Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie

und dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Molekulare Mechanismen der *Moraxella catarrhalis* induzierten Apoptose pulmonaler Epithelzellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Manuel Vigelahn

aus Berlin

Datum der Promotion: 11. Dezember 2015

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **5**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS **9**

1 Einleitung **10**

1.1 COPD/Emphysem 10
1.1.1 Klinik und Prävalenz 10
1.1.2 Pathogenese der COPD 10
1.1.3 Pathophysiologie des Emphysems 11

1.2 Bakterielle Infektionen und ihre Bedeutung in der COPD 12
1.2.1 Allgemeines zu M.catarrhalis 13
1.2.2 Virulenzfaktoren von M.catarrhalis 15

1.3 Morphologie und molekulare Mechanismen der Apoptose 17
1.3.1 Apoptose allgemein 17
1.3.2 Morphologische Veränderungen 18
1.3.3 Caspasen und ihre Funktion der Apoptosevermittlung 18
1.3.4 Die extrinsischen und intrinsischen Signalwege der Apoptoseinduktion 19
1.3.5 Bcl-2-System 22

1.4 Fragestellung 24

2 Materialien **25**

2.1 Bakterienkultur 25
2.1.1 Moraxella catarrhalis 25
2.1.2 Agarplatten und BHI-Medium 25

2.2 Zelllinien und Zellkultur 25

2.3 Messung der Laktatdehydrogenase (LDH) 28

2.4 Messung der Caspasenaktivität 28

2.5 Messung der Apoptoserate 28

2.6 Western Blot 28

2.7 Elektronenmikroskop 31

3 Methoden 32

3.1 Bakterienkultur 32

3.2 Zellkultur 32

3.2.1 Infektion von humanen Zellen 33

3.3 Messung der Laktatdehydrogenase 33

3.4 Quantifizierung der Apoptose mittels ELISA 34

3.5 Fluorometrische Caspase -3-, -8-, -6-, -9-Aktivitäts-Assays 34

3.6 Western Blot 35

3.6.1 Proteinextraktion 35

3.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford 35

3.6.3 Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 36

3.6.4 Protein-Blot und Antikörperexposition 36

3.6.5 Detektion 37

3.7 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) 37

3.8 Cytochrom C ELISA 38

3.9 Statistische Auswertung und Software 38

3.10 Subzelluläre Fraktionierung 38

4 Ergebnisse 39

4.1 Apoptoseinduktion durch M. catarrhalis in humanen alveolaren Epithelzellen ..39

4.2 Apoptoseinduktion in pulmonalen Epithelzellen durch M. catarrhalis und deren Abhängigkeit von der UspA1-Expression 41

4.3 CEACAM1-Abhägigkeit für die durch M. catarrhalis Induzierte Apoptose 44

4.4 Abhängigkeit der M. catarrhalis-Adhäsion an Epithelzellen von der Interaktion zwischen UspA1 und CEACAM1 46

4.5 Apoptoseinduktion durch Caspasenaktivierung 47

4.6 Mitochondrienabhängige Apoptose 50

5 Diskussion 53

5.1 M. catarrhalis-induzierte Apoptose fördert Emphysembildung 53

5.2 Bedeutung der Apoptose bei pulmonalen Infektionen 54

5.3 Einfluss der UspA1-CEACAM1-Interaktion 56

5.4 Caspasenaktivierung und Bedeutung für die mitochondriale Apoptose 57

5.5 Caspasenunabhängige Apoptose Beziehung AIF und Caspase 58

5.6 Ausblick 59

6 Zusammenfassung 60

7 Anhang 62

7.1 Literaturverzeichnis 62

7.2 Publikationsverzeichnis 70

7.2.1 Originalarbeiten 70

7.2.2 Öffentliche Vorträge 70

7.3 Danksagung 71

7.4 Lebenslauf 72

7.5 Eidesstattliche Versicherung 74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A549	Type II Alveoläre karzinogene Bronchialzellen
AIDS	Aquired Immun Defency Syndrome; erworbenes Immundefektsyndrom
AIF	apoptosis inducing factor
AK	Antikörper
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
ARDS	acute respiratory distress syndrome; Akutes Lungenschädigungs-Syndrom
ATCC	Aerican Type Culture Collection
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
Bik	Bcl-2-interacting killer
BIP	Bax-inhibierendes Peptid
Blk	B-lymphocyte kinase
Bmf	Bcl-2-modifying factor
BNIP3	Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
Bok	Bcl-2 related ovarian killer
CARD	caspase recruitment domain
Caspase	cystein-dependent asparate-specific proteases
CD95	Cluster of Differentiation

CEACAM	carcinoembryonic antigen–related cell adhesion molecules
c. elegans	caenorhabditis elegans
cfu	colony forming units, Kolonie-bildende Einheiten
CFX	Ceftriaxon
COPD	chronic obstructive pulmonary disease; chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CytC	Zytochrom C
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	Death Domaine
DED	Death Effector Domaine
DISC	Death Inducing Signalling Complex
DNA	Desoxyribonuclein acid; Desoxyribonukleinsäure
DR-4	Death Receptor
Δψ	transmembranöses Potential
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGL-1	egg laying abnormal-1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-regulated kinase
FADD	Fas-associated protein with death domaine
FCS	Fetal calf serum; fetales Kälberserum
FEV1	forcierte Einsekundenkapazität
FU	Fluoreszenz Unit
FVC	forcierte Vitalkapazität
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor; Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor

HMW-OMP	high molecular weight OMP
hrk	Activator of apoptosis harakiri
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITIM	*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LOS	Lipooligosaccharid
MAC	membrane attack complex
M. catarrhalis	*Moraxella catarrhalis*
MOI	multiplicity of infection; Bakterienzahl pro Zelle
NAD+	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NF-κB	Nuclear Factor-κB
OD	Optische Dichte
OMP	outer membrane protein
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline; Phosphat gepufferte Salzlösung
PRR	pattern recognation receptor; Muster-erkennende Rezeptoren
PT	permeability transition
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
RFU	Relative Fluorescence Units
rpm	revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute
SAEC	small airway epithelial cells; Epithelzellen der kleinen Atemwege
SDS	Sodiumdodecylsulfat; Natriumdodecylsulfat

TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRADD	TNF-receptor-associated protein with death domaine
TRAIL	TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand
UspA	ubiquitous surface protein A; ubiquitäres Oberflächenprotein A
VEGF	vascular endothelial growth factor

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Darstellung der Circulus vitiosus Hypothese der COPD 13

Abbildung 2: Typische morphologische Charakteristika von in Apoptose befindlichen Zellen 18

Abbildung 3: Extrinsische rezeptorvermittelte Caspasenaktivierung 20

Abbildung 4: Mitochondrienvermittelte Caspasenaktivierung am Apoptosom 22

Abbildung 5: Mitochondriale Apoptoseregulation durch Bcl-2-Proteine 24

Abbildung 6: Apoptose in pulmonalen Epithelzellen induziert durch M.catarrhalis 40

Abbildung 7: Zeit- und dosisabhängig induzierte Apoptose durch *M. catarrhalis* und Auswirkung der *M. catarrhalis* UspA1-Expression 42

Abbildung 8: Messung der LDH im Überstand aus mit *M. catarrhalis* infizierten A549-Zellen 43

Abbildung 9: CEACAM1-Expression in A549-Zellen und SAEC 45

Abbildung 10: Bedeutung der UspA1-Expression durch *M. catarrhalis* und der Expression von CEACAM1 durch epitheliale Zellen für die Zelladhäsion von *M. catarrhalis* 47

Abbildung 11: Caspasenabhängigkeit der durch *M. catarrhalis* induzierten Apoptose 48

Abbildung 12: Ansteigende Aktivität der Caspasen 3 und 6 in apoptotischen Zellen nach Infektion mit *M. catarrhalis* 49

Abbildung 13: Ansteigende Aktivität der Caspase 9 nicht aber der Caspase 8 in apoptotischen Zellen nach Infektion mit *M. catarrhalis* 50

Abbildung 14: Verminderte Werte von Bcl-2, mitochondrialer Anstieg von Bax sowie zytosolischer Anstieg von Cytochrom C und Apoptosis-inducing Factor (AIF) in mit *M. catarrhalis* infizierten Zellen 52

1 Einleitung

1.1 COPD/Emphysem

1.1.1 Klinik und Prävalenz

Die COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) zählt zu der vierthäufigsten Todesursache weltweit, wobei mit einem Anstieg der Prävalenz, Mortalität und Morbidität in den folgenden Jahren gerechnet wird [1]. Klinisch imponieren chronischer Husten, vermehrte Sputumproduktion, Dyspnoe sowie ein verlängertes Expirium. Dysfunktion der Zilien, eingeschränkte Lungenfunktion, Gasaustauschstörungen, pulmonale Hypertension mit Cor pulmonale sind weitere klinische Kennzeichen der COPD. Die COPD manifestiert sich klinisch sowohl extrapulmonal mit Atemwegsobstruktion, Bronchiolitis und Zerstörung des Lungenparenchyms mit Verlust von Alveolen [2], als auch extrapulmonal durch Muskelschwund, Osteoporose und Anämie [3, 4]. Die Diagnose der COPD wird spirometrisch nach Gabe von Bronchodillatatoren gestellt: Eine FEV1 < 80 % in Kombination mit FEV1/FVC < 70 % spricht für eine nicht reversible eingeschränkte Lungenfunktion [5]. Abhängig von der Ausprägung klinischer Symptome erfolgt die therapeutische Behandlung. So ist eine Meidung von Risikofaktoren wie Rauchen oder beruflicher Exposition zu Beginn der Erkrankung ohne eingeschränkte Lungenfunktion ausreichend. Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung erfolgt eine Pharmakotherapie mit β-2-Sympathikomimetika, Anticholinergika sowie Glukokortikoiden und Theophyllin [6].

1.1.2 Pathogenese der COPD

Die COPD ist charakterisiert durch eine chronisch fortschreitende Einschränkung der allgemeinen Lungenfunktion in Verbindung mit unnatürlichen Entzündungsreaktionen des Lungengewebes auf inhalierte Noxen (v.a. Zigarettenrauch) [5]. Es konnte eine Infiltration des Oberflächenepithels in zentralen Atemwegen durch Entzündungszellen [7-9] wie Makrophagen, T-Lymphozyten (CD8+) und Neutrophile festgestellt werden, welche u.a. Leukotrien B4 [10], Interleukin-8 (IL-8) [11-13], Tumor Nekrose Faktor-α (TNF-α) [11, 14] als Mediatoren freisetzen. Weiterhin konnten im Lungengewebe von COPD-

Patienten vergrößerte Schleimdrüsen und vermehrte Bildung von Becherzellen nachgewiesen werden. Im Rahmen der chronischen Inflammation entwickelt sich ein Zyklus aus Verletzung und Reparatur in Bronchiolen und kleinen Bronchien, und somit kommt es zum strukturellen Umbau der Atemwege mit erhöhtem Kollagenanteil und Bildung von Narbengewebe, was wiederum zur einer Verengung und Elastizitätsminderung der Atemwege führt [15, 16].

1.1.3 Pathophysiologie des Emphysems

Bei ca. 20 % der COPD-Patienten kommt es im Laufe der Erkrankung zu einer Verschlechterung des Gesundheitszustandes durch die Ausbildung eines Emphysems [17]. Die Definition des Lungenemphysems beinhaltet die irreversible Erweiterung distal terminaler Bronchiolen mit begleitender Zerstörung der Alveolarsepten und resultierender Reduktion der Atemwegsoberfläche. Resultat der chronischen Zerstörung der alveolären Wandstruktur ist die Bildung von Emphysemen, welche eine meist irreversible Dilatation und Zerstörung der Bronchiolen [18] bedeutet. Das Emphysem ist definiert als Vergrößerung des Luftraums in der Lunge Erwachsener [19]. Am häufigsten entwickelt sich das Emphysem im Alter zwischen dem 45 und 60. Lebensjahr im Rahmen der COPD bei Rauchern [20]. Eine anhaltende Hypothese für die Pathogenese der Emphysementstehung: Ein Ungleichgewicht zwischen Elastase/Antielastase sowie Zigarettenrauch führen zur Invasion von Entzündungszellen in die Atemwege, wo diese wiederum vermehrt Elastase freisetzen und das Elastase/Antielastase Gleichgewicht weiter beeinflussen, was zur fortschreitenden Zerstörung von Lungengewebe führt [21].

Die Pathogenese der Emphysementstehung als irreversible Folge der COPD ist bisher nur unzureichend geklärt. Eine seit den 60er Jahren vorherrschende Hypothese stellt proteolytische Enzyme als Ursache in den Vordergrund [17]: Die proteolytischen Enzyme, die in den wandständigen Makrophagen und Leukozyten der Alveolen reichlich vorkommen, werden durch Antiproteasen gehemmt. Eine Imbalance dieses Systems führt zu einer Destruktion von alveolären Strukturen, insbesondere der extrazellulären Matrix. Es wird angenommen, dass der durch die chronische Entzündungsreaktion bedingte Einstrom inflammatorischer Zellen in das Atemwegssystem zu einer überschießenden Protease-Aktivität führt und damit einen großen Anteil an der Zerstörung der alveolären Matrix hat [17, 22]. In Ergänzung zu der vorherrschenden Hypothese des Protea-

se/Antiproteaseungleichgewichts konnte in den letzten Jahren zunehmend beobachtet werden, dass der Apoptose von pulmonalen Epithelzellen ebenfalls eine wichtige Rolle für die Pathogenese der Emphysementstehung zukommt [17, 23]. In mehreren Studien wurde weiterhin in Lungenbioptaten von Patienten mit Lungenemphysem eine vermehrte Apoptoseaktivität nachgewiesen, die mit dem Ausprägungsgrad des Emphysems korrelierte [24-28]. Aoshiba et. al [29] konnten im Mausmodell via Apoptoseinduktion emphysematische Veränderungen hervorrufen und die Bedeutung der Apoptose in der Emphysementstehung hervorheben. Die anschließende schnelle und effektive Entfernung apoptotischer Zellen als zentraler Prozess der Gewebshomeostase wird auch als Efferozytose bezeichnet [30]. Für die Entfernung sind phagozytotische Prozesse verantwortlich, die den meisten Zellen des Lungengewebes (Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten) sowie Dendritischen Zellen und Makrophagen eigen sind [31-34]. Der Prozess der Efferozytose ist entscheidend, da apoptotische Zellen als Ursache für Autoimmunreaktionen gegen körpereigene Antigene und für vermehrte Proteasenaktivität gelten.

