

Aus dem CharitéCentrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie
Medizinische Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie
Direktor: Professor Dr. med. Norbert Suttorp

HABILITATIONSSCHRIFT

**Molekulare Mechanismen der Interaktion von
Moraxella catarrhalis mit pulmonalen Epithelzellen**

Zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Innere Medizin

Vorgelegt dem Fakultätsrat der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frau Dr. med. Hortense Gisela Slevogt
geboren am 16.09.1965 in Jugenheim/Bergstrasse

Eingereicht am: 05.12.2008

Dekanin: Professor Annette Grütters-Kieslich

Gutachter 1. Professor Dr. Robert Bals
2. Professor Dr. Stefan Ehlers

Für meine Mutter

Molecular mechanisms of the interaction of *Moraxella catarrhalis* and pulmonary epithelial cells

Abstract (engl.)

The chronic obstructive lung disease (COPD) is defined as an inflammatory process of the small airways leading to subsequent destruction of the lung. The course of the disease is characterized by acute exacerbations which are often caused by infections with *Moraxella catarrhalis*. Additionally, this pathogen colonizes the airways of up to 25% patients with COPD. Little is known about the molecular mechanisms of the *Moraxella*-epithelial interactions. The aim of the studies presented was to investigate these interactions and the involved mechanisms to allow a better specification of the role of *M. catarrhalis* in the COPD-pathogenesis.

In the work presented we showed that *M. catarrhalis* is capable to adhere to pulmonary epithelium and developed a new adhesion assay for addressing these investigations. Moreover, we found that *M. catarrhalis* is recognized by the pulmonary epithelium via pattern recognition receptors such as the toll-like receptor 2 leading to the induction of pro-inflammatory immune responses. Furthermore, we revealed some of the underlying signaling pathways. In addition, we found that infection with *M. catarrhalis* induced a modification of histon-deacetylase (HDAC) expression in the cells suggesting its capability to perpetuate a chronic inflammatory immune response. We show that *M. catarrhalis* is able to invade pulmonary epithelial cells by using a trigger-like mechanism. Most interestingly we found, that the pathogen evades the immune response of pulmonary epithelial cells by binding the epithelial expressed CEACAM1 receptor suppressing the TLR2-dependent immune response and revealed the underlying signaling mechanisms. In further investigations we showed that *M. catarrhalis* is also able to induce apoptosis in pulmonary epithelial cells suggesting that this pathogen plays a role in the pathogenesis of lung emphysema. Taken together we found that *M. catarrhalis* plays an important role in the pathogenesis of pulmonary epithelial infections.

Abstract (deutsch)

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine schwere Erkrankung, die über eine Entzündungsreaktion der kleinen Atemwege zur Zerstörung der Lunge führt. Der Verlauf der COPD ist gekennzeichnet durch bakteriell bedingte Exazerbationen zu deren häufigsten Ursachen eine Infektion mit *Moraxella catarrhalis* zählt. Zusätzlich kolonisiert dieser Erreger im Respirationstrakt von bis zu 25% aller COPD- Patienten.

Über die molekularen Mechanismen der Wechselwirkungen zwischen *M. catarrhalis* und dem pulmonalem Epithel ist nur wenig bekannt. Daher war es Ziel dieser Arbeiten diese Interaktionen zu untersuchen, um die Bedeutung dieses Erregers für die Pathogenese der COPD besser zu charakterisieren. In den hier zusammengefassten Publikationen konnten wir zeigen, dass *M. catarrhalis* über die Fähigkeit verfügt, an pulmonalen Epithelzellen zu adherieren und entwickelten einen auf unsere Fragestellungen zugeschnittenen verbesserten Adhäsionsassay. Weiterhin demonstrierten wir, dass *M. catarrhalis* von epithelial exprimierten *pattern recognition receptors* wie dem toll-like Rezeptor 2 erkannt wird was die Induktion einer pro-inflammatorischen Immunantwort zur Folge hat. Darüber hinaus identifizierten wir einige dafür entscheidende Signaltransduktionswege und zeigten ferner, dass *M. catarrhalis* über die Modifikation der Expression der Histon-Deazetylasen über die Fähigkeit verfügt, eine chronische Entzündung zu unterhalten. Des weiteren konnten wir nachweisen, dass sich Infektionen mit *M. catarrhalis* nicht nur extrazellulär sondern auch intrazellulär abspielen, da der Erreger mittels eines *Trigger*-Mechanismus in die Epithelzelle eindringen kann. Einen sehr interessanten Befund lieferten unsere Untersuchungen hinsichtlich der Fähigkeit von *M. catarrhalis* das Immunsystem zu umgehen und fanden, dass dieser Erreger über eine spezifische Bindung an den epithelialen CEACAM1 Rezeptor die TLR2 getriggerte Immunantwort reduzieren kann.

Abschließend konnten wir zeigen, dass *M. catarrhalis* in der Lage ist, in pulmonalen Epithelzellen Apoptose zu induzieren. Dies lässt die Hypothese zu, dass dieser Keim auch für die Pathogenese der Emphysementstehung von Bedeutung sein könnte. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass diesem Erreger für die Pathogenese respiratorischer Infektionen eine wichtige Bedeutung zukommt.

Inhaltsverzeichnis mit Zusammenstellung ausgewählter Publikationen

1 Einleitung

1.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

1.2 Die Rolle von Bakterien für die Pathogenese der COPD

1.3 Infektionen mit *Moraxella catarrhalis*

1.3.1 Historische Gesichtspunkte und Nomenklatur

1.3.2 Mikrobiologie von *M. catarrhalis*

1.3.3 Epidemiologie und Kolonisierung des Respirationstraktes

1.3.4 *M. catarrhalis*-assoziierte Infektionen des Respirationstraktes

1.3.5 Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis*

1.3.6 Therapie *M. catarrhalis*-bedingter Infektionen

1.4 Abwehrmechanismen des Respirationstraktes

1.4.1 Die Rolle der pulmonalen Epithelzellen für die Immunabwehr

1.4.2 Die Rolle von PRR für die angeborene Immunantwort

2 Ergebnisse (Zusammenfassungen der Publikationen 1-7)

2.1 Adhäsion von *M. catarrhalis* an pulmonalen Epithelzellen

Publikation 1

Slevogt H, Tiwari KN, Schmeck B, Hocke A, Opitz B, Suttorp N, Seybold J. Adhesion of *Moraxella catarrhalis* to human bronchial epithelium characterized by a novel fluorescence-based assay. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2006;195:73-83.

2.2 Invasion und Pathogenerkennung von *M. catarrhalis*

Publikation 2

Slevogt H, Seybold J, Tiwari KN, Hocke AC, Jonat C, Dietel S, Hippenstiel S, Singer BB, Bachmann S, Suttorp N, 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*. 2007;9:694-707

2.3 *M. catarrhalis*-induzierte Immunantwort in pulmonalen Epithelzellen

Publikation 3

Slevogt H, Schmeck B, Jonat C, Zahlten J, Beermann W, van Laak V, Opitz B, Dietel S, N'Guessan PD, Hippenstiel S, Suttorp N, Seybold J. *Moraxella catarrhalis* induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290:L818-26

Publikation 4

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-kB-dependent COX-2 and PGE₂ in lung epithelium *Eur Res J* 2007;30:443-51.

Publikation 5

Slevogt H, Maqami L, Opitz B, Weimann A., Hocke A, Schmeck B, Eitel B, Hippenstiel S, Suttorp N and Dje N'Guessan P, Differential regulation of *Moraxella catarrhalis*-induced IL-8 response by PKC isoforms. *Eup Resp J* 2008 ; 4:725-35

2.4 Strategien von *M. catarrhalis* zur Umgehung des Immunsystems

Publikation 6

Slevogt H, Zabel S, Opitz B, Hocke A, Dje N´Guessan P, Eitel J, Lucka L, Zimmermann W, Hippenstiel S, Zweigner J, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N and Singer BB. CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered anti-bacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat Immunol* 2008, 9:1270-78

2.5 *M. catarrhalis*-spezifische Schädigung pulmonaler Epithelzellen

Publikation 7

N´Guessan P, Vigelahn M, Bachmann S, Zabel S, Opitz B, Schmeck B, Hippenstiel S, Zweigner J, Riesbeck K, Singer BB, Suttorp N and **Slevogt H**. The UspA1 protein of *Moraxella catarrhalis* induces CEACAM-1 dependent apoptosis in alveolar epithelial cells, *J Infect Dis* 2007;195:1651-60.

3 Diskussion

- 3.1 Adhäsion von *M. catarrhalis* an pulmonalen Epithelzellen
- 3.2 Invasion und Pathogenerkennung von *M. catarrhalis*
- 3.3 *M. catarrhalis*-induzierte Immunantwort
- 3.4 Die Rolle der Histonmodifikation für die *Moraxella*-induzierte Immunreaktion
- 3.5 Die Rolle der *Moraxella*-induzierten Prostaglandin E2 Induktion
- 3.6 Die Rolle der Proteinkinase C für die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Sekretion
- 3.7 Die Interaktion von *M. catarrhalis* mit CEACAM1 als Strategie zur Umgehung des Immunsystems
- 3.8 *M. catarrhalis*-induzierte Schädigungen pulmonaler Epithelzellen
- 3.9 Ausblick

4 Literaturverzeichnis

Danksagung

Erklärung

1 EINLEITUNG

1.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine häufige und epidemiologisch sowie gesundheitsökonomisch außerordentlich bedeutsame Erkrankung, die weltweit den vierten Platz auf der Liste der häufigsten Todesursachen einnimmt [1]. Etwa vier Millionen Menschen leiden derzeit in Deutschland an einer COPD, wobei die Prävalenz weiter ansteigt [1]. Sie ist charakterisiert durch eine meist progredient verlaufende chronische Bronchitis, die mit einer nicht oder wenig reversiblen Obstruktion der Atemwege (Abb.1a) und einer anhaltenden Entzündungsreaktion der kleinen Atemwege (*small airway disease*) und des Lungenparenchyms assoziiert ist [2]. Weitere Folge der COPD ist die Ausbildung eines Lungenemphysems (Abb.1b) [3].

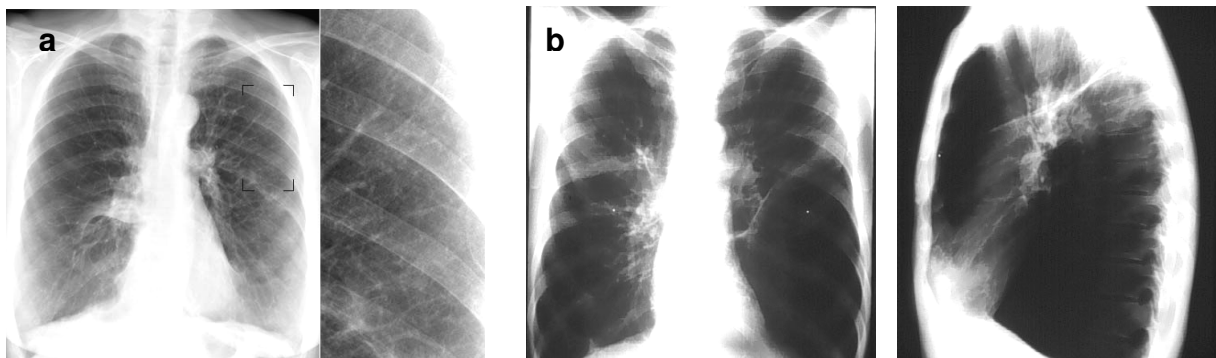


Abb.1 (a) Thoraxübersicht eines Patienten mit COPD mit einer Ausschnittsvergrößerung aus dem rechten Mittel-/Oberfeld Irregulärer Verlauf der bronchiovaskulären Strukturen mit Kalibersprung infolge Vernarbung bei chronischer Entzündung. **(b)** Ausgeprägtes Lungenemphysem bei einem Patienten mit COPD (Röntgen-Thorax-Aufnahmen in zwei Ebenen)

Wichtigster Risikofaktor für die Entwicklung einer COPD ist das inhalative Zigarettenrauchen. Weitere Faktoren wie der α 1-Antitrypsinmangel spielen epidemiologisch eine eher untergeordnete Rolle. Der Verlauf der Erkrankung ist durch häufige Exazerbationen charakterisiert, die einen signifikanten Einfluss auf die Morbidität und Mortalität der Patienten haben [2, 4]. Exazerbationen führen zu einem zunehmenden Verlust an Lebensqualität, zu einer beschleunigten Verschlechterung der Lungenfunktion und in schweren Fällen zu einer deutlich herabgesetzten Überlebenszeit [5]. Trotz der Bedeutung dieser „Volkskrankheit“ sind die pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung bisher nicht vollständig geklärt.

1.2 Die Rolle von Bakterien für die Pathogenese der COPD

Atemwegsinfektionen wurden in den letzten Jahren zunehmend als wesentliche Auslöser der Exazerbation der Erkrankung identifiziert. Bakteriellen Infektionen wird dabei eine vielfältige Beteiligung an der Ätiologie, Pathogenese und am klinischen Verlauf der COPD zugeschrieben. 40-60 Prozent der akuten Exazerbationen der COPD sind auf bakterielle Infektionen hauptsächlich mit *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* und *Streptokokkus pneumoniae* zurückzuführen. Außerdem findet sich auch bei COPD-Patienten ohne akute Krankheitserscheinungen häufig eine bakterielle Kolonisation der unteren Atemwege mit diesen Erregern. Mittels geschützter Bürste wurden bei bis zu 83% der COPD-Patienten Bakterien nachgewiesen [6]. Auch die bakterielle Kolonisierung geht mit einer verstärkten bronchialen Entzündung einher, die durch eine signifikante Vermehrung der neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen charakterisiert ist und direkt mit der Menge der nachgewiesenen Bakterien korreliert [7, 8]. Die bakterielle Kolonisation hat aber auch direkte klinische Konsequenzen, da betroffene COPD-Patienten deutlich häufiger an akuten Exazerbationen erkranken [9]. Dabei wird angenommen, dass eine ständige Besiedelung des Tracheobronchialbaumes mit potentiellen respiratorischen Pathogenen bei Patienten mit COPD die inflammatorische Antwort verstärkt und so zum Fortschreiten der COPD beiträgt [10, 11]. Möglicherweise wird dieser Kreislauf durch die inflammatorische Wirtsantwort der bronchialen Epithelzellen und die sich entwickelnden Erhöhung der elastolytischen Aktivität in der Lunge [10, 11]. Allerdings wird die Bedeutung von Bakterien für die Pathogenese der COPD auch in Frage gestellt [12, 13]. Insgesamt ist wenig über die Wechselwirkungen bekannt, die durch die häufige bzw. dauerhafte Anwesenheit von Bakterien und deren Produkten mit den Epithelzellen der Atemwege auftreten. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass diese einen bedeutenden Anteil an der Pathogenese und der Progression der Erkrankung haben. Daher kommt der Erforschung der molekularen Mechanismen der Interaktionen zwischen Erreger und Wirtsmukosa für die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung der COPD eine zentrale Bedeutung zu.

1.3 Infektionen mit *Moraxella catarrhalis*

1.3.1 Historische Gesichtspunkte und Nomenklatur

Moraxella catarrhalis ist ein wichtiger gramnegativer Erreger von Infektionen des menschlichen Respirationstraktes. Obwohl wahrscheinlich schon 14 Jahre vorher durch Seifert entdeckt, wurde *M. catarrhalis* erstmalig im Jahre 1896 durch Pfeiffer unter der Bezeichnung *Mikrokokkus catarrhalis* beschrieben und durch Ghon und Pfeiffer 1902 neben *Streptococcus pneumoniae* und einem Organismus, der später *Haemophilus influenza* heißen sollte, eindeutig als Atemwegspathogen eingeordnet [14]. 1905 untersuchten Dunn und Gordon eine Influenza-Epidemie in East Herfordshire und konnten drei verschiedene Arten von Gram-negativen Kokken aus Sekreten des Respirationstraktes finden, von denen *M. catarrhalis* am häufigsten isoliert wurde. Allerdings wurde in einer 1921 von Gordon durchgeführten Studie über den Nachweis Gram-negativer Kokken bei der allgemeinen Erkältungskrankheit und der Influenza nicht zwischen *M. catarrhalis* und *Neisseria cinera*, einem Kommensalen des Respirationstraktes differenziert [15] mit der Folge, dass auch *M. catarrhalis* seitdem jede Pathogenität abgesprochen worden ist. Die Einschätzung, dieser Erreger sei allenfalls als harmloser Kommensale der menschlichen Nasen-Rachen Standortflora zuzuordnen, überdauerte die meiste Zeit des letzten Jahrhunderts, während derer viele klinische Labore vernachlässigten, Proben von Patienten mit respiratorischen Infekten auf die Anwesenheit von *M. catarrhalis* zu testen [15]. Erst seit Beginn der 90er Jahre wird die Bedeutung von *M. catarrhalis* als humanpathogene Spezies zunehmend erkannt, was einer Wiederentdeckung eines vormals kaum beachteten Organismus gleichkommt [16].

