

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

und der

Charité – Universitätsmedizin Berlin
Institut für Mikrobiologie und Hygiene
Campus Benjamin Franklin

**Die *M. catarrhalis* – induzierte Verminderung viraler Rezeptoren
und deren Bedeutung für die antivirale Immunantwort in
pulmonalem Epithel**

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

vorgelegt von
Sabrina Zahradnik
Tierärztin
aus Ludwigslust

Berlin 2013
Journal-Nr.: 3665

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hortense Slevogt
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Benedikt Kaufer

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Moraxella catarrhalis; chronic obstructive pulmonary disease; immunity, viral replication; respiratory diseases; picornaviridae; bacterial diseases; pneumonia; horse diseases; Streptococcus; Haemophilus influenzae; bronchitis; epithelium; toll-like receptor 3 (MeSH); receptors, pattern recognition (MeSH); tumor suppressor protein p53 (MeSH); Rhinovirus (MeSH)

Tag der Promotion: 29.01.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-438-4

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

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Zielsetzung.....	5
1.2	Fragestellung	5
1.3	Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD).....	6
1.3.1	Definition und Klinik	6
1.3.2	Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung	6
1.3.3	Exazerbationen.....	7
1.3.4	Bedeutung von Bakterien und Viren für die Pathogenese der COPD....	7
1.4	<i>Moraxella catarrhalis</i>	8
1.4.1	Geschichte und Taxonomie	8
1.4.2	Infektionen.....	9
1.4.3	Virulenzfaktoren.....	10
1.5	Das angeborene Immunsystem.....	12
1.5.1	Die angeborene Immunabwehr der Atemwege	12
1.5.2	Zytokine, Chemokine, IL-8	13
1.5.3	Interferone	14
1.5.4	Rezeptoren der angeborenen Immunität (PRRs).....	15
1.5.4.1	<i>Toll-like</i> Rezeptoren (TLRs)	16
1.5.4.1.1	TLR3	17
1.5.4.1.2	TLR2	18
1.5.4.2	RIG-I-like Helikasen.....	19
1.5.4.3	NOD-Proteine	20
1.6	ICAM-1.....	20
1.7	Das Tumorsuppressor p53 Protein	21
1.8	EGFR.....	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Zelllinien	22
2.1.1.1	Primäre Bronchialepithelzellen.....	22
2.1.1.2	Humane Bronchial-Epithelzelllinie (Beas-2B).....	22
2.1.2	Zellkultur.....	23
2.1.3	Bakterien	25
2.1.3.1	<i>Moraxella catarrhalis</i>	25
2.1.4	Bakterienkultur.....	25

2.1.5	Molekularbiologische Methoden.....	26
2.1.5.1	<i>Real-Time</i> -quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)	26
2.1.5.2	Reverse Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	28
2.1.5.3	Durchflusszytometrie (FACS).....	30
2.1.5.4	Transiente Transfektion von Beas-2B-Zellen	31
2.1.5.5	IL-8 ELISA	31
2.1.5.6	Western Blot.....	32
2.1.5.7	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	36
2.1.6	Stimulantien und Inhibitoren	40
2.1.7	Verbrauchsmaterial.....	41
2.1.8	Geräte	43
2.1.9	Analysesoftware	45
2.2	Methoden	45
2.2.1	Zellbiologische Methoden	45
2.2.1.1	Kultivierung von Primären Bronchialepithelzellen.....	46
2.2.1.2	Kultivierung von Beas-2B-Zellen.....	47
2.2.1.3	Kryokonservierung von Beas-2B-Zellen.....	47
2.2.1.4	Auftauen von Beas-2B-Zellen	47
2.2.1.5	Bestimmung der Zellzahl	48
2.2.2	Mikrobiologische Methoden	48
2.2.2.1	Bakterienkultur.....	48
2.2.2.2	Anlegen eines <i>Moraxella catarrhalis</i> – Glycerolstocks zur Kurzzeitlagerung.....	49
2.2.2.3	Anzucht von <i>Moraxella catarrhalis</i> zur Stimulation.....	49
2.2.2.4	Inaktivierung von <i>Moraxella catarrhalis</i> zur Stimulation.....	50
2.2.2.5	Stimulation der Zellen mit <i>Moraxella catarrhalis</i>	50
2.2.2.6	Kontrollen und Inhibitoren	51
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	51
2.2.3.1	<i>Real-Time</i> -quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR).....	51
2.2.3.2	Reverse Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	54
2.2.3.3	Durchflusszytometrie (FACS).....	55
2.2.3.4	Transiente Transfektion von Beas-2B-Zellen	57
2.2.3.5	IL-8 ELISA	57
2.2.3.6	Western Blot.....	59
2.2.3.7	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	60
2.2.4	Statistik.....	61

3	Ergebnisse.....	62
3.1	<i>Moraxella catarrhalis</i> induziert eine Verminderung der TLR3-Expression....	62
3.1.1	TLR3-Regulation in Primären Bronchialepithelzellen	62
3.1.2	TLR3-Regulation in Beas-2B-Zellen.....	63
3.2	Die Verminderung der TLR3-Expression ist nicht Folge von Zytotoxizität	64
3.3	Vergleich der <i>M. catarrhalis</i> Stämme O35E und BBH18.....	65
3.4	Einfluss spezifischer Pathogenitätsfaktoren auf die TLR3-Expression.....	66
3.4.1	Einfluss der Viabilität der Moraxellen	66
3.4.2	Vergleich bedeutender Virulenzfaktoren (OMPS, LOS).....	67
3.5	Mechanismus der Verminderung der TLR3-Expression.....	68
3.5.1	Interleukin-1 β , EGFR, TLRs	68
3.5.2	Inhibition wichtiger Rezeptoren und Schlüsselenzyme.....	70
3.5.3	Moraxellen regulieren die TLR3-Expression über p53	71
3.5.3.1	p53 am TLR3-Promoter	73
3.6	Einfluss der <i>M. catarrhalis</i> – induzierten Verminderung der p53-Expression auf Zellproliferation und Apoptose	74
3.7	<i>M. catarrhalis</i> reguliert weitere Rezeptoren und Adaptoren.....	75
3.7.1	RIG-I, MDA-5, TRIF	75
3.7.2	ICAM-1, TLR2.....	77
3.8	Funktionelle Bedeutung der <i>M. catarrhalis</i> - induzierten Verminderung der TLR3-Expression.....	78
3.8.1	Poly(I:C) induziert dosis- und zeitabhängig IL-8 und IFN β	78
3.8.2	Die Vorinkubation mit <i>M. catarrhalis</i> führt zu einer verminderten Poly(I:C) induzierten NF- κ B Immunantwort.....	80
3.8.3	Die Vorinkubation mit <i>M. catarrhalis</i> führt zu einer verminderten Poly(I:C) induzierten antiviralen Immunantwort.....	81
3.8.3.1	Bestimmung von IFN β	81
3.8.3.2	Bestimmung von IFN λ	82
3.8.4	Gen- <i>Silencing</i> von p53 vermindert die Poly(I:C) induzierte IFN β - Produktion	83
3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	84
4	Diskussion.....	87
4.1	Diskussion der Ergebnisse	87
4.1.1	COPD und die Rolle der PRRs	87
4.1.2	<i>M. catarrhalis</i> und TLR3 auf pulmonalem Epithel.....	88
4.1.3	<i>M. catarrhalis</i> und p53 auf pulmonalem Epithel	90

4.2	Der Einfluss von <i>M. catarrhalis</i> auf die TLR3-getriggerte Immunantwort	91
4.3	Die Rolle von p53 in der TLR3-getriggerten Immunantwort	92
4.4	Bedeutung der p53-Expressionsenkung für <i>M. catarrhalis</i>	93
4.5	Bedeutung der verminderten p53-Expression für Virusinfektionen.....	94
4.6	Bedeutung für die Pathogenese und Progression der COPD	95
4.7	Einfluss von <i>M. catarrhalis</i> auf weitere viruserkennende PRR	96
4.8	Veterinärmedizinischer Bezug	97
4.9	Ausblick.....	99
4.10	Zusammenfassung	100
4.11	Summary	101
5	Verzeichnisse	103
5.1	Abbildungsverzeichnis	103
5.2	Tabellenverzeichnis	104
5.3	Abkürzungsverzeichnis	105
5.4	Literaturverzeichnis	109
6	Anhang	121
6.1	Danksagung	121
6.2	Selbständigkeitserklärung	121

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung

Ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität ist die Hochregulation bestimmter *pattern recognition receptors* (PRRs) während einer Infektion. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Infektion mit *Haemophilus influenzae* in respiratorischem Epithel zu einer gesteigerten Expression von TLR3 führt (Sajjan et al. 2006). Neben *H. influenzae* ist *Moraxella catarrhalis* der zweithäufigste Erreger der bakteriell bedingten Exazerbationen der COPD (Murphy et al. 2005). Auch Virusinfektionen sind wichtige Trigger akuter Exazerbationen. Dabei werden Rhinoviren am häufigsten isoliert. Über Mechanismen, wie Bakterien und Viren bei gleichzeitigen oder nacheinander folgenden Infektionen mit den Rezeptoren des angeborenen Immunsystems interagieren, ist nur wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Auswirkungen eine Infektion mit *M. catarrhalis* auf die Expression Virus-erkennender PRRs, insbesondere von TLR3, in respiratorischen Epithelzellen hat.

1.2 Fragestellung

In dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Ist *M. catarrhalis* in der Lage in humanem respiratorischem Epithel die Expression Virus-erkennender PRRs, insbesondere TLR3, zu regulieren?
2. Gibt es bei der *M. catarrhalis* bedingten hoch signifikanten Verminderung der TLR3-Expression eine Beteiligung Moraxella-spezifischer Virulenzfaktoren und welche Mechanismen und Signaltransduktionswege liegen der TLR3-Expressionssenkung zugrunde?
3. Welche Rolle spielt die *M. catarrhalis* – induzierte Verminderung der TLR3-Expression für die TLR3-getriggerte Immunantwort?

1.3 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

1.3.1 Definition und Klinik

Die Volkskrankheit COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) ist eine multifaktoriell bedingte chronisch progressive Erkrankung der Lunge. Sie ist gekennzeichnet durch eine chronische Bronchitis und eine anhaltende Entzündung der Bronchiolen und des Lungenparenchyms. Diese geht einher mit einer chronischen nicht-reversiblen Obstruktion der Atemwege (Sethi et al. 2006, Murphy et al. 2000).

Die COPD wird durch die globale Initiative für COPD (GOLD) in vier Stadien eingeteilt, die anzeigen, wie weit die Krankheit bei den Betroffenen fortgeschritten ist. Die COPD kann in vier Stadien eingeteilt werden. Stadium 1 ist gekennzeichnet durch eine geringe Einschränkung des Atemflusses, intermittierend auftretenden Husten und vermehrte Sputumproduktion. Dieses Stadium verläuft meist unbemerkt. Mit zunehmender Einschränkung des Atemflusses geht die COPD in Stadium 2 über, in dem die Patienten typischerweise erstmals einen Arzt aufsuchen. Die schwere Form der COPD mit fortschreitender Atemflussbehinderung, intermittierenden Exazerbationen (sh. 1.3.3) und Einschränkung der Lebensqualität kennzeichnet Stadium 3. Mit Verschlechterung der Symptomatik und unter Umständen lebensbedrohlichen Exazerbationen geht die Erkrankung in Stadium 4 über (GOLD 2013).

1.3.2 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung

Weltweit gehört die COPD nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebsleiden zu den häufigsten Todesursachen - mit steigender Tendenz, was die sozioökonomische Bedeutung dieser Erkrankung unterstreicht (Statistisches Bundesamt 2012). Nach Angaben der Deutschen Lungenstiftung leiden in Deutschland etwa 10–15 % der Bevölkerung an COPD (Deutsche Lungenstiftung eV 2012) und mehr als 3 Millionen Menschen erlagen im Jahr 2005 dieser Krankheit (WHO 2011). In den letzten Jahren hat die Erkrankungshäufigkeit immer stärker zugenommen. Als Ursachen für diesen Anstieg werden die mit dem demographischen Wandel verbundene steigende Lebenserwartung, jedoch auch die weltweite Zunahme des Zigarettenrauchens angesehen (GOLD 2011). Ohne Zweifel ist das Rauchen der wesentlichste Risikofaktor (WHO 2011). Die Wirkung von Zigarettenrauch auf das Bronchialepithel ist sehr komplex. Er induziert eine Mukus-Dysfunktion und beeinflusst die Struktur und

Funktion der zilienträgenden Zellen des Bronchialepithels. Dies führt zu einer erhöhten Schleimproduktion und prädisponiert für Atemwegsinfektionen (Fahy und Dickey 2010, Tudor und Petrache 2012). Schätzungen der Deutschen Lungenstiftung zufolge haben rund 80 % der COPD-Patienten einmal geraucht oder rauchen immer noch. Daneben können auch Luftverschmutzung sowie Staub und Chemikalien am Arbeitsplatz zu einer COPD führen. Allerdings spielen diese Expositionen eine untergeordnete Rolle (Rabe et al. 2007).

1.3.3 Exazerbationen

Häufig erleiden die Patienten wiederkehrende Episoden mit Verschlechterung der respiratorischen Symptome – sogenannte akute Exazerbationen. Eine COPD-Exazerbation ist definiert als eine Episode im Krankheitsverlauf, die durch eine Verschlechterung der klinischen Symptome (Husten, Sputum, Dyspnoe) gekennzeichnet ist und eine Veränderung im Patienten-Management erforderlich macht (Celli et al. 2006). Diese Exazerbationen verstärken die vorhandene Entzündung der Atemwege und führen so zur Progression der Erkrankung mit Zunahme der Morbidität und Mortalität (Sethi et al. 2008). Zu etwa 90% werden Exazerbationen mit bakteriellen und / oder viralen Infektionen assoziiert (Sajjan et al. 2006, Teng et al. 2010).

1.3.4 Die Bedeutung von Bakterien und Viren für die Pathogenese der COPD

Etwa 40 - 60 Prozent akuter Exazerbationen beruhen auf bakteriellen Infektionen hauptsächlich mit *H. influenzae*, *M. catarrhalis* und *Streptococcus pneumoniae*. Bei Patienten mit reduzierter Lungenfunktion treten auch Enterobakter- und Pseudomonadenspezies auf (Mizgerd 2008). Beim Lungengesunden sind die unteren Atemwege weitgehend keimfrei, welches durch lokale Barriere- und Abwehrsysteme der Bronchialschleimhaut bedingt wird. Auffällig ist, dass sich bei der Mehrheit der Patienten mit COPD eine Kolonisation der unteren Atemwege mit den oben genannten Erregern nachweisen lässt, deren Ausmaß in direktem Zusammenhang mit einer deutlich verstärkten Entzündung des Respirationstraktes steht (Sethi et al. 2006). Es wird angenommen, dass die kolonisierenden Bakterien schädigende Einflüsse auf das Bronchialepithel haben, wodurch die Immunantwort des Bronchialepithels vermindert

und damit wiederum die bakterielle Kolonisation gefördert wird (Zabel et al. 2009). Diese ständige Besiedelung des Respirationstraktes mit den genannten respiratorischen Pathogenen und der damit verbundenen Verstärkung der chronischen inflammatorischen Prozesse hat eine wesentliche Bedeutung für das Fortschreiten der COPD und führt dazu, dass betroffene Patienten zu deutlich häufigeren Exazerbationen neigen (Sethi et al. 2006, Murphy et al. 2000).

In 27-56% der Fälle sind COPD-Exazerbationen mit viralen Infektionen assoziiert. Dabei werden Rhinoviren am häufigsten isoliert. Sie gelten daher als wichtiger Trigger für akute Exazerbationen. Es handelt sich um ss-RNA-Viren, die vor allem bei Erkältungen eine wichtige Rolle spielen (Sajjan et al. 2006).

Zurzeit existieren nur wenige Informationen über potentielle Interaktionen von Bakterien und Viren auf bronchialem Epithel. Bekannt ist, dass Viren durch Veränderung der Rezeptorexpression auf respiratorischen Epithelzellen eine vermehrte Adhäsion und Invasion von Bakterien bewirken können. Wiederum kann eine vorausgehende bakterielle Infektion die Empfänglichkeit für eine virale Sekundärinfektion erhöhen (Avadhanula et al. 2006, Sajjan et al. 2006). Diese Wechselwirkungen machen deutlich, dass der Erforschung der Interaktion von Bakterien und Viren auf respiratorischem Epithel für das Verständnis des Fortschreitens der COPD eine wichtige Rolle zukommt.

1.4 *Moraxella catarrhalis*

1.4.1 Geschichte und Taxonomie

Es handelt sich um ein ausschließlich humanpathogenes unbekapseltes, Gram-negatives diplo-kokkoides Stäbchen (Abb. 1). Die erste Beschreibung dieses Erregers erfolgte im Jahr 1896 durch Frosch und Kolle, zu jener Zeit noch unter dem Namen *Micrococcus catarrhalis*. 1963 zeigte Berger, dass die ursprüngliche Gattung *Micrococcus catarrhalis* zwei verschiedene Spezies enthielt: *Neisseria cinerea* und *Neisseria catarrhalis*. In den 70er Jahren wurden DNA-Studien durchgeführt, die zeigten, dass auf genetischer Ebene nicht genügend Gemeinsamkeiten mit den „wahren“ Neisserien bestanden, so dass das Bakterium mit dem neuen Namen *Branhamella catarrhalis* eine eigene Gattungsbezeichnung bekam. Nur kurze Zeit später im Jahr 1984 erfolgte aufgrund weiterer molekularbiologischer Studien eine

neue Zuordnung zur Gattung *Moraxella*. Seither führt der Erreger den Namen *Moraxella catarrhalis* (Verduin et al. 2002).

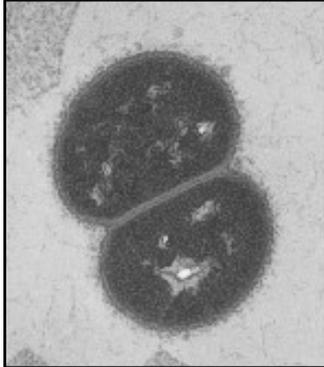


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *M. catarrhalis*:

Die Abbildung zeigt den typischen Diplokokkus. Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Dipl.-Biol. Annina Heinrich zur Verfügung gestellt.

1.4.2 Infektionen

Der obere Respirationstrakt gesunder Individuen ist zum größten Teil mit Bakterien besiedelt. Diese Mikroorganismen stellen die physiologische mikrobielle Flora der oberen Atemwege dar und verursachen sehr selten Erkrankungen. Die Nase ist hauptsächlich mit *Staphylococcus epidermidis* und *Corynebacteria* Spezies kolonisiert. Nicht-hämolysierende und alpha-hämolysierende Streptokokken und *Neisseria* Spezies besiedeln in erster Linie den Nasopharynx (Beasley et al. 2012). Die Prävalenz von Bakterien im unteren Respirationstrakt zu ermitteln ist problematischer. Die Schwierigkeit liegt zum einen darin, Proben aus dem unteren Respirationstrakt zu erhalten, die nicht durch die oberen Atemwege kontaminiert wurden. Zum anderen können viele Bakterienspezies von Schleimhautoberflächen nicht mit gegenwärtig erhältlichen Standard-Kulturtechniken kultiviert werden. Dass die Lunge nicht vollkommen steril ist, wird durch den Anschluss an die obere Atemwege, die enge Nachbarschaft zum Magen-Darm-Trakt und durch die kontinuierliche Exposition zur Umwelt durch Atmung bedingt. Der Unterschied liegt in einer Präsenz von potentiell pathogenen Mikroorganismen im unteren Respirationstrakt, die jedoch keine Beschwerden verursachen und einer pathologischen Kolonisierung der unteren Atemwege mit Bakterien, die eine Entzündung hervorrufen und eine Rolle für die COPD-Pathogenese spielen (Pragman et al. 2012).

Verschiedene Studien haben sich mit dieser Thematik auseinandergesetzt und kamen zu dem Ergebnis, dass zwischen 3 und 10% der gesunden Individuen potentiell pathogene Mikroorganismen im unteren Respirationstrakt aufweisen (Beasley et al.

2012). Im Gegensatz dazu werden bei bis zu 45% der COPD-Patienten Bakterien aus den unteren Atemwegen kultiviert, wobei in Studien, die Sputum zur Detektion bakterieller Infektionen nutzten, generell höhere Keimzahlen isoliert wurden als in Bronchoskopie-Studien. Diese Diskrepanz dürfte durch eine höhere Kontaminationsrate des Sputums mit Mikroorganismen des oberen Respirationstraktes zu erklären sein. Mit beiden Methoden übereinstimmend werden bei COPD-Patienten am häufigsten *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis* isoliert (Beasley et al. 2012, Pragman et al. 2012).

M. catarrhalis besitzt also die Fähigkeit, den unteren Respirationstrakt des Menschen zu besiedeln. Der Grad dieser pathologischen Kolonisierung im Menschen hängt von vielen Faktoren wie Alter, Gesundheitszustand, sozioökonomische Bedingungen und geographische Lage ab (Murphy et al. 2005). Über weite Teile des 20. Jahrhunderts wurde *M. catarrhalis* als harmloser Kommensale des oberen Respirationstraktes verkannt. Die zentrale Bedeutung dieses Erregers als wahres Pathogen im oberen und unteren Respirationstrakt konnte in den letzten Jahren mehr und mehr aufgedeckt werden (de Vries et al. 2009). Heute weiß man, dass allein *M. catarrhalis* für etwa 10-15% aller COPD-Exazerbationen verantwortlich ist. Eine Kolonisierung des unteren Respirationstraktes mit diesem Erreger findet sich bei bis zu 35% aller COPD-Patienten (Murphy et al. 2005). Im Gegensatz dazu kann *M. catarrhalis* bei gesunden Erwachsenen bei bis zu 5% nachgewiesen werden. Die Kolonisierungsrate bei Kindern ist weitaus höher. Bei mehr als zwei Drittel aller Kinder ist eine Kolonisierung mit *M. catarrhalis* im ersten Lebensjahr nachweisbar und mehr als die Hälfte dieser Kinder erkrankt im ersten Lebensjahr mindestens einmal an einer Otitis media (Murphy et al. 2005).

1.4.3 Virulenzfaktoren

Pathogenetische Mechanismen eines Erregers werden durch Virulenzfaktoren vermittelt. Um einen Keim wirkungsvoll zu therapieren, liegt besonderes Interesse in der Klärung des Wechselspiels zwischen bakteriellen Virulenzfaktoren und der Immunantwort des Wirtes.

M. catarrhalis kann an Schleimhautoberflächen des Mittelohres (Otitis media) oder des unteren Respirationstraktes (COPD) adhären. Darüber hinaus ist *M. catarrhalis* nach einer erfolgreichen Adhäsion in der Lage, humane Epithelzellen zu invadieren und

intrazellulär zu überleben, was durch die Fähigkeit zur Ausbildung eines Biofilms unterstützt wird (de Vries et al. 2009).

Ein erster Kontakt zwischen *M. catarrhalis* und Wirtsmukosa wird durch Pili hergestellt. Die darauf folgende engere Anlagerung vermitteln *outer membrane* Proteine (OMPs). Zu diesen OMPs gehören unter anderem die *ubiquitous surface proteins* UspA1 (88kDa), UspA2 (62-kDa), UspA2H (Hybrid aus UspA1 und UspA2, 92-kDa) und das Hag-Protein (200-kDa) (Lafontaine et al. 2000). Als Lollipop-ähnliche Strukturen ragen die strukturell verwandten Proteine UspA1, UspA2 und UspA2H aus der bakteriellen Zellwand hervor. UspA2 wird neben Adhäsion auch mit Komplementresistenz assoziiert. Als spezifischer Bindungspartner für UspA1 wurden unter anderem der humane CEACAM1 Rezeptor beschrieben. UspA2 interagiert nicht mit CEACAM, sondern bindet Laminin, Fibronectin und Vitronectin. UspA2H soll ebenfalls in der Lage sein, Fibronectin zu binden (de Vries et al. 2009). Auch das Hag-Protein bildet fibrilläre Projektionen auf der Zelloberfläche von *M. catarrhalis*. Es stellt ein multifunktionales Protein dar, das neben der Adhäsion auch Hämagglutination, Autoagglutination und IgD-Bindung vermittelt (Balder et al. 2009, Pearson et al. 2002).

Als Gram-negatives Bakterium besitzt *M. catarrhalis* eine äußere Membran mit Lipooligosaccharid (LOS). Es besteht aus einem hydrophilen Oligosaccharid (Kernregion) und einem hydrophoben Lipid A. Im Gegensatz zum Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien fehlt dem LOS die charakteristische lange O-Seitenkette (de Vries et al. 2009). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass dieser Oberflächenstruktur neben der Adhäsion eine entscheidende Rolle für die Resistenz gegenüber der Lyse durch Humanserum zukommt (Slevogt et al. 2009, Zaleski et al. 2000). *M. catarrhalis* besitzt drei verschiedene LOS-Serotypen. Die höchste Prävalenz besitzt Serotyp A (72%), gefolgt von Serotyp B (21%) und C (2%) (de Vries et al. 2009).

Das Hauptziel in der COPD-Therapie ist die Vermeidung von Exazerbationen, denn sie sind es, die zu einer rapiden Progression der Erkrankung führen, die Lebensqualität beeinträchtigen und Morbidität und Mortalität steigern. Exazerbationen werden weitgehend mit bakteriellen und / oder viralen Infektionen assoziiert (Beasley et al. 2012). Das pathogene Potential von *M. catarrhalis* hat seit den 90er Jahren durch die rasch zunehmende Resistenzentwicklung (Expression von β -Laktamasen) stark zugenommen. Über 95% der Isolate aus Europa, den USA und Australien sind heute β -Laktamase-positiv. Aufgrund der Beteiligung von Viren bei COPD-Exazerbationen stellt die Entwicklung von anti-viralen Medikamenten neben der Antibiotika-Therapie eine potentiell erfolgreiche Behandlungsmöglichkeit dar. Mit Pleconaril ist ein

Medikament in Erforschung, dessen Wirksamkeit gegen Rhinoviren bereits nachgewiesen wurde. Der klinische Nutzen von Pleconaril wird bereits in der Asthma-Therapie untersucht. Für die COPD-Behandlung liegen bisher keine Untersuchungen vor (Beasley et al. 2012). In Bezug auf Prophylaxe stellt die Entwicklung von Impfstoffen einen weiteren Ansatz dar. Bisher kann mit Impfstoffen jedoch kein vollständiger Infektionsschutz erreicht werden, sodass der weiteren Erforschung der molekularen Mechanismen der Infektion der Atemwege mit *M. catarrhalis* große Bedeutung zukommt (Slevogt et al. 2009).

1.5 Das angeborene Immunsystem

1.5.1 Die angeborene Immunabwehr der Atemwege

Die hocheffektive Abwehr von allgegenwärtigen Pathogenen, mit denen der Mensch durch Atmung ständig in Berührung kommt, erfolgt durch das Immunsystem. Es besteht aus zwei Komponenten: der angeborenen und der erworbenen Immunität. Die angeborene Immunantwort stellt die erste Verteidigung des Wirtsorganismus gegenüber eingedrungenen Erregern dar. Eine wichtige Funktion nimmt dabei die Mukusschicht des Bronchialepithels ein. Sie wird von den sekretorischen Zellen des Bronchialepithels gebildet und besteht zu 97% aus Wasser und zu 3% aus Feststoffen (Muzine, nicht-muzin Proteine, Salze, Fette, Zelldebris). Sowohl eine Erhöhung des Anteils der Feststoffe (Muzin-Hypersekretion) als auch eine Erniedrigung des wässrigen Anteils (dehydratisierter Mukus) beeinträchtigen die mukoziliäre Reinigung erheblich (Fahy und Dickey 2010). Neben diesem Mukus als protektive Substanz auf der Schleimhaut setzen die sekretorischen Zellen auch antimikrobielle Moleküle wie Defensine, Lysozym und IgA, immunmodulierende Moleküle (Sekretoglobine, Zytokine) und weitere protektive Moleküle (*trefoil* Proteine, Heregulin) frei. Durch die Atmung in den Respirationstrakt eingedrungene Mikroorganismen bleiben auf dieser Mukusschicht hängen und werden von den zilientragenden Epithelzellen zurück in Richtung Rachen befördert (Fahy und Dickey 2010). Größere Partikel lösen durch Reizung von Rezeptoren in den Atemwegsschleimhäuten den Hustenreflex aus.

Mittels spezifischer Rezeptoren, sogenannter *pattern recognition receptors* (PRRs) können Zellen des angeborenen Immunsystems (Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) eingedrungene Pathogene bzw. deren pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennen. In der Folge werden diese Pathogene durch

Phagozytose, Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und Aktivierung des Komplementsystems bekämpft (Kumagai und Akira 2010).

In den letzten Jahren ist klar geworden, dass Bronchialepithelzellen nicht nur eine passive Barrierefunktion darstellen, sondern sich aktiv an der Initiierung der Immunantwort beteiligen. Die Immunantwort der Epithelzellen basiert auf der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, was eine Entzündungsreaktion auslöst und zur Rekrutierung von Makrophagen und dendritischen Zellen führt. Über die Stimulation von Lymphozyten wird das erworbene Immunsystem aktiviert. Dabei nutzen die Bronchialepithelzellen wie die Zellen des angeborenen Immunsystems *pattern recognition receptors* zur Erkennung von eingedrungenen Erregern (Bals und Hiemstra 2004). Pathogene wie *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* werden durch die PRRs der Bronchialepithelzellen detektiert. Andere Mikroorganismen wie Pneumokokken interagieren nicht direkt mit den Bronchialepithelzellen. Während einer Pneumokokken-Pneumonie sind es die durch Alveolarmakrophagen und dendritische Zellen generierten Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und Tumor Nekrose Faktor - α (TNF- α), die die Bronchialepithelzellen aktivieren (Mizgerd 2008).

Die Synthese von Surfactant durch Typ-II-Alveolarepithelien trägt zur Initiierung einer Immunantwort bei, da es die Oberflächenspannung in den Alveolen herabsetzt aber auch antimikrobielle Substanzen enthält. Eine weitere Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist es, Bestandteile der Mikroorganismen (Antigene) den Effektoren des erworbenen Immunsystems zu präsentieren. Dieses ist nach einigen Tagen mit seinen B- und T-Lymphozyten zur Abwehr befähigt (Sethi et al. 2008).

1.5.2 Zytokine, Chemokine, IL-8

Zytokine sind extrazelluläre Signalproteine. Sie werden von verschiedenen Zelltypen produziert und haben überlappende Funktionen, d.h. eine bestimmte Aktivität kann durch verschiedene Zytokine vermittelt werden. Um inflammatorische Prozesse wie Aktivierung, Expansion aber auch kontrollierte Deletion von am Immungeschehen beteiligten Zellen zu steuern, ist ein komplexes Zytokin-Netzwerk erforderlich (Wouters et al. 2005). Es werden proinflammatorische Zytokine, T-Zell-gebildete Zytokine, Chemokine, antiinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren unterschieden (Chung et al. 2001).

Das Zytokin Interleukin-1 β (IL-1 β) gilt zusammen mit dem Tumor Nekrose Faktor - α (TNF- α) als eines der wichtigsten und potentesten proinflammatorischen Zytokine. Wird

die IL-1 β -Produktion stimuliert (vor allem durch Endotoxin), kommt es zu einer Entzündungsreaktion mit Fieber, Anstieg der neutrophilen Granulozyten und der Akuten Phase Proteine (Chung et al. 2001).

Bei den Chemokinen handelt es sich um Zytokine, die die Migration von Entzündungszellen an den Infektionsherd, die sogenannte Chemotaxis, vermitteln (Chung et al. 2001). Eine starke chemotaktische Wirkung für neutrophile Granulozyten und der darauf folgenden proinflammatorischen Immunreaktion besitzt Interleukin-8 (IL-8). Es spielt für die Pathogenese der COPD eine bedeutende Rolle. So konnten in verschiedenen Studien erhöhte IL-8 Konzentrationen im Sputum von COPD-Patienten nachgewiesen werden (Vernooy et al. 2002, Jatakanon et al. 1999). Der Gehalt an IL-8 im Sputum soll dabei direkt mit der klinisch erfassbaren Atemflussbehinderung von COPD-Patienten korrelieren und ist somit von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese der COPD (Beeh et al. 2003).

IL-8 wird auch von bronchialen Epithelzellen nach Infektion mit *M. catarrhalis* sezerniert und lässt daher Rückschlüsse auf das zelluläre Reaktionsmuster und das Ausmaß der Zellaktivierung nach Infektion mit *M. catarrhalis* zu (Slevogt et al. 2006). Es wird in dieser Arbeit exemplarisch als Marker der Entzündungsreaktion untersucht.

