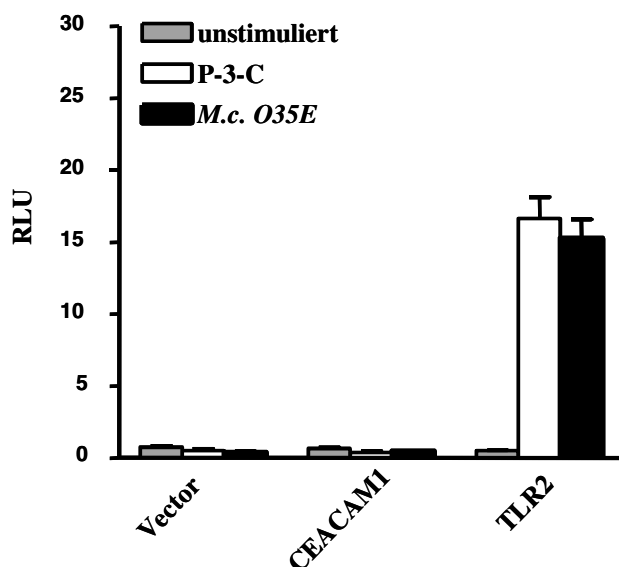
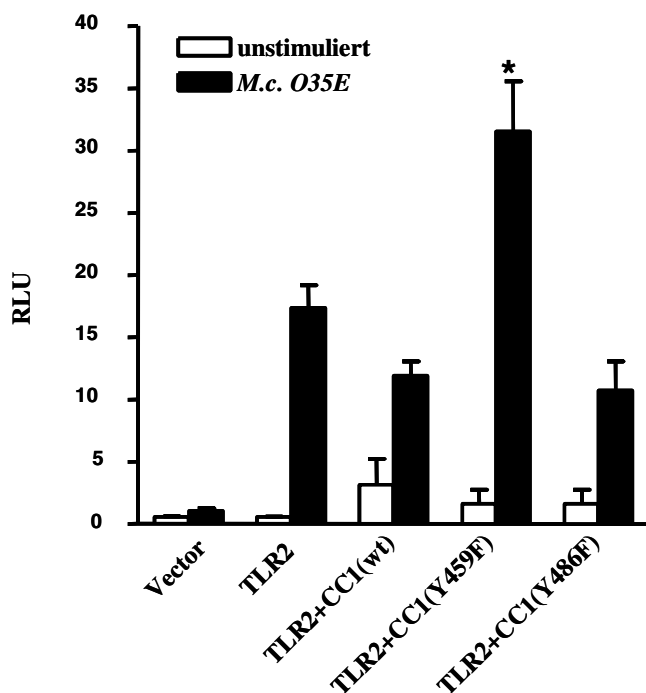


Abb. 4-9: Bedeutung der ITIM-Domäne von CEACAM1 für die Reduktion der *M. catarrhalis*-induzierten Aktivierung von NF- κ B

4-9a: Die Abbildung zeigt die relative Luziferaseaktivität in den Zelllysaten der transient mit CEACAM1 bzw. TLR2 sowie NF- κ B und β -Gal transfizierten HEK293 Zellen 5 h nach Stimulation mit *M. catarrhalis* (*O35E*, 10^5 cfu/ml). Die hier gezeigten RLU („relative light units“) ergeben sich aus dem Quotienten von NF- κ B-Luziferaseaktivität und β -Galaktosidaseaktivität als Maß für die Transfektionseffizienz. Als Positivkontrolle wurden 100 ng/ml Pam₃CSK₄ (P-3-C) eingesetzt.



4-9b: In der Abbildung sind die RLU („relative light units“) von Zelllysaten ebenfalls mit TLR2 und CEACAM1 kotransfizierten Zellen nach Stimulation mit *M. catarrhalis* *O35E* (10^5 cfu/ml, 6h) dargestellt. Allerdings wurden unterschiedliche CEACAM1-Konstrukte (CC1) für die Transfektion verwendet: der CEACAM1-Wildtyp mit intakter ITIM-Domäne (wt), eine Mutante in der ein in der ITIM-Domäne liegender Tyrosinrest durch Phenylalanin ersetzt wurde (Y459F) sowie eine Mutante mit einem Aminosäureaustausch außerhalb des ITIM (Y486F).

Beide Graphen zeigen die Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen, wobei jeder einzelne Wert als Duplikett angelegt war. Signifikante Unterschiede in der relativen Luziferaseaktivität ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

4.10 Die Bindung von UspA1 an CEACAM1 führt zu dessen Tyrosinphosphorylierung und zur Rekrutierung von SHP1

Die Bindung eines Liganden an CEACAM1 führt zur Phosphorylierung der ITIM-Domäne des Rezeptors und darauf folgend zur Rekrutierung verschiedener Phosphatasen wie SHP1 und SHP2.

Mittels Immunpräzipitation wurde deshalb untersucht, ob die Bindung des *Moraxella*-Wildtyps (*O35E*), der UspA1-defizienten Mutante (*O35E.1*) und des TLR2-Agonisten Pam₃CSK₄ ebenfalls eine Phosphorylierung der CEACAM1-ITIM-Domäne hervorruft und ob diese Aktivierung eine Rekrutierung der oben genannten Phosphatasen auslöst.

Zu diesem Zweck wurden A549 Zellen für 5 min mit Pam₃CSK₄ bzw. den entsprechenden Bakterien in einer Konzentration von 10⁷ cfu/ml stimuliert, anschließend lysiert und CEACAM1 mit einem entsprechenden CEACAM1-Antikörper immunpräzipitiert. Mit Hilfe des Western Blots bzw. der Ko-Immunpräzipitation wurde die Phosphorylierung von CEACAM1 und die anschließende SHP1-Rekrutierung nachgewiesen. Gleiche Mengen an CEACAM1 in den verschiedenen Ansätzen wurden mittels eines CEACAM1-spezifischen Antikörpers im Western Blot bestätigt.

In Abbildung 4-10 ist eine deutliche CEACAM1-Phosphorylierung nach Stimulation mit dem *Moraxella*-Wildtyp zu erkennen. Nach Inkubation der Zellen mit der UspA1-defizienten Mutante oder Pam₃CSK₄ kam es nicht zu dieser Reaktion. Pervanadat diente als Positivkontrolle für den Phosphorylierungsnachweis.

Mit Hilfe einer Ko-Immunpräzipitation wurden die Lysate anschließend auf die Präsenz von SHP1 getestet. Dabei zeigte sich, dass die Rekrutierung von SHP1 nur nach vorheriger Phosphorylierung von CEACAM1 stattfand. SHP2 konnte in der Ko-Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden.

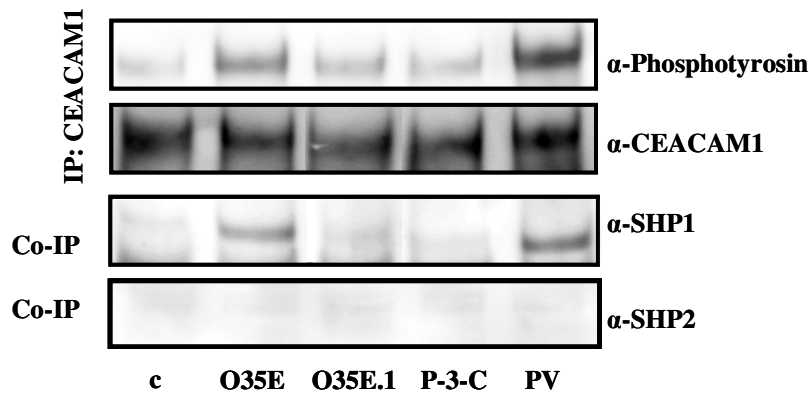


Abb. 4-10: UspA1-vermittelte Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1 sowie Rekrutierung von SHP1 an den aktivierten Rezeptor

Die mit *M. catarrhalis* (O35E, O35E.1, 10^7 cfu/ml) bzw. Pam₃CSK₄ (P-3-C) stimulierten A549 Zellen wurden nach 5 min lysiert. Das Lysat wurde über Nacht mit 2 µg eines CEACAM-Antikörpers immunpräzipitiert und nach Aufreinigung des gewonnenen Präzipitates mit entsprechenden SHP1- bzw. SHP2-spezifischen Antikörpern sowie einem Phosphotyrosinantikörper im Western Blot analysiert. Als Positivkontrolle für die Phosphorylierung diente Pervanadat (PV). Ein Western Blot mit einem spezifischen CEACAM1-Antikörper diente dem Nachweis gleicher Mengen von CEACAM1 in den verschiedenen Ansätzen. Die hier gezeigte Abbildung ist ein repräsentatives Gel von insgesamt drei unterschiedlichen Stimulationen und daraus resultierenden Western Blots.

4.11 Gen-Silencing von SHP1 führt zu einer Verstärkung der *M. catarrhalis*-induzierten IL8-Sekretion, Gen-Silencing von SHP2 hat dagegen keinen Einfluss

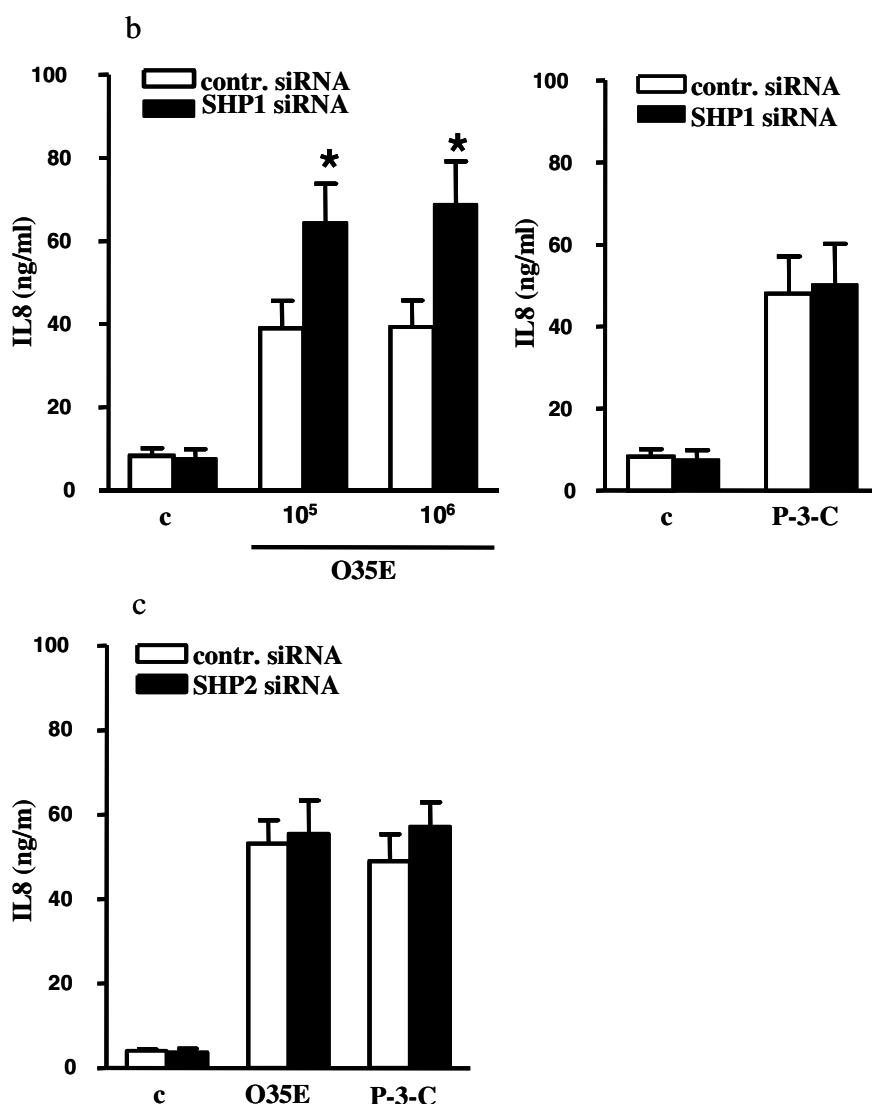
Um den Einfluss der SHP1- bzw. SHP2-Rekrutierung auf die mögliche CEACAM1-TLR2-Interaktion zu untersuchen, wurden weitere siRNA-Experimente durchgeführt. Durch spezifische siRNA gegen SHP1 und SHP2 wurde die Proteinexpression beider Phosphatasen deutlich reduziert. Der Zeitpunkt des optimalen Gen-Silencings wurde mittels Western Blot bestimmt. Dabei diente Aktin als Beladungskontrolle (Abb. 4-11a).

Abbildung 4-11b zeigt die IL8-Gehalte der Zellüberstände transfizierter A549 Zellen nach 15 h Stimulation mit dem *Moraxella*-Wildtyp. Während die Inhibition von SHP1 zu einer signifikanten Steigerung der *M. catarrhalis*-vermittelten IL8-Antwort im Vergleich zu mit Kontroll siRNA behandelten Zellen führte, war die Inhibition von SHP2 ohne Folgen für die IL8-Sekretion. Durch Stimulation der Zellen mit Pam₃CSK₄ ergaben sich weder nach Inhibition von SHP1 noch SHP2 Unterschiede in der IL8-Sekretion im Vergleich zur Kontrolle.



Abb. 4-11: SHP1-Abhängigkeit der *M. catarrhalis*-vermittelten IL8-Sekretion

4-11a: Die Bestimmung des optimalen Zeitpunkts des maximalen Gen-Silencings von SHP1 und 2 durch Transfektion spezifischer siRNA in A549 Zellen wurde mittels Western Blot vorgenommen. Hierzu wurden Proben an drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Nukleofektion untersucht (72 h, 96 h und 120 h). Als Kontrolle diente eine nicht kodierende Kontroll siRNA (c). Die hier gezeigten Blots stellen jeweils ein repräsentatives Gel von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen zum Zeitpunkt von 96 h nach der Nukleofektion dar. Die Bestimmung von Aktin dient der Kontrolle der gleichen Menge eingesetzten Gesamtproteins.



4-11b/c: Die Abbildungen zeigen die Quantifizierung von IL8 im Überstand von SHP1 bzw. SHP2 siRNA-transfizierten und anschließend mit *Moraxella* infizierten A549 Zellen, gemessen 15 h nach der Stimulation mit dem Wildtyp O35E. Als Positivkontrolle wurden 100 ng/ml Pam₃CSK₄ (P-3-C) eingesetzt. Die abgebildeten Diagramme stellen die Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen dar, in denen die einzelnen Werte je als Duplikett angelegt waren. Signifikante Unterschiede in der IL8-Sekretion (p < 0,05) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

4.12 Stimulation pulmonaler Epithelzellen mit *M. catarrhalis* führt zur Phosphorylierung von TLR2

Ein wichtiges Zielprotein der Phosphatase SHP1 ist die p85-Untereinheit der PI3Kinase. Das Enzym dephosphoryliert wichtige Tyrosinphosphorgruppen der regulatorischen Einheit. In der Literatur wurde bereits die SHP1-vermittelte Regulation des PI3K/Akt Signalweges beschrieben (Cuevas et al. 1999). Auch der Toll-like Rezeptor 2 besitzt Bindungsstellen, an die die PI3Kinase nach Ligandenbindung mit anschließender Phosphorylierung des Rezeptors rekrutiert wird, was schließlich eine Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges zur Folge hat.

TLR2 ist einer der wichtigsten PRRs für die Erkennung von *M. catarrhalis* in der Lunge. Um zu überprüfen, welche Rolle SHP1 für die CEACAM1-vermittelte inhibitorische Regulation der TLR2-Signalkaskade spielt, wurde zuerst der Einfluss der PI3-Kinase für das *M. catarrhalis*-induzierte TLR2-Signaling untersucht. Hierzu haben wir initial untersucht, ob TLR2 durch Bindung von *M. catarrhalis* phosphoryliert wird. Es wurde eine Immunpräzipitation stimulierter A549 Zellen mit einem TLR2-spezifischen Antikörper durchgeführt und die Phosphorylierung des Rezeptors anschließend im Western Blot nachgewiesen. Dabei diente ein weiterer TLR2-Antikörper zur Bestätigung gleicher Mengen an TLR2 in den verschiedenen Ansätzen.

Sowohl der *Moraxella*-Wildtyp als auch die UspA1-defiziente Mutante führten zeitabhängig zu einer deutlichen Tyrosinphosphorylierung von TLR2. In beiden Fällen setzte die Phosphorylierung etwa 5 min nach Stimulationsbeginn ein (Abb. 4.12).