Aktuelle Forschungsergebnisse konnten zeigen, dass *S. pneumoniae* über die Fähigkeit verfügt in pulmonalen Epithelzellen apoptotische Prozesse zu initiieren [35, 36]. Allerdings konnte bisher nicht geklärt werden, welche Rolle die bakterielle Kolonisierung des untereren Respirationstraktes bei COPD-Patienten für die Apoptoseinduktion spielt.

1.2 Bakterielle Infektionen und ihre Bedeutung in der COPD

Der Verlauf der Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine intermittierende Verschlechterung der Krankheit der sogenannten Exazerbation. Circa die Hälfte der Exazerbationen wird durch bakterielle Infektionen verursacht [37]. Zu den am häufigsten nachgewiesenen Stämmen gehören *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae und Moraxella catarrhalis (M. catarrhalis)* [38], wovon in etwa 10 % eine Infektion mit *M. catarrhalis* nachgewiesen werden konnte [1]. Bei einer Besiedelung mit *M. catarrhalis* beträgt die Infektionsdauer durchschnittlich einen Monat, anschließend entwickeln alle Patienten einen stammspezifischen immunologischen Schutz [1]. Weiterhin findet sich bei 5 bis 32 % der erwachsenen COPD-Patienten eine chronische Besiedelung mit *M. catarrhalis* [39-41]. Eine verbreitete Hypothese zur Erklärung der anhaltenden Entzündung sowie Fortschreiten der Erkrankung ist die Annahme eines Circulus vitiosus. Im

Zentrum dieses Circulus befindet sich die anhaltende Schädigung des Bronchialepithels durch bakterielle Besiedelung, wodurch es zu einer Störung der mukozilliären Clearance kommt und das Fortschreiten der Kolonisation begünstigt. Parallel führt die Entzündungsantwort der Bronchialzellen des Wirtes auf die bakterielle Infektion zu erhöhter elastolytischer Aktivität im Lungengewebe [38].

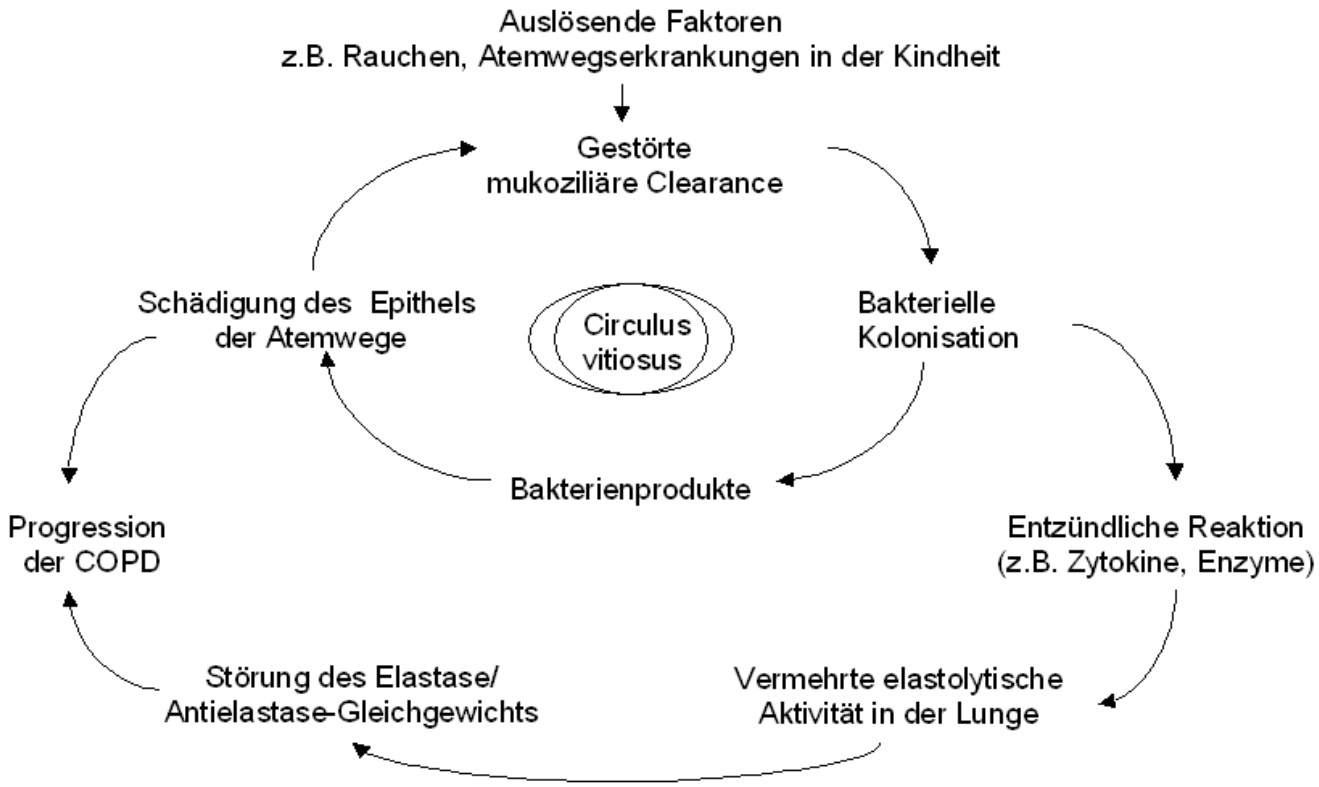

Abb. 1: Darstellung der Circulus vitiosus Hypothese der COPD [38]

1.2.1 Allgemeines zu *M.catarrhalis*

M. catarrhalis ist ein lange Zeit in seiner Bedeutung verkannter wichtiger Erreger von Infektionen des oberen und unteren Respirationstraktes. Der gram-negative unbekapselte aerobe Diplokokkus trägt seit 1984 den Namen *Moraxella catarrhalis*. Zuvor war der Erreger bekannt als *Neisseria catarrhalis* oder aufgrund seiner Zugehörigkeit zu der Gattung der Branhamella unter dem Namen *Branhamella catarrhalis* geläufig [42].

Bei Kultivierung auf Blutagar bildet *M. catarrhalis* runde, weißliche, nicht hämolysierende Kolonien. Weiterhin führt *M. catarrhalis* zur Nitrat- und Nitritreduktion, ist allerdings nicht in der Lage Fruktose, Glukose, Laktose, Maltose und Sucrose zu verstoffwechseln [43]. Eine Reduktionsreaktion von Nitrat und Nitrit während der Synthese von DNAse und Trybutyrinesterase gilt als sicherer Nachweis für *M. catarrhalis* [42].

Bei Kindern ist *M. catarrhalis* als zweithäufigster Erreger der Otitis media von Bedeutung [44]. Darüber hinaus ist der obere Respirationstrakt von bis zu 80 % aller Kinder und durchschnittlich ein bis fünf Prozent der gesunden Erwachsenen mit *M.catarrhalis* besiedelt [45].

Insbesondere Patienten mit einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung sind für Infektionen mit *M.catarrhalis* empfänglich. Bei diesen Patienten kommt es häufig zu einer pathologischen Besiedelung der unteren, beim Gesunden sterilen, Atemwege, bis zu 32 % aller COPD Patienten sind mit *M.catarrhalis* kolonisiert [1]. Dieses hat vermehrte *M.catarrhalis*-induzierte Exazerbationen der COPD zur Folge. Es konnte gezeigt werden, dass bakterielle Exazerbationen den Progress der COPD verschlechtern [1]. Auch andere Infektionen des Respirationstraktes wie z.B. Bronchitis und Laryngitis können durch den ausschließlich humanpathogenen Erreger verursacht sein. Somit gehört *M.catarrhalis* nach *Haemophilus influenzae (H. influenzae)* zu den zweithäufigsten nachgewiesenen pathogenen Erregern der Atemwege [42].

M.catarrhalis ist in der Lage an verschiedene Zelltypen der Atemwege wie bronchialen Epithelzellen, Epithelzellen der kleinen Atemwege (*small airway epithelial cells* = SAEC) und die Typ-2-alveolar Zellen zu adhärieren und sie zu einem geringen Prozentsatz auch zu invadieren [46]. In vorrangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Infektion dieser Zellen eine proinflammatorische Immunantwort zur Folge hat [47]. Die hierbei induzierte Immunantwort der pulmonalen Epithelzellen ist überwiegend Toll-like-Rezeptor-2 (TLR-2)-abhängig und führt nach Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB zur Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine, wie dem Interleukin (IL)8 und dem Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor:* GM-CSF) [48].

1.2.2 Virulenzfaktoren von *M.catarrhalis*

Da die meisten *M.catarrhalis*-Infektionen Schleimhaut-assoziiert sind, sind für die Kolonisierung und Infektion höchstwahrscheinlich Reaktionen zwischen Erreger und respiratorischem Epithel essentiell [49]. Bakteriell induzierte Entzündungsreaktionen des pulmonalen Epithels werden durch bestimmte Muster-erkennende Rezeptoren, sog. *pattern recognition receptors* (PRRs), zu denen als wichtige Repräsentanten die Gruppe der Toll-like Rezeptoren (TLR) gehört, ausgelöst, die mikrobiologische Bestandteile erkennen und darüber eine proinflammatorische Immunantwort einleiten [50, 51]. *M.catarrhalis* induziert eine TLR-2-abhängige inflammatorische Immunantwort in respiratorischen Epithelzellen [46, 47]. Über die Erkennung dieser *pathogen associated molecular pattern* (PAMPs) hinaus wird die Interaktion zwischen *M.catarrhalis* und pulmonalem Epithel von den *M.catarrhalis*-spezifischen Oberflächenproteinen (OMP = *outer membrane proteins*) A bis H, mit einem Molekulargewicht von 21 bis 98 kDa beeinflusst. In vorrangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese HMW-OMPs (*high molecular weight OMP*) auch als UspA1 und 2 (*ubiquitous surface protein A*) bekannt, für die Induktionen einer systemischen und humoralen mukosalen Immunantwort ebenfalls von Bedeutung sind.[52-55]. Für das Lipooligosaccharid (LOS) mit seinen drei Serotypen A, B, und C als Hauptbestandteil der äußeren Bakterienmembran konnte ebenfalls eine wichtige Rolle als Virulenzfaktor von *M. catarrhalis* nachgewiesen werden [56]. Das LOS lässt Ähnlichkeiten zu den als Virulenzfaktoren bedeutsamen Lipooligosacchariden von *H. influenzae, Neisseria meningitidis und Neisseria gonorrhoeae* erkennen [57-59].

In Bezug auf die Pathogenese sowie Adhäsion an den Respirationstrakt von *M. catarrhalis* gehört die UspA-Familie zu den am intensivsten untersuchten Moraxella OMPs [60-62]. Die UspA-Proteine befinden sich auf der äußeren Membran der Bakterien und erscheinen dort als eine lollipopartige Struktur [60]. UspA1 und UspA2 (Größe: 88 kDa bzw. 62 kDa) sind zu 43 % identisch [62]. Sie sind oligomere Adhesine mit multifunktionellen Bindungsstellen, welche in der Lage sind an Proteine der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, Laminin und Vitronectin [63-65] anzuknüpfen, und die Aktivierung des angeborenen Immunsystems mittels Bindung des C4-binding-Proteins und der Neutralisation von C3 zu behindern [66, 67]. Als wichtigster Mechanismus für die Serumresistenz von *M. catarrhalis* wird die Inhibition der MAC-Bildung (*membrane attack complex*)

durch die UspA2-abhängige Bindung von Vitronectin und daraus resultierender C9-Polymerisation angesehen [65, 68].

Weiterhin wird eine UspA-abhängige Neutralisation des antiinflammatorischen Proteaseinhibitors α_1-Antichymotrypsin [66] als möglicher Einfluss von *M. catarrhalis* bei einer Exazerbation der Entzündungsreaktionen bei COPD-Patienten diskutiert [69].

Als ein weiteres Bindungsmolekül des UspA1-Moleküls konnte eine humanspezifische extrazelluläre Immunglobulin-V(IgV)-ähnliche N-terminale Domäne des CEACAM-Proteins (*carcinoembryonic antigen–related cell adhesion molecules*) nachgewiesen werden [70, 71]. Innerhalb dieser Familie konnte bisher insbesondere für das CEACAM1 eine besondere Bedeutung nachgewiesen werden [72, 73]. CEACAM1 wird vermehrt auf Oberflächen verschiedener humaner Gewebe, inklusive respiratorischem Epithel, exprimiert und reguliert unterschiedliche zelluläre Funktionen [73]. CEACAM1 besitzt vier extrazelluläre immunglobulinähnliche Domänen, eine transmembrane und eine zytoplasmatische Domäne mit einem *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) [73]. Von ITIM-enthaltenen Rezeptoren ist bekannt, dass sie zur Regulation einer angemessenen Aktivität der Immunzellen durch Initiation, Steuerung und Beenden der Immunantwort beitragen [74]. Beispielsweise aktiviert die Phosphorylisierung von CEACAM1-ITIM eine Signalkette, welche in einer Hemmung der T-Zell-Funktion resultiert [75-77]. In in-Vitro-Versuchen konnte durch die Interaktion von CEACAM1 mit dem UspA1-Protein vom *M. catarrhalis* eine Hemmung der TLR2-induzierten proinflammatorischen Immunantwort beobachtet werden [72]. Durch die Untersuchung dieser Pathomechanismen von *M. catarrhalis* ließ sich zeigen, welche “Strategien” Erreger nutzen, um eine Kolonisierung des pulmonalen Epithels zu ermöglichen.