Das von Unklarheiten geprägte Bild dieses bakteriellen Erregers spiegelt sich auch in seiner Nomenklatur wieder. 1963 zeigte Berger, dass die ursprüngliche Gattung *Mikrokokkus catarrhalis* die zwei verschiedenen Spezies *Neisseria cinera* und *Neisseria catarrhalis* beinhaltet. Gestützt durch frühe DNA-DNA-Hybridisierungsstudien von 1970 und in Abgrenzung zu *Neisseriaceae spp.* schlug Catlin die Einführung einer neuen Gattung der *Branhamella* vor [15]. Im Folgenden zeigte sich mehr und mehr die Verwandtschaft zu *Moraxella spp.* was die Bezeichnung *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* von 1984 zum Ausdruck bringt [17]. 1979 war eine Teilung der Gattung *Moraxella* in die Subgattungen *Moraxella* und *Branhamella* und 1991 die Einführung

einer neuen Familie der *Branhamaceae* mit den Gattungen der *Moraxella* und *Branhamella* vorgeschlagen worden [18]. Solche Versuche betonten die Trennung zwischen diplokokkoidem „*Branhamella*“ *catarrhalis* und stäbchenförmigen und zudem meist harmlosen *Moraxella* spp. [17]. Heute scheint die taxonomische Diskussion gelöst [19]: Anhand von neueren DNA-DNA- und rRNA-DNA-Hybridisierungen sowie durch den Vergleich von 16S-rDNA-Sequenzen konnte gezeigt werden, dass *M. catarrhalis* ausreichende Ähnlichkeit zu anderen *Moraxella* spp. besitzt und gewöhnliche Kriterien zur Einordnung in diese Gattung erfüllt. Wie aus den Publikationen der letzten 10 Jahre ersichtlich ist, hat sich der Name *Moraxella catarrhalis* nun immer mehr durchgesetzt [19]

1.3.2 Mikrobiologie von *M. catarrhalis*

M. catarrhalis gehört zur Familie der Neisseriaceae die aus den Subgenera *Moraxella* und *Branhamella* besteht. Es handelt sich um ein ausschließlich humanpathogenes unbekapseltes, gramnegatives diplo-kokkoides Stäbchen.

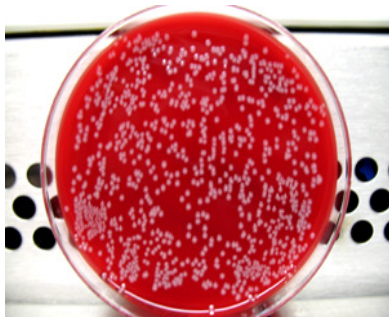


Abb.2 *M. catarrhalis* Kolonien auf einer Columbia-Agar Platte

Die Kolonien des aeroben, Oxidase-positiven Bakteriums sind nach 24-stündiger Inkubation auf Blut- oder Kochblut-Agar etwa 2 mm groß, opak und zeigen keine Hämolyse (Abb.2). Charakteristischerweise lassen sie sich auf dem Agar wie ein Puck auf dem Eis mit einer Schlinge verschieben [18]. Dabei lauern neben der morphologischen Ähnlichkeit zu *Neisseria* spp. auch bei der Stoffwechselaktivität einige Fallstricke, die in der Geschichte des Keims zu beschriebenen Verwechslungen geführt hatten [17]. Daher wurden in den letzten Jahren folgenden Kriterien für die phänotypische Identifikation von *M. catarrhalis* etabliert [19]. Wie bei *N. cinerea* werden die Zucker Saccharose, Glukose, Maltose und Laktose nicht metabolisiert. Zum sicheren Ausschluss von *Neisseria* ssp. sind weitere Tests nötig:

M. catarrhalis reduziert Nitrate und Nitrite, ist Desoxyribonuklease-Produzent (DNase) und reagiert positiv im Superoxol-Test [18].

Alternativ wird zur Abgrenzung zu Neisserien die Fähigkeit von *M. catarrhalis* zur Hydrolyse von Tributyrin (Tributyryl-esterase positiv) in einem Schnelltest in der Routine-Diagnostik ausgenutzt. Allerdings reagieren auch einige *Moraxella spp.* positiv, so dass hier DNase oder Nitrat-Reduktionstests zusätzlich erforderlich sind [20, 21]. Die Hindernisse für die Identifikation des Keims erschweren zusätzlich die Interpretation älterer Studien, bei denen die Erkenntnisse über die Stoffwechselaktivitäten noch nicht berücksichtigt wurden [16]. Eine Identifizierung von *M. catarrhalis* gilt als gesichert, wenn mindestens ein positiver Nachweis für die Produktion von DNase, ein Nachweis einer Reduktion von Nitrat und Nitrit und eine Reaktivität für Trybutyryl-esterase vorhanden ist [19].

1.3.3 Epidemiologie und Kolonisierung des Respirationstraktes

M. catarrhalis besitzt die Fähigkeit, den oberen Respirationstrakt des Menschen zu besiedeln. Der Grad der Kolonisierung im Menschen ist dabei von verschiedenen Faktoren wie dem Alter, dem Gesundheitsstand, den sozioökonomischen Bedingungen und der geographischen Lokalisation abhängig [19].

Die Kolonisierungsrate ist bei jungen Kindern viel höher als bei gesunden Erwachsenen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass bis zu 75% aller Kinder in ihrem ersten Lebensjahr mit *M. catarrhalis* kolonisiert sind [22]. Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass eine Kolonisierung der Atemwege von asymptomatischen vier Wochen alten Neugeborenen mit *M. catarrhalis*, sowie auch *S. pneumoniae* oder *H. influenzae* mit einem deutlich erhöhten Risiko assoziiert ist, im Alter von 5 Jahren an Asthma bronchiale zu erkranken [23].

Asymptomatische Erwachsene sind nur in 1-3% aller Fälle mit diesem Erreger kolonisiert [24]. Die Ursachen für diese reziproke Beziehung zwischen Alter und Kolonisierungsrate ist bisher nur wenig verstanden. Erwachsene COPD-Patienten weisen allerdings deutlich höhere Kolonisierungsraten von bis zu 32% mit diesem Erreger auf [25, 26]. Dabei korreliert die Kolonisierung des Bronchialepithels mit *M. catarrhalis* wie auch mit *H. influenzae* und *S. pneumoniae* mit einem gehäuften Auftreten von Exazerbationen und schwereren Verläufen der COPD [9, 27].

1.3.4 *M. catarrhalis*-assoziierte Infektionen des Respirationstraktes

15-20% aller Otitiden im Kindesalter werden durch Infektionen mit *M. catarrhalis* verursacht. . Damit stellt dieser Erreger nach *S. pneumoniae* und *H. influenzae* die dritthäufigste Ursache da [15, 16]. Bei Kindern hat die Otitis media eine hohe Inzidenz: 50% aller Einjährigen haben eine Episode durchgemacht. Bei den Dreijährigen beträgt dieser Anteil 70% [28]. Bei der Sinusitis zeigt sich ebenfalls die wichtige Trias der schon genannten Pathogene des Respirationstraktes *S. pneumoniae*, *H. influenzae* und *M. catarrhalis*, die hier oft in Koinfektion auftreten. Die gesamte Isolationshäufigkeit von *M. catarrhalis* liegt bei 22%. Eine Reinkultur findet sich vor allem bei jüngeren Kindern [29]. Erkrankungen des unteren Respirationstraktes oder invasive Erkrankungen sind bei Kindern seltener, treten aber auch ohne prädisponierende Faktoren auf, vor allem bei Kindern unter einem Jahr [22].

Bei Erwachsenen sind es gerade solche vorbestehenden pulmonalen Veränderungen oder Erkrankungen, auf deren Boden sich durch *M. catarrhalis* hervorgerufene Infektionen abspielen [30]. Für die Pathogenese der COPD ist dieser Keim von besonderer Bedeutung. Als zweithäufigster Erreger wird *M. catarrhalis* in 30 % der akuten, bakteriell bedingten Exazerbationen gefunden [25, 31]. Zusätzlich wird er in 13,5% der Fälle auch in Kombination mit *S. pneumoniae* und *H. influenzae* ebenfalls isoliert, wie z.B. in den Ergebnissen des Alexander Projekt demonstriert [32]. Aktuelle Untersuchungen konnten außerdem zeigen, dass die Infektion mit einem neuen Bakterienstamm das Risiko einer akuten Exazerbation mehr als verdoppelt [33]. Wiederholte Infektionen scheinen also nicht auf eine periodische Erhöhung der Bakterienlast zurückzuführen zu sein, sondern auf Infektionen mit Bakterienstämmen mit einer für den Wirt bislang unbekanntem Antigenstruktur [31, 34].

1.3.5 Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis*

Das Wechselspiel von bakteriellen Virulenzfaktoren und der lokalen oder systemischen Antwort des Wirtes stellt einen besonderen Fokus des wissenschaftlichen Interesses dar [19]. Untersuchungen zielen dabei hauptsächlich auf die Klärung der Mechanismen der Kolonisation und Infektion ab, um dem Keim in wirkungsvoller Weise begegnen zu können. In den letzten Jahren sind verschiedene Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis* isoliert worden, deren Bedeutung

für die Pathogenese einer *Moraxella*-Infektion jedoch nur lückenhaft verstanden sind. *M. catarrhalis* ist in der Lage über längere Zeit im Respirationstrakt von Patienten mit COPD zu kolonisieren, obwohl im Serum und Sputum dieser Patienten spezifische Antikörper gegen verschiedene Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis* nachgewiesen wurden [35]. Für die Bedeutung von *M. catarrhalis* für die Infektexazerbationen der COPD spricht, dass es zu einer Immunreaktion mit Sekretion von IgG-Antikörpern kommt. Diese Reaktion ist insbesondere gegen die fünf wichtigen *M. catarrhalis* spezifischen *outer membrane* Proteine (OMP), *ubiquitous surface* Protein (Usp)A1, UspA2, das Hag-Protein, das *Transferrin binding protein* (Tbp) B, und das OMP CD gerichtet die auch im Sputum und Serum der Patienten nachgewiesen werden können [34]. Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor einiger *M. catarrhalis*-Stämme ist die Fähigkeit, der Lyse des Komplementsystems in menschlichem Blutserum zu widerstehen [19]. Der dabei zugrundeliegende Mechanismus ist nicht vollständig aufgeklärt. Für verschiedene Oberflächenstrukturen von *M. catarrhalis* wie dem Lipooligosaccharid (LOS), den UspA2 und den OMP CopB/OMP B2 wurde gezeigt, dass ihnen eine entscheidende Rolle für die Resistenz gegenüber der Lyse durch Humanserum zukommen könnte [36-39]. Für die Adhärenz von *M. catarrhalis* an der Bronchialschleimhaut ist das UspA1 von wichtiger Bedeutung, welches von allen bisher aus Patienten isolierten *Moraxella* Stämmen exprimiert wurde [40]. Als weiterer die Adhärenz vermittelnder Bestandteil konnte UspA2H, ein dem UspA2 verwandtes OMP sowie das *Moraxella*-spezifische Lipooligosaccharid (LOS) und das HAG Protein (auch *Moraxella* IgD binding Protein MID bezeichnet) identifiziert werden [24, 35]. Die Zellwand der *Moraxellen* ist aus mehreren Peptidoglykonschichten aufgebaut [41]. Da das Peptidoglykan wie auch das LOS wichtige Molekülstrukturen für die Erkennung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem des humanen pulmonalem Epithels sind, ermöglichen diese *Moraxella*-Strukturen eventuell auch eine Pathogenerkennung durch entsprechende Rezeptoren des angeborenen Immunsystems der Wirtsmukosa.

1.3.6 Therapie von *M. catarrhalis*-bedingten Infektionen

Die antibiotische Therapie von Infektionen mit *M. catarrhalis* galt zunächst als unproblematisch. Allerdings wurde die Etablierung von *M. catarrhalis* als wichtiges humanes Pathogen im Bewusstsein der Wissenschaft begleitet von der

zunehmenden Expression einer neuen Familie der BRO β -Laktamasen durch diesen Erreger, was das pathogene Potential des Organismus noch weiter unterstreicht [17]. Der erste β -Laktamase-positive Stamm wurde 1977 isoliert. Der Anteil der β -Laktamase-Produzenten nahm kontinuierlich zu, sodass heute über 95% aller Isolate aus Europa, den USA und Australien β -Laktamase-positiv sind [19]. Diese Entwicklung entspricht dem schnellsten je beobachtetem Anstieg in der Prävalenz einer β -Laktamase bei einer Spezies [16, 19, 42]. Nicht alle β -Laktam-Antibiotika werden durch die Enzyme inaktiviert. Während Penicillin, Amoxicillin und Ampicillin durch die BRO- β -Laktamase-Produzenten schnell hydrolysiert wird, ist die Aktivität von Zweit- und Drittgenerations-Cephalosporinen bisher praktisch nicht beeinträchtigt. Daher wird Ihr Einsatz laut der aktuellen Empfehlungen der Expertenkommission der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. zur Behandlung von Infektionen mit *M. catarrhalis* auch aktuell empfohlen [43]. Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die Entwicklung von Impfstoffen. Dafür wurden Untersuchungen mit bisher bekannten Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis*, überwiegend Oberflächenproteinen durchgeführt. Bisher konnte zwar die Bildung von Antikörpern gegen verschiedene Bestandteile von *M. catarrhalis* nachgewiesen werden, in keinem Fall führten diese jedoch zu einem vollständigen Schutz vor der Infektion [35]. Angesichts der zunehmenden Resistenzentwicklung und dem Fehlen wirksamer Impfstoffe, ist es für die Entwicklung neuer Therapiestrategien wichtig, die molekularen Mechanismen der Pathogenese von Infektionen der Atemwege mit *M. catarrhalis* weiter zu erforschen.

1.4 Abwehrmechanismen des Respirationstraktes

Das respiratorische System - durch die Atmung kontinuierlich infektiösen Partikeln und toxischen Substanzen ausgesetzt - ist mit einem komplexen System der Immunabwehr ausgestattet, das den Körper vor dem Eindringen von Pathogenen zu schützen vermag. In den oberen Atemwegen wird die Ansiedlung von Mikroorganismen vor allem durch Luftfiltration im Nasopharynxbereich, aerodynamische Filtrationsmechanismen im Tracheo-Bronchialsystem, durch Bewegung der Zilien induzierten Sekretionsfluss über der Schleimhautoberfläche und mechanische Reflexe wie den Hustenreiz verhindert. Damit werden die unteren Abschnitte des Tracheobronchialbaumes mit der alveolären Gasaustauschfläche hocheffizient vor dem Eindringen jeglicher Partikel, sowie Mikroorganismen bis zu

einer Größe von 2-3 µm geschützt [44]. Noch kleinere Partikel und Mikroben, die trotzdem in die unteren Atemwege gelangen, werden durch ein Zusammenspiel zellulärer und humoraler Abwehrmechanismen bekämpft. Das Immunsystem koordiniert und kontrolliert mit Hilfe von angeborenen (unspezifischen) und erworbenen (spezifischen) Abwehrmechanismen die Abwehr von Krankheitserregern. Nach durchlaufenen Infektionen werden Gedächtniszellen gebildet, die im Rahmen von Reinfektionen mit dem gleichen Pathogen eine rasche Reaktivierung der spezifischen Immunantwort ermöglichen. Die unspezifische Immunität ist angeboren und verleiht dem Körper die Möglichkeit, sofort auf eingedrungene Pathogene zu reagieren. Wesentliche Effektormechanismen der angeborenen Immunität sind zum Beispiel Phagozytose durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten, Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Zytokine durch Monozyten und Makrophagen und das Komplementsystem mit Plasmaproteinen, die eine kaskadenartige Abwehrreaktion auslösen können [45].