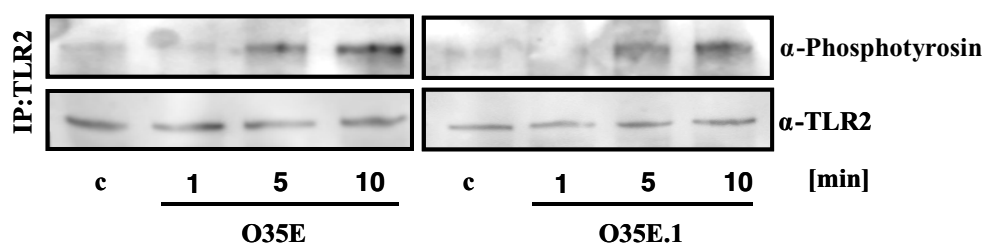


Abb. 4-12: *M. catarrhalis*-vermittelte, UspA1-unabhängige Tyrosinphosphorylierung von TLR2

Die Abbildung zeigt eine zeitabhängige Phosphorylierung von TLR2 auf A549 Zellen nach Stimulation mit *M. catarrhalis* (O35E, O35E.1, 10^7 cfu/ml). Das Zelllysate wurde nach Stimulation über Nacht mit $2 \mu\text{g}$ eines spezifischen TLR2-Antikörpers immunpräzipitiert und nach Aufreinigung des gewonnenen Präzipitates mit einem Phosphotyrosinantikörper im Western Blot analysiert. Ein Western Blot mit einem weiteren spezifischen TLR2-Antikörper diente dem Nachweis gleicher Mengen an TLR2 in den verschiedenen Ansätzen. Die hier gezeigte Abbildung ist ein repräsentatives Gel von insgesamt 3 unterschiedlichen Stimulationen und daraus resultierenden Western Blots.

4.13 Durch spezifische Inhibition der PI3 Kinase wird die *M. catarrhalis*-induzierte NF- κ B-Aktivierung bzw. IL8-Sekretion gehemmt

Die Bedeutung der PI3 Kinase für die *M. catarrhalis*-induzierte TLR2-vermittelte NF- κ B-Aktivierung bzw. IL8-Sekretion sollte im Folgenden durch deren spezifische Inhibition geklärt werden.

Dazu wurden HEK293 Zellen mit einem NF- κ B Luziferase Reporterplasmid sowie einem TLR2- bzw. Leervektorexpressionsplasmid transfiziert und mit den PI3 Kinase-Inhibitoren Ly294002 oder Wortmannin vorinkubiert. Danach wurden die Zellen über 5 h mit dem *Moraxella*-Wildtyp *O35E* stimuliert.

Als Folge einer Stimulation der TLR2-transfizierten Zellen mit *M.catarrhalis* kam es bei gleichzeitiger Inhibition der PI3K zu einer signifikant niedrigeren NF- κ B-Aktivierung als in den nicht vorinkubierten Zellen (Abb. 4-13a). Diese Daten deuten darauf hin, dass der PI3K eine wichtige Rolle für die *M. catarrhalis*-induzierte TLR2-vermittelte NF- κ B-Aktivierung zukommt.

Um nun die Bedeutung der UspA1-CEACAM1-Bindung für die Beteiligung der PI3K an der *Moraxella*-induzierten IL8-Sekretion genauer zu untersuchen wurden A549 und primäre Bronchialepithelzellen mit den oben genannten Inhibitoren vorinkubiert und anschließend mit dem Wildtyp *O35E* bzw. der Mutante *O35E.1* für 15 h stimuliert.

Die Inhibition der PI3K hatte keinen Einfluss auf die durch den Wildtyp hervorgerufene IL8-Antwort. Die Mutanten-induzierte IL8-Sekretion wurde durch PI3K-Inhibition jedoch in beiden Zelltypen auf das Level des Wildtyps reduziert, was darauf hindeutet, dass durch die UspA1-CEACAM1-Interaktion eine Hemmung der PI3K-abhängigen IL8-Sekretion hervorgerufen wird (Abb. 4-13b).

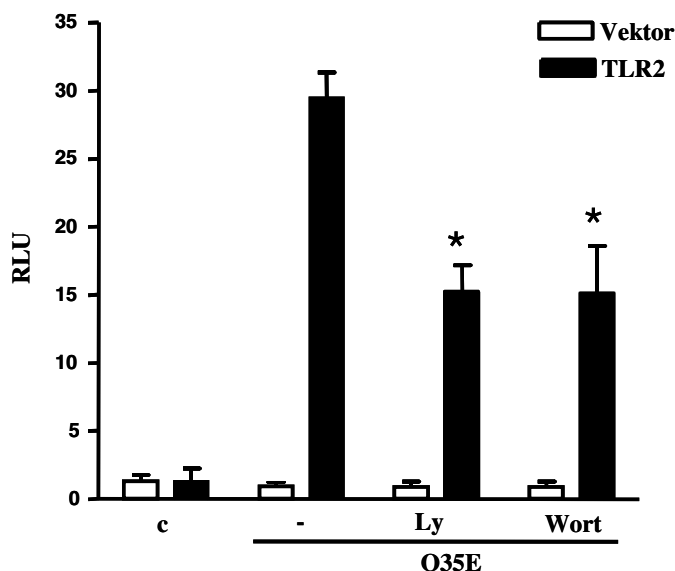
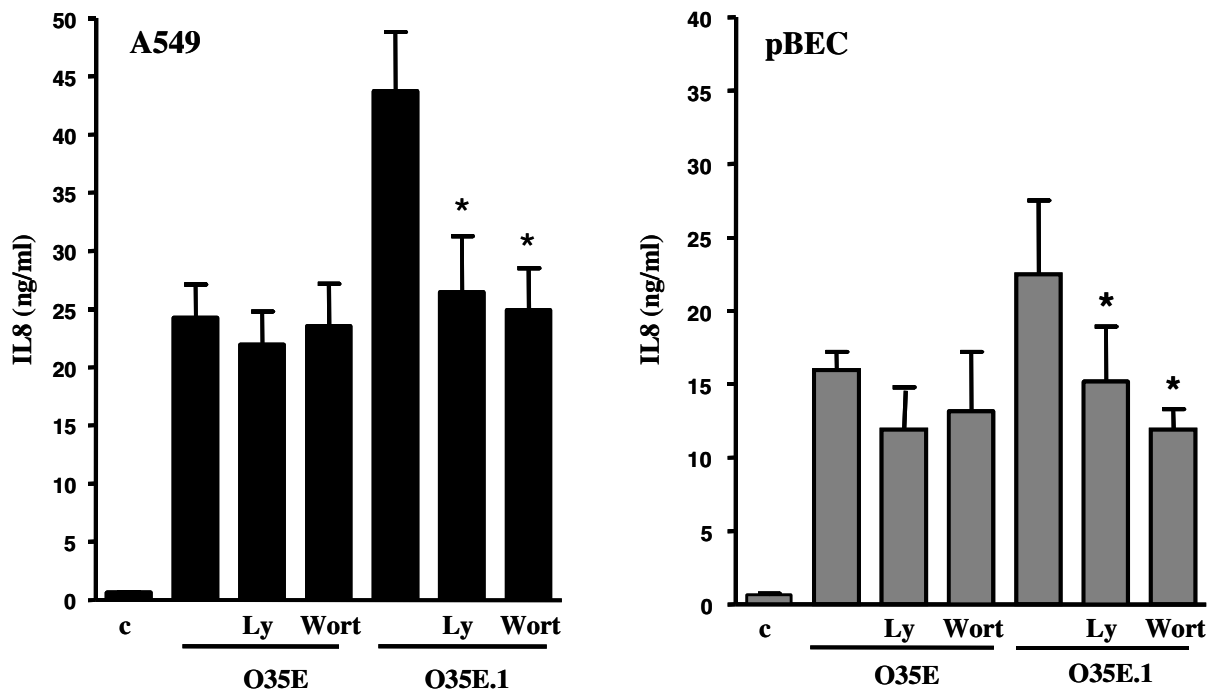


Abb. 4-13: Einfluß der spezifischen Hemmung der PI3 Kinase auf die *M. catarrhalis*-induzierte NF- κ B-Aktivierung bzw. IL8-Sekretion

4-13a: Die Abbildung zeigt die Luziferase- und β -Galaktosidaseaktivität in den Zelllysaten transient mit TLR2 sowie NF- κ B und β -Gal-transfizierten HEK293 Zellen 5 h nach Stimulation mit *M. catarrhalis* (O35E, 10^5 cfu/ml). Vor der Stimulation wurden die Zellen teilweise für eine Stunde mit den PI3 Kinase-Inhibitoren Ly294002 (Ly) und Wortmannin (Wort) vorinkubiert. Die hier gezeigten RLU („relative light units“) ergeben sich aus dem Quotienten von NF- κ B-Luziferaseaktivität und β -Galaktosidaseaktivität als Maß für die Transfektionseffizienz. Signifikante Unterschiede in der relativen Luziferaseaktivität ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.



4-13b: Die Abbildungen zeigen die Quantifizierung von IL8 im Überstand von *Moraxella*-infizierten A549 bzw. primären Bronchialepithelzellen (pBEC), gemessen 15 h nach der Stimulation mit O35E bzw. O35E.1 (10^5 cfu/ml). Vor der Stimulation wurden die Zellen teilweise für eine Stunde mit den PI3 Kinase-Inhibitoren Ly294002 (Ly) und Wortmannin (Wort) vorinkubiert. Die abgebildeten Graphen stellen die Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen dar, in denen die einzelnen Werte je als Duplikett angelegt waren. Signifikante Unterschiede in der IL8-Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

4.14 Die UspA1-CEACAM1-Interaktion führt zur Rekrutierung von SHP1 an TLR2

TLR2 wird durch den *Moraxella*-Wildtyp in gleichem Maße wie durch die UspA1-defiziente Mutante phosphoryliert bzw. aktiviert. Trotzdem kommt es nach Stimulation von A549 und primären Bronchialepithelzellen mit der UspA1-defizienten Mutante zu einer signifikant höheren IL8-Sekretion als nach Stimulation mit dem Wildtyp. Die PI3K hat einen entscheidenden Anteil an der *M. catarrhalis*-induzierten TLR2-vermittelten Aktivierung von NF- κ B. Da SHP1 in der Lage ist, Signalkaskaden, die durch Phosphorylierung der PI3 Kinase aktiviert wurden, zu hemmen, nahmen wir an, dass die UspA1-abhängige SHP1-Rekrutierung an CEACAM1 ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf die PI3K-vermittelte Aktivierung des TLR2-abhängigen Signalweges hat. In den nächsten Versuchen sollte geklärt werden, ob die UspA1-abhängige SHP1-Rekrutierung an CEACAM1 eine SHP1-TLR2-Assoziation zur Folge hat und ob diese möglicherweise für die Hemmung der PI3K-vermittelten NF- κ B-Aktivierung verantwortlich ist.

Zuerst wurde eine Immunpräzipitation mit entsprechend *Moraxella*-Wildtyp-stimulierten A549 Zellen mit Hilfe eines TLR2-spezifischen Antikörpers durchgeführt. Anschließend wurde die Assoziation von SHP1 an TLR2 im Western Blot mit einem spezifischen SHP1 Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle gleicher Mengen an TLR2 in den verschiedenen Ansätzen diente ein weiterer TLR2-Antikörper.

In Abbildung 4-14 ist eine eindeutig UspA1-abhängige Rekrutierung von SHP1 an TLR2 zu erkennen. Nach Stimulation der Zellen mit der UspA1-defizienten Mutante konnte kein SHP1 im Anschluss an die TLR2-Immunpräzipitation im Western Blot nachgewiesen werden.

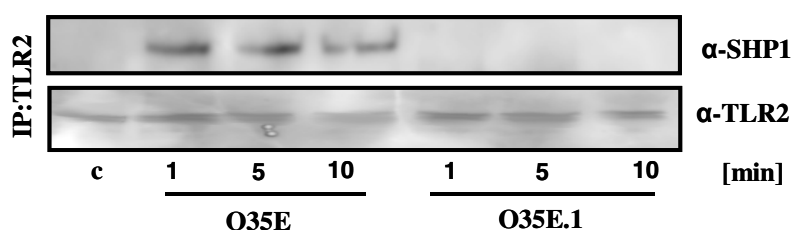


Abb. 4-14: UspA1-abhängige Rekrutierung von SHP1 an TLR2

Die Abbildung zeigt die Unterschiede in der zeitabhängigen Rekrutierung von SHP1 an TLR2 auf A549 Zellen nach Stimulation mit *M. catarrhalis* (O35E, O35E.1, 10^7 cfu/ml). Das Zelllysate wurde nach Stimulation über Nacht mit $2 \mu\text{g}$ eines spezifischen TLR2-Antikörpers immunpräzipitiert und nach Aufreinigung des gewonnenen Präzipitates mit einem spezifischen SHP1-Antikörper im Western Blot analysiert. Ein Western Blot mit einem weiteren spezifischen TLR2-Antikörper diente dem Nachweis gleicher Mengen an TLR2 in den verschiedenen Ansätzen. Die hier gezeigte Abbildung ist ein repräsentatives Gel von insgesamt 3 unterschiedlichen Stimulationen und daraus resultierenden Western Blots.

4.15 Die SHP1-TLR2-Assoziation hat eine Aufhebung des p85-TLR2-Signalkomplexes zur Folge

Nach Aktivierung von TLR2 kommt es zwischen den Phosphotyrosinresten der zytosolischen TLR2-Domäne und der p85-Untereinheit der PI3K zur Bildung eines Signalkomplexes. In Abbildung 4-15a wurden primäre Bronchialepithelzellen auf die Bildung eines solchen Komplexes nach Stimulation mit beiden *Moraxella*-Stämmen untersucht. Aus den Zelllysaten wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers TLR2 immunpräzipitiert und anschließend p85 in einem Sandwich-Elisa nachgewiesen.

Wie in Abbildung 4-15a zu erkennen ist, führte die Stimulation mit *M.catarrhalis* (O35E) zu keiner nennenswerten Komplexbildung, wohingegen die Infektion mit der UspA1-defizienten Mutante bereits nach einer Minute Inkubationszeit eine deutliche Assoziation zwischen TLR2 und p85 zur Folge hatte.

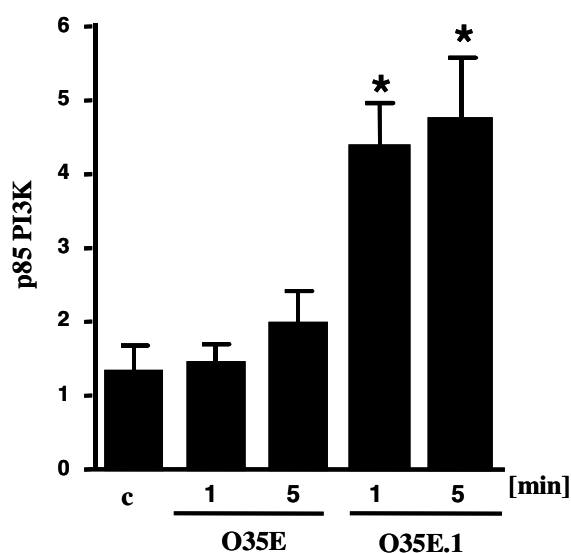


Abb. 4-15a: UspA1-abhängige Aufhebung des p85-TLR2-Komplexes

Die Abbildung zeigt die UspA1-abhängigen Unterschiede in der Bildung des p85-TLR2-Komplexes auf A549 Zellen nach Stimulation mit *M. catarrhalis* (O35E, O35E.1, 10^5 cfu/ml). Das Zelllysate wurde nach Stimulation über Nacht mit $2 \mu\text{g}$ eines spezifischen TLR2-Antikörpers immunpräzipitiert und das gewonnene Präzipitat nach Aufreinigung mit einem p85 spezifischen Sandwich-Elisa untersucht. Der abgebildete Graph stellt die Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen dar, in denen die einzelnen Werte je als Duplikett angelegt waren. Signifikante Unterschiede in der der Bildung des p85-TLR2-Komplexes ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Zusätzlich wurden zwei siRNA-Experimente durchgeführt, um die Bedeutung der Assoziation von SHP1 und TLR2 für den *Moraxella*-induzierten TLR2-p85-Signalkomplex zu bestätigen. Hierfür wurden A549 Zellen wie bereits beschrieben mit CEACAM1- bzw. SHP1-spezifischer siRNA transfiziert und anschließend mit dem *M. catarrhalis*-Wildtyp stimuliert. Aus den Zelllysaten wurde mittels Immunpräzipitation TLR2 extrahiert und im Sandwich-Elisa auf gebundenes p85 untersucht.

