

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Aktivierung des humanen Bronchial-
epithels durch *Moraxella catarrhalis***

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Carola Jonatat
aus Königs Wusterhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. N. Suttorp
 2. Prof. Dr. med. K. Dalhoff
 3. Priv.-Doz. Dr. Th. Adam

Datum der Promotion: 06. Februar 2009

Zusammenfassung

Moraxella catarrhalis ist der zweithäufigste Erreger der bakteriell bedingten Exazerbation der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD). Bisher ist nur wenig über die Wechselwirkungen zwischen diesem Erreger und dem humanen Bronchialepithel bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob *M. catarrhalis* eine inflammatorische Immunantwort in bronchialen Epithelzellen auszulösen vermag und welche Rezeptoren, Signaltransduktionswege und Regulationsmechanismen an einer möglichen Aktivierung beteiligt sind.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass eine Infektion der humanen bronchialen Epithelzellen (BEAS-2B) mit *M. catarrhalis* zu einer Sekretion verschiedener sowohl inflammatorischer als auch antiinflammatorischer Zytokine führt. Genauere Untersuchungen der inflammatorischen Zytokine Interleukin-8 (IL-8) und des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) zeigten eine zeit- und dosisabhängige Sekretion. Ausserdem führte eine Infektion mit *M. catarrhalis* zu einer deutlichen Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK1/2, p38 und JNK sowie des Transkriptionsfaktors NF-kappaB (NF-κB). Die Inhibition der MAPK-Phosphorylierung von p38 und ERK1/2 bzw. die Aktivierung von NF-kappaB hatte eine Reduktion der Zytokinsekretion zur Folge. Des Weiteren zeigte sich als Folge der Infektion mit *M. catarrhalis* eine verminderte Histondeacetylasenexpression sowie -aktivität in den Epithelzellen, die mit einer gesteigerten Zytokinfreisetzung assoziiert war. Eine Pathogenerkennung mit anschliessender Aktivierung der bronchialen Epithelzellen erfolgte sowohl über den Toll-like Rezeptor (TLR2) als auch über den Toll-like Rezeptor (TLR4). Das *M. catarrhalis* spezifische Lipooligosaccharid konnte als TLR4-Ligand identifiziert werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse dienen dem genaueren Verständnis der molekularen sowie zellulären Mechanismen einer Infektion des pulmonalen Epithels mit *M. catarrhalis*. Die spezifische Beeinflussung der *M. catarrhalis* induzierten Immunantwort könnte möglicherweise dazu beitragen, die durch diesen Erreger verursachte Entzündungsreaktion bei Patienten mit COPD günstig zu beeinflussen.

Schlagnworte: *Moraxella catarrhalis*, COPD, Bronchialepithel, Immunantwort, Toll-like Rezeptoren, Signaltransduktionswege, MAPK, NF-kappaB, HDAC, Zytokine, IL-8, GM-CSF

Abstract

Moraxella catarrhalis is the second most common cause of bacterial exacerbation of the chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Contrary to that fact, little is known about the interaction between this pathogen and the human bronchial epithelium. The present study analyses whether *M. catarrhalis* is able to evoke an inflammatory immune response in bronchial epithelial cells and which pattern recognition receptors, signal transduction pathways and other regulation mechanisms are involved in such a potential activation.

The results of this study showed that an infection of human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B) with *M. catarrhalis* induced a secretion of many different inflammatory and antiinflammatory cytokines. In detailed investigation of interleukin-8 (IL-8) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), it was found that *M. catarrhalis* induced a time- and dose-dependent secretion in these cells. Furthermore, *M. catarrhalis*-infected bronchial epithelial cells showed a clearly activation of the mitogen-activated protein kinases (MAPK) ERK1/2, p38 and JNK as well as of the transcription factor NF-kappaB. The inhibition of MAPK-phosphorylation of p38 and ERK1/2 and activation of NF-kappaB reduced the cytokin release by *M. catarrhalis*. Interestingly, *M. catarrhalis* of the cells, lead to a decrease in global histone deacetylase expression and activity which was associated with an augmented cytokin release. The toll-like receptors TLR2 and TLR4 are involved in lung epithelial cell response to *M. catarrhalis* and the specific *M. catarrhalis* Lipooligosaccharide has been identified as a TLR4 ligand.

The results presented here, provide a better understanding into important molecular and cellular mechanisms of the pulmonary epithelial response to infection with *M. catarrhalis*. The ability to influence the immune response induced by *M. catarrhalis* may potentially contribute to provide the basis for new therapeutic strategies for patients with COPD.

Keywords: *Moraxella catarrhalis*, COPD, bronchial epithelium, immune response, toll-like-receptors, signal transduction pathways, MAPK, NF-kappaB, HDAC, cytokines, IL-8, GM-CSF

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung 1

 1.1.1 Definition und Klinik 1

 1.1.2 Epidemiologie und sozialökonomische Bedeutung 2

 1.1.3 Pathogenese und Pathophysiologie der COPD 3

1.2 *Moraxella catarrhalis* 4

 1.2.1 Einteilung / Identifizierung / Kolonisierung 4

 1.2.2 Pathogenitätsfaktoren von *M. catarrhalis* 6

1.3 Die Rolle des Bronchialepithels bei der COPD 8

1.4 Das angeborene Immunsystem 9

 1.4.1 Zusammenspiel der angeborenen und erworbenen Immunantwort 9

 1.4.2 Zytokine und Chemokine 9

 1.4.3 IL-8 und GM-CSF als Marker der Entzündungsreaktion 10

 1.4.4 Rezeptoren der angeborenen Immunität („innate immunity“) 11

 1.4.5 Toll-like Rezeptor vermittelte Aktivierung von Epithelien 13

1.5 Reizweiterleitung über Signalkaskaden 14

 1.5.1 MAP-Kinase Signaltransduktionswege 14

 1.5.2 Funktion der MAP-Kinasen 14

1.6 Die Expressionskontrolle inflammatorischer Gene am Beispiel von IL-8 15

 1.6.1 Der Nukleäre Faktor-κB (NF-κB) 17

 1.6.2 Die Histondeacetylasen / Acetylasen Balance 18

1.7 Fragestellung der Arbeit 20

2 MATERIALIEN 21

2.1 Bakterienkultur 21

 2.1.1 *Moraxella catarrhalis* 21

 2.1.2 Agarplatten und BHI-Medium 21

2.2 Zelllinien und Zellkultur 21

2.3 Messung der Laktatdehydrogenase (LDH) 23

2.4 IL-8 ELISA / GM-CSF ELISA 24

2.5 Bioplex-Immunoassay 25

2.6 Western Blot 25

2.7	Transfektion	28
2.8	Biolumineszenzassay	28
2.9	RT-PCR	28
2.10	EMSA	30
2.11	HDAC Aktivitätsassay	31
3	METHODEN	32
3.1	Übersicht über die durchgeführten Versuche	32
3.2	Bakterienkultur	32
3.3	Zellkultur	32
3.4	Messung der Laktatdehydrogenase	34
3.5	IL-8 ELISA und GM-CSF ELISA	35
	3.5.1 Vorbereitungen	35
	3.5.2 Versuchsdurchführung.....	35
3.6	Bio-Plex Immunoassay	36
3.7	Western Blot	37
	3.7.1 Proteinextraktion	37
	3.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	37
	3.7.3 SDS-Gelelektrophorese	38
	3.7.4 Protein-Blot und Antikörperexposition.....	38
	3.7.5 Detektion.....	39
3.8	Transfektion	39
	3.8.1 Transfektion von HEK293 Zellen mit Calciumphosphatreagenz	39
	3.8.2 Transfektion von HEK293 Zellen mit dem Transfektionsreagenz Superfect	40
	3.8.3 Stimulation der HEK293 Zellen	40
	3.8.4 Galaktosidase- und Luciferase - Bestimmung.....	40
3.9	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	41
	3.9.1 RNA-Isolierung.....	41
	3.9.2 Reverse Transkription	41
	3.9.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	42
	3.9.4 Agarosegel-Elektrophorese.....	43
3.10	EMSA	43
	3.10.1 Fraktionierte Proteinextraktion – Gewinnung der Kernproteine.....	43
	3.10.2 Proteinbestimmung (nach Bradford)	44
	3.10.3 EMSA – Gelretentionsanalyse	44

3.11	HDAC Aktivitätsassay	44
3.12	Statistische Auswertung und Software	45
4	ERGEBNISSE	46
4.1	<i>M. catarrhalis</i> induziert eine Zytokinsekretion in BEAS-2B Zellen	46
4.1.1	Sekretion von Interleukin-8 und GM-CSF	46
4.1.2	Analyse der durch <i>M. catarrhalis</i> induzierten Zytokininduktion	47
4.1.3	Vergleich der beiden <i>M. catarrhalis</i> Stämme O35E und ATCC25238	48
4.2	Einfluss der MAPK auf die <i>M. catarrhalis</i> induzierte Zytokinexpression	50
4.2.1	Nachweis einer Aktivierung der MAPK durch <i>M. catarrhalis</i>	50
4.2.2	Die Abhängigkeit der IL-8 und GM-CSF Sekretion von der Aktivierung der MAPK	51
4.3	Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-κB bei der <i>M. catarrhalis</i> induzierten Aktivierung der BEAS-2B Zellen	53
4.4	Die Bedeutung von TLR2 und TLR4 für die <i>M. catarrhalis</i> induzierte IL-8 Sekretion	56
4.5	Der Einfluss von <i>M. catarrhalis</i> auf die Reduktion der Histondeacetylasen (HDAC)	59
4.6	Der Einfluss spezifischer Pathogenitätsfaktoren von <i>M. catarrhalis</i> auf die IL-8 bzw. GM-CSF Sekretion	61
4.6.1	Vergleich bedeutender Pathogenitätsfaktoren von <i>M. catarrhalis</i> (OMPs, LOS)	61
4.6.2	Veränderungen der <i>M. catarrhalis</i> induzierten IL-8 Sekretion nach Abtötung durch Hitze oder UV-Licht.....	65
5	DISKUSSION	66
5.1	Die <i>M. catarrhalis</i> induzierte Inflammation des Bronchialepithels	66
5.2	Die Bedeutung der TLR2 und 4 an der Generierung einer <i>M. catarrhalis</i> induzierten Immunantwort des Bronchialepithels	68
5.3	Die Rolle der intrazellulären MAPK und des Transkriptionsfaktors NF-κB an der <i>M. catarrhalis</i> induzierten inflammatorischen Antwort	71
5.3.1	Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B für die Zellaktivierung und Zytokinfreisetzung.....	71
5.3.2	Die Beteiligung der verschiedenen MAPK an der Zellaktivierung und Zytokinfreisetzung ...	72
5.4	Epigenetische Regulation in bronchialen Epithelzellen bei der Inflammation durch <i>M. catarrhalis</i>	75

5.5	Die Beeinflussung der Inflammation durch die Pathogenitätsfaktoren UspA1 und UspA2 von <i>M. catarrhalis</i>	76
5.6	Der Einfluss der Viabilität von <i>M. catarrhalis</i> auf die Aktivierung des Bronchialepithels	77
5.7	Zusammenfassung und Ausblick	78
6	LITERATURVERZEICHNIS	82
7	ANHANG	90
7.1	Publikationsverzeichnis	90
	7.1.1 Originalarbeiten.....	90
	7.1.2 Öffentliche Vorträge	90
	7.1.3 Abstracts	90
7.2	Danksagung	91
7.3	Lebenslauf	92
7.4	Erklärung an Eides statt	93

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Adapterprotein-1
A549	Type II Alveoläre karzinogene Bronchialzellen
AK	Antikörper
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BEAS-2B	Humane bronchiale Epithelzelllinie
β-Gal	β-Galaktosidase
CD	„cluster of differentiation“, Gruppe der Differenzierungsantigene
cfu	„colony forming units“, Kolonie-bildende Einheiten
COPD	„chronic obstructive pulmonary disease“, Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
dH ₂ O	Aqua bidest, doppelt destilliertes Wasser
DNA	„desoxyribonuclein acid“, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol, ein Reduktionsmittel
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„epidermal growth factor“, Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay“, Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
EMSA	„electrophoretic mobility shift assay“, Elektrophorese-Assay
ERK	„extracellular regulated-signal kinase“, extrazellulär regulierte Signalkinase
ETI	Sojabohnen-Trypsininhibitor
FCS	„fetal calf serum“, Fötales Kälberserum
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
G-CSF	„granulocyte- colony stimulating factor“, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	„granulocyte-macrophage-colony stimulating factor“, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HAT	Histonacetyltransferasen
HDAC	Histondeacetylasen
HEK	„human embryonic kidney cells“, Humane Embryonale Nierenzelllinie
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure, Puffersubstanz
IL	Interleukin
IκB	„inhibitory κB“, Inhibitor κB
IKK	„inhibitory-κB kinase“, Inhibitor-κB-Kinase
IgG	Immunglobulin G
INF	Interferon
JNK	„c-Jun NH ₂ -terminal kinase“, c-Jun NH ₂ -terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LBP	LPS-bindendes Protein
LOS	Lipooligosaccharid
LP	Lipopeptid
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	„lipoteichonic acid“, Lipoteichonsäure
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MCP-1	„monocyte chemoattractant protein-1“, Monozyten chemotaktisches Protein-1
MIP 1β	„Macrophage inflammatory protein“, Makrophagen inflammatorisches Protein 1β
MOI	„multiplicity of infection“, Bakterienanzahl pro Zelle
<i>M. catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
mRNA	messenger RNA
NAD	Nicotinamid – adenine Dinucleotid
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
NF-κB	Nuklear Transkriptionsfaktor-κB
NOD	„nucleotide-binding oligomerization domain“, Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne
OD	Optische Dichte
OMP	„outer membrane protein“, Oberflächenmembranprotein
PAMP	„pathogen associated molecular pattern“, Pathogen-assoziierte molekulare Muster

P-3-C	„Pam-3-Cys“, (S)-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys4-OH
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
PBS +/-	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Kalzium und Magnesium
PMA	Phorbolmyristataacetat
p38	Stress-aktivierte MAPK von 38 kDa
RNA	„ribonuclein acid“, Ribonukleinsäure
PRR	„pattern recognition receptor“, mustererkennender Rezeptor
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
spp.	Spezies
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	„transforming growth factor“, transformierender Wachstumsfaktor
TMB	Tetramethylbenzidin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSA	Trichostatin A
u	„unit“, Einheit
Usp1	„ubiquitous surface protein 1“, ubiquitäres Oberflächenprotein 1
Usp2	„ubiquitous surface protein 2“, ubiquitäres Oberflächenprotein 2
UV	Ultraviolett
VK	Inspiratorische Vitalkapazität
WHO	World Health Organisation

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Circulus-vitiosus-Hypothese der COPD	4
Abb. 2: Mikroskopische Aufnahme von adhärierenden <i>M. catarrhalis</i> Kolonien auf humanen bronchialen Epithelzellen (BEAS-2B Zellen)	5
Abb. 3: Aufbau von LOS und den verschiedenen Serotypen (A) im Vergleich zu LPS (B)	7
Abb. 4: Die Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden – Signaltransduktionswege	13
Abb. 5: Klassischer Aufbau einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kaskade	15
Abb. 6: Transkriptionskontrolle am Beispiel des IL-8 Gens	16
Abb. 7: Epigenetische Regulation durch die Aktivität der HDACs und HATs	19
Abb. 8: Übersicht über die durchgeführten Versuche mit <i>M. catarrhalis</i>	32
Abb. 9: Zeit- und dosisabhängige Zytokinsekretion in BEAS-2B Zellen	46
Abb. 10: Dosis- und zeitabhängige IL-8 und GM-CSF Expression in BEAS-2B Zellen.....	47
Abb. 11: Pro- und antiinflammatorische Zytokinexpression in BEAS-2B Zellen.....	48
Abb. 12: IL-8 Sekretion der Stämme O35E und ATCC25238 im Vergleich.....	49
Abb. 13: <i>M. catarrhalis</i> induzierte Zytotoxizität in BEAS-2B Zellen	50
Abb. 14: <i>M. catarrhalis</i> induziert die Phosphorylierung der MAPK p38, ERK, JNK.....	51
Abb. 15: Die Inhibition von ERK1/2 und p38 vermindert die <i>M. catarrhalis</i> induzierte IL-8 und GM-CSF Sekretion.....	52
Abb. 16: Die Inhibition von ERK1/2 und p38 vermindert die <i>M. catarrhalis</i> induzierte IL-8 und GM-CSF mRNA Synthese	53
Abb. 17: Degradation von IκBα im Western Blot.....	54
Abb. 18: <i>M. catarrhalis</i> induziert die Bindung von NF-κB an die DNA.....	54
Abb. 19: NF-κB abhängige Reduktion der IL-8 und GM-CSF Expression	55
Abb. 20: <i>M. catarrhalis</i> induzierte Bindungsaktivität von NF-κB über die MAPK.....	56
Abb. 21: <i>M. catarrhalis</i> induzierte NF-κB Aktivierung über TLR2 und TLR4.....	57
Abb. 22: <i>M. catarrhalis</i> induziert eine IL-8 Sekretion über TLR2 und TLR4	58
Abb. 23: TSA verstärkt die durch <i>M. catarrhalis</i> induzierte IL-8 Sekretion in BEAS-2B Zellen ..	59
Abb. 24: Abnahme der HDAC-1 und HDAC-2 Expression nach Stimulation mit <i>M. catarrhalis</i> .	60
Abb. 25: <i>M. catarrhalis</i> bedingt eine Abnahme der HDAC Aktivität	61
Abb. 26: Vergleich der einzelnen Stämme bei der IL-8 und GM-CSF Sekretion.....	62
Abb. 27: LPS und LOS induzieren die IL-8 Sekretion in BEAS-2B Zellen.....	63
Abb. 28: LOS induziert die NF-κB Aktivierung über TLR4	64
Abb. 29: Inhibition der durch <i>M. catarrhalis</i> induzierten IL-8 Sekretion durch Hitze und UV-Licht Einwirkung.....	65
Abb. 30: Beteiligte Signalkaskaden und Einflüsse der <i>M. catarrhalis</i> induzierten Immunantwort in bronchialen Epithelzellen	78

1 Einleitung

1.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung

1.1.1 Definition und Klinik

Die COPD (englisch: „chronic obstructive pulmonary disease“) ist eine multifaktorielle chronische Erkrankung der Lunge, die klinisch durch eine Kombination aus chronischem Husten, einer Atemflussbehinderung und einem eingeschränkten Gasaustausch gekennzeichnet ist. Es handelt sich bei der COPD um eine komplexe Erkrankung, deren verschiedene Symptome auf eine chronische obstruktive Bronchitis und / oder ein Lungenemphysem zurückzuführen sind (Sethi & Murphy 2001).

Die chronische Bronchitis ist definiert durch persistierenden oder rezidivierenden Husten und Auswurf infolge vermehrter Schleimsekretion über mindestens drei Monate in zwei aufeinanderfolgenden Jahren, ohne der Notwendigkeit des Bestehens einer Atemwegsobstruktion (Worth et al. 2002; Barnes 2004). Bei der chronisch obstruktiven Bronchitis liegt zusätzlich eine obstruktive Ventilationsstörung vor, d.h. eine Verengung der Atemwege mit erhöhten Ausatemwiderständen und entsprechend verlangsamter Entleerung der Lungen, bestimmbar mittels Lungenfunktionsprüfung, der Spirometrie (Pauwels et al. 2001).

Das Lungenemphysem ist definiert als eine irreversible Erweiterung der Lufträume distal der terminalen Bronchiolen begleitet von einer Destruktion der Alveolarsepten, woraus eine Verminderung der inneren Atmungsoberfläche resultiert (MacNee 2005).

Diagnostisch lässt sich bei dieser Erkrankung regelhaft eine nicht vollständig reversible Atemflussbehinderung in der Spirometrie nach Gabe von Bronchodilatoren und / oder Glukokortikoiden nachweisen, die auf die chronisch obstruktive Bronchitis zurückzuführen ist (Pauwels et al. 2001; Sethi & Murphy 2001; GOLD 2005).

Der Krankheitsverlauf der COPD ist durch eine progrediente Verschlechterung der Lungenfunktion und eine zunehmende Beeinträchtigung des Befindens gekennzeichnet. Häufig erleiden die Patienten akute Episoden mit vorübergehender Verschlechterung der respiratorischen Symptome - sogenannte akute Exazerbationen, die verbunden sind mit einer Zunahme der Morbidität und Mortalität (Sethi et al. 2000; Patel et al. 2002). Zunächst kommt es durch die gestörte Gasaustauschfunktion der Lunge zu einem Abfall des Sauerstoffgehaltes im Blut, später zusätzlich zu einem Anstieg des Kohlenstoffdioxides mit der daraus resultierenden respiratorischen Globalinsuffizienz. Als Folge der chronischen Hypoxie kommt es zu einer Polyglobulie

sowie über eine hypoxisch bedingte, als v. Euler-Liljestrand-Mechanismus bezeichnete pulmonale Vasokonstriktion zu einer anhaltenden Druckerhöhung im Lungenkreislauf, der pulmonalen Hypertonie. Diese geht häufig mit der Entwicklung eines chronischen Cor pulmonale, einer Hypertrophie und Dilatation des rechten Herzens einher. Die fortgeschrittene respiratorische Insuffizienz und die Dekompensation des Cor pulmonale führen bei diesen Patienten häufig zum Tode (Pauwels et al. 2001).

Die Therapie richtet sich entsprechend nach der Schwere der Erkrankung. Die hierfür notwendige Einteilung in vier Schweregrade nach GOLD (englisch: „global initiative for chronic obstructive lung disease“) erfolgt anhand der Bestimmung des expiratorischen Atemflusses der FEV1 (Forciertes Einsekunden-Volumen) und der relativen Sekundenkapazität (FEV1/VK) im Lungenfunktionstest. Bei beginnender Symptomatik ohne Einschränkungen der Lungenfunktion genügt die Vermeidung von Risikofaktoren wie Tabakrauch oder beruflicher Noxen. Mit zunehmender Symptomatik kommen zusätzlich Medikamente wie Beta-2-Sympatomimetika, Anticholinergika und später auch Theophyllin sowie Glukokortikoide zum Einsatz (Worth et al. 2002).

1.1.2 Epidemiologie und sozialökonomische Bedeutung

Die COPD gewinnt für die Gesundheitssysteme der westlichen Industrienationen immer mehr an Bedeutung. So gilt die Erkrankung inzwischen in den USA als die vierthäufigste Todesursache. In den kommenden Jahren ist weltweit ein weiterer Anstieg an Prävalenz, Morbidität und Mortalität zu erwarten (Lopez & Mathers 2006). Dadurch werden in Zukunft enorme Kosten im Gesundheitssystem entstehen (Murphy et al. 2005). In Deutschland lag die COPD im Jahr 2002 an siebter Stelle der Todesursachen (Nowak et al. 2004). Auch hier wird mit einem Anstieg der Mortalität gerechnet. Genaue Erkenntnisse über die Prävalenz der COPD in Deutschland sind bisher nicht bekannt. Geschätzte Daten erstrecken sich von zwei bis sieben Prozent bezogen auf die Gesamtbevölkerung. Unbestritten ist die sozioökonomische Bedeutung der COPD. Die durchschnittlichen Kosten für die COPD Patientengruppe belaufen sich auf ca. 2,6 bis 8,2 Milliarden Euro pro Jahr. Der Hauptanteil dieser Kosten wird durch Krankenhausaufenthalte und Medikamente verursacht, ebenfalls hohe Kosten entstehen durch Frührente und Arbeitsunfähigkeit (Worth et al. 2002; Nowak et al. 2004).

1.1.3 Pathogenese und Pathophysiologie der COPD

Im Rahmen der COPD kommt es in den peripheren Luftwegen, den Bronchiolen und im Lungengewebe zu einer komplexen chronischen Entzündungsreaktion, bei der eine Vielzahl inflammatorischer Zellen sowie das Atemwegsepithel beteiligt sind. Je nach Schweregrad der COPD findet man in den Atemwegen bei milderer Formen entweder überwiegend T-Lymphozyten, besonders der CD8+ Zellreihe, oder Makrophagen, während neutrophile Granulozyten zusammen mit den Makrophagen das Bild der schweren Formen dominieren (Di Stefano et al. 2004b). Diese inflammatorischen Zellen erreichen mit Hilfe von sezernierten Zytokinen und Chemokinen aus geschädigten bronchialen Epithelien über kleine Gefäße ihren Zielort, produzieren dort selbst Botenstoffe und tragen damit zur Rekrutierung weiterer Zellen und zur Aufrechterhaltung der lokalen Entzündung bei (Barnes 2004; Hogg 2004). Dieser Prozess der Rekrutierung von Entzündungszellen über spezielle Chemokine wird als Chemotaxis bezeichnet. Zusätzlich zu der anhaltenden Entzündungssituation kommt es zu einer Störung der mukoziliären Clearance, d.h. der mukoziliären Reinigung des Bronchialtraktes, einhergehend mit einer gesteigerten Sputumproduktion, chronischem Husten, Atemnot und einem eingeschränkten Gasaustausch. Außerdem führt das häufig zusätzlich bestehende Emphysem zu einem Verlust der Gasaustauschfläche sowie der Elastizität der Lunge mit einer daraus resultierenden Verminderung des expiratorischen Atemflusses (Chung 2001).

In den westlichen Ländern ist der Hauptrisikofaktor für die Entstehung der COPD der Nikotinabusus. Weitere Risikofaktoren sind eine zunehmende Verschmutzung der Atemluft sowie eine berufliche Exposition mit Noxen (Barnes 2004). Die ständige Besiedelung des Tracheobronchialbaumes mit potentiellen respiratorischen Pathogenen wie *M. catarrhalis*, *H. influenzae* und *S. pneumoniae* bei Patienten mit COPD führte zu der Annahme einer Circulus vitiosus Hypothese, mit der möglicherweise die Persistenz der entzündlichen Prozesse, wie auch das Fortschreiten der Erkrankung erklärt werden kann (Sethi & Murphy 2001). Dabei wird angenommen, dass die kolonisierenden Bakterien schädigende Einflüsse auf das Bronchialepithel nehmen, was die mukoziliäre Clearance, die Abwehrfähigkeit des Bronchialepithels, vermindert und damit wiederum die bakterielle Kolonisation fördert. Dieser Kreislauf wird verstärkt durch die inflammatorische Wirtsantwort der bronchialen Epithelzellen und der sich entwickelnden Erhöhung der elastolytischen Aktivität in der Lunge (Sethi & Murphy 2001).

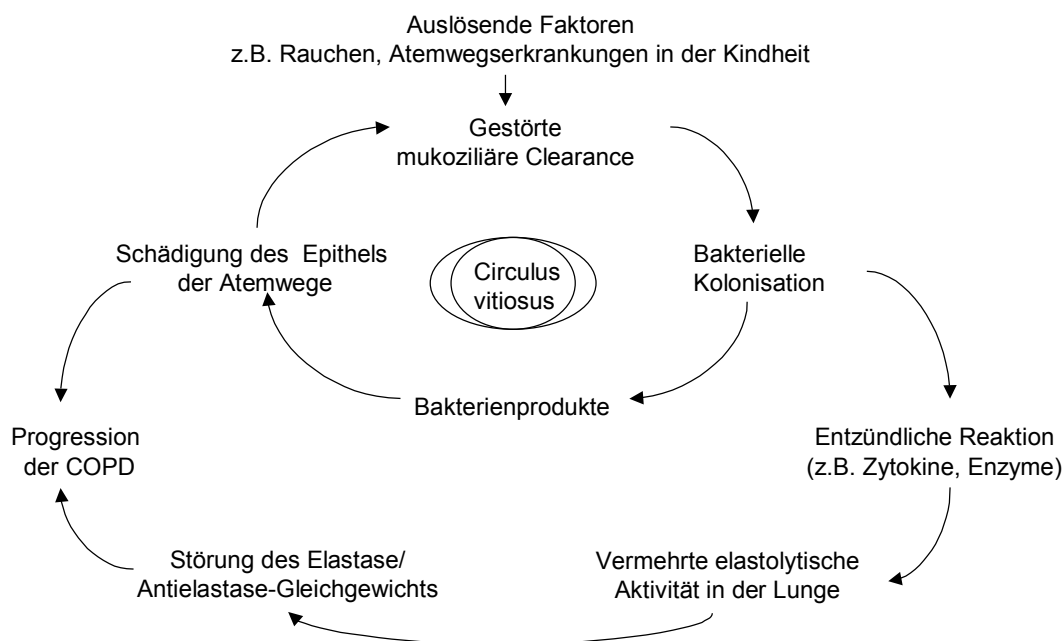


Abb. 1: Schematische Darstellung der Circulus-vitiosus-Hypothese der COPD

[modifiziert nach (Sethi & Murphy 2001)]

Charakteristisch für die COPD ist die periodisch wiederkehrende Verschlechterung der respiratorischen bzw. obstruktiven Symptomatik, die sich in Form von verstärkter Luftnot, vermehrtem Husten und Sputumproduktion manifestiert und als akute Exazerbation bezeichnet wird. Zu etwa 60 Prozent werden diese akuten Exazerbationen durch bakterielle Infektionen der Bronchien verursacht. Dabei spielt *M. catarrhalis* mit bis zu 30 Prozent neben *H. influenzae* und *S. pneumoniae* eine wichtige Rolle (Sethi et al. 2002; Murphy et al. 2005). Selten können auch virale Infektionen und andere atypische Bakterien an einer Exazerbation beteiligt sein (Sethi 2005; Sethi et al. 2005).

1.2 *Moraxella catarrhalis*

1.2.1 Einteilung / Identifizierung / Kolonisierung

M. catarrhalis, ein gramnegativer Diplokokkus, wurde erstmals als *Mikrococcus catarrhalis* im Jahre 1896 beschrieben (Frosch & Kolle 1896). Später zeigte Berger 1963, dass die ursprüngliche Gattung zwei verschiedene Spezies *Neisseria cinerea* und *Neisseria catarrhalis* beinhaltet. In den 70er Jahren erfolgte aufgrund neuer

Erkenntnisse die Zuordnung dieses Bakteriums zu einer neuen Gattung und wurde nun *Branhamella catarrhalis* genannt. Anhand von neueren DNA-DNA und rRNA-DNA Hybridisierungsstudien sowie durch den Vergleich von 16 S-rDNA-Sequenzen konnte gezeigt werden, dass *M. catarrhalis* ausreichende Ähnlichkeit zu *Moraxellen spp.* besitzt und die Kriterien zur Einordnung in diese Gattung erfüllt (Karalus & Campagnari 2000; Verduin et al. 2002).

Lange verkannt als harmloser Kommensal des oberen Respirationstraktes wurde *M. catarrhalis* erst in den 90er Jahren als bedeutender Erreger respiratorischer Infektionen erkannt (Enright & McKenzie 1997). Das gramnegative, aerobe Bakterium gilt heute als der zweithäufigste Erreger der infektexazerbierten COPD sowie als der dritthäufigste Erreger der Otitis media im Kindesalter (Sethi & Murphy 2001). Neben diesen Erkrankungen verursacht *M. catarrhalis* weitere Infektionen im gesamten Respirationstrakt. Außerdem kann *M. catarrhalis* die respiratorische Schleimhaut von Kindern und anderen gesunden Individuen besiedeln, d.h. kolonisieren. Hierbei besteht ein Zusammenhang zwischen der Rate der Kolonisierung und dem Alter der Bevölkerung. Durchschnittlich sind ein bis fünf Prozent der gesunden Erwachsenen mit *M. catarrhalis* besiedelt (Sethi & Murphy 2001). Im Gegensatz dazu weisen Patienten mit einer COPD eine Kolonisierungsrate von bis zu 30 Prozent auf (Murphy et al. 2005). Über die Konsequenzen der Besiedelung des Bronchialtraktes mit *M. catarrhalis* bzw. über die Mechanismen der Beteiligung von *M. catarrhalis* an der Pathogenese der infektexazerbierten COPD ist nur wenig bekannt.