1.5.3 Interferone

Mehr als 50 Jahre ist es mittlerweile her, dass Interferone als eine Gruppe von Glykoproteinen, die von infizierten Zellen innerhalb weniger Stunden nach einer Virusinfektion gebildet werden und die Virusvermehrung in benachbarten Zellen verhindern können, erstmals beschrieben wurden (Isaacs et al. 1957). Diese antivirale Aktivität wird vor allem auf die Gruppe der Typ I Interferone zurückgeführt. Zu dieser Gruppe gehören die Interferone α , β , ω , ϵ , κ , δ und τ , wobei IFN α (13 humane Subtypen) und IFN β (keine Subtypen) die höchste Expressionsdichte zeigen, am besten charakterisiert und aus immunologischer Sicht hauptsächlich von Interesse sind (Bonjardim et al. 2009). In den meisten Körperzellen werden Typ I Interferone nach Ligation von ds-RNA an zytosolische Rezeptoren gebildet. Zu diesen Rezeptoren gehören in erster Linie TLR3, RIG-I (*retinoic acid inducible gene - 1*) und MDA5 (*melanoma differentiation associated gene - 5*) (Kawai et al. 2010). Allen Typ I Interferonen ist gemein, dass sie an einen ubiquitär expremierten heterodimeren Rezeptor binden, der aus zwei Untereinheiten IFNAR (IFN α/β receptor) -1 und IFNAR-

2 besteht. In der Folge kommt es zur Aktivierung der Transkription IFN-induzierbarer Gene (Trinchieri et al. 2010). IFN β ist darüber hinaus in der Lage, durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-7 und -8 die Expression von Typ I Interferonen zu potenzieren (Marie et al. 1998, Taylor et al. 2007).

Das Interferon γ als einziger Vertreter der Typ II Interferone löst über den aus zwei Untereinheiten (IFNGR1 und 2) bestehenden und ubiquitär exprimierten IFN γ -Rezeptor Signalkaskaden aus. Interferon γ hat eine stark aktivierende Wirkung auf Makrophagen, CD8+-T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen und stimuliert somit zellvermittelte Abwehrmechanismen gegen intrazelluläre Erreger (Bonjardim et al. 2009).

Erst im Jahr 2003 wurde eine weitere Gruppe der Interferone klassifiziert, die Typ III Interferone (Sheppard et al. 2003, Kolenko et al. 2003). Bisher wurden dieser Gruppe drei Proteine, IFN λ 1, IFN λ 2 und IFN λ 3, zugeordnet. Obwohl Typ III Interferone an einen spezifischen Rezeptor binden, der aus den zwei Untereinheiten IL-28AR und IL-10R2 besteht, unterscheidet sich der Signalweg nicht von dem der Typ I Interferone (Ank et al. 2006, Lasfar et al. 2011). Die Produktion von Typ III Interferonen wird nach Aktivierung von TLR3 durch ds-RNA initiiert (Ank et al. 2008).

Um die Funktionalität von TLR3 nach einer Infektion mit *M. catarrhalis* zu untersuchen, wurde die Sekretion von IFN β und IFN λ untersucht.

1.5.4 Rezeptoren der angeborenen Immunität (PRRs)

Das angeborene Immunsystem erkennt Mikroorganismen mit Hilfe von Keimbahn-kodierten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs). Diese Rezeptoren befinden sich auf Zelloberflächen, in intrazellulären Kompartimenten und Organellen sowie als sezernierte Moleküle im Extrazellularraum (Rosenstiel et al. 2007). Sie erkennen mikrobielle Komponenten, die als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) bezeichnet werden. Diese konservierten Strukturen sind für das Überleben der Mikroorganismen essentiell. Eine Veränderung der PAMPs, um der Erkennung durch PRRs zu entgehen, ist für die Erreger daher kaum möglich. Jeder PRR reagiert mit spezifischen PAMPs, aktiviert daraufhin verschiedene Signalwege und damit unterschiedliche Immunantworten (Akira et al. 2006). Bedeutende Vertreter der

Mustererkennungsrezeptoren sind die *Toll-like* Rezeptoren (TLR), die RIG-I-like Helikasen und die NOD-Rezeptoren.

1.5.4.1 *Toll-like* Rezeptoren (TLRs)

Der Rezeptor Toll wurde 1984 in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt und stellt dort ein essentielles Genprodukt für die Entwicklung der embryonalen dorsoventralen Polarisation dar (Anderson et al. 1985). Erst einige Jahre später wurde die Bedeutung der durch Toll kodierten Proteinfamilie für die Immunantwort der Fliege auf Pilzinfektionen gezeigt (Lemaitre et al. 1996). Die Homologie zu Toll gab der Gruppe der *Toll-like* Rezeptoren ihren Namen. Bisher wurden im Menschen zehn verschiedene TLRs (TLR1-10) entdeckt (Akira et al. 2006). TLRs gehören zur Gruppe der Typ-I-Transmembranrezeptoren. Sie besitzen eine extrazelluläre leucinreiche Region (*leucin rich repeat*, LRR) zur Ligandenbindung und eine dem Interleukin-1-Rezeptor homologe zytoplasmatische Domäne (*Toll/IL-1 receptor homology*, TIR), die für die Signaltransduktion essentiell ist (Akira et al. 2006). TLRs werden von vielen verschiedenen Zellpopulationen expremiert. Dazu gehören unter anderem respiratorische Epithelzellen, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, und Lymphozyten (Hopkins et al. 2005). Die TLR 1, 2, 4, 5 und 6 sind hauptsächlich auf der Zelloberfläche lokalisiert, wohingegen TLR 3, 7, 8 und 9 in endosomalen Membranen zu finden sind (Akira et al. 2006).

Die Aktivierung der TLRs erfolgt durch verschiedene mikrobielle Komponenten, wie z.B. bakterielle Zellwandbestandteile (LPS, Lipopeptide), Flagellin und Nukleinsäuren (dsRNA, ssRNA und CpG-DNA). Nach der Detektion von PAMPs dimerisieren TLRs und ändern ihre Konformation, wodurch an die Membran rekrutierte Adapterproteine mit ihrer TIR-Domäne an jene der TLRs binden können. Derzeit sind fünf dieser Adapterproteine bekannt: TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*), MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), TRIF (*Toll / IL-1R homologous region (TIR) domain-containing adapter protein inducing IFN β*) und SARM/TIR-1 (*sterile α and amadillo motifs*). Nicht nur die Vielfalt an Agonisten entscheidet über den weiteren Verlauf der Signaltransduktion, sondern auch diese an der Signalweiterleitung beteiligten Adapter. Für alle TLRs gilt jedoch, dass es über die Aktivierung zellulärer Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren zu einer gezielten Transkription und Sekretion von in der Regel proinflammatorisch wirksamen Zytokinen kommt (O'Neill et al. 2007).

Eine Reihe von TLR-Agonisten wurde in dieser Arbeit eingesetzt um die Frage zu beantworten, ob Moraxellen möglicherweise über andere TLRs zur Verminderung der TLR3-Expression führen.

1.5.4.1.1 TLR3

Von allen viralen PRRs ist TLR3 der auf humanen Zellen am häufigsten ubiquitär exprimierte Rezeptor. Wie bereits erwähnt ist TLR3 intrazellulär an den Endosomen lokalisiert, wird aber auch extrazellulär auf der Zellmembran expremiert. Für die Detektion viraler RNA, die bei viralen Infektionen produziert wird, spielen insbesondere TLR3, RIG-I und MDA-5 eine wichtige Rolle (Matsumoto et al. 2008). Durch diese PRRs werden virale doppelsträngige RNA (ds-RNA) und das synthetische Analogon zu ds-RNA Poly(I:C) (*polyinosinic-polycytidylic acid*) detektiert. Interessanterweise konnte mehrfach gezeigt werden, dass TLR3 neben ds-RNA Viren auch ss-RNA Viren wie Respiratorisches Synzytialvirus (RSV), Enzephalomyokarditisvirus (EMV), West Nile Virus und auch DNA-Viren wie das Humane Cytomegalievirus (HCMV) zu erkennen vermag. Dieses ist durch eine bidirektionale Transkription des viralen Genoms bei der Virusreplikation zu erklären, in dessen Folge es auch zur Produktion von ds-RNA kommt (Bowie et al. 2007, Kawai et al. 2010).

Die TLR3 – Ektodomäne besteht aus 23 LRRs (*leucine rich repeats*) und einer N - und C - terminalen Region. Sie ist pferdehufähnlich geformt, was der Oberflächenvergrößerung und damit einer verbesserten Erkennung von ds-RNA dient. TLR3-Moleküle sind als Dimere arrangiert. Nach Ligandenbindung entsteht über die C-terminale Region ein Rezeptor-Homodimer und es folgt, wie in Abbildung 2 dargestellt, über die für den TLR3-Signalweg essentielle Rekrutierung des Adapterproteins TRIF die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 (*activating protein-1*), IRF-3 (*interferon regulatory factor-3*) und NF- κ B (*nuclear transcription factor- κ B*) (Kawai et al. 2010). Dazu bildet TRIF einen Multiprotein-Signalkomplex bestehend aus TRAF6 (*TNF receptor associated factor*), RIP1 (*receptor-interactin protein1*) mit gebundenem Adaptor TRADD (*TNF receptor associated death domain protein*) und Pellino-1. Dieser Komplex führt zur Aktivierung von TAK1 (*transforming growth factor β -activated kinase 1*). Über TAK1 werden NF- κ B und der MAP-Kinasen-Signalweg (*mitogen activated protein*) aktiviert. Aus Letzterem resultiert die Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1. Durch NF- κ B und AP-1 werden dann unter anderem immunologisch aktive Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-12 induziert (Kawai et al. 2010). Außerdem rekrutiert TRIF

nach TLR3-Ligation die TBK1 (*TANK binding kinase1*), die eine Aktivierung von IRF-3 hervorruft, ein Transkriptionsfaktor, der für die Induktion vor allem antiviraler Gene wichtig ist. Nach Aktivierung dimerisiert IRF-3 und transloziert anschließend in den Zellkern. Dort bewirkt es die Expression des Typ I Interferons IFN β , welches über den IFN-Rezeptor die Expression von Chemokinen wie IP-10 und RANTES induziert (Kawai et al. 2010, Fitzgerald et al. 2003). Eine vergleichbare antivirale Aktivität wird durch die Typ III Interferone vermittelt, die ebenfalls nach TLR3-Stimulation expremiert werden (Ank et al. 2008).

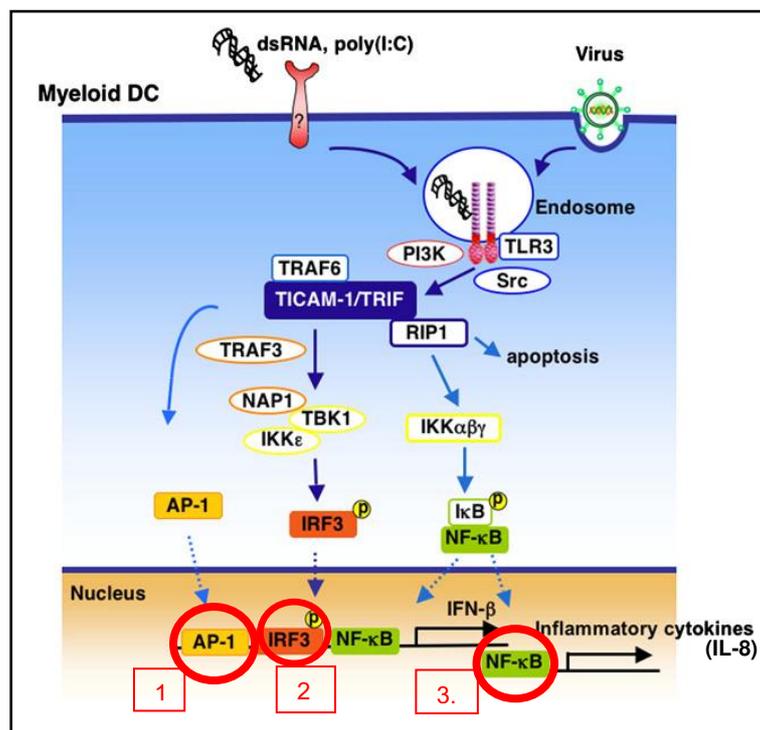


Abb. 2: TLR3-Signalweg: Die Abbildung zeigt, wie über die Rekrutierung des Adapterproteins TRIF die Aktivierung der Transkriptions-faktoren AP-1, IRF-3 und NF- κ B gesteuert wird. Die Darstellung wurde modifiziert nach: Matsumoto et al., 2008.

1.5.4.1.2 TLR2

Die meisten Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs) werden in Form von TLR-Homodimeren erkannt. Lediglich TLR1 und 6 reagieren als Heterodimere mit TLR2. So erkennt das Heterodimer aus TLR2-TLR1 triazetylierte Lipopeptide Gram-negativer Bakterien und Mykoplasmen. Peptidoglykane Gram-positiver Bakterien und diazetylierte mykoplamatische Lipopeptide aktivieren hingegen das Heterodimer TLR2-

TLR6 (Takeuchi et al. 2002, Ozinsky et al. 2000). Nach Bindung eines Liganden an TLR2 kommt es mit Hilfe des Adaptermoleküls MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) zur Induktion zweier Signalwege, dem NF- κ B-Weg und dem MAP-Kinase-Weg. In der Folge kommt es zur Expression verschiedener Gene, die an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind (Kawai et al. 2010). Neben TLR3 sollte auch für die TLR2 - Expression der mögliche Einfluss von *M. catarrhalis* untersucht werden.

1.5.4.2 RIG-I-like Helikasen

Neben den TLRs fungieren die zytoplasmatischen RIG-I-like Helikasen ebenfalls als PRRs. Zu dieser Familie gehören RIG-I (*retinoic acid inducible gene - I*) und MDA5 (*melanoma differentiation associated gene - 5*). Es handelt sich dabei um RNA-Helikasen, die wie TLR3 in der Lage sind ds-RNA-Viren zu erkennen. Neben ds-RNA erkennt RIG-I auch 5'-triphosphorylierte ss-RNA und detektiert damit auch Influenzaviren, Newcastle Disease Virus, Vesikuläre Stomatitis Virus, Sendai Virus und das Japanische Enzephalitisvirus. MDA5 hingegen scheint spezialisiert zu sein auf die Erkennung von Picornaviren wie das Enzephalomyokarditisvirus, Mengo Virus und Theilers Enzephalomyelitis Virus (Bonjardim et al. 2009, Kato et al. 2006, Wang et al. 2009). Die Signaltransduktion wird über CARD (*caspase recruitment domain*) vermittelt und resultiert über die Aktivierung von IRF-3 und NF- κ B in der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, IFN α und IFN β (Bonjardim et al. 2009). Im Gegensatz zu RIG-I und MDA5 scheint Lgp2 als drittes Mitglied der RIG-I-like Helikasen keine Signaltransduktion zu vermitteln. Untersuchungen deuten darauf hin, dass Lgp2 die RIG-I Aktivierung negativ reguliert (Yoneyama et al. 2004, Rothenfusser et al. 2005), wohingegen MDA5 positiv durch Lgp2 beeinflusst zu werden scheint (Venkataraman et al. 2007).

Das Zusammenspiel der drei intrazellulären PRRs TLR3, RIG-I und MDA-5 wurde bereits beschrieben (Slater et al. 2010). TLR3 soll dabei als ein initialer endosomaler Sensor fungieren, der nach Antigenerkennung zu einer Aktivierung der RNA-Helikasen RIG-I und MDA-5 führt. Diese Aktivierung mündet dann in einer Maximierung der Interferon-vermittelten antiviralen Immunabwehr. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in dieser Arbeit auch für die RIG-I - und MDA-5 – Expression ein möglicher Einfluss von *M. catarrhalis* untersucht.

1.5.4.3 NOD-Proteine

Zu den *pattern recognition receptors* (PRRs) gehören auch zytosolische Rezeptoren wie z.B. die NOD1- und NOD2-Proteine (*nucleotide-binding oligomerization domain proteins*). Diese Proteine bestehen aus einem leucinreichen Abschnitt (LRR-Domäne), einer NOD-Komponente und einer CARD-Domäne (NOD1) bzw. zwei CARD-Domänen (NOD2). Während der NOD1-Rezeptor in vielen Gewebetypen zu finden ist, wird der NOD2-Rezeptor hauptsächlich in antigenpräsentierenden Zellen und in Epithelzellen expremiert (Lich et al. 2007). Die NOD-Rezeptoren erkennen Bestandteile des Peptidoglykans. NOD1 identifiziert meso-Diaminopimelinsäure (meso-DAP) enthaltende Peptidoglykanfragmente (Chamaillard et al. 2003). NOD2 detektiert Peptidoglykane mit Hilfe von Muramyldipeptid (MDP) (Girardin et al. 2003). Nach Ligandenbindung erfolgt über verschiedene involvierte Moleküle die Aktivierung von NF- κ B und damit die Initiierung einer proinflammatorischen Immunantwort (Inohara et al. 1999, Ogura et al. 2001).

1.6 ICAM-1

Eine Virusinfektion im Allgemeinen resultiert in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems, wodurch neben den Zytokinen IL-6 und IL-12 vor allem Typ I Interferone (IFN α und IFN β) zur Inhibition der Virusreplikation expremiert werden (Alexopoulou et al. 2001). Rhinoviren gelten als wichtiger Trigger akuter COPD-Exazerbationen. Etwa 90% der Rhinoviren binden über ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) an das Atemwegsepithel. Dabei handelt es sich um ein Transmembranprotein auf der Zelloberfläche, das essenziell für die Rekrutierung von Entzündungszellen in die Atemwege ist (Bella et al. 1999). Bei Patienten mit chronischer Bronchitis und Atemwegsobstruktion konnte eine erhöhte Expression von ICAM-1 nachgewiesen werden (Di Stefano et al. 1994). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob *M. catarrhalis* in der Lage ist, die Expression von ICAM-1 zu beeinflussen.

1.7 Das Tumorsuppressor p53 Protein

Das im Zellkern lokalisierte Protein mit einem Molekulargewicht von 53 kD reguliert ein dichtes Netzwerk biologischer Prozesse wie Zellzyklus, Differenzierung, Alterung und Zelltod. Es ist die wichtigste Kontrollinstanz für die Unversehrtheit der DNA, weshalb ihm 1992 der Titel „Wächter des Genoms“ verliehen wurde (Lane et al. 1992).

Das p53 Protein sorgt im Zellzyklus dafür, dass sich eine Zelle nur dann weiter teilen kann, wenn ihr Erbgut keine Schäden aufweist, ansonsten bewirkt p53 einen Zellzyklus-Arrest oder leitet die Apoptose ein (Rivas et al. 2010).

In vielen Studien konnte p53 eine Schlüsselrolle in der antiviralen Immunabwehr nachgewiesen werden (Muñoz-Fontela et al. 2008). Die Transkription von p53 wird durch Typ I Interferone stimuliert, wodurch die Konzentration von p53 in der Zelle innerhalb kurzer Zeit stark ansteigt, was zur Apoptose virusinfizierter Zellen führt und damit die Virusreplikation reduziert (Takaoka et al. 2003)

Zu einer für diese Arbeit wegweisenden Erkenntnis gelangte die Gruppe von Taura. In ihrer Arbeit zeigten sie, dass p53 in der Lage ist, TLR3 positiv zu regulieren. Sie wiesen nach, dass p53 durch Bindung an einer bestimmten p53-Bindestelle am TLR3-Promoter die Expression von TLR3 aktiviert, wohingegen ein *knockdown* von p53 zu einer verminderten TLR3-Expression führt (Taura et al. 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in dieser Arbeit der Einfluss von *M. catarrhalis* auf p53 und möglicherweise demzufolge auch auf TLR3 untersucht. In der Studie von Taura wurde die p53-Bindestelle identifiziert, die für die Regulation des TLR3-Promoters die größte Bedeutung hat. Dabei handelt es sich um die Sequenz zwischen bp -1929 und -1910. Für die Chromatin-Immunpräzipitation-Analysen wurden Primer verwendet, die diese p53-Bindestelle erkennen.

1.8 EGFR

Nahezu alle Zelltypen exprimieren den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR). Der Rezeptor kann auf vielfältige Weise aktiviert werden und spielt eine wichtige Rolle in zellproliferativen, zellregenerativen und mit zunehmendem Nachweis auch in immunologischen Prozessen der angeborenen Immunabwehr (Haarmann et al. 2011). Die Verwendung von EGF (*epidermal growth factor*) sollte Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des EGFR geben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Bei allen in diesem Kapitel nicht aufgeführten Chemikalien handelt es sich um in Laboratorien standardmäßig eingesetzte Substanzen, welche alle den analytischen Reinheitsgraden entsprechen. Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Kits (z.B. ELISA, RNA-Aufreinigung) werden hier nicht extra gelistet. Die experimentelle Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Bezugsquellen sind den entsprechenden Abschnitten in Kapitel 2.2 Methoden zu entnehmen.

2.1.1 Zelllinien

2.1.1.1 Primäre Bronchialepithelzellen

Die NHBE – Zellen (*Normal Human Bronchial Epithelial Cells*) wurden von der Firma Lonza von HIV-1- und Hepatitis B/C- freien gesunden Spendern bezogen. Zur Anwendung kamen die Lotnummern 84749, 123717, 6F3918, 4F1289J und 75008 jeweils zwischen der Passage 1 und 8.

2.1.1.2 Humane Bronchial-Epithelzelllinie (Beas-2B)

Die humane Bronchialepithelzelllinie Beas-2B wurde von der *American Type Culture Collection (ATCC)* bezogen. Diese Zellen sind durch Transfektion mit einem Adenovirushybrid 12-SV40 (Ad12SV40) immortalisiert (Reddel et al. 1988). Ohne Zugabe von Serum bleiben Beas-2B-Zellen undifferenziert. Die Zellen wurden zwischen Passage 1 und 35 eingesetzt.

2.1.2 Zellkultur

Tabelle 2-1: Zellkultur Primäre Bronchialepithelzellen

Primäre Bronchialepithelzellen	Menge	Hersteller
Zellkulturmedium und Zusätze		
Bronchialepithelzell-Medium (BEGM)	500 ml	Lonza
Bovines Hypophysenextrakt	0,5 ng/ml	Lonza
Insulin	5 µg/ml	Lonza
All trans Retinolsäure	0,1 ng/ml	Lonza
Transferrin	10 µg/ml	Lonza
Tri-Jodthyronin	6,5 ng/ml	Lonza
Epinephrin	0,5 µg/ml	Lonza
Humaner epithelialer Wachstumsfaktor	0,5 ng/ml	Lonza
CC-4031F HC	10 µg/ml	Lonza
CC-4081F GA-1000	10 µg/ml	Lonza
Stimulationsmedium		
Bronchialepithelzell-Basalmedium (BEBM)	500 ml	Lonza
Verbrauchssubstanzen		
Trypsin/EDTA 1 x	100 ml	Gibco
TNS (<i>trypsin neutralizing solution</i>)	100 ml	Lonza
HBSS (Waschpuffer)	500 ml	Lonza

Tabelle 2-2: Zellkultur Beas-2B-Zellen

Beas-2B-Zellen	Menge	Hersteller
Zellkulturmedium und Zusätze		
Keratinocyten - SFM (Serumfreies Medium)	500 ml	Gibco
Rekombinanter epithelialer Wachstumsfaktor	2,50 µg	Gibco
Bovines Hypophysenextrakt	25 mg	Gibco
Epinephrin-Hydrochlorid (1 mg/ml)	250 µl	Sigma
All trans Retinolsäure (1 mg/ml)	50 µl	Sigma
Stimulationsmedium		
Keratinocyten - SFM	500 ml	Gibco
Adhäsionsflüssigkeit		
Keratinocyten - SFM	100 ml	Gibco
Bovines Serumalbumin (BSA) 100 mg/ml	1 ml	Sigma
Fibronektin 1 mg/ml	1 ml	Sigma
Vitronektin 50 µg/ml	0,10 ml	Sigma
Kryokonservierungsmedium		
Keratinocyten - SFM	10 ml	Gibco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10 %	Roth
Verbrauchssubstanzen		
Trypsin/EDTA 1 x	100 ml	Gibco
ETI (Trypsininhibitor, 30mg/ml)	200 µl	Roche
Dulbeccos PBS 1x (Waschpuffer)	500 ml	PAA

2.1.3 Bakterien

2.1.3.1 *Moraxella catarrhalis*

Der *Moraxella catarrhalis* – Stamm O35E und alle seine in dieser Arbeit verwendeten Deletionsmutanten wurden uns freundlicherweise von Eric Hansen, *University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas Texas, USA* zur Verfügung gestellt. Der Stamm BBH18 wurde uns von Kristian Riesbeck, *Lund University Skåne, University Hospital Malmö, Sweden* zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Bakterienkultur

Tabelle 2-3: Kultur von *Moraxella catarrhalis*

Medien für die Bakterienkultur	Menge	Hersteller
Brain-Heart-Infusion-Medium*		
BHI-Pulver	37 g	BD Bioscience
Aqua dest. ad	1000 ml	
Brain-Heart-Infusion-Kryomedium		
Brain-Heart-Infusion-Medium	500 µl	
Glyzerol 99,5%ig	500 µl	Fluka Biochemika
Agar		
Columbia Agar mit 5% Schafsblut		Beckton Dickinson

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

2.1.5 Molekularbiologische Methoden

2.1.5.1 Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Tabelle 2-4: RT-qPCR - Mastermix

RT-qPCR - Mastermix	Menge je Probe	Hersteller
HC-RT		
Ecotainer® Aqua	4,2 µl	B. Braun
Random Primer 10x	2 µl	Applied Biosystems
Buffer 10x	2 µl	Applied Biosystems
Multiscribe Reverse Transkriptase 50 U/µl	1 µl	Applied Biosystems
dNTP Mix 25x 100 mM	0,8 µl	Applied Biosystems
TaqMan® RT-qPCR		
Ecotainer® Aqua	4 µl	B. Braun
TaqMan® Gene Expression Assay	10 µl	Applied Biosystems
Assay-On-Demand 20x (Primer)	1 µl	Applied Biosystems
Power Sybr® Green RT-qPCR		
Ecotainer® Aqua	7 µl	B. Braun
Sybr® Green	12,5 µl	Applied Biosystems
Primer vorwärts (10 µM)	0,25 µl	Metabion
Primer rückwärts (10 µM)	0,25 µl	Metabion
Light Cycler® 480 SYBR Green I Master		
Ecotainer® Aqua	4,6 µl	B. Braun
Sybr Green I Master	10 µl	Roche
Primer vorwärts (100 pmol/µl)	0,2 µl	Metabion
Primer rückwärts (100 pmol/µl)	0,2 µl	Metabion

Tabelle 2-5: RT-qPCR - Primer

RT-qPCR-Primer	Vorwärts-Sequenz	Rückwärts-Sequenz	Annealing-Temperatur, Zyklen	Hersteller
GAPDH	5'-CAgCCTCAAg ATCA TCAgCA-3'	5'-TgTggTCATgAg TCC TTCCA-3'	60°C, 40	Metabion
Assay-on-Demand GAPDH 20xPrimer	HS 02758991-g1		60°C, 40	Applied Biosystems
Assay-on-Demand hIFN β 20xPrimer	HS 00277188-s1		60°C, 40	Applied Biosystems
hIFN λ	HP 218250		60°C, 45	Biocompare
TLR3	5'- TCCCTTTgTCAAg CAgAAgAA-3'	5'- TCCAgCTgAACCT gAgTTCC-3'	60°C, 40	Metabion
TLR2	5'-TgTCACAggACA CACTggT-3'	5'-ATACCACAggCCAT ggAAAC-3'	60°C, 40	Metabion
MDA5	5'-AACCTCCTTCA gCCCCTCT-3'	5'-gCAATCCggTTTC TgTCTTC-3'	60°C, 40	Metabion
RIG-I	5'- AgAgCACTTgTgg ACgCTTT-3'	5'-TTTgCCACgTCC AgTCAATA-3'	60°C, 40	Metabion
TRIF	5'-AggACCCCAggA CCCAgT-3'	5'-CCCCTACCCATT CACTgTTC-3'	60°C, 40	Metabion
ICAM-1	5'-CAAggCCTCAg TC AgTgTgA-3'	5'-CCggAAAgCTgT AgATggTC-3'	60°C, 40	Metabion
P53	5'- CCAgCCAAAgAA gAAACCAC-3'	5'-CCTCATTCAgCT CTCggAAC-3'	60°C, 40	Metabion

2.1.5.2 Reverse Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Tabelle 2-6: RT-PCR - Mastermix

RT-PCR - Mastermix	Menge je Probe	Hersteller
HC-RT		
Ecotainer® Aqua	4,2 µl	B. Braun
Random Primer 10x	2 µl	Applied Biosystems
Buffer 10x	2 µl	Applied Biosystems
Multiscribe Reverse Transkriptase 50 U/µl	1 µl	Applied Biosystems
dNTP Mix 25 x 100 mM	0,8 µl	Applied Biosystems
RT-PCR		
Ecotainer® Aqua	16,3 µl	B. Braun
ThermoPol Reaction Buffer 10x	2,5 µl	BioLabs
Taq DNA Polymerase 5 U / ml (1:5 verdünnt)	0,5 µl	BioLabs
Primer vorwärts (0,5 µg/µl)	0,1 µl	Metabion
Primer rückwärts (0,5 µg/µl)	0,1 µl	Metabion
dNTP-Mix 10mM	0,5 µl	Promega

Tabelle 2-7: RT-PCR - Primer

RT-PCR-Primer	Vorwärts-Sequenz	Rückwärts-Sequenz	Annealing-Temperatur, Zyklen	Hersteller
TLR3 0,5 µg/µl	5`-AGA GTT TTC TCC AGG GTG TTT TCA C-3`	5`-CAT TGA AAA GCC CGT GCA A- 3`	56,4 °C, 31	Metabion
GAPDH 0,5 µg/µl	5`-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3`	5`-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3`	60,0 °C, 24	Metabion

Tabelle 2-8: RT-PCR - Puffer, Gel, Marker

RT-PCR - Puffer, Gel, Marker	Menge	Hersteller
TAE Puffer, pH 8,0		
Tris Base	4,84 g	Sigma
Eisessig 100%ig	1,14 ml	Merck
EDTA 0,5 M	2 ml	Roth
Aqua dest. ad	1000 ml	
Agarosegel 1%		
Agarose	1 g	Promega
TAE-Puffer (1x)	100 ml	Merck
Ethidiumbromid	4 µl	Sigma
Marker		
DNA-Ladder 100 bp	5 µl	NEB
Ladepuffer (6x)		
Xylenxyanol	125 mg	BioRad
Glycerin	15 ml	Fluka Biochemika
A. dest. ad	50 ml	

2.1.5.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Tabelle 2-9: FACS – Antikörper

FACS – Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
Primäre Antikörper			
TLR3 (40C1285)	Maus	5 µg/10 ⁶ Zellen	Santa Cruz
Sekundäre Antikörper			
PE gekoppelt anti-Maus	Ziege	1:50	eBioscience

Tabelle 2-10: FACS – Puffer und Lösungen

FACS – Puffer und Lösungen	Hersteller
Waschpuffer (PBS+10% FCS)	PAA, Gibco
Perm-wash (10x) Solution	BD Pharmingen
FACSFlow	BD Pharmingen
FACSRinse	BD Pharmingen
FACSClean	BD Pharmingen
Cytofix/Cytoperm (1x) Solution	BD Pharmingen
Annexin V-FITC 1:10	MACS Miltenyi Biotec
Propidiumjodid 1:100	MACS Miltenyi Biotec
Annexin-Bindepuffer (10x)	MACS Miltenyi Biotec

2.1.5.4 Transiente Transfektion von Beas-2B-Zellen

Tabelle 2-11: Transfektionsreagenzien und siRNA

Transfektionsreagenzien und siRNA	Hersteller
Amaxa™ NHBE Nucleofector™ Kit	Lonza
Kontroll siRNA #3 (50 µM)	Ambion
TLR3 siRNA #1 und 2 (5 nmol)	Ambion
P53 siRNA, #1 und 2 (5 nmol)	Ambion

2.1.5.5 IL-8 ELISA

Tabelle 2-12: IL-8 ELISA – Puffer

IL-8 ELISA – Puffer	Menge	Hersteller
Carbonatpuffer 0,1 M, pH 9,5		
Natriumhydrogencarbonat	4,2 g	Merck
Natriumcarbonat	1,78 g	Merck
A. dest. ad	500 ml	
Blockpuffer		
Dulbeccos PBS (1 x)	45 ml	PAA
FCS	5 ml	Gibco
Waschpuffer		
Dulbeccos PBS (1 x)	1000 ml	PAA
Tween20	0,05 %	Sigma
Substratlösung TMB		
Wasserstoffperoxid	50 %	BD Bioscience

IL-8 ELISA – Puffer	Menge	Hersteller
3,3',5,5'Tetramethylbenzidin	50 %	BD Bioscience
Stopplösung (2 N H₂SO₄)		
H ₂ SO ₄ (95-97%ig)	27,47 ml	Merck
A. dest. ad	500 ml	

Tabelle 2-12: IL-8 ELISA – Puffer

Tabelle 2-13: IL-8 ELISA - Antikörper

IL-8 ELISA – Antikörper	Konzentration	Hersteller
Capture Antikörper anti humanes IL-8	1:250	BD Bioscience
Detektionsantikörper anti humanes IL-8	1:250	BD Bioscience
SAV-HRP	1:250	BD Bioscience