Wie in den Abbildungen 4-15b zu erkennen ist, führte eine Stimulation mit dem Wildtyp in Kontroll siRNA-transfizierten Zellen nicht zu einer Assoziation von TLR2 mit der p85-Untereinheit der PI3 Kinase. Ein Gen-Silencing sowohl von CEACAM1 als auch von SHP1 hatte jedoch eine deutlich gesteigerte TLR2-p85-Komplexbildung zur Folge, was darauf hindeutet, dass die Rekrutierung von SHP1 an TLR2 hervorgerufen durch die UspA1-CEACAM1-Bindung zu einer Aufhebung des TLR2-p85-Signalkomplexes führt.

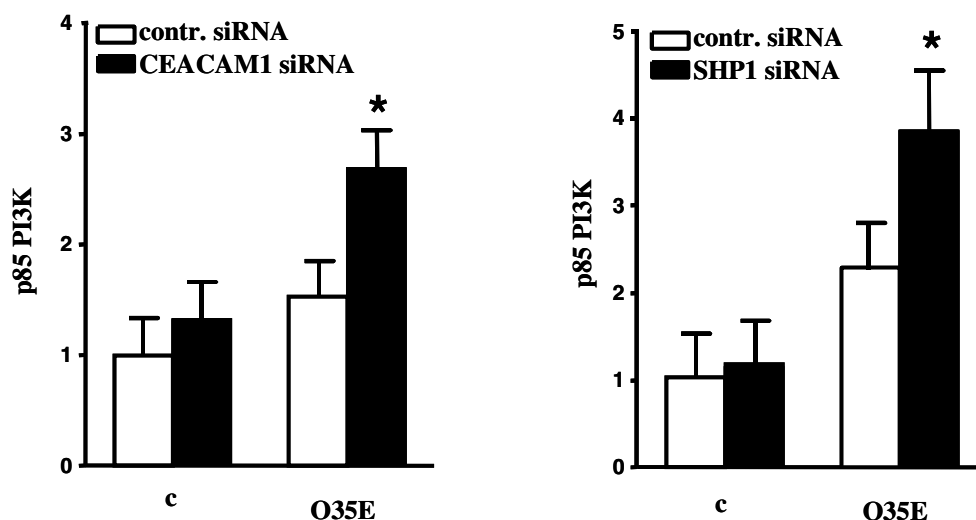


Abb. 4-15b: CEACAM1- bzw. SHP1-abhängige Aufhebung des p85-TLR2-Komplexes

In dieser Abbildung ist die Bildung des p85-TLR2-Komplexes nach Stimulation mit *M. catarrhalis* in Abhängigkeit von CEACAM1 und SHP1 dargestellt. Dazu wurden die Zellen mit spezifischer CEACAM1 bzw. SHP1 siRNA transfiziert und anschließend mit *M. catarrhalis* (O35E, 10^5 cfu/ml) stimuliert. Das Zelllysate wurde wie bereits unter 4-15a beschrieben weiterbehandelt. Die abgebildeten Graphen stellen die Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar, in denen die einzelnen Werte je als Duplikett angelegt waren. Signifikante Unterschiede in der der Bildung des p85-TLR2-Komplexes ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

4.16 Die UspA1-CEACAM1-induzierte SHP1-Rekrutierung kontrolliert die PI3K-abhängige Phosphorylierung von Akt (S437)

Abschließend wurden die regulatorischen Effekte der UspA1-CEACAM1-Interaktion auf das PI3 Kinasen-abhängige Signaling von TLR2 untersucht werden. Dazu wurde die Phosphorylierung als Maß für die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt untersucht, die ein wichtiges Element der PI3K-Signalkaskade darstellt und als solches von der Aktivität der PI3Kinase abhängig ist.

Für den Nachweis einer Abhängigkeit der UspA1-CEACAM1-Interaktion für die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt wurden weitere Experimente durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass es nach Stimulation der Zellen mit dem Wildtyp zu keiner Phosphorylierung von Akt im Vergleich zum unstimulierten Leerwert kam (Abb. 4-16a), während die Inkubation mit der UspA1-depletierten Mutante schon nach 30 min eine deutliche Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt zur Folge hatte.

Während die Vorinkubation mit dem PI3 Kinase-Inhibitor Ly 294002 erwartungsgemäß keine Auswirkung auf die Akt-Phosphorylierung der mit dem Wildtyp stimulierten Zellen hatte, wurde die Aktivierung von Akt durch die Mutante bei vorheriger Inkubation mit dem Inhibitor gehemmt.

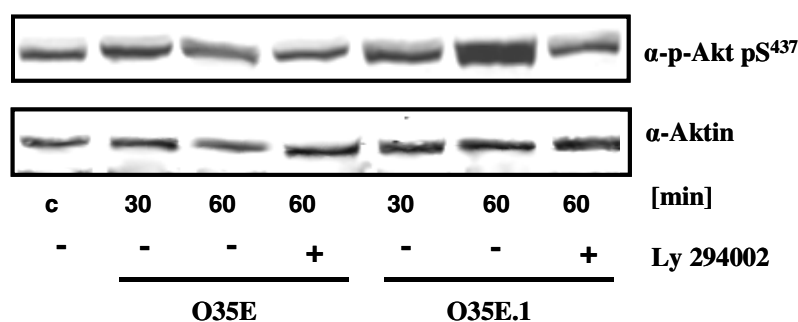


Abb. 4-16a: UspA1- und PI3 Kinase-abhängige Phosphorylierung von Akt

Die Abbildung zeigt die Unterschiede in der zeitabhängigen Phosphorylierung von Akt auf A549 Zellen nach Stimulation mit *M. catarrhalis* (O35E, O35E.1, 10^6 cfu/ml). Vor der Stimulation wurden die Zellen zum Teil mit dem PI3 Kinase-Inhibitor Ly 294002 für eine Stunde vorinkubiert. Das Zelllysate wurde nach der Stimulation mit einem spezifischen Phospho-Akt-Antikörper im Western Blot analysiert. Die Bestimmung von Aktin diente zur Kontrolle von gleichen Mengen eingesetzten Gesamtproteins. Der hier gezeigte Blot stellt ein repräsentatives Gel von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar.

Um die Rolle von SHP1 in der Inhibition des TLR2-Signalings genauer zu untersuchen, wurden siRNA-Versuche mit SHP1-spezifischer siRNA durchgeführt, in denen nach Transfektion und anschließender Stimulation der Zellen mit dem *Moraxella*-Wildtyp die Aktivierung von Akt im Western Blot mittels eines spezifischen Phospho-Akt-Antikörpers untersucht wurde. In A549 Zellen, in denen SHP1 mittels siRNA gehemmt wurde, rief auch der Wildtyp eine deutliche Phosphorylierung von Akt hervor. Dies deutet wiederum darauf hin, dass eine Assoziation von SHP1 an TLR2 zu einer Aufhebung des p85-TLR2-Signalkomplexes und somit zu einer Unterbrechung der PI3 Kinasen-abhängigen Signalkaskade führt.

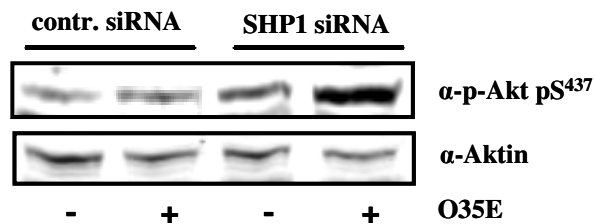


Abb. 4-16b: SHP1-Abhängigkeit der Akt-Phosphorylierung

In dieser Abbildung wird der Einfluß von SHP1 auf die Phosphorylierung von Akt auf A549 Zellen nach Stimulation gezeigt. Die Zellen wurden mit spezifischer SHP1 siRNA transfiziert und anschließend mit *M. catarrhalis* (O35E, 10^6 cfu/ml) stimuliert. Das Zelllysate wurde nach der Stimulation mit einem spezifischen Phospho-Akt-Antikörper im Western Blot analysiert. Die Bestimmung von Aktin diente zur Kontrolle von gleichen Mengen eingesetzten Gesamtproteins. Der hier gezeigte Blot stellt ein repräsentatives Gel von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar.

4.17 Die Bindung der *Neisseria*-spezifischen Oberflächenproteine (Opa) an CEACAM1 hemmt ebenfalls die TLR2-abhängige Immunantwort pulmonaler Epithelzellen

Neben *M. catarrhalis* besitzen auch Neisserien Oberflächenmembranproteine, die *opacity-associated proteins* (Opa), mit denen sie in der Lage sind, an die N-Domäne von CEACAM1 zu binden. Um herauszufinden, ob die Inhibition von TLR2 durch CEACAM1 ausschließlich durch Bindung des Moraxellenoberflächenproteins UspA1 oder auch durch weitere Liganden von CEACAM1 hervorgerufen wird, wurden die Versuche auf die *Neisseria*-spezifischen Oberflächenproteine (Opa) ausgeweitet.

Für die folgenden Versuche wurden rekombinante *E. coli* genutzt, die zwei verschiedene Opa Proteine von *Neisseria meningitidis* an ihrer Zelloberfläche exprimieren (Opa B128, Opa J129). Für den *E. coli*-Wildtyp wurde gezeigt, dass er nicht an CEACAM1 bindet und dieses auch nicht aktiviert.

Zuerst wurde die Adhäsion der Opa-exprimierenden *E. coli* an A549 und primäre Bronchialepithelzellen mittels des bereits für die Moraxellen etablierten Adhäsionsassays überprüft.

Während der *E. coli*-Wildtyp kaum an beide Zelltypen binden konnte, war die Adhäsion der Opa B-exprimierenden Bakterien ausgezeichnet. Durch Vorinkubation mit einem CEACAM1-spezifischen, die N-Domäne bindenden Antikörper konnte die Adhäsion signifikant verringert werden.

Gleiche Ergebnisse lieferte der Versuch mit Opa J-exprimierenden *E. coli* (Daten nicht abgebildet).

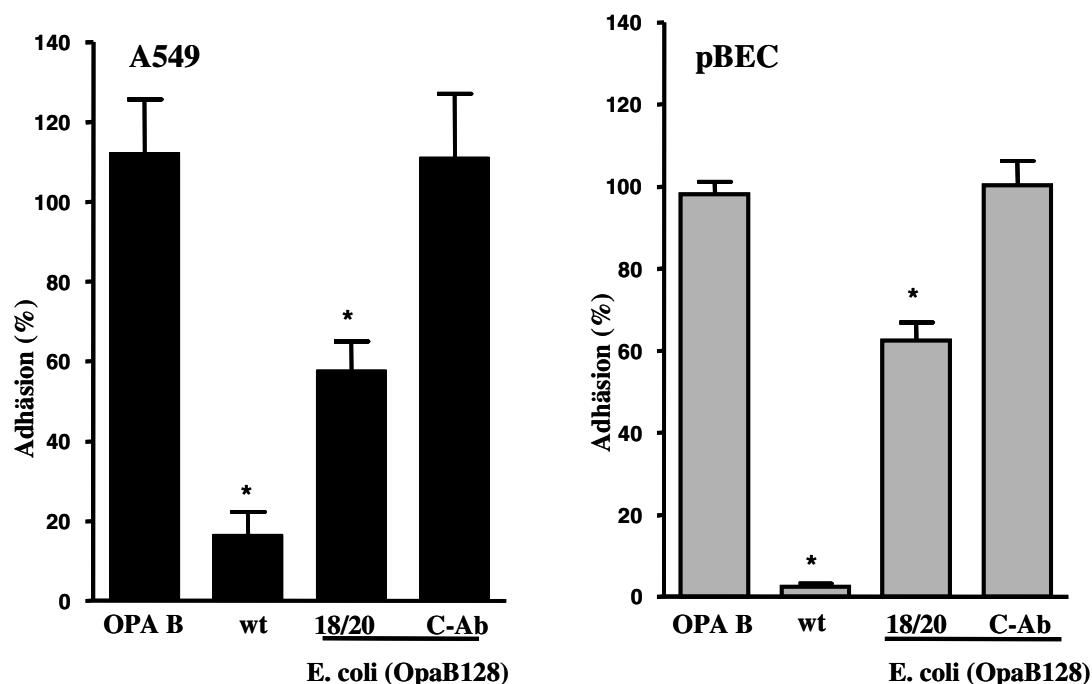


Abb. 4-17a: Adhäsion des *Neisseria*-spezifischen Oberflächenproteins Opa B an pulmonale Epithelzellen
 Die Adhäsion der Opa B-exprimierenden *E. coli* an pulmonalem Epithel wurden nach Stimulation (10^7 cfu/ml, 1h) und anschließendem gründlichen Waschen der Zellen mit Hilfe eines cfu-basierten Assays untersucht. Die Präinkubation zur Blockierung der N-Domäne erfolgte mit einem CEACAM1-spezifischen Antikörper (18/20) für 1 h. Die hier abgebildeten Graphen zeigen die Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen, in denen die einzelnen Werte je als Duplikett angelegt waren. Signifikante Unterschiede in der Adhäsion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Anschließend wurde die IL8-Sekretion beider Zelltypen nach 15 stündiger Stimulation mit den verschiedenen *E. coli*-Stämmen gemessen. Die Infektion mit den Opa-exprimierenden Bakterien lieferte in beiden Fällen eine deutlich niedrigere Sekretion von IL8 als der *E. coli*-Wildtyp.

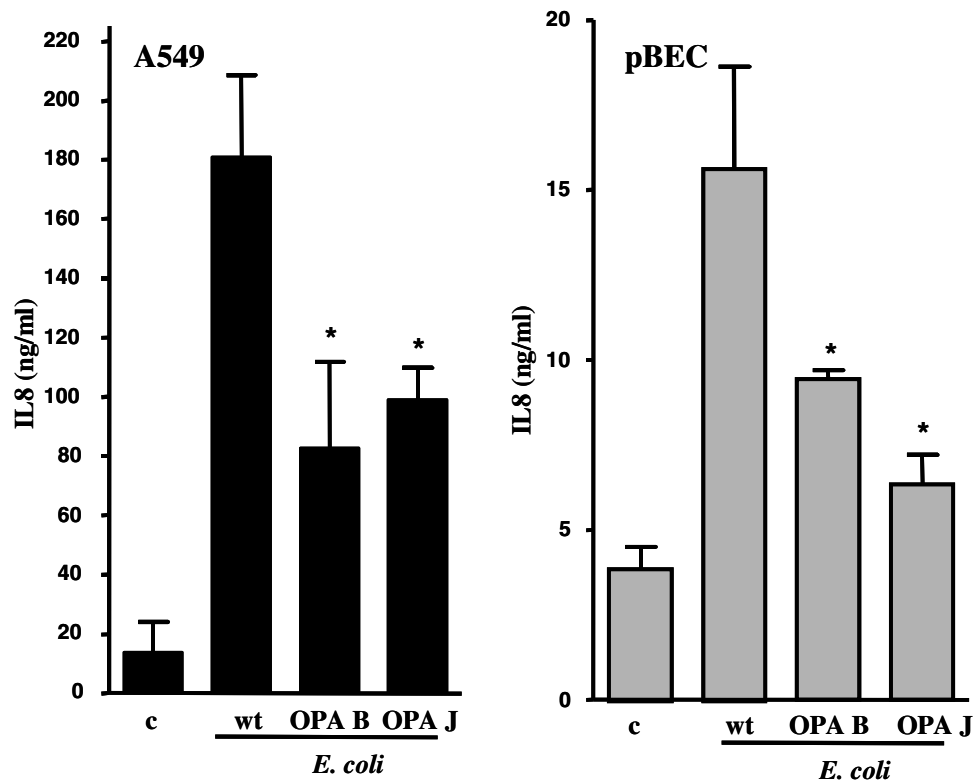


Abb. 4-17b: Opa-abhängige Hemmung der TLR2-vermittelten IL8-Sekretion pulmonaler Epithelzellen

Die Abbildung stellt die IL8-Sekretion von A549 und primären Bronchialepithelzellen nach 15 stündiger Stimulation mit dem *E. coli*-Wildtyp sowie den Opa-exprimierenden *E. coli* (10^7 cfu/ml) dar. Die hier abgebildeten Graphen zeigen die Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen, in denen die einzelnen Werte je als Duplikett angelegt waren. Signifikante Unterschiede in der IL8-Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Stimulation von mit CEACAM1-spezifischer siRNA transfizierten A549 Zellen ergab für beide Opa Proteine eine signifikant höhere Sekretion von IL8 im Vergleich zu Kontroll siRNA-transfizierten Zellen.