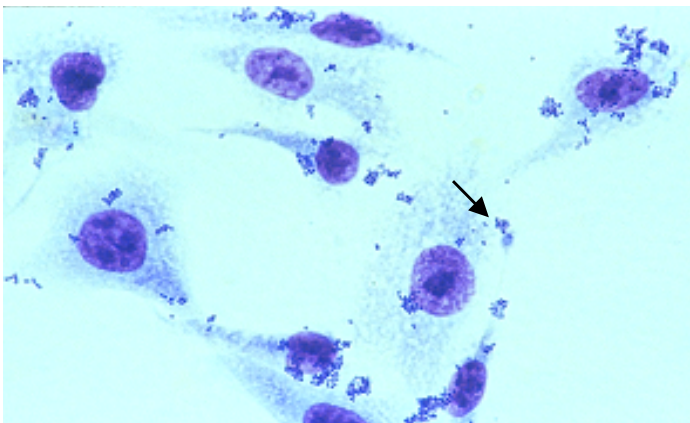


Abb. 2: Mikroskopische Aufnahme von adhätierenden *M. catarrhalis* Kolonien auf humanen bronchialen Epithelzellen (BEAS-2B Zellen)

Die mikroskopische Aufnahme zeigt isolierte BEAS-2B Zellen mit adhätierenden *Moraxellen*. Färbung nach Pappenheim, eigene Abbildung.

Bemerkenswert ist die rasche Resistenzentwicklung, die sich in der letzten Dekade gegen β -Laktamase ausgebildet hat und die inzwischen über 90 Prozent der *M. catarrhalis* Isolate aufweisen (Gu et al. 1998; Sethi et al. 2005). Zur Zeit werden für die antibiotische Behandlung *M. catarrhalis* bedingter Infektionen des Respirationstraktes Cephalosporine der 2. oder 3. Generation sowie alternativ Gyrasehemmer empfohlen. Außerdem wurden weitere Anstrengungen im Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten mit Impfstoffen gegen bekannte Virulenzfaktoren des Erregers unternommen. Jedoch führte bisher keine Impfung zu einem vollständigen Schutz vor Infektionen mit *M. catarrhalis*.

Als ein ausschließlich humanpathogener Keim gibt es für *M. catarrhalis* kein aussagefähiges Tiermodell, welches eine deutliche Einschränkung bezüglich der Untersuchungen zur pathogenetischen Bedeutung dieses Erregers darstellt (Sethi & Murphy 2001).

1.2.2 Pathogenitätsfaktoren von *M. catarrhalis*

Zu den bisher bekannten Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis* zählen die Oberflächenproteine, englisch: outer membrane proteins (OMPs), das Endotoxin Lipooligosaccharid (LOS) in den drei Serotypen A, B und C sowie Proteine, die der Eisenverwertung dienen und Pili zur Adhäsionsvermittlung (McMichael 2000). Durch diese Virulenzfaktoren werden die pathogenetischen Mechanismen des Erregers vermittelt. Dabei ist ihre Bedeutung größtenteils noch nicht vollständig charakterisiert (Karalus & Campagnari 2000; Sethi & Murphy 2001).

Zu den bereits untersuchten Oberflächenproteinen gehören die OMPs A bis H, die ein Molekulargewicht von 21 bis 98 kDa aufweisen sowie das später entdeckte HMW-OMP (high-molecular-weight OMP) UspA. Dieses im Zentrum der Forschung stehende OMP besteht aus zwei verwandten Proteinen dem UspA1 und dem UspA2. Das UspA1 ist ein Adhäsion, welches den Bakterien ermöglicht an Epithelzellen zu binden. Es weist ein Molekulargewicht von 120 kDa auf. UspA2, mit einem geringeren Molekulargewicht von 85 kDa, wirkt durch seine Komplementresistenz der unspezifischen Immunabwehr entgegen (Lafontaine et al. 2000).

Das LOS ist ein Hauptbestandteil der äußeren Membran von *M. catarrhalis* und stellt einen wesentlichen Virulenzfaktor dar (Hu et al. 2001). Der Name Lipooligosaccharid verweist auf die chemische Struktur von LOS; es besteht aus einem hydrophilen Oligosaccharid (äußere und innere Kernregion) und einem hydrophoben Lipid A. Die für das Lipopolysaccharid (LPS) der äußeren Membran gramnegativer Bakterien charakteristische lange O-Seitenkette fehlt dem LOS.

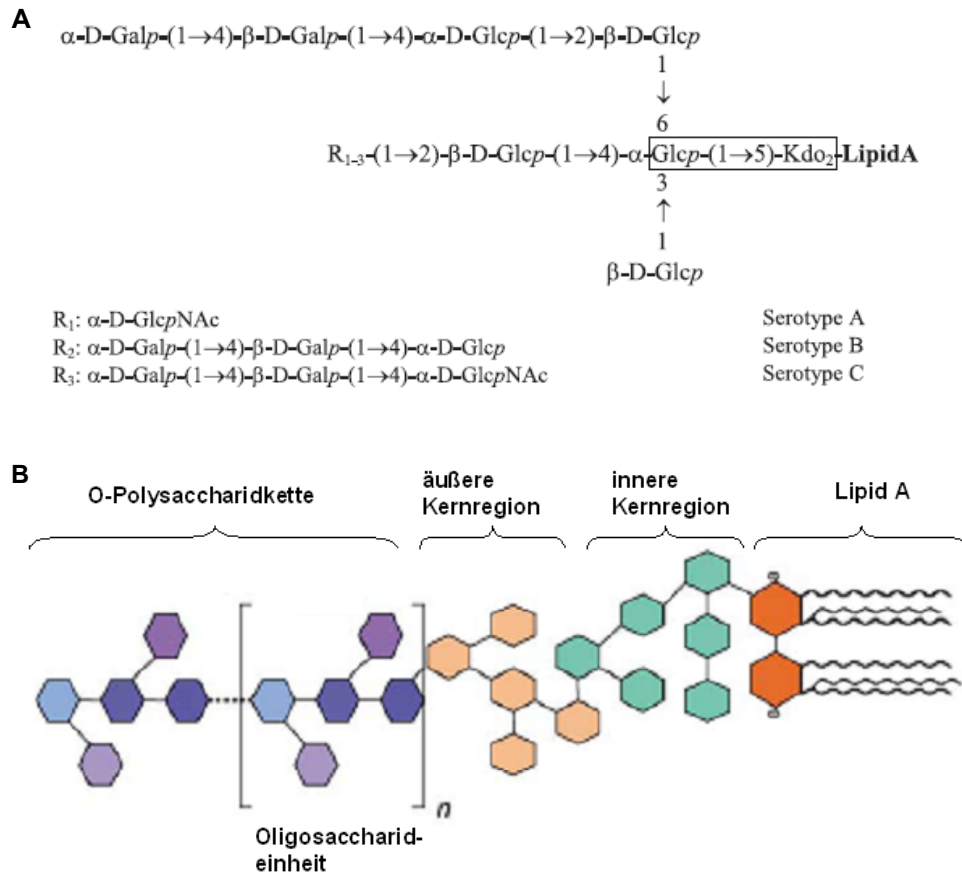


Abb. 3: Aufbau von LOS und den verschiedenen Serotypen (A) im Vergleich zu LPS (B)

Abbildung A zeigt die Struktur der einzelnen Serotypen des LOS von *M. catarrhalis*. Kdo, 2-Keto3-desoxyoctonsäure; Gal, Galaktose; Glc, Glukose, GlcNAc, N-Acetyl-Glukosamin [nach (Verduin et al. 2002)]

Abbildung B stellt die Struktur von LPS dar. Der äußere Kern enthält die häufig vorkommenden Saccharide Glukose, Galaktose, Glukosamin und Galaktosamin, während der innere Kern den in der Natur selten synthetisierten Zucker 2-Keto3-desoxyoctonsäure (Kdo) und Heptosereste, die phosphoryliert sein können, enthält. Das Grundgerüst des Lipid A ist ein phosphoryliertes Glukosamindisaccharid, welches bis zu sechs Fettsäurereste trägt. [modifiziert nach (Erridge et al. 2002)].

LOS Epitope von *M. catarrhalis* weisen Übereinstimmungen mit denen von *H. influenzae* und *N. meningitidis* auf, die wiederum bei diesen Pathogenen als Virulenzfaktoren fungieren (Holme et al. 1999; Clemans et al. 2000; Karalus & Campagnari 2000). Als Bestandteil bakterieller Membranen werden die hitzestabilen Lipopolysaccharide auch als Endotoxine bezeichnet, die im Gegensatz zu den hitzelabilen, eiweißartigen Exotoxinen u. a. bei bakterieller Zellteilung oder Lyse der Zelle aus den äußeren Membranen freigesetzt werden. Viele Studien beschreiben die Bedeutung von LPS als wesentlichen Pathogenitätsfaktor gramnegativer Bakterien (Schröder et al. 2004; Roos-Engstrand et al. 2005).

Die auf der Oberfläche von *M. catarrhalis* exprimierten Rezeptorproteine Transferrin (TbpA und TbpB) und Laktoferrin (LbpA und LbpB) dienen u.a. der Bereitstellung von Eisen für die verschiedensten metabolischen Prozesse (Karalus & Campagnari 2000; Sethi & Murphy 2001).

Angesichts der fortschreitenden Resistenzentwicklung und dem Fehlen wirksamer Impfstoffe ist die Entwicklung neuer Therapiestrategien von Bedeutung. Von besonderem Interesse sind die OMPs UspA1 und UspA2, da sie eine humorale, mukosale und systemische Immunantwort beim Menschen induzieren können (McMichael 2000; Peng et al. 2005).

1.3 Die Rolle des Bronchialepithels bei der COPD

Das Bronchialepithel stellt eine wichtige Barrierefunktion gegenüber Pathogenen wie Bakterien und Viren sowie Schadstoffen und Stäuben dar. Es besitzt die Möglichkeit der mechanischen Eliminierung von Bakterien und inhalierten Partikeln über den produzierten Schleim der Becherzellen und den rachenwärts gerichteten Zilienschlag. Weiterhin ist das Bronchialepithel in der Lage, Pathogene und Noxen zu erkennen und aktiv bei der Generierung einer spezifischen Immunantwort mitzuwirken. Dieses geschieht u.a. durch speziell sezernierte Substanzen wie Zytokine und Chemokine aber auch durch antimikrobiell wirksame Peptide als Teil der angeborenen Immunantwort. Des Weiteren sezernieren die Epithelzellen IgA als Bestandteil der erworbenen Immunantwort, womit sie u.a. der Adhäsion und der Absorption schädlicher Bakterien und Viren entgegenwirken können (Pilette et al. 2001; Gonzales et al. 2002; Pettersen & Adler 2002; Barnes et al. 2003; Barnes 2004).

Dem Atemwegsepithel kommt somit eine multifunktionelle Rolle bei der Pathogenese und Progression der COPD zu (Barnes et al. 2003). Insbesondere über die Bedeutung und die Mechanismen der Interaktion von *M. catarrhalis* mit dem respiratorischen Epithel ist zur Zeit sehr wenig bekannt. Auch der Einfluss der zu beobachtenden Kolonisierung des Bronchialbaumes durch *M. catarrhalis* ist noch unzureichend erforscht.

1.4 Das angeborene Immunsystem

1.4.1 Zusammenspiel der angeborenen und erworbenen Immunantwort

Die Immunabwehr gegen exogene Einflüsse wie Bakterien, Viren oder Noxen beruht auf dem Zusammenspiel zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität. Das phylogenetisch wesentlich ältere angeborene Immunsystem, die sogenannte „innate immunity“ stellt den ersten Schutz des Organismus nach Erregerkontakt her, indem bestimmte Zellen wie Epithelien, Leukozyten und Makrophagen die eindringenden Krankheitserreger u.a. mittels spezifischer Rezeptoren, sogenannter „pattern recognition receptors“ (PRR) erkennen und daraufhin mit der Synthese von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen und Chemokinen reagieren können (Akira et al. 2006).

Zu den Haupteffektoren der erworbenen Immunantwort „adaptive immunity“ gehören die T- und B-Lymphozyten. Für die Aktivierung dieser Immunantwort bedarf es einer Präsentation von Bestandteilen der Mikroorganismen oder anderer Fremdstoffe (Antigene) durch die antigenpräsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems (Hoebe et al. 2004; Martin & Frevert 2005).

1.4.2 Zytokine und Chemokine

Die Zytokine sind extrazelluläre Signalproteine, die von verschiedenen Zelltypen gebildet werden und Zell-Zell-Interaktion vermitteln. Die funktionelle Einteilung der Zytokine gliedert sich in proinflammatorische Zytokine, T-Zell-gebildete Zytokine, chemotaktische Zytokine (Chemokine), antiinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren (Chung 2001). Eine besondere Untergruppe der Zytokine bilden die sogenannten Chemokine. Bei den Chemokinen, von denen bereits mehr als 50 bekannt sind, handelt es sich um niedermolekulare Zytokine mit einem Molekular-

gewicht von 8-14 kDa, die sich in CXC, CC, C und CX₃C Chemokine unterteilen lassen (Chung 2001; Hoffmann et al. 2002). Die zwei Hauptgruppen der Chemokine, CXC-Chemokine und CC-Chemokine unterscheiden sich durch die Position der beiden ersten Cysteine (C), die entweder durch die Aminosäure (X) getrennt oder direkt benachbart sind. Der Hauptvertreter der CXC-Chemokine ist das IL-8. Während MIP und MCP als Vertreter der CC-Chemokine ihre Wirkung auf Monozyten und Lymphozyten entfalten, zeigt IL-8 besonders auf neutrophilen Granulozyten seinen Einfluss (Strieter 2002). In der weiteren Arbeit werden die Chemokine unter dem Oberbegriff der Zytokine subsumiert.

Die proinflammatorischen Zytokine, die anfänglich an der Entzündungsreaktion beteiligt sind und deshalb auch „early response cytokines“ genannt werden, setzen sich aus IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α zusammen. Weitere proinflammatorische Mediatoren sind IL-8, GM-CSF, G-CSF, INF- γ , TGF- β , IL-5, IL-7, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18 und eine Vielzahl anderer. Im Rahmen der Entzündungsreaktion werden neben pro- auch antiinflammatorische Zytokine gebildet. Zu diesen zählen z. B. IL-4, IL-10, IL-13, IL-16 und IFN- α (Chung 2001; Barnes 2004). Die funktionelle Bedeutung von Zytokinen liegt u. a. in der Synthese weiterer Entzündungsmediatoren oder proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 und GM-CSF von Makrophagen und anderen Zellen, wie Epithelzellen oder Endothelzellen, sowie in ihrer chemotaktischen und antiinflammatorischen Wirkung. Weiterhin können z. B. IL-1, IL-6 und TNF- α als endogene Pyrogene wirksam werden. Für den Verlauf einer Entzündung ist die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und den Zytokininhibitoren ausschlaggebend.

1.4.3 IL-8 und GM-CSF als Marker der Entzündungsreaktion

Das IL-8, welches erstmals 1987 beschrieben wurde, gehört zur Superfamilie der Chemokine und wird von Epithelzellen, von Alveolarmakrophagen, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten auf bakterielle und virale Molekülstrukturen wie u. a. auf LPS oder Lipoteichonsäure hin sezerniert (Pettersen & Adler 2002). Es wirkt primär chemotaktisch und aktivierend auf neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen. GM-CSF stimuliert die Proliferation und Differenzierung der neutrophilen, eosinophilen und monozytären Zellreihen. Außerdem initiiert GM-CSF die phänotypische Differenzierung, Aktivierung und Rekrutierung von Antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen und Alveolarmakrophagen) und wirkt chemotaktisch auf eosinophile Granulozyten (Strieter 2002).

Sowohl IL-8 als auch GM-CSF werden von bronchialen Epithelzellen auf exogene bzw. endogene Reize hin sezerniert. Der Nachweis dieser Zytokine im Zellüberstand induziert durch *M. catarrhalis* lässt somit Rückschlüsse auf das zelluläre Reaktionsmuster und das Ausmaß der Zellaktivierung zu. Als exemplarisches Zytokin wird in dieser Arbeit hauptsächlich IL-8 untersucht, welches zum großen Anteil an der Generierung entzündlicher Prozesse beteiligt und für die Pathogenese der COPD von Bedeutung ist (Di Stefano et al. 2004a).

1.4.4 Rezeptoren der angeborenen Immunität („innate immunity“)

Funktionell lassen sich die mustererkennenden Rezeptoren, die sogenannten PRRs („pattern recognition receptors“), der angeborenen Immunantwort in sezernierende, endozytierende und signaltransferierende einteilen (Medzhitov & Janeway 2000). Im Folgenden soll ausschließlich auf die Rezeptoren mit signaltransferierenden Funktionen eingegangen werden.

Die Toll-like Rezeptoren, die als die bestuntersuchten signaltransferierenden PRRs gelten, dienen der schnellen Erkennung eindringender Pathogene und der Induktion erster Abwehrmechanismen. Sie erkennen hoch-konservierte Motive von Mikroorganismen, sogenannte „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) (Akira et al. 2006). Zu diesen Strukturen gehören Bestandteile der Zellwand gramnegativer und grampositiver Bakterien, wie z. B. das Lipopolysaccharid (LPS), Lipopeptide (LP), Lipoproteine und Lipoteichonsäure (LTA), aber auch bakterielle DNA (CpG-Motive) und virale RNA (dsRNA). Allen Toll-like Rezeptoren ist gemeinsam, dass sie für die Signaltransduktion Rezeptorkomplexe bilden, die entweder aus Heterodimeren verschiedener TLRs, wie z. B. bei TLR2 mit TLR1 oder als Homodimer desselben TLRs bestehen können. Sie werden auf vielen verschiedenen Zellen des menschlichen Organismus exprimiert, wie z. B. auf Epithelzellen, dendritischen Zellen, Makrophagen, Granulozyten sowie auf Zellen lymphatisches Gewebes. (Aderem & Ulevitch 2000; Beutler 2004).

„Toll“ wurde erstmals als ein entscheidendes Gen für die dorsoventrale Musterbildung in der Embryonalentwicklung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert (Anderson et al. 1985a; Anderson et al. 1985b). Erst 1996 stellte sich die Bedeutung der durch Toll kodierten Proteinfamilie für die angeborene Immunantwort bei *Drosophila* heraus (Lemaitre et al. 1996). Kurze Zeit später fand man entsprechende

Homologe der Toll-like Rezeptoren (TLR) in der Maus und beim Menschen. Bisher konnten zehn Toll-like Rezeptoren beim Menschen identifiziert werden (TLR 1-10) (Janssens & Beyaert 2003; Martin & Frevert 2005). Die in dieser Arbeit untersuchten Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 stellen den hauptsächlichen Anteil an der Erkennung bakterieller Zellwandbestandteile dar. TLR4 ist gemeinsam mit einem LPS-Bindungsprotein sowie den Molekülen CD14 und MD-2 essentiell an der Erkennung von LPS gramnegativer Bakterien beteiligt (Aderem & Ulevitch 2000; Sabroe et al. 2004). Beide Rezeptoren sind nachweislich verantwortlich für die Induktion einer Inflammation durch *S. pneumoniae* und *H. influenzae* im Respirationstrakt (Lorenz et al. 2005; Schmeck et al. 2006b) und somit vermutlich auch bedeutsam für eine *M. catarrhalis* induzierte Inflammation.

1.4.5 Toll-like Rezeptor vermittelte Aktivierung von Epithelien

Die Erkennung von PAMPs durch TLRs führt über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF- κ B zu einer Induktion inflammatorischer Gene. Dabei werden die erkannten Signale über verschiedene Signalwege in den Epithelzellen weitergeleitet (Chaudhuri et al. 2005). Folgende stark vereinfachte Graphik zeigt schematisch die Aktivierung der einzelnen TLRs durch ihre jeweiligen bisher bekannten Liganden sowie die anschließende Induktion der Inflammation über einige wichtige Signaltransduktionswege.

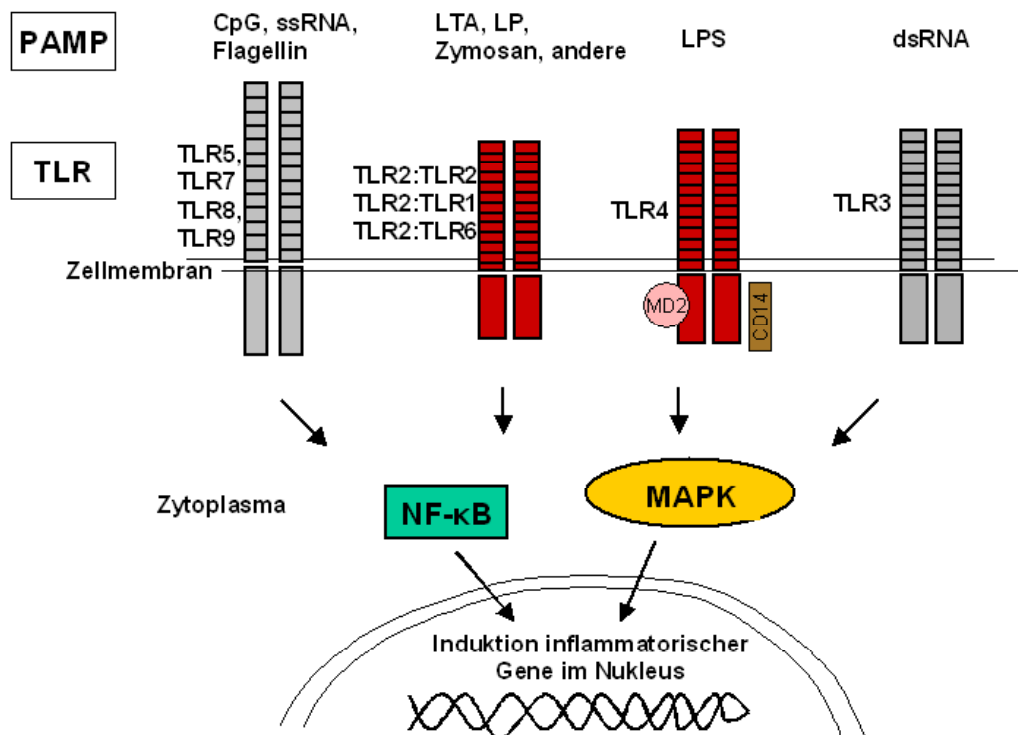


Abb. 4: Die Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden – Signaltransduktionswege

Die Abbildung zeigt einige PAMPs mit ihren bisher identifizierten Toll-like Rezeptoren sowie die stark vereinfachte anschließende Signaltransduktion über die MAPK und NF- κ B, [modifiziert nach (Akira et al. 2006; Trinchieri & Sher 2007)]

CpG (DNA mit unmethylierten CpG Motiven) – TLR9; ssRNA (einzelssträngige RNA) – TLR7, TLR8; Flagellin – TLR5; LP (Lipoprotein), LTA (Lipoteichonsäure), Zymosan und andere - TLR2 und Heterodimere; LPS (Lipopolysaccharid) – TLR4; dsRNA (doppelsträngige RNA) – TLR3; nicht aufgeführt ist TLR10, da bisher kein Ligand bekannt ist

1.5 Reizweiterleitung über Signalkaskaden

1.5.1 MAP-Kinase Signaltransduktionswege

Bevor bronchiale Epithelzellen auf Reize reagieren können, müssen diese erkannt, übersetzt und ins Zellinnere weitergeleitet werden. Die Weiterleitung und Verarbeitung erfolgt u.a. über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, z. B. der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen Kaskaden (MAP-Kinasen Kaskaden). Über eine Beeinflussung der Genexpression kommt es zu einer Reihe verschiedener Zellantworten, wie z. B. zur Induktion der Zytokinexpression, Proliferation oder Apoptose (Puddicombe & Davies 2000).

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) bilden eine Familie von Proteinkinasen, deren Funktion und Regulation sich über die Evolution vom Einzeller wie der Bierhefe bis zum komplexen Organismus erhalten hat. Zu den bisher bekannten MAPK gehören die durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase ERK1/2 (auch p42/p44), die JNK (c-Jun-NH₂-terminale Kinase) und die p38 (38 kDa) sowie die ERK3, 4 und 5 (Kumar et al. 2003; Roux & Blenis 2004). Die Beteiligung der MAPK an der induzierten Inflammation in bronchialen Epithelzellen konnte bereits für die Pathogene *H. influenzae* und *S. pneumoniae* gezeigt werden (Shuto et al. 2001; Schmeck et al. 2004).

Die MAPK leiten ihre Signale über mehrere Stufen weiter. Dazu werden die einzelnen Signalproteine jeweils durch ihren Vorgänger zweifach phosphoryliert und somit aktiviert. Die Phosphorylierung der MAPK findet an einem Threonin- und Tyrosinrest statt. Als MAP-Kinase Aktivatoren fungieren die MAP-Kinase Kinasen (MAPKK), die ihrerseits durch MAP-Kinase Kinase Kinasen (MAPKKK) aktiviert werden. Die MAPK und die zwei stromaufwärts aktivierenden Kinasen bilden zusammen die MAPK Kaskade (Roux & Blenis 2004), siehe auch nachfolgende Abbildung (Abb. 5).

1.5.2 Funktion der MAP-Kinasen

Der ERK-Signalweg wird durch Mitogene wie Wachstumsfaktoren, z. B. EGF oder durch Phorbolster aktiviert. Die Signalwege von JNK und p38-Kinase dagegen sind Reaktionen der Zelle auf Stressfaktoren wie UV-Licht, osmotischen Stress, Zytokine oder Entzündungsmediatoren, weshalb diese häufig auch als „Stress-aktivierte-Proteinkinasen“ (SAPK) bezeichnet werden. Je nach Lokalisation, Zeitverlauf und Höhe der MAP-Kinaseaktivität phosphorylieren z. B. ERK1/2 zytosolische und / oder nukleäre

Substrate, wie z. B. Transkriptionsfaktoren und beeinflussen so verschiedenen Zellfunktionen, wie die Proliferation und Differenzierung von Zellen, während die p38 und die c-Jun-Kinase eher eine Inflammation und Apoptose generieren (Roux & Blenis 2004).

Die nachfolgende Abbildung stellt den Aufbau der MAPK-Signalkaskaden schematisch dar.

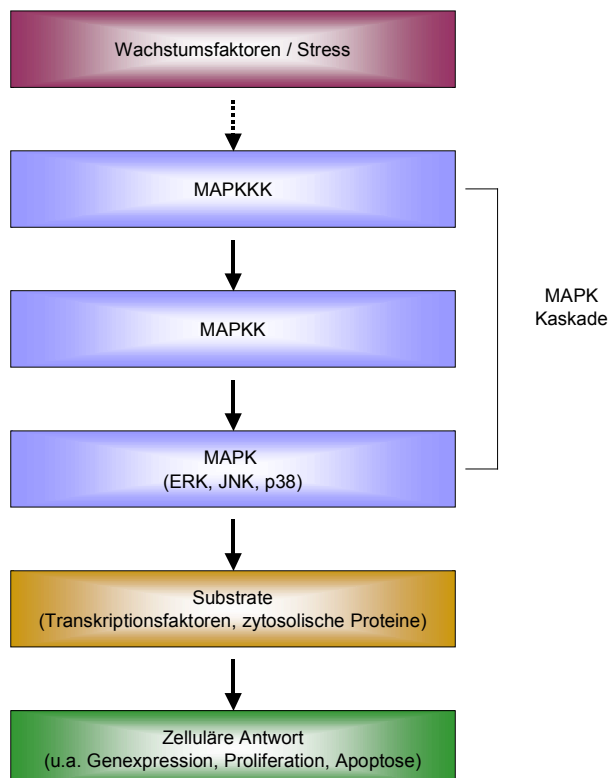


Abb. 5: Klassischer Aufbau einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kaskade

[modifiziert nach (Kumar et al. 2003)]

1.6 Die Expressionskontrolle inflammatorischer Gene am Beispiel von IL-8

In nichtstimulierten ruhenden Zellen liegt bereits eine geringe basale IL-8 Sekretion vor, welche durch die Vielzahl von Induktoren wie proinflammatorischen Zytokinen, bakteriellen oder viralen Bestandteilen und zellulärem Stress stark gesteigert werden kann. Dabei kann es zu einem 10 – 100-fachem Anstieg der IL-8 Expression je nach Stimulus kommen (Hoffmann et al. 2002). Eine maximale Produktion von IL-8 kommt

jedoch erst durch die Kombination verschiedener aktivierender Regulationsmechanismen zustande. Die Regulation in bronchialen Epithelzellen erfolgt, abhängig vom Stimulus, primär auf der Ebene der Transkriptionskontrolle über die Aktivierung des bedeutenden Transkriptionsfaktors NF- κ B und somit der Expression proinflammatorischer Zytokine. Neben NF- κ B sind weitere Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und CAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) für eine optimale IL-8 Genexpression erforderlich sowie verschiedene Koaktivatormoleküle CREB-binding Protein (CBP), NRF und CBP/p300 (Hoffmann et al. 2002). Diese Koaktivatormoleküle agieren als molekulare Schalter, die die Gentranskription kontrollieren. Eine Gentranskription wird nur dann möglich, wenn die Chromatinstruktur geöffnet und die DNA frei zugänglich ist, um die Bindung der RNA Polymerase II sowie basaler Transkriptionskomplexe an die freie DNA zu ermöglichen (Ito et al. 2005).

Eine Aktivierung der MAPK scheint zusätzlich an einer optimalen Induktion der IL-8 Genexpression in bronchialen Epithelzellen beteiligt. Auf der Grundlage chemischer Inhibitorenversuche konnte bereits eine benötigte ERK / JNK und p38 MAP Aktivierung für die IL-8 mRNA und Protein-Expression für verschiedene andere Zellreihen nachgewiesen werden, teilweise auch für bronchiale Epithelzellen (Li et al. 2002; Schmeck et al. 2004). Außerdem spielen posttranskriptionale Mechanismen zur Regulation, z. B. durch Stabilisierungsprozesse der IL-8 mRNA durch MAPK eine Rolle (Hoffmann et al. 2002). Neben diesen beschriebenen Regulationsmechanismen nimmt die epigenetische Regulation mit der Deacetylierung und Acetylierung von Histon-Proteinen einen weiteren bedeutenden Stellenwert ein (Gilmour et al. 2003).

Transkriptionskontrolle: IL-8 Gen

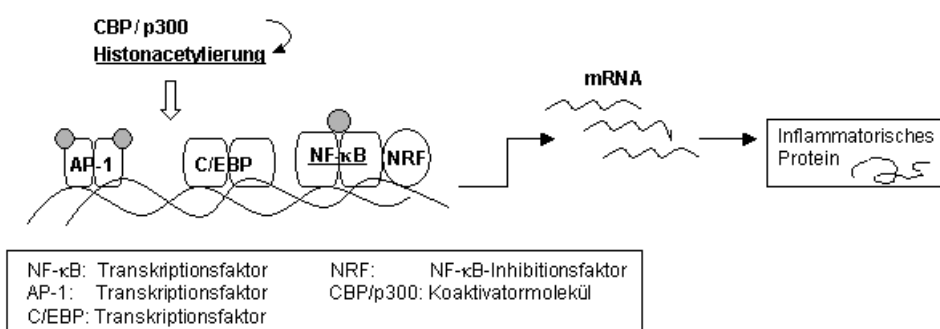


Abb. 6: Transkriptionskontrolle am Beispiel des IL-8 Gens

Die Abbildung zeigt eine vereinfachte Darstellung der Transkriptionsregulation am Beispiel des IL-8 Gens [modifiziert nach (Hoffmann et al. 2002)].

1.6.1 Der Nukleäre Faktor- κ B (NF- κ B)

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert und reguliert die Genexpression in zahlreichen Prozessen der Abwehr, der Stressantwort und der Inflammation. NF- κ B wurde zuerst 1986 als nukleärer Faktor in reifen B-Lymphozyten identifiziert, der dort in der Promotorregion eines Immunglobulin-Gens der κ -Kette bindet (Sen & Baltimore 1986).

NF- κ B ist ein Dimer bestehend aus verschiedenen Mitgliedern der Rel-Protein-Familie, welches sich im Gegensatz zu vielen anderen transkriptionellen Aktivatorproteinen im Zytoplasma der Zellen befindet und, um eine Genexpression induzieren zu können, erst in den Kern transloziert werden muss. Folgende fünf Rel-Proteine kommen in Säugetierzellen vor: p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), c-Rel, p65 (Rel A) und Rel B. Sie existieren sowohl in Form von Homo- als auch Heterodimeren, wobei Säugetierzelltypen am häufigsten das Heterodimer p50 / p65 enthalten (Chen & Greene 2004).