Im Rahmen der fortschreitenden Resistenzentwicklung, wie z.B. die seit den 90er Jahren bestehende ß-Laktam-Resistenz bei ca. 95 % der *M. catarrhalis*-Kulturen in den Industriestaaten [42], fällt der Impfstoffentwicklung gegen *M. catarrhalis* eine besondere Bedeutung zu. Bestandteil aktueller Forschungen zur Entwicklung wirksamer Vakzine sind vor allem Initiatoren der humoralen Immunantwort, wie die OMPs UspA1 und UspA2 [78, 79].

1.3 Morphologie und molekulare Mechanismen der Apoptose

1.3.1 Apoptose allgemein

Das Leben vielzelliger Organismen wird bestimmt durch Zellmigration, Zellteilung und den Zelltod. Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, ist keine proinflammatorische Immunantwort auslösende Destruktion von Zellen und stellt z.B. einen wichtigen Vorgang während der embryonalen Entwicklung dar. Darüber hinaus ist die Apoptose ein wichtiger Bestandteil der Gewebshomöostase sowie der Immuntoleranz in adulten Organismen [80]. Der Fachbegriff Apoptose wurde erstmals in einer Publikation von Kerr, Wyllie und Currie [81] erwähnt, und wurde für die Beschreibung des Phänomens der kontrollierten Selbstzerstörung von Zellen in vielzelligen Organismen verwand.

Eine fehlerhafte Regulation der Apoptose kann zu verschiedene Erkrankungen führen. So kann z.B. eine Überexpression von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen die Überlebenszeit von Zellen vergrößern und dadurch die Wahrscheinlichkeit für weitere onkogenetische Mutationen erhöhen [80]. So kann diese "Apoptoseresistenz" die Bildung von Neoplasien und Autoimmundefekten [82] verursachen, während eine überschießende Apoptoserate für die Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, AIDS und anderen viralen und bakteriellen Erkrankungen von Bedeutung ist [83].

Die Apoptose verläuft über streng regulierte Prozesse, die durch bestimmte Stimuli, über verschiedene Signaltransduktionswege induziert und vermittelt werden. Die Bestandteile des apoptotischen Signalnetzwerkes befinden sich bereits in den Zellen und sind bereit durch entsprechende intra- oder extrazelluläre Stimuli aktiviert zu werden [84, 85]. Zum Verständnis der Apoptose trugen v.a. genetische Studien an der Nematode *Caenorhabditis elegans (c. elegans)* bei. In diesen Studien konnten wichtige Prozesse und Bestandteile der Apoptoseinduktion charakterisiert und die Ergebnisse später auf Säugerzellen übertragen werden. Dabei wurde gezeigt, dass der wichtigste Auslöser für Apoptose während der Entwicklung von *C. elegans* die Aktivierung der Cysteinprotease ced-3 darstellt, welche durch Oligomerisation am Aktivator-Protein ced-4 vermittelt wird. Die Aktivität des ced-3/ced-4-Komplexes wird wiederum durch den Apoptoseinhibitor ced-9 und den Apoptoseaktivator egl-1 bestimmt. Weiterführende Studien konnten die Äquivalente dieser C*. elegans*-Gene identifizieren [86]. Ced-3 stellt

demnach als Mitglied der Cysteinproteasen die Caspasen (*cysteine-dependent asparate-specific proteases*) der Säuger dar, während ced-4 das Pendant zu Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) ist, welches als Zentrum des Apoptosoms, den Caspase-aktivierenden Signalkomplex bildet. Egl-1 und ced-9 gehören zur Familie der pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteine [87].

1.3.2 Morphologische Veränderungen

Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnten während der Apoptose charakteristische morphologische Veränderungen wie Schrumpfen der Zellen, Chromatinkondensation, Blasenbildung der Plasmamembran (engl. "plasmablebbing") und letztlich eine Zell-Fragmentierung in sogenannte membranumhüllte "*apoptotic bodies*" beobachtet werden [88]. Diese werden von Makrophagen phagozytiert und abgebaut ohne eine inflammatorische Reaktion auszulösen.

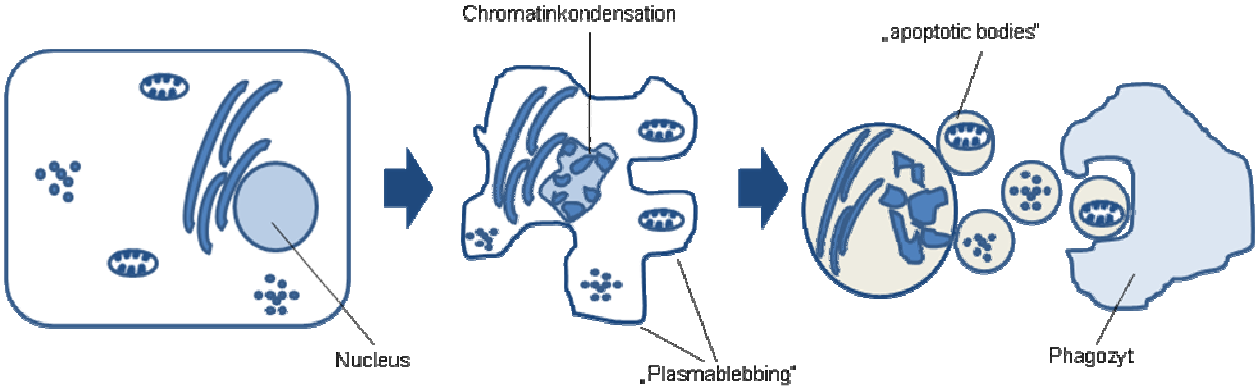

Abbildung 2: Typische morphologische Charakteristika von in Apoptose befindlichen Zellen (modifiziert nach [88])

1.3.3 Caspasen und ihre Funktion der Apoptosevermittlung

Caspasen, Cystein-Asparat-Proteasen, spielen eine zentrale Rolle bei der Apoptoseinduktion. Die katalytische Aktivität der Caspasen ist von einem Cysteinrest abhängig, sie gehören zur Gruppe der Cysteinproteasen. Caspasen sind Aspartat-spezifisch, d.h. sie spalten ihre Substrate spezifisch und effizient an der Carboxyseite eines Asparatrestes. Bei Säugern sind 14 unterschiedliche Caspasen bekannt, wobei die Caspasen-11 und 12 bisher nur in Mäusen nachgewiesen wurden [86, 89]. In verschiedenen Gen-Knock-

out Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Caspasen-3, -9, -8, -2, -6, -7 und -10 jeweils wichtige Rollen für die Vermittlung der Apoptosesignalwege inne haben [90]. Caspasen liegen zunächst als intrazelluläre inaktive Procaspasen vor. An ihrem N-terminalen Ende tragen sie eine Prodomäne gefolgt von einer großen und einer kleinen Untereinheit. Durch proteolytische Aktivität erfolgt eine Teilung zwischen den beiden Untereinheiten. Während dieses Aktivierungsprozesses erfolgt meist die Entfernung der Prodomäne. Die aktive Caspase bildet sich daraufhin aus einem Zusammenschluss von jeweils zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten zu einem Heterotetramer. Die pro-apoptotischen Caspasen lassen sich in eine Gruppe von Initiatorcaspasen mit langen Prodomänen, den Procaspasen-2, -8, -9 und -10, und den Exekutionscaspasen mit kurzen Prodomänen, Procaspasen-3, -6 und -7 unterscheiden. Die Initiatorcaspasen-8 und -10 besitzen eine DED-Prodomäne (*Death Effector Domaine*), während die Caspasen-2 und -9 eine CARD-Domäne (*Caspase Recruitment Domain*) besitzen. Die Apoptose wird im wesentlichen durch zwei unterschiedliche Signalwege induziert. Dabei werden als Reaktionen zum einen auf die Bindung von Todesrezeptoren der Zelloberfläche (extrinsischer Signalweg) oder zum anderen auf intrazelluläre Signale (intrinsischer Signalweg), über verschiedene der eben beschriebenen Prodomänen die Initiatorcaspasen zu den DISC (*Death Inducing Signalling Complexes*) rekrutiert und aktiviert.

1.3.4 Die extrinsischen und intrinsischen Signalwege der Apoptoseinduktion

Extrinsische Apoptoseinduktion: Die extrinsischen Signalwege werden durch die Aktivierung der sog. "Todesrezeptoren" auf der Zelloberfläche vermittelt. Die Todesrezeptoren gehören zur Familie der TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) mit TNFR-1, Fas/CD95 (*Cluster of Differentiation*) und den TRAIL-Rezeptoren (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) DR-4 (*Death Receptor*) und DR-5 [91]. Alle Mitglieder der TNFR-Familie besitzen eine extrazelluläre cysteinreiche Subdomäne, die es ihnen ermöglicht ihre Liganden spezifisch zu binden, was eine Trimerisation und Aktivierung des Todesrezeptors zur Folge hat [92].

Nach Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalweges durch eine Death-Rezeptor-Liganden-Interaktion wird die Procaspase-8 über ihre DED zum DISC, als Membranrezeptorkomplex, rekrutiert [93]. Nach Bindung an den DISC befinden sich die einzelnen Procaspasen-8 in unmittelbarer Nachbarschaft und können sich nun mittels

Autoproteolyse gegenseitig aktivieren [89]. Die folgenden Signalwege werden über den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors, der DD (*Death Domaine*), vermittelt. Adaptermoleküle wie FADD (*Fas-associated Protein with Death Domaine*) oder TRADD (*TNF Receptor-associated Protein with Death Domaine*) besitzen ihre eigenen DD durch die sie zu den DD der aktivierten Todesrezeptoren rekrutiert werden und so den DISC bilden. Neben der DD besitzt der Adapter FADD eine DED, die mittels homotypischer DED-DED Interaktion die Procaspase-8 am DISC bindet. Die autolytische Aktivierung der Procaspase-8-Moleküle am DISC führt nun zur Freisetzung der aktiven Caspase-8, die wiederum weitere der folgenden Effektorcaspasen aktiviert. Zellen mit der Eigenschaft diesen direkten hauptsächlich caspasenabhängigen Apoptosesignalweg zu wählen, werden auch als Typ I Zellen bezeichnet [94].

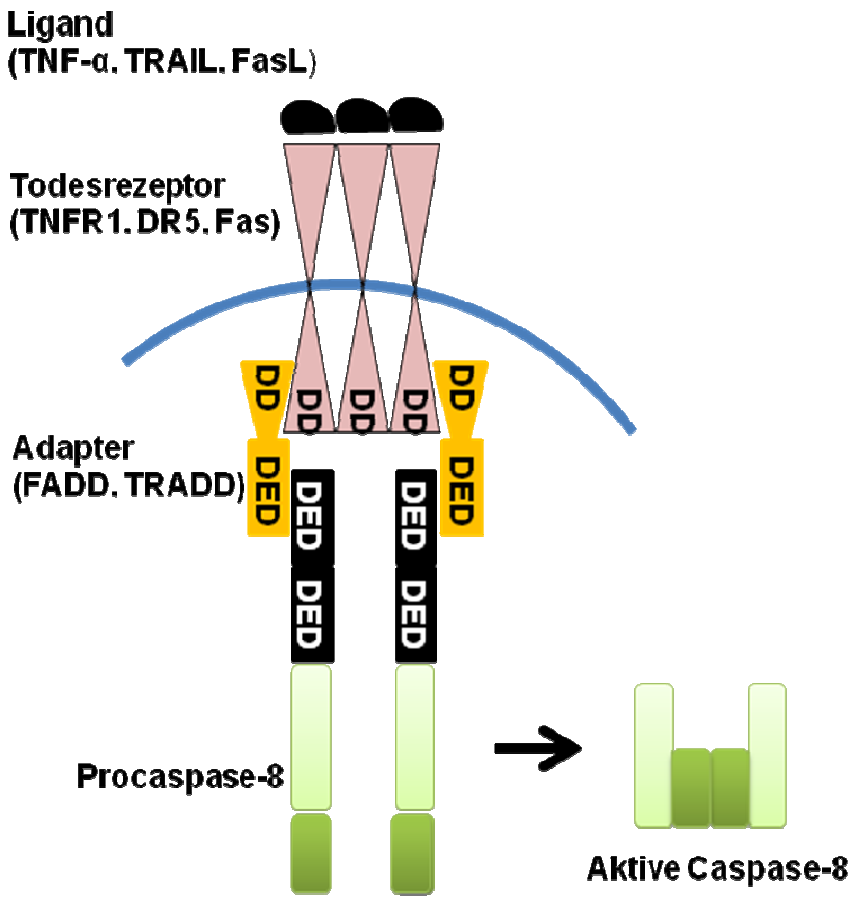

Abb. 3: Extrinsische rezeptorvermittelte Caspasenaktivierung

Der trimerische Todesrezeptor rekrutiert über seine zytoplasmatischen death domains (DD) Adaptermoleküle, die neben den DD auch DED besitzen und über diese die Procaspase-8 am Rezeptorkomplex rekrutieren können (DISC). Über Autoproteolyse wird die Procaspase-8 zur aktiven Caspase-8 mit zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten (modifiziert nach [95]).