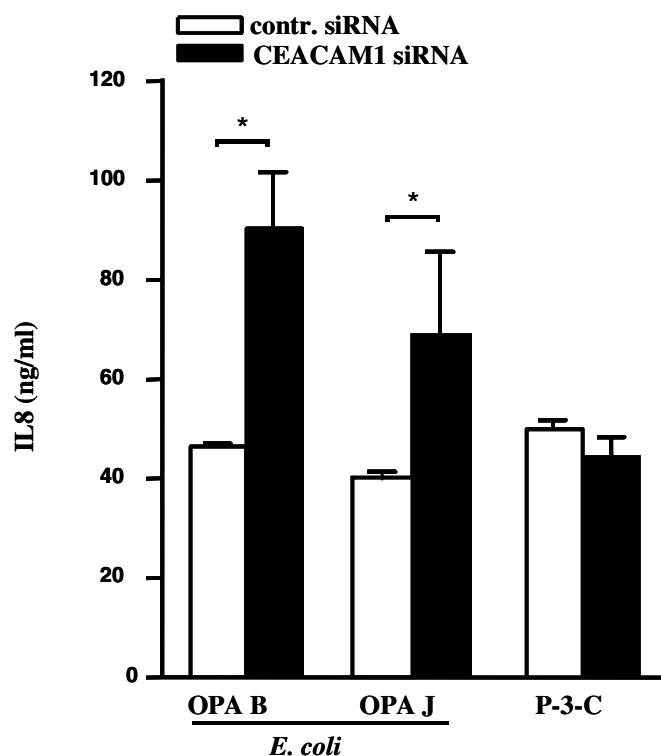


Abb. 4-17c: Einfluss der Opa-CEACAM1-Interaktion auf die TLR2-vermittelte IL8-Sekretion pulmonaler Epithelzellen

Diese Abbildung zeigt die Quantifizierung von IL8 im Überstand von CEACAM1 siRNA-transfizierten und anschließend mit Opa-exprimierenden *E. coli* (10^7 cfu/ml) infizierten A549 Zellen, gemessen 15 h nach der Stimulation. Als Positivkontrolle wurden 100 ng/ml Pam₃CSK₄ (P-3-C) eingesetzt. Der abgebildete Graph stellt die Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar, in denen die einzelnen Werte je als Duplikett angelegt waren. Signifikante Unterschiede in der IL8-Sekretion ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Um die Rolle von CEACAM1 für die *E. coli*-vermittelte TLR2-abhängige NF- κ B-Aktivierung weiter zu bestätigen, wurden HEK293 Zellen mit TLR2- oder CEACAM1-Expressionsplasmiden allein oder mit beiden kotransfiziert. Mittels gleichzeitig transfiziertem NF- κ B-Reporterplasmid wurde im Luziferase-Reporterassay die NF- κ B-Aktivierung der HEK293 Zellen nach Stimulation mit den verschiedenen *E. coli* gemessen.

Die Stimulation von nur TLR2-exprimierenden Zellen führte bei allen drei *E. coli* zu einer vergleichbaren Aktivierung von NF- κ B. Nach Stimulation der kotransfizierten Zellen ergab sich ein ähnliches Bild wie für die Infektion mit *M. catarrhalis* O35E und der UspA1-depletierten Mutante O35E.1. Die Opa-exprimierenden *E. coli* konnten signifikant weniger NF- κ B aktivieren als der *E. coli*-Wildtyp. Diese Ergebnisse waren ein deutlicher Hinweis dafür, dass der CEACAM1-abhängige Mechanismus der Reduktion der TLR2-abhängigen Immunantwort pulmonaler Epithelzellen auch von Opa-exprimierenden Keimen induziert werden kann.

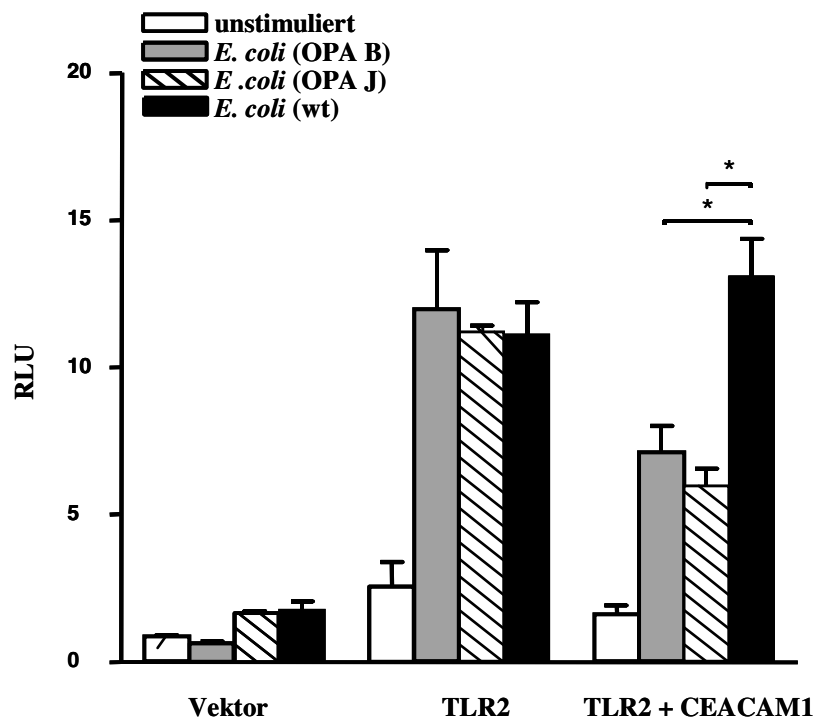


Abb. 4-17d: Auch die durch Opa hervorgerufene Reduktion der TLR2-vermittelten NF- κ B-Aktivierung ist CEACAM1-abhängig

Die Abbildung zeigt die relative Luziferaseaktivität in den Zelllysaten transient mit CEACAM1 bzw. TLR2 sowie NF- κ B und β -Gal transfizierter HEK293 Zellen 5h nach Stimulation mit dem *E. coli*-Wildtyp bzw. den verschiedenen Opa-exprimierenden *E. coli* (10^7 cfu/ml). Die hier gezeigten RLU („relative light units“) ergeben sich aus dem Quotienten von NF- κ B-Luziferaseaktivität und β -Galaktosidaseaktivität als Maß für die Transfektionseffizienz. Der Graph zeigt die Vereinigung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen, wobei jeder einzelne Wert als Duplikett angelegt war. Signifikante Unterschiede in der relativen Luziferaseaktivität ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse

5.1.1 CEACAM-Expression auf pulmonalem Epithel

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal systematisch das Expressionsmuster humaner CEACAM Rezeptoren auf pulmonalem Epithel untersucht. Gegenstand der Versuche waren mit CEACAM1, CEA, CEACAM6 und CEACAM7 alle bisher auf Epithelzellen beschriebenen Vertreter der CEACAM-Rezeptorfamilie (Odin and Öbrink 1987; Thompson J. A. 1995; Prall et al. 1996; Schölzel et al. 2000).

Die mRNA- sowie auch die Facs-Analyse der zwei Laborzelllinien Beas2B und A549 ergab im Vergleich zu primären Bronchialepithelzellen entscheidende Unterschiede im Expressionsmuster, besonders zwischen den Beas2B und den primären Zellen. In der virustransformierten Bronchialepithelzelllinie Beas2B konnte mittels PCR überhaupt keine Expression der vier untersuchten CEACAM Rezeptoren gefunden werden. Es bedarf weiterführender Untersuchungen, um zu klären, ob eine Virustransformation von Epithelzellen mit SV40 Viren Auswirkungen auf die CEACAM-Expression hat, bzw. sie durch die Virusinfektion inhibiert wird. Zu dieser Vermutung gibt es in der Literatur allerdings bisher keine Angaben. Da, aufgrund der ausschließlichen Humanpathogenität der Moraxellen, ein möglichst realitätsnahes Zellmodell unerlässlich war, um entsprechend auswertbare Ergebnisse zu erzielen, wurde die Beas2B Zelllinie für weitere Versuche ausgeschlossen.

Es ist beschrieben, dass CEACAM1 in primären Lungentumoren hochreguliert ist (Ohwada et al. 1994). Deshalb fällt vermutlich die Expression der CEACAM Rezeptoren in der Lungenkarzinomzelllinie A549 etwas höher aus als in den primären Zellen gesunder Spender. Trotzdem scheinen die A549 Zellen ein brauchbares Zellmodell darzustellen, da sie ein ähnliches Expressionsmuster wie die primären Bronchialepithelzellen besitzen.

Da CEACAM7 in primären Zellen nicht nachweisbar war und CEACAM6 und CEA nur in geringer Menge auf der Zelloberfläche exprimiert wurden, beschränkte sich die funktionale Untersuchung auf CEACAM1, dessen Signaltransduktionsmechanismen bisher am besten untersucht sind.

Das Expressionsmuster der vier untersuchten Rezeptoren auf primären Bronchialepithelzellen von Proben unterschiedlicher Probanden stellte sich in den einzelnen Versuchen recht einheitlich dar. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Expression je nach individuell

unterschiedlichen Einflussfaktoren variieren kann. So ist z.B. beschrieben, dass verschiedene Tumorerkrankungen eine veränderte CEACAM1-, CEA- oder auch CEACAM6-Expression zur Folge haben können (Nollau et al. 1997; Busch et al. 2000; Laack et al. 2002). Desweiteren ist denkbar, dass verschiedene exogene oder auch endogene Noxen, wie z.B. Zigarettenrauch bzw. eine chronische Inflammation, einen Einfluss auf das Expressionsmuster des respiratorischen Epithels besitzen. Damit diese möglichen Einflussfaktoren näher charakterisiert werden können, müssen weitere Untersuchungen unterschiedlicher Spenderzellen stattfinden.

5.1.2 *Moraxella catarrhalis* und CEACAM1

Die Interaktion von *M. catarrhalis* und CEACAM1 wurde in der Vergangenheit schon mehrfach beschrieben. Virji et al. zeigten bereits 2003, dass das Oberflächenprotein UspA1 von *M. catarrhalis* ebenso wie das P5 Protein von *Haemophilus influenzae* und die Opa Proteine von *Neisseria meningitidis* spezifisch an die N-Domäne von CEACAM1 bindet (Virji et al. 2003). Da UspA1, P5 und Opa keinerlei strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, ist eine parallele evolutionäre Entwicklung dieser Bindungsproteine denkbar (Hill und Virji 2005).

In der vorgelegten Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Bindung von *M. catarrhalis* an CEACAM1 es dem Erreger ermöglicht, die durch ihn ausgelöste TLR2-abhängige Immunantwort zumindest teilweise zu umgehen. Dieser Mechanismus führt zu einem neuen Erklärungsansatz dafür, warum CEACAM1 bindende Pathogene, als klassische Kolonisierer des unteren Respirationstraktes, eine deutlich verminderte Immunreaktion auslösen. Weiterhin wäre es denkbar, dass das Ausmaß einer entzündlichen Reaktion als Folge einer Infektion mit *M. catarrhalis* von Patient zu Patient unterschiedlich ist und von der individuellen TLR2- und CEACAM1-Expression auf dem Bronchialepithel abhängig sein kann. Um diese Frage zu klären, sind jedoch weitere klinisch orientierte Arbeiten notwendig.

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass auch dem Oberflächenprotein UspA1 in der Frage Kolonisierung versus Infektion eine entscheidende Bedeutung zukommt. Die Affinität dieser Proteine zu CEACAM1 unterscheidet sich je nach Erregerstamm, was auf Punktmutationen des UspA1-Gens zurückzuführen ist (Virji et al. 2008). Die Spezifität und damit die Bindungskapazität hängt also auch von der Proteinstruktur des Oberflächenmoleküls ab. Diese *in vitro* Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die bakterielle Adhäsion von *M. catarrhalis* an Bronchialepithel auch *in vivo* durch Unterschiede des UspA1-Moleküls

beeinflusst werden könnte. Hierzu fehlen ebenfalls klinische Studien, die allerdings von der gastgebenden Arbeitsgruppe in Planung sind.

Brooks et al. haben gezeigt, dass das UspA1 des *M. catarrhalis*-Stammes *O35E*, den auch in dieser Arbeit verwendet wurde, keine nennenswerte Affinität zu CEACAM1 besitzt (Brooks et al. 2008). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit eine deutliche Affinität des UspA1 von *O35E* an CEACAM1 zeigen können. Diese Differenzen lassen sich auf methodische Unterschiede zurückführen. Während die Adhäsionsversuche in dieser Arbeit mit Hilfe eines cfu-basierten Assays durchgeführt wurden, hat die zitierte Arbeitsgruppe einen Elisa verwendet und dafür das UspA1 Protein thermisch vorbehandelt. Laut weiterführender bisher unpublizierter Untersuchungen der gastgebenden Arbeitsgruppe wirkt sich die thermische Behandlung des UspA1 deutlich auf die Affinität des UspA1 zu CEACAM1 aus, sodass die Unterschiede der Ergebnisse darauf zurückgeführt werden können. Wie in den Untersuchungen gezeigt wurde, ist von einer Bindung des UspA1 des *M. catarrhalis*-Stammes *O35E* an CEACAM1 auszugehen, welches auf primären Bronchialepithelzellen sowie auch auf A549 Zellen exprimiert wird. Eine weitere Bestätigung der Bindung konnte mittels Vorinkubation der Zellen mit einem die N-Domäne von CEACAM1 bindenden Antikörper erzielt werden. Durch Vorinkubation mit diesem Antikörper kam es zu einer signifikanten Verminderung der bakteriellen Bindung an die Epithelzellen.

5.1.3 Tyrosinphosphorylierung und Signaltransduktion von CEACAM1

Die Bedeutung der Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1 ist in unterschiedlichen Studien untersucht worden. So ist die Signalweiterleitung über intrazelluläre Bindungspartner wie die Tyrosinphosphatasen SHP1 und SHP2, die Tyrosinkinase c-src, die Adapterproteine Shc und Paxillin sowie das β 3-Integrin absolut abhängig von der vorhergehenden Aktivierung, d.h. Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1 (Brummer et al. 1995; Huber et al. 1999; Poy et al. 2002a).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch *M. catarrhalis* eine Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1 auf humanem pulmonalen Epithel hervorgerufen wird. Entscheidend für diese Aktivierung des Rezeptors ist das Oberflächenprotein UspA1 von *M. catarrhalis*. Insbesondere eine Inkubation der Zellen mit dem rekombinanten Protein UspA1 hatte eine deutliche Phosphorylierung von CEACAM1 zur Folge (Daten nicht gezeigt). Von einer geringfügigen basalen Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1 muss,

wie auch in anderen Studien beschrieben wurde, immer ausgegangen werden (Budt, M. 2002).

Es wurde schon mehrfach gezeigt, dass eine Liganden-abhängige Phosphorylierung von CEACAM1 zu einer Rekrutierung von SHP1 an den Rezeptor führt. Es ist auch bekannt, dass die Interaktion der *Neisserien*-spezifischen Opa-Proteine mit CEACAM1 zu einer Verminderung der Proliferation und Aktivierung von CD4⁺ Zellen durch Inhibition des T-Zell-Rezeptors führt (Boulten and Gray-Owen 2002). Weiterhin wurde für die Rekrutierung von SHP1 und SHP2 gezeigt, dass sie einen wichtigen Schritt für diese CEACAM1-induzierte Hemmung der T-Zell-Funktion darstellt (Boulten and Gray-Owen 2002; Lee et al. 2008). Die Hemmung verschiedener T-Zell-Funktionen als Antwort auf die Interaktion von CEACAM1 mit den Neisserienoberflächenproteinen Opa ist abhängig von der Phosphorylierung der CEACAM1-ITIM-Domäne (Nagaishi et al. 2006; Lee et al. 2008). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Abhängigkeit der TLR2-vermittelten NF-κB-Antwort von einer intakten ITIM-Domäne gezeigt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Punktmutation einer Aminosäure in der aktiven ITIM Domäne zu deren Inaktivierung führt und eine Unterbrechung der anschließenden Signalkaskade zur Folge hat.