Im Zytoplasma ist NF- κ B an inhibitorische Proteine der IKK-Familie gebunden, der sogenannten I κ Bs. Diese maskieren die nukleäre Lokalisationssequenz, so dass eine Translokation in den Kern mit anschließender Bindung an die Promoterregion des entsprechenden Gens nicht stattfinden kann (Baeuerle & Baltimore 1988). Die Multifunktionseinheit, der I κ B α -Kinase-Komplex (IKK-Komplex), ist für die I κ B Phosphorylierung verantwortlich. Dieser IKK-Komplex besteht aus verschiedenen Faktoren, IKK α , IKK β und der regulatorischen Kinase IKK γ . Das regulatorische Protein IKK γ , auch NEMO genannt, aktiviert diesen IKK-Komplex durch seine Bindung an die C-terminale Region von IKK α und IKK β , genannt NEMO-Bindungsdomäne (NBD) (May et al. 2000). Nach der Aktivierung kommt es zur Phosphorylierung von I κ B α , welche nun der Erkennung dienen und zur Ubiquitinierung führen (Hayden & Ghosh 2004).

Die an der anschließenden Ubiquitinierung beteiligten Enzyme katalysieren die Anlagerung von Ubiquitin an die Lysin-Reste von I κ B α und führen dazu, dass das ubiquitinierte im Gegensatz zum phosphoryliertem I κ B α von NF- κ B dissoziiert. Das mit Ubiquitin markierte I κ B α wird vom 26S Proteasom erkannt und dem proteolytischen Verdau zugeführt (Hayden & Ghosh 2004).

1.6.2 Die Histondeacetylasen / Acetylasen Balance

Histone sind im Zellkern befindliche Proteine, die eine wesentliche Bedeutung für die Organisation der zellulären DNA haben. Die einfachste Struktur ist das so genannte Nukleosom, das aus einem jeweils 146 Basenpaare langen DNA-Abschnitt gewickelt, um einen Kern aus 8 Histonproteinen (je zwei Moleküle H2A, H2B, H3 und H4), besteht (Ito et al. 2005). Jedes Kernhistonprotein besitzt ein langes lysinreiches Proteinende, welches aus dem Nukleosom heraussteht und an welchem Modifizierungen, z. B. Acetylierungen, Methylierungen oder Phosphorylierungen stattfinden können (Peterson & M.-A. 2004).

Diese Veränderungen der DNA, die vererbare Unterschiede in der Genexpression darstellen, untersucht die Epigenetik. Im Gegensatz dazu beschäftigt sich die Genetik mit den vererbaren Unterschieden der DNA –Basensequenz (Roloff & Nuber 2005).

Die Histonacetylierung ist die am besten untersuchte Histonmodifikation, die die Gentranskription beeinflusst und wird durch Histonacetyltransferasen (HAT) kontrolliert (Ito et al. 2005). Demgegenüber bewirken Histondeacetylasen (HDAC) über die Entfernung der Acetylgruppen der Histone eine Rückkehr zu ihrem basalen Status, der mit einer Suppression der Gentranskription einhergeht.

Der Acetylierungszustand von Histonproteinen wird in einem dynamischen Gleichgewicht durch die enzymatischen Aktivitäten von Histonacetyltransferasen (HATs) einerseits und Histondeacetylasen (HDACs) andererseits reguliert. Dabei hemmen deacetylierte Histone die Genexpression, während acetylierte die Genexpression begünstigen. Durch die Acetylierung der Histone wird die Histon-DNA-Bindung aufgelockert und somit die Bindung verschiedener zur Initiierung der Transkription benötigter Faktoren und schließlich der RNA Polymerase II ermöglicht (siehe Abb. 7).

Es wurden bisher 11 HDACs beschrieben, die in zwei große Gruppen unterteilt werden. Klasse I beinhaltet die HDACs 1, 2, 3, 8 und 11, die sich hauptsächlich im Kern befinden, während die zur Klasse II gehörenden HDACs 4, 5, 6, 7, 9 und 10 zwischen Kern und Zytoplasma pendeln können. Eine dritte Klasse der Deacetylasen sind die atypischen NAD-abhängigen Sirtuine, welche entscheidend an der Apoptose beteiligt sind (Barnes et al. 2005).

Die Balance zwischen Acetylierungs- und Deacetylierungsgrad der Histone kann durch niedermolekulare Stoffe mikrobieller Herkunft wie dem Trichostatin A (TSA), LPS oder TNF- α zugunsten der Acetylierung beeinflusst werden. Dadurch kommt es z. B. über

die Hemmung der HDACs 1 und 2 am IL-8 Promotor zu einer verstärkten Expression von IL-8 (Hoffmann et al. 2002). Auch andere Modifizierungen der Histone, wie z. B. die Methylierung können die Expression unterschiedlicher Gene beeinflussen.

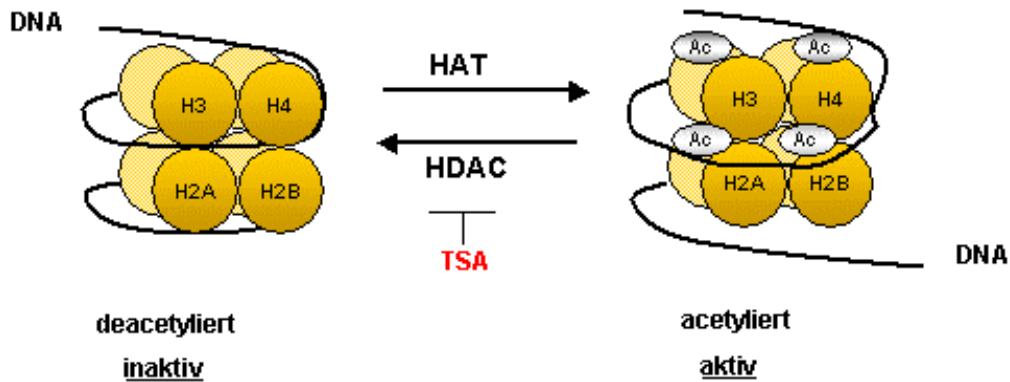


Abb. 7: Epigenetische Regulation durch die Aktivität der HDACs und HATs

Dargestellt ist ein Nucleosom, bestehend aus jeweils acht Histonmolekülen mit umwundener DNA; im deacetylierten inaktiven Zustand mit eng umwickelter DNA links bzw. acetyliert und aktiv mit aufgelockelter DNA rechts. Regulation durch die Aktivität der HAT und HDAC. [modifiziert nach (Barnes et al 2005)].

Immer mehr Studien weisen darauf hin, dass HDACs eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der COPD spielen (Barnes et al. 2005; Ito et al. 2005). Aber auch bei einer Vielzahl anderen Erkrankungen, wie z. B. bei der Entstehung von Tumoren oder beim Asthma, sind die HDACs von entscheidender Bedeutung (Ito et al. 2005; Lin et al. 2006).

1.7 Fragestellung der Arbeit

In bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bronchiale Epithelzellen für die Erkennung und Abwehr von Pathogenen eine große Rolle spielen, da sie in der Lage sind, Bestandteile von Bakterien u.a. durch TLR der angeborenen Immunantwort zu erkennen. Durch eine daraus resultierende spezifische Sekretion verschiedenster Entzündungsmediatoren sind sie befähigt, eine Immunreaktion aktiv einzuleiten, aufrechtzuerhalten, aber sie auch zu terminieren. Über die Wechselwirkungen zwischen *M. catarrhalis* und dem Bronchialepithel ist bisher sehr wenig bekannt. Da diesem Bakterium bei der Pathogenese der COPD eine große Bedeutung zukommt, ist es wichtig, die Art und Ausprägung spezifischer Wechselwirkungen zwischen diesem Erreger und dem Bronchialepithel zu untersuchen. Daher ergaben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Welche Zytokine und Chemokine werden nach einer Infektion mit *M. catarrhalis* in bronchialen Epithelzellen induziert?
2. Spielen Toll-like Rezeptoren bei der Erkennung von *M. catarrhalis* und somit der Generierung einer Immunantwort eine Rolle?
3. Welche Signaltransduktionswege sind an der Aktivierung der bronchialen Epithelzellen nach einer Infektion mit *M. catarrhalis* verantwortlich?
4. Sind der Transkriptionsfaktor NF- κ B und die epigenetischen Regulationsmechanismen auf Histonebene an der Regulation der Genexpression in bronchialen Epithelzellen, induziert durch *M. catarrhalis*, beteiligt?
5. Bewirken äußere Einflüsse auf *M. catarrhalis* eine veränderte Induktion in der Zytokin- bzw. Chemokinantwort?

2 Materialien

2.1 Bakterienkultur

2.1.1 *Moraxella catarrhalis*

Der *M. catarrhalis* Stamm 25238 (Serotype A) wurde von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) bezogen.

Der Wildtypstamm O35E (Serotype A) und die „ubiquitous surface proteins“ UspA1 bzw. UspA2 defizienten Mutanten wurden uns freundlicherweise von Eric Hansen, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas Texas, USA zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Agarplatten und BHI-Medium

Petrischalen der Firma Nunc mit einem Durchmesser von 10 cm wurden mit einer zuvor autoklavierten Agarlösung, bestehend aus Brain Heart Infusion (BHI)-Medium (37,0 g BHI-Pulver auf 1,0 L dH₂O) versetzt mit 5,0 % Schafsblut, beschichtet. BHI-Pulver der Firma Dibco, Schafsblut der Firma Oxoid.

2.2 Zelllinien und Zellkultur

Die humane Bronchialzelllinie BEAS-2B wurde freundlicherweise von C. Harris, NIH, Bethesda, MD zur Verfügung gestellt. Es handelt es sich um eine aus humanen bronchoepithelialen Zellen gewonnene und durch SV40 Transformation immortalisierte Zelllinie (Reddel et al. 1988). Die Zellen wurden in den Passagen 10 bis 35 verwandt.

Bronchialzellkulturmedium:

Keratinocyte-SFM (SFM-Serum freies Medium	500,00 ml	Gibco
Bovine pituitary extract (Rinderhypophysenextrakt)	25,00 mg	Gibco
Epithelial Growth Factor (EGF)	2,50 µg	Gibco
L-Glutamin 200 mM 100 x	5,00 ml	Gibco
All trans Retinolsäure (1 mg/ml)	50,00 µl	Sigma
Epinephrin-Hydrochlorid (1 mg/ml)	250 µl	Sigma
Amphotericin B 500 x	200,00 µl	Roche
Penicillin / Streptomycin 100 x	7,00 ml	PAA

2 MATERIALIEN

Die humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293 Zellen) wurden beim DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) in Braunschweig erworben. Die Zellen sind eine permanente Linie primärer humaner embryonaler Nierenzellen (Nummer: ACC 305; Kennzeichnung: 293), und sind mit Adenovirus Typ 5 DNA transformiert (Graham et al. 1977). Die Zellen wurden in den Passagen 10 bis 30 eingesetzt.

HEK-Zellkulturmedium:

Dulbeccos Modified Eagle Medium (D-MEM)	500,00 ml	Gibco
L-Glutamin 200 mM 100 x	5,00 ml	Gibco
Fötales Kälberserum (FCS*)	10,00 %	Gibco
Penicillin / Streptomycin 100 x	7,00 ml	PAA

*Einsatz nach Erhitzung für eine Dauer von 45 min bei 56°C zur Inaktivierung der Komplementfaktoren

Als Stimulationsmedium diente das entsprechende Zellkulturmedium ohne den Zusatz von Streptomycin, Penicillin bzw. Amphotericin B.

Adhäsionslösung für BEAS-2B Zellen:

Bovines Serumalbumin 100 mg/dl	1,00 ml	Sigma
Vitronektin 50 µg/ml	0,10 ml	Sigma
Fibronektin 1 µg/ml	1,00 ml	Sigma
Keratinozyten-SFM	ad 100,00 ml	Gibco

Kryokonservierungsmedium für BEAS-2B Zellen:

Keratinozyten-SFM	10,00 ml	Gibco
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	1,00 %	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	7,50 %	Sigma

Kryokonservierungsmedium für HEK293 Zellen:

Dulbeccos Modified Eagle Medium	500,00 ml	Gibco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10,00 %	Sigma

Zellkulturmedien und Zusätze:

ETI	Böhringer
PBS-/-	PAA
Trypsin-EDTA	Gibco

Zubehör / Geräte allgemein:

Zellkulturflaschen T75	Falcon
Petrischalen 10 cm Durchmesser	Nunc
Loch-Platten (mit 6 / 8 / 24 Vertiefungen)	Nunc
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar
Pipettierhilfen (10 µl, 200 µl, 1 ml)	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf, VWR
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Quarzglasküvetten Typ 105.200	Hellma
Chamberslides (Glasobjektträger, 8 Kammern)	Becton Dickinson
Urinbecher (100 ml)	Sarstedt
Einmal-Impfösen 10 µl	Roth
Zentrifuge 48 RC, Rotanta RPC	Hettich
Zellkultur Inkubator HERA CELL 240	Heraeus
Sterilbank Laminair HB 2448	Heraeus
Mikroskop BX 60	Olympus
Laborwaage A 120 S	Sartorius
Laborwaage Toledo AB 204	Mettler
UVC 500 UV Crosslinker-Lichtgerät	Hofer
Thermomixer comfort	Eppendorf
pH-Meter 766 Calimatic (Kalorimeter)	Knick
Spektralphotometer Uvicon UV 860	Kontron
Digitalkamera (Amedia)	Olympus
Systec V-65 (Sterilisator)	Heraeus

2.3 Messung der Laktatdehydrogenase (LDH)

Cytotoxicity Detection Kit	Boehringer
----------------------------	------------

2.4 IL-8 ELISA / GM-CSF ELISA

Carbonatpuffer; pH=9,5:

NaHCO ₃	8,40 g	Merk
Na ₂ CO ₃	3,56 g	Merk
dH ₂ O	ad 1000,00 ml	

Waschpuffer; pH=7,0:

Dulbeccos PBS (1 x)	1000,00 ml	PAA
Tween20	0,05 %	Sigma

PBS-Stammlösung (20 x):

NaHPO ₄ × 2H ₂ O	29,25 g	Merk
KH ₂ PO ₄	4,90 g	Merk
NaCl	100,00 g	Roth
dH ₂ O	ad 1000,00 ml	

Stopplösung 2 N H₂SO₄:

H ₂ SO ₄ 97 %	27,47 ml	Merk
dH ₂ O	ad 500,00 ml	

Blockpuffer; pH=7,0:

Dulbeccos PBS (1x)	45,00 ml	PAA
FCS	5,00 ml	Gibco

Substratreagenz:

Substrat A (TMB)	6,00 ml	BD Biosciences Pharmingen
Substrat B (Wasserstoffperoxid)	6,00 ml	BD Biosciences Pharmingen

Zubehör / Geräte speziell:

Human IL-8 ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen
Human GM-CSF ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen

ELISA-Photometer	Dynatech
Tischzentrifuge Mikro 24-48R	Hettich
MS2 Minishaker (Vortexer)	IKA®
pH-Meter 765 Calcimatic	Knick
F96-Immuno Plate (Maxisorp)	Nunc

Inhibitoren:

SB202190	inhibiert p38 MAP Kinase	Calbiochem
SB202474	Chemisch inaktive Kontrolle für SB202190	Calbiochem
U0126	inhibiert MEK1/2	Calbiochem
SP600125	inhibiert JNK	Calbiochem
IKK-NBD	inhibiert NF-κB Aktivierung	Biomol
Trichostatin A (TSA)	HDAC-Inhibitor	Sigma

2.5 Bioplex-Immunoassay

Bio-Plex Cytokine Assay	Bio-Rad
-------------------------	---------

2.6 Western BlotPhosphoproteinwaschpuffer:

NaF 1 M	50,00 ml	Sigma
Na ₂ P ₂ O ₇ 150 mM	50,00 ml	Sigma
Na ₃ VO ₄ 200 mM	5,00 ml	Sigma
Dulbeccos PBS 1×	ad 500,00 ml	PAA

Lyse-Puffer für Proteinextraktion:

Tris-HCl, pH=7,4	50,00 mM	Sigma
EDTA	0,25 mM	Roth
PMSF	1,00 mM	Sigma
Nonidet P-40	1,00 %	Fluka
Antipain, Leupeptin,	je 10,00 µg/ml	Sigma
Pepstatin		
Phosphoproteinwaschpuffer	ad 1,00 ml	Sigma

2 MATERIALIEN

Lösung für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford:

Bradfordreagenz	2,00 ml	Bio-Rad
dH ₂ O	8,00 ml	

Auftragepuffer nach Lämmli:

Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	1,00 ml	Roth
Glycerol 100 %	0,80 ml	Merk
SDS 10 %	1,60 ml	Serva
Bromphenolblau 1 %	0,40 ml	Pharmacia Biotech
β-Mercaptoethanol 1%	0,40 ml	Sigma
dH ₂ O	ad 5,00 ml	

Sammelgel:

Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	2,50 µl	Sigma
SDS 10 %	100,00 µl	Serva
Acrylamidlösung (19 : 1)	1,33 ml	Serva
Ammoniumpersulfat 10 %	50,00 µl	Serva
TEMED 0,05 %	10,00 µl	R&D Systems
dH ₂ O	ad 10,00 ml	

Trenngel 10 %ig:

Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	2,50 ml	Sigma
SDS 10 %	100,00 µl	Serva
Acrylamidlösung	3,35 ml	Serva
Ammoniumpersulfat 10 %	3,35 ml	Serva
TEMED 0,05 %	5,00 µl	R&D Systems
dH ₂ O	ad 10,00 ml	

Gelelektrophoresepuffer:

Tris-Base	3,00 g	Sigma
Glycin	14,40 g	Merk
SDS 10 %	1,00 g	Serva
dH ₂ O	1000,00 ml	

Blot-Puffer (10 ×):

Tris-Base	15,00 g	Sigma
Glycin	72,00 g	Merck
dH ₂ O	ad 500,00 ml	

Blot-Puffer (1 ×):

Blot-Puffer 10 ×	80,00 ml	
Methanol	200,00 ml	Merck
dH ₂ O	ad 1000,00 ml	

Antikörperinkubationslösung / Blockpuffer:

Odyssey Blocking Buffer	50 %	Li-Cor
PBS (1 ×)	50 %	PAA
Tween20	0,10 %	

Ponceau-S-Proteinfärbung:

Ponceau S	1,00 g	Sigma
Eisessig	50,00 ml	Merck
dH ₂ O	ad 1000,00 ml	

Antikörper: Primäre Antikörper:

pp38 MAP-Kinase AK	Santa Cruz
ERK1/2 (p42/44 MAP-Kinase AK)	Santa Cruz
p-cJNK	Biolabs
ERK2	Santa Cruz
IκBα	Santa Cruz
HDAC-1 und HDAC-2	Santa Cruz

Antikörper: Sekundäre Antikörper:

Anti-Kaninchen- IgG	gekoppelt an IRDye 800	Li-Cor
Anti-Maus-IgG	gekoppelt an Cy5.5	Li-Cor

2 MATERIALIEN

Zubehör / Geräte speziell:

Scraper	Costar
Blotmembran Immobilion-P	Millipore
PVDF Membran	
Blotpapier, Whatman Filterpapier	Whatman
Recombinant Protein molecular weight marker (RPN 800)	Amersham life science
Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer RCT basic (Magnetrührer)	Bio-Rad Ika-Labortechnik
Odyssey Infrared Imaging System und Software	Li-Cor

2.7 Transfektion

CalPhos Mammalian Transfection Kit	BD Biosciences Pharmingen
Superfect Transfection Reagent	Qiagen

2.8 Biolumineszenzassay

Luciferase Assay System	Promega
Beta-Gal Reporter Gene Assay	Roche
Lumat LB9501/16	Berthold
Tischschüttler	Janke & Kunkel

2.9 RT-PCR

RNA-Isolierung:

RNeasy Kit	Qiagen
------------	--------

RT-PCR:

AMV-Reverse Transkriptase	Promega
AMV-RT Puffer 5×	Promega
RNAsin (RNase Inhibitor)	Promega
Hexamer-Primer	Pharmacia Biotech
dNTP, 10 mM	Promega

PCR:

RED Taq-Puffer 10 ×	Sigma
RED Taq DNA-Polymerase	Sigma
dNTP, 10 mM	Promega

Primer:

TIB Molbiol

IL-8:	FW: 5` - CTAGGACAAGAGCCAGGAAGA
	RV: 5` - AACCCCTCTGCACCCAGTTTTTC
GM-CSF:	FW: 5` - AGCATGTGAATGCCATCCAG
	RV: 5` - AGGGGATGACAAGCAGAAAG
GAPDH:	FW: 5` - CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA
	RV: 5` - TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC

Agarosegel:

Agarose	1,50 g	Promega
TAE-Puffer (1 ×)	100,00 ml	
Ethidiumbromid	4,00 µl	Sigma

Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen lösen, abkühlen lassen und Ethidiumbromid hinzufügen.

Elektrophoresepuffer: TAE-Puffer; pH=8,0:

Tris Base	4,84 g	Sigma
Essigsäure	1,14 ml	Merk
EDTA 0,5 M, pH=8,0	2,00 ml	Roth
dH ₂ O	ad 1000,0 ml	

Zubehör speziell:

Peltier Thermal Cycler	Biozym
Elektrophoresekammer SUB-CELL GT	Bio-Rad
1 kB DNA-Ladder	Invitrogen
Digitalkamera (Amedia)	Olympus
TFX-20M BRL UV-Transilluminator	Gibco
Scraper	Costar

2.10 EMSA

Puffer A: Hydrolyse der Zellen

MgCl ₂	1,50 mM	Sigma
KCl	10,00 mM	Sigma
Nonidet P-40	0,10 %	Fluka
DTT	1,00 mM	Serva
EDTA	0,25 mM	Roth
PMSF	1,00 mM	Sigma
Leupeptin, Pepstatin, Antipain	10 mg/ml	Sigma
Phosphoproteinwaschpuffer	ad 1,00 ml	Sigma

Puffer B: Hydrolyse der Zellkerne

HEPES; pH=7,4	10,00 mM	Sigma
KCl	50,00 mM	Sigma
EDTA	0,20 mM	Roth
PMSF	0,50 mM	Sigma
dH ₂ O	ad 1,00 ml	Sigma

Bindepuffer 5 ×:

Tris HCl; pH=7,5	50,00 mM	Sigma
MgCl ₂	5,00 mM	Sigma
EDTA	2,50 mM	Roth
DTT	5,00 mM	Serva
NaCl	250,00 mM	Roth
Glycerol	20,00 %	Sigma
Lachssperma	0,4 mg/ml	
dH ₂ O	100,00 ml	

4 %iges, natives Polyacrylamidgel:

2 Stunden auspolymerisieren lassen

40 % Bis-Acrylamid (29:1)	5,00 ml	Serva
Tris 1 M (ph 7,5)	2,00 ml	Sigma
Glycin 1 M	7,60 ml	Serva
EDTA 0,5 M	160,00 µl	Roth

Ammoniumpersulfat 10 %	200,00 µl	Serva
TEMED	30,00 µl	R&D Systems
dH ₂ O	26,00 ml	

TGE Puffer 5 ×; pH=8,3

Tris Base	30,28 g	Sigma
Glycin	142,70 g	Serva
EDTA	3,92 g	Roth
dH ₂ O	ad 1000,00 ml	

TGE 1 ×:

TGE 5 ×	200,00 ml	
dH ₂ O	ad 1000,00 ml	

Orange G 5 ×:

Glycerol 5 ×	5,00 ml	Sigma
EDTA 0,5 M	1,00 ml	Roth
Orange G 2%	1,00 ml	Sigma
SDS 10 %	0,10 ml	Serva
dH ₂ O	ad 10,00 ml	

EMSA-Oigonukleotidsequenz:

NF-κB 1	5'IRD800-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'	metabion GmbH
NF-κB 2	5'IRD800-GCCTGGAAAGTCCCCTCAACT-3'	metabion GmbH

2.11 HDAC Aktivitätsassay

HDAC Aktivitätsassay	Biomol
----------------------	--------

3 Methoden

3.1 Übersicht über die durchgeführten Versuche

Bakterium	Zelllinie	Verfahren	Nachweis
<i>Moraxella catarrhalis</i>	BEAS-2B	ELISA	IL-8 / GM-CSF: Bestimmung von IL-8 und GM-CSF im Zellüberstand (<i>Bio-Plex</i> – gleichzeitige Bestimmung unterschiedlicher Zytokine), Untersuchung der NF- κ B bzw. MAPK Beteiligung an der Zytokinsekretion durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren LDH ELISA: Überprüfung der Zytotoxizität der Bakterien und angewandten Substanzen
		Western Blot	Identifizierung der beteiligten MAPK an der Aktivierung der Zellen, Nachweis einer Beteiligung von NF- κ B an der Aktivierung der Zellen, Einfluss von <i>M. catarrhalis</i> auf die HDAC-1/2 Expression?
		RT-PCR	Bestimmung der mRNA von IL-8 und GM-CSF, Nachweis der Aktivierung der Zellen und Bestimmung des Einflusses der MAPK nach vorherigem Einsatz spezifischer Inhibitoren
		EMSA	Bestimmung der Bindung von NF- κ B an die DNA, Untersuchung auf mögliche Beeinflussung durch MAPK
		HDAC Assay	Bestimmung der Deacetylaseaktivität der Zellen, Nachweis beteiligter epigenetischer Regulationsmechanismen an der Aktivierung der Zellen durch <i>M. catarrhalis</i>
	HEK293	ELISA	Bestimmung der IL-8 Sekretion im Zellüberstand, vermittelt über TLR2 bzw. TLR4 mit entsprechenden Kofaktoren
		Transfektion	Identifizierung der bedeutenden TLR2 und TLR4 für die Erkennung von <i>M. catarrhalis</i>

Abb. 8: Übersicht über die durchgeführten Versuche mit *M. catarrhalis*

Quelle: eigene Abbildung

3.2 Bakterienkultur

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

3.3 Zellkultur

Die BEAS-2B Zellen wurden in Anwesenheit von 10,0 ml des entsprechenden Zellkulturmediums in T75-Zellkulturflaschen 3 bis 4 Tage im Brutschrank ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5,0 % CO_2) kultiviert.

Die nun konfluenten Zellen wurden je nach Verwendungszweck in Petrischalen, 6-Loch-, 24-Loch-Platten oder auf TC-Chamberslides™ (Glasobjektträger, 8 Kammern) gesplittet. Alle Kulturgefäße wurden mit der Adhäsionslösung für mindestens 30 Minuten vorbehandelt, um den Zellen bessere Haftungsmöglichkeiten zu schaffen. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS-/- gewaschen, mit 2,0 ml 0,5 % Trypsin-EDTA abgelöst und mit 10 ml Medium restlos abgelöst. Diese Zellsuspension wurde bei 12000 g für 5 Minuten zentrifugiert und danach das Pellet mit 200 µl des Trypsininhibitors ETI resuspendiert. Die entsprechende Menge an Zellkulturmedium wurde zugesetzt und die Zelllösung auf die vorbehandelten Kulturgefäße verteilt.

Die Zellen der Linie HEK293 wurden ebenfalls in T75-Kulturflaschen mit 10 ml des unter 2.2 beschriebenen Zellkulturmediums für 3 bis 4 Tage bei 37 °C und 0,5 % CO₂ kultiviert. Die nun konfluenten Zellen wurden zum Splitten einmal mit 10 ml PBS-/- gewaschen und anschließend in weiteren 10 ml PBS-/- aufgenommen, um sie dann bei 12000 g 5 Minuten zu zentrifugieren. Das Zellpellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellzahl in der Neubauer Kammer unter dem Mikroskop bestimmt. Um vergleichbare Zellzahlen im subkonfluenten Zustand zu bestimmten Versuchszeitpunkten zu bekommen, wurde eine ausgeprobte Zellzahl ausplattiert.

Infektion von humanen Zellen (BEAS-2B, HEK293)

Die Monolayer der entsprechenden Zelllinien wurden über Nacht auf antibiotikafreies Zellkulturmedium gesetzt. Am nächsten Tag wurde mit einer Übernachtskultur von *M. catarrhalis* eine Bakteriensuspension mit einer Konzentration von 10⁶ cfu/ml hergestellt. Hierfür wurde die Suspension mit PBS-/- bis zu einer OD₄₀₅ von 0,3 verdünnt. Zur Infektion der Monolayer wurde nun eine MOI („multiplicity of infection“) von 0,1, 1 oder 10 Bakterien pro Zelle für die Infektion des Zelllayers mit der entsprechenden Bakteriensuspension berechnet. Die Bakteriensuspension wurde auf die Monolayer gegeben und bei 37 °C, 5 % CO₂ für die entsprechende Versuchszeit inkubiert. Für einige Experimente wurde die berechnete Bakteriensuspension vor ihrem Einsatz zunächst entweder bei 95 °C für 30 Minuten hitzeinaktiviert oder für 45 Minuten mit UV-Licht inaktiviert.

Infektion der besiedelten Glasobjektträger mit *M. catarrhalis* und Färbung nach Pappenheim

Die mit BEAS-2B Zellen besiedelten Glasobjektträger wurden mit einer *M. catarrhalis* Suspension (MOI = 1) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Alkohol-fixierung der BEAS-2B Zellen sowie der adhärierenden Bakterien. Dazu wurden die einzelnen Kammern der Chamberslides fünfmal mit PBS-/- gewaschen und anschließend mit jeweils 300 µl Methanol je Kammer für 10 Minuten inkubiert. Nach der Fixierung wurde das Methanol durch zweimaliges Waschen mit PBS-/- entfernt. Es erfolgte nun die Färbung der Objektträger nach Pappenheim. Bei der Pappenheim-Färbung handelt es sich um eine Färbung, die die May-Grünwald-Färbung (Eosin-Methylenblau, Merck) mit der Giemsa-Färbung (Azur-Eosin-Methylenblau, Merck) kombiniert. Die luftgetrockneten Präparate verbrachten zuerst 3 Minuten in der May-Grünwald-Lösung. Dadurch erfolgte die Fixierung und die Färbung der Granula. Anschließend wurden die Präparate mit dH₂O gespült und für 12 bis 15 Minuten mit der Giemsa-Lösung gefärbt. Durch die Giemsa-Färbung werden die Kerne rotviolett und das Zytoplasma lichtblau gefärbt. Die Pappenheimfärbung ermöglicht die deutliche Darstellung des Zytoplasmas sowie die gute Färbung und damit Erkennung von Mikroorganismen. Die Präparate wurden anschließend unter dem Mikroskop betrachtet und digital fotografiert.

3.4 Messung der Laktatdehydrogenase

Mit dem kalorimetrischen Enzymassay „Cytotoxicity Detection Kit“ wurde die im Zellüberstand freigesetzte Laktatdehydrogenase als Nachweis nekrotischer Zellen bestimmt. Die Messung erfolgte mit dem ELISA-Photometer bei 490 nm. Das Prinzip beruht auf der Reduktion von NAD⁺ zu NADH/H⁺ durch die Laktatdehydrogenase und der Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Das sich dabei bildende Katalysat transferiert nun 2H vom NADH/H⁺ auf das gelbe Tetrazoliumsals INT (2-[4-Iodeophenyl]-3-[4-Nitrophenyl]-5-Phenyltetrazoliumchlorid). Als LDH-Aktivität wurde das Verhältnis des Zellüberstandes von unstimulierten Zellen (Negativkontrolle) und *M. catarrhalis* stimulierten Zellen (bestimmter Wert) zum Überstand des mit 2 % Triton X-100 behandelten Zellen genommen (Positivkontrolle) und mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zytotoxizität} = \frac{\text{bestimmter Wert} - \text{Negativkontrolle}}{\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle}} \times 100\%$$

Außerdem wurde jeweils nach entsprechender Inkubationszeit eine mikroskopische Begutachtung zur morphologischen Beurteilung der BEAS-2B Zellen durchgeführt.

3.5 IL-8 ELISA und GM-CSF ELISA

Zur Bestimmung der IL-8 bzw. GM-CSF Konzentration im Zellüberstand von BEAS-2B oder HEK293 Zellen wurde ein indirekter „Sandwich“-ELISA mit dem Human IL-8 ELISA bzw. GM-CSF Set von BD Biosciences Pharmingen angewandt. Folgende Ausführungen beschreiben nur die genaue Durchführung des IL-8 ELISA, da diese sich lediglich in der Antikörperzusammensetzung und der Standardkonzentration vom GM-CSF ELISA unterscheidet.