Intrinsischer Weg: Neben der Verstärkung und Vermittlung des extrinsischen Weges spielen die Mitochondrien eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Todessignalen aus dem Inneren der Zelle, wie z.B. DNA-Schäden oder oxidativen Stress. Hauptverantwortlich für eine Apoptoseinduktion ist in diesen Fällen eine Störung des mitochondrialen inneren transmembranösen Potentials (Δψ), sowie eine plötzliche erhöhte Permeabilität der inneren mitochondrialen Membran (*Permeability Transition*, PT). Infolge von osmotisch bedingten Wassereinstrom in die mitochondriale Matrix kommt es zum Anschwellen des Mitochondriums bis hin zum Reißen der äußeren mitochondrialen Membran und somit zur Freisetzung proapoptotischer Proteine aus dem intermembranösen Raum ins Zytosol [96, 97]. Die freigesetzten Proteine sind neben Cytochrom c, AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) [98], endonuklease endoG [99], Smac/Diablo [100] und Htr/Omi [101]. Einer PT folgt immer eine Δψ, aber einer Δψ folgt nicht zwingend eine PT und eine Cytochrom c Freisetzung wurde auch ohne eine Δψ beobachtet [96, 102]. Mit Hilfe von Cytochrom C und dATP bilden sich aus mehreren Apaf-1-Proteinen ein radähnliches Heptamer, das Apoptosom. Die Procaspase-9-Moleküle können nun am Zentrum dieses "Drehkreuzes" binden, sich zu Dimeren formieren und nun die Aktivierung von Effektorcaspasen initiieren [103].

Im Gegensatz zu den oben genannten Typ I Zellen führt bei Typ II Zellen wiederum das Signal des aktivierten Rezeptors nicht zu einer ausreichenden Caspasenaktivierung, so dass es einer Verstärkung dieses Signals über die mitochondrienabhängigen Signalwege bedarf. Das Bindeglied zwischen dem Caspasenweg und dem Mitochondrienweg wird über das Bcl-2-Protein Bid vermittelt. Bid wird von Caspase-8 gespalten und in seiner trunkierten Form (tBID) in das Mitochondrium transloziert, wo es gemeinsam mit den proapoptotischen Bcl-2-Proteinen Bax und Bak die Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren ins Zytosol bewirkt [104]. Cytochrom c bindet nun im Zytosol an das monomerische Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*). Dieses zytoplasmatische Protein enthält Mehrfachkopien einer WD-40-Domäne, eine CARD (*Caspase Recruitment Domain*) und eine ATPase-Domäne, über diese dann das Apaf-1 dATP-abhängig zum Apoptosom oligomerisiert. Dieser radförmige Komplex triggert nun die Aktivierung der Procaspase-9 [103], die anschließend eine Kaskade der Effektorcaspasen-3, -7 und -6 initiiert und letztlich zum Zelltod führt [105].

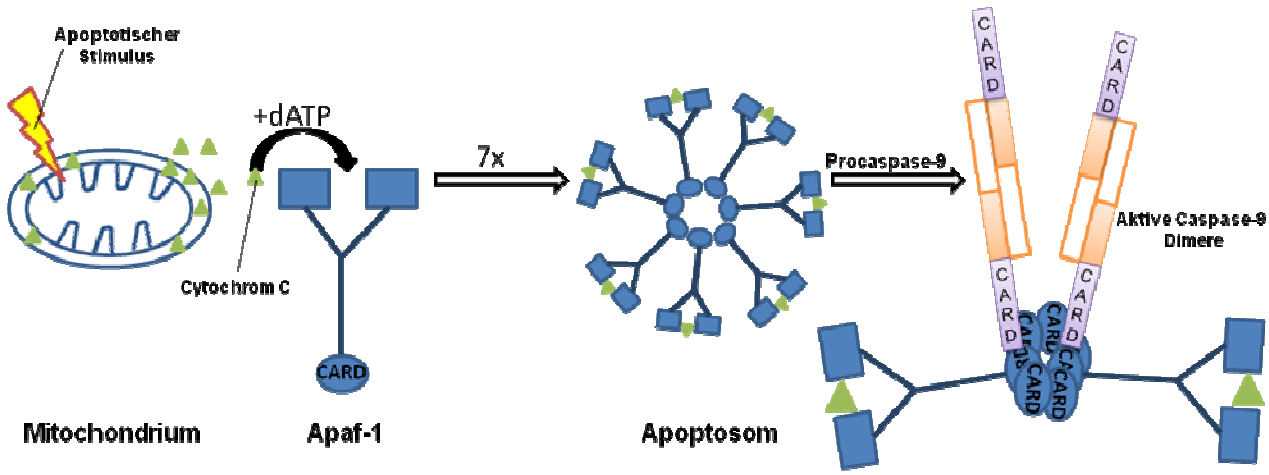

Abb. 4: Mitochondrienvermittelte Caspasenaktivierung am Apoptosom

Ein apoptotischer Stimulus führt zu Freisetzung von Cytochrom C aus dem intermembranösen Raum des Mitochondriums ins Zytosol. dATP- und Cytochrom C-abhängig ändert Apaf-1 seine Konformation und schließt sich zur heptamerischen radähnlichen Struktur, dem Apoptosom, zusammen. An der "Achse" des Apoptosoms binden Procaspase-9-Moleküle und formieren sich zu aktiven Caspase-9-Dimeren, die anschließend die Effektorcaspasen aktivieren (modifiziert nach [103]).

1.3.5 Bcl-2-System

Das Onkogen Bcl-2 ist eines der ersten identifizierten als Onkogene bezeichneten Apoptose-regulierenden Moleküle, welche den Zelltod verhindern anstelle einer Förderung der Zellproliferation zu bewirken. Durch die Transfektion von Bcl-2 in B-Zellen, die sich als Folge der Transfektion resistent gegen eine Apoptoseinduktion mittels IL-3 (Interleukin-3) zeigten, konnte erstmals bewiesen werden, dass die Turmorgenese von humanen Zellen nicht nur von der Fähigkeit der Zellen abhängt, sich der Proliferationskontrolle zu entziehen, sondern auch von der Fähigkeit ihre eigene Apoptoseinduktion aktiv zu verhindern [106]. Durch den Nachweis weiterer Bcl-2-Homologe konnte eine Familie von Bcl-2-Proteinen mit wiederkehrenden Sequenzmotiven, den Bcl-2-Domänen, bestimmt werden. In Säugern konnten bisher 30 verschiedene Bcl-2-Varianten gefunden werden, von denen einige pro- und andere antiapoptotische Eigenschaften besitzen [107]. Neben dem Bcl-2-Protein konnte eine Reihe von antiapoptotischen Proteinen bestimmt werden. Diesen Proteinen gemein sind die Domänen BH1, BH2, BH3 und BH4. Die proapoptotische Gruppe der Bcl-2-Familie wird wiederum in zwei Subgruppen unterteilt: den Bax-Proteinen (Bax, Bak und Bok) mit den Domänen

BH1, BH2 und BH3 und den BH3-only Proteinen (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP3 und Spike), die nur ein kurzes BH3-Motiv besitzen [108, 109]. Die zentrale Funktion der Bcl-2-Proteine liegt am ehesten in der Bewahrung der mitochondrialen Stabilität und die Kontrolle der Freisetzung mitochondrialer Proteine. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Cytochrom-c-Freisetzung durch Bcl-2-Proteine reguliert werden kann [110] [111].

Die proapoptotischen Eigenschaften der Bcl-2-Proteine Bax und Bak konnten im Tierversuch anhand von knock-out-Versuchen [112, 113] nachgewiesen werden. Bax liegt ursprünglich als Monomer im Zytosol vor, welches während der Apoptose seine Konformation ändert und sich dabei in die äußere Mitochondrienmembran integriert und dort oligomerisiert [114] um anschließend die PT der äußeren Membran zu beeinflussen [115, 116]. Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine hingegen sind in der Lage die proapoptotischen Bcl-2-Proteine mittels Bindung an deren BH3-Domäne zu spalten und somit ihre Aktivierung zu verhindern. Den BH3-only Proteinen fällt eine kontrollierende Funktion für die Aktivität der proapoptotischen Bcl-2-Proteine zu, indem sie eine hohe Bindungsaffinität an diese besitzen und sie somit inaktivieren [117]. Zusammenfassend lassen sich die oben geschilderten Prozesse so darstellen: Spezifische apoptotische Signale triggern die Aktivierung bestimmter BH3-only Proteine, die wiederum mit antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen an der äußeren Mitochondrienmembran interagieren, was in einer Freisetzung von proapoptotischen Bcl-2-Proteinen resultiert. Die Bax-ähnlichen Faktoren unterlaufen einer Konformationsänderung, möglicherweise unterstützt durch spezifische BH3-only Proteine, integrieren sich in die äußere Mitochondrienmembran und bewirken die PT und die Freisetzung proapoptotischer Faktoren [107].

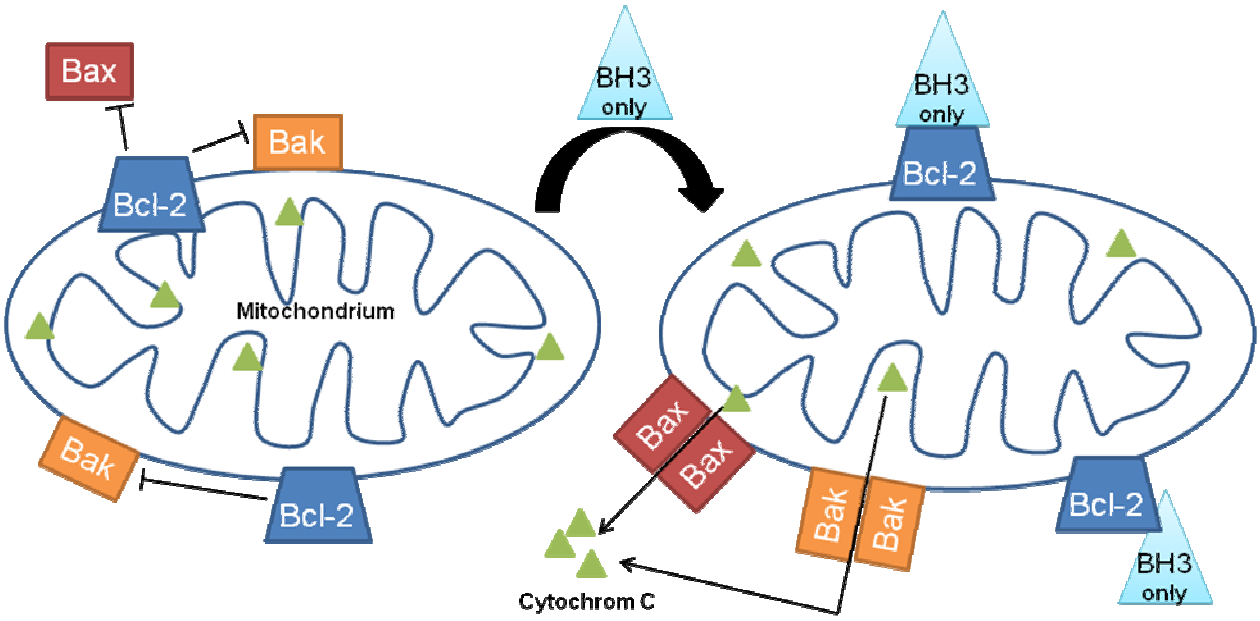

Abb. 5: Mitochondriale Apoptoseregulation durch Bcl-2-Proteine

Die proapoptotischen Bcl-2-Proteine Bax, Bak, BH3-only werden durch antiapoptotische Bcl-2-Proteine wie Bcl-2 gehemmt. Nach einem apoptoseauslösenden Stimulus werden BH3-only-Proteine aktiviert und behindern Bcl-2 bei der Inaktivierung der proapoptotischen Bcl-2-Proteine. Zusätzlich führen sie zu einer Konformationsänderung der Bax- und Bak-Proteine, die oligomerisieren und Poren in der Mitochondrienmembran bilden, durch diese können nun pro-apoptotische Faktoren wie Cytochrom C ins Zytosol freigesetzt werden (modifiziert nach [107]).

1.4 Fragestellung

Anhand des oben Geschilderten stellen wir die Hypothese auf, dass *M. catarrhalis* ebenfalls in der Lage sein könnte Apoptose pulmonaler Epithelzellen zu induzieren und somit eine Infektion bzw. Kolonisierung mit *M. catarrhalis* einer Emphysementstehung Vorschub leistet. Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

1) Führt eine Infektion mit *M. catarrhalis* zur Apoptoseinduktion von pulmonalen Epithelzellen ?

2) Welchen Einfluss hat die Interaktion *M. catarrhalis*-spezifischer Oberflächenproteine mit auf den Epithelzellen exprimierten Rezeptoren auf die Apoptoseinduktion ?

3) Welche Apoptose assoziierten Signalwege (mitochondrialer vs. extrinsischer Weg) werden nach Infektion mit *M. catarrhalis* in pulmonalen Epithelzellen aktiviert ?

4) Ist die Apoptoseinduktion pulmonaler Epithelzellen nach Infektion mit *M.catarrhalis* auch caspasenunabhängig möglich?

2 Materialien

2.1 Bakterienkultur

2.1.1 *Moraxella catarrhalis*

Der aus einem Patienten isolierte *M. catarrhalis* Wildtypstamm O35E (Serotyp A) [118] und die UspA1 defiziente Mutante von O35E (O35E.1) konnten uns freundlicherweise von Eric Hansen (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA) zur Verfügung gestellt werden. Weiterhin verwendeten wir den UspA1-exprimierenden *M. catarrhalis*-Stamm ATCC 25238, den wir über ATCC (ATCC/LGC Standards GmbH Wesel) bezogen.

2.1.2 Agarplatten und BHI-Medium

Eine zuvor autoklavierte Agarlösung, bestehend aus Brain-Heart-Infusion-Medium (BHI) (37 g BHI-Pulver auf 1 L dH_2O) unter Zusatz von 5 % Schafsblut, wurde als Bakteriennährboden in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm gefüllt.

2.2 Zelllinien und Zellkultur

Die epitheliale A549-Zelllinie haben wir über die *American Type Culture Collection* (ATCC/LGC Standards GmbH Wesel) bezogen. Es handelt sich um Zellen eines pulmonalen Adenocarcinoms, welche als Modell für humane Typ II Pneumozyten genutzt werden [119, 120]. Für die Versuche verwendeten wir die Passagen 10 bis 35. A549-Zellkulturmedium: 500 ml Ham´s F12 Medium (PAA Laboratories) wurden mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 200 mol/l L-Glutamin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt.