5.1.4 *M. catarrhalis* und TLR2 auf pulmonalem Epithel

Da das Vorhandensein einer TLR2-Expression für die Experimente dieser Arbeit unerlässlich war, wurden alle verwendeten Zellen mittels RT-PCR und FACS-Analyse auf ihre TLR2-Expression untersucht. Sowohl die primären Bronchialepithelzellen als auch die Alveolarzellkarzinomzelllinie A549 zeigten eine deutliche Expression des Rezeptors. Während bei der Laborzelllinie A549 von einer relativ konstanten TLR2-Dichte ausgegangen werden kann, ist bei den primären Zellen mit einer größeren individuellen Schwankungsbreite zu rechnen. In den verwendeten Zellen stellte sich die TLR2-Expression in den ersten drei Passagen jedoch größtenteils einheitlich dar. Spenderzellen, deren Expressionsmuster sich deutlich vom Durchschnitt unterschied, wurden nicht für weitere Versuche verwendet.

Die *M. catarrhalis*-induzierte Aktivierung der angeborenen Immunität des respiratorischen Epithels wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits untersucht. So wurde gezeigt, dass *M. catarrhalis* dosis- und zeitabhängig zur TLR2-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB führt, was die Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Zytokine unter anderem IL8 und GM-CSF zur Folge hat (Slevogt et al. 2006). Diese Ergebnisse wurden auf A549 Zellen sowie primären Bronchialepithelzellen nachvollzogen.

5.1.5 Signaling von TLR2

Nach Ligandenbindung an den Toll-like Rezeptor 2 erfolgt die Signalweiterleitung auf zwei unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Wegen: die MyD88-abhängige und die PI3 Kinase-abhängige Signalkaskade (Akira and Takeda 2004; Arbibe et al., 2000; Strassheim et al. 2004). Beide münden letztendlich unter anderem in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Es ist derzeit nicht bekannt, wie das TLR2-Signaling von diesen beiden Wegen abhängt und welcher Mechanismus die Intensität der unterschiedlichen Signalkaskaden steuert. Um herauszufinden, welche Umstände zur Auswahl des einen oder anderen Weges des TLR2-Signalings führen und unter welchen Bedingungen die entsprechende Signalkaskade tatsächlich von Bedeutung ist, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Um zu untersuchen, ob die *M. catarrhalis*-induzierte TLR2-vermittelte Aktivierung von NF- κ B auch PI3 Kinase-abhängig verläuft, wurden die einzelnen Schritte dieser Kaskade nach *Moraxella*-Stimulation überprüft. Die Beteiligung dieser auch in der Literatur beschriebenen Signalkaskade (Arbibe et al. 2000) an der TLR2-abhängigen *M. catarrhalis*-induzierten Immunantwort konnte in unseren Versuchen nachvollzogen werden. Wurde der PI3K-Signalweg mit Hilfe spezifischer Inhibitoren gehemmt, führte dies zu einer signifikanten Reduktion der TLR2-vermittelten IL8-Sekretion, was die Bedeutung dieses Signalweges für die *M. catarrhalis*-induzierte TLR2-vermittelte Aktivierung von NF- κ B verdeutlicht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiter, dass einige Pathogene in der Lage sind, CEACAM1 als inhibitorischen non-Toll-like PRR zu nutzen, offensichtlich um die über die PI3 Kinase-vermittelte TLR2-abhängige Immunantwort zu inhibieren. Der MyD88-Signalweg bleibt davon unbeeinflusst.

Die inhibitorische Wirkung des CEACAM1 Rezeptors auf die TLR2-Signalkaskade wurde bisher noch nicht beschrieben. Allerdings gibt es Beispiele anderer ITIM- bzw. ITAM-Domäne tragender Rezeptoren, die inhibitorischen oder aktivierenden Einfluss auf die TLR2-Signalkaskade nehmen. So wurde vor kurzem gezeigt, dass die Bindung von *Staphylococcus aureus* an einen ITIM tragenden Ig-like Rezeptor in Mausfibroblasten zur Hemmung der TLR2-vermittelten Zytokinfreisetzung in diesen Zellen führt (Nakayama et al. 2007). Der Mechanismus dieser Interaktion wurde von den Autoren allerdings nicht geklärt.

Komplementäre Ergebnisse erhielten Underhill et al.. Sie stellten fest, dass die Ligation des Dektin1 Rezeptors mit beta-1,3 Glykanen von Pilzen eine signifikante Steigerung der

TLR2-vermittelten Zytokinproduktion zur Folge hat. Dieser Effekt war von der Phosphorylierung einer intrazytoplasmatischen ITAM-ähnlichen Domäne des Dektin1 Rezeptors abhängig (Underhill, D. M. 2007).

In den Versuchen zu dieser Arbeit wurde deutlich, dass die über die ITIM-Domäne von CEACAM1 vermittelte inhibitorische Wirkung auf die TLR2-Signalkaskade im Weiteren von SHP1 abhängig ist. Auch die Tyrosinphosphatase SHP1 wurde im Zusammenhang mit der TLR2-Signalkaskade bereits beschrieben. So wurde gezeigt, dass SHP1 an der Regulation der TLR2-vermittelten Produktion proinflammatorischer Zytokine beteiligt ist (An et al. 2008). Die Proteinphosphatasen SHIP und SHP1 spielen in verschiedensten Signalingprozessen unterschiedlichster Gewebe eine wichtige modulatorische Rolle. Dabei ist der PI3 Kinase/Akt-Signalweg von entscheidender Bedeutung. Von Wymann et al. wurde er als Schlüssel bei der Modulation inflammatorischer und allergischer Phänomene beschrieben (Wymann et al. 2003). Zum Beispiel führt die Rekrutierung von SHIP an die Zellmembran zur Dephosphorylierung und somit zur Deaktivierung verschiedener Mitglieder des PI3K/Akt-Signalweges, wodurch dieser inhibiert wird (Kalesnikoff et al. 2003; Baran et al. 2003). Strassheim et al. zeigten außerdem, dass SHIP negativ regulatorisch auf verschiedene TLR2-induzierte Funktionen neutrophiler Granulozyten wirkt (Strassheim et al. 2005).

Ähnlich wie für SHIP ist auch für die Proteinphosphatase SHP1 bekannt, dass sie negative Feedback Mechanismen initiiert. So z.B. im PI3K/Akt-Signalweg des aktivierten T Zell Rezeptors: Durch Ligation des T Zell Antigen Rezeptors wird die Src Tyrosinkinase p56 Lck aktiviert. Diese phosphoryliert daraufhin verschiedene intrazelluläre Substrate wie z.B. die PI3 Kinase und SHP1. Werden in den entsprechenden Zellen sowohl die PI3 Kinase als auch SHP1 exprimiert, führt die SHP1-vermittelte Dephosphorylierung der p85-Untereinheit der PI3 Kinase zu deren Inaktivierung und somit zur Unterbrechung der weiteren Signalkaskade (Cuevas et al. 1999; Cuevas et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser von Cuevas et al. beschriebende Mechanismus auch auf die CEACAM1-TLR2-Interaktion übertragbar war, d.h., dass die UspA1-vermittelte CEACAM1-abhängige Rekrutierung von SHP1 an TLR2 ebenfalls zur Dephosphorylierung der p85-Untereinheit und somit zur Unterbrechung der *M. catarrhalis*-vermittelten PI3K-Signalkaskade geführt hat.

5.1.6 CEACAM1 und TLR2

In dieser Arbeit ist es gelungen, eine bisher unbekannte Strategie von Pathogenen zu identifizieren, die Immunantwort pulmonaler Epithelzellen zu reduzieren. Dies könnte es den Bakterien erleichtern, im Respirationstrakt zu kolonisieren. Es wurde gezeigt, dass die TLR2-vermittelte IL8-Freisetzung bei gleichzeitiger Aktivierung von CEACAM1 signifikant vermindert wird. CEACAM1 bindende Erreger sind damit in der Lage, diesen Rezeptor als inhibitorischen nicht TLR-PRR zu nutzen.

Bisher waren für CEACAM1 keine inhibitorischen Funktionen bezüglich der TLR2-induzierten Immunantwort bekannt. In anderen Signalwegen wurde CEACAM1 jedoch mehrfach als negativer Modulator beschrieben (Boulten et al. 2002; Nagaishi et al. 2006).

Aufgrund des Vorhandenseins eines ITIM in der zytoplasmatischen Domäne und der Zugehörigkeit zur Immunglobulin-Superfamilie wurde CEACAM1 schon zuvor zu der Gruppe koinhibitorischer Rezeptoren innerhalb des Immunsystems eingeteilt (Sinclair, N.R. 1999). Diese Rezeptoren initiieren negative Rückkopplungsmechanismen von Signalen, die durch aktivierende Rezeptoren ausgelöst werden.

Ein wesentlicher Schritt der Aktivierung vieler Signaltransduktionskaskaden besteht in der Rekrutierung zytoplasmatischer Proteine an die Membran durch die Bindung an phosphorylierte Rezeptoren. Dieser Mechanismus erhöht, besonders bei Kolokalisation der entsprechenden Rezeptoren, die lokale Konzentration der Proteine und erleichtert so die Ausbildung funktioneller Signalkomplexe. Dadurch werden z.B. auch die mit den inhibitorischen Rezeptoren assoziierten Tyrosinphosphatasen SHP1 und SHP2 in räumliche Nähe zu ihren Substraten gebracht (Hunter, T. 2000). Ein Beispiel für einen in dieser Art wirkenden Rezeptor ist der FcRIIB, der durch Antigen-Antikörperkomplexe mit dem B Zelle Rezeptor koaggregiert wird und dann inhibitorisch wirken kann (Coggeshall, K.M. 1998). In den vorliegenden Versuchen konnte eine Kolokalisation von TLR2 und CEACAM1 in transfizierten HEK293 Zellen nachgewiesen werden, was eine funktionelle Zusammenarbeit beider Rezeptoren in oben beschriebener Weise ermöglicht.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass der TLR2-abhängige PI3 Kinase-Signalweg durch *M. catarrhalis* aktiviert werden kann und dass eine gleichzeitige Aktivierung von CEACAM1, wie in der Literatur beschrieben, über SHP1 zur Hemmung dieses Signalweges führt. Eine vollständige Inhibition der TLR2-vermittelten NF- κ B-Aktivierung bleibt jedoch aus, da durch die Interaktion von CEACAM1 und UspA1 nur die PI3 Kinase-abhängige Signalkaskade unterbrochen wird. Der MyD88-Weg der TLR2-Signalkaskade bleibt durch das rekrutierte SHP1 unberührt.

5.1.7 Weitere mögliche Liganden für CEACAM1 und TLR2

Um zu untersuchen, ob auch andere CEACAM1 bindende Bakterien in der Lage sind, die für *M. catarrhalis* beschriebene Methode, dem Immunsystem zu entgehen zu nutzen, haben wir unsere Versuche auf die *Neisseria meningitidis*-spezifischen Oberflächenproteine Opa B128 und Opa J129 ausgeweitet. Von diesen Proteinen ist bekannt, dass sie ebenso wie UspA1 spezifisch an die N-Domäne von CEACAM1 binden (Virji et al., 1996). Da in unserem Labor das Arbeiten mit *Neisserien* nicht möglich war, wurde für die notwendigen Versuche der rekombinante *E. coli*-Stamm PC2984 genutzt, der die entsprechenden Proteine auf der Zelloberfläche exprimiert. Für diesen Stamm wurde bereits nachgewiesen, dass er ohne Opa-Expression nicht jedoch mit den exprimierten Oberflächenproteinen wie *Neisseria meningitidis* spezifisch an CEACAM1 bindet (de Jonge et al. 2003; de Jonge et al. 2003).

Die für *M. catarrhalis* beschriebenen Signaltransduktionsmechanismen konnten bei Stimulation der Zellen mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm sowohl für die TLR2-Signalkaskade als auch für das Signaling von CEACAM1 nachvollzogen werden. Die Opa-exprimierenden *E. coli* nutzen den gleichen Mechanismus, um der angeborenen Immunantwort zu entgehen. Dies lässt darauf schließen, dass möglicherweise auch andere spezifisch an CEACAM1 bindende und TLR2 aktivierende Pathogene dazu in der Lage sind, sich dieses Mechanismus zu bedienen. In der Lunge käme hierfür z.B. *Haemophilus influenzae* mit seinem spezifisch an CEACAM1 bindenden Oberflächenprotein P5 in Frage. Weitere mögliche Erreger in anderen Organsystemen sind verschiedene Typ 1 Fimbrien tragende Stämme von *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli*. Ob sich diese Bakterien tatsächlich ähnlicher Immunevasionsmechanismen bedienen und ob die Voraussetzungen dafür in den Geweben außerhalb der Lunge gegeben ist, muss in weiteren Studien geklärt werden.

5.2. Diskussion der eingesetzten Materialien und Methoden

5.2.1 Auswahl der Zellen

Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien HEK293 und A549 handelt es sich um adenoviral-transformierte Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie, HEK293) bzw. um humane Alveolarkarzinomzellen (A549) (Graham et al. 1977; Lieber et al. 1976). Die humane Bronchialepithelzelllinie (Beas2B) wurde nicht weiter verwendet, da auf diesen Zellen keine signifikante CEACAM-Expression nachweisbar war.

Unterschiedliche Reaktionen bezüglich der biologischen Aktivität im Vergleich zu primären Zellen wurden bereits in anderen Zusammenhängen beschrieben und sind in dieser Studie nicht gänzlich auszuschließen (Wansley et al. 2005; Zhu et al. 1987). Um die Beobachtungen zu den einzelnen Zelllinien zu verifizieren, wurden zentrale Versuche in primären Bronchialepithelzellen wiederholt. Die Schwierigkeit liegt jedoch in der Gewinnung, Anzucht und Empfindlichkeit primärer Zellen, daher wurden die meisten *in vitro*-Studien zuerst mit etablierten Zelllinien durchgeführt.

Ein weiteres Problem primärer Zellen stellen die individuellen Unterschiede in der Expression der Rezeptoren der Spender dar. Um die interindividuellen Schwankungen möglichst gering zu halten, wurden stichprobenhaft die Expressionsmuster der Spenderzellen in den unterschiedlichen Passagen mittels verschiedener Verfahren überprüft.

Die HEK293 Zellen sind eine etablierte Epithelzelllinie für Transfektionsstudien. Darüber hinaus konnten sie in dieser Studie dazu genutzt werden, die Rolle des Toll-like Rezeptors 2 in den untersuchten Signalwegen zu bestätigen, da sie selbst kein TLR2 exprimieren (Kirschning et al. 1998).

5.2.2 Auswahl der Bakterien

Die Bedeutung von *M. catarrhalis* für die Pathogenese der COPD wurde lange Zeit unterschätzt. Während der Einfluss anderer Bakterien wie *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae* auf das bronchiale Epithel weitgehend erforscht ist, wurden die Moraxellen lange als harmlose Kommensalen verkannt. Erste Hinweise auf eine Beteiligung an der Pathogenese der COPD lieferten Studien, in denen deutlich wurde, dass sich bei vielen Patienten mit COPD eine Kolonisation der unteren Atemwege mit *M. catarrhalis* nachweisen lässt, deren Ausmaß in direktem Zusammenhang mit einer deutlich verstärkten Entzündung des Respirationstrakts steht (Cabello et al. 1997; Hill et al. 2000; Stockley et al. 2000).

Die Wechselwirkungen von *M. catarrhalis* mit den PRRs des respiratorischen Epithels wurden erst in den letzten Jahren genauer untersucht (Slevogt et al. 2006). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Moraxellen unter anderem eine deutliche TLR2-vermittelte Immunantwort auslösen. Die Frage, warum es trotz vorhandener Immunabwehr zur Kolonisierung kommt, war bisher nicht geklärt und ist deshalb Gegenstand dieser Arbeit.

Da sich zwischen dem Wildtyp (*O35E*) und seiner UspA1-defizienten Mutante (*O35E.1*) funktionell deutliche Unterschiede zeigten, lag der Verdacht nahe, dass die Möglichkeit zur Kolonisierung der Bakterien UspA1-abhängig ist.