3.5.1 Vorbereitungen

Die 24-Loch-Platten mit konfluenten Zellen wurden am Vortag mit PBS/- gewaschen und mit antibiotikafreiem Zellkulturmedium überschichtet. Die Stimulationsdauer mit unterschiedlichen *M. catarrhalis* Stämmen (unbehandelt oder mit UV-Licht, Hitze inaktiviert bzw. vorinkubiert mit verschiedenen Inhibitoren siehe 2.4) betrug 15 Stunden. Die Inkubationsdauer für LOS, LPS und TNF- α in Kombination mit IL-1 β betrug ebenfalls 15 Stunden. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und auf Eis gestellt, bei 4 °C über 5 Minuten bei 12000 g zentrifugiert und die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

3.5.2 Versuchsdurchführung

Auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (Maxi Sorb[®]) wurden je Vertiefung 100 μ l des 1:250 verdünnten anti-hIL-8-monoklonalen Antikörper mit 0,1 M Carbonatpuffer aufgetragen und bei 4 °C über 15 Stunden inkubiert.

Die beschichtete Platte wurde danach dreimal mit Waschpuffer gespült, ausgeschlagen und mit 200 μ l Blockpuffer je Well für eine Stunde versetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Während der Inkubationszeit erfolgte die Verdünnung der Proben (1:50 bzw. 1:100) mit Blockpuffer. Weiterhin erfolgte zur Quantifizierung des in den Proben enthaltenen IL-8 die Anlegung einer Standardreihe. Das Referenz wurde ebenfalls in Blockpuffer verdünnt, so dass der höchste Standardwert eine IL-8

Konzentration von 200 pg/ml enthielt. Die Standardwerte wurden bis zum niedrigsten Standardwert von 3,1 pg/ml 1:1 mit Blockpuffer verdünnt. Als Nullstandard wurde der Blockpuffer ohne den Zusatz von IL-8 verwandt. Zur Protektion der Proteine wurden die Proben und die Standardreihen auf Eis pipettiert. Nach dreimaligem Waschen und Ausschlagen der Platte wurden nun je Loch 100 µl der Proben aufgetragen, der IL-8 Standard jeweils in Duplikaten. Nach zwei Stunden erfolgte ein fünfmaliges Waschen, Ausschlagen der Platte und eine Inkubation von je 100 µl eines Gemisches aus Detektions-AK (biotinylierter anti-hIL-8 monoklonaler AK) und Enzymreagenz (Merettichperoxidase) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dieser Inkubationsphase folgte der diesmal siebenmalige Waschprozess. Anschließend erfolgte durch die Inkubation von 100 µl je Well eines Substratreagenzgemisches (TMB, Sigma) im Dunkeln der enzymatische Farbumschlag von gelb nach blau.

Diese Reaktion wurde nach 20 Minuten mit 50 µl einer 0,5 M Schwefelsäure abgestoppt. Dann wurde die optische Dichte am Photometer bei 450 nm bestimmt, die IL-8-Konzentration der Proben über die sigmoide Standardkurve quantifiziert, mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und in pg/ml angegeben. In die Auswertung gelangten nur Ergebnisse, die innerhalb des linearen Bereiches der Standardkurve lagen.

3.6 Bio-Plex Immunoassay

Zur quantitativen Bestimmung der durch *M. catarrhalis* induzierten Zytokine bzw. Chemokine in BEAS-2B Zellen wurde das Bio-Plex Protein Array System der Firma Bio-Rad angewandt, welches eine simultane Bestimmung von bis zu 100 verschiedener im Ansatz befindlicher Zytokine ermöglicht. Es verfügt über farbgekoppelte monoklonale Antikörper, die spezifisch für die einzelnen Zytokine sind. Diese Antikörper sind an Latex-Kügelchen gekoppelt und reagieren mit den Zytokinen aus den Zellüberständen. Der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex wird von einem biotinylierten sekundären Antikörper in Mikrotiterplatten detektiert und nach Zugabe von Streptavidin-Phykoerythrosin, welches sich an den sekundären Antikörper bindet, erkannt. Die Identifizierung erfolgt mit dem Bio-Plex Suspensions Array System, basierend auf Kügelchen-Farbe und -Fluoreszenz der einzelnen zu detektierenden Antikörper-markierten Zytokine, und wird anhand Zytokin-spezifischer Standardreihen quantifiziert.

Versuchsdurchführung

Die BEAS-2B Zellen wurden mit *M. catarrhalis* infiziert und wie bei den ELISA Versuchen (siehe 3.5.1) vorbereitet. Die unverdünnten Proben wurden anschließend auf vorgegebene Mikrotiterplatten aufgeschichtet und entsprechend der Instruktion des Herstellers (Bio-Rad) zunächst mit den Antikörper-gekoppelten Kügelchen inkubiert, dann gewaschen, mit einem biotinyliertem Detektions-Antikörper inkubiert, wiederum gewaschen und abschließend mit Streptavidin-Phykoerythrozin inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der einzelnen Zytokine mittels einer dafür entwickelten Bio-Plex Software und die Quantifizierung der detektierten Zytokine anhand von Standardkurven im Standardmessbereich von 1,95 – 32000 pg/ml. Die Bio-Plex Software kalkuliert die Zytokin-Konzentrationen automatisch anhand der Standardkurven.

3.7 Western Blot

Mit dem Western Blot werden einzelne Proteine, die von Interesse sind, aus einem Proteingemisch nachgewiesen. Diese Proteine werden zunächst mit einer SDS-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, dann auf eine Membran transferiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

3.7.1 Proteinextraktion

Die Zellen in den Petrischalen wurden auf Eis mit kaltem Phosphoproteinwaschpuffer gewaschen, mit 150 µl Lysepuffer lysiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert und die proteinhaltigen Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert.

3.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung wurde der Bio-Rad-Protein Assay (Bio-Rad), basierend auf der Methode nach Bradford eingesetzt, nachdem überprüft wurde, dass keine interferierenden Substanzen vorliegen. Dieses Verfahren nutzt die Tatsache, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue sein Absorptionsmaximum, wenn er basische oder aromatische Aminosäuren bindet, von 465 nm zu 595 nm verlagert.

3 METHODEN

Zur Proteinbestimmung nach Bradford wurden je 5,0 µl Probe verwendet. Nach einer Inkubation des 5,0 µl Proteinlysats mit dem 1:5 verdünnten Farbstoffreagenz über 5 Minuten wurde die Absorption der Probe im Photometer bei 595 nm gemessen. Über eine zuvor generierte BSA (Bovines Serumalbumin) Standardkurve wurde die zugehörige Proteinkonzentration bestimmt. Zur Eichung des Spektralphotometers vor der Messung dienten zwei Küvetten mit 1,0 ml der 1:5 verdünnten Farbstofflösung ohne Proteinlysat.

3.7.3 SDS-Gelelektrophorese

Nach dem Aufbau der Bio-Rad-Elektrophoresekammer wurde das Trenn- und Sammelgel angesetzt, die Vernetzung mit TEMED angestoßen und die Gele gefertigt. Verwendet wurde hier aufgrund der zu erwartenden Proteingröße ein 10 %iges Gel. Vor dem Auftragen wurde das Protein mit β-Mercaptoethanol-haltigem Gelladepuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und 5 Minuten bei 95 °C unter Schütteln erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden von den Proben je 80 µg Protein in die Geltasche aufgetragen, ebenso je Gel ein Marker zur Größenbestimmung. Die Elektrophorese erfolgte mit Lämmli-Puffer in Bio-Rad Mini-Gel-Kammern für 2 Stunden bei 100 V.

3.7.4 Protein-Blot und Antikörperexposition

Der Protein-Blot dient dazu, die aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu übertragen, auf der anschließend die Detektion über Antikörper erfolgt.

Das Gel wurde nach der SDS-Gelelektrophorese vorsichtig aus der Elektrophoresekammer genommen und nach Entfernen des Sammelgels für 10 Minuten im eiskalten Blotpuffer äquilibriert. Dann wurde das Blotsystem in eiskaltem Blotpuffer eingelegt: zwei Blot pads, darauf je zwei Wathmann-Filterpapiere. Die ebenfalls in Blotting-Puffer getränkte Hybond-Nitrozellulosemembran wurde luftblasenfrei auf das Gel aufgebracht und zwischen die Filterpapiere gelegt. Dieses Blotsystem wurde in die Blotkammer eingesetzt und der Proteintransfer eine Stunde bei 100 V im eiskalten Blotpuffer durchgeführt.

Um den Transfererfolg zu beurteilen, wurde die Membran reversibel mit Ponceau-S gefärbt, anschließend mit dH₂O gewaschen bis das Ponceau-S vollständig entfernt war.

Nach dem Blot wurde die Membran für zwei Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur in Blockpuffer inkubiert, um die unspezifischen Bindungen an die Membran zu verringern. Danach erfolgte unter Schütteln über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper, welcher 1:1000 verdünnt war. Nach dreimaligem Waschen für je 5 Minuten mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation im Dunkeln mit dem sekundären Antikörper in 1:2000 verdünnter Antikörperlösung. Bevor die Detektion erfolgen konnte, wurde erneut dreimal gewaschen, zuletzt mit einem Waschpuffer ohne Zusatz von Tween20.

3.7.5 Detektion

Die Detektion des sekundären Antikörpers erfolgte mit dem speziellen Scanner (Odyssey infrared imaging system). Die anschließende Bearbeitung wurde mit der vom Hersteller dazugelieferten Software bewerkstelligt.

3.8 Transfektion

3.8.1 Transfektion von HEK293 Zellen mit Calciumphosphatreagenz

Durch die Mischung von DNA mit Calcium und Phosphatpuffer entsteht ein feinkörniger Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA auf den Zellen, der von diesen durch Endozytose aufgenommen wird.

8×10^6 Zellen wurden pro Vertiefung in 24-Loch-Platten in 500,0 µl HEK-Zellkulturmedium ausplattiert und für 72 Stunden kultiviert. Die aus 0,125 µg Plasmid-DNA, 3,1 µl 2 M Calciumlösung je Vertiefung und sterilem Wasser bestehende Lösung A wurde mit Lösung B ($2 \times$ HBS) vorsichtig geschüttelt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Die Plasmid-DNA je Vertiefung setzte sich aus 0,025 µg der leeren Expressionsvektoren bzw. der TLR-kodierenden Plasmide und jeweils 0,05 µg des NF-κB-Luciferase-Reporterplasmids und 0,05 µg des RSV-β-Galaktosidase-Konstruktes zusammen. Währenddessen wurde das Medium der 24-Loch-Platte gewechselt. Dann wurden pro Vertiefung 50,0 µl der entstandenen Lösung hinzugefügt und die Platte für 6 Stunden bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen einmal mit PBS/- gewaschen und mit 500,0 µl HEK-Zellkulturmedium pro Vertiefung weiter inkubiert. Die Stimulation erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion.

3.8.2 Transfektion von HEK293 Zellen mit dem Transfektionsreagenz Superfect

Die positive Nettoladung der Superfect-DNA-Komplexe ermöglicht die Anlagerung an die negativ geladene Oberfläche eukaryontischer Zellen und somit die Endozytose ins Zellinnere.

Die Transfektion erfolgte in subkonfluenten 24-Loch-Platten, die drei Tage zuvor mit 8×10^6 HEK293 Zellen in 500,0 μ l Zellkulturmedium pro Vertiefung bepflanzt wurden. Es wurde pro Vertiefung ein Gemisch aus 0,4 μ g DNA (bestehend aus leerem Expressionsvektor und TLR-kodierenden Plasmiden) und 2,0 μ l Superfect zu 350,0 μ l Medium gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C im CO₂-Inkubator. Nach 6 Stunden wurden die Zellen mit PBS/- gewaschen und mit 500,0 μ l HEK-Zellkulturmedium über Nacht kultiviert. Die Stimulation erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion.

3.8.3 Stimulation der HEK293 Zellen

Am folgenden Tag wurden die Zellen mit der *M. catarrhalis* Suspension in ansteigender Konzentration für 5 Stunden stimuliert. Die Inkubation erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C. Bei der Inkubation der Zellen mit LPS bzw. LOS wurde zusätzlich 2%iges FCS zum Stimulationsmedium hinzugefügt.

3.8.4 Galaktosidase- und Luciferase - Bestimmung

Nach beendeter Stimulationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS/- gewaschen und entsprechend der Instruktionen der Hersteller zur Luciferase-Bestimmung mit dem „Luciferase Reporter Gen Assay“ bzw. zur β -Galaktosidase – Bestimmung mit dem „ β -Gal Reporter Gen Assay“ aufbereitet. Die Messung der jeweiligen Chemielumineszenzen erfolgte pro Probe für 5 Sekunden mit dem Luminometer. Die enzymatische Aktivität wird anhand der Luminenzwerte quantifiziert. Die erhaltenen Luciferase-Werte wurden zur Normierung der Transfektionseffizienz durch die β -Galaktosidase-Werte dividiert und als relative Luciferase Aktivitäten (engl.: „relative luciferase activity“) angegeben.

3.9 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Mit der RT-PCR lassen sich geringe Mengen von RNA aus biologischem Material untersuchen. Das Prinzip besteht aus zwei Versuchsschritten: zuerst wird aus einer beliebigen Menge RNA die entsprechende cDNA synthetisiert, die dann anschließend als Vorlage für die eigentliche PCR verwendet wird. Die PCR ermöglicht die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Voraussetzung für die Durchführung der PCR ist die Kenntnis der entsprechenden Nukleotidsequenzen zu beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes und die Verfügbarkeit geeigneter Oligonukleotide.

3.9.1 RNA-Isolierung

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurde der RNeasy® Isolationskit von Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden die Epithelzellen zuerst lysiert, die DNA der Proben in den dafür vorgesehenen Schreddersäulen zerkleinert und die RNA nach dem weiteren Protokoll von Qiagen isoliert. Die Konzentration der RNA in den Proben wurde bei 260 nm bestimmt und nur Proben mit einer Reinheit zwischen 1,7 und 2,0 (ratio OD_{260/280}) verwendet.

3.9.2 Reverse Transkription

Mit dieser Methode lässt sich die mRNA aus den Zellen in cDNA transkribieren. Hierzu wurden in den Versuchen 1,0 µg in Wasser gelöste RNA auf Eis in einem dünnwandigen 0,5 µl PCR-Reaktionsgefäß auf ein Volumen von 1,5 µl dH₂O aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde im PCR-Gerät nachfolgend bei 70 °C für 5 Minuten denaturiert. In dieser Zeit erfolgte die Herstellung folgendes Master-Mixes (Angaben für je eine Probe):

AMV –RT – Puffer (5×):	4,00 µl
Nukleotide (dNTP, 10 mM):	2,00 µl
Hexamer-Primer:	1,00 µl
RNAsin:	0,75 µl
AMV-RT:	0,75 µl

3 METHODEN

Die Reverse Transkriptase der denaturierten RNA erfolgte bei 42 °C für 60 Minuten und wurde mit einer Inkubation bei 94 °C für 5 Minuten beendet. Die Probe wurde nun kurz zentrifugiert und mit 80 µl Aqua dest. verdünnt. Für die anschließende PCR wurde von dieser Probe auf Eis 5,0 µl in ein neues PCR-Reaktionsgefäß gegeben.

Nicht direkt für die Reverse Transkriptase verwendete RNA wurde bei –80 °C aufbewahrt. Bei –20 °C wurde die nicht direkt für die PCR eingesetzte cDNA gelagert.

3.9.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR erfolgt in drei Schritten: Zuerst wird bei der Denaturierung die Template-DNA auf 94 °C erhitzt, damit sich die beiden Stränge voneinander trennen, dann folgt unter Hybridisierungsbedingungen in Anwesenheit von Oligonukleotid-Primern der Annealingschritt. Anschließend synthetisiert die Taq-DNA-Polymerase bei einem Temperaturoptimum von 72 °C die komplementären DNA-Sequenzen. Danach beginnt ein neuer Zyklus mit Denaturierung, Hybridisierung und Elongation.

Zu den sich auf Eis befindlichen 5,0 µl der RT-Probe wurden nun 20,0 µl des PCR-Master-Mixes gegeben. Die Proben wurden anschließend in den Thermo-Cycler gestellt. Die Annealingtemperatur der PCR-Zyklen wurde den verwendeten Primer-Paaren angepasst. Für die IL-8 PCR 24 Zyklen, die GM-CSF PCR 36 Zyklen und für die GAPDH PCR 25 Zyklen gewählt. Als Kontrolle wurde pro RT eine PCR mit den Primern für die GAPDH durchgeführt. Gleich stark exprimierte GAPDH Banden zeugen für eine gleichmäßige cDNA Konzentration in den verschiedenen Ansätzen.

<u>Schritt/Primer</u>	<u>IL-8</u>	<u>GM-CSF</u>	<u>GAPDH</u>
Denaturierung	94 °C	94 °C	94 °C
Annealing	60 °C	68 °C	60 °C
Elongation	72 °C	72 °C	72 °C
Zyklen	24 Zyklen	36 Zyklen	25 Zyklen

3.9.4 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine Methode um DNA-Fragmente von 0,5 bis 25 kb Länge, je nach Agarosekonzentration, voneinander zu trennen und zu identifizieren. Zum Auftrennen der hier erhaltenen DNA wurde ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt, indem 1,5 g Agarose in 100 ml Elektrophoresepuffer durch Erhitzen gelöst wurde. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und das Gel gegossen. Nach dem Erkalten des Gels wurden die DNA-Proben in die einzelnen Geltaschen in der Elektrophoresekammer aufgetragen und die Elektrophorese erfolgte für eine Stunde bei 100 V. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und digital mit der Olympus Kamera mit vorgeschaltetem Ethidiumbromidfilter fotografiert.

3.10 EMSA

Mit dem Electromobility Shift Assay (EMSA) wurde in dieser Arbeit die NF-κB Protein-DNA Bindung induziert durch *M. catarrhalis* und deren mögliche Beeinflussung durch die MAPK in BEAS-2B Zellen untersucht.

Die Methode beruht darauf, dass ungebundene DNA in einem nicht denaturierenden Gel eine höhere elektrophoretische Mobilität besitzt als proteingebundene DNA. Man bezeichnet die proteingebundene DNA auch als "geschifft" gegenüber der ungebundenen. Zunächst wird das Proteingemisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten DNA-Fragment inkubiert. Nach einer kurzen Zeitspanne, in der die Proteine an das DNA-Fragment binden können (Komplexbildung), wird der Ansatz auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und so die freie DNA von den DNA-Protein-Komplexen getrennt. Die Detektion erfolgt hierbei über die fluorszenzmarkierte DNA-Sequenz.

3.10.1 Fraktionierte Proteinextraktion – Gewinnung der Kernproteine

Die Petrischalen mit den BEAS-2B Zellen wurden mit eiskaltem Phosphoproteinwaschpuffer gewaschen und mit 120 µl vom EMSA Puffer A lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurden die Proben 3 Minuten bei 5700 g pelletiert und der Überstand mit den zytosolischen Proteinen verworfen. Das Pellet der Proben wurde mit je 50 µl des Puffers B aufgenommen, 7 Minuten inkubiert und anschließend 3 Minuten bei 14000 g kühl zentrifugiert. Der Überstand, der die Kernproteinfraktion enthielt, wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

3.10.2 Proteinbestimmung (nach Bradford)

Der Proteingehalt der Kernproteinfraktion wurde, wie unter 3.7.2 für den Western Blot beschrieben, mit dem Bio-Rad Protein Assay bestimmt. Bei diesem Proteinbestimmungsverfahren erfolgt die Quantifizierung über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Peptidsegmenten und einem Farbstoff (Coomassie). Durch Verdünnung mit fünffachem Bindepuffer wurden die Proben einheitlich auf einen Proteingehalt von 2,5 µg Protein/µl eingestellt.

3.10.3 EMSA – Gelretentionsanalyse

Vor dem Auftragen der Proben in die Geltaschen wurden diese mit 5 × Bindepuffer, Oligonukleotiden, 25 mM DTT / 2,5 % Tween20 und dH₂O versetzt und 20 Minuten bei RT im Dunklen inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Ansätze mit 2 µl des Farbstoffes 5x Orange G versetzt und in die Geltaschen des zuvor gefertigten 4 %igen Polyacrylamidgels gegeben. Die Elektrophoresekammer war gefüllt mit kaltem 1 × TGE Laufpuffer und befand sich eisgekühlt im Dunklen. Dafür wurde die Gelelektrophoresekammer in eine Styroporbox gebracht, in der die Elektrophoresekammer von Eis umschlossen war. Nach 2 bis 3 Stunden bei 80 V waren die Proben aufgetrennt. Die Darstellung der Bindung von NF-κB-Protein an IRDye800 gebundene Oligonukleotide wurden mittels lasergestütztem Detektionssystem (Odyssey infrared imaging system) detektiert und mit der entsprechenden Software bearbeitet.

3.11 HDAC Aktivitätsassay

Dieser Aktivitätsassay erfasst die Deacetylase-Aktivität der HDAC-1 und 2. Die Proben wurden auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und mit dem HDAC Assay Substrat für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde je Vertiefung 20 µl einer Aktivierungslösung (Entwickler) hinzugegeben und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte dann mit dem Photometer bei 405 nm. Nun wurden die Ergebnisse mit den Werten der unstimulierten Zellproben abgeglichen und in Prozent derer angegeben. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Deacetylierung des Substrates (der Seitenketten mit acetylierten Lysinresten) durch die HDACs aus den jeweiligen Proben. Das deacetylierte Substrat wird in einer zweiten Reaktion mit Hilfe eines Entwicklers, welcher einen Farbumschlag bei 405 nm bewirkt, sichtbar gemacht. Dieser Farbumschlag kann mit dem Photometer gemessen werden.

3.12 Statistische Auswertung und Software

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte als Einwegvarianzanalyse für unverbundene Stichproben. Die beobachteten Unterschiede zwischen den Proben wurden über den Newman-Keuls Test geprüft. Die Signifikanz wurde mit $p < 0,05$ angenommen. Als Software hierfür und für die Abbildungen, die Berechnung der Mittelwerte und deren Standardabweichungen (\pm SD) diente Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Alle Versuche wurden mindestens dreimal und jeweils als Duplikat durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 *M. catarrhalis* induziert eine Zytokinsekretion in BEAS-2B Zellen

4.1.1 Sekretion von Interleukin-8 und GM-CSF

Um die Aktivierung des Bronchialepithels nach einer Infektion mit *M. catarrhalis* zu untersuchen, wurden die Konzentrationen verschiedener Zytokine im Zellüberstand nachgewiesen. Hierfür wurden konfluente Zellen der bronchialen Epithelzelllinie BEAS-2B mit ansteigenden Konzentrationen einer *M. catarrhalis* Suspension über verschiedene Zeiten inkubiert. Anschließend wurden mittels ELISA-Technik die IL-8 und GM-CSF Konzentration im Zellüberstand bestimmt. Wie in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 9) zu sehen, zeigte sich eine dosis- und zeitabhängige IL-8 sowie auch GM-CSF Sekretion.

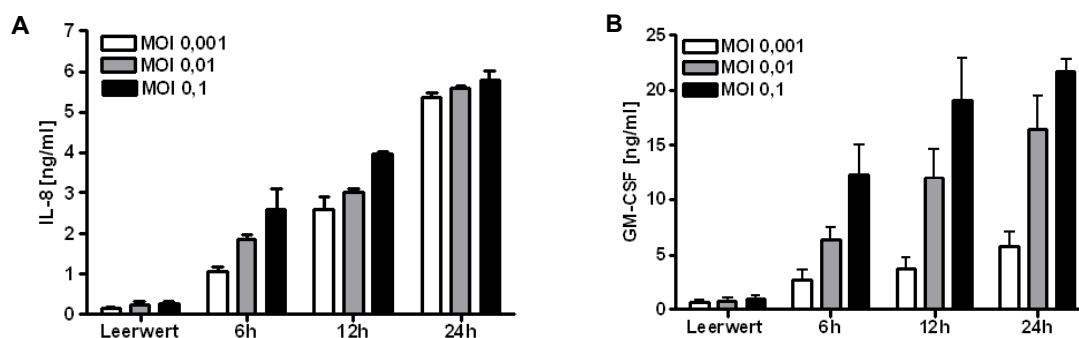


Abb. 9: Zeit- und dosisabhängige Zytokinsekretion in BEAS-2B Zellen

BEAS-2B Zellen wurden mit *M. catarrhalis* (MOI 0,001; 0,01 und 0,1) für 6, 12 bzw. 24 Stunden inkubiert und anschließend die IL-8 bzw. GM-CSF Sekretion im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. In Abbildung A ist die konzentrations- und zeitabhängige IL-8 Sekretion dargestellt. Abbildung B zeigt die *M. catarrhalis* induzierte konzentrations- und zeitabhängige Sekretion von GM-CSF. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von jeweils vier unabhängigen Experimenten in der Abbildung A und B.

Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die *M. catarrhalis* induzierte, bereits auf Proteinebene gezeigte Zeit- und Dosisabhängigkeit der IL-8 und GM-CSF Sekretion durch den Nachweis der spezifischen mRNA-Synthese in BEAS-2B Zellen bestätigt.

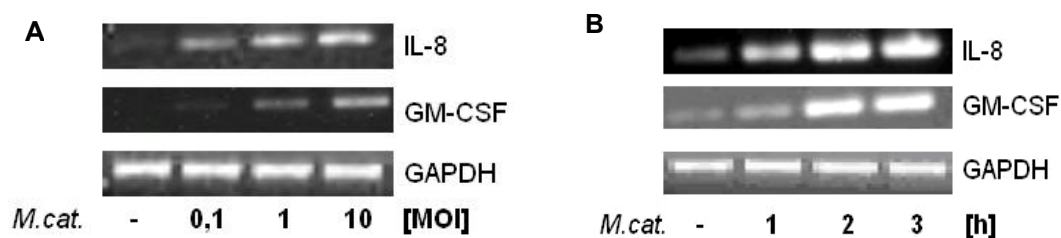


Abb. 10: Dosis- und zeitabhängige IL-8 und GM-CSF Expression in BEAS-2B Zellen

In Abbildung A ist die dosisabhängige IL-8- und GM-CSF spezifische mRNA Expression nach einer zweistündigen Stimulation mit *M. catarrhalis* dargestellt. Die Abbildung B zeigt die zeitabhängige IL-8 und GM-CSF Expression nach einer Infektion mit *M. catarrhalis* (MOI = 0,1) in der RT-PCR. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Gelbild von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

4.1.2 Analyse der durch *M. catarrhalis* induzierten Zytokininduktion

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob durch *M. catarrhalis* weitere Zytokine bzw. Chemokine im Bronchialepithel induziert werden. Dazu wurde die Methode des Bio-Plex ELISAs angewandt. Nach der Infektion der BEAS-2B Zellen mit *M. catarrhalis* zeigte sich, wie in Abb. 11 dargestellt, eine signifikante Induktion folgender proinflammatorischer Zytokine: IL-8, TNF- α , IL-1 β , INF- γ , IL-6 und MIP- β . Ebenfalls konnte ein signifikanter Anstieg von IL-2 verzeichnet werden. Für die Zytokine IL-5 und IL-17 konnte hingegen kein signifikanter Anstieg durch die Infektion mit *M. catarrhalis* nachgewiesen werden.

Zu den antiinflammatorischen Zytokinen die nach der Infektion mit *M. catarrhalis* verstärkt exprimiert wurden zählen die Zytokine IL-4 und IL-13. Dagegen konnte bei IL-10 kein signifikanter Anstieg in der Expression verzeichnet werden.

Als exemplarisches Zytokin für alle weiteren Untersuchungen wurde die IL-8 Sekretion mittels entsprechendem ELISA bestimmt, da es sich bei IL-8 um ein Chemokin handelt, welches zum großen Anteil an der Generierung entzündlicher Prozesse beteiligt und ebenfalls für die Pathogenese der COPD von Bedeutung ist (Di Stefano et al. 2004a).

4 ERGEBNISSE

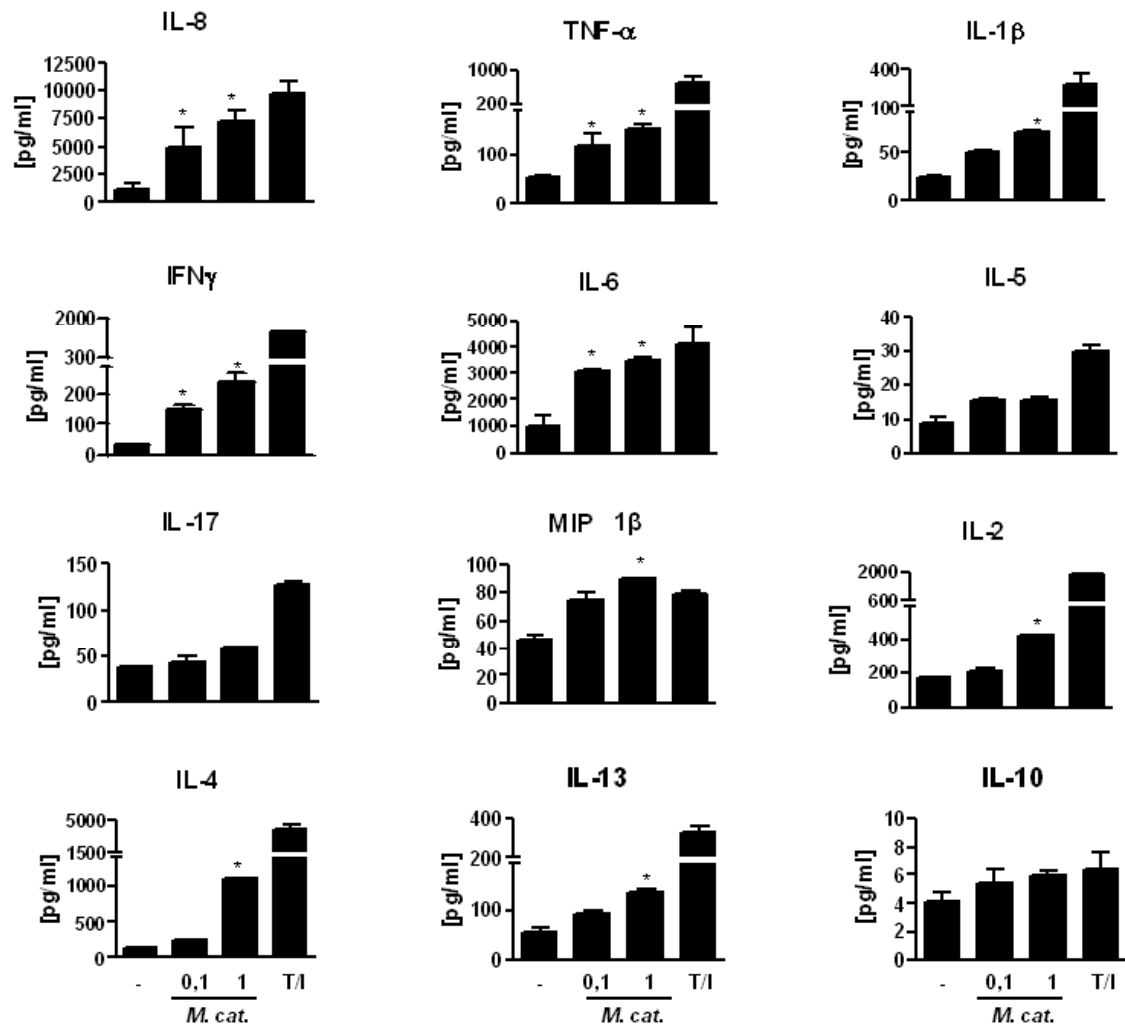


Abb. 11: Pro- und antiinflammatorische Zytokinexpression in BEAS-2B Zellen

Die Abbildung zeigt die unterschiedlich starke Sekretion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen von BEAS-2B Zellen nach einer Stimulation mit *M. catarrhalis*, MOI = 0,1 und 1 über 15 Stunden. Zum Vergleich wurde die IL-8 Sekretion erneut mit dargestellt. Als Positivkontrolle ist die verwendete Kombination aus 50 ng TNF-α und 10 ng IL-1β (T/I) dargestellt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten, * = $p < 0,05$ verglichen mit den unstimulierten Zellen.