2.1.5.6 Western Blot

Tabelle 2-14: Western Blot - Puffer und Lösungen

Western Blot – Puffer und Lösungen	Menge	Hersteller
Phosphoproteinwaschpuffer		
Natriumorthovanadat 98%ig, 200 mM	5 ml	Sigma
Natriumpyrophosphat, 150 mM	50 ml	Fluka Biochemika
Natriumfluorid 99%ig, 1M	50 ml	Serva
Dulbeccos PBS (1x) ad	500 ml	PAA
Lysepuffer zur Proteinextraktion		
Phosphoproteinwaschpuffer	880 µl	
Tris-HCl, pH 7,4, 500 mM	100 µl	Roth

Western Blot – Puffer und Lösungen	Menge	Hersteller
Nonidet® P-40 20%ig	1 %	Fluka Biochemika
Inhibitoren-Cocktail, 100x	10 µl	Calbiochem
Bradford Reagenz 5x (1:5 verdünnt)	995 µl je Probe	Serva
Sammelgelpuffer, pH 6,8		
Tris-HCl	6 g	Roth
A. dest. ad	100 ml	
Trenngelpuffer, pH 8,8		
Tris	18,15 g	Roth
A. dest. ad	100 ml	
Gelladepuffer nach Lämmler		
Sammelgelpuffer	1 ml	
SDS (10%ig w/v)	1,6 ml	Roth
Glycerin	0,8 ml	Roth
Bromphenolblau 1%ig	0,4 ml	Sigma
β-Mercaptoethanol 1%ig	10 µl	Roth
A. dest.	3,8 ml	
Marker		
Protein Kaleidoscope	0,5 ml	BioRad
Cruz Marker™ Molecular Weight Standards	0,5 ml	Santa Cruz
Gelelektrophoresepuffer (5x)		
Tris-Base	15 g	Roth
Glycin	72 g	Roth
SDS 100%	5 g	Roth

Western Blot – Puffer und Lösungen	Menge	Hersteller
A. dest. ad	1000 ml	
Blotpuffer (10x)		
Tris-Base	30 g	Roth
Glycin	144 g	Roth
A. dest. ad	1000 ml	
Blotpuffer (1x)		
Blotpuffer (10x)	80 ml	
Methanol	200 ml	Merck
A. dest. ad	1000 ml	
Blockpuffer		
Milchpulver	5 %	Fluka Biochemika
Dulbeccos PBS (1x) ad	500 ml	PAA
Strippingpuffer	10 ml	Thermo Scientific
Waschpuffer		
Tween20	0,05 %	Sigma
Dulbeccos PBS (1x) ad	500 ml	PAA
Ponceau-S-Proteinfärbung		
Ponceau S	100 µg	Sigma
Essigsäure 100%ig	5 ml	Merck
A. dest. ad	250 ml	
Substrat		
ECL (enhanced chemiluminescence)		ThermoScientific
Entwickler- und Fixierlösung	je 1 Liter	Agfa

Tabelle 2-15: Western Blot - Gele

Western Blot – Gele	Zusammensetzung	Hersteller
Trenngel 10%		
Trenngelpuffer pH 8,8	2,5 ml	
Acrylamid 40% (w/v)	2,5 ml	Serva
SDS 10% (v/v)	100 ml	Roth
Ammoniumpersulfat 10%	50 ml	Roth
TEMED	5 ml	Serva
A. dest.	4,85 ml	
Sammelgel		
Sammelgelpuffer pH 6,8	1 ml	
SDS 10% (v/v)	40 µl	Roth
Bis-Acrylamid 40%ig (w/v)	534 µl	Serva
TEMED	10 µl	Serva
Ammoniumpersulfat 10%ig	40 µl	Roth
A. dest. ad	4 ml	

Tabelle 2-16: Western Blot - primäre und sekundäre Antikörper

Western Blot Antikörper	kDa	Spezies	Konzentration	Hersteller
primäre Antikörper				
TLR3 (Stock 1 mg/ml)	104	Kaninchen	1 µg/ml	abcam
p53 (Stock 0,5 mg/ml)	53	Maus	0,5 µg/ml	BD
β-Tubulin (Stock 1 mg/ml)	55	Kaninchen	0,1 µg/ml	abcam
sekundäre Antikörper				

Western Blot Antikörper	kDa	Spezies	Konzentration	Hersteller
Anti-Maus-IgG (p53)	-	Ziege, gekoppelt an HRP	1:10.000	Santa Cruz
Anti-Kaninchen-IgG (TLR3, β-Tubulin)	-	Ziege, gekoppelt an HRP	1:10.000	Santa Cruz

Tabelle 2-16: Western Blot - primäre und sekundäre Antikörper

2.1.5.7 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Tabelle 2-17: ChIP – Puffer und Lösungen

ChIP – Puffer und Lösungen	Menge	Hersteller
Lysepuffer		
ChIP-RIPA Puffer	50 ml	
Proteinase-Inhibitor Cocktail Set I (100x)	500 µl	Calbiochem
ChIP-RIPA Puffer		
TrisBase pH 7,1	500 mM	Roth
EDTA	500 mM	Roth
Natriumchlorid	4,383 g	Roth
Nonidet P-40	5 ml	Fluka Biochemika
Desoxycholat	5 g	Fluka Biochemika
SDS 10%ig	5 ml	Roth
A. dest. ad	500 ml	
TE-Puffer		
Tris HCl	10 mM	Roth
EDTA	1 mM	Roth

ChIP – Puffer und Lösungen	Menge	Hersteller
A. dest. ad	100 ml	
High Salt Puffer		
Natriumchlorid	2 M	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, pH 7,5	10 mM	Roth
Nonidet P-40	1 %	Fluka Biochemika
Desoxycholat	0,5 %	Fluka Biochemika
EDTA	1 mM	Fluka Biochemika
A. dest. ad	500 ml	
Eluierungspuffer		
TE-Puffer	30 ml	
SDS 10%ig	1 %	Roth
Fixierlösung		
Dulbeccos PBS (1x)	10 ml	PAA
Formaldehyd	1%	Roth
Neutralisationslösung		
Dulbeccos PBS (1x)	500 ml	PAA
Glycin	4,69 g	
Protein A- und G-Agarose	je 20 µl / Probe	Millipore
Proteinase K 600 mAU/ml	5 µl / Probe	Novagen
Ribonuklease A	1 µl / Probe	Sigma

Tabelle 2-17: ChIP – Puffer und Lösungen

Tabelle 2-18: ChIP – Antikörper für die Immunpräzipitation

ChIP – Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
p53	Maus	0,5 mg/ml	BD Pharmingen
Polymerase II	Kaninchen	200 µg/ml	Santa Cruz

Tabelle 2-19: ChIP – TLR3 Promoter-Primer

ChIP-Primer	Vorwärts-Sequenz	Rückwärts-Sequenz	Annealing-Temperatur, Zyklen	Hersteller
TLR3 0,5 µg/µl	5`-GCA CTC ATG ACT CAA TGC AAA C-3`	5`-CAC TTT AGG AGA TTG CTT GAG C-3`	64°C, Input 34 Zyklen, Pol II+ p53 38 Zyklen	Metabion

Tabelle 2-20: ChIP – RT-PCR Mastermix

ChIP – RT-PCR Mastermix	Menge je Probe	Hersteller
Ecotainer® Aqua	16,55 µl	B. Braun
Perfect Taq Plus PCR Buffer 10 x	2,5 µl	5`Prime
Taq DNA Polymerase 5 U/µl (1:5 verdünnt)	0,25 µl	5`Prime
dNTP`s (10 mM)	0,5 µl	Promega
Primer vorwärts (100 pmol/µl)	0,1 µl	Metabion
Primer rückwärts (100 pmol/µl)	0,1 µl	Metabion

Tabelle 2-21: ChIP – RT-PCR Gel

ChIP – RT-PCR Gel	Menge	Hersteller
TBE Puffer 5x		
Tris Base	54 g	Sigma
Borsäure	27,5 g	Merck
EDTA 0,5 M	3,7 g	Roth
Aqua dest. ad	1000 ml	
Agarosegel 2%		
Agarose	3 g	Promega
TBE-Puffer	150 ml	Merck
GelRed 1:50.000	3 µl	Biotium
Ladepuffer (6x)		
Xylenxyanol	125 mg	BioRad
Glycerin	15 ml	Fluka Biochemika
A. dest. ad	50 ml	
Marker		
100 bp DNA Ladder 1:32 verdünnt	12 µl	NEB

2.1.6 Stimulantien und Inhibitoren

Tabelle 2-22: Stimulantien

Stimulantien	Konzentration	Hersteller
TLR - Agonisten		
Pam3Cys	1 µg/ml	Enzo
Poly(I:C)	10 und 100 µg/ml	Imgenex
Lipopolysaccharid (LPS)	1 µg/ml	Alexis Biochemicals
Flagellin	10 ng/ml	Enzo
NOD - Agonisten		
C12-iE-Diaminopimelinsäure	100 ng/ml	InvivoGen
Muramyldipeptid	10 µg/ml	InvivoGen
Sonstige		
IL-1 β	10 ng/ml	R&D Systems
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	50 ng/ml	Gibco
Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)	50 ng/ml	R&D Systems

Tabelle 2-23: Inhibitoren

Inhibitoren, Konzentration	Spezifität	Hersteller
Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)		
AG1478, 1, 5 und 10 µM	EGFR	Calbiochem
Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)		
U0126, 1 und 10 µM	ERK 1,2	Calbiochem
SB202190, 50 nM	p38 MAPK	Calbiochem

JNK Inhibitor II, 40 und 100 nM	JNK 1,2,3	Calbiochem
NF-κB		
NF- κ B Activation Inhibitor, 10 nM	NF- κ B	Calbiochem
Kinasen		
SB216763, 50 und 100 nM	GSK3-Kinase	Sigma
Ly294002, 10 und 50 μ M	PI3-Kinase	Calbiochem
PP2 529573, 5 und 20 μ M	Syk-Kinase	Calbiochem

Tabelle 2-23: Inhibitoren

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2-24: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller
Einmalimpfösen	Ausplattieren von Bakterien	Roth
Einmalpipetten, steril	Transfektion Beas-2B-Zellen	Amaxa
Film 5x7 inches	Western Blot	Thermo Scientific
Filter 50 mm, 150 ml	Sterilfiltration	Nalgene
Filterpapier Whatman	Western Blot	VWR
Glasobjektträger, 8 Kammern	Ermittlung der Zellzahl	Becton Dickinson
Kryoröhrchen	Einfrieren von Zellen / Bakterien	Thermo Scientific
Küvetten, Kunststoff	Messung der optischen Dichte	Serva
Küvetten, steril	Transfektion Beas-2B-Zellen	Amaxa
Küvetten, UV	RNA-Messung	Roth

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller
Loch-Platten (6 / 12 / 24 / 48 Vertiefungen), BioCoat	Zellkultur NHBE	BD Bioscience
Loch-Platten (6 / 12 / 24 / 48 Vertiefungen)	Zellkultur Beas-2B	Falcon
Loch-Platten weiß (96 Vertiefungen) mit Abdeckfolie	RT-qPCR	Roche
Loch-Platten Maxisorp (96 Vertiefungen)	ELISA	Nunc
Membran Hybond ECL	Western Blot	Amersham
Multistepper-Aufsätze	Pipettieren	Ritter medical care
Pasteurpipetten (230 mm)	Absaugen von Flüssigkeiten	Brand
Pipetten (5, 10, 25 ml)	Pipettieren	TPP
Pipettenspitzen gestopft, ungestopft (10,100,200,1000 µl)	Pipettieren	Eppendorf , VWR, Biozyme
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2 ml)		Eppendorf, Sarstedt
Röhrchen (15, 50 ml)	Zell- und Bakterienkultur	Falcon
Röhrchen Polystyren	FACS	Falcon
Spritze, 20 ml	Sterilfiltrieren von Flüssigkeiten	B. Braun
Sterilfilter 0,20 Microliter	Sterilfiltrieren von Flüssigkeiten	Roth
Urinbecher (100 ml)	Zellkultur	Sarstedt
Zellkulturflaschen T ₂₅ , T ₇₅	Zellkultur Beas-2B, NHBE	Falcon, BDBioCoat
Zellschaber	Ablösen von Zellen	Sarstedt

2.1.8 Geräte

Tabelle 2-25: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, Febikon
ELISA-Reader Spectral Fluor Plus	Tecan
FACSCalibur™ Flow Cytometer	BD Biosciences
G:Box	Syngene
Gelhalterungssystem mit Klemmen, Kämmen usw.	BioRad
Inkubator HERA CELL 150	Heraeus
Inkubator Function Line BB16	Heraeus
Kamera Camedia C-4040 mit Ethidiumbromidfilter	Olympus
Laborwaage 822-33	Kern
Laborwaage R 160 P	Sartorius
LightCycler®480	Roche
Magnetrührer RCT basic	Ika-Labortechnik
Mikroskop Wilovert S	hund Wetzlar
Milli-RX75 – Anlage zur Herst. von A. dest.	Millipore Corporation
Multipette elektronisch	Eppendorf
Multistepper	Brand, Eppendorf
Nano Drop 2000c Spectrophotometer	Peq Lab
Nukleofektor II	Amaza
pH-Meter Seven easy	Mettler Toledo

Bezeichnung	Hersteller
Photometer	Eppendorf
Pipetboy	Hirschmann Laborgeräte
Pipettierhilfen (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf
Powersupplie BRL PS 305	Gibco
Pumpe Vacusafe	Integra
Rotierrad	Rettberg Laborbedarf
Schüttler	GFL 3032
Sonifier Branson 250	Heinemann Labortechnik
Sterilbank Hera Safe und antair BSK	Heraeus
Stickstofftank RSSeries	Taylor-Wharton
Thermal Cycler S1000™	BIO-RAD
Thermocycler T3	Biometra
Thermomixer 5436B	Eppendorf
Tischzentrifuge	neoLab
UV Crosslinker-Lichtgerät UVC 500	Hofer
UV-Tisch Dunkelox	Syngene
UV-Transilluminator TFX-20M BRL	Gibco
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Wärmebad	GFL

Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge GS-6	Beckmann
Zentrifuge GS-15R	Beckmann
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge für Platten 5403	Eppendorf

Tabelle 2-25: Geräte

2.1.9 Analysesoftware

Tabelle 2-26: Analysesoftware

Software-Bezeichnung	Hersteller
GraphPad Prism Version 5.0	GraphPad
LightCycler®480 Software Version 1.5.0.39	Roche
Magellan Data Analysis Software	Tecan
Nanodrop 2000/200c, 2009	Qubit Lab
Real-Time PCR System SDS Software	Applied Biosystems
CellQuest Pro	BD
Syngene	Imgen Technologies

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten in der Zellkultur erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank (Genehmigungsnummer der Gentechnikanlage 762/95). Die

Werkbank wurde vor und nach ihrem Gebrauch mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Für alle Materialien und Geräte erfolgte vor ihrer Verwendung eine Sterilisation im Autoklaven oder mit Heißluft, Lösungen wurden sterilfiltriert. Hatten Materialien oder Geräte Kontakt mit humanem oder transfiziertem Zellmaterial, so wurden sie anschließend einer Desinfektion mit 70%igem Ethanol unterzogen.

Für die verwendeten Zelllinien erfolgte die Kultivierung in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37°C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%.

Die Aufbewahrung der Medien erfolgte im Kühlschrank bei 4°C. Vor Ihrer Verwendung wurden sie in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Erwärmung des Mediums für die Primären Bronchialepithelzellen erfolgte bei Raumtemperatur.

Wurden Zellen mit Bakterien stimuliert, so erfolgte dies unter den Bedingungen der Bakterienkultur (sh. 2.2.2.1).

2.2.1.1 Kultivierung von Primären Bronchialepithelzellen

Für die Kultivierung der Primären Bronchialepithelzellen wurden Flaschen und Platten mit einer speziellen Kollagen-Beschichtung verwendet. Eine Subkultivierung der Zellen erfolgte bis Passage 8 in Flaschen der Größe T₇₅. Die zu 50 bis maximal 80% konfluenten Primärzellen wurden je nach Verwendungszweck in die jeweiligen Zellkulturgefäße in gewünschter Dichte ausgesät (für die Subkultivierung 3500 Zellen pro cm²). Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit 5 ml HBSS (*hepes buffered saline solution*) pro T₇₅ gewaschen. Nach Absaugen des HBSS wurden die Zellen zum Ablösen mit 2,5 ml Trypsin / EDTA-Lösung je T₇₅ für 3 bis 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend konnten die Zellen durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden gelöst werden. Mit der Zugabe von 5 ml TNS (*trypsin neutralizing solution*) wurde das Trypsin neutralisiert, die Zellen restlos vom Flaschenboden abgespült und in ein 15 ml Zellkulturröhrchen überführt. Die Flaschen wurden anschließend erneut mit 2,5 ml HBSS gespült. Diese Spülflüssigkeit wurde ebenfalls in das Zellkulturröhrchen gegeben. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 1100 rpm für 5 min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde bis auf etwa 250 µl abgenommen und das Zellpellet vorsichtig in 3 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.2.1.5 beschrieben ausgezählt und in der gewünschten Dichte ausgesät. Das Zellkulturmedium wurde jeden Tag gewechselt.

2.2.1.2 Kultivierung von Beas-2B-Zellen

Vor Aussaat der humanen Bronchial-Epithelzellen (Beas-2B) wurden für die Subkultivierung Zellkulturflaschen der Größe T₇₅, für die Stimulation Lochplatten für 30 min mit Adhäsionsflüssigkeit bei Raumtemperatur inkubiert. Die Adhäsionsflüssigkeit dient dazu, den Zellen bessere Haftungsmöglichkeiten zu schaffen. Anschließend wurde die Adhäsionsflüssigkeit wieder aus den Gefäßen entfernt.

Das Zellkulturmedium der konfluenten Zellen wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Um die Zellen abzulösen wurden sie mit 2 ml Trypsin / EDTA-Lösung für 5 min bei 37°C inkubiert. Durch leichtes Klopfen an der Flasche wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst, in 10 ml PBS aufgenommen, in ein 50 ml Zellkulturröhrchen überführt und bei 1000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 200 µl ETI (Trypsininhibitor) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in neues Zellkulturmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:2 bis 1:5 in die mit Adhäsionsflüssigkeit vorbehandelten Zellkulturgefäße ausgesät. Das Zellkulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt.

2.2.1.3 Kryokonservierung von Beas-2B-Zellen

Die konfluenten Zellen einer T₇₅ wurden wie unter 2.2.1.2 beschrieben gewaschen, trypsiniert, zentrifugiert und mit ETI (Trypsininhibitor) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in 3 ml Einfriermedium (Zellkulturmedium + 10 % Dimethylsulfoxid) aufgenommen und jeweils 1 ml der Suspension in ein Kryoröhrchen gegeben. Um schädigende Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden, wurden die Kryoröhrchen in einer Isopropanolbox für mindestens 24 h bei -80°C gelagert. Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Kryoröhrchen anschließend in Flüssigstickstoff (-196°C) umgelagert.

2.2.1.4 Auftauen von Beas-2B-Zellen

Für jedes aufzutauende Kryoröhrchen wurde eine T₇₅ mit Adhäsionsflüssigkeit für 30 min inkubiert. Die Kryoröhrchen wurden in einem 37°C warmen Wasserbad unter ständigem Schwenken aufgetaut. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde in ein leeres 15 ml Zellkulturröhrchen überführt. Anschließend wurde tropfenweise und unter

Schwenken 10 ml warmes Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen bei 1000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 10 ml neues Zellkulturmedium überführt und in eine T₇₅ gegeben. Am folgenden Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt.

2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie unter 2.2.1.1 und 2.2.1.2 beschrieben vom Zellkulturgefäß gelöst, gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in Suspension gebracht und die Neubauer-Zählkammer mit 20 µl dieser Zellsuspension beschickt. Unter dem Mikroskop wurden die Zellzahlen aus 16 Kleinquadraten ausgezählt und summiert, um die Zellzahl eines Großquadrats zu erhalten. Dies erfolgte stets in Duplikaten mit Berechnung der Mittelwerte. Die Zellzahl pro ml wurde nach folgender Formel berechnet:

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

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Bakterienkultur

Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Bakterienkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank. Die Werkbank wurde vor und nach ihrem Gebrauch mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Für alle Materialien und Geräte erfolgte vor ihrer Verwendung eine Sterilisation im Autoklaven oder mit Heißluft, Lösungen wurden sterilfiltriert. Hatten Materialien oder Geräte Kontakt mit Bakterien, so wurden sie anschließend einer Desinfektion mit Inzidin unterzogen. Verbrauchsmaterialien und bakterienhaltige Flüssigkeiten wurden vor der Entsorgung autoklaviert.

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

2.2.2.2 Anlegen eines *Moraxella catarrhalis* – Glycerolstocks zur Kurzzeitlagerung

Die Stimulation der Zellen mit den *Moraxella catarrhalis* – Stämmen erfolgte stets aus einem zuvor angelegten Glycerolstock. Zum Anlegen dieser Bakterienstöcke wurde eine Impföse in den bei -80°C gelagerten Langzeitstock getaucht und auf Columbia-Agarplatten mit 5% Schafblut ausgestrichen. Bei den *Moraxella* – Mutanten wurden dem Agar die entsprechenden Antibiotika zur Selektion beigefügt (sh. Tabelle 2-27). Anschließend wurden die Agarplatten für etwa 16 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Bakterienkolonien mit einer Impföse von der Agarplatte abgestrichen und in 1 ml BHI-Medium in Suspension gebracht. Anschließend wurde dieser Suspension 1 ml Glycerol 9,9% zugegeben, gut resuspendiert und 1 ml daraus in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden für den kurzfristigen Gebrauch bei -20°C gelagert. Die Glycerolstocks wurden alle 8 Wochen erneuert.

Tabelle 2-27: *Moraxella catarrhalis* - Stämme und deren Anzucht

Stamm / Mutante	Defizienz, verantwortlich für	Resistenz gegen
Stamm O35E	Keine	Keine
Mutante O35E.1	UspA1, Adhäsion	Kanamycin
Mutante O35E.2	UspA2, Komplementresistenz	Kanamycin
Mutante O35E.1.2	UspA1 und UspA2	Kanamycin, Chloramphenicol
Mutante O35E.lpx.A	LOS, Komplementhemmung	Kanamycin
Mutante O35E.HG	Hag, Adhäsion, Hämagglutination, Autoagglutination	Spectinomycin
Stamm BBH18	Keine	Keine

2.2.2.3 Anzucht von *Moraxella catarrhalis* zur Stimulation

Zur Anzüchtung des jeweiligen *Moraxella catarrhalis* – Stamms für die Stimulation wurde eine Impföse in den bei -20°C gelagerten Glycerolstock getaucht und auf einer Columbia-Agarplatte mit 5% Schafblut ausgestrichen. Anschließend wurde die

Agarplatte für etwa 16 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Viertel der gewachsenen Bakterienkolonien mit einer Impföse von der Agarplatte abgestrichen, in 25 ml BHI-Medium in Suspension gebracht und unter Schütteln bei 37°C für etwa 2 h inkubiert. Durch diese Schüttel-Inkubation erreichen die Moraxellen eine logarithmische Wachstumsphase, in welcher sie optimale Infektionseigenschaften besitzen (Haarmann 2011). Nach der Inkubation erfolgte die Zentrifugation bei 3500 rpm für 5 min, anschließend wurde der Überstand entfernt, das Bakterienpellet in 3 ml PBS resuspendiert. Die Bakterienkonzentration wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 405 nm ermittelt:

OD_{405nm} von 0,3 entspricht etwa 5×10^7 colony forming units (cfu) / ml

2.2.2.4 Inaktivierung von *Moraxella catarrhalis* zur Stimulation

Für einige Versuche wurden die Bakterien durch Hitze oder ultraviolettes (UV-) Licht inaktiviert. Nach dem Herstellen einer Bakterienlösung mit 10 Mio. cfu/ml wurden die Bakterien bei 95°C im Wärmeblock für 20 min hitzeinaktiviert bzw. für 1 h im *UV-Crosslinker*-Gerät UV-inaktiviert. Zur Kontrolle der Inaktivierung wurden die Bakterien anschließend ausgestrichen und inkubiert. Auf den Platten durfte kein Bakterienwachstum sichtbar sein. Die inaktivierte Bakteriensuspension wurde dann bei -20°C gelagert.

2.2.2.5 Stimulation der Zellen mit *Moraxella catarrhalis*

Vorbereitend zur Stimulation wurden die Primären Bronchialepithelzellen je nach Verwendungszweck wie unter 2.2.1.1 beschrieben in Loch-Platten ausgesät. Um eine Kontaktinhibition der Zellen zu vermeiden, wurden sie bereits vor Erreichen der Konfluenz stimuliert, in etwa bei einer Konfluenz von 80%. Um den Zellstress möglichst gering zu halten, wurden sie erst vor der Stimulation auf zusatzfreies Zellkulturmedium gesetzt.

Auch die Beas-2B-Zellen wurden je nach Verwendungszweck in Loch-Platten wie unter 2.2.1.2 beschrieben ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen über Nacht auf zusatzfreies Zellkulturmedium gesetzt, welches am Folgetag unmittelbar vor der Stimulation erneut gewechselt wurde.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte wie unter 2.2.1.5 beschrieben, die Bestimmung der Bakterienkonzentration nach Punkt 2.2.2.3. Zur Infektion der Zellen wurde eine MOI (*multiplicity of infection*) von 2,5, 5 und 25 berechnet, d.h. 2,5, 5 bzw. 25 Bakterien pro Zelle. Anschließend wurde die errechnete Menge Bakteriensuspension auf die Zellen gegeben. Es folgte die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für die entsprechende Versuchszeit. Für die Stimulation der Zellen mit inaktivierten Bakterien wurden ebenfalls die oben genannten Infektionsmengen errechnet und die entsprechende Menge inaktivierte Bakteriensuspension auf die Zellen gegeben.

2.2.2.6 Kontrollen und Inhibitoren

Als Negativkontrolle wurde zu jedem Versuch das gleiche Volumen des entsprechenden Stimulationsmediums eingesetzt.

Bei der Verwendung von Inhibitoren wurden die Zellen vor der Infektion mit *Moraxella catarrhalis* 1 h mit dem Inhibitor vorinkubiert. Zellen, die lediglich allein mit dem Inhibitor stimuliert wurden, dienten als Kontrollen.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Real-Time-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Zellyse und RNA-Aufreinigung

Die in 6-Loch-Platten stimulierten Zellen wurden nach der entsprechenden Inkubationszeit lysiert. Dazu wurde das Stimulationsmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend 400 µl *Lysis Solution* aus dem PerfectPure RNA Cultured Cell Kit™ der Firma 5`Prime pro Vertiefung auf die Zellen pipettiert. Die Platten wurden anschließend 2 min geschwenkt, bis sichtlich alle Zellen gelöst waren. Im Anschluss wurde die RNA-Isolierung mit dem PerfectPure RNA Cultured Cell Kit™ der Firma 5`Prime nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Die Messung des RNA-Gehaltes erfolgte mit dem NanoDrop 2000c Spectrophotometer der Firma Peq Lab bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der RNA-Gehalt wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{OD}_{260\text{nm}} \times 40\text{xVerdünnung} / 1000 = \text{RNA } \mu\text{g} / \text{ml}$$

Aus dem Verhältnis OD_{260} (Optimum RNA Absorption) und OD_{280} (Optimum Protein Absorption) kann eine Verunreinigung der RNA mit Proteinen bestimmt werden. Als rein wurden dabei RNA-Protein-Quotienten zwischen 1,7 und 2,0 betrachtet. Die isolierte RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

Reverse Transkriptase Reaktion

Je Ansatz wurde 1 μg RNA eingesetzt. Dazu wurden die ermittelten RNA-Konzentrationen durch Zugabe von Ecotainer® Wasser so verdünnt, dass 1 μg totale RNA in 10 μl Wasser gelöst waren. Als Negativkontrolle diente das gleiche Volumen an Wasser ohne RNA. Anschließend wurden zu jeder Probe 10 μl Mastermix pipettiert. Anschließend erfolgte die Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm: 10 min bei 25°C , 120 min bei 37°C , 5 sek bei 85°C , Abkühlung auf 4°C . Anschließend wurden die Proben mit der enthaltenen cDNA mit 80 μl Ecotainer® Wasser verdünnt. Die cDNA wurde dann bei -20°C aufbewahrt.

Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Die RT-qPCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (sh. 2.2.3.2) und bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung, d.h. sie sagt nicht nur aus, ob ein bestimmter DNA-Abschnitt in einer Probe vorhanden ist, sondern bestimmt zugleich dessen Menge, die schon während der Reaktion, also nach jedem einzelnen Zyklus, erfasst werden kann.

Eine Möglichkeit, die Anzahl gebildeter DNA-Moleküle während der Reaktion zu erfassen, besteht in der Verwendung fluoreszierender Reporterfarbstoffe, die in die doppelsträngige DNA interkalieren. Mit Fortschreiten der PCR-Reaktion kommt es zu einem Fluoreszenzanstieg, der direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist. Nach diesem Prinzip wurde der Farbstoff SYBR Green I eingesetzt. Zur Prüfung der Spezifität wurden Schmelzkurvenanalysen durchgeführt. Fehlhybridisierungen konnten dadurch ausgeschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Quantifizierung der PCR-Produkte besteht darin, den *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) auszunutzen. Dies geschieht z.B. durch die Verwendung von TaqMan-Sonden. Es handelt sich dabei um kurze DNA-Stücke, die mit den DNA-Molekülen hybridisieren. Sie tragen an ihrem einen Ende einen Reporterfarbstoff und am anderen einen Quencher. Quencher sind Moleküle, welche die Fluoreszenz von Farbstoffen in ihrer Nähe abfangen. Die Polymerasen im PCR-Ansatz sind in der Lage, die TaqMan-Sonden bei der Verdopplung der DNA-Vorlage abzubauen. Dabei setzen sie zunächst den Reporterfarbstoff frei, welcher somit aus dem Einflussbereich des Quenchers gelangt. Auf diese Weise wird die Fluoreszenz des Farbstoffs nur dann messbar, wenn die Polymerase tatsächlich den gewünschten DNA-Strang kopiert hat. Jedes freigesetzte Molekül an Reporterfarbstoff steht daher für einen gebildeten DNA-Strang. Daher kann man mit TaqMan-Sonden tatsächlich jederzeit die Menge gebildeter DNA messen. Die hIFN β -Bestimmungen wurden nach dem TaqMan-Prinzip durchgeführt.

Die Quantifizierung der PCR beruht für beide Methoden auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, den sogenannten Ct-Wert (*cycle threshold*, Schwellenwert-Zyklus). Der Ct-Wert beschreibt den Zyklus, an dem die Reporter-Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

SYBR Green – RT-qPCR

Ein Ansatz wurde stets als Triplet pipettiert und setzte sich aus 5 μ l Probe plus Mastermix (20 μ l Sybr Green Applied Biosystems, 15 μ l Sybr Green Roche) zusammen. Die PCR-Bedingungen wurden für die untersuchten Zielgene (TLR3, p53, RIG-I, MDA-5, TRIF, ICAM-1) wie folgt eingestellt: 50°C 2 min, 95°C 10 min, 40 Zyklen mit je 95°C 15 sek und 60°C 1 min, anschließend 95°C 15 sek, 60°C 1 min, 95°C 15 sek, 60°C 1 min. Optimale Annealingtemperaturen und Zyklenzahlen wurden durch Gradienten-PCRs ermittelt. Die Durchführung der Gradienten-PCR entspricht der einer normalen Polymerase-Kettenreaktion, mit dem Unterschied, dass alle Ansätze für die verschiedenen Temperaturen aus derselben Probe stammen.

TaqMan – RT-qPCR

Ein TaqMan-Ansatz wurde ebenfalls als Triplet pipettiert. 5 μ l Probe wurden mit 15 μ l Mastermix versetzt. Die PCR-Bedingungen wurden für das untersuchte Zielgen hIFN β wie folgt eingestellt: 50°C 2 min, 95°C 10 min, 40 Zyklen mit je 95°C 15 sek und 60°C 1 min.

Auswertung der RT-qPCR

Die Auswertung erfolgte als relative Quantifizierung. Um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen, wurde als interne Kontrolle das *Housekeeping-Gen* GAPDH verwendet. Die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) wird von eukaryotischen Zellen ubiquitär und homogen expremiert.

Die Berechnung erfolgte nach der Ct-Methode. Dabei werden die Ct-Werte der internen Kontrolle GAPDH von denen des Ziel-Gens (z.B. TLR3) abgezogen. Dies ergibt den Ct-Wert ($Ct = Ct \text{ Ziel-Gen} - Ct \text{ Referenz-Gen}$). Anschließend werden die Ct-Werte der unstimulierten Kontrolle vom Ct-Wert des Ziel-Gens abgezogen. Dies ergibt den Ct-Wert. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenz-Gen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel 2^{-Ct} .

2.2.3.2 Reverse Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Zellyse, RNA-Aufreinigung und Reverse Transkriptase Reaktion erfolgten wie unter Punkt 2.2.3.1 beschrieben.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Amplifikation eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Je Ansatz wurden 5 µl cDNA und 20 µl Mastermix verwendet. Als Kontrolle diente eine PCR mit den Primern für die GAPDH (sh. 2.2.3.1 Auswertung der RT-qPCR). Gleich stark expremierte GAPDH-Banden zeugen für gleichmäßige cDNA-Konzentrationen in den verschiedenen Ansätzen.