1.4.1 Die Rolle der pulmonalen Epithelzellen für die Immunabwehr

Das Epithel der Atemwege stellt die wichtigste Kontaktfläche zwischen aerogen übertragbaren potentiell pathogenen Erregern und dem Respirationstrakt dar. Lange Zeit wurde angenommen, dass den pulmonalen Epithelzellen lediglich eine überwiegend passive Barrierefunktion gegen die externe Umgebung zukommt. Im letzten Jahrzehnt ermöglichten große Fortschritte auf den Gebieten der Mikrobiologie, der Molekularbiologie und der Zellbiologie neue Ansätze, die Wechselwirkungen zwischen pulmonalen Epithelzellen und unterschiedlichen Bakterien zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die pulmonalen Epithelzellen eine zentrale, aktive Rolle bei der Koordination und Regulation von Abwehrreaktionen und Entzündungsprozessen in den Atemwegen spielen. Ausgestattet mit vielen Komponenten des angeborenen Immunsystems sind sie befähigt, auf bestimmte Stimuli eine lokale Immunreaktion durch die gezielte Produktion von Zytokinen, Chemokinen, Lipid-Mediatoren u.a. zu orchestrieren [46]. Sie werden z.B. durch verschiedene Entzündungsmediatoren oder Bestandteile von Bakterien aktiviert. Sie können weitere Entzündungszellen rekrutieren, Adhäsionsprozesse einleiten und steuern und die Aktivität von Entzündungszellen modulieren (Abb.3); [45, 47].

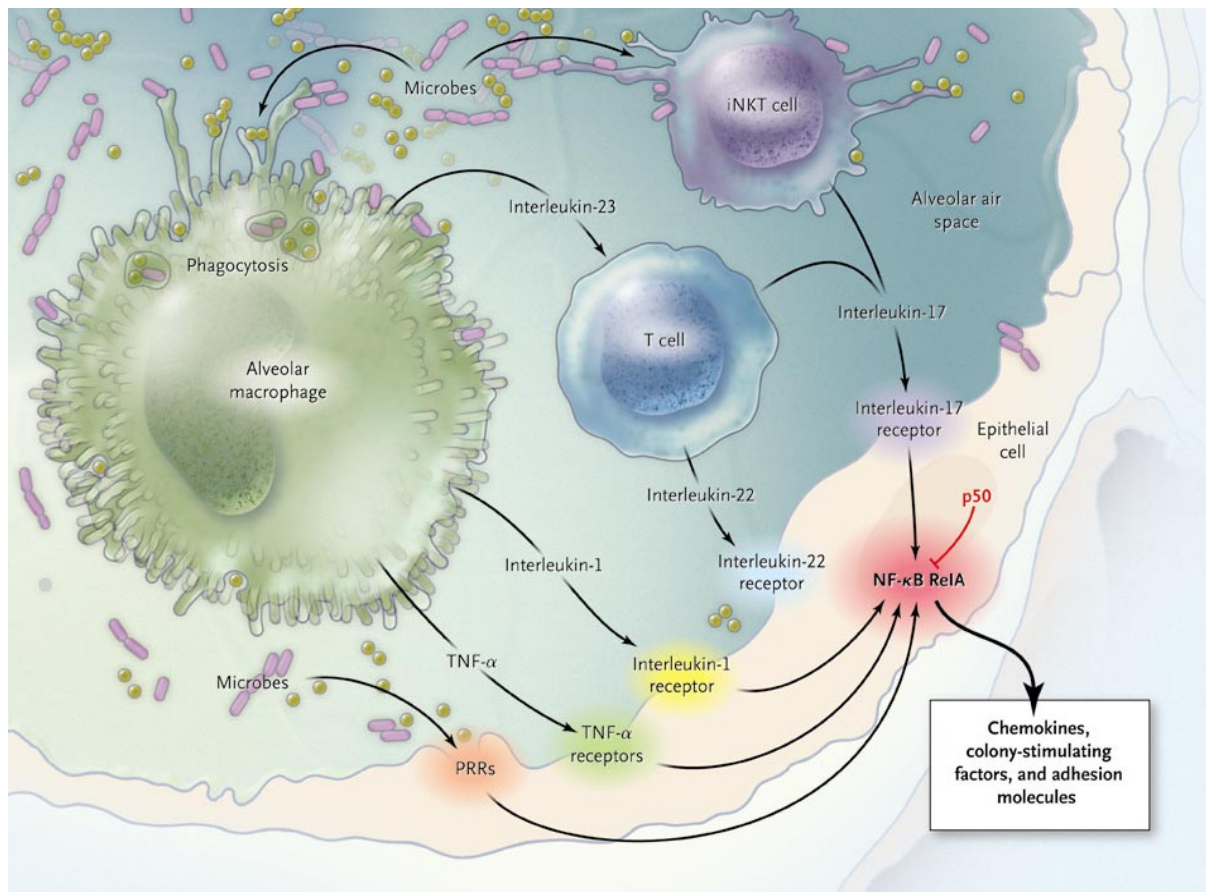


Abbildung 3) Die Aktivierung des pulmonalen Epithels verstärkt die Immunreaktion des angeborenen Immunsystems. Eindringende Bakterien werden durch *pattern recognition receptors* (PRRs) erkannt, die auf Alveolarmakrophagen und auf den Epithelzellen exprimiert werden. Über die Aktivierung insbesondere des Transkriptionsfaktors NF- κ B kommt es daraufhin zur Produktion proinflammatorisch wirksamer Entzündungsmediatoren wie Chemokinen, Kolonie-stimulierenden Faktoren und Adhäsionsmolekülen. (Mizgerd JP., NEJM 2008 [45]).

Außerdem können sie einem entzündlichen Prozess durch die Freisetzung antiinflammatorisch wirkender Mediatoren, löslicher Rezeptoren und durch die Inaktivierung pro-inflammatorischer Mediatoren entgegenwirken [46]. Die Produktion der o.g. Entzündungsmediatoren beinhaltet eine Signalübertragung in den Epithelzellen und damit eine Aktivierung komplexer intrazellulärer Signaltransduktionswege. Die an der Zelloberfläche ankommenden Signale werden dabei zunächst durch bestimmte Rezeptoren erkannt und bis auf die Ebene der Transkriptionsfaktoren weitergeleitet, die für die Transaktivierung oder Transrepression an den Promotoren der Zielgene (z.B. für Entzündungsmediatoren) an der Transkription beteiligt sind.

1.4.2 Die Bedeutung von *Pattern Recognition* Rezeptoren für die angeborene Immunantwort

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die angeborene Immunität wesentlich spezifischer als zuvor angenommen zwischen körpereigenen Bestandteilen und Pathogenen unterscheiden kann. Die Fähigkeit zu unterscheiden, beruht im Wesentlichen auf sogenannten *pattern recognition* Rezeptoren (PRR). Insbesondere den toll-*like* Rezeptoren (TLR) kommt dabei eine wichtige Bedeutung zu. Beim Menschen sind bisher mindestens 10 TLR bekannt, wobei TLR 1,2,4,5,6 und 9 wichtige Funktionen bei der Abwehr bakterieller Infektionen haben [12]. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass das Atemwegsepithel sowohl durch spezifische TLR Liganden, als auch durch bestimmte Molekülstrukturen von Pathogenen, die sog. *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) über TLR aktiviert wird. Bakteriell Lipopeptid stimuliert zum Beispiel TLR2 abhängig die Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in Atemwegsepithelzellen [44]. Experimente mit TLR4 defizienten murinen Atemwegszellen zeigten, dass TLR4 die Aktivierung von Atemwegsepithelzellen durch LPS vermittelt [21]. Als Folge einer Detektion durch TLR9 führt bakterielle DNA und CpGMotive enthaltende DNS ebenfalls zur Abgabe pro-inflammatorischer Zytokine [45]. *Pseudomonas aeruginosa* Flagellin aktiviert hingegen Atemwegsepithelzellen über TLR2 und TLR5 [43;46]. Neben den TLR spielen für die Erkennung intrazellulärer PAMP von Bakterien, wie z.B. die Nod (nucleotide-binding oligomerization domain) Proteine 1 und 2 eine wichtige Rolle [48, 49]. Eine Aktivierung der einzelnen PRR führt zur Expression und Abgabe von verschiedenen Effektorproteinen wie z.B. von Zytokinen und Chemokinen (z.B. TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- β). Zytokine sind extrazelluläre Signalproteine, die von verschiedenen Zelltypen gebildet werden und die Zell-Zell-Interaktion vermitteln. Die funktionelle Einteilung der Zytokine gliedert sich in proinflammatorische Zytokine, T-Zell-gebildete Zytokine, chemotaktische Zytokine (Chemokine), antiinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren. Ein Hauptvertreter der Chemokine ist das IL-8, das insbesondere die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten vermittelt [47, 50]. Die funktionelle Bedeutung von Zytokinen und Chemokinen liegt u. a. in der Synthese weiterer Entzündungsmediatoren oder proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen und anderen Zellen, wie Epithelzellen oder Endothelzellen, sowie in ihrer chemotaktischen und antiinflammatorischen Wirkung. Weiterhin können z. B. IL-1, IL-6 und TNF- α als endogene Pyrogene wirksam werden [47, 50].

Nach der Pathogenerkennung durch Rezeptoren müssen diese von den Epithelzellen in chemische Reize übersetzt und ins Zellinnere weitergeleitet werden [49]. In der Zelle nimmt die Signaltransduktion ihren Anfang an bestimmten Domänen der PRR wie der TIR-Domäne der TLR, an die verschiedene Adapterproteine binden können. Aufgrund der beteiligten Adapterproteine werden zwei Signalwege unterschieden: der MyD88 abhängige Signalweg und der MyD88 unabhängige Signalweg. Die Weiterleitung und Verarbeitung erfolgt u.a. über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, z. B. der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kaskaden (MAP-Kinasen Kaskaden) [51]. Zu den bisher bekannten MAPK gehören die durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase ERK1/2 (auch p42/p44), die JNK (c-Jun-NH₂- terminale Kinase) und die p38 (38 kDa). Die Beteiligung der MAPK an der induzierten Inflammation in bronchialen Epithelzellen konnte bereits für die Pathogene *H. influenzae* und *S. pneumoniae* gezeigt werden [46]. Weitere wichtige Faktoren der Signaltransduktion für die Induktion inflammatorischer Prozesse in pulmonalen Epithelzellen sind die Transkriptionsfaktoren NF (*nucleor factor*) κ B und Aktivatorprotein (AP)-1, die durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden und die Genexpression in zahlreichen Prozessen der Abwehr, der Stressantwort, der Apoptose und der Inflammation regulieren [52-54]. In der letzten Zeit mehren sich die Hinweise, dass auch epigenetische Regulationsmechanismen, insbesondere der Histonmodifikation für die Expression von inflammatorischen Mediatoren ebenfalls eine wichtige Bedeutung zukommen [55-57].

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeiten

Über die Wechselwirkungen zwischen *M. catarrhalis* und dem pulmonalen Epithel ist bisher sehr wenig bekannt. Die hier vorgelegten Arbeiten hatten daher zum Ziel, spezifische Wechselwirkungen zwischen *M. catarrhalis* und dem pulmonalen Bronchialepithel zu untersuchen. Die experimentellen Untersuchungen sollten dabei auf die folgenden Schwerpunkte gerichtet sein:

- Die Adhäsion von *M. catarrhalis* an pulmonalen Epithelzellen
- Die Invasion und Pathogenerkennung von *M. catarrhalis*
- Die *M. catarrhalis*-induzierte Immunantwort in pulmonalen Epithelzellen
- Strategien von *M. catarrhalis* zur Umgehung des Immunsystems
- *M. catarrhalis* spezifische Schädigungen pulmonaler Epithelzellen

2 ERGEBNISSE

2.1 Adhäsion von *M. catarrhalis* an pulmonalen Epithelzellen

Publikation 1

Slevogt H, Tiwari KN, Schmeck B, Hocke A, Opitz B, Suttorp N, Seybold J. Adhesion of *Moraxella catarrhalis* to human bronchial epithelium characterized by a novel fluorescence-based assay. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2006;195:73-83.

Moraxella catarrhalis ist ein bedeutsamer Erreger der infektexazerbierten COPD. Die Fähigkeit dieses Erregers an pulmonalen Epithelzellen zu adhären ist ein bedeutsamer Pathogenitätsfaktor. Daher sind große Anstrengungen unternommen worden, charakteristische Moleküle auf der Zelloberfläche von *M. catarrhalis* als Adhäsionsmoleküle (sog. Adhäsine) zu identifizieren. Dafür kamen verschiedene Adhäsionsassays zum Einsatz, deren Ergebnisse jedoch nie auf ihre Validität überprüft, oder miteinander verglichen wurden. In der vorliegenden Studie haben wir die Fähigkeit von *M. catarrhalis*, an verschiedenen humanen Epithelzelllinien zu adhären, untersucht. Unter Verwendung der beiden in der Literatur am häufigsten verwandten Adhäsionsassays - zum einen basierend auf der Auszählung von *colony-forming units* (CFU) und zum anderen basierend auf der lichtmikroskopischen Auszählung der adherenten Bakterien pro Epithelzelle - haben wir für beide signifikante Limitationen festgestellt. Diese waren entweder begründet auf Unterschiede der einzelnen Bakterien-Stämme, auf der epithelialen Oberfläche zu adhären oder auf Unterschiede, die auf unterschiedliche Stadien der Konfluenz der Epithelzellen zurückzuführen waren. Daher haben wir einen neuen auf die Messung von Fluoreszenzintensitäten basierten Adhäsionsassay entwickelt und unsere damit erhobenen Ergebnisse mit den Resultaten aus den Messungen mit den anderen beiden Adhäsionsassays verglichen.

Wir konnten zeigen, dass der Fluoreszenz-basierte Assay eine verlässliche und praktikable Methode für die Quantifizierung der Adhäsion von *M. catarrhalis* an epithelialen Monolayern darstellt

2.2 Invasion und Pathogenerkennung von *M. catarrhalis*

Publikation 2

Slevogt H, Seybold J, Tiwari KN, Hocke AC, Jonat C, Dietel S, Hippenstiel S, Singer BB, Bachmann S, Suttorp N, 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.** 2007;9:694-707

Moraxella catarrhalis ist ein wichtiger Erreger bei Patienten mit einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung. *M. catarrhalis* wird als rein extrazellulär vorkommender Erreger beschrieben. Allerdings sind bisher keine Untersuchungen durchgeführt worden, die das Potential dieses Erregers, Epithelzellen zu invadieren, analysiert haben. Die Ergebnisse unserer elektronen- und konfokalmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass *M. catarrhalis* in der Lage ist Bronchialepithelzellen (BEAS-2B), Pneumozyten Typ II (A549) und primäre humane Epithelzellen (SAEC) kleinerer Bronchien zu invadieren. Die Invasionsfähigkeit von *M. catarrhalis* war abhängig von zellulären Mikrofilamenten, sowie der bakteriellen Viabilität. Sie war außerdem charakterisiert durch die - für einen „trigger“-ähnlichen Aufnahmemechanismus typische - intrazelluläre Invasion mittels Makropinozytose, die mit der Ausbildung von Lamellipodien und der intrazellulären Aufnahme des Erregers in ein Makropinosom assoziiert war. Die Zellen sind in der Lage TLR2 sowie das kürzlich entdeckte zytosolische NOD1 Protein zu exprimieren, welches in der Lage ist intrazellulär vorkommende Bestandteile von Bakterienzellwänden zu erkennen. Wir konnten zeigen, dass die Inhibition von TLR2 sowie NOD1 mittels siRNA die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Sekretion signifikant zu vermindern vermag. Diese Ergebnisse wurden durch Überexpressionsversuche in HEK293 Zellen bestätigt.

Zusammenfassend geben diese Daten Hinweise dafür, dass *M. catarrhalis* pulmonales Epithel invadiert und dabei sowohl extrazellulär von TLR2 Rezeptoren als auch intrazellulär von NOD1 detektiert werden kann.