4.1.3 Vergleich der beiden *M. catarrhalis* Stämme O35E und ATCC25238

Um mögliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen zu untersuchen, wurde der Stamm O35E, welcher aus einem Patienten mit COPD isoliert worden ist (Unhanand et al. 1992), mit dem *M. catarrhalis* Referenzstamm ATCC25238 (Furihata et al. 1995) auf mögliche Unterschiede hinsichtlich der Induktion ihrer Zytokinausschüt-

tung in BEAS-2B Zellen verglichen. Dazu wurden die BEAS-2B Zellen mit beiden Stämmen in aufsteigender Konzentration für 15 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die IL-8 Konzentration im Zellüberstand bestimmt.

Wie in folgender Abbildung ersichtlich, fand sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der IL-8 Sekretion beider Stämme. Daher wurden alle weiteren Versuche mit dem Stamm O35E, einem klinischen Isolat von *M. catarrhalis*, durchgeführt.

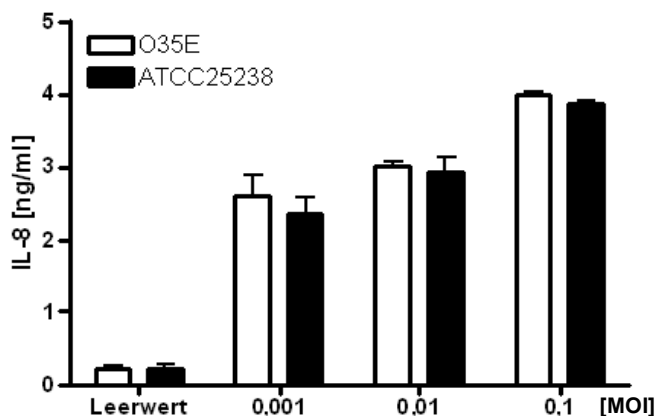


Abb. 12: IL-8 Sekretion der Stämme O35E und ATCC25238 im Vergleich

BEAS-2B Zellen wurden über 15 Stunden in der angegebenen Dosierung jeweils mit den *M. catarrhalis* Stämmen O35E oder ATCC25238 inkubiert. Anschließend wurden die IL-8 Konzentration in den Überständen mittels ELISA untersucht. Zwischen beiden Stämmen fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Versuchen.

Mittels LDH-Messung wurde eine mögliche *M. catarrhalis* induzierte Zytotoxizität der BEAS-2B Zellen für die verwendeten Dosismengen und Inkubationszeiten untersucht.

Wie in Abb. 13 gezeigt ist, fand sich keine durch eine Infektion mit *M. catarrhalis* verursachte zytotoxische Wirkung auf die BEAS-2B Zellen im verwendeten Zeit- und Dosisfenster. Erst nach 24 Stunden bzw. einer MOI von 10 zeigte sich eine beginnende Zytotoxizität, sodass die verwendeten Zeiten und Konzentrationen an diese Beobachtung angepasst wurden.

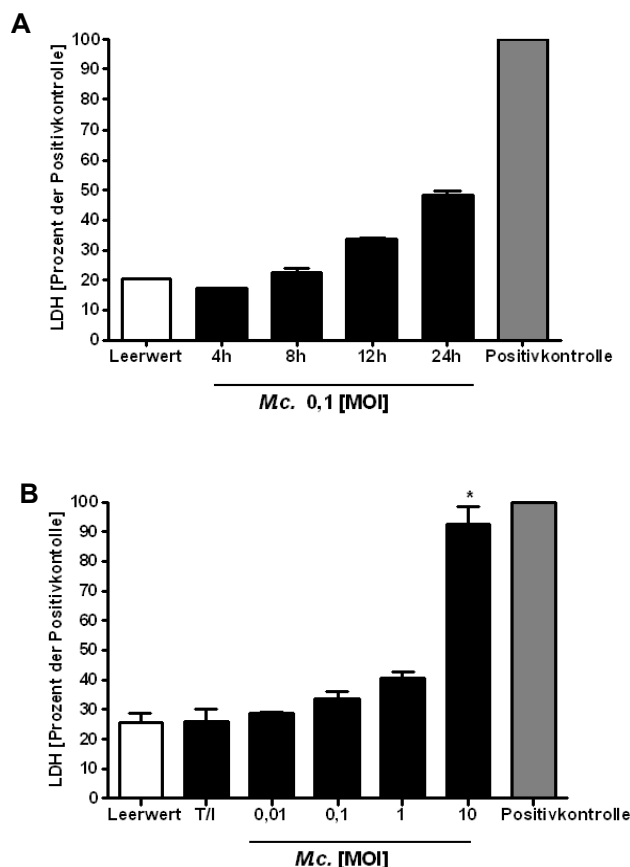


Abb. 13: *M. catarrhalis* induzierte Zytotoxizität in BEAS-2B Zellen

In der Abbildung A ist der zeitliche Verlauf, in Abbildung B die Konzentrationsabhängigkeit der durch *M. catarrhalis* (*M.c.*) bedingten Zytotoxizität in Prozent der Positivkontrolle (siehe 3.4.) gezeigt. Zum Vergleich ist als Leerwert die LDH-Konzentration im Überstand der BEAS-2B Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus jeweils drei verschiedenen LDH-Versuchen. Die in allen folgenden Versuchen verwendete Kombination aus TNF- α und IL-1 β (T/I) in den Konzentrationen 50 ng und 10 ng als Positivkontrolle für die Zytokinduktion in BEAS-2B Zellen zeigte keine zytotoxische Wirkung (Abbildung B). Nach der Inkubation über 24 Stunden mit einer MOI von 0,1 (Abbildung A) bzw. einer MOI von 10 über 15 Stunden (Abbildung B) ließ sich eine deutliche bzw. signifikante *M. catarrhalis* induzierte Zytotoxizität der BEAS-2B Zellen erkennen.

4.2 Einfluss der MAPK auf die *M. catarrhalis* induzierte Zytokinexpression

4.2.1 Nachweis einer Aktivierung der MAPK durch *M. catarrhalis*

Weitere Experimente sollten belegen, ob es nach der Infektion mit *M. catarrhalis* zu einer Aktivierung der MAPK kommt und diese in Zusammenhang mit der IL-8 Expression steht. Die *M. catarrhalis* induzierte Phosphorylierung der MAPK wurde zunächst mittels Western Blot untersucht.

Im Anschluss an die Infektion der BEAS-2B Zellen mit *M. catarrhalis* zeigte sich eine deutliche Phosphorylierung der p38, der ERK1/2 und der JNK (siehe Abb. 14 A-C). Eine Stimulation der BEAS-2B Zellen mit TNF- α und IL-1 β führt nachweislich zu einer Aktivierung der MAPK und diente in nachfolgenden Versuchen als Positivkontrolle (Puddicombe & Davies 2000; Roux & Blenis 2004).

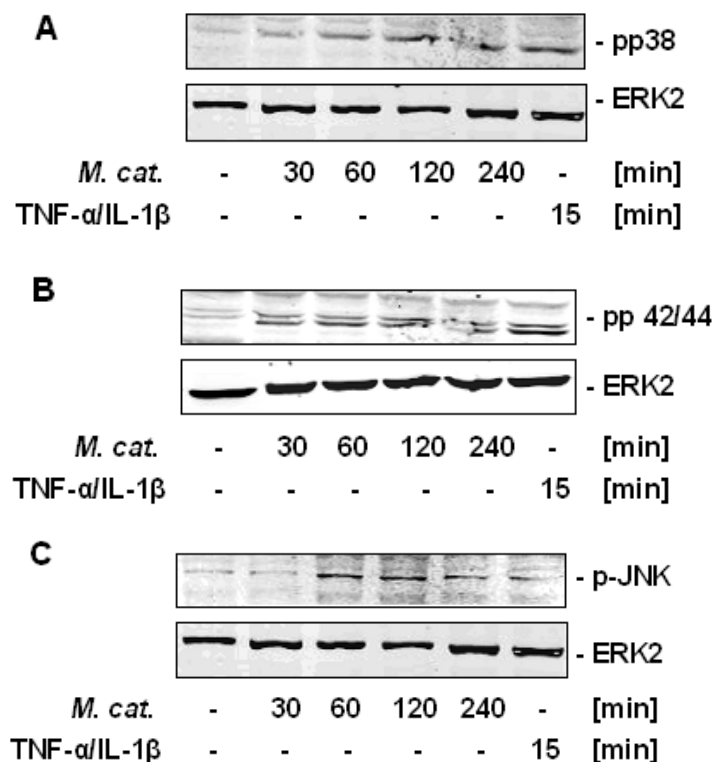


Abb. 14: *M. catarrhalis* induziert die Phosphorylierung der MAPK p38, ERK, JNK

Konfluente BEAS-2B Zellen wurden mit einer *M. catarrhalis* Suspension (MOI = 1) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Phosphorylierung der MAPK p38 (A), p42/44 (ERK1/2) (B) und JNK (C) im zeitlichen Verlauf (30 – 240 Minuten) untersucht. Als Beladungskontrolle diente die Detektion der ERK2. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Gelbild von drei unabhängigen Versuchen mit identischen Resultaten.

4.2.2 Die Abhängigkeit der IL-8 und GM-CSF Sekretion von der Aktivierung der MAPK

Durch den Einsatz spezifischer MAPK Inhibitoren der p38, der ERK1/2 und der JNK sollte eine Beteiligung verschiedener Signalwege an der Zytokinsekretion von IL-8 und GM-CSF mittels ELISA-Technik untersucht werden. Die Vorinkubation der BEAS-2B Zellen mit einem Inhibitor der p38 MAPK SB202190, jedoch nicht seine inaktive Form der SB202474, führte zu einer signifikanten Reduktion der IL-8 und der GM-CSF

4 ERGEBNISSE

Sekretion (siehe Abb. 15 A und C). Der Einsatz von U0126, einem Inhibitor des ERK Signalweges, bewirkte ebenfalls eine signifikante Reduktion der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 und GM-CSF Sekretion. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach dem Einsatz eines Inhibitors der JNK keine signifikante Veränderung der Zytokinfreisetzung (siehe Abb. 15 B und D).

Um eine eventuelle Beeinträchtigung der BEAS-2B Zellen durch die Inhibitoren auszuschließen und somit die Aussagekraft dieser zu gewährleisten, wurden mehrfach Kontrollexperimente in Form von LDH Versuchen durchgeführt. Eine Zytotoxizität der MAPK-Inhibitoren ließ sich nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt).

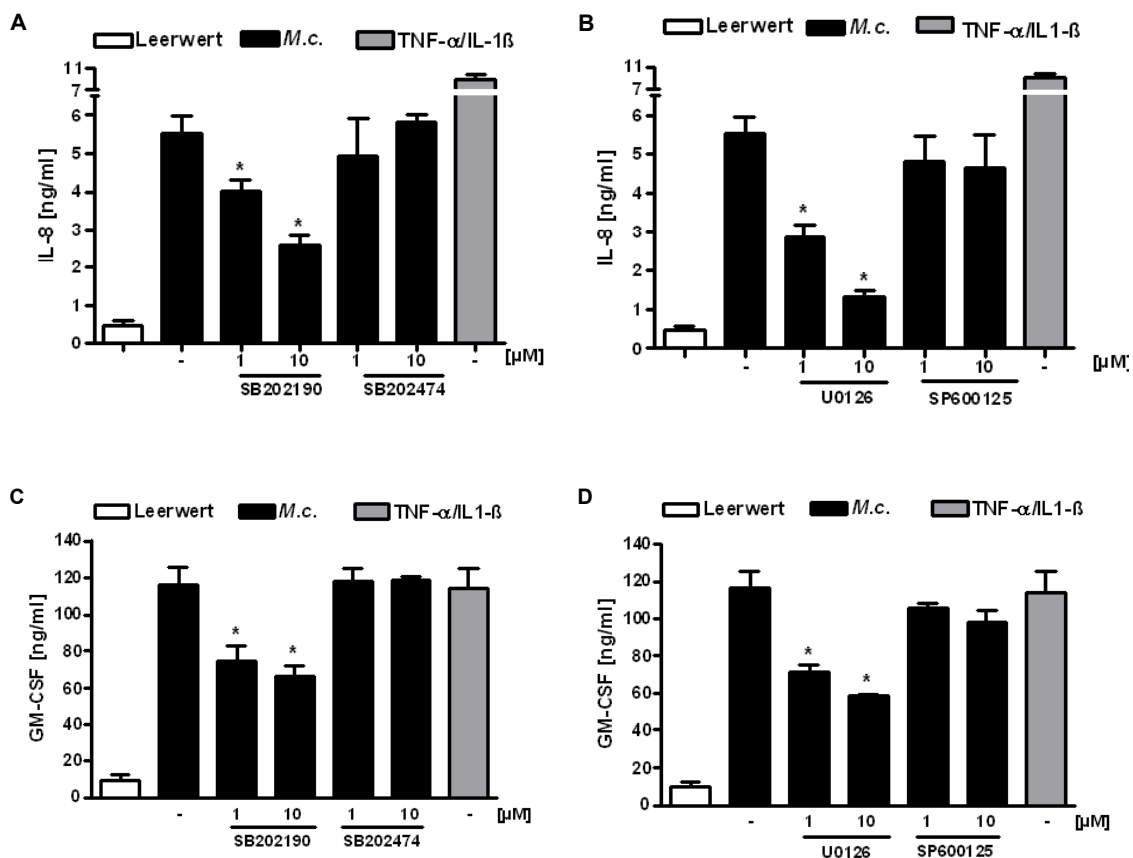


Abb. 15: Die Inhibition von ERK1/2 und p38 vermindert die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 und GM-CSF Sekretion

Dargestellt ist die IL-8 (Abbildung A und B) und GM-CSF (Abbildung C und D) Sekretion von BEAS-2B Zellen nach der Stimulation mit *M. catarrhalis* (MOI = 0,1) über 15 Stunden gemessen mittels ELISA. Die Zellen wurden mit den entsprechenden MAPK Inhibitoren SB202190, der inaktiven Kontrollsubstanz SB202474, U0126 und SP600125 in den beiden Konzentrationen 1 μ M und 10 μ M für 45 Minuten vorinkubiert oder blieben unbehandelt. Die Kombination aus TNF α (50 ng/ml) und IL-1 β (10 ng/ml) diente als Positivkontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus jeweils sechs unabhängigen Experimenten pro Abbildung. Signifikante Unterschiede $p < 0,05$ im Vergleich zur Sekretion der mit *M. catarrhalis* stimulierten Zellen sind markiert (* = $p < 0,05$).

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde eine RT-PCR nach Inkubation der BEAS-2B Zellen mit *M. catarrhalis* und Vorinkubation mit den o.g. Inhibitoren durchgeführt. Auch hier zeigte sich eine verminderte mRNA Synthese von IL-8 und GM-CSF in Abhängigkeit von der Inhibition der p38 und der ERK1/2. Auch hier blieb eine Inhibition der JNK bei diesem Versuchsansatz ohne Effekt.

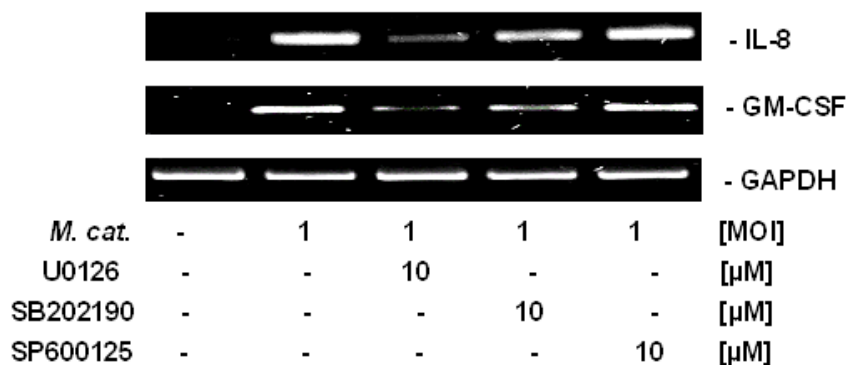


Abb. 16: Die Inhibition von ERK1/2 und p38 vermindert die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 und GM-CSF mRNA Synthese

Die Abbildung zeigt ein Agarosegel nach der RT-PCR von IL-8 und GM-CSF. Es zeigt sich eine starke Reduktion der mRNA Synthese von IL-8 und GM-CSF bei vorheriger Blockade der MAPK ERK1/2 (U0126, 10 μ M) und eine geringere Abschwächung der MAPK p38 (SB202190, 10 μ M). Die Vorinkubation mit dem MAPK-Inhibitor SP600125 (10 μ M) der JNK zeigte keinen Einfluss. Die unten abgebildete GAPDH stellt die interne Kontrolle dar. Der gezeigte Versuch ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.3 Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der *M. catarrhalis* induzierten Aktivierung der BEAS-2B Zellen

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt für die Genexpression insbesondere inflammatorischer Zytokine eine entscheidende Rolle. Um den Einfluss seiner Aktivierung für die IL-8 und GM-CSF Expression in BEAS-2B Zellen zu verdeutlichen, wurde zunächst die Degradation von I κ B α nach der Infektion mit *M. catarrhalis* im Western Blot untersucht. Eine Degradation von I κ B α , ließ sich bereits nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten darstellen.

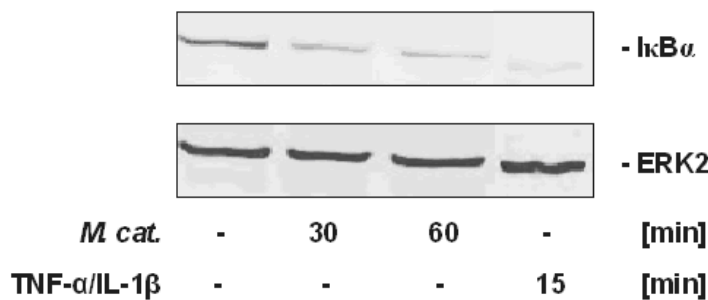


Abb. 17: Degradation von IκBα im Western Blot

BEAS-2B Zellen wurden mit einer *M. catarrhalis* Suspension (MOI = 1) für 30 bzw. 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mittels Western Blot eine bereits nach 30 min einsetzende Degradation von IκBα nachgewiesen. Als Positivkontrolle dienten mit einer Kombination aus TNF-α und IL-1β stimulierte Proben, bei denen eine Degradation bereits nach 15 Minuten nachweisbar war. Als Beladungskontrolle diente die Detektion der ERK2. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen mit gleichen Resultaten.

Mit dem „Electromobility Shift Assay“ (EMSA) sollte anschließend untersucht werden, ob nach der Stimulation mit *M. catarrhalis* der Transkriptionsfaktor NF-κB in den Zellkern der BEAS-2B Zellen transloziert und an die DNA bindet. Dazu wurden zunächst konfluente BEAS-2B Zellen mit der Bakteriensuspension (MOI = 1) über unterschiedliche Zeiten (30 bis 120 Minuten) inkubiert und anschließend mittels EMSA-Technik untersucht.

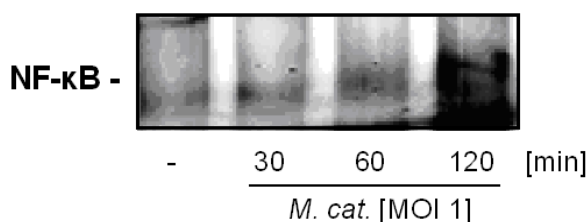


Abb. 18: *M. catarrhalis* induziert die Bindung von NF-κB an die DNA

BEAS-2B Zellen wurden mit einer *M. catarrhalis* Suspension der Konzentration MOI = 1 stimuliert. Im nukleären Anteil des Zelllysates wurde anschließend die zeitabhängige Bindungsaktivität (30 - 120 Minuten) von NF-κB mittels EMSA bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentativer Gelausschnitt aus jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Im Folgenden sollte die NF- κ B Abhängigkeit für die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 und GM-CSF Sekretion untersucht werden. Dazu wurde der spezifische NF- κ B Inhibitor IKK-NBD eingesetzt. Dieser hemmt die spezifische Bindungsdomäne der regulatorischen Einheit IKK γ des Kinase-Komplexes, der die Abspaltung des I κ B α von NF- κ B katalysiert und damit dessen Aktivierung bewirkt (Hayden & Ghosh 2004). Nach Vorinkubation der BEAS-2B Zellen mit 10 μ M IKK-NBD für 45 Minuten und anschließender Infektion mit *M. catarrhalis* kam es im Zellüberstand zu einer signifikanten Reduktion der IL-8 und GM-CSF Zytokinausschüttung (Abb. 19). Dieses Ergebnis zeigt, dass die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 und GM-CSF Sekretion in BEAS-2B Zellen von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B abhängig ist.

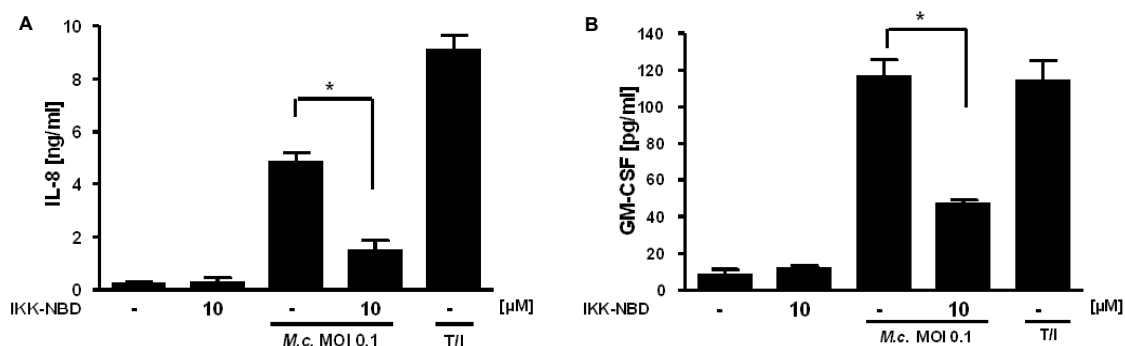


Abb. 19: NF- κ B abhängige Reduktion der IL-8 und GM-CSF Expression

BEAS-2B Zellen wurden mit 10 μ M des Inhibitors IKK-NBD für 45 Minuten vorinkubiert. Danach wurden die Zellen mit *M. catarrhalis* (MOI = 0,1) oder mit TNF- α (50 ng/ml) und IL-1 β (10 ng/ml) (T/I) als Positivkontrolle stimuliert. Nach 15 Stunden wurden die IL-8 (Abbildung A) und GM-CSF Konzentrationen (Abbildung B) in den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Markierungen (*) kennzeichnen die signifikante ($p < 0,05$) Hemmung durch den Inhibitor. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus vier verschiedenen Experimenten.

In weiteren Experimenten sollte der Einfluss der MAPK auf die Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an die DNA im Zellkern untersucht werden. Einen Einfluss auf die mRNA Synthese zeigten zuvor in der RT-PCR nur die p38 MAPK und ERK1/2. Deshalb wurden die BEAS-2B Zellen mit entsprechenden MAPK-Inhibitoren vorinkubiert, dann für zwei Stunden mit *M. catarrhalis* inkubiert und anschließend die NF- κ B-Bindung in den nukleären Extrakten der BEAS-2B Zellen mittels EMSA bestimmt.

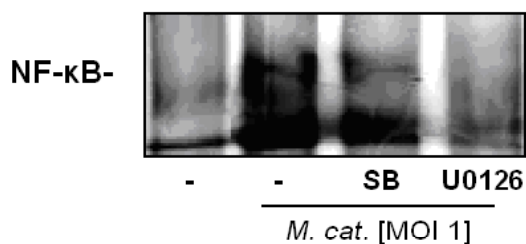


Abb. 20: *M. catarrhalis* induzierte Bindungsaktivität von NF-κB über die MAPK

BEAS-2B Zellen wurden mit den MAPK-Inhibitoren SB202190 (SB), U0126 der Konzentration 10 μM für jeweils 45 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit *M. catarrhalis* (MOI = 1) für 2 Stunden inkubiert. Nach Einsatz der MAPK-Inhibitoren SB202190 und U0126 zeigte sich eine deutliche Reduktion im Bindungsverhalten von NF-κB. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch aus jeweils vier unabhängigen Experimenten.

Die Bindung von NF-κB an die DNA wurde durch Inhibition der MAPK p38 und stärker noch durch Inhibition der ERK1/2 vermindert. Die *M. catarrhalis* induzierte Bindung von NF-κB an die DNA der BEAS-2B Zellen könnte somit eine Schnittstelle zwischen dem aktivierten NF-κB und den MAPK Signaltransduktionswegen darstellen.

4.4 Die Bedeutung von TLR2 und TLR4 für die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Sekretion

Wie auch andere Körperzellen besitzt das respiratorische Epithel die Fähigkeit, über die Expression von Toll-like Rezeptoren der „innate immunity“ eindringende Pathogene zu erkennen. In weiteren Versuchen sollte die Bedeutung der für die Erkennung von bakteriellen Molekülstrukturen wichtigen TLR2 und 4 für eine *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Sekretion untersucht werden.

In Überexpressionsversuchen wurde zunächst eine Beteiligung von TLR2 und TLR4 bei der Zellaktivierung durch *M. catarrhalis* über die Aktivierung von NF-κB untersucht. Hierzu dienten Transfektionsversuche, bei denen jeweils die Funktion eines TLR durch die entsprechende Überexpression bei gleichzeitiger Transfektion eines NF-κB Luciferase-Reporter-Plasmids untersucht wurde. Für diese Versuche wurde die Zelllinie HEK293 gewählt, da diese im Gegensatz zu BEAS-2B Zellen keine TLR2 und TLR4 besitzen. Durch die gezielte Transfektion konnte so die Bedeutung der TLR für die IL-8 Sekretion selektiv untersucht werden. Für die folgenden Untersuchungen wurden HEK293 Zellen im subkonfluenten Zustand mit den entsprechenden Plasmiden für TLR2 oder TLR4 mit seinen Kofaktoren CD14 und MD2 bzw. einem entsprechen-

den Leervektorplasmid als Kontrolle und jeweils einem NF- κ B Luciferase-Reporter-Plasmid transfiziert. Um die Transfektionseffizienz der Proben untereinander vergleichen zu können, wurde gleichzeitig in einem weiteren Ansatz ein β -Galaktosidase-Konstrukt in die HEK293 Zellen kotransfiziert. In den folgenden Abbildungen ist die Beteiligung der beiden TLR an der Zellaktivierung über NF- κ B dargestellt. Es zeigt sich, dass eine Aktivierung der Zellen durch *M. catarrhalis* von einer Pathogenerkennung durch TLR2 und TLR4 abhängig ist.

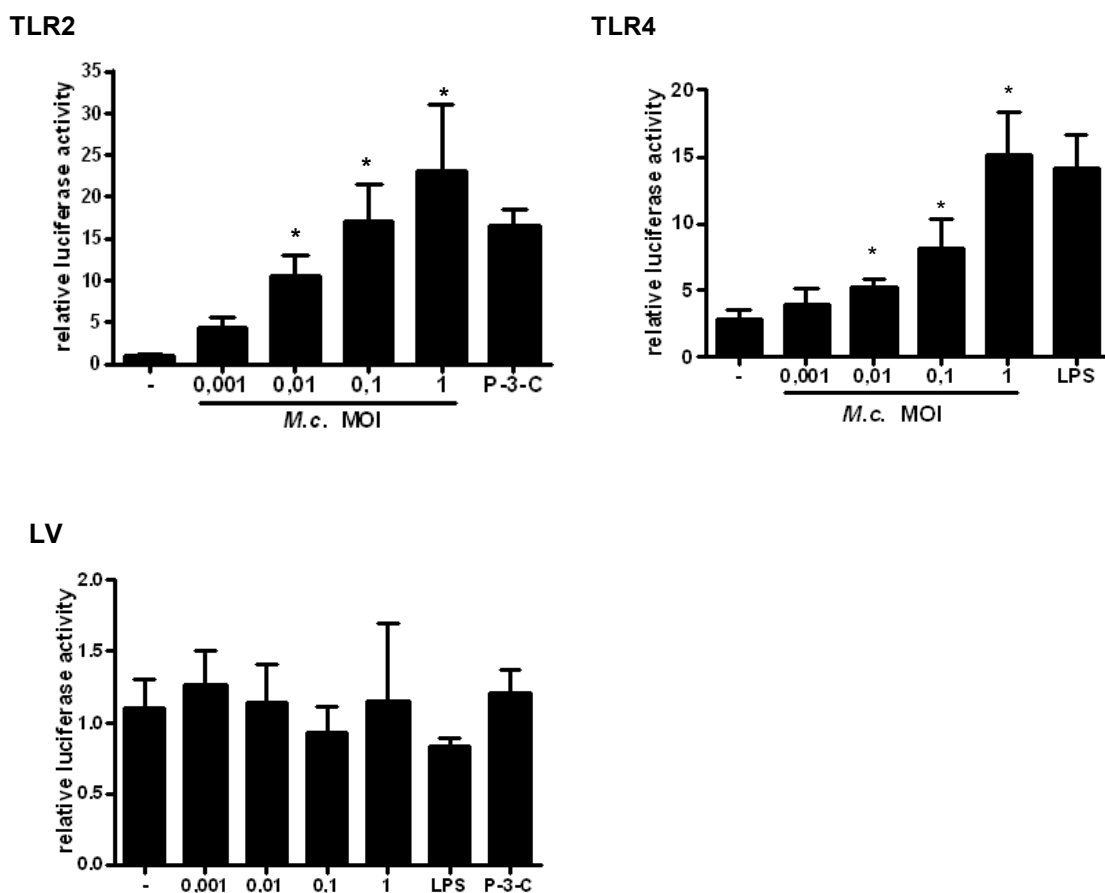


Abb. 21: *M. catarrhalis* induzierte NF- κ B Aktivierung über TLR2 und TLR4

Zellen der Linie HEK293 wurden mit dem jeweiligen TLR-Plasmid bzw. einem Leervektorplasmid (LV) und zusätzlich jeweils mit einem β -Galaktosidase-Konstrukt und NF- κ B Luciferase-Reporter-Plasmid mit Calciumphosphatreagenz transfiziert. Als Kofaktoren für TLR4 dienten CD14 und MD2. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die transfizierten HEK293 Zellen mit einer *M. catarrhalis* Suspension in ansteigender Konzentration (MOI 0,001-1) für 6 Stunden stimuliert. Als Positivkontrolle für TLR2 diente der selektive Agonist für den TLR2 Rezeptor (P-3-C) und für TLR4 das Lipopolysaccharid von *E. coli*. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Ergebnisse, zuvor korreliert mit den β -Galaktosidasewerten und bezogen auf die Leervektordaten (LV) jeweils aus vier unabhängigen Transfektionsversuchen. * = $p < 0,05$ verglichen mit den nicht infizierten Zellen.

4 ERGEBNISSE

Diese Ergebnisse bestätigen, dass *M. catarrhalis* konzentrationsabhängig zu einer NF- κ B Aktivierung führt, welche über die Bindung an TLR2 und TLR4 vermittelt wird. In weiterführenden Untersuchungen konnte mittels Superfect-Transfektion der HEK293 Zellen mit TLR2- und TLR4-Plasmiden und anschließender Stimulation mit *M. catarrhalis* gezeigt werden, dass die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Sekretion von der Bindung an diese beiden Rezeptoren abhängig ist. Die Inkubation der mit dem Leervektorplasmid transfizierten Zellen führte zu keinem Anstieg der IL-8 Sekretion.