Bei der HeLa-Zelllinie handelt es sich um Zellen eines cervikalen Adenocarcinoms, die wir ebenfalls über ATCC bezogen. In der Forschung ist sie die älteste und am häufigsten verwendete Zelllinie [121]. Zur Herstellung stabiler CEACAM1-exprimierender HeLa-Zellen wurde der mit CEACAM1 und cDNA geklonte Expressionsvektor pcDNAI NEO (Stratagene) in HeLa-Zellen mittels Lipofektion transfiziert. Die stabil transfizierten Zellen wurden aus einem Zellkulturmedium, welches 1 mg/ml Geneticin enthält, selek-

tiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von CEACAM1 auf der Zelloberfläche der jeweiligen Klone bestimmt. Ein HeLa-CEACAM1-Klon mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von 120 FU wurde für die weiteren Versuche verwendet. Die HeLa-Zellen und HeLa-CEACAM1-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von Penicillin, Streptomycin, 10 % hitzebehandelten Kälberserum und 0,6 mg/ml G418 gezüchtet. 12 Stunden vor Beginn der Experimente wuchsen die Zellen in Antibiotika-freiem Medium.

Die primären humanen *small airway epithelial cells* (SAEC) bezogen wir von Clonetics/Cambrex (Walkersville USA) und kultivierten sie mittels des SAEC BulletKit. Bei den Zellen handelt es sich um respiratorische Epithelzellen der distalen Atemwege. Verwendet wurden diese Zellen in Passage drei.

Vor einer Verwendung in den Versuchen ließen wir alle Zellarten bis zu einem Konfluenzgrad von ca. 80% wachsen.

Fetales Kälberserum* (FCS)	PAA Laboratories, Wien
L-Glutamin	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
Medium HAM`s F12	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Sigma Chemical, Steinheim
PBS+/+ (mit Ca^{2+} und Mg^{2+})	Biochrom AG, Berlin
PBS-/-	PAA Laboratories, Wien
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Carlsbad USA
Geniticin (G418 Sulfate)	Sigma Chemical, Steinheim
Trypsin-EDTA	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
SAEC BulletKit	Clonetics/Cambrex, Walkersville USA
CA-650	Life Technologies, Carlsbad USA
Triton X-100	Sigma Chemical, Steinheim
4-Dichloroisocumarin	Sigma Chemical, Steinheim

Pan-caspase Inhibitor (zVAD)	Calbiochem, Darmstadt
Caspase-3 Inhibitor (C3-InhVII)	Calbiochem, Darmstadt
Caspase-6 Inhibitor (Z-VEID-FMK))	Calbiochem, Darmstadt
Caspase-8 Inhibitor (Z-IETD-CHO)	Calbiochem, Darmstadt
Caspase-9 Inhibitor (Z-LEHD-CHO)	Calbiochem, Darmstadt
TNF-α	Roth
Cyclohexamid	Merck
Bax-inhibiting Peptide (BIP V5)	Merck
Negative control peptide (BIP NC)	Merck

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

Zellkulturflaschen T75	BD Biosciences Pharmingen
Petrischalen 10 cm Durchmesser	Nunc, Dänemark
Well-Platten (mit 6 / 8 / 24 Vertiefungen)	Nunc, Dänemark
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Falcon
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Zentrifuge 48 RC, Rotanta RPC	Hettich
Zellkultur Inkubator	Hereaus
Sterilbank Laminair HB 2448	Hereaus
Mikroskop BX 60	Olympus, Hamburg
Laborwaage	Sartorius
UVC 500 UV Crosslinker-Lichtgerät	Hoefer

Thermomixer comfort	Eppendorf
Spektralphotometer Uvicon UV 860	Kontron, München
Systec V-65 (Sterilisator)	Heraeus

2.3 Messung der Laktatdehydrogenase (LDH)

Cytotoxicity Detection Kit	Boehringer, Mannheim

2.4 Messung der Caspasenaktivität

ApoTarget	Biosource
Fluoro-Max-2	ISA

2.5 Messung der Apoptoserate

Cell Death Detection ELISA Plus	Roche

2.6 Western Blot

Phosphoproteinwaschpuffer:		**Lyse-Puffer für Proteinextraktion:**	
NaF Stocklsg. Konz.	50 ml	EDTA 0,25 mM	1 µl
$Na_2P_2O_7$ Konz.	70 ml	PMSF 1 mM	10 µl
Na_3VO_4 Konz.	5 ml	NP-40 1 %	50 µl
PBS 1×	ad 500 ml	Antipain, Leupeptin, Pepstatin	je10 µg/ml
		Phosphoproteinwaschpuffer	ad 1000 µl

NaF	Merck, Darmstadt
$Na_2P_2O_7$	Merck, Darmstadt

Na_3VO_4	Merck, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt
Antipain, Leupeptin, Pepstatin	Sigma, Deisenhofen

Lösung für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford:

Bradfordreagenz	2 ml	Bio-Rad, München
dH_2O	8 ml	

Auftragepuffer nach Lämmli:

Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	1,0 ml	Roth, Karlsruhe
Glycerol 100 %	0,8 ml	Merck, Darmstadt
SDS 10 %	1,6 ml	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau 1 %	0,4 ml	Pharmacia Biotech, Freiburg
ß-Mercaptoethanol 1%	0,4 ml	Sigma, Deisenhofen

Sammelgel:	**Trenngel:**
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8
SDS 10 %	SDS 10 %
Acrylamidlösung (19 : 1)	Acrylamidlösung (19 : 1)
dH_2O	dH_2O
Ammoniumpersulfat 10 %	Ammoniumpersulfat 10 %
TEMED 0,05 %	TEMED 0,05 %

Die prozentuale Zusammensetzung des Trenngels wurde an das molekulare Gewicht des Zielproteins angepasst.

Sodium-Dodecylsulfate (SDS)	Serva, Heidelberg
Acrylamidlösung	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
TEMED	Serva, Heidelberg

Blotting-Puffer (10×):

Tris-Base	15 g
Glycerol	72 g
dH_2O	ad 500 ml

Blotting-Puffer (1×):

Blotting 10×	80 ml
Methanol	200 ml
dH_2O	ad 720 ml

Antikörperinkubationslösung:

Odyssey Blocking Buffer	50 %	Li-Cor, Homburg
PBS (1×)	50 %	
Tween	0,1 %	Sigma Chemical

Ponceau-S-Proteinfärbung:

Ponceau S	1 g	
Eisessig	50 ml	Merck, Darmstadt
dH_2O	ad 1000 ml	

Primäre Antikörper:

Procaspase 3	Upstate Biotechnology
Cleaved Caspase 6	Cell Signaling

Procaspase 8	Biosciences Pharmingen
Procaspase 9	Santa Cruz Biotechnology, Hamburg
ERK2	Santa Cruz, Hamburg
Bax	Upstate Biotechnology
Bcl-2	Upstate Biotechnology
AIF	Upstate Biotechnology

Sekundäre Antikörper:

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

Blotmembran Immobilion-P PVDF-Membran	Millipore, Eschborn
Blotpapier	Roth, Karlsruhe
Proteinlaufhöhenmarker BOA-Marker	Biomol, Hamburg
Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer	Bio-Rad, München
Odyssey Infrared Imaging System + Software	Li-COR, Homburg

2.7 Elektronenmikroskop

Glutaraldehyd

Phosphatpuffer

Osmiumtetroxid

PBS

Uranylazetat

Bleizitrat

Epon 812 (Serva)

EM 906 Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss)

3 Methoden

3.1 Bakterienkultur

Auf längere Zeit wurden die *M. catarrhalis*-Stämme als Glycerinstocks bei -80 °C gelagert, während die für laufenden Versuche benötigten Stämme bei -20 °C in Gefriermedium zwischengelagert wurden. Für die Versuche wuchsen die auf BHI-Agarplatten ausgestrichenen Bakterien über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2. Anschließend wurden die Bakterienkolonien von den Agarplatten abgeerntet, in BHI-Medium angereichert und für zwei bis drei Stunden bis zur mid-log Phase (OD 0,4-0,6) bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Sodann wurden die Bakterien durch Zentrifugieren bei 3000 rpm gesammelt, im antibiotikafreien Zellkulturmedium resuspensiert und konnten nach Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 405 nm (OD 0,3 ≈1 x 10^6 cfu/ml) für die Infektion der Epithelzellen verwendet werden.

Um sich zu vergewissern, dass die Bakterien im Zellkulturmedium überleben, wurde über die Zeit die optische Dichte (OD) der Suspension bei 405 nm gemessen. Es konnte eine Zunahme der OD beobachtet werden. Durch Zählen der koloniebildenden Einheiten (*colony-forming units* ≈ cfu) bei verschiedener OD der *M. catarrhalis*-Suspension konnte gezeigt werden, dass *M.catarrhalis* im Zellkulturmedium überleben und sich sogar vermehren.

3.2 Zellkultur

Die Kultivierung der A549-Zellen fand für drei bis vier Tage in T75-Zellkulturflaschen unter Zusatz von 10 ml des entsprechenden Zellkulturmediums bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank statt. Bei Konfluenz der Zellen, wurden diese entweder auf sechs- oder 24-Well-Platten gesplittet. Dafür wurden die Zellen einmalig mit PBS-/- gewaschen, mit 2 ml Trypsin-EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst und in 10 ml Zellkulturmedium suspensiert. Die Zelllösung wurde auf die Kulturgefässe verteilt und die erforderliche Menge an Zellkulturmedium hinzugefügt.

3.2.1 Infektion von humanen Zellen

Die Zell-Monolayer wurden eine Nacht vor der Infektion auf antibiotikafreies Zellkulturmedium umgestellt. Zum Erreichen einer bestimmten MOI (*multiplicity of infection*) wurde zunächst die Zellzahl der in einem Well konfluent gewachsenen Lungenepithelzellen mittels der Neubauer Zählkammer bestimmt (Zellen/ml). Außerdem war bekannt, dass eine Bakteriensuspension mit einer OD von 0,3 bei 405 nm einer Bakterienanzahl von $1x10^6$ cfu/ml entspricht. Mittels dieser beiden Angaben ließ sich anschließend durch Verdünnen der Bakterienlösung mit antibiotikafreien Zellkulturmedium die Bakterienkonzentration erstellen, die bei der Infektion der Monolayer zur entsprechenden MOI führen sollte. Für die Versuche wurden MOI von 0,1, 1 und 10 Bakterien pro Zelle eingesetzt. Die infizierten Zelllayer wurden dann bei 37°C und 5 % CO_2 für die erforderliche Inkubationszeit gelagert. Als Negativkontrollen dienten Zelllayer, denen zeitgleich die entsprechende Menge Zellkulturmedium zugeführt wurde. Den Zelllayern, die als Positivkontrollen dienten, wurde zum Zellkulturmedium CFX (Ceftriaxon) und TNF-α in der benötigten Konzentration zugegeben.

3.3 Messung der Laktatdehydrogenase

Mit Hilfe des kalorimetrischen Enzymassays „*Cytotoxicity Detection Kit*“ wurde die Aktivität der von nekrotischen Zellen in den Zellüberstand freigesetzten Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt. Das Prinzip der Messung basiert auf der Oxidation von Laktat zu Pyruvat und der Reduktion von NAD^+ zu $NADH/H^+$ durch LDH. In eine Mikrotiterplatte wurden 100 µl des Zellüberstandes mit 100 µl Assaylösung pipettiert, worauf die enzymatische Übertragung der zwei Wasserstoffatome des NADH/H+ auf das gelbe Tetrazoliumsalz INT(2-(4-Iodeophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-Phenyltetrazoliumchlorid) per Diaphorase erfolgte. Bei 490 nm konnte dann die Adsorption des Reaktionsproduktes (rotes Formazansalz) gemessen werden. Die LDH-Aktivität wurde im Verhältnis zur gesamt LDH der Kontrollzellen (behandelt mit 2 % Triton X-100) angegeben und mit folgender Formel nach Roché® berechnet:

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

Des Weiteren erfolgte eine morphologische Beurteilung der Zellen mittels Betrachtung durch das Mikroskop.

3.4 Quantifizierung der Apoptose mittels ELISA

Die Apoptose wurde mit Hilfe eines kalorimetrischen Sandwich ELISAs der Firma Roché® (*Cell-Death-Detection ELISA plus*®) gemessen. Mit diesem Assay ist es möglich die DNA-Fragmentierung (Endonukleolyse) bei Apoptose nachzuweisen. Die DNA wird an den frei zugänglichen Inter-Histon-Abschnitten geschnitten, wodurch histongebundene Mono- und Oligonukleosomen mit einer Länge von 180 Basenpaaren entstehen. Die im 24-Well konfluent gewachsenen und stimulierten Zellen wurden bei 200 g für 10 Minuten zentrifugiert und für 1,5 Stunden mit einem Lyse-Puffer inkubiert. Um die histongebundenen Mono- und Oligonukleosomen aus dem Überstand zu gewinnen wurde anschließend erneut zentrifugiert. 20 µl des Überstandes mit Nukleosomen wurden in eine mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte gegeben und mit 2-murinen monoklonalen Antikörper inkubiert. Über biotinylierte Anti-Histon-Antikörper kam es zur Bindung der Histon-DNA-Fragmente an Streptavidin, worauf eine Markierung mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti–DNA-Antikörper erfolgte. Die Histon-DNA-Fragmente konnten dann nach Umwandlung des ABTS (2,2´-Azino-di(3-Ethylbenzthiazolinsulfonat))-Substrates quantitativ bestimmt werden, indem die Adsorption bei 495 nm gemessen wurde.

3.5 Fluorometrische Caspase -3-, -8-, -6-, -9-Aktivitäts-Assays

Mit Hilfe dieser Assays lassen sich die Aktivitäten der Caspasen-3, -6, -8 und -9 bestimmen. Für jede dieser Caspasen gibt es spezifische Enzyme, welche hinter dem Aspartat-Rest des Substrats in einer bestimmten Peptidsequenz schneiden, woraus sich die Spezifizität ergibt.