2.3 *M. catarrhalis*-induzierte Immunantwort in pulmonalen Epithelzellen

Publikation 3

Slevogt H, Schmeck B, Jonatat C, Zahlten J, Beermann W, van Laak V, Opitz B, Dietel S, N'Guessan PD, Hippenstiel S, Suttorp N, Seybold J.

Moraxella catarrhalis induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction.

***Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290:L818-26**

Moraxella catarrhalis ist eine wichtige Ursache der infektexazerbierten chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) und möglicherweise für die Pathogenese der COPD von wichtiger Bedeutung. Über die Wechselwirkungen zwischen *M. catarrhalis* und dem Bronchialepithel ist wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit haben wir die Aktivierung des Bronchialepithels durch *M. catarrhalis* und die zugrundeliegenden Signaltransduktionswege charakterisiert. Außerdem sind wir der Hypothese nachgegangen, dass die *M. catarrhalis*-induzierte Zytokinexpression durch die Azetylierung von Histonresten reguliert und durch die Histon Deazetylase Aktivität kontrolliert wird. Wie konnten zeigen, dass *M. catarrhalis* eine starke dosis- und zeitabhängige Entzündungsreaktion der bronchialen Epithelzelllinie BEAS-2B induzierte, was sich durch eine gesteigerte IL-8 und GM-CSF Sekretion äußerte. Diese Zytokinfreisetzung war verbunden mit einer Aktivierung der ERK und der p38 mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und dem Transkriptionsfaktor NF- κ B. *M. catarrhalis*-infizierte Bronchialepithelzellen zeigten außerdem eine globale sowie am IL-8 Promotor gesteigerte Azetylierung der Histone H3 und H4. Eine Inhibition der Histondeazetylierung durch den spezifischen Histone-Deazetylase Inhibitor Trichostatin A führte zu einer Steigerung der *M. catarrhalis*-induzierten IL-8 Produktion. Nach der Infektion der Zellen mit *M. catarrhalis* ließ sich eine Abnahme der globalen Histon-Deazetylase Expression und Aktivität nachweisen. Unsere Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die *M. catarrhalis*-induzierte Aktivierung der Transkription des IL-8 Genes durch epigenetische Mechanismen gesteuert wird, die die Ablesbarkeit des IL-8 Genes regulieren. Unsere Untersuchungen geben neue Hinweise auf die molekularen und zellulären Mechanismen der *M. catarrhalis*-induzierten Aktivierung des humanen Bronchialepithels.

Publikation 4

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 and PGE₂ in lung epithelium

Eur Resp J 2007;30:443-51.

Moraxella catarrhalis ist ein wichtiges Pathogen für die bakteriell bedingte Exazerbation der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD). Es wird angenommen, dass Cyclooxygenase-2 (COX-2) abhängige Prostaglandine wichtige Funktionen für die Regulation der Abwehrfunktionen der Lunge einnehmen. In der vorliegenden Arbeit sind wir der Hypothese nachgegangen, dass *M. catarrhalis* in pulmonalen Epithelzellen möglicherweise eine COX-2 abhängige PGE₂ Synthese induziert. Wir konnten zeigen, dass *M. catarrhalis* eine COX-2 Expression mit anschließender Freisetzung von PGE₂ induziert. Dabei kam es in diesen Zellen zu einer *M. catarrhalis*-induzierten Hochregulation der Prostanoid Rezeptor Subtypen EP2 und EP4. Das *M. catarrhalis* spezifische Oberflächenmembranprotein UspA1 spielte für die Induktion der COX-2 abhängigen PGE₂ Expression eine wichtige Rolle. Außerdem zeigte sich, dass die *M. catarrhalis*-induzierte COX2 und PGE₂ Expression von einer Aktivierung der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1/2 und dem nukleären Faktor NF- κ B, nicht aber von einer Aktivierung der p38 mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) abhängig war.

Zusammengefasst lassen unsere Daten den Schluss zu, dass die *M. catarrhalis*-induzierte Expression der COX2 mit darauf folgenden PGE₂ Freisetzung von dem *M. catarrhalis* spezifischen Oberflächenprotein UspA1, der MAPK ERK 2/2 und von NF- κ B kontrolliert wird. Eine *M. catarrhalis*-induzierte PGE₂ Freisetzung wirkt möglicherweise einer pulmonalen Entzündungsreaktion entgegen und begünstigt damit die Kolonisierung des unteren Respirationstraktes von COPD-Patienten mit diesem Erreger.

Publikation 5

Slevogt H, Maqami L, Vardarowa K, Beermann W, Hocke AC, Eitel J, Schmeck B, Weimann A, Opitz B, Hippenstiel S, Suttorp N, N'Guessan PD. Differential regulation of *Moraxella catarrhalis*-induced interleukin-8 response by protein kinase C isoforms. *Eur Respir J*. 2008 4:725-35

Moraxella catarrhalis ist ein wichtiger Erreger der infektexazerbierten COPD. Eine Infektion von pulmonalen Epithelzellen mit diesem Erreger induziert eine Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-8 (IL-8), welches für die Orchestrierung der entzündlichen Immunantwort eine wichtige Rolle spielt. In der hier vorgelegten Studie konnten wir zeigen, dass die Proteinkinase (PK)C durch eine Infektion mit *M. catarrhalis* selbst aktiviert wurde und für die Aktivierung des *Nuclear Factors* (NF)- κ B und der daran anschließenden IL-8 Sekretion von wichtiger Bedeutung war. Wir konnten weiter zeigen, dass die Aktivierung des PKC/NF- κ B abhängigen Signalweges von der Expression des *M. catarrhalis*-spezifischen *Ubiquitous Surface Proteins* (Usp)A2 abhängig war. Außerdem fanden wir, dass spezifische Isoformen der PKC einen unterschiedlichen Einfluss auf die Regulation der *M. catarrhalis*-induzierten NF- κ B-abhängigen IL-8 Genexpression ausüben, welches über eine unterschiedliche Kontrolle der IL-8 Promoter Aktivität erfolgte. Eine Inhibition der PKC α und ϵ mit chemischen Inhibitoren oder mittels Versuchen mit *short interfering RNA-mediated gene silencing* führte zu einer signifikanten Verminderung der IL-8 Sekretion, während eine Inhibition der PKC θ eine Steigerung der *M. catarrhalis*-induzierten IL-8 Sekretion in pulmonalen Epithelzellen zur Folge hatte.

Zusammenfassend zeigte sich, dass eine Infektion der Zellen mit *M. catarrhalis* eine Aktivierung der PKC zur Folge hatte und dass die PKC Isoformen α , ϵ und θ die IL-8 Transkription in pulmonalen Epithelzellen auf unterschiedliche Weise regulierten.

2.4 Strategien von *M. catarrhalis* zur Umgehung des Immunsystems

Publikation 6

Slevogt H, Zabel S, Opitz B, Hocke A, Dje N´Guessan P, Eitel J, Lucka L, Riesbeck R., Zimmermann W, Hippenstiel S, Zweigner J, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N and Singer BB. CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered anti-bacterial responses of human pulmonary epithelial cells, **Nat. Immunol.** 2008 (in press)

Obwohl *Moraxella catarrhalis* und *Neisseria meningitidis* bedeutsame human-pathogene Erreger sind, kolonisieren sie häufig den menschlichen Respirationstrakt ohne ausgeprägte entzündliche Reaktionen zu verursachen. Beide Pathogene exprimieren strukturell nicht verwandte Proteine, denen gemeinsam ist, dass sie über die Fähigkeit verfügen, das *Carcinoembryonic antigen (CEA)-related cell adhesion molecule 1* (CEACAM1) zu stimulieren, welches auf humanen Zellen exprimiert ist.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass eine Interaktion des CEACAM1 sowohl mit dem UspA1 Protein, welches auf der Oberfläche von *M. catarrhalis* exprimiert wird, als auch mit den Opa-Proteinen von *N. meningitidis* die durch toll-like Rezeptor 2 (TLR2)-initiierte NF- κ B-abhängige pro-inflammatorische Immunantwort primärer Bronchialepithelzellen reduzierte. Dieser inhibitorische Effekt wurde über die Phosphorylierung des *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) der intrazellulären Domäne von CEACAM1 vermittelt. Als direkte Folge kam es zu einer Rekrutierung der Phosphatase Shp1, die die TLR2-abhängige Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt Signalweges reduzierte. Unsere Ergebnisse beschreiben eine bisher unentdeckte CEACAM1-abhängige Strategie von Bakterien, das menschliche Immunsystem zu umgehen.

2.5 *M. catarrhalis* spezifische Schädigung pulmonaler Epithelzellen

Publikation 7

N´Guessan P, Vigelahn M, Bachmann S, Zabel S, Opitz B, Schmeck B, Hippenstiel S, Zweigner J, Riesbeck K, Singer BB, Suttorp N and **Slevogt H**. The UspA1 protein of *Moraxella catarrhalis* induces CEACAM-1 dependent apoptosis in alveolar epithelial cells, **J Infect Dis** 2007;195:1651-60.

Moraxella catarrhalis ist ein wichtiger Verursacher der infektexazerbierten chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD). In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass es als Folge einer Interaktion des auf der Oberfläche von *M. catarrhalis* exprimierten erregerspezifischen *ubiquitous surface proteins* (Usp) A1 mit dem epithelial exprimierten *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule* (CEACAM) 1 zur Apoptose alveolarer Epithelzellen kam. Es zeigte sich im Vergleich mit nicht stabil transfizierten Zellen ohne CEACAM1 Expression, dass die durch *M. catarrhalis*-induzierte Apoptose in solchen HeLa Zellen gesteigert war, die stabil mit CEACAM1 transfiziert worden waren. Bei den *M. catarrhalis*-infizierten Zellen war eine gesteigerte Aktivität der Caspasen 3, 6 und 9 nicht aber der Caspase 8 nachweisbar. Eine Reduktion der Bcl-2 Expression, sowie eine Translokation von Bax in die Mitochondrien und ein Anstieg des Apoptose-induzierenden Faktors im Zytosol waren Hinweise auf eine Beteiligung von mitochondrialen Apoptose induzierenden Signalwegen. Zusammenfassend zeigten unsere Ergebnisse, dass *M. catarrhalis* eine Apoptose in pulmonalen Epithelzellen induzierte – ein Prozess, der durch die Interaktion von UspA1 und CEACAM1 ausgelöst wurde. Möglicherweise trägt die *M. catarrhalis*-induzierte Apoptose zu einer Emphysementstehung bei Patienten mit COPD bei.

3. Diskussion

Da *M. catarrhalis* lange als ein unbedeutender Kommensale des Respirationstraktes verkannt war, wurde auch der Erforschung der pathogenetischen Bedeutung dieses Keimes bisher ein geringer bzw. gar kein Stellenwert zugeordnet. Jedoch ist inzwischen anerkannt, dass diesem Keim bei COPD-Patienten eine wichtige Rolle für die Pathogenese der Erkrankung zukommt. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeiten fokussierten daher auf die molekularen Wechselwirkungen zwischen diesem Erreger und dem pulmonalen Epithel und leisten so einen wichtigen Betrag für die Analyse der dabei zugrundeliegenden Mechanismen.

3.1 Die Adhäsion von *M. catarrhalis* an pulmonalen Epithelzellen

Bakterielle Infektionen folgen meist einer konstanten Abfolge einer immer enger werdenden Kontaktaufnahme mit dem Zielgewebe [58]. Dieser Prozess wird initiiert durch die Kolonisation des Gewebes durch das Bakterium, dieses ist Voraussetzung für die spätere Infektion bedeutet aber zunächst nur eine Art Koexistenz. Für die Etablierung der Infektion ist die Adhäsion der Bakterien an das Zielgewebe von großer Bedeutung [59]. Als wichtiges Atemwegspathogen ist *M. catarrhalis* in der Lage, an Epithelzellen zu adhären [26]. Aebi et al. konnten erstmalig zeigen, dass eine bakterielle Adhäsion des O35E Wildstammes von *M. catarrhalis* an humane konjunktivale Epithelzellen (Chang-Zellen) durch das *M. catarrhalis*-spezifische äußere Membranprotein (*outer membran protein* OMP) UspA1 vermittelt wird. Eine Mutante dieses Stammes, die kein funktionsfähiges Gen für UspA1 mehr aufwies, zeigte eine deutlich verminderte Fähigkeit, an diese Epithelzellen zu adhären [40]. Es folgten verschiedene Arbeiten, in denen die Adhäsion von *M. catarrhalis* an humanem Epithel in Abhängigkeit von verschiedenen erregerspezifischen Molekülstrukturen, z.B. dem Lipooligosaccharid (LOS) und dem *M. catarrhalis* IgD-binding Protein (MID) untersucht wurden. Für diese Analysen wurden nahezu ausnahmslos Epithelzell-Linien verwandt, die nicht pulmonalen Ursprungs waren (HeLa Zellen und Chang konjunktivale Epithelzellen) und daher keine Rückschlüsse auf spezifische Adhäsionseigenschaften dieses Erregers an Epithelien des respiratorischen Organsystems [35, 60]. In der hier vorgestellten Arbeit konnten wir zeigen, dass *M. catarrhalis* auch an pulmonale Epithelzellen adhärert [61]. Für diese Untersuchungen verwendeten wir initial die in der Literatur am häufigsten verwendeten Adhäsionsassays, und fanden erhebliche methodische Schwierigkeiten

bezüglich ihrer Aussagekraft [40, 62]. Diese ließen sich insbesondere darauf zurückführen, dass für diese Verfahren nicht bezüglich der Fragestellung standardisiert wurden, ob konfluente oder nicht konfluente Zelllayer verwendet werden oder ob sich das für jeden Bakterienstamm mögliche spezifische Adhäsionsverhalten auf die Ergebnisse der Assays auswirkt. Daraufhin entwickelten wir eigens einen Adhäsionsassay. Zunächst haben wir die Versuchsergebnisse dieses Assays standardisiert und konnten nachweisen, dass er verlässliche und reproduzierbare Daten liefert. Weiterhin bestätigten unsere Ergebnisse die Beobachtung anderer Arbeitsgruppen, dass die *Moraxella*-Adhäsion an Epithelzellen überwiegend durch proteinhaltige Strukturen auf der Oberfläche des Erregers vermittelt wird [19, 35].

Zur Prävention von *M. catarrhalis* Infektionen ist die Entwicklung geeigneter Vakzine, die die Adhäsion des Erregers an respiratorische Epithelzellen unterbinden, der am stärksten bevorzugte Ansatz [35]. Nach einer amerikanischen Schätzung könnte die Entwicklung einer Vakzine, die in der Lage ist das Auftreten von *M. catarrhalis*-bedingten Infektionen um 30% zu verringern, zu jährlichen Einsparungen im Gesundheitswesen von mindestens 400 Millionen Dollar führen.

Es sind bereits Versuche unternommen worden, *M. catarrhalis*-Antigene, die als potentiell wichtige Ziele der humanen Immunreaktion auf eine Infektion dienen, zu identifizieren und zu charakterisieren [19, 34]. Der von uns entwickelte Adhäsionsassay bietet die Möglichkeit die Bedeutung dieser *Moraxella*-spezifischen Adhäsine wie verschiedene äußere Membranproteine (OMPs), LOS und Fimbriae auf die Adhäsionsfähigkeit dieses Erregers an pulmonalen Epithelzellen *in vitro* zu untersuchen und liefert damit einen wichtigen methodischen Beitrag für die Impfstoffentwicklung zur Prävention *M. catarrhalis*-induzierter Infektionen.