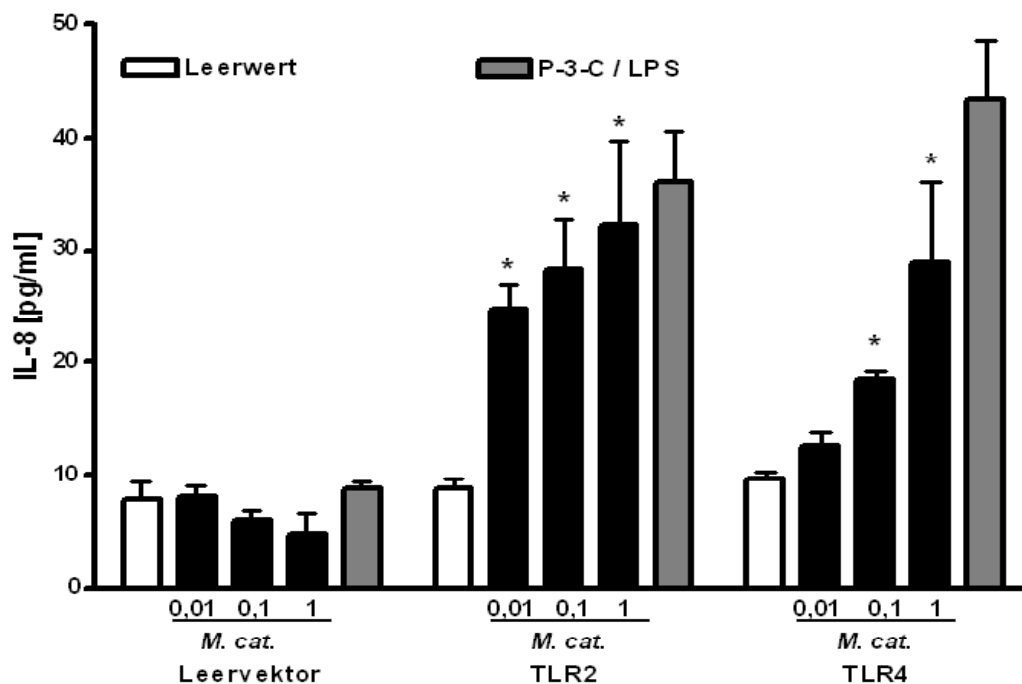


Abb. 22: *M. catarrhalis* induziert eine IL-8 Sekretion über TLR2 und TLR4

Dargestellt ist die signifikante, abhängig von TLR2 und TLR4, induzierte IL-8 Sekretion. Diese zeigte sich konzentrationsabhängig. Die HEK293 Zellen wurden zunächst mit dem jeweiligen TLR-Plasmid bzw. einem Leervektorplasmid mittels Superfectreagenz transfiziert. Die Leervektorplasmid-transfizierten Zellen als Kontrolle zeigten keine signifikante IL-8 Sekretion im Vergleich zum Leerwert. Als Kofaktoren für TLR4 dienten CD14 und MD2. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit *M. catarrhalis* in ansteigender Konzentration (MOI 0,01 – 1) stimuliert und für weitere 13 Stunden inkubiert. Danach wurde im Zellüberstand die IL-8 Sekretion mittels IL-8 ELISA bestimmt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm SD aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. * = $p < 0,05$ verglichen mit den nicht infizierten Zellen.

4.5 Der Einfluss von *M. catarrhalis* auf die Reduktion der Histondeacetylasen (HDAC)

Der Einfluss der HDACs für die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Expression wurde zunächst mittels Einsatz des irreversiblen HDAC Inhibitors Trichostatin A (TSA) untersucht. Die Ergebnisse in der folgenden Abbildung zeigen, dass es nach der Vorinkubation der BEAS-2B Zellen mit TSA zu einer signifikanten Zunahme der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Antwort kam.

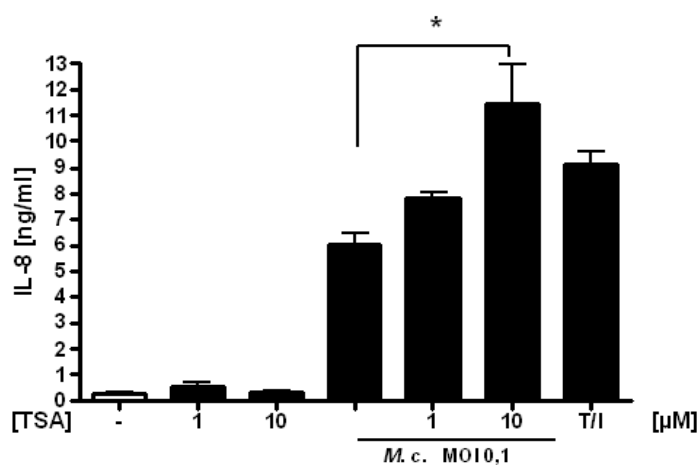


Abb. 23: TSA verstärkt die durch *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Sekretion in BEAS-2B Zellen

Dargestellt ist die IL-8 Sekretion der BEAS-2B Zellen nach der Stimulation mit *M. catarrhalis* und TSA. Die ersten drei Säulen zeigen den Leerwert im Vergleich zu den angewendeten TSA-Konzentrationen hinsichtlich ihrer alleinigen IL-8 Sekretion. Die Kombination von TSA mit *M. catarrhalis* führte konzentrationsabhängig zu einem signifikanten Anstieg der IL-8 Sekretion im Vergleich zur alleinigen Anwesenheit von *M. catarrhalis* (MOI = 0,1) auf BEAS-2B Zellen. Signifikante Unterschiede $p < 0,05$ sind markiert (* = $p < 0,05$). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Als Positivkontrolle diente der Nachweis des signifikanten Anstiegs von TNF- α / IL-1 β (T/I) gegenüber dem Leerwert.

Im Anschluss wurde untersucht, ob eine Infektion der BEAS-2B Zellen mit *M. catarrhalis* eine Veränderung der HDAC-Expression nach sich zieht. Die in Abb. 24 dargestellten Ergebnisse zeigen eine deutliche Reduktion der HDAC-Expression in infizierten BEAS-2B Zellen. Eine zeitabhängige Reduktion war für HDAC-1 und HDAC-2 gleichermaßen nachweisbar. Die gleichmäßige Beladung der Proteinproben wurde mittels ERK2 kontrolliert. Als Positivkontrolle konnte für LPS, einem wichtigen Virulenzfaktor gramnegativer Bakterien, ebenfalls eine Reduktion der HDAC-1 und HDAC-2 nachgewiesen werden.

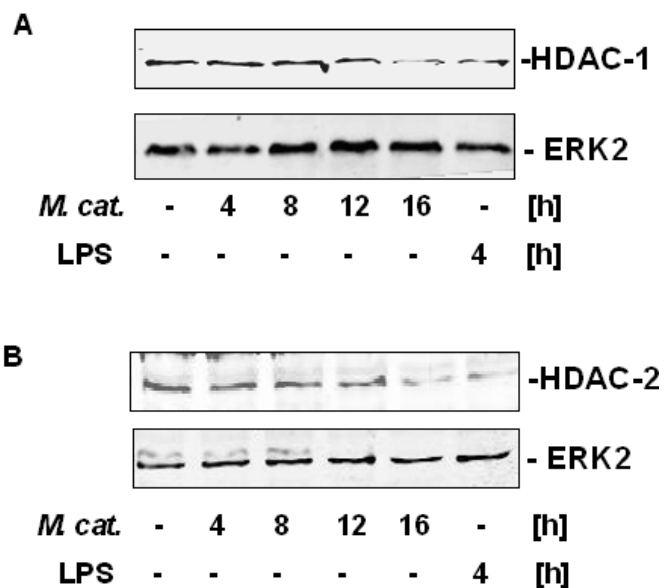


Abb. 24: Abnahme der HDAC-1 und HDAC-2 Expression nach Stimulation mit *M. catarrhalis*

BEAS-2B Zellen wurden mit *M. catarrhalis* (MOI = 1) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf eine zeitabhängige Veränderung der HDAC Expression untersucht. Nach 16 Stunden zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression von HDAC-1 (A) und HDAC-2 (B). Für LPS (1 µg /ml) war schon nach 4 Stunden eine Reduktion nachweisbar (siehe Abb. 24 A und B). Die Abbildung von ERK2 dokumentiert die gleiche Beladung der Proteine. Dargestellt sind die repräsentativen Blots von jeweils drei unabhängigen Versuchen.

Diese Beobachtung konnte durch die Messung der Enzymaktivität der zytosolischen HDACs in BEAS-2B Zellen bestätigt werden (siehe Abb. 25). In den durchgeführten Untersuchungen fand sich nach 16 Stunden der Infektion der Zellen mit *M. catarrhalis* eine signifikant um 33 % verminderte Aktivität der HDACs im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen.

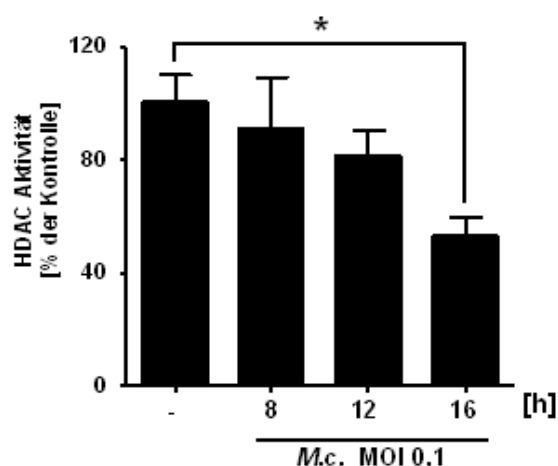


Abb. 25: *M. catarrhalis* bedingt eine Abnahme der HDAC Aktivität

Die BEAS-2B Zellen wurden mit *M. catarrhalis* (*M.c.*) mit einer MOI von 0,1 für die oben beschriebenen Zeiten inkubiert und anschließend mit dem HDAC-Assay die Gesamtaktivität der HDAC bestimmt. Die Abbildung zeigt zeitabhängig die Aktivitäten der HDAC, angegeben in Prozent der Aktivität unstimulierter BEAS-2B Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede (* = $p < 0,05$) gegenüber der Kontrollaktivität sind markiert.

Zusammengefasst belegen die Ergebnisse der Abbildung 24 und 25, dass die Infektion von bronchialen Epithelzellen mit *M. catarrhalis* eine Reduktion der HDAC Expression und Aktivität nach sich zieht.

4.6 Der Einfluss spezifischer Pathogenitätsfaktoren von *M. catarrhalis* auf die IL-8 bzw. GM-CSF Sekretion

4.6.1 Vergleich bedeutender Pathogenitätsfaktoren von *M. catarrhalis* (OMPs, LOS)

Im Folgenden sollte die Bedeutung einiger Pathogenitätsfaktoren von *M. catarrhalis* für die Zytokinexpression untersucht werden. Dafür wurden die Stämme ATCC25238, O35E sowie die UspA1 und UspA2 depletierten Mutanten des Wildtypstammes O35E (O35E.1 und O35E.2) auf mögliche Unterschiede bei der Induktion der IL-8 und GM-CSF Sekretion verglichen. Sowohl die IL-8 wie auch die GM-CSF Expression induziert durch O35E.1 war vergleichbar mit denen der beiden Wildtypstämme ATCC25238 und O35E. Allerdings zeigte sich nach der Infektion der BEAS-2B Zellen mit der UspA2 depletierten Mutante O35E.2 eine signifikant verminderte Zytokinexpression (Abb. 26 A und B).

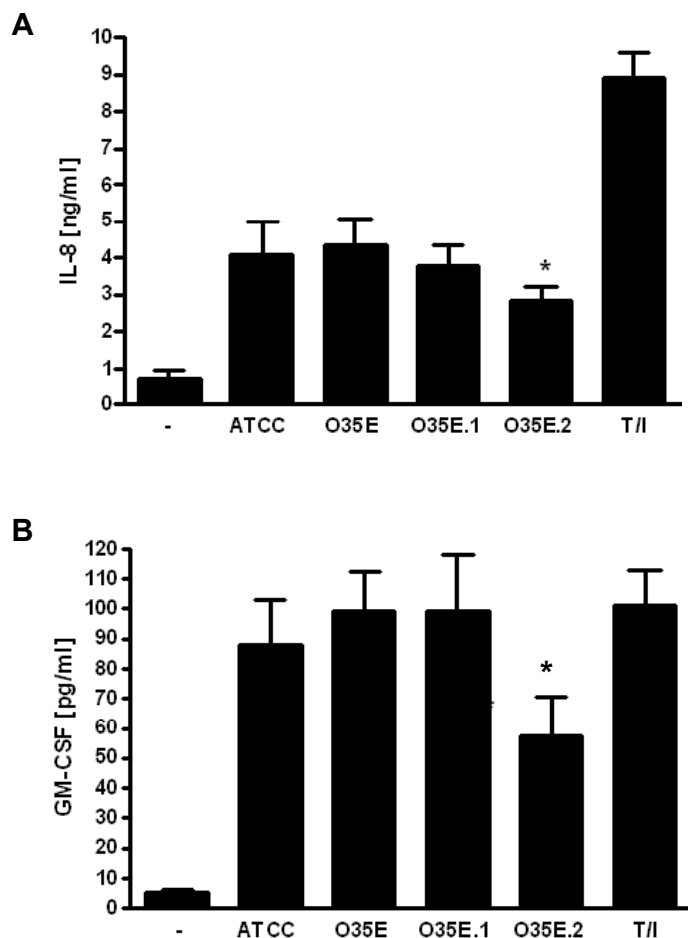


Abb. 26: Vergleich der einzelnen Stämme bei der IL-8 und GM-CSF Sekretion

Abbildung A stellt die IL-8 Sekretion von dem *M. catarrhalis* Wildtyp Stamm O35E sowie dessen UspA1 und UspA2 depletierte Mutanten (O35E.1 und O35E.2) im Vergleich dar. Während es zwischen O35E sowie O35E.1 keinen Unterschied gab, zeigte sich eine signifikante Reduktion der IL-8 (A) und der GM-CSF Sekretion (B) durch die Infektion mit der UspA2 depletierten Mutante O35E.2. Der Vergleich zum Referenzstamm ATCC25238 ist zur Vollständigkeit mit abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus jeweils drei Versuchen. Signifikante Unterschiede $p < 0,05$ sind markiert (* = $p < 0,05$). Als Positivkontrolle diente der Nachweis des signifikanten Anstiegs von TNF- α / IL-1 β (T/I) gegenüber dem Leerwert.

In weiteren Untersuchungen sollte der Einfluss von *M. catarrhalis* spezifischem LOS auf die Zytokinexpression in BEAS-2B Zellen untersucht werden. Unter der Annahme, dass die für die Zytokininduktion von BEAS-2B Zellen benötigten Konzentrationen mit denen von LPS annähernd vergleichbar sind, wurden äquivalente Dosierungen von LOS verwendet. Außerdem musste davon ausgegangen werden, dass wie für die LPS-Stimulation beschrieben (Tobias et al. 1995) auch für LOS die Anwesenheit von LBP, anstelle des reinen LBPs wurde in diesen Versuchen FCS verwandt welches LBP

enthält, zu einer Verstärkung der inflammatorischen Antwort führt. Die folgende Abbildung belegt diese Bedeutung der Anwesenheit von LBP am Wirkungsmaß von LOS bei der Stimulation der BEAS-2B Zellen. Zusätzlich konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme der IL-8 Sekretion durch die Inkubation der Zellen mit LOS gezeigt werden. Diese allein durch LOS ausgelöste IL-8 Sekretion verdeutlicht seine Bedeutung als Pathogenitätsfaktor für die Induktion einer Immunantwort.

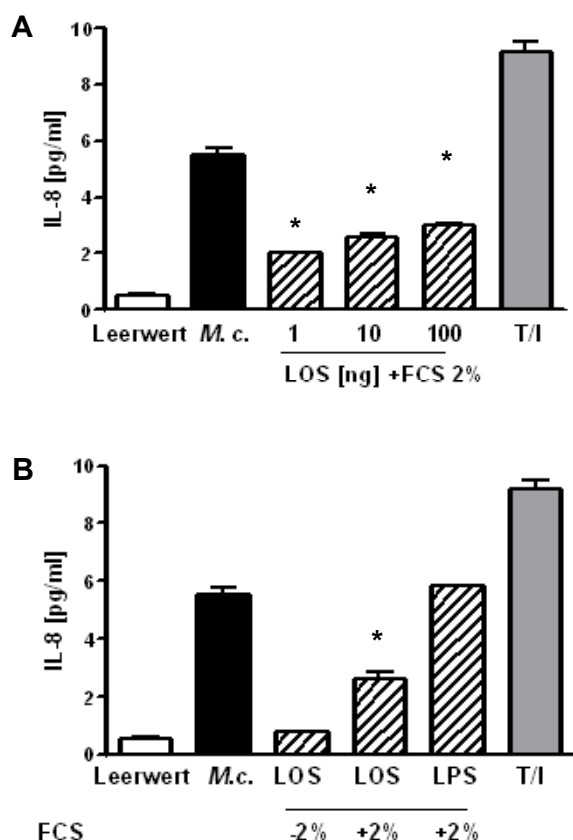


Abb. 27: LPS und LOS induzieren die IL-8 Sekretion in BEAS-2B Zellen

In Abbildung A ist die durch *M. catarrhalis* spezifische LOS induzierte konzentrationsabhängige IL-8 Sekretion dargestellt. Im Vergleich dazu wurde die IL-8 Sekretion von *M. catarrhalis* (*M.c.*) mit einer MOI = 0,1 dargestellt. In Abbildung B zeigt sich die LOS sowie LPS abhängige IL-8 Sekretion in BEAS-2B Zellen. Für die LOS abhängige IL-8 Sekretion konnte wie für die bekannte LPS induzierte IL-8 Sekretion eine signifikante Steigerung nach Zusatz von LBP (2 %iges FCS) nachgewiesen werden (* = $p < 0,05$ im Vergleich zu den mit LOS ohne LBP stimulierten Zellen). LOS und LPS wurden jeweils in einer Konzentration von 10 ng eingesetzt. Als Positivkontrolle diente die Inkubation der Zellen mit TNF- α und IL-1 β (T/I). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus jeweils vier unabhängigen Versuchen.

Nachdem eine LOS abhängige IL-8 Sekretion nachgewiesen werden konnte, sollte ermittelt werden, über welche der bereits im oberen Abschnitt untersuchten TLR (TLR2

4 ERGEBNISSE

und TLR4) LOS erkannt wird und somit die Aktivierung der BEAS-2B Zellen erfolgt. Dafür wurden HEK293 Zellen wie bei den zuvor beschriebenen Transfektionsversuchen mit TLR2 oder TLR4 sowie den weiteren benötigten Plasmiden (CD14 und MD2) transfiziert. Die Ergebnisse der Versuche zeigen, dass der TLR4 im Gegensatz zu dem TLR2 für die LOS Erkennung eine Bedeutung spielt (siehe Abb. 28 A). Eine Stimulation von TLR2 transfizierten HEK293 Zellen mit LOS führte zu keiner Veränderung im Vergleich zur Stimulation mit dem TLR2 Agonisten Pam-3-Cys (siehe Abb. 28 B).

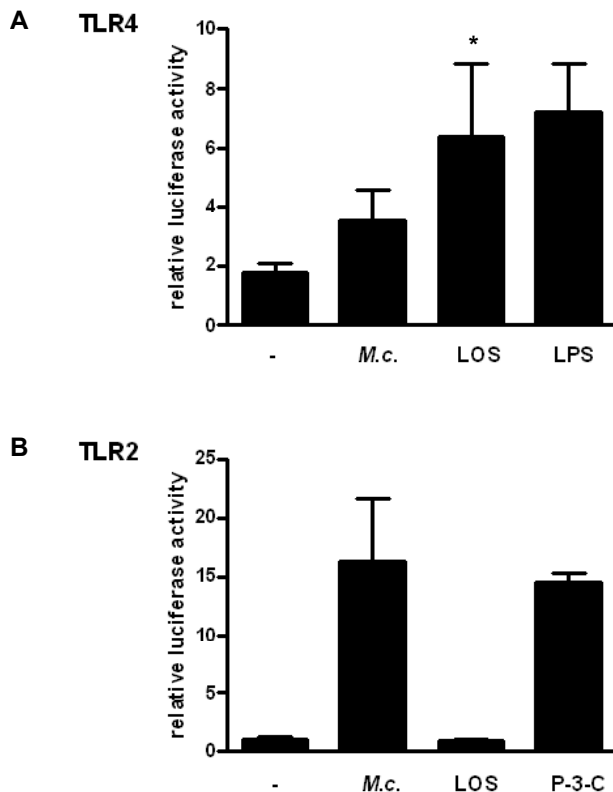


Abb. 28: LOS induziert die NF- κ B Aktivierung über TLR4

Die Abbildung A zeigt eine signifikante Aktivierung von NF- κ B nach der Inkubation TLR4 transfizierter HEK293 Zellen mit 10 ng *M. catarrhalis* spezifischem LOS. Die Markierung (*) kennzeichnet die signifikante Aktivierung ($p < 0,05$) gegenüber dem Leerwert. 10 ng LPS von *E. coli* sowie die Inkubation von *M. catarrhalis* MOI = 0,1 dienten als positiver Kontrollwert. Bei den mit TLR2 transfizierten HEK293 Zellen führte eine Stimulation mit LOS zu keiner Veränderung gegenüber dem Leerwert (B). Als Positivkontrolle diente Pam-3-Cys (P-3-C). Zu jedem Stimulationsansatz wurde 2 %iges FCS hinzugegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Ergebnisse, zuvor korreliert mit den β -Galaktosidasewerten, bezogen auf die Leervektordaten jeweils aus drei unabhängigen Versuchen.

4.6.2 Veränderungen der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Sekretion nach Abtötung durch Hitze oder UV-Licht

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Viabilität der Moraxellen bzw. die Proteinstrukturen auf der Oberfläche dieser Bakterien für die Zytokinantwort haben, wurde die IL-8 Sekretion der BEAS-2B Zellen nach einer Infektion mit Hitze (HI) bzw. UV-Licht (UV) inaktivierten Moraxellen im Vergleich zu dem unbehandelten *M. catarrhalis* Stamm O35E bestimmt. Als Nachweis nicht mehr lebensfähiger Bakterien infolge der durchgeführten Maßnahmen diente der Ausschluss des Bakterienwachstums auf Agarplatten über 24 Stunden. Wie in der folgenden Abbildung (Abb. 29) dargestellt, fand sich nach der Inkubation der BEAS-2B Zellen mit durch Hitze wie auch UV-Licht vorbehandelten Bakterien eine signifikant reduzierte IL-8 Sekretion im Vergleich zu den mit unbehandelten, lebenden Bakterien inkubierten Zellen. Weiterhin führte die Hitzinaktivierung zu einer stärkeren Verminderung der IL-8 Sekretion im Vergleich zu den UV-Lichtinaktivierung.

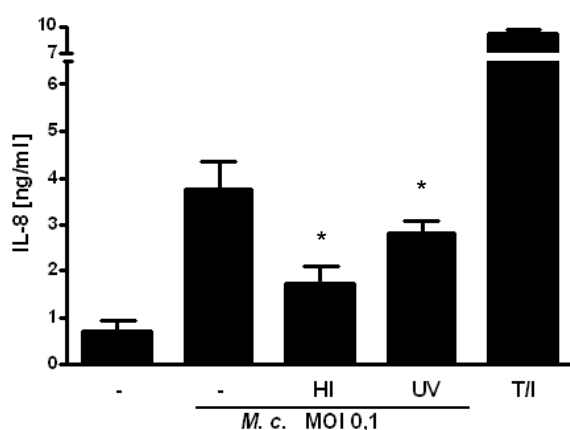


Abb. 29: Inhibition der durch *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Sekretion durch Hitze und UV-Licht Einwirkung

Die BEAS-2B Zellen wurden mit der entsprechend vorbehandelten *M. catarrhalis* Suspension inkubiert. Nach 15 Stunden wurde die IL-8 Sekretion im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung zeigt eine signifikante Reduktion der IL-8 Sekretion bei den zuvor mit Hitze und UV-Licht inaktivierten Moraxellen im Vergleich zu den unbehandelten Moraxellen (* = $p < 0,05$). Weiterhin konnte bei den mit Hitze inaktivierten Moraxellen eine stärkere IL-8 Reduktion im Vergleich zu den UV-Licht inaktivierten Moraxellen nachgewiesen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus jeweils vier unabhängigen Versuchen.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von *M. catarrhalis* für die Aktivierung von humanem Bronchialepithel analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation von humanem bronchialem Epithel mit *M. catarrhalis* die Sekretion inflammatorischer Zytokine wie z. B. IL-8 und GM-CSF induziert. Diese Beobachtungen sind ein deutlicher Hinweis dafür, dass diesem Pathogen eine wichtige Rolle für die Aktivierung und Generierung einer Immunantwort der bronchialen Epithelzellen zukommt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass insbesondere TLR2 und TLR4 für die Erkennung von *M. catarrhalis* bzw. deren Zellwandbestandteil LOS von wichtiger Bedeutung sind. Im Anschluss an die Pathogenerkennung, bei der die Pathogenitätsfaktoren UspA und LOS bedeutsam sind, konnte eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2, p38 und JNK sowie des Transkriptionsfaktors NF- κ B nachgewiesen werden. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Infektion mit *M. catarrhalis* zusätzlich über eine Modifikation der Histonacetylierung zu einer signifikanten Steigerung der Zytokinexpression beitragen kann. Diese Daten sind ein deutlicher Hinweis dafür, dass eine Infektion mit *M. catarrhalis* einen entzündlichen Prozess der Atemwege durch die Aktivierung des epithelialen angeborenen Immunsystems auslösen und unterhalten kann.

5.1 Die *M. catarrhalis* induzierte Inflammation des Bronchialepithels

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Induktion verschiedener Zytokine und Chemokine in bronchialen Epithelzellen, die durch eine Infektion mit *M. catarrhalis* hervorgerufen wurden. In der Literatur ist belegt, dass die für die Pathogenese der bakteriellen Exazerbation der COPD wichtigen Pathogene *H. influenzae* und *S. pneumoniae* eine vergleichbare Zytokininduktion im Bronchialepithel hervorrufen können (Clemans et al. 2000; Schmeck et al. 2004; Schmeck et al. 2006a).

Durch die in dieser Arbeit untersuchte Infektion bronchialer Epithelzellen mit *M. catarrhalis* konnte eine signifikante Sekretion der Zytokine IL-8 und GM-CSF nachgewiesen werden. Diesen beiden Zytokinen kommt durch ihre wichtigen Funktionen, wie der Chemotaxis (IL-8) bzw. der Reifung von Granulozyten (GM-CSF), eine besondere Bedeutung bei der Pathogenese der COPD zu. Insbesondere ist eine vermehrte Sekretion dieser Zytokine entscheidend für die Orchestrierung einer Entzündung im Bronchialtrakt (Barnes 2004).

Die Bedeutung der Veränderungen in der Zytokinexpression für den Verlauf der COPD ist bis heute nur teilweise verstanden. Bei Patienten mit häufigen Exazerbationen zeigen sich erhöhte Zytokinspiegel im Sputum von IL-8 und IL-6, die in der vorliegenden Arbeit auch durch Infektionen mit *M. catarrhalis* induzierbar waren (Patel et al. 2002). Auch GM-CSF konnte bei Patienten mit akuter Exazerbation im Vergleich zu Patienten mit stabiler COPD mittels BAL in erhöhter Konzentration extrahiert werden (Barnes 2004).

Neben *M. catarrhalis* ist auch für *H. influenzae* und *S. pneumoniae* eine Kolonisierung der unteren Atemwege bei Patienten mit COPD nachgewiesen (Murphy et al. 2000; Sethi et al. 2002). Hierbei korreliert u.a. die Konzentration von IL-8 im Sputum dieser Patienten mit ihrer Bakterienlast (Barnes 2004). Die Kolonisierungsrate von *M. catarrhalis* nimmt mit zunehmenden Alter ab, ist jedoch bei Patienten mit COPD im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich erhöht (Sethi & Murphy 2001). Daher ist anzunehmen, dass die häufige bzw. dauerhafte Anwesenheit von *M. catarrhalis* und seine induzierte Freisetzung von Entzündungsmediatoren des Bronchialepithels einen bedeutenden Anteil an der Pathogenese und der Progression der COPD haben.

Die Daten des Bio-Plex zeigen neben den ELISA-Ergebnissen von IL-8 und GM-CSF den Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α , IL-1 β nach der Stimulation der bronchialen Epithelzellen mit *M. catarrhalis*. Diese Zytokinerhöhung konnte ebenfalls in Sputumproben von Patienten mit COPD gefunden werden, die bei diesen im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich erhöht waren (Barnes 2004). Dies weist darauf hin, dass *M. catarrhalis* entscheidend an einer Aufrechterhaltung einer chronischen Inflammation des Bronchialepithels beteiligt sein kann.

In dieser Studie zeigte sich eine durch *M. catarrhalis* induzierte vermehrte Sekretion von IL-13 und IL-4 in bronchialen Epithelzellen. Die Rolle, die diesen antiinflammatorisch wirksamen Zytokinen bei der COPD zukommt, sind bisher nur unzureichend beschrieben worden. Eine vermehrte Sekretion beider Zytokine konnte in einer Arbeit von Miotto et al in Bronchialbiopsien von Patienten mit chronischer Bronchitis und vermehrter Schleimsekretion gefunden werden, so dass die durch *M. catarrhalis* induzierte gesteigerte Sekretion möglicherweise mit der bei diesen Patienten vermehrt auftretenden Dyskrinie in Verbindung stehen könnte (Miotto et al. 2003; Cohn 2006). Eine Infektion der BEAS-2B Zellen mit *M. catarrhalis* führte in den hier durchgeführten Versuchen nicht zu einer signifikanten IL-10 Sekretion. Die Bedeutung dieses Zytokins liegt in der Unterdrückung einer inflammatorischen Immunantwort durch die Inhibition

bestimmter Zytokine, wie z. B. TNF- α oder IL-8. In Sputumproben von Patienten mit COPD konnten Takanashi et al sogar verminderte IL-10 Konzentrationen finden (Takanashi et al. 1999; Barnes 2004).

Eine Zigarettenrauchexposition führte nachweislich in bronchialen Epithelzellen ebenfalls zu einer Erhöhung der IL-8 Genexpression mit steigender Zytokinfreisetzung (Chung 2001). Daher ist es denkbar, dass die Kombination eines dauerhaften Nikotinabusus und die Kolonisierung bzw. Infektion mit potentiellen pathogenen Erregern, wie *M. catarrhalis*, im Bronchialtrakt zu einer Potenzierung der schädigenden Wirkung und somit zu einer chronischen Inflammation führen kann.

Die detaillierte Analyse der Bedeutung der unterschiedlichen Zytokine für die Pathogenese der COPD, insbesondere mit einer Fokussierung auf die Suppression der chronischen neutrophilen Inflammation, könnte neue Therapieansätze eröffnen. Der Versuch den meist progressiven Verlauf dieser Erkrankung günstig zu beeinflussen führte zu Therapieansätzen u.a. durch Entwicklung von Anti-Zytokintherapien (Chung 2001). Der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen IL-8 in der Therapie der COPD stellte sich bisher als nur bedingt wirksam heraus (Yang et al. 1999; Mahler et al. 2004). Möglicherweise kann die Blockade von TNF- α mittels Antikörpern für die Behandlung der COPD in einigen Fällen von Bedeutung sein, zumal Antikörper gegen TNF- α bereits bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen erfolgreich angewandt werden konnten (Yang et al. 1999; Barnes 2004; Mahler et al. 2004; Barnes & Stockley 2005).

5.2 Die Bedeutung der TLR2 und 4 an der Generierung einer *M. catarrhalis* induzierten Immunantwort des Bronchialepithels

In der Literatur gab es bisher keine Untersuchungen darüber, ob *M. catarrhalis* vom Bronchialepithel möglicherweise von Rezeptoren der angeborenen Immunantwort erkannt werden kann. In dieser Arbeit gelang der Nachweis der Erkennung und Vermittlung einer von *M. catarrhalis* induzierten Inflammation in bronchialen Epithelzellen über den TLR2 und TLR4. Des Weiteren konnte ihre Bedeutung für die IL-8 Sekretion in HEK293 Zellen dargestellt werden. Die Expression beider Rezeptoren in BEAS-2B Zellen ist in der Literatur vielfach nachgewiesen worden (Guillot et al. 2004; Sha et al. 2004).

Auch in primären humanen bronchialen Epithelzellen, gewonnen aus dem Bronchialtrakt gesunder Spender, gelang der Nachweis dieser Rezeptoren, so dass von einer Übertragbarkeit der in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse auf primäre Zellen auszugehen ist (Schulz et al. 2002; Schulz et al. 2003; Guillot et al. 2004).