Damit die Darstellung dieses Vorgangs ermöglicht werden kann, werden die Substrate an das Fluorochrom 7-amino-4-trifluoromethyl Coumarin (AFC) gekoppelt. Eine Abspaltung des flourochromen AFC´s und somit ein Farbumschlag von blau zu grün, erfolgt, wenn die Probe die gesuchte Caspase enthält. Bei einer Exzitation von 400 nm und

einer Emission von 505 nm lassen sich dann die Caspasen mit einem Fluorometer quantifizieren.

Die Lungenepithelzellen wurden für diesen Versuch bis zur Bildung eines gleichmäßigen Monolayers in einer speziellen schwarzen 96-well-Platte mit durchsichtigem Boden kultiviert und dann mit den erforderlichen Stimulanzen behandelt. Den Zellen wurde 1 M Dithiothreitol-Lösung (DTT 1:1000) zugegeben und anschließend wurden sie mit 50 µl des mitgelieferten Assay-Puffers behandelt. Lichtgeschützt erfolgte die Zugabe von 10 µl des AFC-gekoppelten Substrats und sofort wurde die Grundaktivität gemessen.

Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37 °C wurde durch erneutes Messen die Endaktivität bestimmt. Parallel lief eine Pufferkontrolle, so konnte die tatsächliche Caspasenaktivität aus der Differenz der Endaktivität (2 h-Wert) und der Grundaktivität (0 h-Wert) ermittelt werden, wobei die Aktivitätsangabe in RFU (*Relative Fluorescence Units*) erfolgte.

3.6 Western Blot

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

3.6.1 Proteinextraktion

Die in einer 6-Well-Platte konfluent gewachsenen und stimulierten Zellen wurden auf Eis mit kaltem PBS gewaschen, mit je 60 µl Lysepuffer abgelöst und anschließend mit einem Zellschaber abgeschabt. Das so gewonnene Zelllysat wurde dann in Eppendorf-Reaktionsgefäßen für 3 min bei 4 °C und 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand kam in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße, wovon 5 µl zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet wurden. Der Rest des Überstands wurde bei -20 °C zur Aufbewahrung eingefroren.

3.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Vorausgesetzt, dass keine interferierenden Substanzen vorliegen, ermöglicht das BioRad Protein-Assay die Quantifizierung von Proteinen. Das Prinzip des Verfahrens

basiert auf der Verlagerung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brillant Blue®, der durch Bindung basischer und aromatischer Aminosäuren sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verändert.

Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit von 5 µl der Proteinlösung in 1000 µl der 1:5 verdünnten Farbstofflösung kam es zum Farbwechsel von grünbraun zu blau. Die Absorption wurde bei 595 nm in einem Spektralphotometer gemessen, und mit Hilfe einer zuvor erstellten Albumin-Standardkurve konnte nun die entsprechende Proteinkonzentration bestimmt werden.

3.6.3 Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

An das Polypeptidgerüst der Proteine bindet das anionische Detergens SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) in einem Massenverhältnis von 1,4:1. In Folge dessen erhalten die Proteine ihrer Länge entsprechend eine negative Außenladung und können nach ihrer jeweiligen Molekülgröße im Gel aufgetrennt werden.

Das Gel wurde abhängig von der Molekülgröße der gesuchten Proteinen hergestellt: für Caspase-3, -8, -6, -9 10 % und für Bcl-2, Bax und AIF 12,5 %. Der Vernetzungsgrad des Gels wird durch das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid bestimmt und betrug 19:1.

Das Protein wurde zunächst mit β-Mercaptoethanol-haltigen Gelladepuffer in einem Verhältnis von 1:1 versetzt und dann für drei Minuten unter Schütteln auf 95 °C erhitzt, bevor es auf das SDS-Gel aufgetragen wurde. Nach Abkühlen wurden je 80 µg Protein separat in je eine Geltasche aufgetragen. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde ein Marker (Amersham Rainbow high) eingesetzt. Die anschließende zweistündige Elektrophorese lief in BioRad Mini-Gel-Kammern im Laemmli-Puffer-System bei 100 V.

3.6.4 Protein-Blot und Antikörperexposition

Zur Detektion der getrennten Proteine wurden diese auf eine Membran übertragen. Dieser Transfer nutzt das Streben der negativ geladenen Proteine zur Anode. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig aus der Elektrophoresekammer entnommen und für 15 Minuten im eisgekühlten Blotting-Puffer äquilibriert. Um störende Luftblasen zu beseitigen wurde das Trenngel auf einer puffergetränkten Hybond-Nitrozellulosemembran (Amersham) mit einem sauberen Reagenzglas ausgerollt. Auf jede Seite der Trenngel-Membran-Vorrichtung kamen je zwei puffergetränkte Lagen 3M-

Whatman-Filterpapiere, so dass ein Sandwich gebildet wurde, welches dann in die Blotvorrichtung (Transblot, München) gemäß Herstellerangaben eingespannt wurde. Das gesamte System wurde nun zum Proteintransfer in die Blotkammer überführt und mit eiskalten Blotpuffer bei 100 V, 4 °C und maximaler Stromstärke für eine Stunde geblottet. Um zu überprüfen ob der Transfer erfolgreich war, wurde die Membran reversibel mit Ponceau-S gefärbt. Zur Entfärbung wurde die Membran in Aqua bidest gewaschen.

Antikörperexposition:

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran mit Odyssey Licor Biosciences Block-Puffer® für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Danach wurde sie für eine Stunde (bei Raumtemperatur) bzw. über Nacht (bei 4 °C) mit einem primären Antikörper gegen das Zielprotein im frischen Blockpuffer exponiert. Nach dreimaligem, jeweils fünfminütigem Waschen in Waschpuffer wurde anschließend bei Raumtemperatur und in Dunkelheit für 45 Minuten mit einem an IRDye800 oder an Cy5.5 gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert und anschließend dreimal gewaschen, wobei der letzte Waschgang ohne Zusatz von Tween erfolgte. Die ermittelte optimale Antikörperverdünnung lag für die primären Antikörper bei 1:1000 und für die sekundären Antikörper bei 1:2000.

3.6.5 Detektion

Die Detektion der an den primären Antikörper gebundenen sekundären Antikörper (IRDye500, Cy5.5) erfolgte mit dem lasergestützten Odyssey Infrared Imaging System. Zur Bearbeitung wurde eine entsprechende Software nach Herstellerangaben genutzt. So konnten nicht nur die Proteinbanden dargestellt sondern auch ihre Intensität bestimmt werden.

3.7 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Lungenepithelzellmonolayer wurden für zwei Tage in einer Lösung aus 2,5 % Glutaraldehyd und 0,06 mol/L Phosphatpuffer (pH 7,3) fixiert. Die Proben wurden anschließend für zwei Stunden mit Osmiumtetroxid (OsO_4) nachfixiert und dreimal mit PBS gespült. Die Dehydration der Zellen erfolgte schrittweise mittels einer Reihe von unterschiedlichen Alkoholkonzentrationen. In Epon 812 (Serva) erfolgte dann die Ein-

bettung der Proben. Anschließend wurden ultradünne Schnitte angefertigt, die nach Anfärbung mit Uranylazetat und Bleizitrat unter einem EM 906 Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss) untersucht werden konnten. Diese Untersuchungen erfolgten in Kollaboration mit Prof. Sebastian Bachmann am Institut für Anatomie der Charité Berlin.

3.8 Cytochrom C ELISA

Das *Cytochrom C ELISA Kit* (Calbiochem) diente der quantitative Bestimmung von Zytochrom C (CytC) aus dem Zelllysat der untersuchten Zellen. Das Assay funktioniert nach dem Prinzip eines Sandwich Enzym Immunoassays. In die mit monoklonalen Antikörpern gegen CytC beschichteten Wells wurden die Proben gegeben wonach das enthaltene CytC an diese gebunden wurde. Nach dem Waschen der Wells wurde ein zweiter enzymgekoppelter CytC-spezifischer monoklonaler Antikörper hinzugegeben. Nach erneutem Waschen und Zugabe einer Substratlösung kam es zu einem Farbumschlag, der in seiner Intensität proportional zum gebundenen CytC stand.

3.9 Statistische Auswertung und Software

Die Ergebnisse wurden als Einwegvarianzanalyse für unverbundene Stichproben statistisch ausgewertet. Zur Prüfung der Differenzen unter den Proben diente der Newman-Keuls-Test und die Signifikanz wurde mit $p < 0{,}05$ angenommen. Die verwendete Software, Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA), wurde außerdem auch für die meisten Abbildungen und die Berechnung der Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen (± SD) herangezogen.

3.10 Subzelluläre Fraktionierung

Zur subzellulären Fraktionierung wurde ein Kit von Enzo Life Sciences (Mitochondria/Cytosol fractionation Kit) nach Vorgaben des Herstellers eingesetzt. Die subzelluläre Fraktionierung dient der Auftrennung apoptotischer und nicht-apoptotischer Säuger-Zellen in eine mitochondriale und eine zytosolische Fraktion. Die Isolation erfolgt durch wiederholte Zentrifugation und Homogenisation mittels Homogenisationspuffer (DTT, Proteaseinhibitoren). Produkte des Verfahrens sind eine

stark angereicherte mitochondriale Fraktion sowie eine zytosolische Fraktion. Anschließend können die einzelnen Fraktionen im Westernblotverfahren aufgetrennt werden und so Aufschluss über aktivierte Signalwege der Apoptose liefern.

4 Ergebnisse

Im Fokus dieser Arbeit steht, ob *M. catarrhalis* in der Lage ist Apoptose in pulmonalen Epithelzellen zu induzieren, und welche Faktoren zur Apoptoseinduktion durch *M. catarrhalis* beitragen. Insbesondere soll geprüft werden, welchen Einfluss die Moraxella spezifischen Oberflächenproteine wie UspA1 und der auf humanen pulmonalen Epithelzellen exprimierte und *M. catarrhalis* UspA1 bindende Rezeptor CEACAM1 auf die Apoptoseinduktion besitzen und welche apoptotischen Signalkaskaden aktiviert werden. Zunächst stand die benötigte Bakterienkonzentration und Inkubationsdauer zur Induktion der Apoptose im Vordergrund der Experimente. Darauf aufbauend interessierte, welche Caspasen aktiviert werden, ob eine caspasenunabhängige Apoptoseinduktion stattfindet und ob mitochondriale Signalkaskaden involviert sind. Es folgten weiterhin Versuche, in denen die Rolle des bakteriellen Oberflächenproteins UspA1 für die Apoptoseinduktion sowie dessen Interaktion mit CEACAM1 untersucht wurden.

4.1 Apoptoseinduktion durch *M. catarrhalis* in humanen alveolaren Epithelzellen

Um die Auswirkung einer Infektion des Lungenepithels durch *M.catarrhalis* zu untersuchen, haben wir SAE- und A549-Zellen mit dem *M.catarrhalis*-Stamm O35E in unterschiedlicher Dosierung und Zeitdauer infiziert. Mittels TEM (Transmissionselektronenmikroskopie) konnten darauf die charakteristischen Veränderungen der Zellmorphologie, die bei Apoptose auftreten, bei beiden Zelllinien beobachtet werden. So zeigten die infizierten A549-Zellen in Abbildung 6 (Abb. 6), im Gegensatz zu den Negativkontrollen, die für die Apoptose typische Morphologie wie Kondensation des Chromatins und Margination des Zellkerns (Abb. 6b). Sowohl bei den SAE- als auch in den A549-Zellen konnten, wie in Abb. 6c und 6e gezeigt, Phänomene wie nukleäre Fragmentierung, Zellschrumpfung und -blebbing beobachtet werden. In Abb. 6e ist sogar zu erkennen, dass intrazelluläre Organellen wie das ER sich lösen und beginnen mit der Zellmembran zu verschmelzen, um Vakuolen zu bilden. Dies steht im deutlichen

Gegensatz zum Erscheinungsbild unbehandelter Zellen wie in Abb. 6 a und d mit unveränderten Zellkernen und gleichmäßig verteilten Chromatin sowie intakten Zellorganellen. Diese Beobachtungen lassen uns auf eine durch *M.catarrhalis* induzierte Apoptose in pulmonalen Epithelzellen schließen.