3.2 Invasion und Pathogenerkennung von *M. catarrhalis*

Infektionen mit *M. catarrhalis* wurden in der Literatur stets als rein extrazellulärer Natur beschrieben [15, 19]. Entgegen dieser Beschreibungen konnten wir in den hier vorgelegten Arbeiten nachweisen, dass *M. catarrhalis* unter Zuhilfenahme eines *trigger*-ähnlichen Mechanismus pulmonale Epithelzellen zu invadieren vermag [63]. Dabei kommt es in der Wirtszelle zu der Ausbildung eines Makropinosoms, welches den Erreger umschließt. Dieses konnten wir mittels konfokal- und elektronenmikroskopischer Aufnahmen in unterschiedlichen pulmonalen Epithelzellen nachweisen. Ein intrazelluläres Vorkommen in pulmonalen

Epithelzellen ist auch für *H. influenzae* und *S. pneumoniae* beschrieben worden, die ebenfalls für die Pathogenese der COPD von wichtiger Bedeutung sind [64, 65]. Adhäsion sowie Invasion bakterieller Erreger spielen für die Etablierung einer Infektion eine große Rolle und sind überdies für die Erregerpersistenz im Respirationstrakt von wichtiger Bedeutung. Da das angeborene Immunsystem der pulmonalen Epithelzellen nicht nur mit einer Vielzahl extra- sondern auch intrazellulärer PRR zu Detektion eindringender Erreger besitzt, ist es wahrscheinlich dass auch adhärierende sowie invadierende *M. catarrhalis* durch solche Rezeptoren erkannt werden [48]. Möglicherweise wird *M. catarrhalis* durch sein intrazelluläres Vorkommen aber auch befähigt, eine Erregererkennung durch Komponenten des extrazellulären Immunsystems zu umgehen. Dies könnte seiner Persistenz im Bronchialtrakt Vorschub leisten.

Die humanen Atemwege kommen während der Inhalation ständig mit Bakterien, bakteriellen Bestandteilen und deren *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) in Kontakt. Pulmonale Epithelzellen, die im Respirationstrakt inhalierten Bakterien und PAMPs exponiert sind, spielen neben Makrophagen und neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, für die Orchestrierung einer Immunantwort eine aktive und wichtige Rolle. Diese Epithelzellen exprimieren alle beim Menschen bisher nachgewiesenen TLR [46, 66]. Es ist bekannt, dass insbesondere dem TLR2 für die Erkennung von PAMPs grampositiver sowie auch gramnegativer Bakterien als auch für die Detektion einiger viraler Pamps eine bedeutende Rolle zukommt [67, 68]. In den vorgelegten Arbeiten konnten wir zeigen, dass für die extrazelluläre Pathogenerkennung von *M. catarrhalis* die Expression von TLR2 auf humanem Bronchialepithel von großer Bedeutung ist (**Publikation 2**), [63]. Für den ebenfalls intrazellulär vorkommenden Erreger konnten wir außerdem nachweisen, dass *M. catarrhalis* durch den intrazellulären PRR NOD-1 erkannt wird. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die *M. catarrhalis*-induzierte Immunantwort von der Aktivierung und möglicherweise auch der Interaktion verschiedener extrazellulärer und intrazellulärer PRR abhängig ist.

3.3 Die *M. catarrhalis*-induzierte Immunantwort

Bei COPD-Patienten findet sich sowohl in der BAL als auch im induzierten Sputum eine deutliche Vermehrung von neutrophilen Granulozyten [9, 69]. Hingegen zeigt sich in bronchialen Schleimhautbiopsien eine Infiltration mit mononukleären Zellen,

viele CD8⁺ T-Lymphozyten, aber kaum neutrophile Granulozyten, weil diese rasch von der Zirkulation in das Lumen der Atemwege wandern [70, 71]. Daher ist das bei der COPD vorherrschende Zytokin IL-8 als ein selektives *attractant* für neutrophile von besonderer Bedeutung [47, 53]. Die IL-8- Spiegel im induzierten Sputum sowie in der BAL von Patienten mit COPD korrelieren mit dem Ausmaß der neutrophilen Entzündungsreaktion und mit dem Schweregrad der Erkrankung [9, 71]. In den vorliegenden Arbeiten wurde die Bedeutung von *M. catarrhalis* für die Aktivierung des humanen Bronchialepithels analysiert (**Publikation 3**) [62]. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation von humanem bronchialem Epithel mit *M. catarrhalis* die Sekretion von IL-8 sowie dem *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) induziert [62]. Diese Beobachtungen sind ein deutlicher Hinweis dafür, dass diesem Pathogen eine wichtige Rolle für die Aktivierung und Generierung einer Immunantwort der bronchialen Epithelzellen zukommt. Da *M. catarrhalis* bei COPD-Patienten häufig als kolonisierender Keim im unteren Respirationstrakt anzutreffen ist [31], ist es wahrscheinlich, dass seine Präsenz auch *in vivo* zu einer anhaltende Aktivierung des respiratorischen Epithels führt u.a. durch eine gesteigerte Zytokinproduktion, was sich negativ auf den Verlauf der Erkrankung auswirkt.

In unseren Untersuchungen konnten wir weiterhin zeigen, dass es im Anschluss an die Pathogenerkennung von *M. catarrhalis* durch die pulmonalen Epithelzellen zu einer Aktivierung der *Mitogen*-aktivierte Proteinkinase (MAP) *extracellular-signal regulated* Kinase (ERK)1/2, p38 und c-Jun N-terminal Kinase (JNK) sowie des Transkriptionsfaktors NF- κ B kommt. Aufgrund dieser *in vitro* Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass eine Infektion mit *M. catarrhalis* einen entzündlichen Prozess der Atemwege auszulösen und zu unterhalten vermag. Um diese Beobachtung auch *in vivo* zu verifizieren, sind allerdings weiterführende klinisch orientierte Studien notwendig.

3.4 Die Rolle der Histonmodifikation für die *Moraxella*-induzierte Immunreaktion

Die Histon-Deazetylase (HDAC) konnte als zentrales Enzym für die negative Regulation proinflammatorischer Zytokine in Lungengewebe und alveolären Makrophagen identifiziert werden [55]. Insbesondere bei Patienten mit fortgeschrittener COPD konnte eine verminderte Histon-Deazetylase (HDAC) Aktivität nachgewiesen werden. HDACs und Histon-Azetyltransferasen (HAT) bilden

Enzymfamilien, die im Zellkern aktiv sind und durch die Modifizierung der Chromatinstruktur die Expression von Genen steuern, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind [55]. HAT azetylieren die Kern-Histone, wodurch sich die Chromatinstruktur so verändert, dass die Transkription der entsprechenden Genabschnitte möglich wird. Umgekehrt führt die Deazetylierung der Kern-Histone durch die HDAC zu einer Blockierung der DNA, die deren Transkription verhindert und somit die Expression entsprechender Genprodukte hemmt (Abb.4).

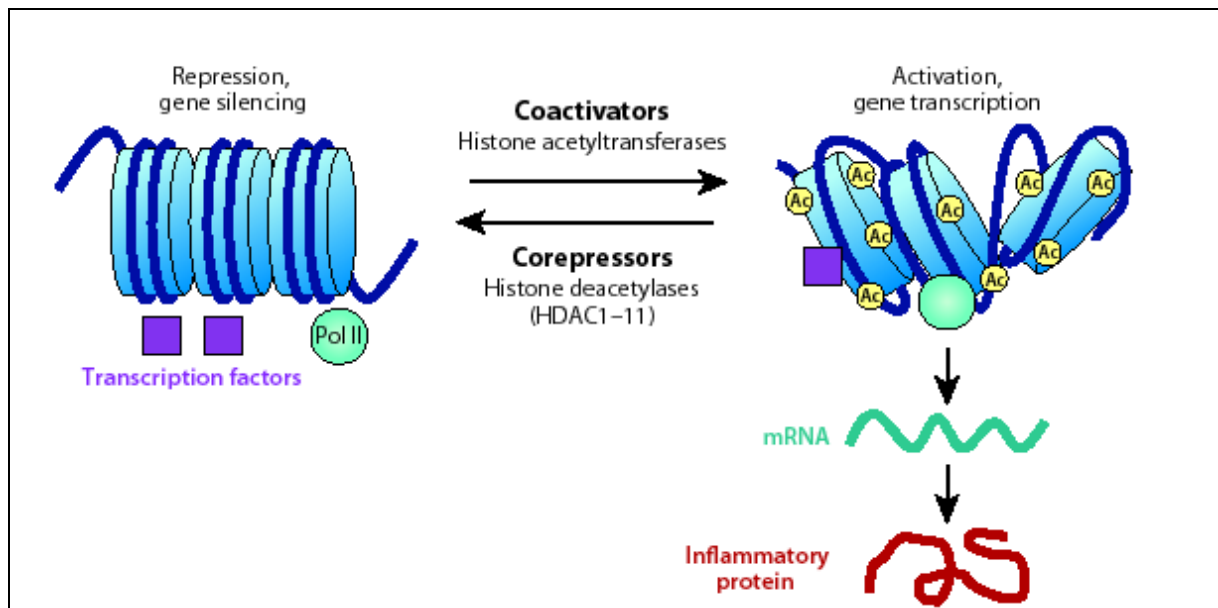


Abbildung 4.) Die Chromatinstruktur beeinflusst die Genexpression. Azetylierung der Kernhistone regulieren die Genexpression. Die Azetylierung wird vermittelt durch Kofaktoren die eine Histonazytransferaseaktivität besitzen und führt zu eine Auflockerung der Chromatinstruktur, was eine vermehrte Bindung der RNA Polymerase II (POL II) und von Transkriptionsfaktoren zur Folge hat. Durch eine Deazetylierung der Histone, der durch die Histondeazetylasen vermittelt wird, wird dieser Prozess umgekehrt und die Genexpression inhibiert. (Aus: Barnes P. 2009, Annual review of Physiology, [72]).

Das Ausmaß der Histon-Azetylierung hängt also vom dynamischen Gleichgewicht zwischen der HAT- und HDAC-Aktivität ab. Folge davon ist ein verschobenes Gleichgewicht zu Gunsten der Histon-Azetyltransferase (HAT), welches in einer vermehrten Bildung proinflammatorischer Zytokine wie dem IL-8 resultiert. Bei COPD-Patienten ist dieses Gleichgewicht in Richtung Histon-Hyperazetylierung verschoben. Dabei konnte durch Ito et al. gezeigt werden, dass im Vergleich zu gesunden Probanden die Expression insbesondere der HDAC2 im Lungengewebe von COPD-Patienten deutlich erniedrigt war [57]. Der Schweregrad der COPD korrelierte dabei mit der Verminderung der HDAC-Aktivität. Die Folge einer niedrigen HDAC Aktivität ist der Anstieg proinflammatorischer Zytokine wie dem IL-8 [56]. Die niedrige Enzymaktivität hat möglicherweise auch einen wichtigen Einfluss für die

Chronifizierung der Erkrankung. In Analogie zu diesen klinischen Studienergebnissen konnten wir in unseren Arbeiten zeigen, dass eine Infektion von Bronchialepithel mit *M. catarrhalis in vitro* ebenfalls zu einer verminderten HDAC2 Expression führt, was eine gesteigerte IL-8 Produktion zur Folge hatte (**Publikation 3**) [62]. Diese Daten sind ein wichtiger Hinweis dafür, dass eine Kolonisierung des Bronchialtraktes mit *M. catarrhalis* auch einen Einfluss auf die epigenetische Regulation pro-inflammatorischer Mediatoren im Lungengewebe haben könnte. Eine verminderte HDAC2 Expression hat eine erhöhte Ansprechbarkeit der Expression pro-inflammatorischer Gene wie des *IL8* zur Folge. Es ist deshalb denkbar, dass eine *M. catarrhalis*-induzierte HDAC2 Reduktion einen wichtigen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der chronisch entzündlichen Reaktion in der Lunge bei COPD-Patienten hat, die mit diesem Erreger kolonisiert bzw. infiziert sind.

3.5 Die Rolle der Moraxella-induzierten Prostaglandin (PG) E₂ Induktion

Prostaglandin (PG)E₂ ist ein wichtiger Mediator akuter und chronischer Entzündungen [73]. Der Ausgangspunkt der Prostaglandinsynthese ist die Arachidonsäure, die in Phospholipiden von Zellmembranen enthalten ist und durch die Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂) aus der Membran ausgelöst werden kann. Die Cyclooxygenase (COX) oder Prostaglandin H Synthase (PGHS) ist das Schlüsselenzym der Prostaglandin-Biosynthese. Dieses Enzym katalysiert die ersten beiden Schritte in der Umwandlung der Arachidonsäure zu PG. Das Intermediärprodukt PGH₂ wird schließlich durch gewebspezifische Synthasen in die biologisch aktiven Endprodukte PGE₂, PGF₂, PGD₂, PGI₂ (Prostacyclin) und Thromboxan umgewandelt. Für die COX sind zwei verschiedene Isoformen beschrieben, COX-1 und COX-2. Diese Enzyme werden unterschiedlich reguliert und haben verschiedene biologische Funktionen [74].

Die Wirkungen von PGE₂ wird über Membranrezeptoren vermittelt, die der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) des Rhodopsin-Typs angehören. Aufgrund der Affinität spezifischer Liganden können vier Subtypen des PGE₂-Rezeptors (EP1-EP4) unterschieden werden. Die verschiedenen Wirkungen werden über die verschiedene Rezeptorausstattung dieser Rezeptoren in den verschiedenen Geweben reguliert. Hinsichtlich ihrer Funktion werden sie in 3 Klassen eingeordnet. EP1 vermittelt einen intrazellulären Kalziumeinstrom, während EP2 und EP4 einen Anstieg der intrazellulären c-AMP Konzentration bewirken [75].

EP3 hingegen bewirkt einen Abfall der intrazellulären c-AMP Konzentration [75, 76]. Die Effekte der Prostanoiden auf die diesen Rezeptoren nachgeschalteten Signalwegen können als Funktion der Liganden Struktur und Konzentration variieren. Über die Regulation der Expression der verschiedenen EP in pulmonalem Gewebe ist nur wenig bekannt. In unseren Arbeiten haben wir daher zunächst einen möglichen Einfluss von Infektionen mit *M. catarrhalis* auf die Expression der EP Rezeptoren in pulmonalem Epithel untersucht (**Publikation 4**), [77]. Dabei zeigte sich eine *M. catarrhalis*-induzierte Hochregulation der Prostanoid Rezeptor Subtypen EP2 und EP4, nicht aber der Subtypen EP1 und EP3. Allerdings konnte das Vorhandensein aller Rezeptoren im pulmonalem Epithel nachgewiesen werden.

Weiterhin konnten wir durch unsere Untersuchungen zeigen, dass es als Folge einer Infektion der Zellen mit *M. catarrhalis* zu einer Steigerung der Cox-2 Expression mit darauf folgender Freisetzung von PGE2 kam.

Über die Bedeutung der PGE2 für die Pathogenese der COPD gibt es bisher nur wenig Arbeiten, ebenso wie über die Rolle der PGE2 im Rahmen bakterieller Infektionen. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass es nach Infektionen von pulmonalem Epithel mit *H. influenza*, *S. pneumonia* und *Legionella pneumophila* ebenfalls zu einer Induktion der PGE2 kommt [78-80].

Im Rahmen systemischer akuter und chronischer Entzündungen wird dem PGE2 eine besonders wichtige Rolle als pro-inflammatorische Reaktionen vermittelndes Prostanoid zugeschrieben [76]. Im Gegensatz dazu wird davon ausgegangen, dass PGE2 in der Lunge organspezifisch vorwiegend entzündungshemmende Wirkungen ausübt [76]. Bei verschiedenen pulmonalen Erkrankungen konnte dabei ein antiinflammatorischer und antifibrotischer Einfluss dieses Prostaglandins auf das Lungengewebe nachgewiesen werden wie z.B. bei Asthma bronchiale, bei der Lungenfibrose und der Hypersensitivitäts-Pneumonitis [76]. Es muss daher in weiterführenden Studien der Fragestellung nachgegangen werden, welche Bedeutung die Cox-2 abhängige PGE2 Produktion speziell für die Pathogenese bakterieller Infektionen in der Lunge hat. Möglicherweise lässt sich hier ebenfalls ein eher protektiver als proinflammatorischer Effekt nachweisen. Dabei ist zu hinterfragen, ob das Expressionsmuster der EP1-4 für die Wirkungsweise der PGE2 von Bedeutung ist. Es ist durchaus denkbar, dass eine *M. catarrhalis*-induzierte PGE2 Freisetzung einer pulmonalen Entzündungsreaktion entgegen wirkt und

darüber hinaus die Kolonisierung des unteren Respirationstraktes von COPD-Patienten mit Bakterien begünstigt.