Lange wurde davon ausgegangen, dass TLR2 neben Lipoteichonsäure und Lipoproteinen Peptidoglykan als PAMP erkennen kann (Medzhitov & Janeway 2000; Takeda & Akira 2003). Peptidoglykane sind Zellwandbestandteile grampositiver und gramnegativer Bakterien, die in der Zellwand grampositiver Bakterien ein mehrschichtiges Netz von einer Dicke bis zu 80 nm ausbilden können (Akira et al. 2006). Keller et al konnten nachweisen, dass auch die Zellwand von *M. catarrhalis* einen hohen Peptidoglykangehalt aufweist (Keller et al. 1992). Jedoch zeigten kürzlich Untersuchungen von Travassos et al mit aufgereinigten Peptidoglykanen verschiedener Bakterien, dass die Erkennung über TLR2 nicht auf diese, sondern auf Verunreinigungen der Proben mit anderen Zellwandbestandteilen, wie Lipoteichonsäure zurückzuführen waren (Travassos et al. 2004). Somit konnte an der Annahme der *M. catarrhalis* induzierten Aktivierung des bronchialen Epithels über den TLR2 durch Peptidoglykan nicht festgehalten werden. Andere Bakterienwandbestandteile, für die ein starkes proinflammatorisches Potential über die Aktivierung des TLR2 nachgewiesen werden konnte, wie für die Lipoproteine von *H. influenzae* und *E. coli*, könnten möglicherweise an der *M. catarrhalis* induzierten Aktivierung des Bronchialepithels neben weiteren, bisher noch unbekanntem Bestandteilen beteiligt sein (Schröder et al. 2004; Trinchieri & Sher 2007). Möglicherweise dienen auch andere OMPs, die auf der Zelloberfläche von *M. catarrhalis* nachgewiesen werden konnten, als Agonisten für die TLR2 Erkennung. Um diese Hypothese zu belegen, wären weitere Untersuchungen mit aufgereinigten Zellwandbestandteilen von *M. catarrhalis* notwendig. Weiterführende in der Arbeitsgruppe unternommene Versuche belegten zusätzlich die Beteiligung intrazellulärer Proteine, sogenannter NOD-Proteine, an der Aktivierung des Bronchialepithels durch *M. catarrhalis* (Slevogt et al. 2006b). Diese sind gleichfalls an der Induktion einer inflammatorischen Antwort verschiedener sowohl gramnegativer als auch grampositiver intrazellulärer Bakterien beteiligt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass NOD-Proteine Peptidoglykan, genauer deren Bestandteile Muramyl-dipeptid (NOD2), und Diaminopimelinsäure (NOD1) erkennen (Opitz et al. 2004; Travassos et al. 2004; Opitz et al. 2005). Diese Erkennung von Peptidoglykanmustern von *M. catarrhalis* ließe die intrazelluläre Beteiligung der Aktivierung des Bronchialepithels über NOD-Proteine erklären. Da TLR2 in der Lage ist mit TLR1 bzw. TLR6 Hetero-

dimere zu bilden und somit das Spektrum der PAMP-Erkennung sowie die Stärke der Immunantwort zu erweitern und zu modulieren (Abreu & Arditi 2004; Sabroe et al. 2004; Schmeck et al. 2006b), könnte eine Erkennung von *M. catarrhalis* durch TLR-Heterodimere zusätzlich von Bedeutung sein. Derartige Versuchsreihen werden derzeit von der betreuenden Arbeitsgruppe für *M. catarrhalis* durchgeführt.

Neben *M. catarrhalis* wird die inflammatorische Immunantwort der wichtigen respiratorischen Pathogene *S. pneumoniae* und *H. influenzae* ebenfalls über den TLR2 vermittelt (Mogensen et al. 2006). Für die zystische Fibrose, eine autosomal-rezessive Erkrankung, die mit einer chronischen Entzündung einhergeht, konnte außerdem eine Reduktion der TLR2 und TLR4 Expression in Epithelzellen festgestellt werden (Greene et al. 2005; Hauber et al. 2005). Dabei scheint dies eine Ursache für die verminderte Abwehr gegenüber bakteriellen Pathogenen zu sein, mit der daraus resultierenden chronischen Inflammation der Atemwege. Es wäre ein interessanter Untersuchungsansatz zu erforschen, ob bei Patienten mit COPD eine veränderte Expression der TLR Rezeptoren nachgewiesen werden kann.

Sowohl für TLR4 als auch für TLR2 sind für den Menschen bisher verschiedene Polymorphismen, wie z. B. den TLR4-Polymorphismus Asp299Gly nachgewiesen (Sabroe et al. 2004), die jedoch aufgrund geringer Fallzahlen in den wenigen bisher durchgeführten Studien keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Schweregrad der COPD erkennen lassen. Möglicherweise beeinflussen diese oder andere bisher nicht erforschte Polymorphismen von TLR2 und TLR4 die Erkennung der für die COPD entscheidenden Pathogene in geringer Ausprägung (Sabroe et al. 2004).

Die vorliegenden Ergebnisse konnten zeigen, dass die Erkennung von *M. catarrhalis* auch über den TLR4 in Anwesenheit seiner Kofaktoren CD14 und MD2 in bronchialen Epithelzellen erfolgte. Dieser Rezeptor dient hauptsächlich der Erkennung von PAMPs gramnegativer Bakterien, wie z. B. dem LPS. In der Zellwand von *M. catarrhalis* befindet sich jedoch nicht LPS sondern LOS, ein dem LPS verwandtes Oberflächenmolekül (Peng et al. 2005). Dieses LOS zeigt u.a. Übereinstimmungen in den Oligosaccharidketten des LOS von *H. influenzae*, bei dem LOS als wichtiger Virulenzfaktor beschrieben ist (Karalus & Campagnari 2000; Lorenz et al. 2005). Die in dieser Arbeit durchgeführten Ergebnisse zeigten, dass LOS für die Erkennung von *M. catarrhalis* durch TLR4 von entscheidender Bedeutung ist. Wie auch schon von Schröder et al für die Erkennung von LPS beschrieben (Schröder et al. 2004; Schröder

& Schumann 2005), zeigten mehrere Experimente, dass die Anwesenheit von LBP, enthalten im zugegebenen Serum, für die Pathogenerkennung des *M. catarrhalis* spezifischen LOS wichtig ist.

Das LBP ist ein akutes Phaseprotein, welches in pulmonalen, hepatischen und gastrointestinalen Zellen gebildet wird und sich in geringen Konzentrationen von 5 - 10 µg/ml im Serum befindet (Weber et al. 2003). Da sich LBP in ähnlicher Dosierung auch in fötalem Kälberserum befindet, wurde dieses Serum den Proben hinzugegeben. Die so durchgeführten Versuche konnten eine Verstärkung der inflammatorischen Antwort, dargestellt durch die IL-8 Sekretion, von LOS herbeiführen. Der Anteil den LBP an der Verstärkung der IL-8 Sekretion trägt lässt sich in diesem Versuchsaufbau nicht genau bestimmen, da im Serum neben LBP weitere möglicherweise beeinflussende Bestandteile vorhanden sind. Um eine genauere Aussage treffen zu können, müssten die Versuche mit rekombinantem LBP durchgeführt werden.

In höheren Konzentrationen ist für LBP eine hemmende Wirkung auf die Zytokinfreisetzung beschrieben, die zu einer Abschwächung der induzierten Inflammation führt (Schulz et al. 2002). Eine solche Inhibition ließ sich in den durchgeführten Versuchen mit den angegebenen Konzentrationen nicht nachweisen.

5.3 Die Rolle der intrazellulären MAPK und des Transkriptionsfaktors NF-κB an der *M. catarrhalis* induzierten inflammatorischen Antwort

5.3.1 Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF-κB für die Zellaktivierung und Zytokinfreisetzung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB für die *M. catarrhalis* induzierte Zytokinsekretion von zentraler Bedeutung ist. Dieser Transkriptionsfaktor ist nachweislich an der Induktion einer Vielzahl für die Immunantwort essentieller Zytokine wie IL-8 und GM-CSF beteiligt (Hayden & Ghosh 2004). Die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors im Anschluss an die Pathogenerkennung durch alle TLR, wie z. B. das LPS gramnegativer Bakterien durch TLR4, konnten mehrere Publikationen belegen (Muegge 2002; Chen & Greene 2004). Zur Identifizierung einer Beteiligung von NF-κB an der durch *M. catarrhalis* induzierten Inflammation wurde zunächst die Degradation von IκBα als indirekter Nachweis der NF-κB Aktivierung nachgewiesen. Zur weiteren Bestätigung ließ sich die Reduktion der IL-8 und GM-CSF Sekretion nach Präinkubation der Zellen mit dem

Inhibitor IKK-NBD nachweisen. Die dargestellten Ergebnisse stehen in Übereinstimmung zu anderen publizierten Studien, die zeigen konnten, dass es im Anschluss an die Pathogenerkennung wichtiger Bakterien des Respirationstraktes, wie z. B. *H. influenzae* (Shuto et al. 2001) oder *S. pneumoniae* (Schmeck et al. 2004) zu einer Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors kommt. Der Nachweis der Translokation von NF- κ B in den Kern induziert durch *M. catarrhalis* mit anschließender Bindung an die DNA gelang mittels EMSA. Diese Induktion der inflammatorischen Genaktivierung konnte ebenfalls für *S. pneumoniae* aufgezeigt werden (Schmeck et al. 2004).

Bei der COPD scheint die NF- κ B abhängige Aktivierung ebenfalls eine bedeutende Rolle für die chronische Inflammation zu spielen. Di Stefano et al konnten eine erhöhte Kernlokalisierung von p65, einer Untereinheit von NF- κ B, in Bronchialbiopsien von COPD Patienten nachweisen (Di Stefano et al. 2002; Di Stefano et al. 2004b). Diese gesteigerte NF- κ B Kernlokalisierung korrelierte mit dem Schweregrad der Erkrankung. In verschiedenen Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass eine gesteigerte NF- κ B Kernlokalisierung eine erhöhte Sekretion proinflammatorischer Zytokine in bronchialen Epitelzellen von COPD Patienten zur Folge hatte, was sich negativ auf die Prognose dieser Patienten auswirkte (Schulz et al. 2003; Di Stefano et al. 2004a). Diese Daten sind ein wichtiger Hinweis dafür, dass die Aktivierung des NF- κ B vermittelten Signaltransduktionsweges für die Pathogenese der COPD von großer Bedeutung ist. Es ist anzunehmen, dass die *M. catarrhalis* induzierte NF- κ B Aktivierung gemeinsam mit anderen Mechanismen an der Aufrechterhaltung des chronisch entzündlichen Prozesses bei der COPD signifikant beteiligt ist.

5.3.2 Die Beteiligung der verschiedenen MAPK an der Zellaktivierung und Zytokinfreisetzung

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass *M. catarrhalis* eine Aktivierung in Form einer Phosphorylierung der MAPK p38, ERK1/2 und JNK nach sich zieht. Im Anschluss daran wurde durch die Präinkubation der BEAS-2B Zellen mit selektiven chemischen Inhibitoren der Einfluss der einzelnen MAPK für die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 und GM-CSF Sekretion mittels ELISA, deren Nachweis der spezifischen mRNA mittels RT-PCR und das Bindungsverhalten des Transkriptionsfaktors NF- κ B an die DNA im EMSA untersucht.

Der Einsatz des p38 MAPK – Inhibitors SB202190 führte zu einer signifikanten Reduktion der durch *M. catarrhalis* hervorgerufenen IL-8 und GM-CSF spezifischen

mRNA Synthese und der Sekretion dieser Zytokine in den Zellüberstand. Jedoch wurde die NF- κ B – DNA Bindung durch den Inhibitor nicht beeinflusst. Dies spricht dafür, dass die Aktivierung des NF- κ B Signalweges, genauer die Translokation von NF- κ B in den Kern und die Bindung an die DNA, unabhängig von der *M. catarrhalis* induzierten p38 MAPK Aktivierung abläuft. Eine mögliche gegenseitige Beeinflussung im Kern an der Generierung einer inflammatorischen Antwort ist nicht auszuschließen. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Aussagen von Schmeck et al, die in Folge einer Infektion mit *S. pneumoniae* eine Aktivierung des p38 sowie des NF- κ B Signaltransduktionsweges in bronchialen Epithelzellen aufzeigen konnten, die jedoch im Zellkern in der MAPK-abhängigen Phosphorylierung der NF- κ B-Untereinheit fusionieren und somit beide für die Zytokinproduktion von Bedeutung waren (Saccani et al. 2002; Schmeck et al. 2004). Weiterhin gibt es in der Literatur Hinweise dafür, dass eine Inhibition der p38 MAPK für die Aktivierung des NF- κ B Transkriptionsweges sowohl inhibierende als auch steigernde Auswirkungen haben kann, so z. B. in Form einer möglichen Beeinflussung der DNA-Bindung bzw. der IL-8 Promoteraktivität (Li et al. 2002; Saccani et al. 2002). Weiterführende Untersuchungen über eine mögliche Beeinflussung der beiden Signaltransduktionswege für die Generierung einer Immunantwort sind somit von großem Interesse.

Eine Inhibition des ERK1/2 Signaltransduktionsweges führte sowohl zu einer signifikanten Hemmung der IL-8 und GM-CSF Sekretion, die im Vergleich zur Inhibition des p38 Signaltransduktionsweges bei IL-8 stärker ausfiel. Für die NF- κ B–DNA Bindung konnte eine starke Verminderung des Signals durch die ERK1/2 Inhibition gezeigt werden. Die vorliegenden Ergebnisse sind Hinweise dafür, dass eine *M. catarrhalis* induzierte ERK1/2 Aktivierung einen Einfluss auf die NF- κ B Aktivierung durch *M. catarrhalis* ausübt. Diese mögliche Schnittstelle in der Aktivierung der bronchialen Epithelzellen steht im Widerspruch zu den erhobenen Daten bei der TNF- α Induktion von Li et al., die eine NF- κ B Aktivierung unabhängig von der ERK Aktivierung annehmen (Li et al. 2002). Im Vergleich zur Induktion von TNF- α wird die Signaltransduktion von *M. catarrhalis* über verschiedene andere Rezeptoren vermittelt, so dass eine Erklärungsmöglichkeit darin liegen könnte. Möglicherweise gibt es weiterhin bezüglich von Interaktionen dieser Signaltransduktionswege auch erregere- bzw. stimulationspezifische Unterschiede.

Eine Infektion der bronchialen Epithelzellen mit *M. catarrhalis* führte zu einer Aktivierung des JNK Signaltransduktionsweges, allerdings zeigte sich mittels chemischer Inhibition dieses Signaltransduktionsweges keine signifikante Veränderung

in der IL-8 Sekretion. Hingegen konnten Versuche der Arbeitsgruppe zeigen, dass derselbe JNK Inhibitor zu einer signifikanten Reduktion der mit TNF- α und IL-1 β inkubierten BEAS-2B Zellen führte (Slevogt et al. 2006c). Daher ist anzunehmen, dass dieser Signaltransduktionsweg an anderen Prozessen der zellulären Immunreaktion beteiligt ist. Die JNK Aktivierung beeinflusst über die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren verschiedene Zellfunktionen wie die Zellproliferation oder die Induktion bestimmter Zytokine und Wachstumsfaktoren. Die Beteiligung der JNK an der IL-8 Zytokinregulation konnte hingegen für andere pulmonale Pathogene wie z. B. für *H. influenzae* und *S. pneumoniae* nachgewiesen werden (Galdiero et al. 2003; Schmeck et al. 2006a).

Für die Pathogenese der COPD sind die MAPK von entscheidender Bedeutung. Viele der Transkriptionsfaktoren, die bei der Genregulierung inflammatorischer Zytokine mitwirken, werden zuvor von den verschiedenen MAPK aktiviert. Dabei konnte für *H. influenzae* eine IL-8 Sekretion, vergleichbar mit der *M. catarrhalis* induzierten, über die MAPK p38 und ERK1/2 gefunden werden (Wang et al. 2003). An der Aktivierung des bronchialen Epithels durch *S. pneumoniae* konnte die Beteiligung vor allem der MAPK p38 und der JNK nachgewiesen werden, hingegen zeigte sich die MAPK ERK1/2 ohne Bedeutung für die IL-8 und GM-CSF Sekretion (Schmeck et al. 2004; Schmeck et al. 2006a). Zusammenfassend lassen die vorgestellten Ergebnisse mehrerer Studien den Schluss zu, dass die verschiedenen Pathogene des Respirationstraktes ein unterschiedliches Aktivierungsmuster der MAPK für die Generierung einer Immunantwort aufzeigen.

Für den Hauptrisikofaktor bei der Pathogenese der COPD, dem Nikotin, konnte bereits eine Aktivierung der MAPK-Signalwege ERK1/2 und JNK in bronchialen Epithelzellen nachgewiesen werden, ebenso zeigte sich nach der spezifischen Inhibition eine verminderte Zytokinsekretion (Tsai et al. 2006).

Die Aktivierung der MAPK und des Transkriptionsfaktors NF- κ B im Bronchialepithel durch *M. catarrhalis* erfolgte nach der Erkennung dieses Pathogens durch den TLR2 und TLR4. Diese hier aufgezeigten Aktivierungswege werden von den Pathogenen *H. influenzae* und *S. pneumoniae* ebenfalls genutzt (Schmeck et al. 2004; Watanabe et al. 2004; Schmeck et al. 2006b). Dabei konnte die Aktivierung der MAPK sowohl über den TLR2 als auch über den TLR4 gezeigt werden (Schmeck et al. 2004; Lorenz et al. 2005; Mogensen et al. 2006).

5.4 Epigenetische Regulation in bronchialen Epithelzellen bei der Inflammation durch *M. catarrhalis*

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Zytokinsynthese als Folge einer zellulären Abwehrreaktion auf eine Infektion mit Pathogenen nicht nur durch die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege und Transkriptionsfaktoren gesteuert wird, sondern auch von sogenannten epigenetischen Regulationsmechanismen abhängig ist (Barnes et al. 2005). Um die Transkription eines Gens, z. B. eines Zytokins starten zu können, muss zunächst die Histon-DNA-Bindung gelockert werden, damit Transkriptionsfaktoren und der Transkriptionsapparat der Zelle an den entsprechenden Promotor binden können. Im Euchromatin ist die DNA jedoch eng um Histone gewickelt. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass die DNA-Histon-Interaktion durch eine komplexe Modifikation der Histone reguliert wird (Peterson & M.-A. 2004; Barnes et al. 2005). Darüber hinaus unterliegt auch die Bindung der Transkriptionsfaktoren einer Modulation durch verschiedene Enzyme. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass solche epigenetischen Signale wesentlich zur *M. catarrhalis* induzierten Zellaktivierung beitragen.

Bisher konnte in Studien die Kontrolle inflammatorischer Gentranskription durch die lokale Entwindung der nukleosomalen DNA u.a. auf eine Acetylierung spezifischer Lysinreste der Histone H4 und H3 zurückgeführt werden (Barnes et al. 2005). Eine verminderte Acetylierung dieser Histone bzw. eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen acetylierenden Enzymen (HATs) und deacetylierenden Enzymen (HDACs) zugunsten der HDACs führen zu einer festeren Wicklung der DNA um die Histone und somit zu einer verringerten Genexpression.

In verschiedenen Studien konnte nach spezifischer Inhibition der HDACs durch Trichostatin A eine gesteigerte Expression inflammatorischer Gene, wie z. B. von IL-8 nachgewiesen werden (Gilmour et al. 2003; Tomita et al. 2003; Barnes et al. 2005). Die hier gezeigten Ergebnisse lassen die Beteiligung der HDACs an der *M. catarrhalis* induzierten Genexpression erkennen. Nach Einsatz des spezifischen HDAC-Inhibitors TSA kam es zu einer Verstärkung der *M. catarrhalis* induzierten Expression von IL-8. Zusätzlich zeigten die Ergebnisse, dass eine Infektion mit *M. catarrhalis* auch eine Verminderung der Expression und Aktivität der HDAC-1 und HDAC-2 selbst zur Folge hatte. Ito et al konnten kürzlich zeigen, dass die Expression der HDAC-2 in pulmonalem Gewebe von Patienten mit COPD deutlich vermindert ist (Ito et al. 2005). Diese Ergebnisse in Verbindung mit den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen lassen

daher den Schluss zu, dass eine Verminderung der HDAC Expression durch *M. catarrhalis* möglicherweise auch für die Unterhaltung einer chronischen Entzündung bei COPD Patienten von wichtiger Bedeutung sein könnte. Dafür spricht weiterhin, dass in mehreren Publikationen nachgewiesen werden konnte, dass bei COPD Patienten eine Reduktion der HDAC-2 mit der Schwere der Erkrankung korreliert (Ito et al. 2005; Barnes 2006b). Diese wurde in der Studie anhand der Intensität der Inflammation durch die IL-8 Expression und die Anzahl der Entzündungszellen in den Atemwegen bestimmt (Hogg et al. 2004). Weitere untersuchte HDACs wiesen hingegen geringe bis keine Veränderungen in ihrer Aktivität auf (Hogg et al. 2004; Barnes et al. 2005). Ebenfalls zeigten Untersuchungen eine HDAC-2 Reduktion bei Zigarettenrauchern und oxidativem Stress, die eine mögliche Rolle bei der Pathogenese der COPD spielen könnten (Barnes 2006a; Barnes 2006b). Eine Aktivierung der HAT konnte bei der COPD im Vergleich zum Asthma in speziellen Untersuchungen nicht beschrieben werden (Ito et al. 2005).

Untersuchungen, ob eine Reduktion der HDAC auch durch andere für die Pathogenese der COPD wichtige Erreger hervorgerufen werden kann, sind bisher nicht publiziert worden. Allerdings konnten Schmeck et al eine Bakterien induzierte Histonmodifikation durch *Listeria monocytogenes* in humanen Endothelzellen nachweisen (Schmeck et al. 2005). Somit scheint der Induktion der proinflammatorischen Antwort durch die Beeinflussung der HAT/HDAC Balance durch Bakterien für die Pathogenese von Infektionskrankheiten von wichtiger Bedeutung zu sein.

5.5 Die Beeinflussung der Inflammation durch die Pathogenitätsfaktoren UspA1 und UspA2 von *M. catarrhalis*

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Adhäsion des Wildstammes O35E von *M. catarrhalis* an humane konjunktivale Epithelzellen (Chang-Zellen) durch das OMP UspA1 vermittelt wird (Aebi et al. 1998). Eine Mutante dieses Stammes, die kein funktionsfähiges Gen für UspA1 mehr aufwies, zeigte eine deutlich verminderte Adhäsionsfähigkeit an diese Epithelzellen. Auch Antikörper gegen UspA1 führten zu einer Blockade der bakteriellen Adhäsion (Lafontaine et al. 2000). Hingegen konnte in bronchialen Epithelzellen eine solche Adhäsionshemmung durch UspA1 nicht festgestellt werden (Slevogt et al. 2006a). Diese Aussage stützten die Ergebnisse dieser Arbeit, in der der Einsatz der UspA1 depletierten Mutante auf bronchialen Epithelzellen auch zu keiner Veränderung in der Zytokinsekretion im Vergleich zum

Wildstamm führte. Die UspA2 depletierte Mutante hingegen zeigte eine signifikante Reduktion in der IL-8 und GM-CSF Sekretion. Es scheint, dass dieses Oberflächenmolekül somit nicht nur an der Komplementresistenz beteiligt ist, sondern auch an der Adhäsion bzw. der Signalübertragung der BEAS-2B Zellen eine Rolle spielt. Zur Analyse des Einflusses des *M. catarrhalis* spezifischen UspA2 sind weiterführende Untersuchungen notwendig, die auch eine Identifikation eines Rezeptors auf der zellulären Oberfläche der Epithelzellen mit-einschliessen sollte.

5.6 Der Einfluss der Viabilität von *M. catarrhalis* auf die Aktivierung des Bronchialepithels

Nach der Inkubation der BEAS-2B Zellen mit einer Hitze- bzw. UV-Licht inaktivierten Bakteriensuspension zeigte sich im Zellüberstand eine signifikant verminderte IL-8 Sekretion. Daraus lässt sich ableiten, dass die Viabilität von *M. catarrhalis* für die Generierung einer zellulären Immunantwort entscheidend ist.

Interessanterweise kam es durch Inkubation von Bakterien, die mit UV-Licht vorbehandelt und dadurch abgetötet wurden, zu einer geringeren Reduktion der IL-8 Sekretion als nach Abtötung der Bakterien durch Hitze. Während eine Abtötung der Bakterien mit UV-Licht unter Erhalt der molekularen Strukturen, insbesondere der Proteine, erreicht werden kann, führt eine Abtötung der Bakterien durch Hitze zu einer Denaturierung der bakteriellen Oberflächenmembranproteine (Slevogt et al. 2006a). Durch die Einwirkung von UV-Licht kommt es zu ausgedehnten strukturellen Veränderungen der DNA, was eine Unterbrechung der Proteinsynthese sowie der Replikation und damit eine Abtötung der Bakterien zur Folge hat. Die gewonnenen Ergebnisse sind daher hinweisend dafür, dass sowohl proteinhaltige Molekülstrukturen von *M. catarrhalis* als auch das hitzestabile LOS für die Pathogenerkennung mit anschließender Induktion einer inflammatorischen Immunantwort von großer Bedeutung sind. In Übereinstimmung zu diesen Daten konnte Fink et al kürzlich zeigen, dass es nach einer Hitzeinaktivierung von *M. catarrhalis* Stämmen zu einer verminderten Induktion der Zytokine IL-8 und IL-6 in A549 Zellen kommt (Fink et al. 2006). Die verbliebene durch hitzeinaktivierte *M. catarrhalis* Stämme induzierte Zytokinsekretion der Zellen, die sich sowohl in A549 Zellen als auch in BEAS-2B Zellen nachweisen ließ, beruht vermutlich auf der Erkennung von hitzestabilen Oberflächenmolekülen. Bekanntester Vertreter dieser bakteriellen Molekülgruppe ist das hitzestabile LPS gramnegativer Bakterien. Dieses ist in ähnlicher Form als LOS bei

M. catarrhalis nachweisbar und induzierte, wie in dieser Studie gezeigt wurde, über den TLR4 eine inflammatorische Immunantwort. Weiterhin konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass *M. catarrhalis* nach Hitzebehandlung eine verminderte Adhäsion an BEAS-2B Zellen aufweist (Slevogt et al. 2006a). Die Adhäsionsfähigkeit von Erregern wird allgemein als ein wichtiger Virulenzfaktor von Bakterien angesehen (Sethi & Murphy 2001). Diese ermöglicht ihnen das Haften an den Wirtszellen, welches dann meist eine inflammatorische Immunantwort zur Folge hat. Es ist möglich, dass diese Adhäsionsverminderung von *M. catarrhalis* einen entscheidenden Anteil an der verminderten Zytokinantwort der Zellen haben könnte, und damit für die Initiierung einer Infektion durch *M. catarrhalis* eine wichtige Rolle spielen dürfte.

5.7 Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Studie gezeigten Ergebnisse geben wichtige Hinweise auf die molekularen Mechanismen der Pathogenerkennung von *M. catarrhalis* und der Generierung einer proinflammatorischen Immunantwort durch das Bronchialepithel. Zusammenfassend sind die Ergebnisse im folgenden Schema dargestellt.

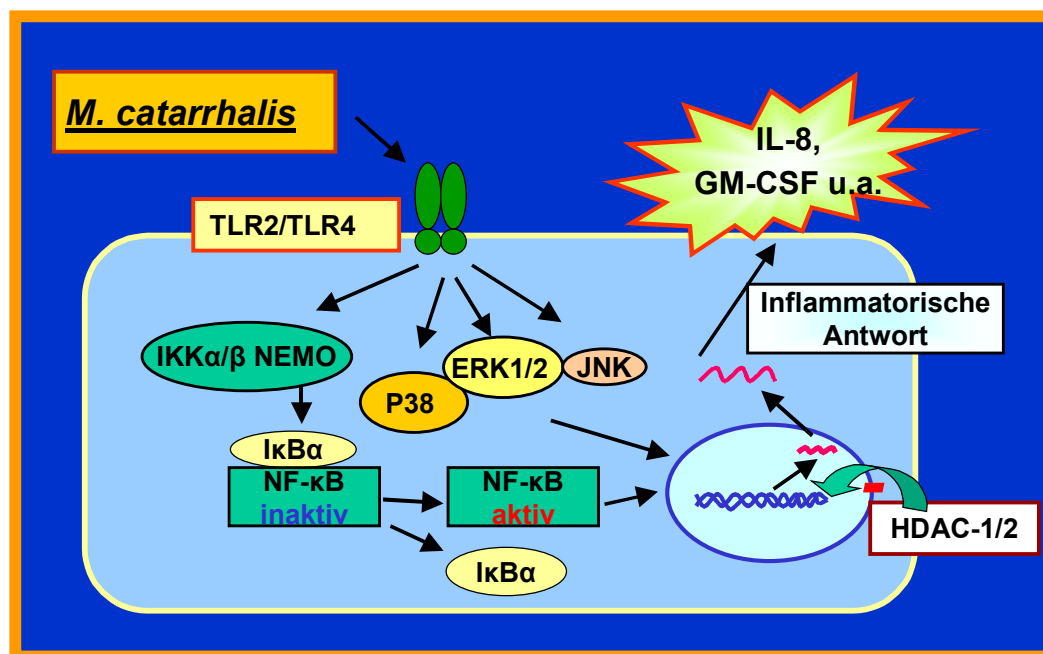


Abb. 30: Beteiligte Signalkaskaden und Einflüsse der *M. catarrhalis* induzierten Immunantwort in bronchialen Epithelzellen

Quelle: eigene Darstellung

Wie in Abb. 30 dargestellt, erfolgt eine Pathogenerkennung von *M. catarrhalis* durch TLR2 und TLR4, zwei der zentralen PRRs der angeborenen Immunität, die der Erkennung bakterieller Molekülstrukturen dienen. Die intrazelluläre Signaltransduktion erfolgte anschließend über die Aktivierung von MAPK, speziell der ERK1/2, der p38 und der JNK, sowie über die Aktivierung von NF- κ B. Zusätzlich konnte eine durch *M. catarrhalis* beeinflussbare Steuerung der epigenetischen Genregulation des IL-8 Gens nachgewiesen werden. Dabei führte eine durch *M. catarrhalis* induzierte verminderte HDAC Expression und Aktivität zu einer verstärkten inflammatorischen Zytokinexpression. Weiterhin konnte die Expression und Sekretion zahlreicher weiterer durch eine Infektion mit *M. catarrhalis* induzierter Zytokine und Chemokine identifiziert werden, die in dieser Abbildung nicht dargestellt sind.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit untersuchten durch *M. catarrhalis* induzierten Zytokine und Chemokine und ihrer Expression zugrundeliegenden aktivierten Signaltransduktionswege könnten einen Beitrag für die Entwicklung neuer Therapieansätze für die Behandlung von Patienten mit COPD leisten. Es ist zum Beispiel theoretisch denkbar, dass eine chronische Inflammation u. a. durch die Inhibition der Expression von IL-8 erreicht werden könnte, welches möglicherweise ein vermindertes Rekrutment und eine verminderte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zur Folge hätte. In klinischen Studien kamen bereits Antikörper gegen IL-8 zur Anwendung, deren Wirksamkeit nicht zu dem gewünschten Therapieerfolg geführt haben, wahrscheinlich aufgrund der Vielzahl weiterer an der chronischen Inflammation beteiligten Zytokine und Chemokine (Yang et al. 1999; Barnes & Hansel 2004; Mahler et al. 2004). Eine Blockade der gleichzeitig durch verschiedene Chemokine aktivierten Rezeptoren, die weiterhin auf vielen Zellen z. B. Epithelzellen, Monozyten etc. nachweisbar sind, bietet aufgrund der größeren Inhibitionswirkung einen weiteren interessanten Ansatzpunkt für eine Therapie zur Unterdrückung der Inflammation (Barnes 2004).

Fragen über eine Beteiligung weiterer TLR oder die Bedeutung der Bildung von Heterodimeren durch TLR2 an der durch *M. catarrhalis* induzierten Aktivierung der bronchialen Epithelzellen werden derzeit von der betreuenden Arbeitsgruppe bearbeitet. Eine auf die hier gezeigte Pathogenerkennung von *M. catarrhalis* durch TLR2 und TLR4 aufbauende Therapiestrategie könnte die Entwicklung und der Einsatz von TLR Antagonisten sein. Diese könnten möglicherweise durch eine kompetitive

Hemmung die Bindung von *M. catarrhalis* an die PRR verhindern und somit zu einer Reduktion der chronischen Inflammation beitragen. Im Hinblick auf die vorwiegend bakteriell bedingten Exazerbationen der COPD könnte in Zukunft möglicherweise mit Hilfe von TLR Agonisten eine Verbesserung der Impfeffektivität über eine Immunmodulation erreicht werden. Erste synthetische TLR4 Agonisten befinden sich als Impfzusatz bereits im klinischen Einsatz (Chaudhuri et al. 2005; Cluff et al. 2005; Alderson et al. 2006).