2003 wurde ein neuer Mechanismus entdeckt, der es den Moraxellen ermöglicht über das Oberflächenprotein UspA1 spezifisch an die N-Domäne von CEACAM1 zu binden (Hill and Virji 2003). Diese Bindungskapazität konnte in unseren Adhäsionsversuchen mit dem *Moraxella*-Stamm *O35E* auf A549 und primären Bronchialepithelzellen nachvollzogen werden.

Für CEACAM1 wurden bereits in vergangenen Studien inhibitorische Effekte beschrieben. Da der *Moraxella*-Wildtyp (*O35E*) sowohl TLR2 aktivieren als auch spezifisch an CEACAM1 binden kann und es von diesem Stamm außerdem eine UspA1-defiziente Mutante (*O35E.1*) gibt, war er als Erreger für die Untersuchung der Interaktion von TLR2 und CEACAM1 in der Lunge ideal geeignet. Der einzige Nachteil ist seine hoch spezifische Humanpathogenität, was *in vivo* Studien anhand von Tiermodellen zur UspA1-CEACAM1-Interaktion deutlich erschwert.

5.2.3 Transfektionsversuche

Transfektionsversuche sind ein molekularbiologisches Verfahren, um die Bedeutung von zell-eigenen Proteinen zu untersuchen. In dieser Arbeit konnten mit Hilfe verschiedener Transfektionsverfahren bereits beschriebene Zusammenhänge bestätigt und neue dargestellt werden. So wurde unter anderem bestätigt, dass HEK293 Zellen nur responsiv auf die Stimulation mit Moraxellen in Bezug auf die NF- κ B-Aktivierung bzw. die IL8-Sekretion reagieren, wenn sie zuvor mit einem Toll-like Rezeptor 2-Expressionsplasmid transfiziert wurden. Eine gleichzeitige Überexpression von CEACAM1 führte in dieser Zelllinie zu einer verringerten NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation. Mittels verschiedener CEACAM1-Expressionsplasmidmutanten konnte die für diese Hemmung verantwortliche Domäne des intrazytoplasmatischen Anteils des Rezeptors identifiziert werden.

Um diese Ergebnisse in einem weniger artifiziellen Zellsystem zu verifizieren, wurden small interfering RNA-Versuche mit A549 Zellen durchgeführt. Die Nukleofektion, bei der die siRNA zum Knock-down zelleigener Proteine durch Permeabilisierung der Kernmembran mittels elektrischem Impuls in den Zellkern eingeschleust wird, gilt als derzeitiger „Goldstandard“ der transfektionsgestützten Versuche.

Bei dieser Methode handelt es sich um eine transiente Transfektion mit sogenannter, synthetisch hergestellter „small interfering RNA“ (siRNA). Wird sie in eukaryote Zellen transfiziert, bewirkt sie eine verringerte Expression von spezifischen Zielgenen durch die Interaktion mit dem „RNA-induced silencing complex“ (RISC). Dieser entstandene Komplex bindet komplementär an die DNA oder mRNA des Zielgens und verhindert so die Expression der entsprechenden Proteine. Dieser Prozess wird auch als „silencing“ bezeichnet (Meister and Tuschl 2004). Da die Wirksamkeit verschiedener siRNA-Sequenzen sehr unterschiedlich ausfallen kann, ist es vor Versuchsbeginn unbedingt erforderlich, diese zu untersuchen, um den Zeitpunkt des optimalen Knock-down der Zielproteine festzustellen. In dieser Arbeit wurde hierfür zeitabhängig entweder die Verringerung der freien mRNA mittels RT-PCR oder die Abnahme der Zielproteine selbst mit Hilfe des Western Blots bestimmt.

Insgesamt wurden in der Arbeit verschiedene siRNA-Sequenzen eingesetzt. Durch die Transfektion von A549 Zellen mit CEACAM1 siRNA konnte die Bedeutung dieses Rezeptors für die Hemmung der TLR2-vermittelten IL8-Sekretion bestätigt werden. Der Einsatz von spezifischer siRNA gegen SHP1 und 2 zeigte, dass SHP1 als einziger Vertreter aus der bisher bekannten CEACAM1-Signalkaskade eine Rolle für die CEACAM1-TLR2-Interaktion spielt. Der Einfluss von SHP1 auf die TLR2-Signalkaskade, insbesondere den PI3 Kinase-abhängigen Weg, wurde mittels weiterer siRNA-Versuche, gekoppelt an unterschiedliche Folgeexperimente, genauer untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass es in SHP1 siRNA-transfizierten Zellen zur Aufhebung des für die Signalweiterleitung notwendigen p85-TLR2-Komplexes und in Folge dessen zu einer geringeren Phosphorylierung von Akt kommt. Mit Hilfe der Transfektion konnte also gezeigt werden, dass es bei CEACAM1-abhängiger Rekrutierung von SHP1 an den Toll-like Rezeptor 2 zur Hemmung der PI3K-abhängigen TLR2-Signalkaskade kommt.

Da primäre Bronchialepithelzellen sehr empfindlich auf das Nukleofektionsverfahren reagieren, musste für diese Versuche auf eine Modellzelllinie ausgewichen werden. A549 Zellen werden für Transfektionsversuche standardmäßig eingesetzt. Die Transfektionsparameter für diese Zelllinie sind bestens untersucht und sie verfügen über alle für die Untersuchungen wichtigen Proteine und Signalmechanismen. Deshalb waren sie für

die Fragestellung in dieser Arbeit das ideale Zellmodell. Trotzdem sind die Ergebnisse nicht vollständig auf primäre Zellen zu übertragen, und es bleibt nur zu vermuten, dass es sich bei den dargestellten Zusammenhängen um ein allgemeingültiges Prinzip handelt.

5.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmalig eine bisher unbekannte Strategie einzelner Erreger gezeigt werden, den angeborenen Mechanismen des humanen Immunsystems teilweise zu entgehen. Durch gleichzeitige Ligation von TLR2 und CEACAM1 sind die Erreger in der Lage, die TLR2-vermittelte Immunantwort pulmonaler Epithelzellen zu hemmen. Diese Beobachtung bietet einen ersten Ansatz zu erklären, warum es einigen Pathogenen gelingt, trotz vorhandener Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität, in der Lunge zu kolonisieren und dabei nur geringfügige oder keine Entzündungs- oder Abwehrreaktionen hervorzurufen. Die Ergebnisse der *in vitro* Studien lassen die Hypothese zu, dass dieses Phänomen sowohl vom Phänotyp der Erreger als auch von individuellen Unterschieden im CEACAM1-Expressionsmuster der jeweiligen Patienten abhängen kann. So findet die Hemmung der TLR2-vermittelten Immunantwort durch *M. catarrhalis* nur in Abhängigkeit des spezifisch an CEACAM1 bindenden Oberflächenproteins UspA1 statt. Erregerstämme, die dieses Protein nicht exprimieren, dürften damit auch nicht in der Lage sein, die TLR2-vermittelte Immunantwort auf dem beschriebenen Weg zu vermindern. Gleiches gilt für die Opa- bzw. nicht Opa-exprimierenden Neisserien.

Dass die Hemmung der TLR2-Signalkaskade auch durch andere Erreger, die spezifische Bindungspartner für CEACAM1 darstellen und gleichzeitig TLR2 aktivieren, möglich ist, ist nur zu vermuten und müsste in weiteren Studien näher untersucht werden. Mögliche weitere Liganden für TLR2 und CEACAM1 wären z. B. *Haemophilus influenzae* mit seinem spezifisch an CEACAM1 bindenden Oberflächenprotein P5 oder auch *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* mit ihren Typ 1 Fimbrien.

Während *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae* vor allem die Lunge besiedeln, sind *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* hauptsächlich im Darm anzutreffen. Es bleibt also zu untersuchen, ob ähnliche Kolonisierungsphänomene nur auf die Lunge beschränkt sind oder ob sie auch in anderen Organsystemen wie z. B. dem Darm eine Bedeutung haben.

Für den Verlauf der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung spielt die Keimbesiedlung in der Lunge eine entscheidende Rolle. *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae*

tragen nachweislich zur Verschlechterung des Zustandes der erkrankten Patienten bei. Auffällig ist, dass sich bei vielen Patienten mit COPD eine Kolonisation der unteren Atemwege mit diesen Erregern nachweisen lässt. Trotzdem werden *Moraxellen* auch bei 1-5 % der klinisch gesunden Erwachsenen gefunden. Ob sich diese Unterschiede zwischen Kolonisation und Infektion durch eine unterschiedlich starke Expression von CEACAM1 auf den Lungeneithelien der verschiedenen Patienten erklären lässt und wovon die Ausbildung bestimmter Expressionsmuster abhängt, muss in weiteren klinischen Studien untersucht werden. Denkbar ist eine Beeinflussung durch Noxen wie z.B. Zigarettenrauch. Auch eine genetische Prädisposition ist nicht auszuschließen. In der Vergangenheit hatten CEACAM Rezeptoren besonders als Tumormarker eine klinische Bedeutung. Dass sie auch auf gesunden Geweben zu finden sind, haben zahlreiche neuere Studien gezeigt. Trotzdem ist die Expression in den veränderten Zellen maligner Tumore auch in der Lunge im Vergleich zu gesundem Gewebe stark erhöht. Ob auch eine chronische Inflammation der Bronchialepithelzellen zu einer verstärkten CEACAM1 Expression führt, muss ebenfalls weiter untersucht werden.

6 Zusammenfassung / Summary

6.1 Zusammenfassung

Die bakterielle Ligation von CEACAM1 reduziert die TLR2-vermittelte Immunabwehr auf humanen Bronchialepithelzellen

Die COPD ist eine häufige, gesundheitsökonomisch bedeutsame Erkrankung, deren Fortschreiten bisher auch mit Hilfe modernster Medikamente nur unzureichend zu beeinflussen ist. Der Verlauf ist insbesondere gekennzeichnet von bakteriell-induzierten Infektexazerbationen. Bedeutsame Erreger sind dabei: *M. catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae*, deren zunehmende Antibiotikaresistenz die Therapie zusätzlich erschwert. Besonders *M. catarrhalis* ist trotz der Aktivierung einer TLR2-vermittelten Signalkaskade in der Lage, im normalerweise sterilen unteren Respirationstrakt zu kolonisieren, ohne von der Immunabwehr eliminiert zu werden. Kenntnisse über die Mechanismen, die zu dieser Kolonisierung führen, könnten wesentlich zum Verständnis der Pathogenese der COPD beitragen und neue Therapiestrategien im Kampf gegen diese Erkrankung eröffnen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *M. catarrhalis*-induzierte TLR2-vermittelte Immunantwort pulmonaler Epithelzellen durch gleichzeitige Aktivierung von CEACAM1 reduziert wird. Das *Moraxella*-spezifische Oberflächenmembranprotein UspA1 bindet spezifisch an die extrazellulär gelegene N-Domäne von CEACAM1. Dadurch wird der Rezeptor innerhalb seiner intrazellulär gelegenen ITIM-Domäne tyrosinphosphoryliert und es kommt zu einer Rekrutierung von SHP1 an den Rezeptor. Beide Rezeptoren werden auf der Oberfläche primärer Bronchialepithelzellen exprimiert. Durch Kollokalisierung von CEACAM1 und TLR2 wird SHP1 in räumliche Nähe zu seinem Substrat gebracht und kann so die p85-Untereinheit der PI3 Kinase dephosphorylieren, was zu einer Unterbrechung des PI3K-abhängigen Signalweges von TLR2 führt. In Folge dessen kann die Serin/Threoninkinase Akt nicht mehr phosphoryliert werden und eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B mit anschließender IL8-Sekretion durch diesen Signalweg bleibt aus. Die MyD88-abhängige Signalkaskade von TLR2 bleibt davon unbeeinflusst, was dazu führt, dass es in den *in vitro*-Versuchen nur zu einer teilweisen Hemmung der IL8-Sekretion kommt. Welche Mechanismen die Aktivierung des PI3 Kinase-abhängigen und des MyD88-abhängigen Signalweges zur Weiterleitung des TLR2-vermittelten Signals

bedingen und wovon das CEACAM-Expressionsmuster humaner Bronchialepithelzellen *in vivo* abhängt, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen inhibitorischen Effekte bleiben nicht nur auf *M. catarrhalis* beschränkt. Es konnte gezeigt werden, dass die *Neisseria*-spezifischen Opa Proteine, die ebenso wie UspA1 in der Lage sind an die N-Domäne von CEACAM1 zu binden, auf gleichem Weg die TLR2-vermittelte Immunantwort hemmen können. Es ist zu vermuten, dass es sich bei den beschriebenen Beobachtungen um eine generelle Strategie verschiedener durch TLR2 erkannter Pathogene handelt, mittels gleichzeitiger Ligation von CEACAM1 die humane Immunantwort zu umgehen. Welche Erreger diesen Mechanismus neben *M. catarrhalis* und *Neisseria meningitidis* noch ausnutzen und ob das System auch auf andere Organe übertragbar ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können helfen, die verminderte Immunabwehr des pulmonalen Epithels während der Kolonisation von CEACAM1 bindenden Bakterien zu verstehen. Trotzdem sind weitere Versuche notwendig, um die Feinabstimmung zwischen den unterschiedlichen Rezeptoren genauer begreifen und die gewonnen Erkenntnisse schließlich für neue Strategien im Kampf gegen die Entzündung nutzen zu können.

6.2 Summary

Bacterial ligation of CEACAM1 reduces Toll-like receptor2-triggered antibacterial responses of pulmonary epithelial cells

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major cause of chronic morbidity and mortality throughout the world. Modern drugs and therapies do not sufficiently influence progression and the outcome of the disease. Pathogenes like *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* are responsible for acute bacterial COPD exacerbations and their rising β -lactam resistance causes additional problems in treatment of COPD patients. Especially *M. catarrhalis*, which normally induces a TLR2-dependent immunological response, is able to colonize the human respiratory tract without causing overt clinical symptoms. An increasing knowledge of the mechanisms of bacterial colonization would lead to a better understanding of pathogenesis of the chronic obstructive pulmonary disease and perhaps could reveal new strategies for therapy of this illness.

In this study it is shown that CEACAM1 inhibits *M. catarrhalis*-induced TLR2-triggered antibacterial response of pulmonary epithelial cells. The outer membrane protein UspA1 of

M. catarrhalis binds specifically to the extracellular N-domain of CEACAM1. This ligation leads to tyrosinphosphorylation of the CEACAM1-ITIM-domain and to recruitment of SHP1. Both receptors, CEACAM1 and TLR2, are expressed on the outer membrane of primary bronchial epithelial cells. Colocalization of them enables SHP1 to dephosphorylate the p85-subunit of the PI3 kinase. Subsequently, formation of the signaling complex composed of TLR2 and PI3K, induced in response to ligation of TLR2 by *M. catarrhalis*, is abrogated leading to inhibition of the PI3K-Akt-NF- κ B signaling pathway. Nevertheless, IL8 secretion is not completely inhibited because the MyD88 dependent TLR2 signaling pathway remains un-affected by the CEACAM1-UspA1 interaction. Further studies are needed to elucidate the mechanisms, which are regulating the two different TLR2 signaling pathways and CEACAM1 expression *in vivo*.

The inhibitory effect of CEACAM1 regarding TLR2 signaling is not only restricted to *M. catarrhalis*. Neisserial Opa proteins are also able to bind specifically to CEACAM1. They use the same strategy to evade the TLR2-triggered human immune response. Possibly the described observations represent a general mechanism and there are other CEACAM binding pathogenes which are able to use CEACAM1 as coinhibitory receptor for TLR2. Further studies are needed to show, if there are other pathogenes except from *M. catarrhalis* and *Neisseria meningitidis* which use the same strategy and if this strategy also functions in other organic systems such as the enteral mucosa.

The results of this study may add to the understanding of the development of a relative immunological hyporesponsiveness of epithelial cells, found during mucosal colonization by CEACAM1 binding pathogenes. Nevertheless further studies are needed to complete the understanding of the interaction of the different innate immune receptors and to be able to provide the basis for new therapeutic strategies to combat inflammation.