3.6 Die Rolle der Proteinkinase C für die *Moraxella*-induzierte IL-8 Sekretion

Die Proteinkinase C (PKC) gehört zu den Serin/Threonin-spezifischen Kinasen und zu der Familie der second messenger-abhängigen Proteinkinasen. Durch eine Übertragung von Phosphat auf Serin- oder Threoningruppen steuert sie die Aktivität nachgeordneter Enzyme oder Faktoren [81]. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Zellantwort auf extrazelluläre Stimuli. Die PKC kann als Polypeptidstrang mit einem C-Terminus, der die katalysatorische Domäne darstellt, und einem N-Terminus, der die regulatorischen Domäne darstellt, veranschaulicht werden (Abb. 3). Der Polypeptidstrang besteht aus vier konservierten Bereichen, die mit C1, C2, C3 und C4 benannt sind, und 5 variablen Bereichen, deren Funktion unbekannt ist. C1 und C2 sind die regulatorischen Bereiche. Zwei Cystein-reiche Sequenzen lokalisiert an der C1-Domäne bilden die Bindestellen für Diacylglycerin und Phorbolster. Kommt es zu einer Bindung von DAG an die PKC, so fungiert DAG als Anker des Enzyms an die Zellmembran. C2 seinerseits erkennt saure Lipide und dient ggf. als Kalzium-Ion-Bindestelle.

Aufgrund der Variation innerhalb dieser Eigenschaften innerhalb der Familie der PKC umfasst sie derzeit 12 bekannte verschiedene Isoenzyme, die anhand ihrer Primärstruktur und biochemischen Eigenschaften in drei Klassen eingeteilt werden (Abb. 4): *classic* PKC (cPKC), *novel* PKC (nPKC) und *atypical* PKC (aPKC) [74]. Die cPKC-Isoformen werden durch second messenger (Ca^{2+} und Diacylglycerin, DAG sowie Phorbolster (PE) aktiviert, die nPKC-Isoformen werden nur durch DAG und PE aktiviert, und aPKC sind Ca^{2+} - und DAG-unabhängig. Zu den cPKC-Isoformen zählen $\text{PKC}\alpha$, $\text{PKC}\beta\text{I}$, $\text{PKC}\beta\text{II}$ und $\text{PKC}\gamma$, zu den nPKC-Isoformen zählen $\text{PKC}\epsilon$, $\text{PKC}\delta$ und $\text{PKC}\eta$ und die aPKC-Isoformen bestehen aus $\text{PKC}\zeta$, $\text{PKC}\lambda\text{I}$ und $\text{PKC}\mu$.

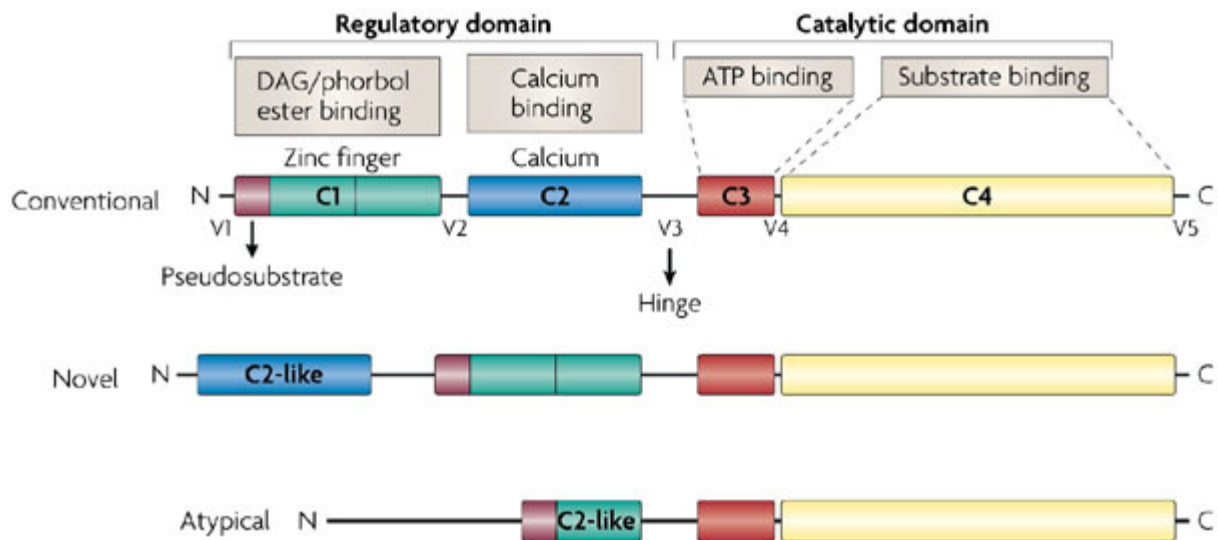


Abbildung 4) Strukturunterschiede der PKC Isoformen. Die PKC besitzt 4 konservierte Domänen (C1-4): C1 der klassischen (engl.: *conventionale*) PKC besteht aus 1-2 Cystein-reichen Motifen, die die Bindungsstelle für DAG und PE bilden. C2 beinhaltet die Bindungsstelle für Ca^{2+} . C3 und C4 formieren sich zu der Bindungsstelle für ATP und dem jeweiligen Substrat (Aus: Mackey and Twelves, Nat Rev Cancer 2007, [82]).

Neben den klassischen Aktivatoren der PKC konnte eine Aktivierung der PKC auch durch Fettsäuren und andere Lipidmediatoren wie Lysophosphatidylcholin und Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat und auch durch Tyrosin Phosphorylierung gezeigt werden [81].

Die unterschiedlichen biologischen Funktionen der PKC Isoformen finden ihr Korrelat nicht nur in deutlichen Unterschieden bezüglich ihrer Molekülstruktur und ihrer Substratspezifität, sondern auch in ihrer Verteilung in den einzelnen Zellen und Körpergeweben, ihrem Vorkommen in intrazellulären Kompartimenten und der Art ihrer Aktivierung [82]. Die PKC-vermittelte Signaltransduktion ist somit nicht nur isoformspezifisch, sondern auch abhängig von Zelltyp und dem induzierendem Stimulus. Ihre Funktionen werden entscheidend von einer Translokation der aktivierten Kinase in ein spezifisches Zellkompartiment und den dort zur Verfügung stehenden Substraten beeinflusst. So kann die Aktivierung spezifischer Isoformen der PKC in der Aktivierung von MAPK und Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel dem NF- κ B resultieren, daneben werden auch zahlreiche weitere Angriffspunkte, zum Beispiel die Initiierung der p70 S6 Kinase Kaskade, vermutet [81, 82].

In der Lunge ist die Familie der PKC Isoformen für viele wichtige zelluläre Funktionen von großer Bedeutung, wie für die Steuerung der Permeabilität, der Proliferation, der Apoptose und der Zytokinsekretion [74, 81]. Weitere experimentelle Studien deuten darauf hin, dass der PKC eine wichtige Funktion in der Steuerung NF- κ B abhängiger

Genexpression und der Kontrolle einer IL-8 Freisetzung durch Interleukin 1 β oder TNF α zugeschrieben werden kann [83]. Die Aktivierung der PKC ist somit ein integraler Bestandteil für die Generierung einer proinflammatorischen Immunantwort. Allerdings ist insbesondere die Rolle der PKC für die angeborene Immunantwort zur Abwehr pulmonaler Erreger nur wenig untersucht. In unseren Studien konnten wir zeigen, dass die PKC für die Orchestrierung einer *M. catarrhalis*-induzierten Immunantwort von grosser Bedeutung ist (**Publikation 5**), [84]. Dabei nimmt das Moraxella-spezifische Oberflächenmembranprotein UspA2 eine wichtige Rolle als Aktivator der PKC pulmonaler Epithelzellen ein. Interessanterweise fanden wir zudem, dass einzelne Isoformen der PKC die *Moraxella*-induzierte IL-8 Sekretion unterschiedlich beeinflussten. Während PKC α and PKC ϵ eine Steigerung der IL-8 Sekretion bewirkten, steuerte die PKC θ diesem Prozess entgegen. Anhand dieser Ergebnisse wäre es wichtig zu untersuchen, ob sich das Expressionsprofil der PKC Isoformen im Lungengewebe von gesunden Menschen und COPD-Patienten unterscheidet und welchen Steuerungsmechanismen dieses unterliegt. Darüber liegen derzeit nur wenig Kenntnisse vor [74]. Unsere *in vitro* Ergebnisse legen allerdings die Annahme nahe, dass unterschiedliche Expressionsprofile der PKC Isoformen im Lungengewebe einen modulierenden Einfluss auf die gegen bakterielle Infektionen gerichtete pro-inflammatorische Immunantwort haben könnten. Möglicherweise wäre dabei die Beeinflussung der Expressionsprofile auch ein interessanter Therapieansatz zur Reduktion der chronischen Inflammation der COPD.

3.7 Die Interaktion von *M. catarrhalis* mit CEACAM1 als Strategie zur Umgehung der angeborenen Immunantwort

M. catarrhalis besitzt wie auch *H. influenzae* und *N. meningitidis* spezifische Molekülstrukturen, die mit einer hohen Affinität und Selektivität an die sog. N-Domäne von Rezeptoren aus der Familie der *cruciform embryonic antigen-related cell adhesion molecules* (CEACAMs) binden [85-87]. CEACAMs sind Immunglobulin-verwandte Moleküle, die für die Vermittlung der Adhäsion zwischen einzelnen Körperzellen und der Adhäsion an der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle spielen. Diese Rezeptorfamilie umfasst zurzeit etwa 20 Mitglieder, welche in einer Zelltyp-spezifischen Weise exprimiert werden. Dabei lassen sich gleich mehrere dieser Moleküle auf verschiedenen Epithelien finden [88]. Die membrangebundenen

Mitglieder der CEACAM Familie sind entweder über eine Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Gruppe in der Membran verankert, oder sie sind transmembranär mit verschiedenen zytoplasmatischen Domänen angelegt (Abb.5).

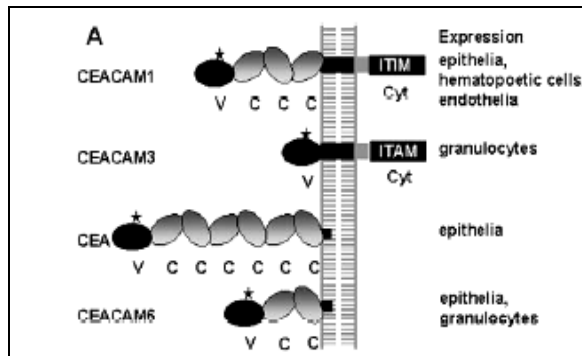


Abbildung 5) An der Zelloberfläche verschiedener Zellarten exprimierte CEACAM-Rezeptoren mit GPI-Verankerung [CEA (entspricht CEACAM5) und CEACAM6] oder mit zytoplasmatischer ITIM- Domäne (CEACAM1) bzw. ITAM-Domäne (CEACAM3). V=Amino-terminal IgV-like domain, auch N-Dömäne genannt; C=IgC2-like domain [88]).

Zur Ausübung der meisten für die CEACAM bekannten Zellfunktionen wie z.B. Zellproliferation und -differenzierung müssen die Rezeptoren in der Lage sein, Signale zu empfangen, zu modulieren und weiterzuleiten. Zum Beispiel besitzt die zytoplasmatische Domäne von CEACAM1 dafür ein *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* (ITIM) während die intrazelluläre Domäne von CEACAM3 ein *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) enthält. ITIMs und ITAMs werden in einer Vielzahl von Membranrezeptoren gefunden, wie zum Beispiel in dem T-Zell, und dem B-Zell-Rezeptor, in dem Fc gamma Rezeptor IIb (FcγRIIb), in Interleukinrezeptoren und in den *kller-cll-Ig-Ike*-Rezeptoren (KIRs). Nach ihrer Phosphorylierung binden ITAMs und ITIMs an Proteinkinasen bzw. -Phosphatasen, deren Aktivierung zur Stimulation oder Terminierung von Signalwegen führt, die u.a. die Zellproliferation regulieren. Nach Tyrosinphosphorylierung seines ITIMs kann CEACAM1 eine Reihe von Substraten binden und aktivieren. Hier sind vor allem die SH2-domain containing Proteinphosphatasen (PTP) SHP1 und SHP2 von Bedeutung. CEACAMs sind in polarisierten Epithelien vor allem auf der apikalen Seite der Zellen lokalisiert und damit für die auf Schleimhäuten vorkommenden Bakterien leicht zugänglich. Beispielsweise führte die Bindung von CEACAM1 durch *Neisserien* zu einer Verminderung der Aktivierung und Proliferation von CD4 T-Lymphozyten. Diese Eigenschaft konnte auf die Anwesenheit des ITIMs in der zytosolischen Domäne von CEACAM1 zurückgeführt werden. Rezeptoren der CEACAM-Familie wurden auch auf Zellen des Respirationstraktes nachgewiesen.

Wir konnten in unseren Arbeiten zeigen, dass es durch Bindung von *M. catarrhalis*-UspA1, einem *Moraxella*-spezifischen Membranprotein an CEACAM1 zu einer reduzierten TLR2-vermittelten Immunantwort kommt (**Publikation 6**). Desweiteren konnten wir nachweisen, dass diese Reduktion über die Rekrutierung von SHP1 an die ITIM-Domäne von CEACAM1 vermittelt wird. Folge dieser Reaktion ist die Kolokalisation von CEACAM1 mit dem TLR2 Rezeptor und einer direkten Inhibition der PI3K-vermittelten Aktivierung von NF- κ B, die durch SHP1 inhibiert wird (Abb. 6).

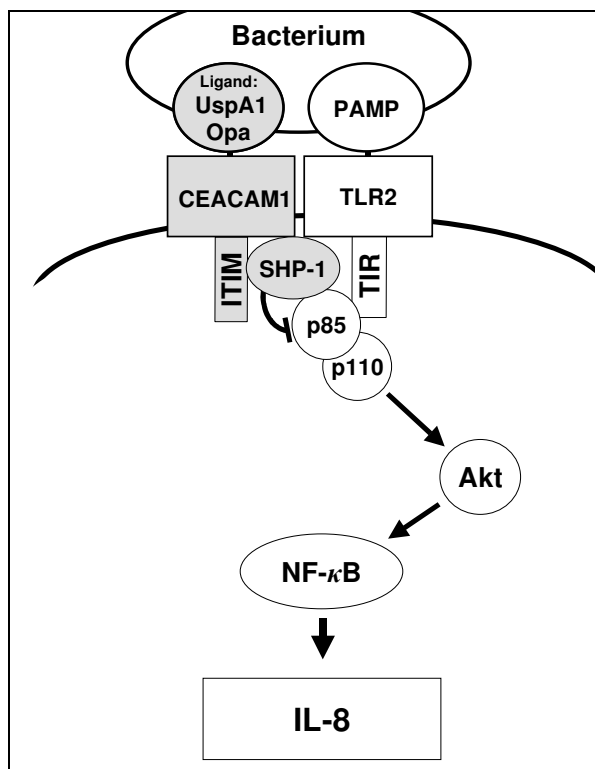


Abbildung 6) Modell der CEACAM1-vermittelten Inhibition der PI3K-abhängigen TLR2-Aktivierung. Im Anschluss an eine Detektion des TLR2-Liganden durch den Rezeptor kommt es zu einer Phosphorylierung des YXXM Motifs der TIR Domäne von TLR2, die daraufhin mit der p85 Untereinheit der PI3K assoziiert. Dieses hat eine AKT-Aktivierung mit einer anschließenden NF- κ B-vermittelten gesteigerten IL-8 Sekretion zur Folge [89]. Eine gleichzeitige Aktivierung von CEACAM1 führt zu einer Rekrutierung von SHP1 zu der zytosmatischen ITIM-Domäne von CEACAM1 und parallel dazu auch zu dem kolokalisierenden TLR2. Daraufhin wird der p85 α -TLR2 Komplex inhibiert, was ein Reduktion der Akt-vermittelten NF- κ B Aktivierung zur Folge hat. (Aus: Slevogt et al. Nat Immunol, 2008, [90]).

Bei diesem Mechanismus handelt es sich wahrscheinlich um eine Strategie des Erregers, der Immunantwort zu entgehen oder sie zumindest abzuschwächen. Außerdem bietet dieser Mechanismus ein mögliches Erklärungsmodell dafür, warum Erreger pulmonales Epithel kolonisieren können, ohne dabei eine wesentliche Immunantwort zu induzieren.