Die eingesetzte cDNA wird zunächst bei 95°C denaturiert. Im folgenden Hybridisierungsschritt lagern sich die Oligonukleotid-Primer bei einer für sie spezifischen Temperatur (Annealing-Temperatur) an die DNA-Einzelstränge an. Bei einer Temperatur von 72°C erreicht die Polymerase optimale Bedingungen für die Synthese in 3`-5`-Richtung (Elongationsphase).

Optimale Annealingtemperaturen und Zyklenzahlen wurden durch Gradienten-PCRs ermittelt. Die Durchführung der Gradienten-PCR entspricht der einer normalen Polymerase-Kettenreaktion, mit dem Unterschied, dass alle Ansätze für die verschiedenen Temperaturen aus derselben Probe stammen.

Tabelle 2-28: primerabhängige Annealingtemperatur und Zyklenzahl

Primer	Annealingtemperatur	Zyklenzahl
GAPDH	60°C	24
TLR3	63°C	36

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Molekülen in einem konstanten elektrischen Feld. Die Agarose dient hierbei als interne Matrix, in welcher DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrad im elektrischen Feld zur Anode wandern.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde im TAE-Puffersystem durchgeführt. Standardmäßig wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Unter Aufkochen wurde 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer gelöst und nach dem Abkühlen 4 µl Ethidiumbromid zugefügt. Anschließend wurde das Gel in eine Gelhalterung gegossen, welche mit Kämmen bestückt war, die als Platzhalter für 20 Geltaschen dienten. Nach Erstarren des Gels wurde dieses in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die DNA-Proben wurden mit 5 µl 6xLoading Dye Puffer versetzt und anschließend 12 µl Probe in die Geltasche pipettiert. Um nach Abschluss des Gel-Laufes die Länge und Menge der aufgetragenen DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Referenzmarker (100 bp Ladder) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 100 V über eine halbe Stunde durchgeführt. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und lässt sich aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften bei UV-Licht sichtbar machen. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einer Olympus Kamera mit vorgeschaltetem Ethidiumbromidfilter unter UV-Licht.

2.2.3.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Ein Durchflusszytometer ist ein Instrument zur qualitativen und quantitativen Untersuchung unterschiedlichster Zellpopulationen. Oft ist es mit einem zusätzlichen Zellseparator ausgestattet und wird deshalb im allgemeinen Sprachgebrauch auch kurz FACS genannt.

Durch eine FACS-Analyse können einzelne Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz, die durch die Bindung von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern bewirkt wird, charakterisiert werden. Aus der Intensität der Fluoreszenz kann auf die Menge der gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper geschlossen werden. So ist eine Aussage über die Expressionsdichte von markierten Oberflächenmolekülen und – nach Permeabilisierung der Zellen – auch von intrazellulären Molekülen möglich.

Bei der Messung werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt und gelangen einzeln in die Durchflusszelle, in der sie durch Laserlicht angeregt werden. Detektiert wird zum einen die Lichtstreuung, zum anderen das emittierte Fluoreszenzlicht einer bestimmten Wellenlänge der Antikörper-gekoppelten Fluorophore.

Um die Expression von TLR3 extrazellulär nachzuweisen wurden je FACS-Ansatz $0,3 \times 10^6$ Zellen verwendet. Die Färbung der Zellen erfolgte in 96 Lochplatten. Dazu wurden die Zellen mit dem TLR3-Primärantikörper (2 μ l je Ansatz) für 1 h bei Raumtemperatur in einem Volumen von 50 μ l Waschpuffer inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit FACS-Wash und folgend eine Inkubation mit PE-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:50) für 30 min bei Raumtemperatur. Der Sekundärantikörper bindet selektiv an den Primärantikörper und ist mit einem Fluorochrom gekoppelt. Er dient dazu, den Primärantikörper bei der FACS-Messung sichtbar zu machen. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen zweimal gewaschen, in PBS aufgenommen und analysiert.

Die Vorbereitung der Zellen für die intrazelluläre Analyse von TLR3 erfolgte wie für die extrazelluläre Färbung mit dem Unterschied, dass die Zellen vor der Färbung mit Cytoperm-Lösung 20 min auf Eis permeabilisiert wurden und die Waschschrte mit Perm-Wash erfolgten.

Zur Quantifizierung apoptotischer und nekrotischer Zellen wurde das Annexin V-FITC Kit der Firma MACS Miltenyi Biotec verwendet. In lebenden Zellen befindet sich Phosphatidylserin auf der Innenseite der Zellmembran. Tritt jedoch Apoptose ein, gelangt Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran und kann mittels fluoreszenzmarkiertem Annexin V angefärbt werden. Allerdings kann Annexin auch in nekrotische Zellen eindringen, da deren Membran durchlässig wird. Bei alleiniger Annexin-Färbung wären apoptotische und nekrotische Zellen also nicht zu unterscheiden. Man kombiniert daher die Annexin - Markierung mit einer Propidiumjodidfärbung. Das Propidiumjodid dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also in nekrotische Zellen ein. Daraus ergibt sich folgende Auswertung:

Tabelle 2-29: Auswertung Annexin-Propidiumjodid-Färbung

Zellen	Annexin	Propidiumjodid
lebend	negativ	negativ
apoptotisch	positiv	negativ
nekrotisch	positiv	positiv

2.2.3.4 Transiente Transfektion von Beas-2B-Zellen

Um die Auswirkungen der Herunterregulation der Gene TLR3 und p53 zu studieren, wurde der *small interfering RNA* (siRNA) - vermittelte *Gen-knockdown* verwendet. Dieses zeitweilige Einbringen von RNA in eukaryotische Zellen wird als transiente Transfektion bezeichnet. Für die Transfektion der Beas-2B-Zellen wurde das Amaxa™ NHBE Nucleofector™ Kit der Firma Lonza verwendet.

Konfluente Beas-2B-Zellen wurden wie unter 2.2.1.2 vom Flaschenboden gelöst und ausgezählt (sh. 2.2.1.5). 5×10^5 Zellen wurden je Nukleofektionsansatz in ein Zellkulturrohrchen überführt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt, 100 µl NHBE-Nukleofektor Solution mit enthaltenen Supplements und 2 µg Kontroll-siRNA bzw. Target-siRNA auf das Zellpellet pipettiert. Dieser Ansatz wurde dann in eine sterile Küvette überführt und in den Nukleofektor gestellt. Dieser erzeugt eine elektrische Spannung, durch die es zur Polarisierung der Zellmembran kommt. Folglich kann die siRNA in die Zelle eindringen, an die mRNA des Zielproteins (TLR3, p53) binden und so dessen Translation verhindern. Nach dieser Elektroporation wurden die transfizierten Zellen mit einer Einmalpipette in vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt und in 6-Lochplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Durch Zeitreihen wurde der beste *knockdown*-Zeitpunkt bestimmt. Die Zellen wurden dann an diesem Zeitpunkt stimuliert oder die Expression anderer Rezeptoren untersucht.

2.2.3.5 IL-8 ELISA

Zum Nachweis des Zytokins Interleukin 8 im Zellkulturüberstand wurden IL-8 ELISAs durchgeführt, die auf der Technik des Sandwich-ELISA basieren. Verwendet wurde

das OptEIA™ ELISA Set Human IL-8 der Firma BD Bioscience. Zunächst wurde der *capture* Antikörper (1:250 in Carbonatpuffer, 100 µl je well) gegen das zu untersuchende Antigen (IL-8) auf eine 96 Lochplatte über Nacht bei 4°C gebunden (*coating*). Am Folgetag wurde die Platte dreimal gewaschen und Blockpuffer zur Absättigung unspezifischer Bindungen aufpipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut dreimal gewaschen. Anschließend wurden Duplikate der Standardreihe (100 µl, siehe unten) und Duplikate der mit Blockpuffer verdünnten Proben (100 µl) in die Vertiefungen der Platte pipettiert und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene IL-8. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte viermal gewaschen, um ungebundene Bestandteile zu entfernen. Anschließend wurden ein biotinylierter Detektions-Antikörper und die Streptavidin- Meerrettichperoxidase zugegeben. Der Detektions-Antikörper bindet an den Komplex aus *capture*-Antikörper und Probe. Die Meerrettichperoxidase bindet das Biotin des Detektions-Antikörpers. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und weiteren sieben Waschschritten wurde das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben, das von der Meerrettichperoxidase umgesetzt wird und so einen Farbumschlag bewirkt. Die Platte wurde anschließend unter Kontrolle dieser Blaufärbung etwa 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 50 µl Schwefelsäure gestoppt. Durch den niedrigen pH-Wert kommt es zum Farbumschlag von blau nach gelb, der durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm bestimmt wurde. Die in den Proben gemessenen optischen Dichten wurden anhand der Standardkurve quantifiziert, mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und als pg/ml Werte angegeben. In die Auswertung gelangten nur Ergebnisse, welche sich innerhalb des linearen Bereiches der Standardkurve befanden.

Anhand des mitgeführten Standards (siehe oben) können quantitative Aussagen über den Gehalt des zu untersuchenden Antigens in der Probe gemacht werden. Das Referenz-IL-8 wurde in Blockpuffer so verdünnt, dass der höchste Standardwert eine Konzentration von 200 pg/ml aufwies. Die Standardwerte wurden bis zum niedrigsten Standardwert von 3,1 pg/ml jeweils 1:1 mit Blockpuffer verdünnt. Als Null-Standard diente reiner Blockpuffer ohne IL-8.

2.2.3.6 Western Blot

Extraktion des Gesamtproteins

Um die Expression des p53-Proteins zu untersuchen, wurden in 6-Lochplatten konfluente Beas-2B-Zellen mit *Moraxella catarrhalis* und anderen Substanzen stimuliert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und 80 µl Western Blot Lysepuffer zugegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen aus der 6-Lochplatte abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation bei 14.000 rpm für 5 min bei 4°C gelangt das Protein in den Überstand, der in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt wurde.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde mittels Bradford Reagenz durchgeführt. Dies ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau hat in seiner ungebundenen Form ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. In saurer Lösung bildet der Farbstoff mit Proteinen Komplexe, sein Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 595 nm. Die Bradford Reagenz wurde 1:5 verdünnt und dann jeweils 995 µl mit 5 µl Probe vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration berechnet.

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

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße. Zur Denaturierung der Proteine wurden die mit Lämmli-puffer versetzten Proben im Heizblock für 8 min bei 95°C gekocht. SDS, das im Lämmli-puffer enthalten ist, bildet mit den Proteinen negativ geladene Komplexe. Während der Elektrophorese wandern diese SDS-Proteinkomplexe aufgrund der negativen Ladung im elektrischen Feld zum Pluspol. Die Gelmatrix setzt sich aus zwei unterschiedlichen Geltypen zusammen. Zum einen aus einem großporigen Sammelgel, in welchem die Proteinproben (40 µl) aufgetragen und gesammelt wurden und zum anderen aus einem engporigen Trenngel, das die Proteine nach ihrer Größe auftrennt. Die Proben liefen 1 h bei 25 mA. Zur Größenkontrolle lief in jedem Gel ein Marker mit.

Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, bei der Proteine nach SDS-PAGE und Transfer auf eine Membran spezifisch nachgewiesen werden. Dazu wurde das Gel nach Abschluss

der Elektrophorese vorsichtig aus der Elektrophoresekammer entnommen und möglichst ohne Luftblasen auf eine Hybond-Nitrozellulosemembran gelegt. Filterpapier und Schwamm wurden in Blotpuffer getränkt und dann auf beide Seiten der Membran gelegt. Anschließend wurde dieses Sandwich in die Blotvorrichtung gespannt, dann in die Blotkammer gestellt und zusammen mit eiskaltem Blotpuffer bei 100 V unter Kühlung mit Kühlakkus für 1 h geblottet. Die Proteine werden hierbei auf die Membran transferiert und durch hydrophobe Wechselwirkungen auf dieser fixiert. Nach dem Blotten wurde die Membran standardmäßig mit Ponceau S gefärbt, um die Bloteffizienz zu testen. Anschließend erfolgte ein Waschen der Membran, bis das Ponceau S wieder vollständig entfernt war. Um unspezifische Bindestellen abzusättigen, wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer geschwenkt. Über Nacht folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C auf dem Taumelschüttler. Die Verdünnungen der Antikörper erfolgten jeweils nach Angaben des Herstellers in Blockpuffer. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal 10 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit einem an eine Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschritte. Als Substrat für die Peroxidase diente ECL, das für 5 min auf die Membran gegeben wurde. Durch die Peroxidase wird das ECL (*enhanced chemiluminescence*) so umgesetzt, dass es leuchtet. Dadurch wird der Film, der für maximal 20 min aufgelegt wurde, belichtet. Als Beladungskontrolle diente β -Tubulin.

2.2.3.7 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitation dient der Feststellung, ob bestimmte Proteine (hier der Transkriptionsfaktor p53) bestimmte Teile des endogenen Chromatins binden. Dazu wurden konfluente Beas-2B-Zellen mit *Moraxella catarrhalis* stimuliert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen (und damit die bestehenden Protein-DNA-Bindungen) durch Zugabe von 1 % Formaldehyd fixiert. Durch die Zugabe von 5 ml 0,125 M Glycin in kaltem PBS wurde die Formaldehydwirkung neutralisiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Flaschenboden in 5 ml kaltem PBS gelöst und in ein 15 ml Zellkulturrohrchen überführt. Durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min bei 4°C wurden die Zellen pelletiert und durch Zugabe von 1 ml Lysepuffer lysiert. Das Chromatin wurde mittels Ultraschall in Stücke von einigen hundert Basenpaaren Länge zertrümmert (jeweils 4 mal 1 min Schallen, 1 min Pause, bei 50% Schallintensität). Anschließend erfolgte eine

Zentrifugation mit 14.000 rpm für 20 min bei 4°C. Die Lysate wurden dann in neue Reaktionsgefäße überführt (50 µl für den Input, zweimal 250 µl für die Immunpräzipitation). Jene DNA-Stücke, die das gewünschte Protein (p53) gebunden haben, wurden durch Zugabe von 2 µg von einem für das Protein spezifischem Antikörper immunpräzipitiert. Der Ansatz rotierte über Nacht bei 4°C. Um den Antikörper-Transkriptionsfaktor-Komplex zu binden, wurden am nächsten Tag 100 µl eines Protein A/G Agarose (Beads) und ChIP-RIPA-Puffer Gemisches zu den Proben gegeben. Die Proben rotierten dann für 1-2 h bei 4°C und wurden anschließend für 1 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend folgten mehrere Waschschrte mit ChIP-RIPA-Puffer, High Salt- und TE-Puffer, um Verunreinigungen und unspezifische Bindungen zu entfernen. Durch die Zugabe von Eluierungspuffer wurden die Proteine unter Schütteln für 15 min bei 30°C von der Agarose getrennt. Nach erneuter Zentrifugation wurden 50 µl des Überstandes mit der gewonnenen DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das 150 µl TE-Puffer und 0,5% Ribonuklease A vorgelegt wurden. Für die Input-Proben wurde zusätzlich 1% SDS vorgelegt. Alle Ansätze wurden dann für 30 min bei 37°C inkubiert, mit 2,5 % Proteinase K versetzt und für 18 h in einem Thermocycler verdaut (12 h bei 37°C, 6 h bei 65°C). Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen. Anschließend kam eine PCR zur Anwendung unter Verwendung eines TLR3-Promoter-Primers, der spezifisch für die p53-Bindestelle am TLR3-Promoter ist.

2.2.4 Statistik

Alle gezeigten Versuche wurden mindestens dreimal erfolgreich und unabhängig voneinander durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde das Programm Prism 5 von Graph Pad® verwendet (Student's t-Test, One way ANOVA). Unterschiede wurden als signifikant betrachtet und in den Abbildungen mit einem Stern markiert, wenn die berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ($p < 0,05$) lag, d.h. wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Aussage unter 5% liegt. Die Abbildungen von Western Blot, PCR und ChIP-Analysen zeigen jeweils repräsentative Gele von wenigstens drei unabhängig voneinander durchgeführten Wiederholungen mit gleichem Ergebnis.

3 Ergebnisse

3.1 *Moraxella catarrhalis* induziert eine Verminderung der TLR3-Expression

3.1.1 TLR3-Regulation in Primären Bronchialepithelzellen

Um die TLR3-Expression nach einer Infektion mit *M. catarrhalis* zu untersuchen, wurden primäre Bronchialepithelzellen (*normal human bronchial epithelial cells*, *NHBE cells*) mit *M. catarrhalis* (MOI 25) über 24 h inkubiert. Unstimulierte Primärzellen dienten als Kontrolle. Im Anschluss an eine Permeabilisierung der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) die intrazelluläre TLR3-Expression bestimmt. Wie in Abbildung 3 gezeigt konnte ich eine deutlich signifikante *M. catarrhalis* - induzierte Verminderung der intrazellulären TLR3-Expression auf Proteinebene (A) beobachten. Diese Herunterregulation von TLR3 konnte auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (B) und bestätigt somit das Ergebnis der Durchflusszytometrie.

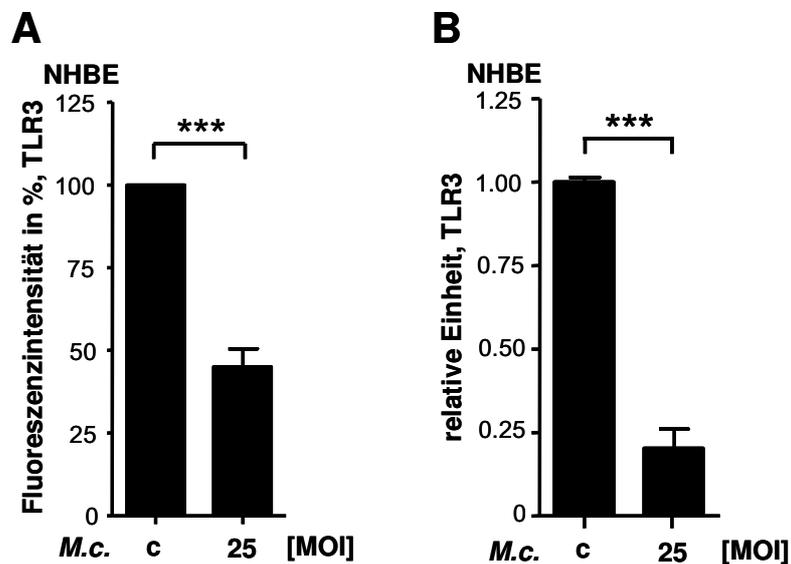


Abb. 3: Primäre Bronchialepithelzellen (*NHBE*) wurden für 24 h mit *M. catarrhalis* (Stamm O35E, MOI 25) infiziert. Anschließend wurde die TLR3-Expression auf Rezeptor-Ebene in der Durchflusszytometrie (A) und auf RNA-Ebene in der RT-qPCR (B) untersucht. Als Kontrolle dienten unstimulierte *NHBE*-Zellen. Jeder Graph zeigt die Vereinigung von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) wurden mit drei Sternen gekennzeichnet.

3.1.2 TLR3-Regulation in Beas-2B-Zellen

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die in den Primärzellen beobachtete Expressionsminderung auch mit der bronchialen Epithelzelllinie Beas-2B darstellbar ist. Dazu wurden Beas-2B-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen einer *M. catarrhalis* Suspension (MOI 2,5 und 25) über 24 h inkubiert. Anschließend wurde die intrazelluläre TLR3-Expression in der Durchflusszytometrie (FACS) gemessen. In Abbildung 4 A ist zu sehen, dass Moraxellen auch in Beas-2B-Zellen eine signifikante und konzentrationsabhängige Verminderung der Expression des intrazellulären TLR3-Rezeptors bewirken können. Der gleiche Versuchsaufbau wurde wiederholt und die Zellen in der RT-qPCR auf ihre TLR3-mRNA-Level untersucht mit dem Ergebnis, dass auch auf mRNA-Ebene eine Moraxellen-abhängige Herunterregulation von TLR3 erfolgt (Abb. 4 B). In der RT-PCR konnte nach *M. catarrhalis* – Infektion ebenfalls eine signifikant verringerte Menge TLR3-mRNA im Vergleich zu unstimulierten Zellen zeit- und dosisabhängig nachgewiesen werden. Nach Infektion mit der höheren Moraxella-Dosis (MOI 25) und einer Versuchsdauer von 24 h wurden die niedrigsten Level von TLR3-mRNA nachgewiesen. Daher wurde diese Dosis bei einer Infektionsdauer von 24 Stunden für weiterführende Versuche verwendet (Abb. 4 C).

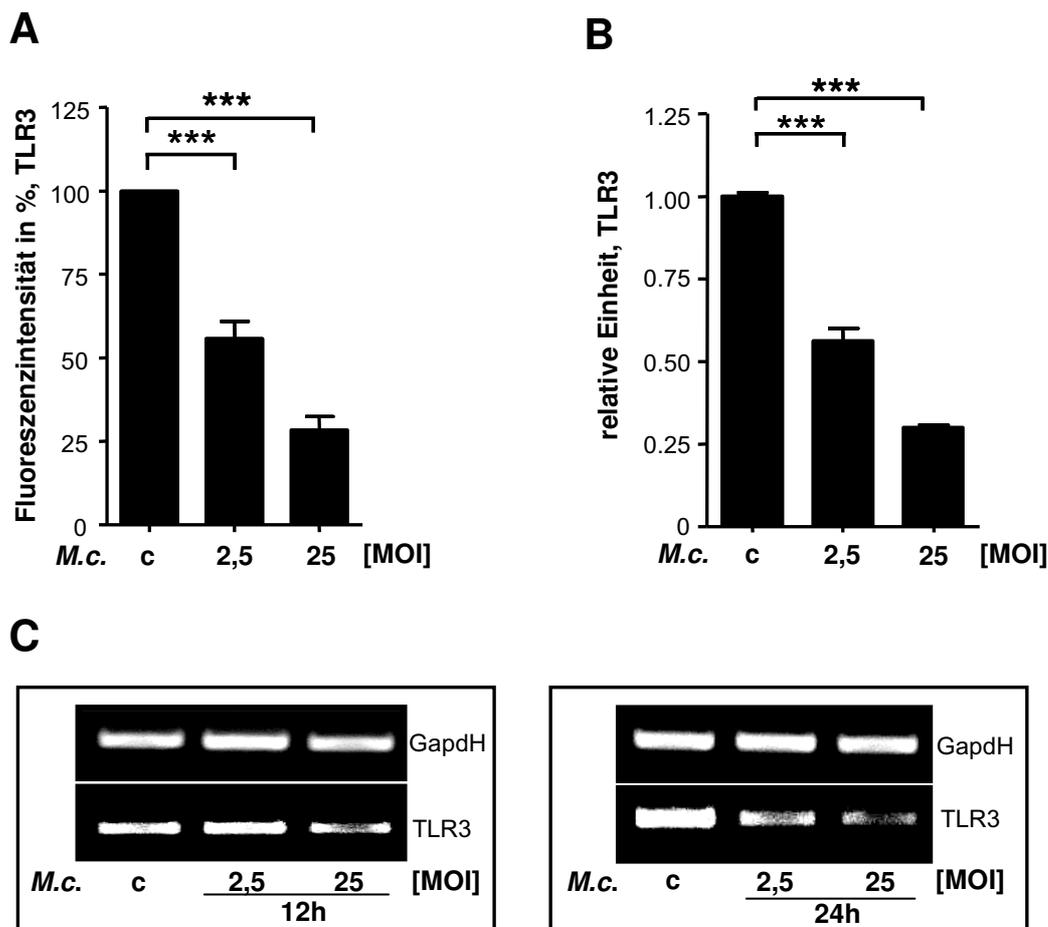


Abb. 4: Beas-2B-Zellen wurden mit dem *M. catarrhalis* - Wildtypstamm O35E (MOI 2,5 und 25) infiziert. Anschließend wurde nach 24 h die TLR3-Expression auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie (**A**) und auf RNA-Ebene in der RT-qPCR (**B**) untersucht. Die Abbildung stellt die Zusammenfassung von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) wurden mit drei Sternen gekennzeichnet. In der RT-PCR (**C**) wurde die TLR3-Expression 12 und 24 h nach der Infektion untersucht. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

3.2 Die Verminderung der TLR3-Expression ist nicht Folge von Zytotoxizität

Um auszuschließen, dass es sich bei der *M. catarrhalis* – induzierten Verringerung der TLR3-Expression lediglich um durch die Moraxellen verursachte zytotoxische Effekte handelt, wurden Beas-2B-Zellen mit einer *M. catarrhalis* Suspension (MOI 25) über 24 h inkubiert und anschließend mit Annexin und Propidiumjodid gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Mit dieser Färbung lassen sich apoptotische und

nekrotische Zellen quantifizieren und so die Anzahl lebender Zellen ermitteln. Vitale Zellen sind weder mit Annexin noch mit Propidiumjodid anfärbbar. Zellen, die dem gleichen Prozedere unterworfen waren, jedoch nicht mit Moraxellen infiziert wurden, dienten als Kontrolle. Die Analyse der Durchflusszytometrie in Abbildung 5 zeigt, dass nach einer Infektion mit Moraxellen in dem angegebenen Dosis- und Zeitfenster noch rund 85% der Zellen vital sind. Auch nicht-infizierte Zellen erreichen mit etwa 95% nicht den 100%-Wert, da es allein durch die Kultivierung und Färbung der Zellen zu geringgradigem Zelltod kommt. Zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen liegt eine Differenz von etwa 10%, die nicht signifikant ist. Durch die Ergebnisse konnte ich einen *M. catarrhalis*-induzierten Zelltod als Ursache für die verminderte Expression von TLR3 ausschließen.

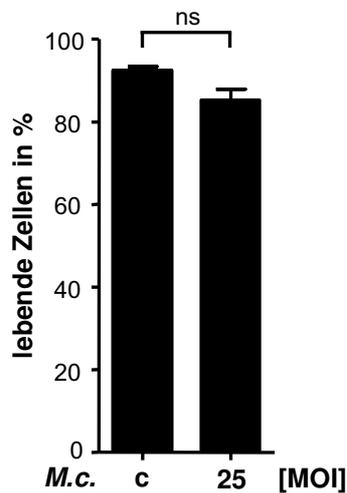


Abb. 5: Konfluente Beas-2B-Zellen wurden mit einer *M. catarrhalis* (Wildtyp O35E) Suspension (MOI 25) über 24 h inkubiert, anschließend mittels Annexin und Propidiumjodid gefärbt und der Prozentsatz lebender Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Uninfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. ns = nicht signifikant.

3.3 Vergleich der *M. catarrhalis* Stämme O35E und BBH18

In einem nächsten Schritt wurde der bisher verwendete Moraxella - Stamm O35E mit dem Stamm BBH18 auf mögliche Unterschiede hinsichtlich ihres Einflusses auf die TLR3-Expression untersucht. Beide Stämme sind klinische Isolate aus Patienten mit COPD. Bei dem Stamm O35E handelt es sich um ein amerikanisches Isolat, wohingegen BBH18 in Europa isoliert wurde (Aebi et al. 1998, Nordström et al. 2005). Beas-2B-Zellen wurden mit beiden Stämmen in aufsteigender Konzentration für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Menge der TLR3-mRNA in den Zelllysaten bestimmt. Wie in Abbildung 6 ersichtlich, waren beide Stämme konzentrationsabhängig in der Lage, TLR3 zu supprimieren. Zwischen den Stämmen fand sich kein signifikanter Unterschied.

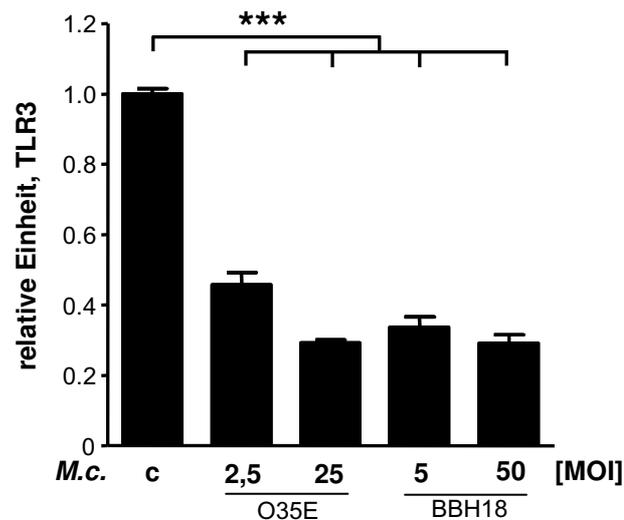


Abb. 6: Beas-2B-Zellen wurden mit den *M. catarrhalis* – Stämmen O35E (MOI 2,5 und 25) und BBH18 (MOI 5 und 50) infiziert. Die Infektionsdauer betrug 24 h. In den Lysaten wurde mittels RT-qPCR TLR3-mRNA nachgewiesen. Nicht infizierte Zellen dienten als Kontrolle. Der hier abgebildete Graph stellt die Zusammenfassung von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen dar. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) wurden mit drei Sternen gekennzeichnet.

3.4 Einfluss spezifischer Pathogenitätsfaktoren auf die TLR3-Expression

3.4.1 Einfluss der Viabilität der Moraxellen

In der nächsten Versuchsreihe habe ich untersucht, ob die Herunterregulation von TLR3 eine Lebendleistung der Moraxellen ist, oder ob die Erkennung von einzelnen *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) von *M. catarrhalis* ursächlich für die Beobachtung ist. Dazu wurde durch Hitze oder ultraviolettes (UV-) Licht eine Inaktivierung der Bakterien vorgenommen. Als Nachweis nicht mehr lebensfähiger Bakterien wurden die inaktivierten Moraxellen auf Agarplatten ausgestrichen und 24 h inkubiert. Auf den Platten war kein Bakterienwachstum sichtbar. Anschließend wurden konfluente Beas-2B-Zellen mit lebenden, hitzeinaktivierten oder UV-inaktivierten Moraxellen in gleichen Konzentrationen inkubiert. Die mRNA der Zellen wurde nach 24 h isoliert. Die Quantifizierung der TLR3-mRNA erfolgte mittels RT-qPCR. Hier zeigte sich, dass inaktivierte Bakterien die TLR3-Expression nicht signifikant beeinflussen können, wohingegen lebende Moraxellen die Expression von TLR3 senken. Für die Regulation von TLR3 sind demnach lebende Bakterien erforderlich (Abb. 7).

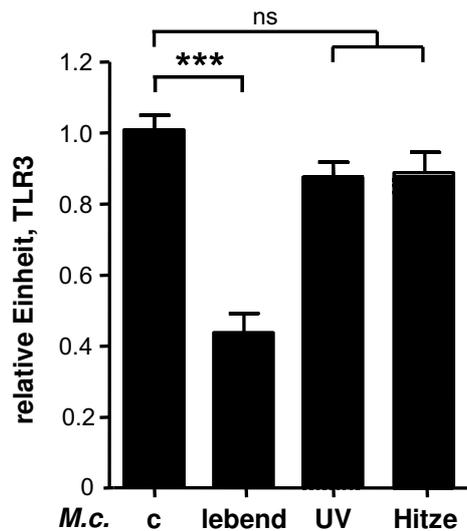


Abb. 7: Beas-2B-Zellen wurden mit lebenden und inaktivierten (Hitze/UV) Moraxellen (MOI 25) inkubiert. Nicht stimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 24 h wurde die RNA aus den Zellen isoliert und die TLR3-mRNA in der RT-qPCR quantifiziert. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) wurden mit drei Sternen gekennzeichnet. ns = nicht signifikant.

3.4.2 Vergleich bedeutender Virulenzfaktoren (OMPS, LOS)

Zur Identifikation *M. catarrhalis* - spezifischer Virulenzfaktoren, die für die Regulation der TLR3-Rezeptorexpression ursächlich sein könnten, wurden Beas-2B-Zellen mit unterschiedlichen Moraxella - Deletionsmutanten, bei denen die Expression bestimmter Virulenzfaktoren ausgeschaltet wurde, im Vergleich zum *M. catarrhalis* - Wildtypstamm O35E infiziert. Tabelle 3-1 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Deletionsmutanten.

Tabelle 3-1: Stamm O35E – Deletionsmutanten

Stamm / Mutante	Defizienz, verantwortlich für
Stamm O35E	Keine
Mutante O35E.1	UspA1, Adhäsion
Mutante O35E.2	UspA2, Adhäsion und Komplementresistenz
Mutante O35E.1.2	UspA1 und UspA2
Mutante O35E.lpx.A	LOS, Komplementresistenz
Mutante O35E.HG	Hag, Adhäsion, Häm- und Autoagglutination

Anschließend wurde die *M. catarrhalis* induzierte Änderung der TLR3 - Expression nach Infektion mit den Deletionsmutanten mittels RT-qPCR quantifiziert und verglichen. Wie in Abbildung 8 demonstriert, zeigte sich nach der Infektion mit den aufgelisteten Deletionsmutanten, dass die Verminderung der TLR3 - Expression aller Mutanten vergleichbar mit der des Wildtypstammes O35E ist. Eine Abhängigkeit von den getesteten Pathogenitätsfaktoren liegt demnach nicht vor.