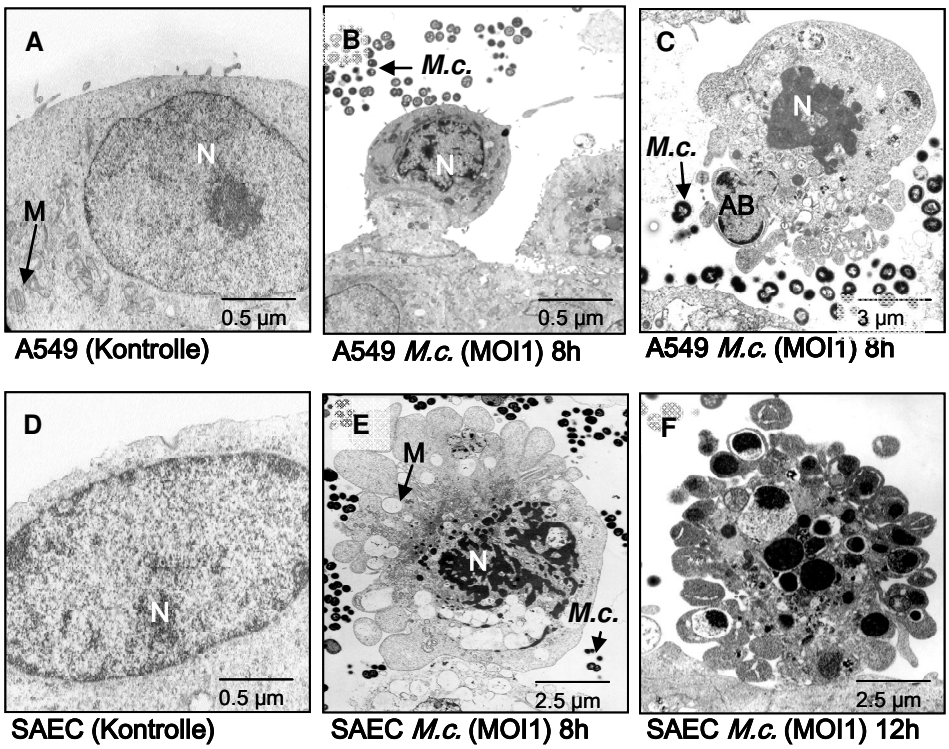

Abb.6: Apoptose in pulmonalen Epithelzellen induziert durch *M.catarrhalis*

Die Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt *M. catarrhalis*-induzierte Apoptose in A549- (*B* und *C*) und *Small Airway Epithelial Cells* (SAEC) (*E* und *F*). In beiden Zelltypen sind acht Stunden nach *M. catarrhalis*-Exposition Zellschrumpfung, Chromatinkondensation im Nukleus und zelluläre sowie nukleäre Fragmentationen sichtbar (*B*, *C* und *E*). *F* zeigt 12 h nach Infektion mit *M. catarrhalis* die komplette Fragmentation der apoptotischen SAEC in kompakte apoptotische Körperchen (engl. *apoptotic body*). Nichtinfizierte Zellen (Kontrollen) sind in den Bildern *A* (A549) und *D* (SAEC) zu sehen. AB, apoptotic body; M, Mitochondrium; N, Nukleus; *M.c.*, *M. catarrhalis*

4.2 Apoptoseinduktion in pulmonalen Epithelzellen durch *M. catarrhalis* und deren Abhängigkeit von der UspA1-Expression

Um die Apoptoseinduktion in pulmonalen Epithelzellen durch *M. catarrhalis* zu untersuchen, wurden SAE- und A549-Zellen mit dem *M. catarrhalis*-Stamm O35E für unterschiedliche Dauer und mit verschiedenen MOIs infiziert. Und zwar in Konzentrationen von 0,1, 1 und 10 MOI für jeweils 4, 8 und 24 h. Verglichen wurde mit einer nicht infizierten Negativkontrolle und einer mit TNF-α und Cyclohexamid behandelten Positivkontrolle. (Abb. 7 a). Wie in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, führt die Zugabe von TNF-α und Cyclohexamid in allen Zellen von Säugern mit Nukleus zur Apoptoseinduktion [35, 85], weshalb wir diese Stimulanzien als Positivkontrolle verwendeten. Die Apoptoserate konnte über die Messung der DNS-Fragmentation mit dem *Cell Death Detection ELISA Plus* von Roché quantitativ bestimmt werden. In Abb. 7 a und b sieht man, dass es nach einer Inkubationszeit von 8 h mit O35E in beiden Zellarten zu einer erhöhten DNS-Fragmentation kommt. Das Signal der durch *M. catarrhalis* ausgelösten Apoptose war in der Messung ähnlich hoch wie das Maximalsignal der Positivkontrolle.

Bei der anschließenden vergleichenden Untersuchung des *M. catarrhalis*-Stamm O35E und dem UspA1-exprimierenden Stamm ATCC 25238 [62, 122], konnten, wie in Abb.7 zu sehen, bezüglich der Apoptoseinduktion sowohl bei den primären SAE-Zellen als auch beiden A549-Zellen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Abb. 7 c zeigt, dass beim Einsatz der UspA1-defizienten Mutante O35E.1 nach 8 h Infektionszeit eine signifikant geringere DNS-Fragmentation als bei einer Infektion mit dem Wildstamm O35E nachgewiesen werden konnte. Aus dieser Beobachtung schlossen wir, dass das Oberflächenprotein UspA1 eine wichtige Rolle bei der durch *M.catarrhalis* induzierten Apoptose in pulmonalen Epithelzellen spielt. Um die Induktion einer Zellnekrose auszuschließen, wurden die Überstände der infizierten Zellen auf erhöhte Laktatdehydrogenasewerte (LDH-Werte) untersucht und mit denen der nicht infizierten Zellen verglichen. Wie in Abb. 8 zu sehen, ist kein signifikanter Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen gemessen worden.

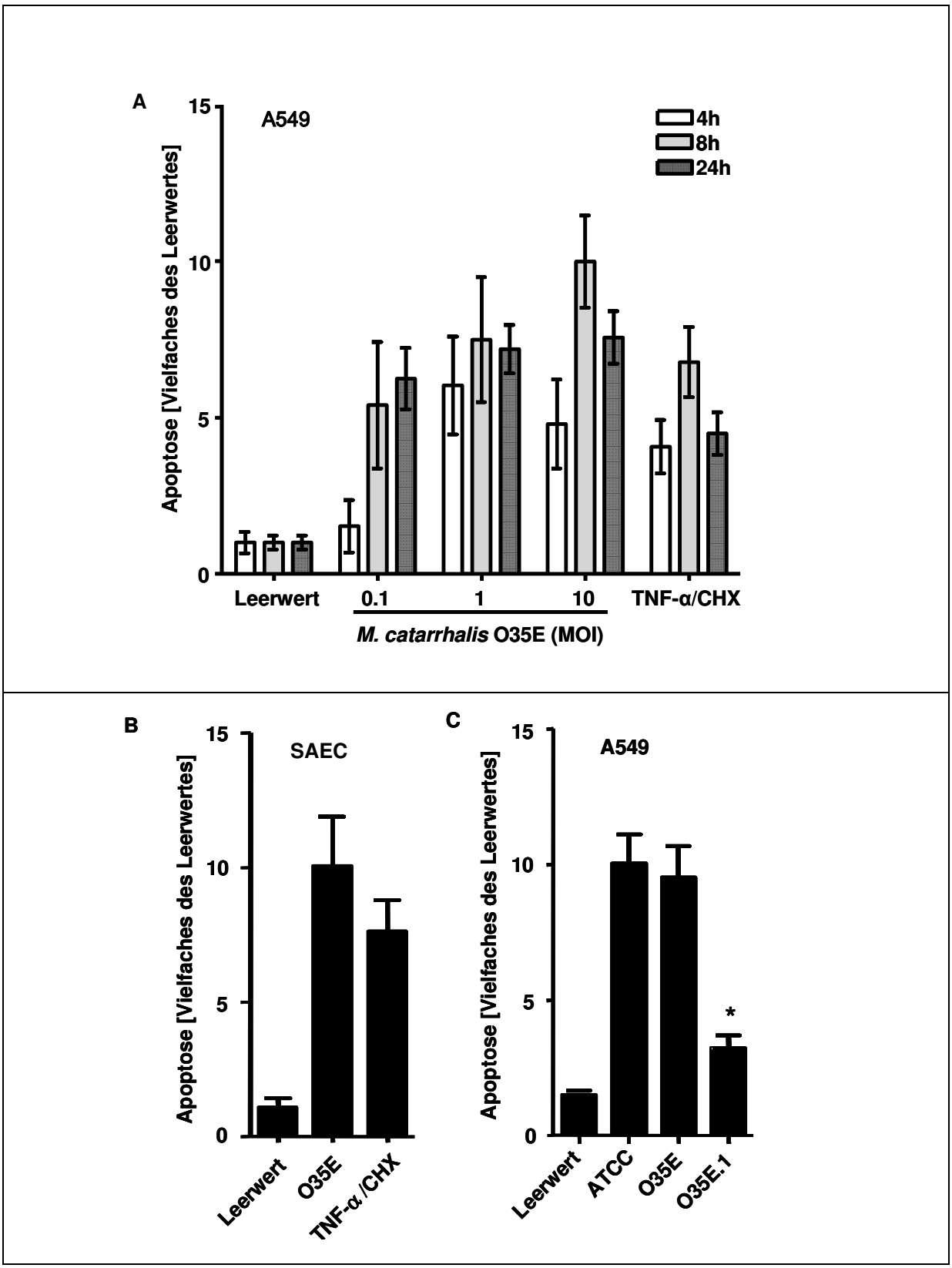

Abb.7: Zeit- und dosisabhängig induzierte Apoptose durch *M. catarrhalis* und Auswirkung der *M. catarrhalis* UspA1-Expression

A549-Zellen (*A*) und SAEC (*B*) wurden für unterschiedliche Zeitdauer mit dem *M. catarrhalis*-Stamm O35E infiziert oder mit Tumor Nekrose Faktor(TNF)-α (10 g/mL) plus Cyclohexamid

(CHX; 5 µg/mL) inkubiert. Dargestellt ist die DNS-Fragmentation nach verschiedenen Inkubationszeiten in infizierten Zellen verglichen mit nicht infizierten Zellen (Leerwert). In B beträgt die MOI 1 und die Inkubationszeit 8 h. *C*, A549-Zellen wurden mit dem UspA1-exprimierenden *M. catarrhalis* Referenzstamm ATCC 25238 (ATCC) [62], dem Stamm O35E (O35E), dem UspA1-defizienten Stamm O35E.1 (O35E.1) (jeweils MOI = 1) oder mit TNF-α (10 g/mL) plus CHX (5 µg/mL) für 8 h inkubiert. Gemessen wurde die DNS-Fragmentation, wiedergegeben als Vielfaches des Leerwertes. Die Abbildungen zeigen den Mittelwert der Ergebnisse aus drei verschiedenen Versuchen. *P < 0,05 verglichen mit O35E.

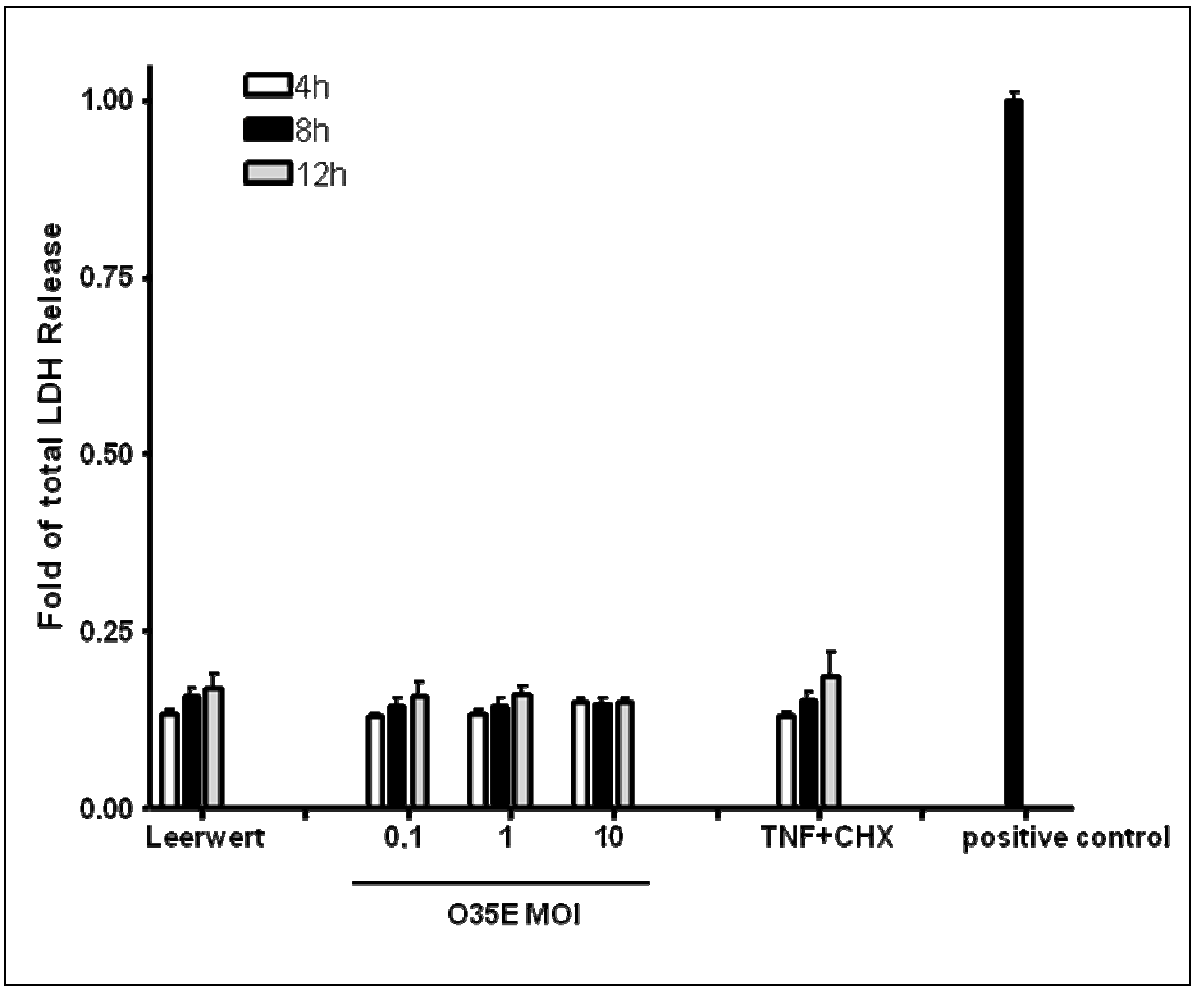

Abb.8: Messung der LDH im Überstand aus mit *M. catarrhalis* infizierten A549-Zellen

A549-Zellen wurden für unterschiedliche Zeitdauer mit dem *M. catarrhalis*-Stamm O35E verschiedener MOIs infiziert oder mit Tumor Nekrose Faktor(TNF)-α (10 g/mL) plus Cyclohexamid (CHX; 5 µg/mL) inkubiert. Gemessen wurde die LDH Konzentration im Überstand, wiedergegeben als ein Vielfaches des Leerwertes. *P < 0,05 verglichen mit O35E.