3.8 *M. catarrhalis* spezifische Schädigungen pulmonaler Epithelzellen

Das Lungenemphysem ist eine pathologische Erweiterung und Rarifizierung des Lungenparenchyms, einschliesslich der Bronchioli und der Alveolen, die mit einer

sukzessiven Zerstörung der Wandungen dieser Strukturen einhergeht. Einer der Hauptrisikofaktoren ist das Rauchen und die Anzahl der “pack-years” des Zigarettenkonsums korreliert signifikant mit der Emphysementstehung. Interessanterweise entwickeln aber nur 40% aller starken Raucher ein Emphysem, sodass anzunehmen ist, dass auch andere Faktoren an der Emphysementstehung beteiligt sind [91, 92]. Die Pathogenese der Emphysementstehung als irreversible Folge der COPD ist bisher nur unzureichend geklärt. Eine seit den 60er Jahren vorherrschenden Hypothese stellt proteolytische Enzyme als Ursache in den Vordergrund. Dieses pathogenetische Konzept beruht auf der Entdeckung einer Verbindung der Emphysementstehung mit einem α 1-Antitrypsin Mangel [93]. Die proteolytischen Enzyme, die in den wandständigen Makrophagen und Leukozyten der Alveolen reichlich vorkommen, werden durch Antiproteasen gehemmt, von denen der α ₁-Proteinaseinhibitor am bekanntesten ist. Bei einer Imbalance dieses Systems kommt es zu einer Destruktion von alveolären Strukturen insbesondere der extrazellulären Matrix. Es wird angenommen, dass der durch die chronische Entzündungsreaktion bedingte Einstrom inflammatorischer Zellen in das Atemwegssystem zu einer überschüssigen Protease-Aktivität führt und damit einen großen Anteil an der Zerstörung der alveolären Matrix hat [93]. Die sukzessive Zerstörung der alveolären Matrix lässt sich allerdings nicht vollständig mit der Kombination aus der chronischen Entzündung und der exzessiven Proteolyse erklären, zumal es auch zu einem signifikanten Verlust zellulärer Komponenten des Lungenparenchyms wie Epithel- und Endothelzellen kommt. In den letzten Jahren wurde zunehmend erkannt, dass der Apoptose von pulmonalen Epithelzellen eine wichtige Rolle für die Pathogenese der Emphysementstehung zukommt [94]. In mehreren Studien wurde außerdem in Lungenbiopsaten von Patienten mit Lungenemphysem eine vermehrte Apoptoseaktivität nachgewiesen, die mit dem Ausprägungsgrad des Emphysems korrelierte [94-96]. Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass *S. pneumoniae* über die Fähigkeit verfügt, in pulmonalen Epithelzellen apoptotische Prozesse zu initiieren [97, 98]. In unserer hier vorgestellten Studie konnten wir zeigen, dass auch *M. catarrhalis* eine Apoptose pulmonaler Epithelzellen induziert (**Publikation 7**) [99]. In Weiterführenden Untersuchungen fanden wir, dass die Apoptose von der schon o.g. Interaktion zwischen dem *Moraxella*-spezifischen UspA1 und CEACAM1 abhängig war. Wie schon erwähnt lassen sich 40-60 Prozent der akuten Exazerbationen der COPD auf

bakterielle Infektionen zurückführen [26]. Darüber hinaus lässt sich bei bis zu 40 % der COPD Patienten eine pathologische Kolonisierung des unteren Respirationstraktes nachweisen. Daher lassen die Ergebnisse unserer Studie die Hypothese zu, dass eine bakterielle Kolonisierung und Infektion des Respirationstraktes bei COPD Patienten für eine Emphysementstehung von wichtiger Bedeutung sein könnte. Die weitere Klärung der pathogenetischen Bedeutung der bakteriell-induzierten Apoptose für die Emphysementstehung könnte neue Therapieansätze eröffnen, um den zumeist progressiven Verlauf dieser Erkrankung günstig zu beeinflussen.

3.9 Ausblick

Unsere *in vitro* Arbeiten über die molekularen Wechselwirkungen zwischen *M. catarrhalis* und dem respiratorischen Epithel ergeben deutliche Hinweise dafür, dass Infektionen mit *M. catarrhalis* für die Pathogenese der COPD eine wichtige Bedeutung zukommen könnte. Dieser Erreger ist in der Lage, proinflammatorische Reaktionen des pulmonalen Epithels auszulösen und diese über Histon-Modifikationen zu unterhalten und es so auch für weitere Stimuli empfänglicher zu machen. Interessanterweise verfügt dieser Erreger auch über Strategien, die Immunantwort des Epithels zu reduzieren (Abb. 7).

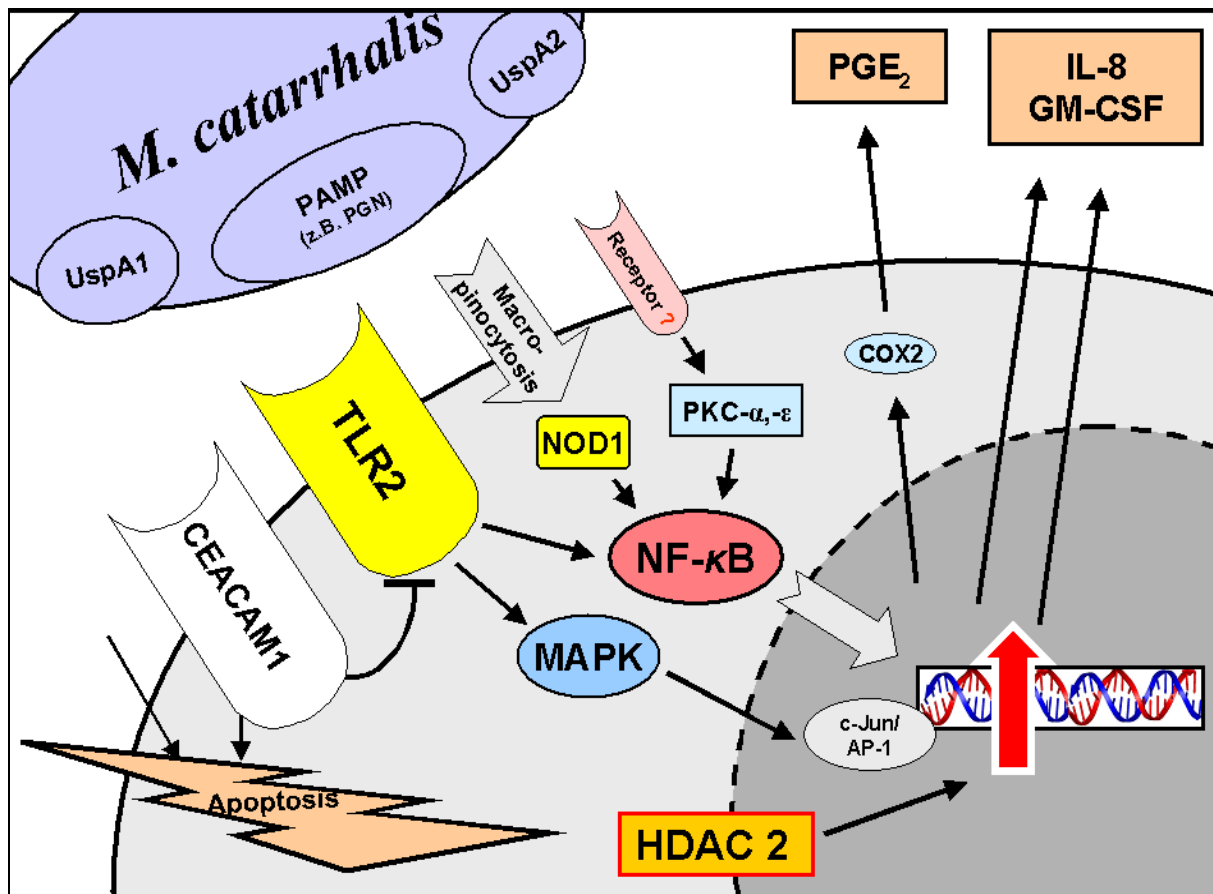


Abbildung 7.) Zusammenfassung der untersuchten Wechselwirkungen und beteiligten Signaltransduktionswege in *M. catarrhalis*-infizierten pulmonalen Epithelzellen [61-63, 77, 84, 90, 99].

Allerdings bedarf es weiterer Studien, um die Bedeutung dieser Fähigkeiten und Interaktionen für die Pathogenese der COPD *in vivo* zu untersuchen. Im Fokus dieser Untersuchungen sollte stehen, die Bedeutung der CEACAM1 Expression auf pulmonalem Epithel mit der Häufigkeit und Ausprägung von *M. catarrhalis* induzierten Infektionen bzw. auch von Infektionen mit anderen CEACAM1-bindenden Bakterien zu untersuchen. Möglicherweise bietet sich dabei ein interessanter Therapieansatz durch Stimulation von CEACAM1 die TLR2-induzierte pro-inflammatorische Immunantwort zu reduzieren. Zum anderen ist es von großer Relevanz zu untersuchen, ob diese Interaktion Auswirkungen auf die Persistenz dieser Bakterien im Respirationstrakt hat. Weiterer Klärungsbedarf besteht außerdem für den Stellenwert, der der *M. catarrhalis*-induzierten Apoptose pulmonaler Epithelzellen *in vivo* für die Pathogenese der Emphysementstehung zukommt.

Die Rolle von *M. catarrhalis* für die Pathogenese der COPD *in vivo* ist insgesamt nur wenig untersucht. Hauptsächliche Ursache dafür ist die strikte Humanspezifität

des Erregers, was zur Folge hat, dass nach einer Inokulation von *M. catarrhalis* im Mausmodell diese Erreger schon nach wenigen Stunden nicht mehr im Respirationstrakt nachweisbar ist [100-103]. Obwohl viele verschiedene Strategien getestet worden sind, trotz dieses Umstandes ein Tiermodell zu etablieren, konnte bisher keine Verlängerung der Erregerpersistenz in den Atemwegen der Versuchstiere erzielt werden. Daher ist es weiterhin von grosser Wichtigkeit zu versuchen, ein nutzbares *in vivo* Mausmodell zu etablieren, das es ermöglicht, die systemischen Konsequenzen einer persistierenden *Moraxella*-Infektion des Respirationstraktes zu untersuchen. Es ist denkbar, dass in transgenen, humanes CEACAM1 exprimierenden Mäusen, eine persistierende Infektion mit *M. catarrhalis* induziert werden könnte und mit Hilfe dieses Modells die damit verbundenen immunologischen Konsequenzen weiteren *in vivo* Untersuchungen zugänglich wären. Mit einem solchen Projektansatz werden wir in Kürze beginnen.

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen, dass eine Infektion mit *M. catarrhalis* weitreichende Wechselwirkungen zwischen dem Erreger und dem Epithel zur Folge hat. Es ist naheliegend, dass *M. catarrhalis* eine wichtige Rolle in der Pathogenese der COPD spielt. Daher sollte diesem Keim im Rahmen der COPD-Diagnostik und auch für die weitere Klärung anderer noch offener Fragestellungen eine besondere Beachtung geschenkt werden.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Lopez AD and Mathers CD. Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2006; 100: 481-499.
2. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease: A growing but neglected global epidemic. *Plos Medicine* 2007; 4: 779-780.
3. Friedman PJ. Imaging Studies in Emphysema. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 494-500.
4. Sethi S and Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14: 336-+.
5. Vogelmeier C. Chronic obstructive pulmonary disease. *Internist* 2003; 44: S16-+.
6. Cabello H, Torres A, Celis R, ElEbiary M, delaBellacasa JP, 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* 1997; 10: 1137-1144.
7. Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, and Stockley RA. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *American Journal of Medicine* 2000; 109: 288-295.
8. Stockley RA, Hill AT, Hill SL, and Campbell EJ. Bronchial inflammation - Its relationship to colonizing microbial load and alpha(1)-antitrypsin deficiency. *Chest* 2000; 117: 291S-293S.
9. Patel IS, Seemungal TAR, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, and Wedzicha JA. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* 2002; 57: 759-764.
10. Murphy TF, Sethi S, and Niederman MS. The role of bacteria in exacerbations of COPD - a constructive view. *Chest* 2000; 118: 204-209.
11. Sethi S, Muscarella K, Evans N, Klingman KL, Grant BJB, and Murphy TF. Bacterial colonization enhances airway inflammation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: A820.
12. Barnes PJ and Stockley RA. COPD: current therapeutic interventions and future approaches. *Eur Respir J* 2005; 25: 1084-1106.
13. Vogelmeier C, Koczulla R, Fehrenbach H, and Bals R. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Internist* 2006; 47: 885-+.
14. Berk SL. From Micrococcus to Moraxella - the Reemergence of Branhamella-Catarrhalis. *Archives of Internal Medicine* 1990; 150: 2254-2257.
15. Karalus R and Campagnari A. Moraxella catarrhalis: a review of an important human mucosal pathogen. *Microbes and Infection* 2000; 2: 547-559.

16. Enright MC and McKenzie H. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* - Clinical and molecular aspects of a rediscovered pathogen. *Journal of Medical Microbiology* 1997; 46: 360-371.
17. Beeck A. Molekularepidemiologische Charakterisierung der BRO-β-Laktamasen europäischer *Moraxella catarrhalis* Isolate und Analyse der In-vitro-Aktivität verschiedener Antibiotika. Dissertation. <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=2774> 2004;
18. Schmitz FJ, Beeck A, Perdikouli M, Boos M, Mayer S, Scheuring S, Kohrer K, Verhoef J, and Fluit AC. Production of BRO beta-lactamases and resistance to complement in European *Moraxella catarrhalis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 1546-1548.
19. Verduin CM, Hol C, Fleer A, van Dijk H, and van Belkum A. *Moraxella catarrhalis*: from emerging to established pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 2002; 15: 125-+.
20. Peiris V. Detection of Beta-Lactamase Production in *Moraxella-Catarrhalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1992; 30: 399.
21. Peiris V, Bennett C, and Norris S. Use of Api Nh System for Identification of *Moraxella-Catarrhalis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32: 2628.
22. Faden H, Harabuchi Y, and Hong JJ. Epidemiology of *Moraxella-Catarrhalis* in Children During the First 2 Years of Life - Relationship to Otitis-Media. *Journal of Infectious Diseases* 1994; 169: 1312-1317.
23. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, Loland L, Halkjaer LB, Bonnelykke K, Brasholt M, Heltberg A, Vissing NH, Thorsen SV, Stage M, and Pipper CB. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *New England Journal of Medicine* 2007; 357: 1487-1495.
24. Lafontaine ER, Cope LD, Aebi C, Latimer JL, McCracken GH, Jr., and Hansen EJ. The UspA1 Protein and a Second Type of UspA2 Protein Mediate Adherence of *Moraxella catarrhalis* to Human Epithelial Cells In Vitro. *J Bacteriol* 2000; 182: 1364-1373.
25. Almoudi O. Bacterial infection and risk factors in outpatients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: A 2-year prospective study. *Respirology* 2007; 2: 283-287.
26. Murphy TF. The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2006; 19: 225-230.
27. Banerjee D, Khair OA, and Honeybourne D. Impact of sputum bacteria on airway inflammation and health status in clinical stable COPD. *Eur Respir J* 2004; 23: 685-691.
28. Thoene DE and Johnson CE. Pharmacotherapy of Otitis-Media. *Pharmacotherapy* 1991; 11: 212-221.