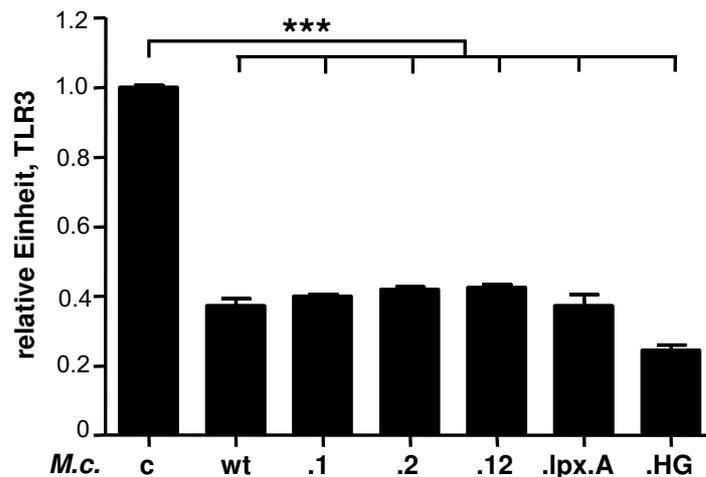


Abb. 8: Die Abbildung stellt die TLR3-Expression in Beas-2B-Zellen 24 h nach Infektion mit dem Wildtypstamm O35E (wt) sowie dessen UspA1, UspA2, UspA1+2, LOS und hag depletierten Mutanten (O35E.1, O35E.2, O35E.1.2, O35E.lpx.A, O35E.HG) im Vergleich dar. Mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche wurden in diesem Graph zusammengefasst. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) wurden mit drei Sternen gekennzeichnet.

3.5 Mechanismus der Verminderung der TLR3-Expression

3.5.1 Interleukin-1 β , EGFR, TLRs

In einem nächsten Schritt haben wir untersucht, ob die Modulation der TLR3 - Expression von Aktivierungen von *pattern recognition receptors* (PRRs) oder / und der Induktion von zellulärem Stress abhängig ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden verschiedene Stimulantien verwendet, die in Tabelle 3-2 aufgeführt sind. Beas-2B-Zellen wurden mit diesen Substanzen über 24 h inkubiert. Nach Versuche erfolgte die Lyse der Zellen und die Isolierung der mRNA. Eine Quantifizierung der TLR3-

mRNA wurde mit der RT-qPCR durchgeführt. Abbildung 9 zeigt, dass keine der verwendeten Substanzen einen Einfluss auf die TLR3-Expression hat. Es gab keine signifikanten Abweichungen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen.

Tabelle 3-2: Substanzen, für die eine Beteiligung an der TLR3-Regulation untersucht wurde

Substanz (Abkürzung)	Wirkung
Interleukin-1 β (IL-1 β)	Entzündungsmediator
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	EGFR-Agonist
Pam3Cys (P3C)	TLR2-Agonist
Poly(I:C) (PI:C)	TLR3-Agonist
Lipopolysaccharid (LPS)	TLR4-Agonist
Flagellin (Flg)	TLR5-Agonist
Diaminopimelinsäure (C12)	NOD1-Agonist
Muramyldipeptid (MDP)	NOD2-Agonist

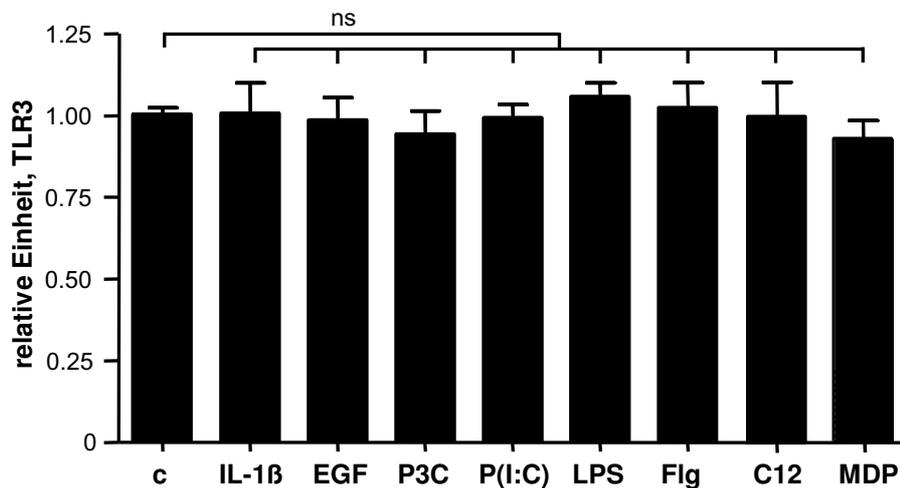


Abb. 9: Konfluente Beas-2B-Zellen wurden über 24 h mit Interleukin-1 β (IL-1 β), dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Pam3Cys (P3C), Poly(I:C) (PI:C), Lipopolysaccharid (LPS), Flagellin (Flg), Diaminopimelinsäure (C12) und Muramyldipeptid (MDP) inkubiert. Die Quantifizierung der TLR3-mRNA erfolgte mittels RT-qPCR. Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen wurden in diesem Graph zusammengefasst. ns = nicht signifikant.

3.5.2 Inhibition wichtiger Rezeptoren und Schlüsselenzyme

Um die Regulationsmechanismen der *M. catarrhalis* - induzierten TLR3 - Modulation genauer zu untersuchen haben wir Inhibitoren wichtiger Rezeptoren und Schlüsselenzyme von zellulären Signalwegen eingesetzt. Beas-2B-Zellen wurden vor der Infektion mit *M. catarrhalis* mit den in Tabelle 3-3 aufgelisteten Inhibitoren inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR und RT-qPCR.

Tabelle 3-3: Inhibitoren wichtiger Rezeptoren und Schlüsselenzyme, für die eine Beteiligung an der TLR3-Regulation untersucht wurde

Inhibitoren	eingesetzte Konzentration	Spezifität
AG1478	1, 5 und 10 μ M	<i>epidermal growth factor receptor</i> (EGFR)
U0126	1 und 10 μ M	<i>extracellular signal-regulated kinase 1, 2</i> (ERK)
SB202190	50 nM	<i>p38 mitogen activated protein kinase</i> (MAPK)
JNK Inhibitor II	40 und 100 nM	<i>c-jun-N-terminal kinase 1,2,3</i> (JNK)
NF- κ B Activation Inhibitor	10 nM	<i>nuclear transcription factor-κB</i> (NF- κ B)
SB216763	50 und 100 nM	<i>glycogen synthase kinase 3</i> (GSK)
Ly294002	10 und 50 μ M	Phosphoinositid-3-Kinase
PP2 529573	5 und 20 μ M	<i>spleen tyrosine kinase</i> (Syk)

Beas-2B-Zellen wurden für 1 h mit dem jeweiligen Inhibitor inkubiert, anschließend wurden die Zellen nach einem Mediumwechsel über 24 h mit dem Moraxellen-Wildtyp O35E stimuliert. Zellen, die weder mit Inhibitor noch mit Moraxellen inkubiert und Zellen, die nur mit dem Inhibitor stimuliert wurden, dienten als Kontrolle. Die

Auswertung dieser Versuche lieferte die Erkenntnis, dass alle untersuchten Signaltransduktionswege sowie der EGFR-Rezeptor nicht an der Moraxellen - induzierten TLR3-Expressionsenkung beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden die Abbildungen hier nicht dargestellt.

3.5.3 Moraxellen regulieren die TLR3-Expression über p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 reguliert als Transkriptionsfaktor Zellzyklus und Apoptose. DNA-Schäden oder abnormale Proliferation von Zellen resultieren in einer erhöhten Aktivität von p53, wodurch Zellzyklusarrest oder Apoptose eingeleitet werden (Rivas et al. 2010). Es ist bereits bekannt, dass p53 ein positiver Regulator der TLR3-Expression ist (Taura et al. 2008). Daher haben wir in einem nächsten Schritt untersucht, ob die Expression von p53 ebenfalls von *M. catarrhalis* moduliert wird. Dafür haben wir Beas-2B-Zellen über 24 h mit *M. catarrhalis* (MOI 25) infiziert, lysiert und anschließend p53-mRNA in der RT-qPCR quantifiziert. Wie in Abbildung 10 A dargestellt, zeigte sich, dass *M. catarrhalis* in der Lage ist, die p53-Expression signifikant zu vermindern. An unstimulierten Zellen konnte keine Veränderung der p53-Expression gemessen werden.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob auch inaktivierte Moraxellen (UV/Hitze), Poly(I:C) oder TNF- α die p53-Level beeinflussen können. Die Auswertung erfolgte mittels Western Blot. Das Ergebnis der RT-qPCR konnte im Western Blot bestätigt werden. Die Proteinlevel von p53 werden durch lebende Moraxellen deutlich reduziert (Abb. 10 B), wohingegen inaktivierte Moraxellen, sowie Poly(I:C) und TNF- α die Menge an p53-Protein nicht beeinflussen konnten. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle.

Im nächsten Schritt sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen p53 und TLR3 untersucht werden. Dazu wurde die Expression von p53 durch RNA-Interferenz gesenkt. Die RT-qPCR in Abbildung 10 C zeigt den *knockdown* von p53 in zwei Sequenzen nach 24 h. Die mit p53-siRNA transfizierten Zellen wiesen eine signifikant verringerte Expression von p53 im Vergleich zu den Zellen auf, die mit Kontroll-siRNA (csi) transfiziert wurden. Zellen, die mit Sequenz 1 transfiziert wurden, zeigten wiederum niedrigere p53-Level im Vergleich zu Zellen, die mit Sequenz 2 behandelt wurden. Für folgende Versuche wurden daher beide Sequenzen oder nur Sequenz 1 verwendet. Als nächstes wurden die p53-transfizierten Zellen in der RT-qPCR auf ihre

TLR3-Expression hin untersucht (Abb. 10 D). Zu sehen ist, dass ein Gen-Silencing von p53 eine deutlich verringerte TLR3-Expression zur Folge hat.

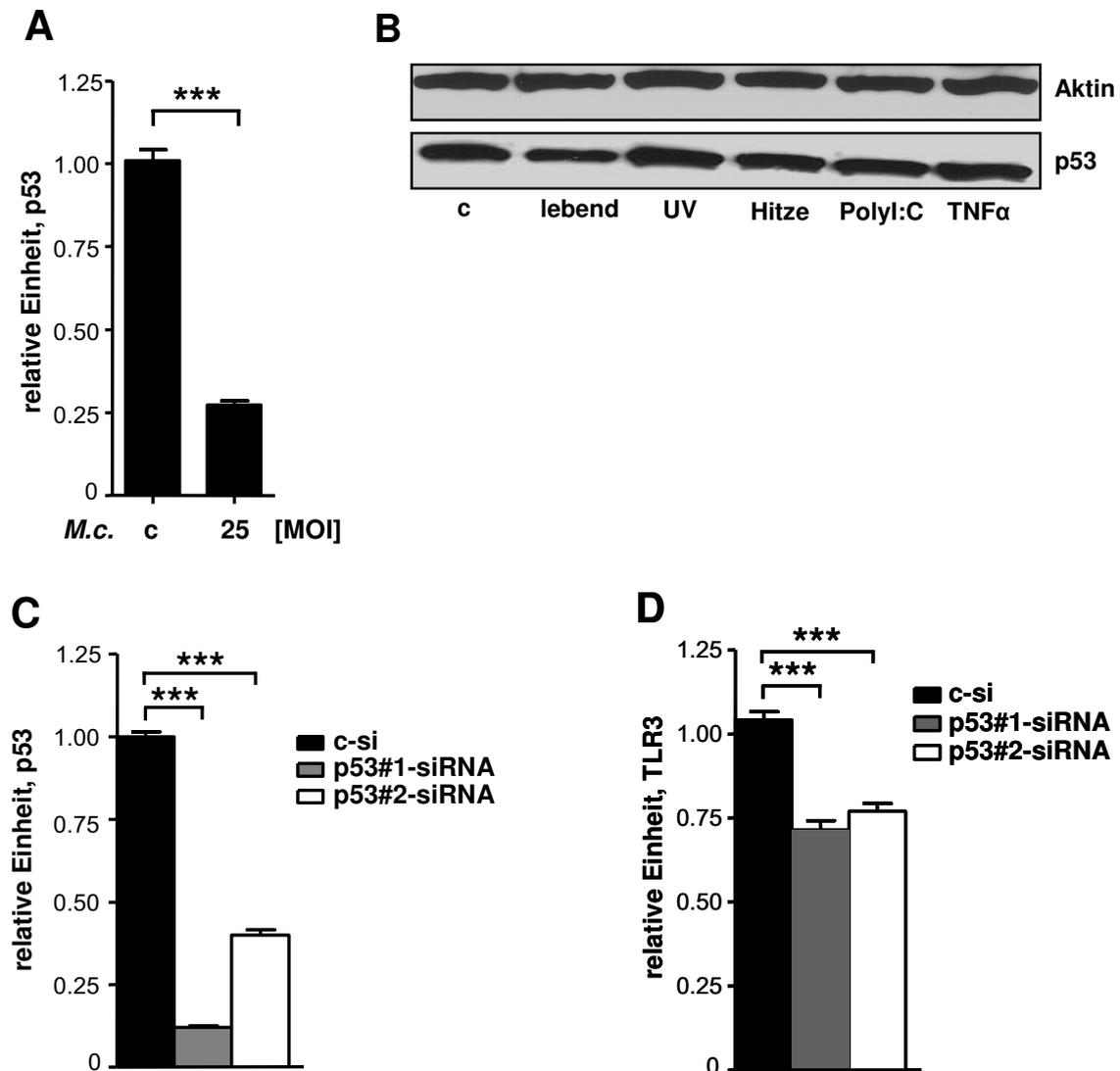


Abb. 10: Beas-2B-Zellen wurden mit *M. catarrhalis* – Wildtypstamm O35E infiziert (MOI 25). Die Infektionsdauer betrug 24 h. In den Lysaten erfolgte mittels RT-qPCR die Bestimmung der p53-mRNA. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle (**A**). Außerdem wurden die wie unter (A) infizierten Zellen und Zellen, die für 24 h mit inaktivierten Moraxellen, Poly(I:C) und TNF- α stimuliert wurden, mittels Western Blot auf p53 Protein untersucht. Zu sehen ist eine Hybond ECL-Membran mit den entsprechenden Protein-Banden (**B**). (**C**) zeigt den *knockdown* von p53 in zwei Sequenzen nach 24 h. Mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen dienten dem Vergleich. Anschließend wurde nach einem Gen-Silencing von p53 die TLR3-Expression bestimmt. Zum Vergleich dienten Zellen, die lediglich mit Kontroll-siRNA inkubiert waren (**D**). In den Graphen A, C und D wurden mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche zusammengefasst. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) wurden mit drei Sternen gekennzeichnet. Abbildung B ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Stimulationen.

3.5.3.1 Nach Infektion mit lebenden Moraxellen bindet weniger p53 am TLR3-Promoter

Es wurde bereits nachgewiesen, dass p53 über die Bindung am TLR3-Promoter in der Lage ist, das TLR3-Gen positiv zu regulieren (Taura et al. 2008). Um herauszufinden, ob es durch die Infektion mit *M. catarrhalis* zu einer verminderten Bindung von p53 am TLR3-Promoter kommt, wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) durchgeführt. Dazu wurden konfluente Beas-2B-Zellen mit *M. catarrhalis* lebend und UV-inaktiviert jeweils in einer MOI von 25 über 24 h infiziert. Die Proben wurden in der RT-PCR ausgewertet. Die Ergebnisse in Abbildung 11 zeigen, dass es nach der Infektion mit lebenden Moraxellen zu einer verminderten Bindung von p53 am TLR3-Promoter kommt. Auch die Bindung der Polymerase II als Nachweis der eingeleiteten Transkription ist vermindert. Im Vergleich dazu zeigten mittels UV Exposition abgetötete Moraxellen keine dieser Beeinflussungen, die Bindung von p53 und Polymerase II zeigte keinen Unterschied zu der Bindung in unstimulierten Kontrollzellen.

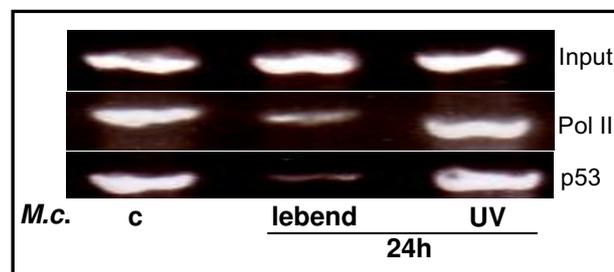


Abb. 11: Beas-2B-Zellen wurden mit *M. catarrhalis* – Wildtypstamm O35E lebend und UV-inaktiviert in einer MOI von 25 infiziert. Die Infektionsdauer betrug 24 h. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und lysiert. Die DNA-Abschnitte, an denen p53 und die RNA-Polymerase II (Pol II) gebunden waren, wurden durch Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) aufgereinigt. Der gewünschte DNA-Abschnitt der TLR3-Promoterregion wurde anschließend in einer ChIP-PCR amplifiziert. Die Abbildung zeigt ein Agarose-Gel mit den entsprechenden DNA-Banden. Die Bindung der RNA-Polymerase II an die Promoterregion diente als Kontrolle zum Nachweis der eingeleiteten Transkription. Die Amplifikation der Promoterregion in der Gesamt-DNA-Fraktion (Input) erfolgte zum Nachweis des Einsatzes identischer DNA-Mengen. Das Agarose-Gel ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

3.6 Einfluss der *M. catarrhalis* – induzierten Verminderung der p53-Expression auf Zellproliferation und Apoptose

Anschließend sind wir der Frage nachgegangen, welche Bedeutung eine Infektion mit *M. catarrhalis* für Zellproliferation und Apoptose hat. Aufschlüsse darüber sollte die Untersuchung des Ki-67 Proteins in infizierten Zellen geben. Bei Ki-67 handelt es sich um ein nukleäres Antigen, das lediglich in proliferierenden Zellen in der S-, G2-, M- und der G1-Phase des Zellzyklus vorkommt. In der G0-Phase der Zelle kann Ki-67 nicht detektiert werden, d.h. ruhende Zellen exprimieren das Ki-67 Antigen nicht. Ki-67 kann daher zum Markieren von Zellen im Gewebe verwendet werden, die sich vermehren. Mit ihm lässt sich also die sogenannte Wachstumsfraktion einer Zellpopulation bestimmen (Gerdes et al. 1984). Dazu wurden Beas-2B-Zellen mit *M. catarrhalis* (MOI 25) über 24 h infiziert. Nach Versuchende wurde die Expression von Ki-67 in der Durchflusszytometrie analysiert. Nicht infizierte Zellen dienten als Kontrolle.

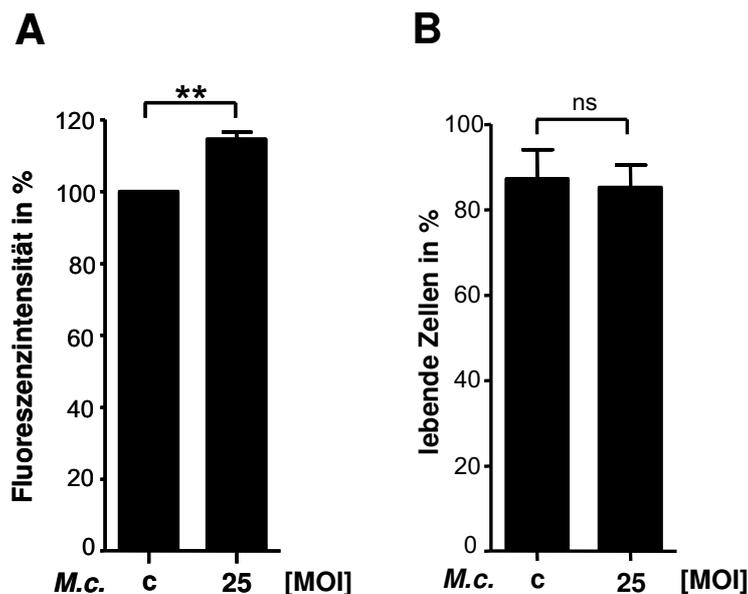


Abb. 12: Konfluente Beas-2B-Zellen wurden mit dem Wildtypstamm O35E (MOI 25) infiziert. Die Infektionsdauer betrug 24 h. Anschließend wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Nicht infizierte Zellen dienten als Kontrolle. Abbildung **A** zeigt die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67. In Abbildung **B** ist eine Annexin-Propidiumjodid-Färbung zu sehen. Die Graphen stellen die Zusammenfassung von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar. Signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) wurden mit zwei Sternen gekennzeichnet. ns = nicht signifikant.

Diese Versuche lieferten das Ergebnis, dass die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in mit *M. catarrhalis* infizierten Zellen signifikant erhöht ist (Abb. 12 A). Parallel dazu wurden auf gleiche Weise infizierte Zellen mit Annexin und Propidiumjodid gefärbt. Die Analyse der Durchflusszytometrie dieser Zellen in Abbildung 12 B zeigt, dass Moraxellen in dem stets verwendeten Dosis- und Zeitfenster (MOI 25, 24 h Infektionszeit) die Zellvitalität nicht beeinflussen. Es gab keine signifikanten Abweichungen von der Vitalität nicht infizierter Zellen (beide etwa 85%).

3.7 *M. catarrhalis* reguliert weitere Rezeptoren und Adaptern

Nachdem die durch *M. catarrhalis* induzierte und p53-abhängige Verminderung der TLR3-Expression nachgewiesen werden konnte, sollte ermittelt werden, ob auch weitere Rezeptoren oder wichtige Adaptermoleküle durch *M. catarrhalis* reguliert werden. Dafür wurden Beas-2B-Zellen wie bisher mit einer Moraxellen-Suspension (O35E Wildtyp, MOI 25) über 24 h infiziert. Anschließend erfolgten die Zelllyse und die Quantifizierung der mRNA des zu untersuchenden Zielgens in der RT-qPCR.

3.7.1 RIG-I, MDA-5, TRIF

Ein erster Fokus lag auf der Untersuchung der intrazellulären PRRs RIG-I (*retinoic acid inducible gene - 1*) und MDA5 (*melanoma differentiation associated gene - 5*) und auf TRIF (*Toll / IL-1R homologous region (TIR) - domain-containing adapter inducing IFN β*) als Adaptermolekül des TLR3 Signalweges. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 13 A-C zu sehen. Sowohl RIG-I, als auch MDA-5 und TRIF werden durch *M. catarrhalis* signifikant herunterreguliert.

Um zu klären, ob diese Expressionsminderung auch p53-abhängig ist, wurden Beas-2B-Zellen wie zuvor beschrieben mit p53-siRNA transfiziert und anschließend die Expression der drei Gene in der RT-qPCR untersucht. Abbildung 13 D-F zeigt die Ergebnisse. Die mit p53-siRNA transfizierten Zellen wiesen keine verringerte Expression von RIG-I, MDA-5 und TRIF im Vergleich zu den Zellen auf, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden.

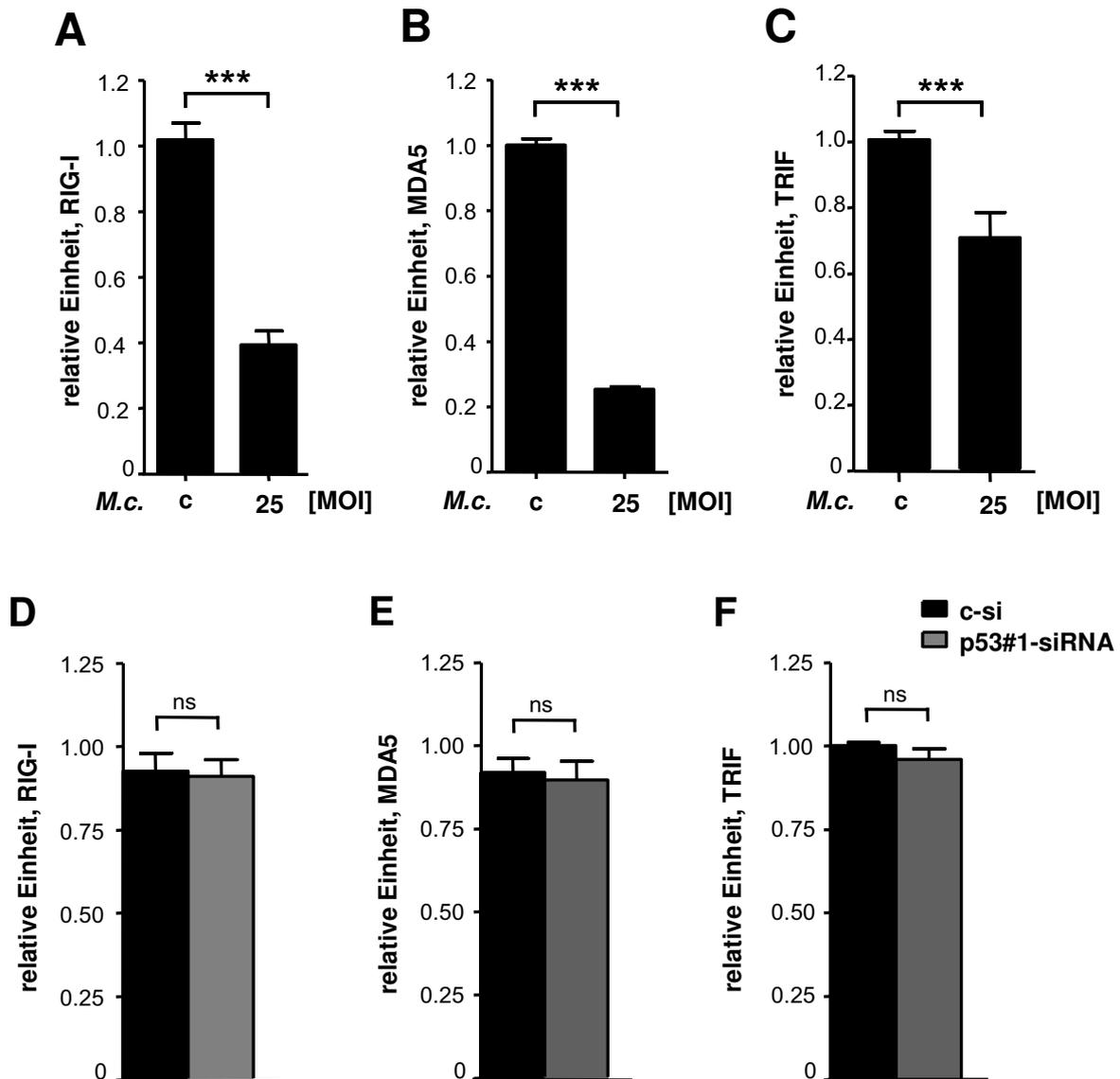


Abb. 13 A-C: Konfluente Beas-2B-Zellen wurden mit einer Moraxella-Suspension (O35E Wildtyp, MOI 25) infiziert. Die Versuchsdauer betrug 24 h. Im Anschluss daran wurden die Zellen lysiert und in der RT-qPCR auf die Expression von RIG-I, MDA-5 und TRIF untersucht. Nicht mit *M. catarrhalis* infizierte Zellen waren die Kontrolle. **D-F:** Konfluente Beas-2B-Zellen wurden mit p53-siRNA Sequenz 1 transfiziert. Nach 24 h erfolgten die Zellyse und die Quantifizierung der mRNA von RIG-I, MDA-5 und TRIF in der RT-qPCR. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit Kontroll-siRNA (c-siRNA) inkubiert waren. Jeder Graph stellt die Zusammenfassung von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) wurden mit drei Sternen gekennzeichnet. ns = nicht signifikant.

3.7.2 ICAM-1 und TLR2

Im Anschluss an die bisher gewonnenen Erkenntnisse, sollte der Einfluss von *M. catarrhalis* auf die Expression von ICAM-1 und TLR2 untersucht werden. Konfluente Beas-2B-Zellen wurden mit einer *M. catarrhalis* Suspension (MOI 25) über 24 h inkubiert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie und RT-qPCR die Expression von ICAM-1 auf Rezeptor- und mRNA-Ebene, die Expression von TLR2 auf mRNA-Ebene bestimmt. Abbildung 14 zeigt eine signifikante *M. catarrhalis* - induzierte Erhöhung der Expression von ICAM-1 auf Proteinebene (A), was auf mRNA-Ebene bestätigt werden konnte (B). Auch für TLR2 ließ sich eine durch Moraxella – Infektion deutlich gesteigerte Expression auf mRNA-Ebene nachweisen.

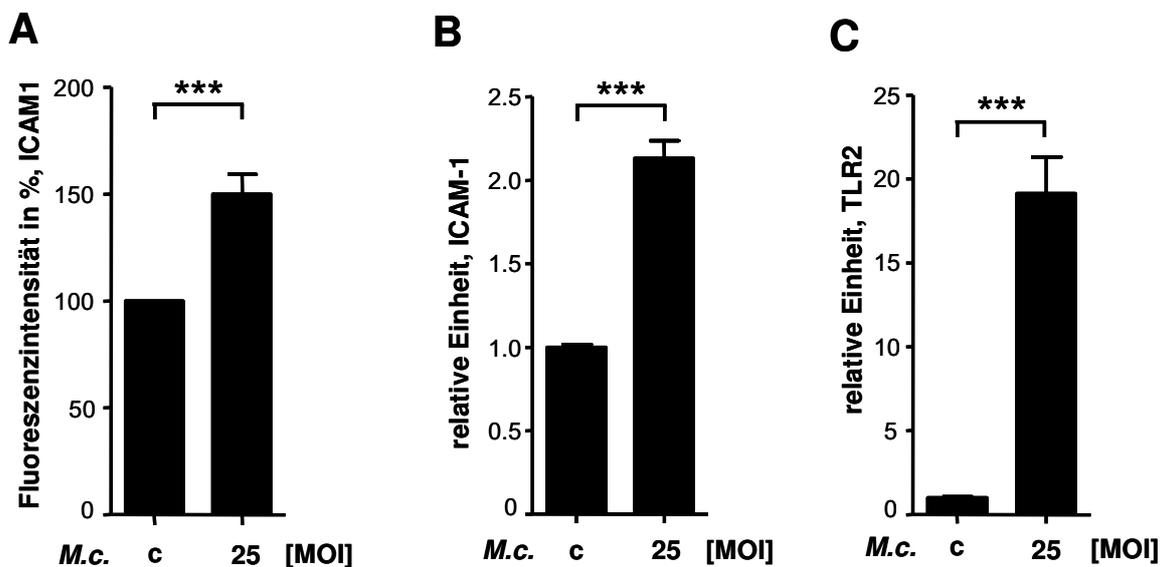


Abb. 14: Beas-2B-Zellen wurden für 24 h mit dem *M. catarrhalis* - Wildtypstamm O35E (MOI 25) infiziert. Anschließend wurde die ICAM-1-Expression auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie (A) und auf mRNA-Ebene in der RT-qPCR (B), die TLR2-Expression auf mRNA-Ebene in der RT-qPCR (C) untersucht. Die Graphen stellen die Vereinigung von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) wurden mit drei Sternen gekennzeichnet.

3.8 Funktionelle Bedeutung der *M. catarrhalis* - induzierten Verminderung der TLR3-Expression

3.8.1 Poly(I:C) induziert dosis- und zeitabhängig IL-8 und IFN β

Die Erkennung von ds-RNA Viren durch TLR3 resultiert in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und *interferon regulatory factor* (IRF)-3, die für die IL-8 und IFN β Genexpression erforderlich sind und antivirale Immunität vermitteln (Slater et al. 2010). Um die Funktionalität des Rezeptors in Beas-2B-Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen mit dem TLR3-spezifischen Liganden Poly(I:C) behandelt und seine Auswirkungen auf die pathogen-assoziierte Entzündungsreaktion durch Nachweis der IL-8 Sekretion im ELISA und der IFN β Produktion in der RT-qPCR bestimmt. Es konnte dargestellt werden, dass die Poly(I:C) / TLR3-Bindung zu einer zeit- sowie dosisabhängigen IL-8 und IFN β Produktion der Zellen führte (Abb. 15).