7 Referenzen

- Aderem, A. and Ulevitch, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787 (2000).
- Aderem, A. and Underhill, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593-623 (1999).
- Aihara, M., Takizawa, H., Azuma, A., Wakebe, H., Ohmoto, Y., Imagawa, K., Kikuchi, M., Mukaida, N. and Mtsushima, K. Mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect. Immun.* **65**, 3218-3224 (1997).
- Akira, S. and Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499-511 (2004).
- Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* **2**, 675-680 (2001).
- An, H., Hou, J., Zhou, J., Zhao, W., Xu., H., Zheng, Y., Yu, Y., Liu, S., and Cao, X. Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1. *Nat. Immunol.* **9**, 542-550 (2008).
- Anderson, K.V., Bokla, L. and Nusslein-Volhard, C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**, 791-798 (1985).
- Arbibe, L., Mira, J.P., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P.J., Ulevitch, R.J. and Knaus, U.G. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a RAC1-dependent pathway. *Nat. Immunol.* **1**, 533-540 (2000).
- Baggiolini, M. and Clark-Lewis, I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* **307**, 97-101 (1992).
- Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565-568 (1998).

- Baran, C.P., Tridandapani, S., Helgason, C.D., Humphries, R.K., Krystal, G. and Marsh, C.B. The inositol 5'-phosphatase SHIP-1 and the Src kinase Lyn negatively regulate macrophage colony-stimulating factor-induced Akt activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 38628-38636 (2003).
- Barnes, P.J. Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol. Rev.* **56**, 515-148 (2004).
- Barnett, T.R., Drake, L. et Pickle, W.^{2nd}. Human bilary glycoprotein gene: characterization of a family of novel alternatively spliced RNAs and their expressed proteins. *Mol. Cell Biol.* **13**, 1273-1282 (1993).
- Barrow, A.D. and Trowsdale, J. You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling. *Europ. J. of Immunol.* **36**, 1646-1653 (2006).
- Beauchemin, N., Draber, P., Dveksler, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F., Hammarström, S., Holmes, K.V., Karlsson, A., Kuroki, M., Lin, S.H., Lucka, L., Najjar, S.M., Neumaier, M., Öbrink, B., Shively, J.E., Skubitz, K.M., Stanners, C.P., Thomas, P., Thompson, J.A., Virji, M., von Kleist, S., Wagner, C., Watts, S. et Zimmermann, W. Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell Res.* **252**, 243-249 (1999).
- Beauchemin, N., Kunath, T., Robitaille, J., Chow, B., Turbide, C., Daniels, E. and Veillette, A. Association of bilary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene* **14**, 783-790 (1997).
- Becker, A., Lucka, L., Kilian, C., Kannicht, C. and Reutter, W. Characterisation of the ATP-dependent taurocholate-carrier protein (gp110) of the hepatocyte canalicular membrane. *Eur. J. Biochem.* **214**, 539-548 (1993).
- Belvin, M.P. and Anderson, K.V. A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 393-416 (1996).
- Beutler, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. *Nature* **430**, 257-263 (2004).

- Birchler, T., Seibl, R., Buchner, K., Loeliger, S., Seger, R., Hossle, J.P., Aguzzi, A. and Lauener, R.P. Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3131-3137 (2001).
- Boulten, I.C. and Gray-Owen, S.D. Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat. Immunol.* **3**, 229-236 (2002).
- Bousquet, C., Guillermet-Guibert, J., Saint-Laurent, N., Archer-Lahlou, E., Lopez, F., Fanjul, M., Ferrand, A., Fourmy, D., Pichereaux, C., Monsarrat, B., Pradayrol, C., Estève, J.P. and Susini, C. Direct binding of p85 to sst2 somatostatin receptor reveals a novel mechanism for inhibiting PI3K pathway. *Embo J.* **25**, 3943-3954 (2006).
- Brasier, A.R., Jamaluddin, M., Casola, A., Duan, W., Shen, Q. and Garofalo, R.P. A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF-kappaB1, and c-Rel transcriptionfactors. *J. Biol. Chem.* **273**, 3551-3561 (1998).
- Brooks, M.J., Sedillo, J.L., Wagner, M., Wang, W., Attia, A.S., Wong, H., Laurence, C.A., Hansen, E.J. and Gray-Owen, S.D. *Moraxella catarrhalis* binding to host cellular receptors is mediated by sequence-specific determinants not conserved among all UspA1 protein variants. *Infect. Immun.* **76**, 5322-5329 (2008).
- Brummer, J., Neumaier, M., Gopfert, C. and Wagner, C. Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* **11**, 1649-1655 (1995).
- Budt, M. Charakterisierung der Expression und Signaltransduktion des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 in PC12-Zellen. *Online-Dissertation FU-Berlin* (2002). http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000000663
- Burshtyn, D.N., Yang, W., Yi, T. and Long, E.O. A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Biol. Chem.* **272**, 13066-13072 (1997).

- Cabello, H., Torres, A., Celis R., ElEbiary, M., delaBellacasa, J.P., Xaubet, A., Gonzalez, J., Agusti, C. and Soler, N. Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: A bronchoscopic study. *Eur. Respir. J.* **10**, 1137-1144 (1997).
- Carriquiry, L.A. and Pineyro, A. Should carcinoembryonic antigen be used in the management of patients with colorectal cancer? *Dis. Colon Rectum* **42**, 921-929 (1999).
- Caugant, D.A., Tzanakaki, G. and Kriz, P. Lessons from meningococcal carriage studies. *FEMS Microbiology Reviews* **31**, 52-63 (2007).
- Chun, J. and Prince, A. Activation of Ca²⁺-Dependent Signaling by TLR2. *J. Immunol.* **177**, 1330-1337 (2006).
- Chung, K.F. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Resp. J.* **18**, 50-59 (2001).
- Coggeshall, K.M. Inhibitory signaling by B cell Fc gamma RIIB. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 306-312 (1998).
- Connors, R., Hill, D.J., Borodina, E., Agnew, C., Daniell, S.J., Burton, N.M., Sessions, R.B., Clarka, A.R., Catto, L.E., Lammie, D., Wess, T., Brady, R.L. and Virji, M. The Moraxella adhesin UspA1 binds to its human CEACAM1 receptor by a deformable trimeric coiled-coil. *EMBO J.* **27**, 1779-1789 (2008).
- Cuevas, B., Lu, Y., Watt, S., Kumar, R., Zhang, J., Siminovitch, K.A. and Mills, G.B. SHP-1 regulates Lck-induced phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation and activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 27583-27589 (1999).
- Cuevas, B.D., Lu, Y., Mao, M., Zhang, J., LaPushin, R., Siminovitch, K. and Mills, G.B. Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 27455-27461 (2001).
- Daeron, M., Latour, S., Malbec, O., Espinosa, E., Pina, P., Pasmans, S. and Fridman, W.H. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR- and FcR-dependent cell activation. *Immunity* **3**, 635-646 (1995).

- de Jonge, M.I., Bos, M.P., Hamstra, H.J., Jiskoot, W., van Ulsen, P., Tommassen, J., van Alphen, L. and van der Ley, P. Conformational analysis of opacity proteins from *Neisseria meningitidis*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5215-5223 (2002).
- de Jonge, M., Hamstra, H.J., van Alphen, L., Dankert, J. and van der Ley, P. Mapping the binding domains on meningococcal Opa proteins for CEACAM1 and CEA receptors. *Mol. Microbiol.* **50**, 1005-1015 (2003).
- DeForge, L.E., Preston, A.M., Takeuchi, E., Kenney, J., Boxer, L.A. and Remick, D.G. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J. Biol. Chem.* **268**, 25568-25576 (1993).
- Dubois, M.,J., Bergeron, S., Kim, H.J., Dombrowski, L., Perreault, M., Fournès, B., Faure, R., Olivier, M., Beauchemin, N., Shuhnan, G.I., Siminovitch, K.A., Kim, J.K. and Marette, A. The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis. *Nat. Med.* **12**, 549-556 (2006).
- Dveksler, G.S., Dieffenbach, C.W., Cardellichio, C.B., Mc Cuaig, K., Pensiero, M.N., Jiang, G.S., Beauchemin, N. and Holmes, K.V. Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *J. Virol.* **67**, 1-8 (1993a).
- Edlund, M., Wikström, K., Toomik, R., Ek, P. and Öbrink, B. Characterization of protein kinase C-mediated phosphorylation of the short cytoplasmic domain isoform of C-CAM. *FEBS Lett.* **425**, 166-170 (1998).
- Fängsmyr, L., Baranov, V., Prall, F., Yeung, M.M., Wagner, C. and Hammarström, S. Cell and region-specific expression of biliary glycoprotein and its messenger RNA in normal human colonic mucosa. *Cancer Res.* **55**, 2963-2967 (1995).
- Gay, N.J. and Keith, F.J. Drosophila Toll and IL-1-receptor. *Nature* **351**, 355-356 (1991).
- Godfraind, C., Langreth, S.G., Cardellichio, C.B., Knobler, R., Coutelier, J.P., Dubois-Dalcq, M. and Holmes, K.V. Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Lab. Invest.* **73**, 615-627 (1995).

- Gold, P. and Freedman S.O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* **122**, 467-482 (1965).
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-74 (1977).
- Graham, R.A., Wang, S., Catalano P.J. and Haller, D.G. Postsurgical surveillance of colon cancer: preliminary cost analysis of physician examination, carcinoembryonic antigen testing, chest x-ray and colonoscopy. *Ann. Surg.* **228**, 59-63 (1998).
- Gray-Owen, S.D., Dehio, C., Haude, A., Grunert, F. and Meyer, T.F. CD66 carcinoembryonic antigens mediate interactions between Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* and human polymorphonuclear phagocytes. *EMBO J.* **16**, 3435-3445 (1997a).
- Hammarström, S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin. Cancer Biol.* **9**: 67-81 (1999).
- Hanenberg, H., Baumann, M., Quentin, I., Nagel, G., Grosse-Wilde, H., von Kleist, S., Gobel, U., Burdach, S. and Grunert, F. Expression of the CEA gene family members NCA-50/90 and NCA-160 (CD66) in childhood acute lymphoblastic leukemias (ALLs) and in cell lines of B-cell origin. *Leukemia* **8**, 2127-2133 (1994).
- Hashimoto, C., Hudson, K.L. and Anderson, K.V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral polarity, appear to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**, 269-279 (1988).
- Hill, A.T., Campbell, E.J., Hill, S.L., Bayley, D.L. and Stockley, R.A. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am. J. of Med.* **109**, 288-295 (2000).
- Hill, D.J. and Virji, M.A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catharrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domaine of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1. *Molecular Microbiology* **48**, 117-129 (2003).

- Hill, D.J., Edwards, A.M., Rowe, H.A. and Virji, M. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM)-binding recombinant polypeptide confers protection against infection by respiratory and urogenital pathogens. *Molecular Microbiology* **55**, 1515-1527 (2005).
- Hill, D.J., Toleman, M.A., Evans, D.J., Villullas, S., Van Alphen, L. and Virji, M. The variable P5 proteins of typable and non-typable *Haemophilus influenzae* target human CEACAM1. *Mol. Microbiol.* **39**, 850-862 (2001).
- Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H. and Kracht, M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 847-855 (2002).
- Huber, A.R., Kunkel, S.L., Todd, R.F. and Weiss, S.J. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous Interleukin 8. *Science* **254**, 99-102 (1991).
- Huber, M., Izzi, L., Grondin, P., Houde, C., Kunath, T., Veillette, A. and Beauchemin, N. 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. *J. Biol. Chem.* **274**, 335-344 (1999).
- Hunter, T. Signaling – 2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127 (2000).
- Hu, W.-G., Chen, J., McMichael, J.C. & Gu, X.-X. Functional Characteristics of a Protective Monoclonal Antibody against Serotype A and C Lipooligosaccharides from *Moraxella catarrhalis*. *Infect. Immun.* **69**, 1358-1363 (2001).
- Imhof, B.A. and Dunon, D. Basic mechanism of leukocyte migration. *Horm. Metab. Res.* **29**, 614-621 (1997).
- Janeway, C.A., Jr. and Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216 (2002).
- Janeway, C.A., Jr. and Medzhitov, R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin. Immunol.* **10**, 349-350 (1998).
- Janssens, S. and Beyaert, R. Role of Toll-like receptors in pathogene recognition. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 637-646 (2003).

- Kalesnikoff, J., Sey, L.M., Hughes, M.R., Büchse, T., Rauh, M.J., Cao, L.P., Lam, V., Mui, A., Huber, M. and Krystal, G. The role of SHIP in cytokine-induced signaling. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **149**, 87-103 (2003).
- Kammerer, R., Hahn, S., Singer, B.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.* **28**, 3664-3674 (1998).
- Kammerer, R., Stober, D., Singer, B.B., Öbrink, B. and Reimann, J. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation. *J. Immunol.* **166**, 6537-6544 (2001).
- Karalus, R. and Campagnari, A. *Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen. *Microbes and Infection* **2**, 547-559 (2000).
- Keller, R., Gustafson, J.E. and Keist, R. The macrophage response to bacteria. Modulation of macrophage functional activity by peptidoglycan from *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. *Clin. Exp. Immunol.* **89**, 384-389 (1992).
- Kim, J., Kaye, F.J., Henslee, J.G., Shiveley, J.E., Park, J.G., Lai, S.L., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L. and Gazdar, A.F. Expression of carcinoembryonic antigens and related genes in lung and gastrointestinal cancer. *Int. J. Cancer* **52**, 718-725 (1992).
- Kirschning, C.J., Wesche, H., Merrill, A.T., and Rothe, M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **188**, 2091-2097 (1998).
- Klingman, K. and Murphy, T.F. Purification and characterisation of a high-molecular-weight outer membrane protein of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. *Infect. Immun.* **62**, 1150-1155 (1994).
- Kodera, Y., Isobe, K., Yamauchi, M., Satta, T., Hasegawa, T., Oikawa, S., Kondoh, K., Akiyama, S., Itho, K. and Nakashima, I. Expression of carcinoembryonic antigens (CEA) and nonspecific crossreacting antigens (NCA) in gastrointestinal cancer; the correlation with degree of differentiation. *Br. J. Cancer* **68**, 130-136 (1993).

- Krebs, E.G. and Beavo, J.A. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 923-959 (1979).
- Lafontaine, E.R., Cope, L.D., Aebi, C., Latimer, J.L., McCracken, G.H., Jr. and Hansen, E.J. The UspA1 Protein and a Second Type of UspA2 Protein Mediate Adherence of *Moraxella catarrhalis* to Human Epithelial Cells In Vitro. *J. Bacteriol.* **182**, 1364-1373 (2000).
- Lee, H.S.W., Ostrowski, M.A. and Gray-Owen, S.D. CEACAM1 dynamics during *Neisseria gonorrhoeae* suppression of CD4⁺ T lymphocyte activation. *J. Immunol.* **180**, 6827-6835 (2008).
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. and Hoffmann, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983 (1996).
- Leusch, H-G., Drzeniek, Z., Hefta, S.A., Markos-Pusztai, Z. and Wagner, C. The putative role of members of the CEA-gene family (CEA, NCA and BPG) as ligands for the bacterial colonization of different human epithelial tissues. *Zentralbl. Bakteriol.* **275**, 118-122 (1991a).
- Leusch, H-G., Drzeniek, Z., Markos-Pusztai, Z. and Wagner, C. Binding of *E. coli* and *Salmonella* strains to members of the CEA family: differential binding inhibition by aromatic α -glycosides of mannose. *Infect. Immun.* **59**, 2051-2057 (1991b).
- Leusch, H-G., Hefta, S.A., Drzeniek, Z., Hummel, K., Markos-Pusztai, Z. and Wagner, C. *Escherichia coli* of human origin binds to carcinoembryonic antigen (CEA) and non-specific crossreacting antigen (NCA). *FEBS Lett.* **216**, 405-409 (1990).
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W. and Todaro, G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* **17**, 62-70 (1976).
- Majuri, M.L., Hakkarainen, M., Paavonen, T. and Renkonen, R. Carcinoembryonic antigen is expressed on endothelial cells. A putative mediator of tumor cell extravasation and metastasis. *Apmis.* **102**, 432-438 (1994).