29. Wald ER, Milmo GJ, Bowen AD, Ledesma Medina J, and Bluestone CD. Acute Maxillary Sinusitis - Reply. *New England Journal of Medicine* 1981; 305: 226-227.
30. McGregor K, Chang BJ, Mee BJ, and Riley TV. *Moraxella catarrhalis*: Clinical significance, antimicrobial susceptibility and BRO beta-lactamases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 1998; 17: 219-234.
31. Murphy TF, Brauer AL, Grant BJ, and Sethi S. *Moraxella catarrhalis* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Burden of Disease and Immune Response. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 200412-1747OC.
32. Felmingham D and Gruneberg RN. A multicentre collaborative study of the antimicrobial susceptibility of community-acquired, lower respiratory tract pathogens 1992-1993: The Alexander Project. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1996; 38: 1-57.
33. Sethi S, Evans N, Grant BJB, and Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *New England Journal of Medicine* 2002; 347: 465-471.
34. Murphy TF, Brauer AL, Aebi C, and Sethi S. Identification of surface antigens of *Moraxella catarrhalis* as targets of human serum antibody responses in chronic obstructive pulmonary disease. *Infect Immun* 2005; 73: 3471-3478.
35. McMichael JC. Vaccines for *Moraxella catarrhalis*. *Vaccine* 2000; 19: S101-S107.
36. Helminen ME, Maciver I, Paris M, Latimer JL, Lumbley SL, Cope LD, McCracken GH, and Hansen EJ. A Mutation Affecting Expression of A Major Outer-Membrane Protein of *Moraxella-Catarrhalis* Alters Serum Resistance and Survival In-Vivo. *Journal of Infectious Diseases* 1993; 168: 1194-1201.
37. Nordstrom T, Blom AM, Tan TT, Forsgren A, and Riesbeck K. Ionic Binding of C3 to the Human Pathogen *Moraxella catarrhalis* Is a Unique Mechanism for Combating Innate Immunity. *J Immunol* 2005; 175: 3628-3636.
38. Verduin CM, Jansze M, Hol C, Mollnes TE, Verhoef J, and Vandijk H. Differences in Complement Activation Between Complement-Resistant and Complement-Sensitive *Moraxella (Branhamella) Catarrhalis* Strains Occur at the Level of Membrane Attack Complex-Formation. *Infect Immun* 1994; 62: 589-595.
39. Zaleski A, Scheffler NK, Densen P, Lee FKN, Campagnari AA, Gibson BW, and Apicella MA. Lipooligosaccharide P-k (Gal alpha 1-4Gal beta 1-4Glc) epitope of *Moraxella catarrhalis* is a factor in resistance to bactericidal activity mediated by normal human serum. *Infect Immun* 2000; 68: 5261-5268.
40. Aebi C, Lafontaine ER, Cope LD, Latimer JL, Lumbley SL, McCracken GH, Jr., and Hansen EJ. Phenotypic effect of isogenic *uspA1* and *uspA2* mutations on *Moraxella catarrhalis* 035E. *Infect Immun* 1998; 66: 3113-3119.
41. Keller R, Gustafson JE, and Keist R. The Macrophage Response to Bacteria - Modulation of Macrophage Functional-Activity by Peptidoglycan from *Moraxella (Branhamella) Catarrhalis*. *Clinical and Experimental Immunology* 1992; 89: 384-389.

42. Hol C, Vandijke EEM, Verduin CM, Verhoef J, and Vandijk H. Experimental-Evidence for Moraxella-Induced Penicillin Neutralization in Pneumococcal Pneumonia. *Journal of Infectious Diseases* 1994; 170: 1613-1616.
43. Lode H. et al. Rationaler Einsatz oraler Antibiotika bei Erwachsenen und Schulkindern (Lebensalter ab 6 Jahre), Empfehlungen einer Expertenkommission der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. *Chemotherapie Journal* 2006; 15: 129-145.
44. Pison U, Max M, Neuendank A, Weissbach S, and Pietschmann S. Host-Defense Capacities of Pulmonary Surfactant - Evidence for Nonsurfactant Functions of the Surfactant System. *European Journal of Clinical Investigation* 1994; 24: 586-599.
45. Mizgerd JP. Mechanisms of disease: Acute lower respiratory tract infection. *New England Journal of Medicine* 2008; 358: 716-727.
46. Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, and Suttorp N. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respiratory Research* 2006; 7:
47. Barnes PJ. Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 515-548.
48. Akira S, Uematsu S, and Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
49. Lee MS and Kim YJ. Signaling Pathways Downstream of Pattern-Recognition Receptors and Their Cross Talk. *Annual Review of Biochemistry* 2007; 76:
50. Barnes PJ. New molecular targets for the treatment of neutrophilic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007; 119: 1055-1062.
51. Krause A, Holtmann H, Holland P, Eickemeier S, Winzen R, Szamel M, Resch K, Saklatvala J, and Kracht M. Stress activated protein kinase Jun N-terminal kinase is required for interleukin-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 1998; 358: R781.
52. Kettner-Buhrow D, Quante T, Bakiri L, Wagner EF, Hoffmann E, and Kracht M. Identification of the AP-1 dimer repertoire that regulates IL-8 transcription. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 2007; 375: 52.
53. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, and Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of Leukocyte Biology* 2002; 72: 847-855.
54. Koch A, Giembycz M, Stirling RG, Lim S, Adcock I, Wassermann K, Erdmann E, and Chung KF. Effect of smoking on MAP kinase-induced modulation of IL-8 in human alveolar macrophages. *Eur Respir J* 2004; 23: 805-812.
55. Barnes PJ. Reduced histone deacetylase in COPD - Clinical implications. *Chest* 2006; 129: 151-155.

56. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, and Barnes PJ. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *New England Journal of Medicine* 2005; 352: 1967-1976.
57. Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, Cosio B, Ito M, Barnes PJ, and Adcock IM. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappa B suppression. *Journal of Experimental Medicine* 2006; 203: 7-13.
58. Beachey EH. Bacterial adherence. Adhesin receptor-mediated attachment of pathogenic bacteria to mucosal surfaces. *Am Rev Respir Dis* 2004; 138: 45-48.
59. Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J, Barron J, Achotegui V, Pijoan JI, and Llorente JL. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999; 13: 343-348.
60. Wizemann TM, Adamou JE, and Langermann S. Adhesins as targets for vaccine development. *Emerging Infectious Diseases* 1999; 5: 395-403.
61. Slevogt H, Tiwari KN, Schmeck B, Hocke A, Opitz B, Suttorp N, and Seybold J. Adhesion of *Moraxella catarrhalis* to human bronchial epithelium characterized by a novel fluorescence-based assay. *Medical Microbiology and Immunology* 2006; 195: 73-83.
62. Slevogt H, Schmeck B, Jonatat C, Zahlten J, Beermann W, van Laak V, Opitz B, Dietel S, N'Guessan PD, Hippenstiel S, Suttorp N, and Seybold J. *Moraxella catarrhalis* induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappa B activation and histone deacetylase activity reduction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2006; 290: L818-L826.
63. Slevogt H, Tiwari K, 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. *Inflammation Research* 2007; 56: S118.
64. Ketterer MR, Shao JQ, Hornick DB, Buscher B, Bandi VK, and Apicella MA. Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: Macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infect Immun* 1999; 67: 4161-4170.
65. Ring A, Weiser JN, and Tuomanen EI. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier - Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* 1998; 102: 347-360.
66. Chaudhuri N, Whyte MKB, and Sabroe I. Reducing the Toll of Inflammatory Lung Disease. *Chest* 2007; 131: 1550-1556.
67. Guillot L, Medjane S, Le Barillec K, Balloy V, Danel C, Chignard M, and Si-Tahar M. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways - Evidence for an

- intracellular compartmentalization of TLR4. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 2712-2718.
68. Soong G, Reddy B, Sokol S, Adamo R, and Prince A. TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *J Clin Invest* 2004; 113: 1482-1489.
69. Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FLM, Capelli A, Adcock IM, and Donner CF. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clinical and Experimental Allergy* 2004; 34: 1156-1167.
70. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, Ioli F, Chung KF, Donner CF, Barnes PJ, and Adcock IM. Increased expression of nuclear factor- κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 2002; 20: 556-563.
71. Di Stefano A, Capelli A, and Donner CF. Role of interleukin-8 in the pathogenesis and treatment of COPD. *Chest* 2004; 126: 676-678.
72. Barnes PJ. Role of HDAC2 in the Pathophysiology of COPD. *Annual Review of Physiology* 2009; 71:
73. Vancheri C, Mastruzzo C, Sortino MA, and Crimi N. The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE2. *Trends in Immunology* 2004; 25: 40-46.
74. Dempsey EC, Cool CD, and Littler CM. Lung disease and PKCs. *Pharmacological Research* 2007; 55: 545-559.
75. Narumiya S, Sugimoto Y, and Ushikubi F. Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiol Rev* 1999; 79: 1193-1226.
76. Matsuoka T and Narumiya S. Prostaglandin receptor signaling in disease. *The scientific world journal* 2007; 7: 1329-1347.
77. N'Guessan PD, Ternmesfeld-Wollbruck 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 and prostaglandin E-2 in lung epithelium. *Eur Respir J* 2007; 30: 443-451.
78. N'Guessan PD, Hippenstiel S, Etouem MO, Zahlten J, Beermann W, Lindner D, Opitz B, Witzenrath M, Rosseau S, Suttorp N, and Schmeck B. *Streptococcus pneumoniae* induced p38 MAPK- and NF- κ B-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: L1131-L1138.
79. N'Guessan PD, Etouem MO, Schmeck B, Hocke AC, Scharf S, Vardarova K, Opitz B, Flieger A, Suttorp N, and Hippenstiel S. *Legionella pneumophila*-induced PKC α -, MAPK-, and NF- κ B-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: L267-L277.
80. Xu F, Xu ZH, Zhang R, Wu ZQ, Lim JH, Koga T, Li JD, and Shen HH. Nontypeable *Haemophilus influenzae* induces COX-2 and PGE2 expression in

lung epithelial cells via activation of p38 MAPK and NF-kappa B. *Respiratory Research* 2008; 9:

81. Yang C and Kazanietz MG. Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends in Pharmacological Sciences* 2003; 24: 602-608.
82. Mackay HJ and Twelves CJ. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 554-562.
83. Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, and Messing RO. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L429-L438.
84. Slevogt H, Maqami L, Vardarowa K, Beermann W, Hocke AC, Eitel J, Schmeck B, Weimann A, Opitz B, Hippenstiel S, Suttorp N, and N'Guessan PD. Differential regulation of *Moraxella catarrhalis*-induced interleukin-8 response by protein kinase C isoforms. *Eur Respir J* 2008; 31: 725-735.
85. Hill DJ, Toleman MA, Evans DJ, Villullas S, van Alphen L, and Virji M. The variable P5 proteins of typeable and non-typeable *Haemophilus influenzae* target human CEACAM1. *Mol Microbiol* 2001; 39: 850-862.
86. Hill DJ and Virji M. A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1. *Mol Microbiol* 2003; 48: 117-129.
87. Hill DJ, Edwards AM, Rowe HA, and Virji M. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM)-binding recombinant polypeptide confers protection against infection by respiratory and urogenital pathogens. *Mol Microbiol* 2005; 55: 1515-1527.
88. Christof RH. Cell adhesion receptors - signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. *Medical Microbiology and Immunology* 2002; 191: 55-62.
89. Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackman N, Godowski PJ, Ulevitch RJ, and Knaus UG. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nature Immunology* 2000; 1: 533-540.
90. Slevogt H, Zabel S, Opitz B, Hocke A, Eitel J, N'Guessan PD, Lucka L, Riesbeck K, Zimmermann W, Zweigner J, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N, and Singer BB. CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat Immunol* 2008; 9: 1270-1278.
91. Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Jr., Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, and Flavell RA. Caspases 3 and 7: Key Mediators of Mitochondrial Events of Apoptosis. *Science* 2006; 311: 847-851.
92. Spurzem JR and Rennard SI. Pathogenesis of COPD. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 2005; 26: 142-153.
93. Sharafkhaneh A, Hanania NA, and Kim V. Pathogenesis of Emphysema: From the Bench to the Bedside. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 475-477.

94. Tuder RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, Voelkel NF, and Flores SC. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 88-97.
95. Tuder RM, Petrache I, Elias JA, Voelkel NF, and Henson PM. Apoptosis and emphysema - The missing link. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 551-554.
96. Tuder RM, McGrath S, and Neptune E. The pathobiological mechanisms of emphysema models: What do they have in common? *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2003; 16: 67-78.
97. N'Guessan PD, Schmeck B, Ayim A, Hocke AC, Brell B, Hammerschmidt S, Rosseau S, Suttorp N, and Hippenstiel S. Streptococcus pneumoniae R6x induced p38 MAPK and JNK-mediated Caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis* 2005; 94: 295-303.
98. Schmeck B, Gross R, N'Guessan PD, Hocke AC, Hammerschmidt S, Mitchell TJ, Rosseau S, Suttorp N, and Hippenstiel S. Streptococcus pneumoniae-induced caspase 6-dependent apoptosis in lung epithelium. *Infect Immun* 2004; 72: 4940-4947.
99. N'Guessan PD, Vigelahn M, Bachmann S, Zabel S, Opitz B, Schmeck B, Hippenstiel S, Zweigner J, Riesbeck K, Singer BB, Suttorp N, and Slevogt H. The UspA1 protein of Moraxella catarrhalis induces CEACAM-1-dependent apoptosis in alveolar epithelial cells. *Journal of Infectious Diseases* 2007; 195: 1651-1660.
100. Hansen EJ and Toews GB. Animal-Models for the Study of Noninvasive Haemophilus-Influenzae Disease - Pulmonary Clearance Systems. *Journal of Infectious Diseases* 1992; 165: S185-S187.
101. Szelenyi I and Marx D. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Arzneimittel-Forschung-Drug Research* 2001; 51: 1004-1014.
102. Kadioglu A, Taylor S, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, and Andrew PW. Upper and lower respiratory tract infection by Streptococcus pneumoniae is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect Immun* 2002; 70: 2886-2890.
103. Stark JM, McDowell SA, Koenigsnecht V, Prows DR, Leikauf JE, Le Vine AM, and Leikauf GD. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus infection in inbred mice. *Journal of Medical Virology* 2002; 67: 92-100.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Norbert Suttorp und Herrn Dr. Joachim Seybold meinen Dank aussprechen, für die Bereitstellung des kompetenten wissenschaftlichen Umfeldes und meines Themenschwerpunktes.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Roland Wauer, der mich nachhaltig in meinem Bestreben bestärkt hat, mich als Wissenschaftlerin zu etablieren. Danken möchte ich auch Frau Professor Gabriele Kaczmarczyk, die mich ermutigt hat, den Schritt in die Wissenschaft zu wagen und Frau Priv.-Doz. Dr. Ingrid Rundshagen, die mich als meine Mentorin im Rahmen des Mentoring-Programms der Charité auf diesem Weg unterstützt hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Gremien der Nachwuchsförderung und der Frauenförderung der Charité für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit - insbesondere durch das Rahel-Hirsch Stipendium -, mit deren Hilfe mir insbesondere die zeitliche, aber auch die finanzielle Unterstützung gegeben wurde, ohne die ich die vorliegenden Arbeiten und meine Habilitation nicht hätte durchführen können.

Ganz herzlich danke ich meinem Kollegen Herrn Dr. Bernhard Singer und meiner Kollegin Frau Dr. Janine Zweigner für die sehr produktive, lehrreiche und vertrauensvolle Zusammenarbeit und Herr Dr. Philippe Dje N'Guessan und Herrn Dr. Bastian Opitz für die gute Kooperation.

Meinen Doktoranden und Doktorandinnen, Frau Dr. Carola Jonatat, Herrn Krishna Tiwari, Frau Solveig Zabel, Frau Lily Maqami und Herrn Manuel Vigelan danke ich für ihr überdurchschnittliches und kontinuierliches Engagement.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Kerstin Möhr und Frau Jacqueline Hellwig gilt mein besonderer Dank für ihre unermüdliche und kompetente Unterstützung meiner Arbeit.

Mein größter Dank gebührt meinem Mann Herrn Dr. Turhan Keles, für die umfangreiche und Unterstützung und die teilweise Mit-Finanzierung meiner Arbeit, für sein Verständnis und für seinen unerschütterlichen Beistand, den er mir in jeder Lebenslage auf dem Weg zur Habilitation gegeben hat.

Auch unseren Kindern Amelya und Aeneas gilt mein Dank, nicht nur dafür, dass sie meinen Mut durch ihre Lebensfreude immer wieder aufgefrischt haben, sondern auch dafür, dass meine Forschungsarbeiten ohne sie in nicht möglich gewesen wäre.

Erklärung

§4Abs.3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst wurde, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung klar ist.

Berlin, den 05.12.2008

Hortense Slevogt