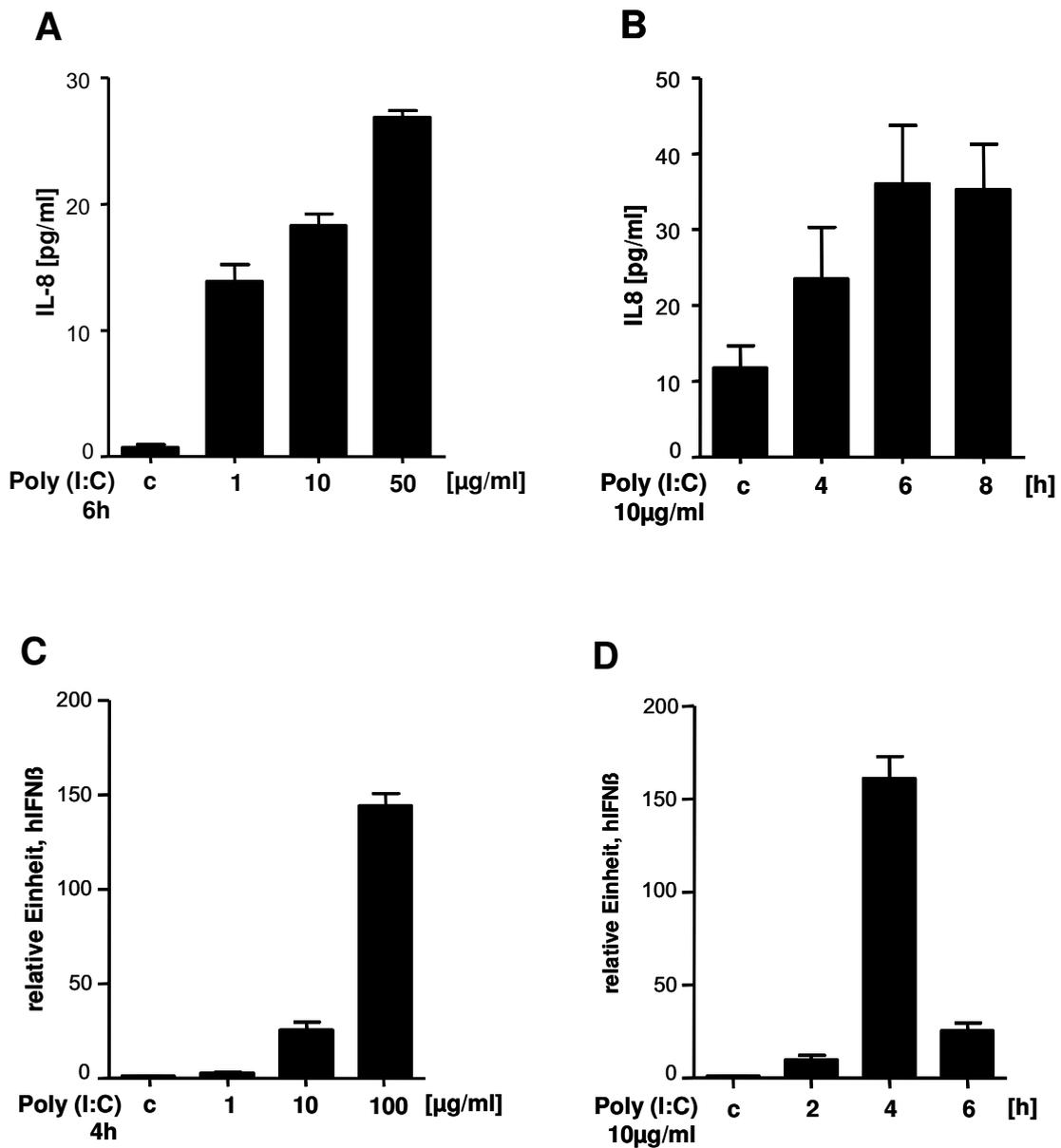


Abb. 15: Zur Bestimmung der IL-8 Sekretion wurden Beas-2B-Zellen mit Poly(I:C) mit den angegebenen Dosierungen über 6 h **(A)** und bei einer Dosierung von 10 µg/ml über die angegebenen Zeiten stimuliert **(B)**. Anschließend wurde die IL-8 Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Die IFNβ Level wurden durch Inkubation der Beas-2B-Zellen mit Poly(I:C) mit den angegebenen Dosierungen über 4 h **(C)** und bei einer Dosierung von 10 µg/ml über die angegebenen Zeiten bestimmt **(D)**. Mit der RT-qPCR wurde die IFNβ mRNA quantifiziert. Zu sehen ist die Zusammenfassung von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

3.8.2 Die Vorinkubation mit *M. catarrhalis* führt zu einer verminderten Poly(I:C) induzierten NF- κ B Immunantwort

Im nächsten Schritt wurden Beas-2B-Zellen über 16 h mit *M. catarrhalis* (Stamm O35E, MOI 5) vorinkubiert. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen, um den Großteil der Bakterien wieder vom Epithel zu entfernen. Anschließend wurde Poly(I:C) in einer Dosierung von 10 μ g/ml auf die mit *M. catarrhalis* vorinkubierten und auf nicht vorinkubierte Zellen gegeben. Nach 6 h wurden die Überstände abgenommen und die IL-8 Konzentration mittels ELISA im Zellüberstand gemessen. Abbildung 16 A zeigt, dass für 6 h zugesetztes Poly(I:C) auf nicht mit *M. catarrhalis* vorinkubierten Zellen zu einem deutlichen Anstieg der IL-8 Konzentration verglichen mit unstimulierten Zellen führt. Waren die Zellen aber vorher über 16 h mit *M. catarrhalis* vorstimuliert und das Poly(I:C) im Anschluss daran nach einem Mediumwechsel über weitere 6 h zugesetzt worden, führte dieses zu einer signifikant geringeren Steigerung der IL-8 Konzentration verglichen mit der IL-8 Konzentration, die durch Poly(I:C) auf unbehandelten Zellen hervorgerufen wurde.

Um das Phänomen der *cross-tolerance* auszuschließen, wurden die Versuche unter Verwendung von Lipopolysaccharid (LPS) anstelle von *M. catarrhalis* wiederholt. *Cross-tolerance* ist definiert als Toleranz gegenüber bestimmter Stimuli, die durch vorherige Exposition mit Endotoxin ausgelöst wird (Saturnino et al. 2010). Dazu wurden Beas-2B-Zellen wie zuvor für *M. catarrhalis* beschrieben für 16 h mit LPS vorinkubiert. Anschließend wurde auf die mit LPS vorbehandelten Beas-2B-Zellen Poly(I:C) für 6 h in einer Konzentration von 10 μ g/ml gegeben. Die IL-8 Konzentration im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Abbildung 16 B zeigt, dass nach LPS-Vorinkubation die nach *M. catarrhalis*-Vorinkubation beobachtete Verminderung der Poly(I:C) induzierten IL-8 Sekretion nicht zu erkennen ist. Die Zellen produzieren mit und ohne LPS-Vorinkubation in etwa gleich hohe IL-8 Level, was eine *cross-tolerance* ausschließt. Eine Beeinflussung der TLR3-Expression durch LPS konnte durch RT-qPCR Experimente ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

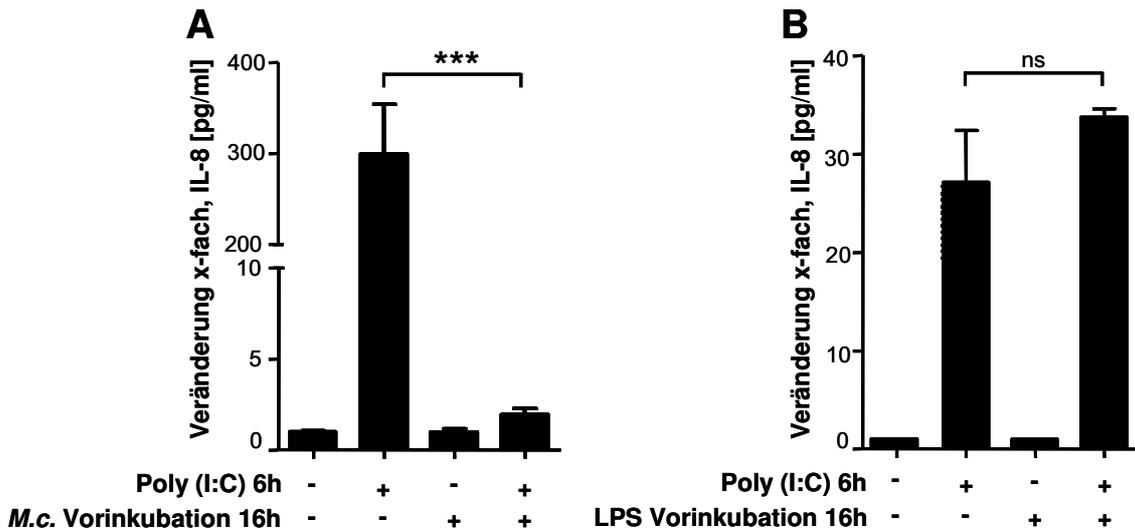


Abb. 16: Beas-2B-Zellen wurden über 16 h mit *M. catarrhalis* (Stamm O35E, MOI 5) stimuliert. Im Anschluss daran wurde für 6 h Poly(I:C) in einer Konzentration von 10 µg/ml auf die mit *M. catarrhalis* vorinkubierten Zellen und auf nicht vorinkubierte Zellen gegeben. Anschließend erfolgte mittels ELISA die Bestimmung der IL-8 Konzentration im Zellüberstand (**A**). Zum Ausschluss einer *cross-tolerance* wurden Beas-2B-Zellen für 16 h mit LPS vorinkubiert. Anschließend wurde Poly(I:C) für 6 h in einer Konzentration von 10 µg/ml auf die Zellen gegeben. Die Bestimmung der IL-8 Konzentration im Zellüberstand erfolgte mittels ELISA (**B**). Die abgebildeten Graphen zeigen die Vereinigung von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen, in denen die einzelnen Werte je als Duplikett angelegt waren. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) wurden mit drei Sternen gekennzeichnet. ns = nicht signifikant.

3.8.3 Die Vorinkubation mit *M. catarrhalis* führt zu einer verminderten Poly(I:C) induzierten antiviralen Immunantwort

3.8.3.1 Bestimmung von IFN β

Um zu prüfen, ob die beschriebenen Auswirkungen der, durch Inkubation der Zellen mit *M. catarrhalis* induzierten, verminderten TLR3-Expression auf die IL-8 Sekretion auch die IFN β – Expression beeinflussen, wurden die unter 3.8.2 beschriebenen Versuche unter Bestimmung von IFN β wiederholt. Im Unterschied zu den in 3.8.2 beschriebenen Versuchen wurde Poly(I:C) in Anlehnung an die Dosis- und Zeitreihen für IFN β (siehe 3.8.1) für 4 h zugesetzt. Wie in Abbildung 17 A dargestellt, führte für 4 h zugesetztes Poly(I:C) auf nicht mit *M. catarrhalis* vorinkubierten Zellen zu einem deutlichen Anstieg der IFN β -mRNA Konzentration verglichen mit unstimulierten Zellen. Erfolgte jedoch über 16 h eine Stimulation mit *M. catarrhalis* (Stamm O35E, MOI 5) und im Anschluss daran nach einem Mediumwechsel die Zugabe von Poly(I:C) über

weitere 4 h, führte dies zu einer signifikant geringeren Steigerung der IFN β -mRNA Konzentration verglichen mit der IFN β Konzentration, die durch Poly(I:C) auf unbehandelten Zellen induziert wurde. In Abbildung 17 B ist dargestellt, dass auch für IFN β das Phänomen der *cross-tolerance* (sh. 3.8.2) ausgeschlossen werden kann.

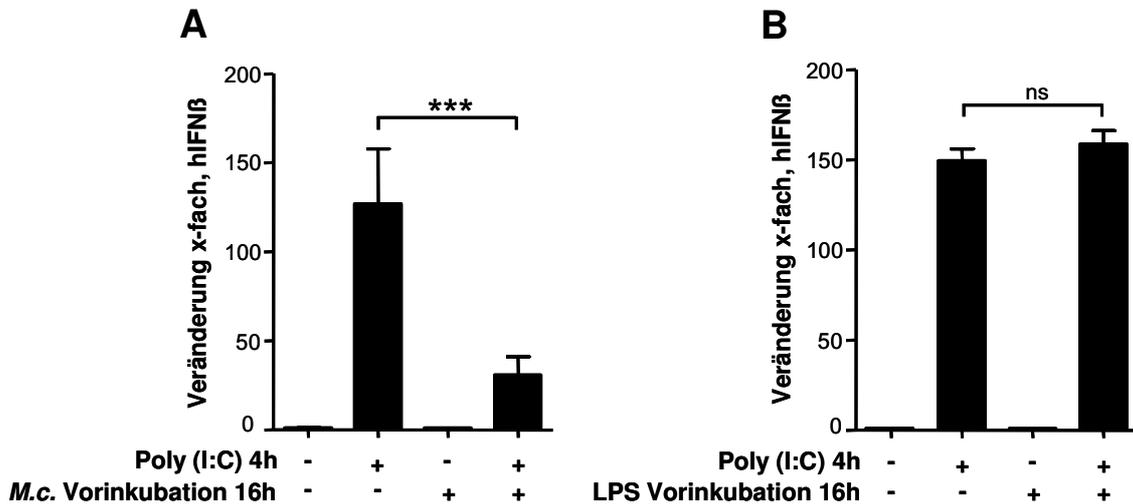


Abb. 17: Beas-2B-Zellen wurden über 16 h mit *M. catarrhalis* (Stamm O35E, MOI 5) stimuliert. Anschließend wurde für 4 h Poly(I:C) in einer Konzentration von 10 μ g/ml zugegeben. Mittels RT-qPCR erfolgte die Bestimmung der IFN β -mRNA Konzentration in den Zelllysaten (**A**). Zum Ausschluss einer *cross-tolerance* wurden Beas-2B-Zellen für 16 h mit LPS vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Poly(I:C) in einer Konzentration von 10 μ g/ml für 4 h. Die Bestimmung der IFN β -mRNA in den Zelllysaten erfolgte mittels RT-qPCR (**B**). In den Graphen sind jeweils mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche zusammengefasst. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) wurden mit drei Sternen gekennzeichnet. ns = nicht signifikant.

3.8.3.2 Bestimmung von IFN λ

Ein mit den IL8 - und IFN β - Daten vergleichbares Ergebnis fand sich auch nach der Messung von IFN λ -mRNA mittels RT-qPCR in den Zelllysaten derselben oben genannten Versuche. Auch hier kam es nach Vorstimulation mit *M. catarrhalis* zu einer signifikanten Verringerung der Poly(I:C) induzierten Expressionssteigerung von IFN λ (Abb. 18).

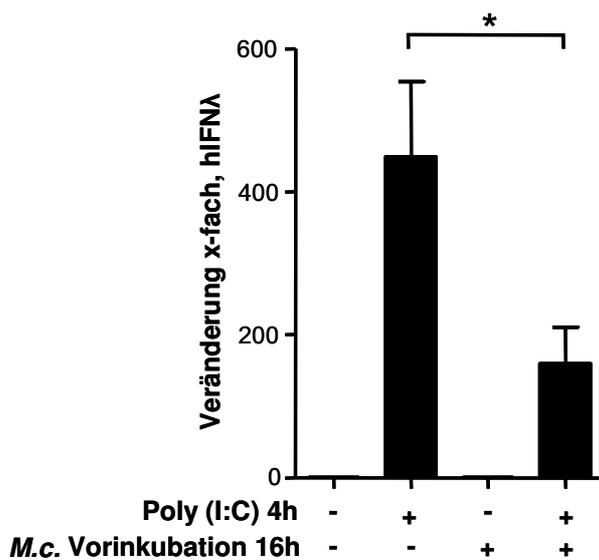


Abb. 18: Beas-2B-Zellen wurden über 16 h mit *M. catarrhalis* (Stamm O35E, MOI 5) stimuliert. Im Anschluss daran wurde für 4 h Poly(I:C) in einer Konzentration von 10 µg/ml auf die mit *M. catarrhalis* vorinkubierten Zellen und auf nicht vorinkubierte Zellen gegeben. Anschließend erfolgte mittels RT-qPCR die Bestimmung der IFN β -mRNA Konzentration in den Zelllysaten. Der Graph ist eine Zusammenfassung von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

3.8.4 Gen-Silencing von p53 führt zu einer Verminderung der Poly(I:C) induzierten IFN β -Produktion

Im nächsten Schritt sollte der funktionelle Effekt von p53 auf die Poly(I:C) induzierte IFN β -Produktion untersucht werden. Dazu wurde ein *knockdown* von p53 (#1) und TLR3 (#2) mittels si-RNA in Beas-2B-Zellen durchgeführt. Nach 24 h wurde ein Teil der Zellen für 4 h mit Poly(I:C) in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Die andere Hälfte der Zellen war gleichermaßen transfiziert, wurde jedoch nicht mit Poly(I:C) inkubiert und diente zur Kontrolle. Am Ende der Versuchszeit erfolgten die Zelllyse und der quantitative Nachweis von IFN β -mRNA in der RT-qPCR.

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse. Transfizierte nicht mit Poly(I:C) inkubierte Zellen zeigten eine sehr geringe basale IFN β -Expression. Wurden die Zellen jedoch mit Poly(I:C) inkubiert, war eine signifikante Poly(I:C) bedingte IFN β -Induktion erkennbar. Im Vergleich zu csi-transfizierten Zellen war diese IFN β -Induktion nach Poly(I:C) Stimulation jedoch bei den mit p53- und TLR3-siRNA behandelten Zellen signifikant verringert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Poly(I:C) induzierte TLR3 vermittelte IFN β -Produktion nach *knockdown* von p53 vermindert ist.

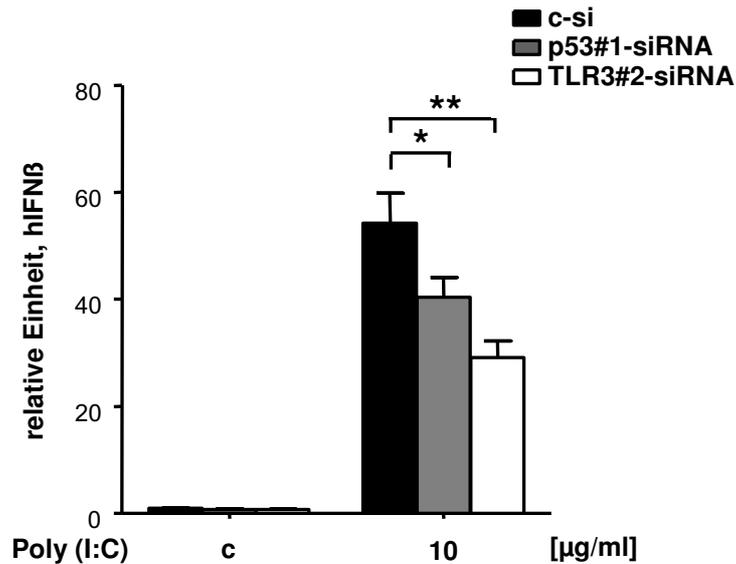


Abb. 19: Zu sehen ist ein *knockdown* von p53 (#1) und TLR3 (#2) in Beas-2B-Zellen. Nach 24 h wurde ein Teil der Zellen für 4 h mit Poly(I:C) in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Die andere Hälfte der Zellen war gleichermaßen transfiziert, wurde jedoch nicht mit Poly(I:C) inkubiert und diente zur Kontrolle. Der quantitative Nachweis von IFNβ-mRNA erfolgte in der RT-qPCR. In dem Graphen wurden mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche zusammengefasst. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 1\%$ ($p < 0,01$) erhielt zwei Sterne.

3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

In primären Bronchialepithelzellen konnte sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene gezeigt werden, dass eine Infektion mit *M. catarrhalis* die TLR3 – Expression in diesen Zellen signifikant verringert. Diese Beobachtung wurde durch Versuche mit der bronchialen Epithelzelllinie Beas-2B bestätigt. Es ließ sich eine Zeit- und Dosisabhängige Verminderung der TLR3 - Expression durch *M. catarrhalis* (Wildtypstamm O35E) nachweisen. Dass es sich bei der Verringerung der TLR3 - Expression lediglich um durch die Moraxellen verursachte zytotoxische Effekte handelt, wurde in weiterführenden Experimenten ausgeschlossen.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass der *M. catarrhalis* (O35E) induzierte Effekt nicht Stamm spezifisch ist, da auch ein weiterer *M. catarrhalis* Stamm (BBH18) konzentrationsabhängig in der Lage ist, TLR3 dramatisch zu supprimieren. Im Gegensatz dazu sind durch Hitze und ultraviolettes Licht inaktivierte Bakterien nicht in der Lage, TLR3 signifikant zu beeinflussen.

Zur Identifikation *M. catarrhalis* - spezifischer Virulenzfaktoren erfolgte der Einsatz unterschiedlicher Moraxella-Deletionsmutanten, bei denen die Expression bestimmter Virulenzfaktoren ausgeschaltet wurde. Es zeigte sich, dass jede verwendete Deletionsmutante zu einer, mit der des Wildtypstammes O35E vergleichbaren, Verminderung der TLR3-Expression in der Lage war.

In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss von Moraxellen auf p53 näher untersucht. Es zeigte sich, dass im Gegensatz zu inaktivierten Moraxellen, Poly(I:C) oder TNF- α lediglich lebende Moraxellen in der Lage waren, die p53-Expression signifikant zu vermindern. Es konnte gezeigt werden, dass ein Gen-*Silencing* von p53 eine deutlich verringerte TLR3-Expression zur Folge hat. Dies bedeutet, dass die *M. catarrhalis* - induzierte TLR3-Expressionsminderung in Abhängigkeit von p53 reguliert wird. Weitere Versuche lieferten die Erkenntnis, dass eine Infektion mit lebenden Moraxellen eine verminderte Bindung von p53 am TLR3-Promoter zur Folge hat.

Aufschlüsse darüber, welche Bedeutung die Moraxella-induzierte Verminderung der TLR3-Expression für *M. catarrhalis* selbst hat, sollte die Untersuchung des Proliferationsmarkers Ki-67 in infizierten Zellen geben. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Ki-67 in mit *M. catarrhalis* infizierten Zellen signifikant erhöht ist.

Ein weiterer Fokus lag auf der Untersuchung, ob Moraxella in der Lage ist, auch die intrazellulären PRRs RIG-I (*retinoic acid inducible gene1*) und MDA5 (*melanoma differentiation associated gene-5*) und das nach Aktivierung von TLR3 rekrutierte Adaptermolekül TRIF (*Toll / IL-1R homologous region (TIR) - domain-containing adapter inducing IFN- β*) zu regulieren. In diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass sowohl RIG-I, als auch MDA-5 und TRIF durch *M. catarrhalis* signifikant herunterreguliert werden. Dies geschieht im Gegensatz zu der TLR3-Senkung jedoch unabhängig von p53.

Im Gegensatz zu RIG-I, MDA5 und TRIF konnte für ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) und TLR2 eine gesteigerte Expression nach Moraxella-Infektion nachgewiesen werden.

Die funktionelle Bedeutung der TLR3-Expressionssenkung für eine anschließende ds-RNA induzierte Immunantwort wurde durch Stimulation mit dem TLR3-Agonisten Poly(I:C) und anschließender Bestimmung von IL-8, IFN β und IFN λ untersucht. Es zeigte sich, dass die *M. catarrhalis* - induzierte Senkung von TLR3 eine verminderte Poly(I:C) induzierte Zytokinexpression zur Folge hat. Das Phänomen der *cross-tolerance* wurde unter Verwendung von Lipopolysaccharid (LPS) im Vergleich mit *M. catarrhalis* ausgeschlossen. Zuletzt erfolgte die Untersuchung des funktionellen Effekts von p53 auf die Poly(I:C) induzierte IFN β -Produktion. Es konnte nachgewiesen

werden, dass die Poly(I:C) induzierte und TLR3 vermittelte IFN β -Produktion nach *knockdown* von p53 signifikant vermindert ist.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

4.1.1 COPD und die Rolle der PRRs

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation des *Toll-like* Rezeptors 3 (TLR3) auf humanen pulmonalen Epithelzellen untersucht. TLR3 ist ein Rezeptor, der für die Detektion viraler RNA von Bedeutung ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig eine durch *M. catarrhalis* induzierte Verminderung der TLR3-Expression.

Die COPD als chronisch progressive Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine chronische Bronchitis und eine anhaltende Entzündung der Bronchiolen und des Lungenparenchyms, was eine zunehmende Obstruktion der Atemwege zur Folge hat (Slevogt et al. 2009). Häufig erleiden die Patienten wiederkehrende Episoden mit Verschlechterung der respiratorischen Symptome – sogenannte akute Exazerbationen (Celli et al. 2006). Etwa 40 - 60 Prozent akuter Exazerbationen beruhen auf bakteriellen Infektionen hauptsächlich mit *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* und *Streptococcus pneumoniae* (Mizgerd 2008). Weitere 50 Prozent aller infektionsbedingten COPD-Exazerbationen sind auf virale Infektionen, insbesondere mit Rhinoviren, zurückzuführen (Wedzicha et al. 2004). Es ist davon auszugehen, dass es im Verlauf der COPD häufig zu einem gleichzeitigen Zusammentreffen von Bakterien und Viren auf der Schleimhaut des Bronchialepithels kommt. Möglicherweise kann es dabei auch zu einer für die Pathogenese der COPD entscheidenden wechselseitigen Beeinflussung von Bakterien und Viren kommen. Allerdings ist bisher nur unzureichend geklärt, welche spezifischen Wechselwirkungen zwischen viralen und bakteriellen Erregern mit der Wirtsmukosa im humanen Respirationstrakt auftreten. Die Folge einer bakteriellen als auch viral bedingten respiratorischen Infektion ist eine proinflammatorische Immunantwort, die je nach beteiligtem Agens unterschiedlich stark ausgeprägt, jedoch mit der klinischen Symptomatik der COPD-Exazerbation und der Progredienz der Erkrankung assoziiert ist (Patel et al. 2002). Die Initiierung dieser Immunantwort erfolgt im Wesentlichen durch keimbahnkodierte mustererkennende Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs). Zu dieser Rezeptorgruppe gehören die *Toll-like* Rezeptoren. Sie erkennen konservierte molekulare Muster von Pathogenen, induzieren daraufhin intrazelluläre Signalwege, woraus die bereits erwähnte proinflammatorische Immunantwort resultiert (Kumar et al.

2012). Die Regulation dieser Rezeptoren ist von großem Interesse. Für die Detektion viraler ds-RNA ist insbesondere TLR3 von Bedeutung (Matsumoto et al. 2008). Dieser Rezeptor ist vor allem intrazellulär an den Endosomen lokalisiert, wird aber auch extrazellulär auf der Zellmembran expremiert (Duffy et al. 2007, Akira et al. 2006). Nach Ligandenbindung erfolgt über den TLR3-Signalweg die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (*nuclear transcription factor- κ B*), AP-1 (*activating protein-1*) und IRF-3 (*interferon regulatory factor*). Durch NF- κ B und AP-1 werden unter anderem immunologisch aktive Zytokine induziert. Die Aktivierung von IRF-3 bewirkt die Expression des antiviralen Typ I Interferons IFN β (Kawai et al. 2010, Fitzgerald et al. 2003).

4.1.2 *M. catarrhalis* und TLR3 auf pulmonalem Epithel

Die Bedeutung von *M. catarrhalis* in der Pathogenese der COPD wurde lange Zeit unterschätzt. Während die Rolle anderer Bakterien wie *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae* bereits weitgehend erforscht war, wurden Moraxellen lange als harmlose Kommensalen verkannt. Heute weiß man, dass *M. catarrhalis* vor allem bei Otitis media und COPD-Exazerbationen als mukosales Pathogen auftritt (Aebi et al. 2011).

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob und über welche Mechanismen es nach Infektion mit *M. catarrhalis* in respiratorischen Epithelzellen zu einer Veränderung der Expression Virus-erkennender PRRs, insbesondere von TLR3, kommt. Die Versuche wurden in Primärzellen (NHBE) und in humanen respiratorischen Epithelzellen (Beas-2B) durchgeführt. Die letztgenannten immortalisierten Zellen stehen in unbegrenzter Zahl zur Verfügung, lassen sich mittels siRNA genetisch manipulieren, wurden von uns und anderen Gruppen bereits erfolgreich zur Untersuchung molekularer Mechanismen der Pathogen-Wirtszellinteraktion eingesetzt. Darüber hinaus wurde eine intra- wie auch extrazelluläre TLR3-Expression in dieser Zelllinie bereits nachgewiesen (Guillot et al. 2005). Da jedoch eine konstante TLR3-Expression für auswertbare Ergebnisse unerlässlich war, wurden alle verwendeten Zellen vor der Verwendung auf ihre TLR3-Expression untersucht. Sowohl die primären Bronchialepithelzellen als auch die Beas-2B-Zellen zeigten eine deutliche Expression des Rezeptors. Allerdings muss erwähnt werden, dass die Primärzellen spenderabhängige individuelle Schwankungsbreiten zeigten. Daher wurden Spenderzellen, deren Expressionsmuster deutlich vom Durchschnitt abwich, nicht für weitere Versuche verwendet. Während der Passage 1 –

8 zeigten die Primärzellen eine relativ konstante und vergleichbar hohe TLR3-Expression, weshalb sie nur in diesen Passagen eingesetzt wurden. Ein weiteres Problem primärer Zellen ist die Kultivierung und Empfindlichkeit, weshalb nur zentrale Versuche in primären Bronchialepithelzellen durchgeführt wurden. Die Beas-2B-Zellen zeigten eine homogene TLR3-Dichte.

Obwohl TLR3 auf humanen Zellen der am häufigsten ubiquitär exprimierte Rezeptor ist, so ist seine Regulation bisher nur wenig erforscht. Zarembek et al. beschäftigten sich mit der Expression von TLR3 nach Stimulation von THP-1-Zellen mit Lipopolysaccharid, *Staphylococcus aureus* und *E. coli*. Sie wiesen sowohl für LPS als auch für *Staphylococcus aureus* und *E. coli* eine signifikante Erhöhung der TLR3-Expression nach (Zarembek et al. 2002). Allerdings konnten Hähnel et al. in Monozyten, Makrophagen und in vitro differenzierten dendritischen Zellen zeigen, dass LPS keinen Effekt auf die TLR3-Expression in den untersuchten Zellpopulationen hatte (Hähnel et al. 2003).

TLR3 erkennt ds-RNA als ein wichtiges Zwischenprodukt vieler viraler Reproduktionszyklen. Auch Rhinoviren bilden ds-RNA Intermediate und sind in der Lage, die Expression von TLR3-mRNA und TLR3-Protein auf der Zelloberfläche von Beas-2B-Zellen zu erhöhen (Hewson et al. 2005).

Die Gruppe um Sajjan untersuchte die TLR3-Expression nach einer Infektion mit *H. influenzae*, dem häufigsten Erreger der bakteriell bedingten Exazerbationen der COPD. Sie inkubierten humane Bronchialepithelzellen (16HBE14o-Zellen) mit *H. influenzae* und detektierten anschließend die extra- und intrazelluläre TLR3-Expression auf Proteinebene. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Infektion mit *H. influenzae* zu einer vor allem intrazellulär gesteigerten Expression von TLR3 führt (Sajjan et al. 2006).

In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde im Rahmen meiner Arbeit untersucht, ob auch *M. catarrhalis*, ein im Respirationstrakt anzutreffender und oft auch kolonisierender Keim, in der Lage ist, die TLR3-Expression zu beeinflussen. In den Versuchen zu dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass es als direkte Folge einer Infektion von primären Bronchialepithelzellen mit dem Moraxella Wildtyp O35E zu einer signifikanten Verminderung der TLR3-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene kommt. Diese Expressionsminderung war auch mit der bronchialen Epithelzelllinie Beas-2B darstellbar. Dass es sich hierbei lediglich um durch die Moraxellen verursachte zytotoxische Effekte handelt, konnte ausgeschlossen werden. In ihrer Studie wiesen Sajjan et al. die Erhöhung der TLR3-Expression für vier *H. influenzae* – Stämme nach (Sajjan et al. 2006). Unsere Versuche mit einem weiteren als BBH18 bezeichneten Moraxella-Stamm machten deutlich, dass auch dieser eine hoch

signifikante TLR3-Expressionsminderung zu bewirken vermag. Sowohl O35E als auch BBH18 sind klinische Isolate aus Patienten mit COPD. Bei dem Stamm O35E handelt es sich um ein amerikanisches Isolat, wohingegen BBH18 in Europa isoliert wurde (Nordström et al. 2005). Sajjan et al. konnten weiterhin zeigen, dass die Erhöhung der TLR3-Expression durch eine Hitzeinaktivierung von *H. influenzae* nicht mehr ausgelöst werden konnte. Eigene Versuche zeigten vergleichbare Ergebnisse für *M. catarrhalis*, denn inaktivierte Moraxellen (Hitze, ultraviolettes Licht) konnten die TLR3-Expression ebenfalls nicht mehr signifikant beeinflussen. Für die Regulation von TLR3 sind demnach stimulatorische Strukturen lebender Bakterien erforderlich. Im Gegensatz zur Arbeit von Sajjan et al. untersuchten wir auch die Auswirkungen Moraxella – spezifischen Virulenzfaktoren auf die TLR3 – Expression. Dazu setzten wir verschiedene Deletionsmutanten zur Infektion ein, bei denen die Expression bestimmter Virulenzfaktoren ausgeschaltet wurde, zur Infektion ein. Im Ergebnis lieferten alle verwendeten Deletionsmutanten eine mit der des Wildtypstamms O35E vergleichbare Verminderung der TLR3-Expression, was die Folgerung zuließ, dass weder die Moraxella – spezifischen äußeren Membranproteine UspA1 und UspA2, noch das Moraxella-Hag-Protein und das Moraxella-Lipooligosaccharid an der *M. catarrhalis* – induzierten Expressionsminderung von TLR3 beteiligt sind.

4.1.3 *M. catarrhalis* und p53 auf pulmonalem Epithel

Das im Zellkern lokalisierte Protein p53 ist in der Vergangenheit intensiv erforscht worden. Allgemein bekannt ist es in seiner eindeutigen Rolle als Tumorsuppressor. Weist das Erbgut einer Zelle Schäden auf, bewirkt p53 einen Zellzyklus-Arrest oder leitet die Apoptose ein (Rivas et al. 2010). Das Fehlen oder eine Mutation dieses Proteins erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Krebserkrankung (Royds et al. 2006).