- Margolis, R.N., Schell, M.J., Taylor, S.I. and Hubbard, A.L. Hepatocyte plasma membrane ECTO-ATPase (pp120/HA4) is a substrate for tyrosine kinase activity of the insulin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 562-566 (1990).
- Mastonarde, J.G., Monick, M.M., Mukaida, N., Matsushima, K. And Hunninghake, G.W. Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. *J. Infect. Dis.* **177**, 1275-1281 (1998).
- McMichael, J.C. Progress toward the development of a vaccine to prevent Moraxella (Branhamella) catarrhalis infections. *Microbes Infect.* **2**, 561-568 (2000).
- McMichael, J.C. Vaccines for Moraxella catarrhalis. *Vaccine* **19**, S101-S107 (2000).
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology* **8**, 452-456 (2000).
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C.A., Jr. A homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397 (1997).
- Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 135-145 (2001).
- Meister, G. and Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-349 (2004).
- Metze, D., Soyer, H-P., Zelger, B., Neumaier, M., Grunert, F., Hartig, C., Amann, U., Bhardwaj, R., Wagner, C. and Luger T.A. Expression of a glycoprotein of the carcinoembryonic antigen family in normal and neoplastic sebaceous glands. *J. Am. Acad. Dermatol.* **134**, 735-744 (1996).
- Mowery, J. and Hixson, D.C. Detection of cell-CAM 105 in the pericanalicular domain of the rat hepatocyte plasma membrane. *Hepatology* **13**, 47-56 (1991).
- Mukaida, N., Harada, A. and Matsushima, K. Interleukin-8 (IL8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**, 9-23 (1998).

- Murayama, T., Ohara, Y., Obuchi, M., Khabar, K.S., Higashi, H., Mukaida, N. and Matsushima, K. Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. *J. Virol.* **71**, 5692-5695 (1997).
- Murphy, T.F., Brauner, A.L., Grant, B.J.B. and 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., Sethi, S. and Niederman, M.S. The role of bacteria in exacerbations of COPD – a constructive view. *Chest* **118**, 204-209 (2000).
- Murphy, T.F. Studies of the outer membrane proteins of *Branhamella catarrhalis*. *Am. J. Med.* **88**, 41S-45S (1990).
- Murphy, T.F. The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Opin. Infect. Diss.* **19**, 225-230 (2006).
- Nagaishi, T., Pao, L., Lin, S-H., Iijima, H., Kasre, A., Qiao, S-W., Chen, Z., Glickman, J., Najjar, S.M., Nakajima, A., Neel, B.G. and Blumberg, R.S. SHP1 Phosphatase-Dependent T Cell Inhibition by CEACAM1 Adhesion Molecule Isoforms. *Immunity* **25**, 769-781 (2006).
- Nakayama, M., Underhill, D.M., Petersen, T.W., Li, B., Kitamura, T., Takai, T. and Aderem, A. Paired Ig-like receptors bind to bacteria and shape TLR-mediated cytokine production. *J. Immunol.* **178**, 4250-4259 (2007).
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signaling pathway. *Nature* **398**, 252-256 (1999).
- Öbrink, B. CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 616-626 (1997).
- Ocklind, C. and Öbrink, B. Intercellular adhesion of rat hepatocytes. Identification of a cell surface glycoprotein involved in the initial adhesion process. *J. Biol. Chem.* **257**, 6788-6795 (1982).

- Odin, P. and Öbrink, B. Quantitative determination of the organ distribution of the cell adhesion molecule cell-CAM 105 by radioimmunoassay. *Exp. Cell Res.* **171**, 1-15 (1987).
- Odin, P. and Öbrink, B. The cell-surface expression of the cell adhesion molecule cellCAM 105 in rat fetal tissues and regenerating liver. *Exp. Cell Res.* **179**, 89-103 (1988).
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S. and Kolb, H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol.* **164**, 558-561 (2000).
- Olsen, A., Teglund, S., Nelson, D., Gorden, L., Copeland, A., Georgescu, A., Carrano, A. and Hammarström, S. Gene organisation of the pregnancy-specific glycoprotein region on human chromosome 19: assembly and analysis of a 700-kb cosmid contig spanning the region. *Genomics* **23**, 659-668 (1994).
- Patel, I.S., Seemungal, T.A.R., Wilks, M., Lloyd-Owen, S.J., Donaldson, G.C. and Wedzicha, J.A. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* **57**, 759-764 (2002).
- Peng, D., Hong, W., Choudhury, B.P., Carlson, R.W. and Gu, X.-X. *Moraxella catarrhalis*: Bacterium without Endotoxin, a Potential Vaccine Candidate. *Infect. Immun.* **73**, 7569-7577 (2005).
- Poy, M.N., Ruch, R.J., Fernstrom, M.A., Okabayashi, Y. and Najjar, S.M. Shc and CEACAM1 interact to regulate the mitogenic action of insulin. *J. Biol. Chem.* **277**, 1076-1084 (2002a).
- Prall, F., Nollau, P., Neumaier, M., Haubeck, H-D., Drzeniek, Z., Helmchen, U., Löning, T. and Wagner, C. CD66a (BPG), an adhesion molecule of the CEA family, is expressed in epithelium, endothelium and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **44**, 35-41 (1996).
- Reddel, R.R., Ke, Y., Gerwin, B.I., McMenamin, M.G., Lechner, J.F., Su, R.T., Brash, D.E., Park, J.B., Rhim, J.S., and Harris, C.C. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res.* **48**, 1904-1909 (1988).

- Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A. and Bazan, J.F. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 588-593 (1998).
- Rojas, M., Fuks, A and Stanners, C.P. Biliary glycoprotein, a member of the immunoglobulin supergene family functions in vitro as a Ca²⁺ dependent intercellular adhesion molecule. *Cell Growth Differentiation* **1**, 527-533 (1990).
- Ruse, M. and Knaus, U.G. New players in TLR-mediated innate immunity – PI3K and small Rho GTPases. *Immunologic Research* **34**, 33-48 (2006).
- Sabroe, I., Lloyd, C.M., Whyte, M.K., Dower, S.K., Williams, T.J. and Pease, J.E. Chemokines, innate and adaptive immunity and respiratory disease. *Eur. Respir. J.* **19**, 350-355 (2002).
- Salmi, M. and Jalkanen, S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 760-771 (2005).
- Sauter, S.L., Rutherford, S.M., Wagner, C., Shively, J.E. and Hefta, S.A. Binding of nonspecific cross reacting antigen, a granulocyte membrane glycoprotein, to *E.coli* expressing type I fimbriae. *Infect. Immun.* **59**, 2485-2493 (1991).
- Schmeck, B., Huber, S., Moog, K., Zahlten, J., Hocke, A.C., Opitz, B., Hammerschmidt, S., Mitchell, T.J., Kracht, M., Rosseau, S., Suttorp, N. and Hippenstiel, S. Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF- κ B-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **290**, 730-737 (2006).
- Schölzel, S., Zimmermann, W., Schwarzkopf, G., Grunert, F., Rogaczewski, B. and Thompson, J. Carcinoembryonic antigene family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am. J. Pathol.* **156**, 595-605 (2000).
- Sethi, S., Anzueto, A. and Farrell, D.J. Antibiotic activity of telithromycin and comperators against bacterial pathogens isolated from 3043 patients with acute exacerbation of chronic bronchitis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* (2005).

- Sethi, S., Maloney, L., Grove, L., Wrona, C. and 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., Murphy, T.F. Bacterial Infektion in Chronic Obstructive Pulmonary Disease in 2000: a State-of-the-Art Review. *Clin. Mikrobiol. Rev.* **14**, 336-363 (2001)
- Sethi, S., Muscarella, K., Evans, N., Klingman, K.L., Grant, B.J.B. and Murphy, T.F. Airway Inflammation and Etiology of Acute Exacerbations of Chronic Bronchitis. *Chest* **118**, 1557-1565 (2000).
- Sethi, S., Muscarella, K., Evans, N., Klingman, K.L., Grant, B.J.B. and Murphy, T.F. Bacterial colonization enhances airway inflammation in COPD. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, A820 (1999).
- Shi, Z.R., Tacha, D. and Itzkowitz, S.H. Monoclonal antibody COL-1 reacts with restricted epitopes on carcinoembryonic antigene : an immunohistochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 1215-1219 (1994).
- Sinclair, N.R., Why so many coinhibitory receptors? *Scand. J. Immunol.* **50**, 10-13 (1999).
- Singh, S., Cisera, K.M., Turnidge, J.D. and Russell, E.G. Selection of optimum laboratory tests for the identification of *Moraxella catarrhalis*. *Pathology* **29**, 206-208 (1997).
- Skubitz, K.M., Campbel, K.D., Ahmed, K. and Skubitz A.P. CD66 family members are associated with tyrosin kinase activity in human neutrophils. *J. Immunol.* **155**, 5382-5390 (1995).
- Slevogt, H., Schmeck, B., Jonatat, C., Zahlten, J., Beermann, W., vanLaak, V., Opitz, B., Dietel, S., Dje N'Guessan, P., Hippenstiel, S., Suttorp, N. and Seybold, J. *Moraxella catharralis* induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **290**, L818-L826 (2006).
- Slevogt, H., Seybold, J., Tiwari, K.N., Hocke, A.C., Jonatat, C., Dietel, S., Hippenstiel, S., Singer, B.B., 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. *Cell Microbiol.* **9**, 694-707 (2007).

- Sonoda, J., Kasahara, T., Yamaguchi, J., Kuno, K., Matsushima, K. and Mukaida, N. Stimulation of interleukin-8 production by okadaic acid and vanadate in human promyelocyte cell line, an HL-60 subline, Possible role of mitogen-activated protein kinase on the okadaic acid-induced NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 15366-15372 (1997).
- Stockley, R.A., Hill, A.T., Hill, S.L. and Campbell, E.J. Bronchial inflammation - Its relationship to colonizing microbial load and alpha(1)-antitrypsin deficiency. *Chest* **117**, 291S-293S (2000).
- Strassheim, D., Asehnoune, K., Park, J.S., Kim, J.Y., He, Q., Richter, D., Kuhn, K., Mitra, S. and Abraham, E. Phosphoinositide 3-kinase and Akt occupy central roles in inflammatory responses of Toll-like receptor 2-stimulated neutrophils. *J. Immunol.* **172**, 5727-5733 (2004).
- Strassheim, D., Kim, J.Y., Park, J.S., Mitra, S. and Abraham, E. Involvement of SHIP in TLR2-induced neutrophil activation and acute lung injury. *J. Immunol.* **174**, 8064-8071 (2005).
- Takeda, K. and Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**, 1-14 (2005).
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335-376 (2003).
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L. and Akira, S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* **169**, 10-14 (2002).
- Thompson, J., Zimmermann, W., Nollau, P., Neumaier, M., Weber-Arden, J., Schrewe, H., Craig, I. and Willocks, T. CGM2 a member of the carcinoembryonic antigen family is down-regulated in colorectal carcinoma. *J. Biol. Chem.* **269**, 32924-32931 (1994).
- Tosi, M.F. Innate immune responses to infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* **116**, 241-249 (2005).
- Underhill, D.M. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. *Immunological Reviews* **219**, 75-87 (2007).

- Verduin, C.M., Hol, C., Fler, A., van Dijk, H., van Belkum, A. *Moraxella catarrhalis*: from Emerging to Established Pathogen. *Clin. Mikrobiol. Rev.* **15**, 125-144 (2002).
- Virji, M., Evans, D., Griffith, J., Hill, D., Serino, L., Hadfield, H. and Watt, S.M. Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* **36**, 784-795 (2000).
- Virji, M., Watt, S.M., Barker, S., Makepeace, K. and Doyonass, R. The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* **22**, 929-939 (1996).
- Wang, J. and Springer, T.A. Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol. Rev.* **163**, 197-215 (1998).
- Wansley, E.K., Dillon, P.J., Gainey, M.D., Tam, J., Cramer, S.D., and Parks, G.D. Growth sensitivity of a recombinant simian virus 5 P/V mutant to type I interferon differs between tumor cell lines and normal primary cells. *Virology* **335**, 131-144 (2005).
- Wessells, J., Wessner, D., Parsells, R., White, K., Finkenzeller, D., Zimmermann, W. and Dveksler, G. Pregnancy specific glycoprotein 18 induces IL-10 expression in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1830-1840 (2000).
- Whitsett, J.A. Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense and repair. *J. Clin. Invest.* **109**, 565-569 (2002).
- WHO Report (2004)
- Wymann, M.P., Zvelebil, M. and Laffargue, M. Phosphoinositide 3-kinase signaling – which way to target? *Trends Pharmacol. Sci.* **7**, 366-376 (2003).
- Zimmermann, W. Carcinoembryonic antigen. In: Creighton T (ed) *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*. John Wiley and Sons, New York, pp 459-462 (2002).
- Zimmermann, W. CEA-homepage. <http://www.carcinoembryonic-antigen.de>
- Zhou, G.Q. and Hammarström, S. Pregnancy-specific glycoprotein (PSG) in baboon (*Papio hamadryas*): family size, domain structure, and prediction of a functional region in primate PSGs. *Biol. Reprod.* **64**, 90-99 (2001).

- Zhou, G.Q., Zhang, Y. and Hammarström, S. The carcinoembryonic antigen (CEA) gene family in non-human primates. *Gene* **264**, 105-112 (2001).
- Zhu, Q.Z., Singh, A.V., Bateman, A., Esch, F. and Solomon, S. The corticostatic (anti-ACTH) and cytotoxic activity of peptides isolated from fetal, adult and tumor-bearing lung. *J. Steroid. Biochem.* **27**, 1017-1022 (1987).

8 Anhang

8.1 Publikationen

Slevogt, H., Schmeck, B., Jonat, C., Zahlten, J., Beermann, W., van Laak, V., Opitz, B., **Dietel, S.**, Dje N'Guessan, P., Hippenstiel, S., Suttorp, N. and Seybold, J.

Moraxella catarrhalis induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via Mitogen-activated protein kinase and NF- κ B activation and histone deacetylase activity reduction.

Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. **290**, L818 – L826 (2006).

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.

Cell Microbiol. **9**, 694-707 (2007).

Dje N'Guessan, P., Temmesfeld-Wollbrück, B., Zahlten, J., Eitel, J., **Zabel, S.**, Schmeck, B., Opitz, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N. and Slevogt, H.

Moraxella catarrhalis induces ERK- and NF- κ B - dependent COX – 2 expression and PGE₂ in lung epithelium.

Eur. Respir. J. **30**, 443-451 (2007).

Dje N'Guessan, P., Vigelahn, M., Bachmann, S., **Zabel, S.**, Opitz, B., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Zweigner, J., Riesbeck, K., Singer, B.B., Suttorp, N. and Slevogt, H.

The UspA1 protein of *Moraxella catarrhalis* induces CEACAM1 – dependent apoptosis in alveolar epithelial cells.

J. Infect. Dis. **195**, 1651-1660 (2007).

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).

8.2 Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit schulde ich allen Menschen, die mich unterstützt haben, meinen herzlichen Dank.

An erster Stelle möchte ich Frau Dr. Hortense Slevogt für die engagierte Betreuung in allen Phasen meiner Doktorarbeit danken. Vielen Dank für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Einführung in dieses Teilgebiet der Forschung und das offene Ohr für Probleme aller Art. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Suttorp, dass er mir die Gelegenheit gab, in seiner Arbeitsgruppe tätig zu werden.

Herrn Professor Dr. Wieler danke ich sehr für die Übernahme des ersten Gutachtens und die Bereitschaft, diese Arbeit als externe Dissertation zu betreuen und am Fachbereich der Veterinärmedizin zu vertreten.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Bernhard Singer, der mich in schwierigen Zeiten sowohl in fachlichen als auch in methodischen Fragen unterstützt hat.

Besonders bei Dr. Bastian Opitz, Dr. Philippe Dje N'Guessan, Dr. Janine Zahlten, Dr. Andreas Hocke, Dr. Julia Eitel und den technischen Assistenten Jaqueline Hellwig und Frauke Schreiber möchte ich mich dafür bedanken, dass sie nicht nur meine zeitweise schlechte Laune und überstrapazierten Nerven geduldet und überstanden haben, sondern mir mit ihrem Fachwissen, ihrer konstruktiven Kritik und ihren vielen Ideen immer wieder den nötigen Schwung verliehen haben.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre. Sie hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meiner Familie und meinen Freunden, vor allem meinem Mann gilt mein größter Dank für die vorbehaltlose Unterstützung in jeder Hinsicht, ob in guten oder in schweren Tagen.

8.3 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Solveig Zabel, an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertationsarbeit von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.

Solveig Zabel