Die gezielte Inhibition einzelner MAPK bietet einen weiteren Ansatzpunkt zur Verminderung der chronischen Inflammation bei Patienten mit COPD, die wie hier gezeigt durch *M. catarrhalis* deutlich verstärkt werden kann. Erste Ergebnisse aus klinischen Studien in Phase 2 und 3 haben eine erfolgreiche Reduktion der Zytokinausschüttung nach Gabe eines p38 MAPK bzw. eines JNK Inhibitors zeigen können, die mit ersten klinischen Verbesserungen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen einhergingen (Adcock et al. 2006).

Für den Transkriptionsfaktor NF- κ B, für den bei Patienten mit COPD eine verstärkte Kernlokalisierung durch Di Stefano et al nachgewiesen wurde (Di Stefano et al. 2002) und deren Aktivierung induziert durch *M. catarrhalis* in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sind verschiedene Ansätze zur Reduktion denkbar. Zum Beispiel könnte durch eine Inhibition beteiligter Vorgänge an der zytosolischen Degradation von I κ B α , welche Bedingung für die Freisetzung und Translokation von NF- κ B in den Zellkern ist, eine Unterdrückung der Expression und somit eine Verminderung der Inflammation erreicht werden (Barnes & Hansel 2004). Derzeitige experimentelle Therapieversuche mit spezifischen Inhibitoren führten aufgrund der weitreichenden Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an verschiedenen Zellprozessen jedoch zu unerwünschten Wirkungen (Adcock et al. 2006).

Weiterhin wäre es von besonderem Interesse zu untersuchen, inwieweit neben der Erkennung von *M. catarrhalis* und *H. influenzae* über die TLR der angeborenen Immunität weitere TLR unabhängige Signalwege für die Aktivierung der Zellen von Bedeutung sind, z. B. intrazytoplasmatische PRR (Ratner et al. 2005; Akira et al. 2006). Ihre Signalkaskaden sind jedoch bisher nicht vollständig verstanden und bedürfen in Zukunft weiterer Forschung.

Interessanterweise konnten Ratner et al zeigen, dass es durch die zeitgleiche Kolonisierung des Bronchialepithels durch die pulmonalen pathogenen Erreger *S. pneumoniae* und *H. influenzae* zu einer potenzierenden Beeinträchtigung der

angeborenen Immunantwort des Bronchialepithels kommt, welche wiederum einer Koinfektion mit weiteren Erregern Vorschub leistet (Ratner et al. 2005). Diese Wechselwirkungen spielen möglicherweise auch bei Infektionen mit *M. catarrhalis* eine Rolle. Aufschluss darüber könnten Experimente mit bronchialen Epithelzellen geben, die kombinierte Infektionen der oben genannten Pathogene bzw. ihrer Virulenzfaktoren im Hinblick auf die resultierende synergistische IL-8 Zytokinproduktion untersuchen.

Darüber hinaus wäre zu klären, welche Rolle der Histonmodifikationen an der Regulation und Orchestrierung einer Immunantwort in humanen Zellen zukommt und ob es zell- oder erregerspezifische Unterschiede bei ihrer Regulation gibt. Angesichts der Tatsache, dass es eine große Anzahl in dieser Arbeit nicht untersuchter HDACs und HATs gibt, die möglicherweise ebenfalls einen Einfluss auf die Regulation der Histonmodifikation bronchialer Epithelzellen ausüben, wäre es interessant zu untersuchen, in wieweit diese Prozesse durch eine Infektion mit *M. catarrhalis* beeinflusst werden.

Bei *M. catarrhalis* handelt es sich um einen rein humanpathogenen Erreger. Um die Bedeutung dieses Pathogens beim Menschen näher zu untersuchen wäre es wichtig die Experimente auch auf primäre humane Bronchialepithelzellen auszudehnen, und sie gegebenenfalls mit klinischen Daten von COPD Patienten in Beziehung zu setzen.

Weitere Fragen ergeben sich hinsichtlich der Empfänglichkeit für *M. catarrhalis* Infektionen durch genetische Faktoren, die möglicherweise von großer Bedeutung sind und bei eventueller Erforschung als weitere Möglichkeit eines therapeutischen Ansatzes dienen könnten.

Außerdem besteht der Versuch durch bestimmte Medikamente die Nikotinsucht bei Patienten mit COPD zu verringern (Barnes & Hansel 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *M. catarrhalis* in der Lage ist, eine inflammatorische Immunantwort nach der Infektion in bronchialen Epithelzellen auszulösen. Daher kommt diesem Erreger möglicherweise eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der COPD zu. Für die Entwicklung neuer wirksamer Therapieformen bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen, um die weitreichenden Interaktionen dieses Erregers mit dem Respirationstrakt zu erkennen und zu verstehen.

6 Literaturverzeichnis

- ABREU, M. T., ARDITI, M. (2004) Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research. *Journal of Pediatrics* 144: 421-429
- ADCOCK, I. M., CHUNG, K. F., CARAMORI, G., ITO, K. (2006) Kinase inhibitors and airway inflammation. *European Journal of Pharmacology* 533: 118-132
- ADEREM, A., ULEVITCH, R. J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787
- AEBI, C., LAFONTAINE, E. R., COPE, L. D., LATIMER, J. L., LUMBLEY, S. L., MCCracken, G. H., JR., HANSEN, E. J. (1998) Phenotypic Effect of Isogenic *uspA1* and *uspA2* Mutations on *Moraxella catarrhalis* 035E. *Infect. Immun.* 66: 3113-3119
- AKIRA, S., UEMATSU, S., TAKEUCHI, O. (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124: 783-801
- ALDERSON, M., MCGOWAN, P., BALDRIDGE, J. R., PROBST, P. (2006) TLR4 agonists as immunomodulatory agents. *Journal of Endotoxin Research* 12: 313-319
- ANDERSON, K. V., BOKLA, L., NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1985a) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42: 791-798
- ANDERSON, K. V., JURGENS, G., NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1985b) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42: 779-789
- BAEUERLE, P., BALTIMORE, D. (1988) I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 242: 540-546
- BARNES, P. J. (2004) Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol Rev* 56: 515-548
- BARNES, P. J. (2006a) How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *148*: 245-254
- BARNES, P. J. (2006b) Reduced Histone Deacetylase in COPD: Clinical Implications. *Chest* 129: 151-155
- BARNES, P. J., HANSEL, T. T. (2004) Prospects for new drugs for chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 364: 985-996
- BARNES, P. J., STOCKLEY, R. A. (2005) COPD: current therapeutic interventions and future approaches. *Eur Respir J* 25: 1084-1106
- BARNES, P. J., SHAPIRO, S. D., PAUWELS, R. A. (2003) Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 22: 672-688
- BARNES, P. J., ADCOCK, I. M., ITO, K. (2005) Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 25: 552-563
- BEUTLER, B. (2004) Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* 40: 845-859
- CHAUDHURI, N., DOWER, S. K., WHYTE, M. K. B., SABROE, I. (2005) Toll-like receptors and chronic lung disease. *Clinical Science* 109: 125-133
- CHEN, L.-F., GREENE, W. C. (2004) Shaping the nuclear action of NF-[kappa]B. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 392-401
- CHUNG, K. F. (2001) Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 18: 50S-59

- CLEMANS, D. L., BAUER, R. J., HANSON, J. A., HOBBS, M. V., ST. GEME, J. W., III, MARRS, C. F., GILSDORF, J. R. (2000) Induction of Proinflammatory Cytokines from Human Respiratory Epithelial Cells after Stimulation by Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 68: 4430-4440
- Cluff, C. W., Baldrige, J. R., Stover, A. G., Evans, J. T., Johnson, D. A., Lacy, M. J., Clawson, V. G., Yorgensen, V. M., Johnson, C. L., Livesay, M. T., Hershberg, R. M., Persing, D. H. (2005) Synthetic Toll-Like Receptor 4 Agonists Stimulate Innate Resistance to Infectious Challenge. *Infect. Immun.* 73: 3044-3052
- COHN, L. (2006) Mucus in chronic airway diseases: sorting out the sticky details. *J. Clin. Invest.* 116: 306-308
- DI STEFANO, A., CAPELLI, A., DONNER, C. F. (2004a) Role of Interleukin-8 in the Pathogenesis and Treatment of COPD. *Chest* 126: 676-678
- DI STEFANO, A., CARAMORI, G., RICCIARDOLO, F. L. M., CAPELLI, A., ADCOCK, I. M., DONNER, C. F. (2004b) Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clinical & Experimental Allergy* 34: 1156-1167
- DI STEFANO, A., CARAMORI, G., OATES, T., CAPELLI, A., LUSUARDI, M., GNEMMI, I., IOLI, F., CHUNG, K. F., DONNER, C. F., BARNES, P. J., ADCOCK, I. M. (2002) Increased expression of nuclear factor- κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 20: 556-563
- ENRIGHT, M. C., MCKENZIE, H. (1997) *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* - clinical and molecular aspects of a rediscovered pathogen. *Journal of Medical Microbiology* 46: 360-371
- ERRIDGE, C., BENNETT-GUERRERO, E., POXTON, I. R. (2002) Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection* 4: 837-851
- FINK, J., MATHABA, L. T., STEWART, G. A., GRAHAM, P. T., STEER, J. H., JOYCE, D. A., MCWILLIAM, A. S. (2006) *Moraxella catarrhalis* stimulates the release of proinflammatory cytokines and prostaglandin E2 from human respiratory epithelial cells and monocyte-derived macrophages. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 46: 198-208
- FROSCH, P., KOLLE, W. (1896) Die Mikrokokken. In C. Flugge (ed.), *Die Mikroorganismen*, Verlag von Vogel, Leipzig 2: 154-155
- FURIHATA, K., SATO, K., MATSUMOTO, H. (1995) Construction of A Combined NotI/SmaI Physical and Genetic-Map of *Moraxella (Branhamella) Catarrhalis* Strain Atcc25238. *Microbiology and Immunology* 39: 745-751
- GALDIERO, S., CAPASSO, D., VITIELLO, M., D'ISANTO, M., PEDONE, C., GALDIERO, M. (2003) Role of Surface-Exposed Loops of *Haemophilus influenzae* Protein P2 in the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *Infect. Immun.* 71: 2798-2809
- GILMOUR, P. S., RAHMAN, I., DONALDSON, K., MACNEE, W. (2003) Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L533-540
- GOLD. (2005) Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: An Asia-Pacific perspective. *Respirology* 10: 9-17

- GONZALES, L. W., GUTTENTAG, S. H., WADE, K. C., POSTLE, A. D., BALLARD, P. L. (2002) Differentiation of human pulmonary type II cells in vitro by glucocorticoid plus cAMP. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L940-951
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C., NAIRN, R. (1977) Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol* 36: 59-72
- GREENE, C. M., CARROLL, T. P., SMITH, S. G. J., TAGGART, C. C., DEVANEY, J., GRIFFIN, S., O'NEILL, S. J., MCELVANEY, N. G. (2005) TLR-Induced Inflammation in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *J Immunol* 174: 1638-1646
- GU, X.-X., CHEN, J., BARENKAMP, S. J., ROBBINS, J. B., TSAI, C.-M., LIM, D. J., BATTEY, J. (1998) Synthesis and Characterization of Lipooligosaccharide-Based Conjugates as Vaccine Candidates for *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Infect. Immun.* 66: 1891-1897
- GUILLOT, L., MEDJANE, S., LE-BARILLEC, K., BALLOY, V., DANIEL, C., CHIGNARD, M., SI-TAHAR, M. (2004) Response of Human Pulmonary Epithelial Cells to Lipopolysaccharide Involves Toll-like Receptor 4 (TLR4)-dependent Signaling Pathways: Evidence For An Intracellular Compartmentalization Of TLR4. *J. Biol. Chem.* 279: 2712-2718
- HAUBER, H., TULIC, M., TSICOPOULOS, A., WALLAERT, B., OLIVENSTEIN, R., DAIGNEAULT, P., HAMID, Q. (2005) Toll-like receptors 4 and 2 expression in the bronchial mucosa of patients with cystic fibrosis. *Canadian respiratory journal* 12: 13-18
- HAYDEN, M. S., GHOSH, S. (2004) Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* 18: 2195-2224
- HOEBE, K., JANSSEN, E., BEUTLER, B. (2004) The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 5: 971-974
- HOFFMANN, E., DITTRICH-BREIHZOL, O., HOLTMANN, H., KRACHT, M. (2002) Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 72: 847-855
- HOGG, J. C. (2004) Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 364: 709-721
- Hogg, J. C., Chu, F., Utokaparch, S., Woods, R., Elliott, W. M., Buzatu, L., Cherniack, R. M., Rogers, R. M., Sciurba, F. C., Coxson, H. O., Pare, P. D. (2004) The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 350: 2645-2653
- HOLME, T., RAHMAN, M., JANSSON, P.-E., WIDMALM, G. (1999) The lipopolysaccharide of *Moraxella catarrhalis*. Structural relationships and antigenic properties. *European Journal of Biochemistry* 265: 524-529
- HU, W.-G., CHEN, J., MCMICHAEL, J. C., GU, X.-X. (2001) Functional Characteristics of a Protective Monoclonal Antibody against Serotype A and C Lipooligosaccharides from *Moraxella catarrhalis*. *Infect. Immun.* 69: 1358-1363
- ITO, K., ITO, M., ELLIOTT, W. M., COSIO, B., CARAMORI, G., KON, O. M., BARCZYK, A., HAYASHI, S., ADCOCK, I. M., HOGG, J. C., BARNES, P. J. (2005) Decreased Histone Deacetylase Activity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 352: 1967-1976
- JANSSENS, S., BEYAERT, R. (2003) Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 637-646

- KARALUS, R., CAMPAGNARI, A. (2000) *Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen. *Microbes and Infection* 2: 547-559
- KELLER, R., GUSTAFSON, J., KEIST, R. (1992) The macrophage response to bacteria. Modulation of macrophage functional activity by peptidoglycan from *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Clin. Exp. Immunology* 89: 384-389
- KUMAR, S., BOEHM, J., LEE, J. C. (2003) p38 MAP Kinases: Key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 2: 717-726
- LAFONTAINE, E. R., COPE, L. D., AEBI, C., LATIMER, J. L., MCCRACKEN, G. H., JR., 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. *J. Bacteriol.* 182: 1364-1373
- 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. *Cell* 86: 973-983
- LI, J., KARTHA, S., IASVOVSKAIA, S., TAN, A., BHAT, R. K., MANALIGOD, J. M., PAGE, K., BRASIER, A. R., HERSHENSON, M. B. (2002) Regulation of human airway epithelial cell IL-8 expression by MAP kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L690-699
- LIN, H.-Y., CHEN, C.-S., LIN, S.-P., WENG, J.-R., CHEN, C.-S. (2006) Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Medicinal Research Reviews* 26: 397-413
- LOPEZ, A. D., MATHERS, C. D. (2006) Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 100: 481-499
- LORENZ, E., CHEMOTTI, D. C., JIANG, A. L., MCDUGAL, L. D. (2005) Differential Involvement of Toll-Like Receptors 2 and 4 in the Host Response to Acute Respiratory Infections with Wild-Type and Mutant *Haemophilus influenzae* Strains. *Infect. Immun.* 73: 2075-2082
- MACNEE, W. (2005) Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2: 258-266
- MAHLER, D. A., HUANG, S., TABRIZI, M., BELL, G. M. (2004) Efficacy and Safety of a Monoclonal Antibody Recognizing Interleukin-8 in COPD: A Pilot Study. *Chest* 126: 926-934
- MARTIN, T. R., FREVERT, C. W. (2005) Innate Immunity in the Lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2: 403-411
- MAY, M. J., D'ACQUISTO, F., MADGE, L. A., GLOCKNER, J., POBER, J. S., GHOSH, S. (2000) Selective Inhibition of NF-kappa B Activation by a Peptide That Blocks the Interaction of NEMO with the Ikappa B Kinase Complex. *Science* 289: 1550-1554
- MCMICHAEL, J. C. (2000) Progress toward the development of a vaccine to prevent *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* infections. *Microbes and Infection* 2: 561-568
- MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. (2000) The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology* 8: 452-456

- MIOTTO, D., RUGGIERI, M. P., BOSCHETTO, P., CAVALLESKO, G., PAPI, A., BONONI, I., PIOLA, C., MURER, B., FABBRI, L. M., MAPP, C. E. (2003) Interleukin-13 and -4 expression in the central airways of smokers with chronic bronchitis. *Eur Respir J* 22: 602-608
- MOGENSEN, T. H., PALUDAN, S. R., KILIAN, M., OSTERGAARD, L. (2006) Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *J Leukoc Biol* 80: 267-277
- MUEGGE, K. (2002) Preparing the target for the bullet. *Nat Immunol* 3: 16-17
- MURPHY, T. F., SETHI, S., NIEDERMAN, M. S. (2000) The Role of Bacteria in Exacerbations of COPD : A Constructive View. *Chest* 118: 204-209
- MURPHY, T. F., BRAUER, A. L., GRANT, B. J. B., SETHI, S. (2005) *Moraxella catarrhalis* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Burden of Disease and Immune Response. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172: 195-199
- Nowak, D., Dietrich, E. S., Oberender, P., Überla, K., Reitberger, U., Schlegel, C., Albers, F., Ruckdäschel, S., Welsch, R. (2004) Krankheitskosten von COPD in Deutschland. *Pneumologie* 58: 837-844
- OPITZ, B., FORSTER, S., HOCKE, A. C., MAASS, M., SCHMECK, B., HIPPENSTIEL, S., SUTTORP, N., KRULL, M. (2005) Nod1-Mediated Endothelial Cell Activation by *Chlamydia pneumoniae*. *Circ Res* 96: 319-326
- OPITZ, B., PUSCHEL, A., SCHMECK, B., HOCKE, A. C., ROSSEAU, S., HAMMERSCHMIDT, S., SCHUMANN, R. R., SUTTORP, N., HIPPENSTIEL, S. (2004) Nucleotide-binding Oligomerization Domain Proteins Are Innate Immune Receptors for Internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 279: 36426-36432
- 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. *Thorax* 57: 759-764
- PAUWELS, R. A., BUIST, A. S., CALVERLEY, P. M. A., JENKINS, C. R., HURD, S. S. (2001) Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop Summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163: 1256-1276
- PENG, D., HONG, W., CHOUDHURY, B. P., CARLSON, R. W., GU, X.-X. (2005) *Moraxella catarrhalis* Bacterium without Endotoxin, a Potential Vaccine Candidate. *Infect. Immun.* 73: 7569-7577
- PETERSON, C. L., M.-A., L. (2004) Histones and histone modifications. *Curr Biol.*: R546-R551
- PETTERSEN, C. A., ADLER, K. B. (2002) Airways Inflammation and COPD* : Epithelial-Neutrophil Interactions. *Chest* 121: 142S-150
- PILETTE, C., GODDING, V., KISS, R., DELOS, M., VERBEKEN, E., DECAESTECKER, C., DE PAEPE, K., VAERMAN, J.-P., DECRAMER, M., SIBILLE, Y. (2001) Reduced Epithelial Expression of Secretory Component in Small Airways Correlates with Airflow Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163: 185-194
- PUDDICOMBE, S. M., DAVIES, D. E. (2000) The role of MAP kinases in intracellular signal transduction in bronchial epithelium. *Clinical & Experimental Allergy* 30: 7-11

- RATNER, A. J., LYSENKO, E. S., PAUL, M. N., WEISER, J. N. (2005) Synergistic proinflammatory responses induced by polymicrobial colonization of epithelial surfaces. *PNAS* 102: 3429-3434
- REDDEL, R., KE, Y., GERWIN, B., MCMENAMIN, M., LECHNER, J., SU, R., BRASH, D., PARK, J., RHIM, J., HARRIS, C. (1988) Transformation of human bronchial epithelial-cell by infection with Sv40 Or adenovirus-12 Sv40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing Sv40 early region genes. *Cancer Res.* 48: 1904-1909
- ROLOFF, T. C., NUBER, U. A. (2005) Chromatin, epigenetics and stem cells. *Eur J of Cell Biology* 84: 123-135
- ROOS-ENGSTRAND, E., WALLIN, A., BUCHT, A., POURAZAR, J., SANDSTROM, T., BLOMBERG, A. (2005) Increased expression of p38 MAPK in human bronchial epithelium after lipopolysaccharide exposure. *Eur Respir J* 25: 797-803
- ROUX, P. P., BLENIS, J. (2004) ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 320-344
- SABROE, I., WHYTE, M. K. B., WILSON, A. G., DOWER, S. K., HUBBARD, R., HALL, I. (2004) Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms and COPD. *Thorax* 59: 81-a
- SACCANI, S., PANTANO, S., NATOLI, G. (2002) p38-dependent marking of inflammatory genes for increased NF- κ B recruitment. *Nat Immunol* 3: 69-75
- SCHMECK, B., MOOG, K., ZAHLTEN, J., VAN LAAK, V., N'GUESSAN, P., OPITZ, B., ROSSEAU, S., SUTTORP, N., HIPPENSTIEL, S. (2006a) Streptococcus pneumoniae induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1 -dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. *Respiratory Research* 7: 98
- Schmeck, B., Beermann, W., van Laak, V., Zahlten, J., Opitz, B., Witzenrath, M., Hocke, A. C., Chakraborty, T., Kracht, M., Rosseau, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S. (2005) Intracellular Bacteria Differentially Regulated Endothelial Cytokine Release by MAPK-Dependent Histone Modification. *J Immunol* 175: 2843-2850
- Schmeck, B., Huber, S., Moog, K., Zahlten, J., Hocke, A. C., Opitz, B., Hammerschmidt, S., Mitchell, T. J., Kracht, M., Rosseau, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S. (2006b) Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF- κ B-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L730-737
- Schmeck, B., Zahlten, J., Moog, K., van Laak, V., Huber, S., Hocke, A. C., Opitz, B., Hoffmann, E., Kracht, M., Zerrahn, J., Hammerschmidt, S., Rosseau, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S. (2004) Streptococcus pneumoniae-induced p38 MAPK-dependent Phosphorylation of RelA at the Interleukin-8 Promotor. *J. Biol. Chem.* 279: 53241-53247
- SCHRÖDER, N. W. J., SCHUMANN, R. R. (2005) Non-LPS targets and actions of LPS binding protein (LBP). *Journal of Endotoxin Research* 11: 237-242
- SCHRÖDER, N. W. J., HEINE, H., ALEXANDER, C., MANUKYAN, M., ECKERT, J., HAMANN, L., GOBEL, U. B., SCHUMANN, R. R. (2004) Lipopolysaccharide Binding Protein Binds to Triacylated and Diacylated Lipopeptides and Mediates Innate Immune Responses. *J Immunol* 173: 2683-2691

- SCHULZ, C., FARKAS, L., WOLF, K., KRÄTZEL, K., EISSNER, G., PFEIFFER, M. (2002) Differences in LPS-Induced Activation of Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B) and Type II-Like Pneumocytes (A-549). *Scandinavian Journal of Immunology* 56: 294-302
- SCHULZ, C., WOLF, K., HARTH, M., KRÄTZEL, K., KUNZ-SCHUGHART, L., PFEIFER, M. (2003) Expression and Release of Interleukin-8 by Human Bronchial Epithelial Cells from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Smokers, and Never-Smokers. *Respiration* 70: 254-261
- SEN, R., BALTIMORE, D. (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46(5): 705-716
- SETHI, S. (2005) Pathogenesis and Treatment of Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 26: 192-203
- SETHI, S., MURPHY, T. F. (2001) Bacterial Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease in 2000: a State-of-the-Art Review. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 336-363
- SETHI, S., ANZUETO, A., FARREL, D. J. (2005) Antibiotic activity of telithromycin and comparators against bacterial pathogens isolated from 3,043 patients with acute exacerbation of chronic bronchitis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*
- SETHI, S., EVANS, N., GRANT, B. J. B., MURPHY, T. F. (2002) New Strains of Bacteria and Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 347: 465-471
- SETHI, S., MUSCARELLA, K., EVANS, N., KLINGMAN, K. L., GRANT, B. J. B., MURPHY, T. F. (2000) Airway Inflammation and Etiology of Acute Exacerbations of Chronic Bronchitis. *Chest* 118: 1557-1565
- SHA, Q., TRUONG-TRAN, A. Q., PLITT, J. R., BECK, L. A., SCHLEIMER, R. P. (2004) Activation of Airway Epithelial Cells by Toll-Like Receptor Agonists. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31: 358-364
- SHUTO, T., XU, H., WANG, B., HAN, J., KAI, H., GU, X.-X., MURPHY, T. F., LIM, D. J., LI, J.-D. (2001) Activation of NF-kappa B by nontypeable *Hemophilus influenzae* is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKKalpha /beta - I kappa Balpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *PNAS* 98: 8774-8779
- SLEVOGT, H., TIWARI, K. N., SCHMECK, B., HOCKE, A., OPITZ, B., SUTTORP, N., SEYBOLD, J. (2006a) Adhesion of *Moraxella catarrhalis* to human bronchial epithelium characterized by a novel fluorescence-based assay. *Medical Microbiology and Immunology* 195: 73-83
- Slevogt, H., Seybold, J., Tiwari, K. N., Hocke, A. C., Jonatat, C., Dietel, S., Hippenstiel, S., Singer, B. B., Bachmann, S., Suttorp, N., Opitz, B. (2006b) *Moraxella catarrhalis* is internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and initiates a TLR2- and partly NOD1-dependent inflammatory immune response. *Cellular Microbiology* 9: 694-707
- Slevogt, H., Schmeck, B., Jonatat, C., Zahlten, J., Beermann, W., van Laak, V., Opitz, B., Dietel, S., N'Guessan, P. D., Hippenstiel, S., Suttorp, N., Seybold, J. (2006c) *Moraxella catarrhalis* induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF- κ B activation and histone deacetylase activity reduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L818-826

- STRIETER, R. M. (2002) Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L688-689
- TAKANASHI, S., HASEGAWA, Y., KANEHIRA, Y., YAMAMOTO, K., FUJIMOTO, K., SATOH, K., OKAMURA, K. (1999) Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J* 14: 309-314
- TAKEDA, K., AKIRA, S. (2003) Toll receptors and pathogen resistance. *Cellular Microbiology* 5: 143-153
- TOBIAS, P. S., SOLDAU, K., GEGNER, J. A., MINTZ, D., ULEVITCH, R. J. (1995) Lipopolysaccharide Binding Protein-mediated Complexation of Lipopolysaccharide with Soluble CD14. *J. Biol. Chem.* 270: 10482-10488
- TOMITA, K., BARNES, P. J., ADCOCK, I. M. (2003) The effect of oxidative stress on histone acetylation and IL-8 release. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301: 572-577
- TRAVASSOS, L. H., GIARDIN, S. E., PHILPOTT, D. J., BLANOT, D., BONECA, I. G. (2004) Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *European Molecular Biology Organization* 5: 1000-1006
- TRINCHIERI, G., SHER, A. (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7: 179-190
- TSAI, J.-R., CHONG, I.-W., CHEN, C.-C., LIN, S.-R., SHEU, C.-C., HWANG, J.-J. (2006) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Was Significantly Activated in Human Bronchial Epithelial Cells by Nicotine. *DNA and Cell Biology* 25: 312-322
- UNHANAND, M., MACIVER, I., RAMILO, O. (1992) Pulmonary Clearance of *Moraxella-Catarrhalis* in An Animal-Model. *Journal of Infectious Diseases* 165: 644-650
- VERDUIN, C. M., HOL, C., FLEER, A., VAN DIJK, H., VAN BELKUM, A. (2002) *Moraxella catarrhalis*: from Emerging to Established Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 125-144
- WANG, B., CLEARY, P. P., XU, H., LI, J.-D. (2003) Up-Regulation of Interleukin-8 by Novel Small Cytoplasmic Molecules of Nontypeable *Haemophilus influenzae* via p38 and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways. *Infect. Immun.* 71: 5523-5530
- WATANABE, T., JONO, H., HAN, J., LIM, D. J., LI, J.-D. (2004) Synergistic activation of NF- κ B by nontypeable *Haemophilus influenzae* and tumor necrosis factor α . *PNAS* 101: 3563-3568
- WEBER, J. R., FREYER, D., ALEXANDER, C., SCHRÖDER, N. W. J., REISS, A., KÜSTER, C., PFEIL, D., TUOMANEN, E., SCHUMANN, R. R. (2003) Recognition of Pneumococcal Peptidoglycan: An Expanded, Pivotal Role for LPS Binding Protein. *Cell* 19: 269-279
- WORTH, H., BUHL, R., CEGLA, U., CRIÉE, C. P., GILLISSEN, A., KARDOS, P., KÖHLER, D., MAGNUSSEN, H., MEISTER, R., NOWAK, D. (2002) Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungemphysem (COPD). *Pneumologie* 56: 704-738
- YANG, X., CORVALAN, J., WANG, P., ROY, C., DAVIS, C. (1999) Fully human anti-interleukin-8 monoclonal antibodies: potential therapeutics for the treatment of inflammatory disease states. *J Leukoc Biol* 66: 401-410

7 Anhang

7.1 Publikationsverzeichnis

7.1.1 Originalarbeiten

“*Moraxella catarrhalis* induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction”, Slevogt H., Schmeck B., **Jonat C.**, Zahlten J., van Laak V., N’Guesson P., Opitz B., Hippenstiel S., Suttorp N., Seybold J.; 2006 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290: L818-826

“*Moraxella catarrhalis* is internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and initiates a TLR2- and partly NOD1-dependent inflammatory immune response.”; Slevogt H., Seybold J., Tiwari KN., Hocke AC., **Jonat C.**, Dietel S., Hippenstiel S., Singer B., Suttorp N., Opitz B.; 2007 Cellular Microbiology 9: 694-707

“Expression of CEA-related cell adhesion molecules in human pulmonary epithelial cells“, Singer B., Zabel S., **Jonat C.**, N’Guesson P., Opitz B., Zahlten J., Schmeck B., Weimann A., Bachmann S., Temmesfeld-Wollbrueck B., Suttorp N., Slevogt H., in Vorbereitung

7.1.2 Öffentliche Vorträge

Jonat C., Opitz B., Zahlten J., Seybold J., Slevogt H., Schmeck B., Suttorp N. (2005). Die Rolle der MAP Kinasen ERK, p38 und des Transkriptionsfaktors NF-κB für die Expression von Interleukin-8 in humanem Bronchialepithel nach Infektion mit *Moraxella catarrhalis*. 46. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, Posterdiskussion.

Jonat C., Opitz B., Zahlten J., Seybold J., Slevogt H., Suttorp N. (2004). *Moraxella catarrhalis* induced IL-8 release by bronchial epithelial cells is mediated by NF-κB and the MAP kinase signaling pathway. 15th European Students Conference – Charité

7.1.3 Abstracts

H. Slevogt, K. Möhr, **C. Jonat** , B. Schmeck, M. Krüll, S. Hippenstiel, N. Suttorp, J. Seybold (2004). Die Adhäsion von *Moraxella catarrhalis* an bronchialen Epithelzellen: Bedeutung bakterieller Membranproteine (OMP) und epithelialer Oberflächenproteine. 45. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie

7.2 Danksagung

Für das vorliegende interessante Thema und die Einführung in dieses Teilgebiet der Forschung danke ich Prof. Dr. Norbert Suttrop und Dr. Joachim Seybold. Mein besonderer Dank richtet sich an Frau Dr. Hortense Slevogt, die mich mit der Unterstützung von Frau Möhr in die Methoden eingearbeitet hat, sich stets für meine wissenschaftliche Ausbildung engagierte und mich auf diesem Weg betreute und förderte.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Schmeck, Herrn Dr. Opitz und Frau Dr. Zahlten für den praktischen Rat und die Unterstützung bei der Arbeit im Labor danken. Ihre Ideen und Vorschläge zu weiteren Forschungsteilgebieten haben wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Das angenehme Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft der Mitarbeiter/innen im Labor erlaubten mir eine schnelle Durchführung der Versuche und anschließende Auswertung der Ergebnisse.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und Karl-Friedemann Jerosch für die Unterstützung bei dieser umfangreichen Arbeit und für deren Verständnis bedanken.

7.3 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.4 Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich, Carola Jonatat, dass diese Dissertation mit dem Thema: „Die Aktivierung des humanen Bronchialepithels durch *M. catarrhalis*“ von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den _____