Neben dieser Funktion konnte p53 auch eine Schlüsselrolle in der antiviralen Immunabwehr nachgewiesen werden (Muñoz-Fontela et al. 2008). Die Transkription von p53 wird durch Typ I Interferone stimuliert, wodurch die Konzentration von p53 in der Zelle innerhalb kurzer Zeit stark ansteigt, was zur Apoptose virusinfizierter Zellen führt und damit die Virusreplikation reduziert (Takaoka et al. 2003).

Zu einer für diese Arbeit wegweisenden Erkenntnis gelangten Taura et al. Sie wiesen nach, dass p53 durch Bindung an einer bestimmten p53-Bindestelle am TLR3-Promoter (Sequenz zwischen bp -1929 und -1910) die TLR3-Expression in HCT116-Zellen (*human colon cancer cell line*) aktiviert (Taura et al. 2008).

Aufgrund dieser Erkenntnis untersuchten wir den Einfluss von *M. catarrhalis* auf p53 und möglicherweise demzufolge auch auf TLR3. Unsere Versuche zeigten, dass lebende Moraxellen in der Lage waren, die p53-mRNA-Expression und die Proteinlevel von p53 signifikant zu vermindern. Inaktivierte Moraxellen (UV/Hitze), Poly(I:C) und TNF- α hatten keinen Einfluss auf die p53-Level.

Taura et al. wiesen weiter nach, dass ein *knockdown* von p53 zu einer signifikant verminderten TLR3-Expression führt. Auch diesen Zusammenhang konnten wir in Beas-2B-Zellen bestätigen. Wir senkten die Expression von p53 durch RNA-Interferenz und untersuchten die p53-transfizierten Zellen auf ihre TLR3-Expression. Tatsächlich hatte das Gen-*Silencing* von p53 eine deutlich verringerte TLR3-Expression zur Folge. In Einklang mit den Ergebnissen der Gruppe um Taura konnten wir letztendlich zeigen, dass es durch die Infektion mit *M. catarrhalis* zu einer verminderten Bindung von p53 am TLR3-Promoter kommt, was in einer Verminderung der TLR3-Expression resultiert.

4.2 Der Einfluss von *M. catarrhalis* auf die TLR3-getriggerte Immunantwort

Bislang ist wenig darüber bekannt, wie Bakterien und Viren bei gleichzeitigen oder nacheinander folgenden Infektionen mit den Rezeptoren des angeborenen Immunsystems interagieren. Die in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Versuche mit Poly(I:C), einem TLR3-spezifischen Liganden, geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass die *M. catarrhalis* - induzierte Verminderung der TLR3-Expression auch Auswirkungen auf die TLR3-getriggerten Abwehrfunktionen hat.

Um unsere Hypothese zu beweisen untersuchten wir, ob die Infektion mit *M. catarrhalis* Auswirkungen auf die Poly(I:C) induzierte NF- κ B- und IFN β -vermittelte Immunantwort hat. Die Erkennung von ds-RNA Viren durch TLR3 resultiert in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF-3, die für die IL-8 und IFN β Genexpression erforderlich sind (Slater et al. 2010). IFN β vermittelt über den IFNAR 1/2 Rezeptor antivirale Immunität (O'Neill et al. 2010).

Unsere Versuche lieferten eindeutige Ergebnisse. Wurden die Zellen mit *M. catarrhalis* vorstimuliert und das Poly(I:C) erst danach zugesetzt, so führte dies zu einer signifikant geringeren Steigerung der IL-8 Konzentration verglichen mit der IL-8 Konzentration, die durch Poly(I:C) auf nicht mit *M. catarrhalis* vorstimulierten Zellen hervorgerufen wurde. In der Annahme, dass *M. catarrhalis* auch einen Einfluss auf die durch TLR3 vermittelte und IFN β -induzierte antivirale Immunabwehr hat, wurde diese

Rezeptorfunktionalität ebenfalls näher untersucht. Wie von uns vermutet führte auch hier auf mit *M. catarrhalis* vorinkubierten Zellen zugesetztes Poly(I:C) zu einer signifikant geringeren Steigerung der IFN β mRNA Konzentration verglichen mit der IFN β Konzentration, die durch Poly(I:C) auf unbehandelten Zellen induziert wurde.

Ein mit den IL8 - und IFN β - Daten vergleichbares Ergebnis fand sich auch nach der Messung von IFN λ mRNA, einem Typ III Interferon.

Das Phänomen der *cross-tolerance* wurde ausgeschlossen, da nach LPS - Vorinkubation die nach *M. catarrhalis* - Vorinkubation beobachtete Verminderung der Poly(I:C) induzierten IL-8 und IFN β Sekretion nicht zu erkennen war. Die Zellen produzieren mit und ohne LPS - Vorinkubation in etwa gleich hohe IL-8 und IFN β Level. Eine Beeinflussung der TLR3 Expression durch LPS konnte ausgeschlossen werden.

4.3 Die Rolle von p53 in der TLR3-getriggerten Immunantwort

In der Studie von Taura et al. konnte nachgewiesen werden, dass die durch ds-RNA ausgelöste und TLR3-getriggerte Sekretionssteigerung von IL-8 weitestgehend abhängig von p53 ist. Darüber hinaus wiesen sie nach, dass die durch Poly(I:C) in p53 wt HCT116 Zellen hervorgerufene Stimulation von TLR3 und die darauf folgende Aktivierung des IFN β Promoters in p53 $^{-/-}$ Zellen erheblich beeinträchtigt war (Taura et al. 2008). Zu dem gleichen Ergebnis kamen Rivas et al (Rivas et al. 2010). In Anlehnung an diese Erkenntnisse untersuchten auch wir den funktionellen Effekt von p53 auf die Poly(I:C) induzierte IFN β Produktion. Dazu wurde ein *knockdown* von p53 durchgeführt. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit Poly(I:C) inkubiert. Die andere Hälfte der Zellen war gleichermaßen mit si-RNA transfiziert, wurde jedoch nicht mit Poly(I:C) inkubiert. Diese Zellen zeigten eine sehr geringe basale IFN β Expression. Wurden die Zellen jedoch mit Poly(I:C) inkubiert, war eine signifikante Poly(I:C) bedingte IFN β -Induktion erkennbar. Im Vergleich zu c-siRNA - transfizierten Zellen war diese IFN β Induktion jedoch bei den mit p53-siRNA behandelten Zellen signifikant verringert. Wie erwartet führte die Suppression von p53 durch p53-siRNA zu einer Inhibition der Zytokinproduktion in mit Poly(I:C) behandelten Zellen. Um zu beweisen, dass die Poly(I:C) induzierte Aktivierung von IFN β durch TLR3 vermittelt wurde, wurde für diesen ebenfalls ein *knockdown* durchgeführt. Die Zellen wurden in gleicher Weise mit Poly(I:C) stimuliert wie für p53 beschrieben. Im Ergebnis konnten wir eine weitaus geringere IFN β Produktion in mit TLR3-siRNA behandelten Zellen im Vergleich zu mit

Kontroll-siRNA und p53-siRNA inkubierten Zellen nachweisen. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass p53 aufgrund seiner regulatorischen Funktion für TLR3 notwendig für die TLR3 vermittelte Poly(I:C) induzierte Zytokinproduktion ist. Damit stehen unsere Ergebnisse im absoluten Einklang mit den Erkenntnissen der Studie von Taura (Taura et al. 2008).

4.4 Bedeutung der p53-Expressionsenkung für *M. catarrhalis*

Um Erkenntnisse darüber zu erlangen, welche Bedeutung die hoch signifikante Verminderung der p53-Level für *M. catarrhalis* selbst hat, mussten wir die Frage klären, ob die verminderte p53-Expression Auswirkungen auf Zellproliferation und Apoptose hat. Aufschlüsse darüber sollte die Untersuchung des Ki-67 Proteins in infizierten Zellen geben. Mit ihm lässt sich die sogenannte Wachstumsfraktion einer Zellpopulation bestimmen. Es kommt lediglich in proliferierenden Zellen in der S-, G2-, M- und der G1-Phase des Zellzyklus vor. Ruhende Zellen (G0-Phase) exprimieren das Ki-67 Antigen nicht. Es kann daher zum Markieren von Zellen im Gewebe verwendet werden, die sich vermehren (Gerdes et al. 1984). Dazu wurden mit *M. catarrhalis* infizierte Zellen auf ihre Expression von Ki-67 analysiert. Wie erwartet ist die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in mit *M. catarrhalis* infizierten Zellen signifikant erhöht. Parallel dazu wurden auf gleiche Weise infizierte Zellen mit Annexin und Propidiumjodid gefärbt, um nachzuweisen, dass Moraxellen in dem stets verwendeten Dosis- und Zeitfenster die Zellvitalität nicht beeinflussen. Es gab keine signifikanten Abweichungen von der Vitalität nicht infizierter Zellen. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass *M. catarrhalis* über die gezeigten Regulationsmechanismen in der Lage ist, die durch p53 vermittelte Apoptose und Proliferationshemmung aufzuheben. Dies bedeutet, dass *M. catarrhalis* den Zelltod verhindert und gleichzeitig das Zellwachstum erhält, um damit günstige Voraussetzungen für die Infektion weiterer bronchialer Epithelzellen zu schaffen und um letztlich den Respirationstrakt zu kolonisieren.

4.5 Bedeutung der verminderten p53-Expression für Virusinfektionen

COPD - Patienten erleiden häufig sogenannte akute Exazerbationen, d.h. wiederkehrende Episoden mit Verschlechterung der klinischen Symptome. Sie führen zu einer Progression der Erkrankung mit Zunahme der Morbidität und Mortalität (Sethi et al. 2008). Zu etwa 90% werden Exazerbationen mit bakteriellen und / oder viralen Infektionen assoziiert (Sajjan et al. 2006, Teng et al. 2010). Dabei fallen etwa 40 – 60% auf eine bakterielle Beteiligung hauptsächlich mit *H. influenzae*, *M. catarrhalis* und *Str. pneumoniae* (Mizgerd 2008). In unseren Versuchen konnten wir nachweisen, dass *M. catarrhalis* die Immunantwort des Bronchialepithels zu mindern vermag und damit wiederum seine eigene Kolonisation gefördert wird. Diese Kolonisierung und die damit verbundenen inflammatorischen Prozesse sollen eine wesentliche Bedeutung für das Fortschreiten der COPD haben und erklären, dass betroffene Patienten zu deutlich häufigeren Exazerbationen neigen (Sethi et al. 2006, Murphy et al. 2000).

Etwa 50% aller infektionsbedingten Exazerbationen fallen auf virale Infektionen. Dabei werden Rhinoviren am häufigsten isoliert und gelten daher als wichtiger Trigger für akute Exazerbationen. Es handelt sich um ss-RNA-Viren, die vor allem bei Erkältungen eine wichtige Rolle spielen (Sajjan et al. 2006). Außerdem kommt den Respiratorischen Synzytial-Viren (RSV) und den Influenzaviren eine wichtige Bedeutung zu (Seemungal et al. 2003). Weiterhin gibt es Hinweise, dass latente virale Infektionen insbesondere mit Adenoviren und RSV ebenfalls eine entscheidende Rolle für die Pathogenese der COPD haben und sich negativ auf den Verlauf der Erkrankung auswirken (Borg et al. 2003, Hayashi et al. 2007). Darüber hinaus wurde bei COPD-Patienten wiederholt von einer adenoviral assoziierten vermehrten Emphysementstehung und dem vermehrten Auftreten von „*Squamous Cell Lung Cancer*“, dem häufigsten Bronchial-Karzinomtypus, berichtet (Hill et al. 2000, Kuwano et al. 1997).

Aufgrund der oben beschriebenen Fähigkeit von *M. catarrhalis*, den humanen Respirationstrakt zu kolonisieren, kann davon ausgegangen werden, dass es im Verlauf der COPD zu einem Zusammentreffen von Bakterien und Viren auf der Bronchialschleimhaut kommen kann. Wir nehmen an, dass dabei auch eine wechselseitige Beeinflussung von Bakterien und Viren möglich ist, was Bedeutung für den weiteren Verlauf der COPD haben könnte. Zurzeit existieren allerdings nur wenige Informationen über potentielle Interaktionen von Bakterien und Viren auf bronchialem Epithel. Direkte Folge bakteriell als auch viral bedingter respiratorischer Infektionen ist eine unterschiedlich stark ausgeprägte inflammatorische Immunantwort, die mit der

klinischen Symptomatik der COPD-Exazerbationen und der Progredienz der Erkrankung assoziiert ist (Patel et al. 2002). Bekannt ist, dass Viren durch Veränderung der Rezeptorexpression auf respiratorischen Epithelzellen eine vermehrte Adhäsion und Invasion von Bakterien bewirken können. Wiederum kann eine vorausgehende bakterielle Infektion die Empfänglichkeit für eine virale Sekundärinfektion erhöhen (Avadhanula et al. 2006, Sajjan et al. 2006). Aufgrund unserer Forschungsergebnisse stellen wir die Hypothese auf, dass es als Folge einer Infektion mit *M. catarrhalis*, dem zweithäufigsten bakteriellen Erreger bei COPD-Exazerbationen, zu einer verminderten antiviralen Immunantwort in humanen Bronchialepithelzellen kommt. Dies könnte die Virusreplikation und auch die Ausbildung latenter viraler Infektionen begünstigen, was für die Pathogenese und Progression der COPD große Bedeutung haben dürfte. Hierfür sind weitere Versuche notwendig.

4.6 Bedeutung für die Pathogenese und Progression der COPD

Eine Detektion von PAMPs durch PRRs führt unter anderem über eine Aktivierung von zellulären Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren zu einer gezielten Transkription und Sekretion von in der Regel proinflammatorisch wirksamen Zytokinen. Dies ist mit der klinischen Symptomatik der COPD-Exazerbationen und der Progredienz der Erkrankung assoziiert. Hat TLR3 Viruskontakt, reagiert das Immunsystem häufig mit einer über eine Aktivierung der sog. IRFs (*interferon regulatory factors*) gesteuerten Freisetzung von Typ I Interferonen, die unter anderem virale Mechanismen der Virusreplikation hemmen (Bowie et al. 2007). Außerdem kann es zu einer ausgeprägten, über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B gesteuerten, proinflammatorischen Zytokinantwort kommen (Akira et al. 2006, Alexopoulou et al. 2001). Für die Pathogenese der COPD spielt insbesondere Interleukin-8, ein selektives Chemokin für neutrophile Granulozyten, eine bedeutende Rolle. Seine Expression wird unter anderem über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermittelt und kann als Marker für das Ausmaß der Atemwegsinfektion herangezogen werden (Barnes et al. 2003, Patel et al. 2002, Schulz et al. 2003). Ein weiterer wichtiger Mechanismus der angeborenen Immunität ist die Hochregulation bestimmter PRRs durch infektiöse Stimuli. Dabei ist wenig darüber bekannt wie die Expression viral bzw. bakteriell erkennender Rezeptoren durch Co-Infektionen beeinflusst wird. Die bereits

erwähnte Studie von Sajjan zeigte in diesem Zusammenhang, dass Bakterien die Expression bestimmter, für virale Infektionen wichtiger, Rezeptoren beeinflussen können. So führte eine Infektion mit *H. influenzae* in respiratorischem Epithel zu der bereits erwähnten Expressionssteigerung von TLR3, darüber hinaus wiesen sie aber in mit *H. influenzae* infizierten Zellen auch eine Erhöhung der extrazellulären Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (intercellular adhesion molecule), einem wichtigen Rezeptor für die Adhäsion von Rhinoviren, nach. In weiteren Versuchen wiesen Sajjan et al. nach, dass es infolge dieser Expressionssteigerung von TLR3 und ICAM-1 zu einer deutlichen Potentierung der inflammatorischen Immunantwort nach einer anschließenden Infektion dieser Zellen mit Rhinoviren kommt (Sajjan et al. 2006). Diese Beobachtung wurde durch eine klinische Studie von Wilkinson et al. bestätigt, in der gezeigt wurde, dass es im Bronchialtrakt von COPD-Patienten bei Co-Infektionen mit beiden Erregern zu einer signifikanten Zunahme der entzündlichen Immunantwort kommt (Wilkinson et al. 2006). Anhand dieser Sachverhalte untersuchten wir für *M. catarrhalis*, wie schon für *H. influenzae* gezeigt, ob eine Regulation von ICAM-1 möglich ist. Und tatsächlich konnte nach Moraxellen – Infektion eine gesteigerte Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden, was auf mRNA-Ebene bestätigt werden konnte. Diese Wechselwirkungen machen deutlich, dass der Erforschung der Interaktion von Bakterien und Viren auf respiratorischem Epithel für das Verständnis des Fortschreitens der COPD eine wichtige Rolle zukommt.

4.7 Einfluss von *M. catarrhalis* auf weitere viruserkennende PRR

Mikroorganismen werden mit Hilfe von Keimbahn-kodierten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) erkannt. Zu ihnen zählen die *Toll-like* Rezeptoren (TLR), die *RIG-I-like* Helikasen und die NOD-Rezeptoren (Akira et al. 2006).

Der Einfluss von *M. catarrhalis* auf die Expression von TLR3 wurde bereits ausführlich geschildert. Neben TLR3 gibt es weitere viruserkennende Rezeptoren, für die eine Regulation durch *M. catarrhalis* untersucht wurde. In erster Linie wurden RIG-I (*retinoic acid inducible gene - 1*) und MDA5 (*melanoma differentiation associated gene - 5*) getestet. Neben ds-RNA erkennt RIG-I auch 5'-triphosphorylierte ss-RNA und detektiert damit auch Influenzaviren, Newcastle Disease Virus, Vesikuläre Stomatitis Virus, Sendai Virus und das Japanische Enzephalitisvirus. MDA5 hingegen scheint

spezialisiert zu sein auf die Erkennung von Picornaviren wie das Enzephalomyokarditisvirus, Mengo Virus und Theilers Enzephalomyelitis Virus (Bonjardim et al. 2009, Kato et al. 2006, Wang et al. 2009). Slater et al. beschreiben ein Zusammenwirken der drei intrazellulären PRRs TLR3, RIG-I und MDA-5. Nach Antigenerkennung soll TLR3 zu einer Aktivierung der RNA-Helikasen RIG-I und MDA-5 führen, was in einer Maximierung der Interferon-vermittelten antiviralen Immunabwehr mündet (Slater et al. 2010).

In unseren Untersuchungen fanden wir heraus, dass sowohl RIG-I, als auch MDA-5 durch *M. catarrhalis* signifikant herunterreguliert werden. Im Unterschied zur Expressionsminderung von TLR3 geschieht diese Regulation jedoch völlig unabhängig von p53.

4.8 Veterinärmedizinischer Bezug

Eine mit der COPD des Menschen vergleichbare Erkrankung ist die chronisch obstruktive Bronchitis (COB) des Pferdes, auch als *recurrent airway obstruction* (RAO) bezeichnet. Nach histologischen Untersuchungen sollte besser auch beim Pferd von „COPD“ oder einer „chronisch obstruktiven Lungenerkrankung“ gesprochen werden, da die Veränderungen nicht nur die Bronchien, sondern auch den Alveolarbereich betreffen können (Arndt et al. 2001).

Für die Entstehung einer COPD des Menschen gilt das Rauchen als Risikofaktor Nummer 1, Umweltschadstoffen oder Vererbung kommt hier eine geringe Bedeutung zu (Rabe et al. 2007). Die Pathogenese der COB des Pferdes ist jedoch deutlich multifaktorieller zu betrachten und Gegenstand intensiver Diskussionen. Die Entstehung ist auf immunologischer Ebene kaum erforscht. Es handelt sich um eine innerhalb der Pferdepopulation weit verbreitete Erkrankung, bei rund 45 % der Pferde in Westeuropa kann diese chronische und schlecht therapierbare Erkrankung nachgewiesen werden. Die Bedeutung der einzelnen Faktoren in der Pathogenese ist noch nicht genau geklärt.

Es wird angenommen, dass am Anfang einer COB eine Infektion mit Viren, Bakterien oder Parasiten oder eine Inhalation von Antigenen oder Endotoxinen steht, was die Reaktionsbereitschaft der Bronchien gegenüber weiteren potentiell bronchokonstriktorisch wirkenden Reizen erhöht (Arndt et al. 2001). Als Allergene kommen maßgeblich Pollen, Pilzsporen und Futtermilben (vor allem aus Heu und Stroh) in Frage (Reitz et al. 2006). Häufig lässt sich eine alleinige Ursache nicht

ausmachen, vielmehr handelt es sich um ein synergistisches Zusammenspiel infektiöser und nicht infektiöser Faktoren (Arndt et al. 2001). Inwieweit humanpathogene Keime, die bei infektiös bedingten COPD-Exazerbationen des Menschen eine Rolle spielen, beim Pferd ebenfalls von Bedeutung sind, ist weitgehend unklar. Fakt ist, dass die Pathogenese der COPD des Menschen beeinflussende Keime wie *Streptococcus pneumoniae* und Rhinoviren auch beim Pferd bei Atemwegserkrankungen isoliert werden konnten (Arndt et al. 2001).

Die COPD des Menschen ist in erster Linie geprägt durch eine chronische Bronchitis und eine anhaltende Entzündung der Bronchiolen und des Lungenparenchyms, was zu einer chronischen Obstruktion der Atemwege führt. Ganz ähnlich führen die Pathomechanismen beim Pferd zu Bronchospasmus, Dyskrie und Schleimhautschwellung. Es ist daher kaum verwunderlich, dass sich die bei Mensch und Tier auftretenden Symptome sehr ähnlich sind: Einschränkung des Atemflusses, Leistungsabfall, Nasenausfluss, und Husten (Slevogt et al. 2009, Raethel et al. 2007). Die Leistungseinbußen führen häufig dazu, dass die Pferde nicht mehr nutzbar sind.

Grundvoraussetzung jeglicher Therapie eines an COB erkrankten Pferdes, so betonen praktisch alle Autoren, sollte eine dauerhaft staubarme Haltung und Fütterung sein. Sie kann die Entzündung verringern und somit die klinischen Symptome lindern. In den allermeisten Fällen ist jedoch eine zusätzliche medikamentelle Therapie erforderlich. Sie besteht bei der COB in der Regel in der Verabreichung eines Bronchospasmolytikums (β 2-Agonist), eines Sekretolytikums und eines Glukokortikoids. Bronchodilatoren sollten nie ohne Glukokortikoide eingesetzt werden, da mit deren Gabe zwar die klinische Symptomatik (Bronchokonstriktion) behandelt wird aber nicht die zugrunde liegende Ursache (Entzündung). Aufgrund der hochpotenten antiinflammatorischen Wirkung unterbrechen Glukokortikoide den Teufelskreis aus Entzündung, Hyperreagibilität und Bronchokonstriktion der Atemwege und bilden deshalb einen Eckpfeiler in der Therapie (Niedermaier et al. 2009, Reitz et al. 2006).

Häufig ist ein dauerhafter Therapieerfolg jedoch nicht zu erreichen. Insbesondere Kortikosteroide können erhebliche unerwünschte Wirkungen haben. Daneben ist ein Pferd unter der Therapie mit Kortikosteroiden und β -Mimetika für die Teilnahme an Reitsportveranstaltungen aufgrund des Dopingnachweises ungeeignet. Auf die Pferdebesitzer kommen durch die Kosten der Therapeutika erhebliche finanzielle Belastungen zu. Alternativen sind aus all diesen Gründen sehr wünschenswert und von erheblicher praktischer Bedeutung. Um maximal mögliche Novellierungen in der Therapie der COB des Pferdes zu erreichen, müssen Erkenntnisse aus Studien der

Humanmedizin mit dem Wissen der Veterinärmedizin kombiniert werden. Gerade dort, wo die Humanmedizin an Ihre vermeintlichen Grenzen stößt, wie bei den chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen, liegt der Fokus der Öffentlichkeit. Wenngleich die Veterinärmedizin ihren Teil zur Entwicklung neuartiger Therapiemethoden beitragen kann, so profitiert sie doch in erster Linie aus den Forschungsergebnissen der Humanmedizin.

4.9 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 viral bedingten COPD-Exazerbation eine wichtige Bedeutung zukommen könnte. Zum einen ist der Keim in der Lage, proinflammatorische Reaktionen des pulmonalen Epithels auszulösen, zum anderen verfügt der Erreger über Strategien, die vor allem die antivirale Abwehrfunktion des Epithels reduzieren, was die Empfänglichkeit für Virusinfektionen, die für den Verlauf der COPD bedeutsam sind, erhöhen könnte. Darüber hinaus könnten eine Viruspersistenz und die Ausbildung latenter viraler Infektionen begünstigt werden.

Weitere Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, welche funktionale Bedeutung die ausgeprägte *M. catarrhalis*-induzierte TLR3-Expressionsenkung für rhino- und adenovirale Infektionen von pulmonalen Epithelzellen hat. Dazu könnten mit TLR3-siRNA transfizierte, untransfizierte und mit *M. catarrhalis* vorstimulierte Beas-2B-Zellen zum Einsatz kommen, die in einem ersten Schritt mit Rhinoviren infiziert werden. Aufbauend auf unsere Hypothese würden wir für die mit TLR3-siRNA behandelten Zellen und für die mit *M. catarrhalis* vorstimulierten Zellen eine dramatisch vermehrte Virusreplikation im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten und den nicht mit *M. catarrhalis* infizierten Zellen erwarten. Dazu würde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten der Zellüberstand (mit repliziertem und freigesetztem Virus) auf HeLA-Zellen titriert und anschließend nach weiterer Inkubation die Ausdehnung der zytopathischen Effekte beurteilt werden. Alternativ oder zusätzlich hierzu könnte die Bestimmung auf RNA-Ebene (Menge an Rhinovirus RNA) mit einem *house-keeping* Gen (konstitutiv expremiert, z.B. cMyc) und der $\Delta\Delta$ Ct-Methode erfolgen.

4.10 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt unserer Untersuchungen standen die Wechselwirkungen zwischen *M. catarrhalis* und dem respiratorischem Epithel, insbesondere über die von uns erstmalig bewiesene Wechselwirkung mit TLR3. Ein besonderer Fokus lag bei der Klärung des zugrundeliegenden Mechanismus, der es *M. catarrhalis* ermöglicht, die TLR3-Expression zu senken. In einem ersten Schritt untersuchten wir Inhibitoren wichtiger Rezeptoren und Schlüsselenzyme, um deren Beteiligung bei der *M. catarrhalis* – induzierten TLR3-Expressionssenkung zu untersuchen. Die Auswertung dieser Versuche lieferte die Erkenntnis, dass alle untersuchten Signaltransduktionswege sowie der *EGFR*-Rezeptor nicht an der Moraxellen - induzierten Verminderung der TLR3-Expression beteiligt sind.

Im nächsten Schritt konzentrierten wir uns in Anlehnung an die Ergebnisse der Studie von Taura et al. darauf, den Einfluss von *M. catarrhalis* auf p53 und demzufolge auch auf TLR3 zu untersuchen (Taura et al. 2008). Und tatsächlich konnten wir nachweisen, dass lebende Moraxellen in der Lage sind, die p53-mRNA-Expression und die Proteinlevel von p53 hoch signifikant zu vermindern. Ein Gen-Silencing von p53 hatte eine deutlich verringerte TLR3-Expression zur Folge. In Einklang mit den Ergebnissen der Gruppe um Taura konnten wir zeigen, dass es durch die Infektion mit *M. catarrhalis* zu einer verminderten Bindung von p53 am TLR3-Promoter kommt, was in einer Verminderung der TLR3-Expression resultiert. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf Experimenten zur funktionellen Bedeutung der *M. catarrhalis* – induzierten Verminderung der TLR3-Expression. Dazu nutzten wir den TLR3-spezifischen Liganden Poly(I:C) und seine Auswirkungen auf die pathogen-assoziierte Entzündungsreaktion durch Nachweis der IL-8- und IFN β -Sekretion. Wir konnten zeigen, dass eine Infektion von Beas-2B-Zellen mit *M. catarrhalis* die Poly(I:C) induzierte und TLR3 getriggerte proinflammatorische Immunantwort signifikant reduziert. Aufgrund der *Moraxella catarrhalis* induzierten Expressionssenkung von TLR3 führt zugesetztes Poly(I:C) zu signifikant niedrigeren IL-8 und IFN β Level im Vergleich zu nicht mit *M. catarrhalis* infizierten Zellen. Die Expressionssenkung von TLR3 hat demnach funktionelle Bedeutung für eine anschließende ds-RNA induzierte Immunantwort. Welche Bedeutung diese Verminderung der TLR3-Expression für Folgeinfektionen mit, für die Pathogenese der COPD bedeutsamen, Viren hat, muss weiter untersucht werden. Ein besonderer Fokus muss dabei auf Veränderungen der Virusreplikation in den Epithelzellen und dem Auftreten latenter Virusinfektionen liegen. Hierzu sollen weitere Versuche mit Rhinoviren und Beas-2B-Zellen erfolgen. Ein

tieferes Verständnis von viralen und bakteriellen Wechselwirkungen bietet möglicherweise neue therapeutische Ansätze für die Behandlung der COPD.

4.11 Summary

The *M. catarrhalis* – induced downregulation of viral pattern recognition receptors and the impact on the antiviral proinflammatory immune response in pulmonary epithelium

Main focus of our research has been the interdependence between *M. catarrhalis* and the respiratory tract. Especially the interaction with TLR3 has been proven for the first time. In this context, particular emphasis was put on clarifying the underlying mechanism that enables *M. catarrhalis* to decrease the expression of TLR3. In a first step we examined inhibitors of important receptors and key enzymes in order to investigate their contribution to the TLR3 downregulation induced by *M. catarrhalis*. An evaluation of the tests led to the finding that both, the examined signal transduction pathways and the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) are not contributing to the Moraxella-induced TLR3 downregulation.

Following the results of the study of Taura et al., we focused on investigating the influence of *M. catarrhalis* on p53 and potentially also on TLR3 as a next step (Taura et al. 2008). Indeed we could show that live Moraxella are able to significantly reduce the p53 mRNA expression as well as the protein level of p53. A gene silencing of p53 resulted in a considerably decreased TLR3 expression.

In line with the research results of the group around Taura, we could prove that the infection with *M. catarrhalis* leads to a lowered binding of p53 to the TLR3 promoter, which results in a reduced TLR3 expression.

Another focus was on experiments regarding the functional significance of the *M. catarrhalis* induced TLR3 downregulation. For this purpose we used the TLR3-specific ligand Poly(I:C) and its effects on the pathogen-associated inflammatory response by measuring the secretion of IL-8 and IFN β . In these experiments we could demonstrate that an infection of Beas-2B-cells with *M. catarrhalis* significantly reduces the Poly(I:C) induced and TLR3-triggered proinflammatory immune response. Due to the *M. catarrhalis* caused downregulation of TLR3, added Poly(I:C) leads to significantly lower IL8 and IFN β levels compared to unstimulated cells. Thus the down regulation of TLR3 has a functional relevance for a following dsRNA induced immune response.

In general, the significance of the downregulation in regard of subsequent infections with viruses, which are relevant for the pathogenesis of COPD, has to be further

investigated. Particular emphasis has to be placed on changes of the virus replication in epithelial cells as well as on the occurrence of latent viral infections. For this purpose, additional tests with rhinoviruses and Beas-2B-cells have to be carried out. A deeper insight into viral and bacterial interactions potentially leads to new therapeutic approaches to the treatment of COPD.

5 Verzeichnisse

5.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>M. catarrhalis</i>	9
Abb. 2:	TLR3-Signalweg.....	18
Abb. 3:	TLR3-Regulation in <i>NHBE</i> -Zellen.....	62
Abb. 4:	TLR3-Regulation in Beas-2B-Zellen.....	64
Abb. 5:	Ausschluss der Zytotoxizität als Ursache der TLR3-Verminderung.....	65
Abb. 6:	TLR3-Regulation durch Moraxella-Stamm BBH18.....	66
Abb. 7:	Einfluss der Viabilität der Moraxellen.....	67
Abb. 8:	Vergleich bedeutender Virulenzfaktoren.....	68
Abb. 9:	Einfluss von IL-1 β , EGF, Pam3Cys, Poly(I:C), LPS, Flagellin, Diaminopimelinsäure und Muramyldipeptid auf die TLR3-Expression.....	69
Abb. 10:	Einfluss des Tumorsuppressors p53 auf die TLR3-Expression.....	72
Abb. 11:	Bindung von p53 am TLR3-Promotor nach Moraxella-Infektion.....	73
Abb. 12:	Bedeutung der Verminderung der p53-Expression für Zellproliferation und Apoptose.....	74
Abb. 13:	Regulation von RIG-I, MDA-5 und TRIF.....	76
Abb. 14:	Regulation von ICAM-1 und TLR2.....	77
Abb. 15:	IL-8 - und IFN β - Produktion. durch Poly(I:C) / TLR3-Bindung.....	79
Abb. 16:	Verminderung der Poly(I:C) induzierten NF- κ B-Immunantwort unter Ausschluss der <i>cross-tolerance</i>	81
Abb. 17:	Verminderung der Poly(I:C) induzierten antiviralen Immunantwort unter Ausschluss der <i>cross-tolerance</i>	82
Abb. 18:	Verminderung der Poly(I:C) induzierten Expressionssteigerung von IFN λ	83
Abb. 19:	Verminderung der Poly(I:C) induzierten IFN β -Produktion durch Gen- <i>Silencing</i> von p53.....	84

5.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Zellkultur Primäre Bronchialepithelzellen.....	23
Tabelle 2-2: Zellkultur Beas-2B-Zellen	24
Tabelle 2-3: Kultur von <i>Moraxella catarrhalis</i>	25
Tabelle 2-4: RT-qPCR - Mastermix	26
Tabelle 2-5: RT-qPCR - Primer	27
Tabelle 2-6: RT-PCR - Mastermix	28
Tabelle 2-7: RT-PCR - Primer	28
Tabelle 2-8: RT-PCR - Puffer, Gel, Marker	29
Tabelle 2-9: FACS - Antikörper	30
Tabelle 2-10: FACS - Puffer und Lösungen	30
Tabelle 2-11: Transfektionsreagenzien und siRNA	31
Tabelle 2-12: IL-8 ELISA - Puffer	31
Tabelle 2-13: IL-8 ELISA - Antikörper	32
Tabelle 2-14: Western Blot - Puffer und Lösungen.....	32
Tabelle 2-15: Western Blot - Gele	35
Tabelle 2-16: Western Blot - primäre und sekundäre Antikörper	35
Tabelle 2-17: ChIP - Puffer und Lösungen	36
Tabelle 2-18: ChIP - Antikörper für die Immunpräzipitation	38
Tabelle 2-19: ChIP - TLR3 Promoter-Primer	38
Tabelle 2-20: ChIP - RT-PCR Mastermix	38
Tabelle 2-21: ChIP - RT-PCR Gel	39
Tabelle 2-22: Stimulantien	40
Tabelle 2-23: Inhibitoren	40
Tabelle 2-24: Verbrauchsmaterial	41
Tabelle 2-25: Geräte	43
Tabelle 2-26: Analysesoftware	45
Tabelle 2-27: <i>Moraxella catarrhalis</i> - Stämme und deren Anzucht	49
Tabelle 2-28: primerabhängige Annealingtemperatur und Zyklenzahl.....	55
Tabelle 2-29: Auswertung Annexin-Propidiumjodid-Färbung.....	57
Tabelle 3-1: Stamm O35E – Deletionsmutanten	67
Tabelle 3-2: Substanzen, für die eine Beteiligung an der TLR3-Regulation untersucht wurde.....	69
Tabelle 3-3: Inhibitoren wichtiger Rezeptoren und Schlüsselenzyme, für die eine Beteiligung an der TLR3-Regulation untersucht wurde	70

5.3 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AP-1	<i>activating protein-1</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection™
Beas-2B	humane Bronchialepithelzelllinie
BEBM	<i>bronchial epithelial cell basal medium</i>
BEGM	<i>bronchial epithelial cell growth medium</i>
BHI	<i>brain heart infusion</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CEACAM	<i>carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule</i>
cfu	<i>colony forming units</i> , Kolonie-bildende Einheiten
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
CpG-DNA	Cytosin- und Guanin-reiche DNA-Abschnitte
csi-RNA	<i>control small interfering RNA</i>
Ct	<i>cycle threshold</i> , Schwellenwert-Zyklus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleinacid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotide
ds-RNA	<i>double stranded RNA</i> ; doppelsträngige RNA
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	ethylendiamintetraacid, Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
EMV	Enzephalomyokarditisvirus
ETI	<i>Erythrina caffra</i> Trypsininhibitor

FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> , Durchflusszytometrie
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-5-isothiocyanat
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HBSS	<i>hepes buffered saline solution</i> , Hepes gepufferte Salzlösung
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HC-RT	<i>high capacity cDNA reverse transcription</i>
HeLa	humane Epithelzellen eines Zervixcarcinoms
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
k-da	kilo-Dalton
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucin-rich-repeat</i> , leucinreiche Wiederholungen
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
<i>M. catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation associated gene – 5</i>
MDP	Muramyldipeptid
meso-DAP	meso-Diaminopimelinsäure
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Verhältnis von Bakterien zu Zellen
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten RNA
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NF-κB	<i>nuclear transcription factor- κB</i>
NHBE	<i>normal human bronchial epithelium</i> , Primärzellen
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-protein</i>
OD	Optische Dichte
OMP	<i>outer membrane proteins</i> , Oberflächenprotein

PAGE	<i>Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese</i>
Pam ₃ Cys	Pam ₃ Cys-Ser-(Lys) ₄ trihydrochlorid
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase- Kettenreaktion
PI3 K	Phosphoinositid 3 Kinase
PKC	Proteinkinase C
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
Poly(I:C)	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i> , Mustererkennung- Rezeptoren
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene – I</i>
RIP1	<i>receptor-interactin protein1</i>
RNA	<i>ribonuclein acid</i> , Ribonukleinsäure
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> , Reverse Transkriptase – Polymerase- Kettenreaktion
RT-qPCR	Real-Time-quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SAV-HRP	<i>Streptavidin-Horseradish peroxidase</i> Streptaidin-Meerrettichperoxidase
SARM/TIR-1	<i>sterile α and amadillo motifs</i>
SDS	<i>sodium-dodecyl-sulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium-dodecyl-sulfat-Polyacrylamid-Gel-</i> <i>Elektrophorese</i>
SFM	Serum-freies Medium
si-RNA	<i>small interfering RNA</i>
ss-RNA	single stranded RNA; einzelsträngige RNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK1	<i>transforming growth factor β-activated kinase 1</i>
TBK1	<i>TANK binding kinase1</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylethylendiamin
TIR	Toll/IL-1 receptor Rezeptor-Domäne

TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor – alpha
TNS	<i>trypsin neutralizing solution</i>
TRADD	<i>TNF receptor associated death domain protein</i>
TRAF6	<i>TNF receptor associated factor 6</i> , Tumor- nekrosefaktor Rezeptor-assoziiertes Faktor 6
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>Toll / IL-1R homologous region (TIR) domain- containing adapter protein inducing IFNβ</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tris-HCl	Tris-Salzsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
UspA	<i>ubiquitous surface protein</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp

5.4 Literaturverzeichnis

- Aebi, Christoph (2011): *Moraxella catarrhalis* - pathogen or commensal? In: *Adv. Exp. Med. Biol* 697, S. 107–116.
- Akira, Shizuo; Uematsu, Satoshi; Takeuchi, Osamu (2006): Pathogen recognition and innate immunity. In: *Cell* 124 (4), S. 783–801.
- Alexopoulou, L.; Holt, A. C.; Medzhitov, R.; Flavell, R. A. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. In: *Nature* 413 (6857), S. 732–738.
- Arndt, Swantje (2001): Vergleich der Pferdehaltung in bäuerlich-ländlichen Kleinbetrieben mit derjenigen in hauptberuflichen, städtischen Pferdewirtschaftsbetrieben im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang mit Atemwegserkrankungen. Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Avadhanula, Vasanthi; Rodriguez, Carina A.; Devincenzo, John P.; Wang, Yan; Webby, Richard J.; Ulett, Glen C.; Adderson, Elisabeth E. (2006): Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. In: *J. Virol* 80 (4), S. 1629–1636.
- Anderson, K. V.; Bokla, L.; Nusslein-Volhard, C. (1985): Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. In: *Cell* 42 (3), S. 791–798.
- Ank, Nina; West, Hans; Paludan, Soren R. (2006): IFN-lambda: novel antiviral cytokines. In: *J Interferon Cytokine Res* 26 (6), S. 373–379.
- Ank, Nina; Iversen, Marie B.; Bartholdy, Christina; Staeheli, Peter; Hartmann, Rune; Jensen, Uffe B. et al. (2008): An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity. In: *J. Immunol* 180 (4), S. 2474–2485.
- Avadhanula, Vasanthi; Rodriguez, Carina A.; Devincenzo, John P.; Wang, Yan; Webby, Richard J.; Ulett, Glen C.; Adderson, Elisabeth E. (2006): Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. In: *J. Virol* 80 (4), S. 1629–1636.

- Balder, Rachel; Krunkosky, Thomas M.; Nguyen, Chi Q.; Feezel, Lacey; Lafontaine, Eric R. (2009): Hag mediates adherence of *Moraxella catarrhalis* to ciliated human airway cells. In: *Infect Immun* 77 (10), S. 4597–4608.
- Bals, R.; Hiemstra, P. S. (2004): Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. In: *Eur. Respir. J* 23 (2), S. 327–333.
- Barnes, P. J.; Shapiro, S. D.; Pauwels, R. A. (2003): Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. In: *Eur. Respir. J* 22 (4), S. 672–688.
- Beasley, Victoria; Joshi, Priya V.; Singanayagam, Aran; Molyneaux, Philip L.; Johnston, Sebastian L.; Mallia, Patrick (2012): Lung microbiology and exacerbations in COPD. In: *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 7, S. 555–569.
- Beeh, Kai M.; Kornmann, Oliver; Buhl, Roland; Culpitt, Sarah V.; Giembycz, Mark A.; Barnes, Peter J. (2003): Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B₄. In: *Chest* 123 (4), S. 1240–1247.
- Beisswenger, C.; Hess, C.; Bals, R. (2011): *Aspergillus fumigatus* conidia induce IFN- γ signaling in respiratory epithelial cells¹. In: *European Respiratory Journal*.
- Bella, J.; Kolatkar, P. R.; Marlor, C. W.; Greve, J. M.; Rossmann, M. G. (1999): The structure of the two amino-terminal domains of human intercellular adhesion molecule-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor. In: *Virus Res* 62 (2), S. 107–117.
- Bonjardim, Claudio A.; Ferreira, Paulo C. P.; Kroon, Erna G. (2009): Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. In: *Immunol Lett* 122 (1), S. 1–11.
- Borg, I.; Rohde, G.; Loseke, S.; Bittscheidt, J.; Schultze-Werninghaus, G.; Stephan, V.; Bufe, A. (2003): Evaluation of a quantitative real-time PCR for the detection of respiratory syncytial virus in pulmonary diseases. In: *Eur Respir J* 21 (6), S. 944–951.
- Bowie, A. G. (2007): Translational mini-review series on Toll-like receptors: recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity. In: *Clin. Exp. Immunol* 147 (2), S. 217–226.
- Celli, Bartolome R. (2006): Chronic obstructive pulmonary disease: from unjustified nihilism to evidence-based optimism. In: *Proc Am Thorac Soc* 3 (1), S. 58–65.

- Chamaillard, Mathias; Hashimoto, Masahito; Horie, Yasuo; Masumoto, Junya; Qiu, Su; Saab, Lisa et al. (2003): An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. In: *Nat Immunol* 4 (7), S. 702–707.
- Choi, Y. J.; Im, E.; Pothoulakis, C.; Rhee, S. H. (2010): TRIF Modulates TLR5-dependent Responses by Inducing Proteolytic Degradation of TLR5. In: *Journal of Biological Chemistry* 285 (28), S. 21382–21390.
- Chung, K. F. (2001): Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. In: *Eur Respir J Suppl* 34 (1), S. 50s-59s.
- Deutsche Lungenstiftung eV (2012): Die Deutsche Lungenstiftung informiert: COPD.
- Di Stefano, A.; Maestrelli, P.; Roggeri, A.; Turato, G.; Calabro, S.; Potena, A. et al. (1994): Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. In: *Am J Respir Crit Care Med* 149 (3 Pt 1), S. 803–810.
- Duffy, Karen E.; Lamb, Roberta J.; San Mateo, Lani R.; Jordan, Jarrat L.; Canziani, Gabriela; Brigham-Burke, Michael et al. (2007): Down modulation of human TLR3 function by a monoclonal antibody. In: *Cell Immunol* 248 (2), S. 103–114.
- Fahy, John V.; Dickey, Burton F. (2010): Airway mucus function and dysfunction. In: *N. Engl. J. Med* 363 (23), S. 2233–2247.
- Fitzgerald, Katherine A.; McWhirter, Sarah M.; Faia, Kerrie L.; Rowe, Daniel C.; Latz, Eicke; Golenbock, Douglas T. et al. (2003): IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. In: *Nat Immunol* 4 (5), S. 491–496.
- Girardin, Stephen E.; Boneca, Ivo G.; Viala, Jérôme; Chamaillard, Mathias; Labigne, Agnès; Thomas, Gilles et al. (2003): Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. In: *J. Biol. Chem* 278 (11), S. 8869–8872.
- GOLD (2013): Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Online verfügbar unter <http://www.goldcopd.org>.
- Guillot, Loïc; Le Goffic, Ronan; Bloch, Sarah; Escriou, Nicolas; Akira, Shizuo; Chignard, Michel; Si-Tahar, Mustapha (2005): Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. In: *J. Biol. Chem* 280 (7), S. 5571–5580.

- Haarmann, Helge (2011): Die Bedeutung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors für die *Moraxella catarrhalis*-induzierte proinflammatorische Immunantwort in pulmonalem Epithel.
- Hähnel, Viola (2003): Die transkriptionelle Regulation der Toll-like Rezeptoren (TLR2, TLR3 und TLR4) in mononukleären Phagozyten. Dissertation.
- Han, Chaofeng; Jin, Jing; Xu, Sheng; Liu, Haibo; Li, Nan; Cao, Xuetao (2010): Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. In: *Nat Immunol* 11 (8), S. 734–742.
- Hayashi, Shizu; Hogg, James C. (2007): Adenovirus infections and lung disease. In: *Curr Opin Pharmacol* 7 (3), S. 237–243.
- Hewson, Christopher A. Alice Jardine Michael R. Edwards Vasile Laza-Stanca and Sebastian L. Johnston (2005): Toll-Like Receptor 3 Is Induced by and Mediates Antiviral Activity against Rhinovirus Infection of Human Bronchial Epithelial Cells. In: *J Virol*. 2005 October; 79(19): 12273–12279 2005.
- Hill, A. S. Gompertz and R. Stockley (2000): Factors influencing airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. In: *Thorax*. 2000 November; 55(11): 970–977 2000.
- Hirai, M.; Kadowaki, N.; Kitawaki, T.; Fujita, H.; Takaori-Kondo, A.; Fukui, R. et al. (2011): Bortezomib suppresses function and survival of plasmacytoid dendritic cells by targeting intracellular trafficking of Toll-like receptors and endoplasmic reticulum homeostasis. In: *Blood* 117 (2), S. 500–509.
- Hopkins, P. A.; Sriskandan, S. (2005): Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. In: *Clin. Exp. Immunol* 140 (3), S. 395–407.
- Inohara, N. (1999): Nod1, an Apaf-1-like Activator of Caspase-9 and Nuclear Factor-kappa B. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (21), S. 14560–14567.
- Isaacs, A.; Lindenmann, J. (1957): Virus Interference. I. The Interferon. In: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 147 (927), S. 258–267.
- Jatakanon, A.; Lalloo, U. G.; Lim, S.; Chung, K. F.; Barnes, P. J. (1999): Increased neutrophils and cytokines, TNF-alpha and IL-8, in induced sputum of non-asthmatic patients with chronic dry cough. In: *Thorax* 54 (3), S. 234–237.

- Kato, Hiroki; Takeuchi, Osamu; Sato, Shintaro; Yoneyama, Mitsutoshi; Yamamoto, Masahiro; Matsui, Kosuke et al. (2006): Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. In: *Nature* 441 (7089), S. 101–105.
- Kawai, Taro; Akira, Shizuo (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. In: *Nat Immunol* 11 (5), S. 373–384.
- Kettner-Buhrow, Daniela: Untersuchungen zur RNAi-vermittelten Suppression von Effektormolekülen im Entzündungsprozess.
- Kotenko, Sergei V.; Gallagher, Grant; Baurin, Vitaliy V.; Lewis-Antes, Anita; Shen, Meiling; Shah, Nital K. et al. (2003): IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. In: *Nat Immunol* 4 (1), S. 69–77.
- Kumagai, Yutaro; Akira, Shizuo (2010): Identification and functions of pattern-recognition receptors. In: *J. Allergy Clin. Immunol* 125 (5), S. 985–992.
- Kumar, Sushil; Ingle, Harshad; Prasad, Durbaka Vijaya Raghava; Kumar, Himanshu (2012): Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. In: *Crit Rev Microbiol*.
- Kuwano, Kazuyoshi; Kawasaki, Masayuki; Kunitake, Ritsuko; Hagimoto, Naoki; Nomoto, Yoshitsugu; Matsuba, Tokuji et al. (1997): Detection of group C adenovirus DNA in small-cell lung cancer with the nested polymerase chain reaction. In: *J Cancer Res Clin Oncol* 123 (7), S. 377–382.
- Lafontaine, E. R.; Cope, L. D.; Aebi, C.; Latimer, J. L.; McCracken, G. H.; Hansen, E. J. (2000): The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro. In: *J. Bacteriol* 182 (5), S. 1364–1373.
- Lane, D. P. (1992): Worrying about p53. In: *Curr Biol* 2 (11), S. 581–583.
- Lasfar, Ahmed; Abushahba, Walid; Balan, Murugabaskar; Cohen-Solal, Karine A. (2011): Interferon lambda: a new sword in cancer immunotherapy. In: *Clin. Dev. Immunol* 2011, S. 349575.
- Lemaitre, B.; Nicolas, E.; Michaut, L.; Reichhart, J. M.; Hoffmann, J. A. (1996): The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. In: *Cell* 86 (6), S. 973–983.

- Lich, John D.; Ting, Jenny P-Y (2007): CATERPILLER (NLR) family members as positive and negative regulators of inflammatory responses. In: *Proc Am Thorac Soc* 4 (3), S. 263–266.
- Lundberg, A. M.; Drexler, S. K.; Monaco, C.; Williams, L. M.; Sacre, S. M.; Feldmann, M.; Foxwell, B. M. (2007): Key differences in TLR3/poly I:C signaling and cytokine induction by human primary cells: a phenomenon absent from murine cell systems. In: *Blood* 110 (9), S. 3245–3252.
- Marie, I.; Durbin, J. E.; Levy, D. E. (1998): Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. In: *EMBO J* 17 (22), S. 6660–6669.
- Matsumoto, Misako; Seya, Tsukasa (2008): TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). In: *Adv Drug Deliv Rev* 60 (7), S. 805–812.
- Mizgerd, Joseph P. (2008): Acute lower respiratory tract infection. In: *N. Engl. J. Med* 358 (7), S. 716–727.
- Muñoz-Fontela, César; Macip, Salvador; Martínez-Sobrido, Luis; Brown, Lauren; Ashour, Joseph; García-Sastre, Adolfo et al. (2008): Transcriptional role of p53 in interferon-mediated antiviral immunity. In: *J. Exp. Med* 205 (8), S. 1929–1938.
- Murphy, T. F.; Sethi, S.; Niederman, M. S. (2000): The role of bacteria in exacerbations of COPD. A constructive view. A Constructive View. In: *Chest* 118 (1), S. 204–209.
- Murphy, Timothy F.; Brauer, Aimee L.; Grant, Brydon J. B.; Sethi, Sanjay (2005): *Moraxella catarrhalis* in chronic obstructive pulmonary disease: burden of disease and immune response. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 172 (2), S. 195–199.
- Niedermaier, Gabriele; Gehlen Heidrun (2009): Möglichkeiten der Inhalationstherapie zur Behandlung der chronisch obstruktiven Bronchitis des Pferdes. Klinik für Pferde, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München. In: *Pferdeheilkunde* 25 (2009) 4 (Juli/August)).
- Nordström, Therése; Blom, Anna M.; Tan, Thuan Tong; Forsgren, Arne; Riesbeck, Kristian (2005): Ionic binding of C3 to the human pathogen *Moraxella catarrhalis* is a unique mechanism for combating innate immunity. In: *J. Immunol* 175 (6), S. 3628–3636.

- Ogura, Y.; Inohara, N.; Benito, A.; Chen, F. F.; Yamaoka, S.; Nunez, G. (2001): Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. In: *J Biol Chem* 276 (7), S. 4812–4818.
- Oczenski, W. (2012): Atmen – Atemhilfen, Atemphysiologie und Beatmungstechnik, Thieme Verlag, 9. Auflage, S. 25, ISBN: 978-3-13-137699-2
- O'Neill, Luke A. J.; Bowie, Andrew G. (2007): The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. In: *Nat Rev Immunol* 7 (5), S. 353–364.
- O'Neill, Luke A.J; Bowie, Andrew G. (2010): Sensing and Signaling in Antiviral Innate Immunity. In: *Current Biology* 20 (7), S. R328.
- Ozinsky, A.; Underhill, D. M.; Fontenot, J. D.; Hajjar, A. M.; Smith, K. D.; Wilson, C. B. et al. (2000): The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97 (25), S. 13766–13771.
- Pearson, Melanie M.; Lafontaine, Eric R.; Wagner, Nikki J.; St Geme, Joseph W.; Hansen, Eric J. (2002): A hag mutant of *Moraxella catarrhalis* strain O35E is deficient in hemagglutination, autoagglutination, and immunoglobulin D-binding activities. In: *Infect. Immun* 70 (8), S. 4523–4533.
- Patel, I. S.; Seemungal, T. A. R.; Wilks, M.; Lloyd-Owen, S. J.; Donaldson, G. C.; Wedzicha, J. A. (2002): Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. In: *Thorax* 57 (9), S. 759–764.
- Pragman, Alexa A.; Kim, Hyeun Bum; Reilly, Cavan S.; Wendt, Christine; Isaacson, Richard E. (2012): The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease. In: *PLoS ONE* 7 (10), S. e47305.
- Rabe, Klaus F.; Hurd, Suzanne; Anzueto, Antonio; Barnes, Peter J.; Buist, Sonia A.; Calverley, Peter et al. (2007): Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 176 (6), S. 532–555.
- Raethel, Sabine (2007): Die COB des Pferdes im Zusammenhang mit viralen Infektionen und im Vergleich mit dem allergischen Asthma des Menschen.
- Rasmussen, M. K.; Iversen, L.; Johansen, C.; Finnemann, J.; Olsen, L. S.; Kragballe, K.; Gesser, Borbala (2008): IL-8 and p53 are inversely regulated through JNK,

- p38 and NF- κ B p65 in HepG2 cells during an inflammatory response. In: *Inflamm. res* 57 (7), S. 329–339.
- Reitz, Astrid (2006): Vergleich therapeutischer Effekte von Laserakupunktur und medikamenteller Therapie bei der COB (RAO) des Pferdes. 1. Aufl. Giessen: VVB Laufersweiler.
- Rivas, Carmen; Aaronson, Stuart A.; Munoz-Fontela, Cesar (2010): Dual Role of p53 in Innate Antiviral Immunity. In: *Viruses* 2 (1), S. 298–313.
- Rosenstiel, Philip; Till, Andreas; Schreiber, Stefan (2007): NOD-like receptors and human diseases. In: *Microbes Infect* 9 (5), S. 648–657.
- Rothenfusser, Simon; Goutagny, Nadege; DiPerna, Gary; Gong, Mei; Monks, Brian G.; Schoenemeyer, Annett et al. (2005): The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. In: *J. Immunol* 175 (8), S. 5260–5268.
- Royds, J. A.; Iacopetta, B. (2006): p53 and disease: when the guardian angel fails. In: *Cell Death Differ* 13 (6), S. 1017–1026.
- Sajjan, U. S. (2006): H. influenzae potentiates airway epithelial cell responses to rhinovirus by increasing ICAM-1 and TLR3 expression. In: *The FASEB Journal* 20 (12), S. 2121–2123.
- Sarkar, S. N.; Elco, C. P.; Peters, K. L.; Chattopadhyay, S.; Sen, G. C. (2006): Two Tyrosine Residues of Toll-like Receptor 3 Trigger Different Steps of NF- κ B Activation. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (6), S. 3423–3427.
- Saturnino, Saulo F.; Prado, Roberta O.; Cunha-Melo, José R.; Andrade, Marcus V. (2010): Endotoxin tolerance and cross-tolerance in mast cells involves TLR4, TLR2 and Fc ϵ R1 interactions and SOCS expression: perspectives on immunomodulation in infectious and allergic diseases. In: *BMC Infect Dis* 10 (1), S. 240.
- Schneider, D.; Ganesan, S.; Comstock, A. T.; Meldrum, C. A.; Mahidhara, R.; Goldsmith, A. M. et al. (2010): Increased Cytokine Response of Rhinovirus-infected Airway Epithelial Cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182 (3), S. 332–340.
- Schulz, Christian; Wolf, Konrad; Harth, Martina; Krätzel, Kirsten; Kunz-Schughart, Leoni; Pfeifer, Michael (2003): Expression and release of interleukin-8 by

- human bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease, smokers, and never-smokers. In: *Respiration* 70 (3), S. 254–261.
- Seemungal, Terence A. R.; Wedzicha, Jadwiga A. (2003): Viral infections in obstructive airway diseases. In: *Curr Opin Pulm Med* 9 (2), S. 111–116.
- Sethi, Sanjay; Maloney, Jane; Grove, Lori; Wrona, Catherine; Berenson, Charles S. (2006): Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 173 (9), S. 991–998.
- Sethi, Sanjay; Murphy, Timothy F. (2008): Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. In: *N. Engl. J. Med* 359 (22), S. 2355–2365.
- Sheppard, Paul; Kindsvogel, Wayne; Xu, Wenfeng; Henderson, Katherine; Schlutsmeyer, Stacy; Whitmore, Theodore E. et al. (2003): IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. In: *Nat Immunol* 4 (1), S. 63–68.
- Slater, Louise; Bartlett, Nathan W.; Haas, Jennifer J.; Zhu, Jie; Message, Simon D.; Walton, Ross P. et al. (2010): Co-ordinated Role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the Innate Response to Rhinovirus in Bronchial Epithelium. In: *PLoS Pathog* 6 (11), S. e1001178.
- Slevogt, Hortense (2009): Molekulare Mechanismen der Interaktion von *Moraxella catarrhalis* mit pulmonalen Epithelzellen.
- Slevogt, Hortense; Schmeck, Bernd; Jonatat, Carola; Zahlten, Janine; Beermann, Wiebke; van Laak, Vincent et al. (2006): *Moraxella catarrhalis* induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 290 (5), S. L818-26.
- Tailor, Prafullakumar; Tamura, Tomohiko; Kong, Hee Jeong; Kubota, Toru; Kubota, Mayumi; Borghi, Paola et al. (2007): The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8. In: *Immunity* 27 (2), S. 228–239.
- Takaoka, Akinori; Hayakawa, Sumio; Yanai, Hideyuki; Stoiber, Dagmar; Negishi, Hideo; Kikuchi, Hideaki et al. (2003): Integration of interferon-alpha/beta

- signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. In: *Nature* 424 (6948), S. 516–523.
- Takeuchi, Osamu; Sato, Shintaro; Horiuchi, Takao; Hoshino, Katsuaki; Takeda, Kiyoshi; Dong, Zhongyun et al. (2002): Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. In: *J. Immunol* 169 (1), S. 10–14.
- Taura, M.; Eguma, A.; Suico, M. A.; Shuto, T.; Koga, T.; Komatsu, K. et al. (2008): p53 Regulates Toll-Like Receptor 3 Expression and Function in Human Epithelial Cell Lines. In: *Molecular and Cellular Biology* 28 (21), S. 6557–6567.
- Teng, Fang; Slavik, Victoria; Duffy, Karen E.; San Mateo, Lani; Goldschmidt, Raul (2010): Toll-like receptor 3 is involved in airway epithelial cell response to nontypeable *Haemophilus influenzae*. In: *Cell. Immunol* 260 (2), S. 98–104.
- Then, Cornelia: Die Bedeutung der Tyrosinkinase Syk für die Aktivierung der PI3-Kinase bei der β 2-Integrin-abhängigen Leukozytenmigration.
- Trinchieri, Giorgio (2010): Type I interferon: friend or foe? In: *J Exp Med* 207 (10), S. 2053–2063.
- Tuder, Rubin M.; Petrache, Irina (2012): Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. In: *J. Clin. Invest* 122 (8), S. 2749–2755.
- Venkataraman, Thiagarajan; Valdes, Maikel; Elsby, Rachel; Kakuta, Shigeru; Caceres, Gisela; Saijo, Shinobu et al. (2007): Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. In: *J. Immunol* 178 (10), S. 6444–6455.
- Verduin, Cees M.; Hol, Cees; FLeer, André; van Dijk, Hans; van Belkum, Alex (2002): *Moraxella catarrhalis*: from emerging to established pathogen. In: *Clin. Microbiol. Rev* 15 (1), S. 125–144.
- Vernooy, Juanita H.; Küçükaycan, Mehmet; Jacobs, Jan A.; Chavannes, Niels H.; Buurman, Wim A.; Dentener, Mieke A.; Wouters, Emiel F. (2002): Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 166 (9), S. 1218–1224.
- Verstrepen, Lynn; Verhelst, Kelly; van Loo, Geert; Carpentier, Isabelle; Ley, Steven C.; Beyaert, Rudi (2010): Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3). In: *Biochemical Pharmacology* 80 (12), S. 2009–2020.

- Vries, S. P. W. de; Bootsma, H. J.; Hays, J. P.; Hermans, P. W. M.; Vries, Stefan P. W. de; Bootsma, Hester J. et al. (2009): Molecular Aspects of *Moraxella catarrhalis* Pathogenesis // Molecular aspects of *Moraxella catarrhalis* pathogenesis. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73 (3), S. 389–406 // 389-406, Table of Contents.
- Wang, Qiong; Nagarkar, Deepti R.; Bowman, Emily R.; Schneider, Dina; Gosangi, Babina; Lei, Jing et al. (2009): Role of double-stranded RNA pattern recognition receptors in rhinovirus-induced airway epithelial cell responses. In: *J. Immunol* 183 (11), S. 6989–6997.
- Wang, Lu; Gordon, Rachael A.; Huynh, Linda; Su, Xiaodi; Min, Kyung-Hyun Park; Han, Jiahuai et al. (2010): Indirect Inhibition of Toll-like Receptor and Type I Interferon Responses by ITAM-Coupled Receptors and Integrins. In: *Immunity* 32 (4), S. 518–530.
- Wang, Qiong; Miller, David J.; Bowman, Emily R.; Nagarkar, Deepti R.; Schneider, Dina; Zhao, Ying et al. (2011): MDA5 and TLR3 Initiate Pro-Inflammatory Signaling Pathways Leading to Rhinovirus-Induced Airways Inflammation and Hyperresponsiveness. In: *PLoS Pathog* 7 (5), S. e1002070.
- Wedzicha, Jadwiga A. (2004): Role of viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. In: *Proc Am Thorac Soc* 1 (2), S. 115–120.
- Wilkinson, Tom M. A.; Hurst, John R.; Perera, Wayomi R.; Wilks, Mark; Donaldson, Gavin C.; Wedzicha, Jadwiga A. (2006): Effect of interactions between lower airway bacterial and rhinoviral infection in exacerbations of COPD. In: *Chest* 129 (2), S. 317–324.
- Wouters, Emiel F. M. (2005): Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. In: *Proc Am Thorac Soc* 2 (1), S. 26–33.
- Yoneyama, Mitsutoshi; Kikuchi, Mika; Natsukawa, Takashi; Shinobu, Noriaki; Imaizumi, Tadaatsu; Miyagishi, Makoto et al. (2004): The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. In: *Nat Immunol* 5 (7), S. 730–737.
- Zabel, Solveig (2009): Die Bedeutung von CEACAM1 für die *Moraxella catarrhalis*-induzierte TLR2-vermittelte Aktivierung des respiratorischen Epithels 2009.
- Zaleski, A.; Scheffler, N. K.; Densen, P.; Lee, F. K.; Campagnari, A. A.; Gibson, B. W.; Apicella, M. A. (2000): Lipooligosaccharide P(k) (Galalpha1-4Galbeta1-4Glc)

epitope of moraxella catarrhalis is a factor in resistance to bactericidal activity mediated by normal human serum. In: *Infect. Immun* 68 (9), S. 5261–5268.

Zarembek, Kol A.; Godowski, Paul J. (2002): Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. In: *J. Immunol* 168 (2), S. 554–561

Zhou, Muxiang; Gu, Lubing; Zhu, Ningxi; Woods, William G.; Findley, Harry W. (2003): Transfection of a dominant-negative mutant NF- κ B inhibitor (I κ Bm) represses p53-dependent apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells: interaction of I κ Bm and p53. In: *Oncogene* 22 (50), S. 8137-8144.

6 Anhang

6.1 Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. med. Hortense Slevogt für die Bereitstellung des Themas, die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die hervorragende Betreuung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Als nächstes danke ich Herrn Prof. Dr. med. vet. Lothar Wieler für die exzellente Betreuung von Seiten der FU Berlin.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Suttorp und Herrn Prof. Dr. med. Schumann für die Gelegenheit, in ihren Arbeitsgruppen tätig werden zu können.

Für die Unterstützung im Laboralltag bedanke ich mich bei den technischen Assistentinnen, allen voran bei Frauke Schreiber und folgend bei Annika Kühn, Doris Stoll, Fränzi Creutzburg und Diana Wöllner.

Auch gilt mein Dank allen wissenschaftlichen Mitarbeitern und Doktoranden für die Unterstützung, die aufmunternden Worte und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Für die gewissenhafte Durchsicht meiner Arbeit danke ich insbesondere Annina Heinrich, Kerstin Heyl und Lena Opp.

Meiner Familie danke ich für das Verständnis und die moralische Unterstützung.

6.2 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.