4.3 CEACAM1-Abhägigkeit für die durch *M. catarrhalis* Induzierte Apoptose

Wie schon in anderen Studien gezeigt wurde [70], fungiert CEACAM1 im respiratorischen Epithel als pattern recognation rezeptor für das *M. catarrhalis*-Protein UspA1. Um nun die Bedeutung für die durch *M. catarrhalis* induzierte Apoptose in pulmonalen Epithelzellen zu erforschen, untersuchten wir zunächst mittels Immunoblot die CEACAM1-Expression aller in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien. Es konnte dabei eine signifikante Expression von CEACAM1 in den epithelialen Zelllinien A549, SAEC und den stabil mit CEACAM1-transfizierten und somit -exprimierenden HeLa-Zellen (HeLa-CC1) beobachtet werden. Als Negativkontrollen wurden nichttransfizierte HeLa-Zellen verwendet (Abb. 9a).

Nun war die Bedeutung der Interaktion zwischen CEACAM1 und UspA1 für die Apoptoseinduktion durch *M. catarrhalis* in pulmonalen Epithelzellen von großem Interesse und Gegenstand weiterer Versuche. Hierzu wurden A549-Zellen mit dem CEACAM1-spezifischen Antikörper YTH.71.3 vorbehandelt, der die N-Domäne und damit die UspA1-Bindungsstelle des CEACAM1-Rezeptors blockiert [123] und anschließend mit verschiedenen MOI des *M. catarrhalis* Stammes O35E für 8 Stunden inkubiert. Wie in Abb. 9b dargestellt, wiesen in der Auswertung jene mit YTH.71.3 vorbehandelten Zellen eine weitaus geringere DNS-Fragmentation auf als die unbehandelten infizierten und die mit einem unspezifischen Antikörper (c-AB) vorinkubierten Kontrollzellen.

Um die wichtige Rolle, die CEACAM1 bei der Apoptoseinduktion durch *M. catarrhalis* in pulmonalen Epithelzellen zu spielen scheint, zu festigen, verglichen wir die Apoptoserate von HeLa- und stabil mit CEACAM1 transfizierte HeLa-Zellen (HeLa-CC1-Zellen) nach achtstündiger Infektion mit den *M. catarrhalis*-Stämmen O35E und O35E.1. Wie in Abb. 9c zu sehen, war die Apoptoserate nach Infektion mit O35E bei den transfizierten HeLa-CC1-Zellen signifikant höher als bei den normalen HeLa-Zellen. Des Weiteren war die DNS-Fragmentation bei den mit O35E.1 infizierten HeLa-CC1-Zellen signifikant niedriger als bei den mit dem Wildstamm infizierten HeLa-CC1-Zellen.

Die Ergebnisse dieser Versuche lassen den Schluss zu, dass die Interaktion von CEACAM1 und UspA1 einen großen Einfluss auf die durch *M. catarrhalis* induzierte Apoptose in Epithelzellen besitzt.

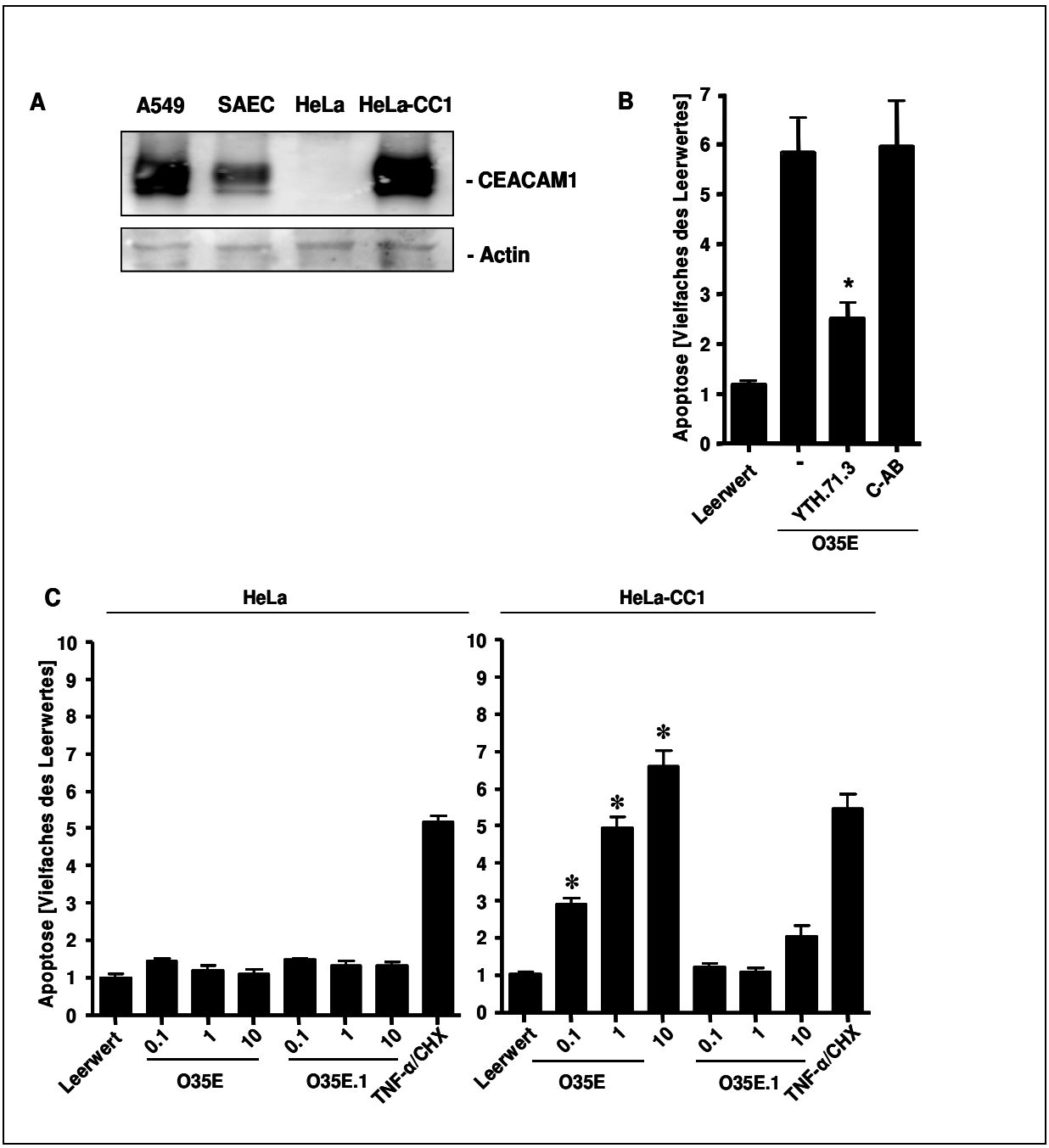

Abb. 9: CEACAM1-Expression in A549-Zellen und SAEC. Die Expression ist essentiell für die *M. catarrhalis*-spezifische UspA1-vermittelte Apoptose.

***A*, Expression von CEACAM1 in verschiedenen Lungenepithelzellen verglichen im Westernblot mit CEACAM1-transfizierten HeLa-Zellen (HeLa-CC1). *B*, DNS-Fragmentation nach 8 h Inkubation von A549-Zellen mit *M. catarrhalis*-Stamm O35E (MOI 1) alleine oder nach vorheriger Inkubation mit CEACAM1-bindenden Antikörper YTH.71.3. Als Kontrolle diente ein unspezifischer Maus-Antikörper (c-AB). *C*, DNS-Fragmentation in HeLa- und HeLa-CC1-Zellen nach 8 h Inkubation mit steigenden MOIs (0.1, 1, 10) des *M.catarrhalis*-Stammes O35E, des UspA1-defizienten Stammes O35E.1 oder mit Tumornekrosefaktor (TNF)-α (10 ng/mL) und Cyclohexamid (CHX) (5 µg/mL). Gemessen wurde die DNS-Fragmentation, wiedergegeben als Vielfaches des Leerwertes. * P < 0,05, verglichen mit dem Leerwert oder dem Wildtyp-Stamm O35E.**

4.4 Abhängigkeit der *M. catarrhalis*-Adhäsion an Epithelzellen von der Interaktion zwischen UspA1 und CEACAM1

Zur weiteren Untersuchung der Adhäsionseigenschaften von *M. catarrhalis* in Abhängigkeit des CEACAM1-Proteins wurden die CEACAM1-exprimierenden Zellen A549 und HeLa-CC1 verwendet. Wie in Abb. 10 a zu sehen, konnte dabei beobachtet werden, dass der *M. catarrhalis*-Stamm O35E sowohl an A549 als auch an HeLa-CC1 eine höhere Adhäsionsrate vorwies als an den HeLa-Kontroll-Zellen [61, 70]. Unsere Ergebnisse wiesen darauf hin, dass CEACAM1 zwar nicht essentiell für die Adhäsion von *M. catarrhalis* zu sein scheint aber diese in hohem Maße fördert.

Nach Infektion der CEACAM1-eprimierenden HeLa-CC1- sowie der nichttransfizierten HeLa-Zellen, einmal mit dem Wildstamm O35E und ein weiteres Mal mit der UspA1-defizienten Mutante O35E.1, wurde die Adhäsion der Bakterien an den Zellen gemessen. Bei beiden Zelllinien fiel die Adhäsionsrate nach Inkubation mit O35E.1 weitaus geringer aus als nach der Infektion mit O35E, wie in Abb. 10 b zu erkennen. Da bisher *M. catarrhalis* Apoptose nur in CEACAM1-exprimierenden HeLa-Zellen induzierte, scheint dieser Vorgang von der Interaktion zwischen UspA1 und CEACAM1 abhängig zu sein.

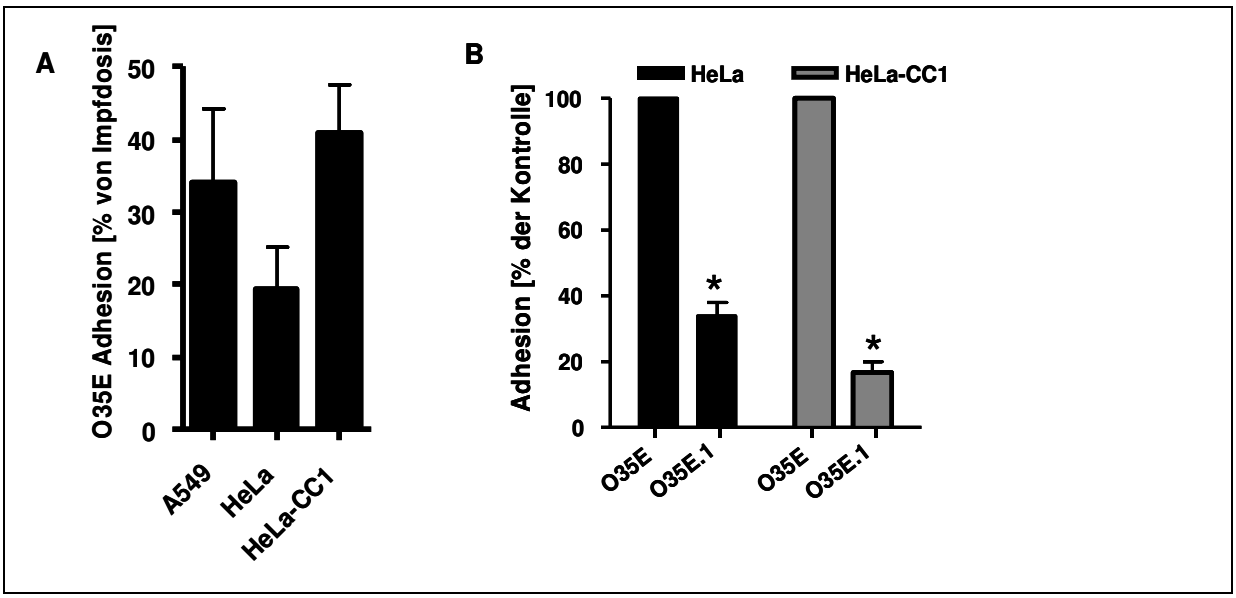

Abb. 10: Bedeutung der UspA1-Expression durch *M. catarrhalis* und der Expression von CEACAM1 durch epitheliale Zellen für die Zelladhäsion von *M. catarrhalis.*

***A*, Adhäsion von *M. catarrhalis* (MOI 1, Inkubationszeit 8 h) an Monolayern der humanen epithelialen Zelllinien A549, HeLa und HeLa-CC1. *B*, Quantifizierung der Adhäsion des Wildtypstammes O35E und des UspA1-defizienten Mutanten O35E.1 an epitheliale HeLa- und HeLa-CC1-Zellen. Die Ergebnisse ergeben sich aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. *P < 0,05 (einfaktorielle Varianzanalyse) verglichen mit O35E.**

4.5 Apoptoseinduktion durch Caspasenaktivierung

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden welche Signaltransduktionswege für die Apoptoseinduktion durch *M. catarrhalis* in pulmonalen Epithelzellen eine Rolle spielen und welche Caspasen dabei aktiviert werden. Zur genaueren Untersuchung wurden zu 80 % konfluente Zelllayer mit dem Pancaspaseninhibitor zVAD über eine Zeitdauer von 30 Minuten inkubiert und anschließend mit *M. catarrhalis* bei einer MOI von 1 über einen Zeitraum von 8 Stunden infiziert. Die Vorbehandlung mit zVAD führte im Vergleich zu nicht vorinkubierten Zellen zu einer signifikanten Abnahme der DNS-Fragmentation, wie in Abb. 11 dargestellt, und legte somit nahe, dass die durch *M. catarrhalis* induzierte Apoptose caspasenabhängig verläuft. Durch Einsatz der Inhibitoren C3-InhVII (spezifischer Inhibitor für Caspase 3), Z-VEID-FMK (spezifischer Inhibitor für Caspase 9) und Z-LEHD-CHO (spezifischer Inhibitor für Caspase 8), konnte eine signifikante Abnahme der *M. catarrhalis*-induzierten Apoptose durch Inhibition der Caspasen 3, 6 und 9 gezeigt werden (Abb. 11). Eine Hemmung der Caspase 8 durch Verwendung des Inhibi-

tors Z-IETD-CHO führte zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptoserate in den infizierten Zellen.

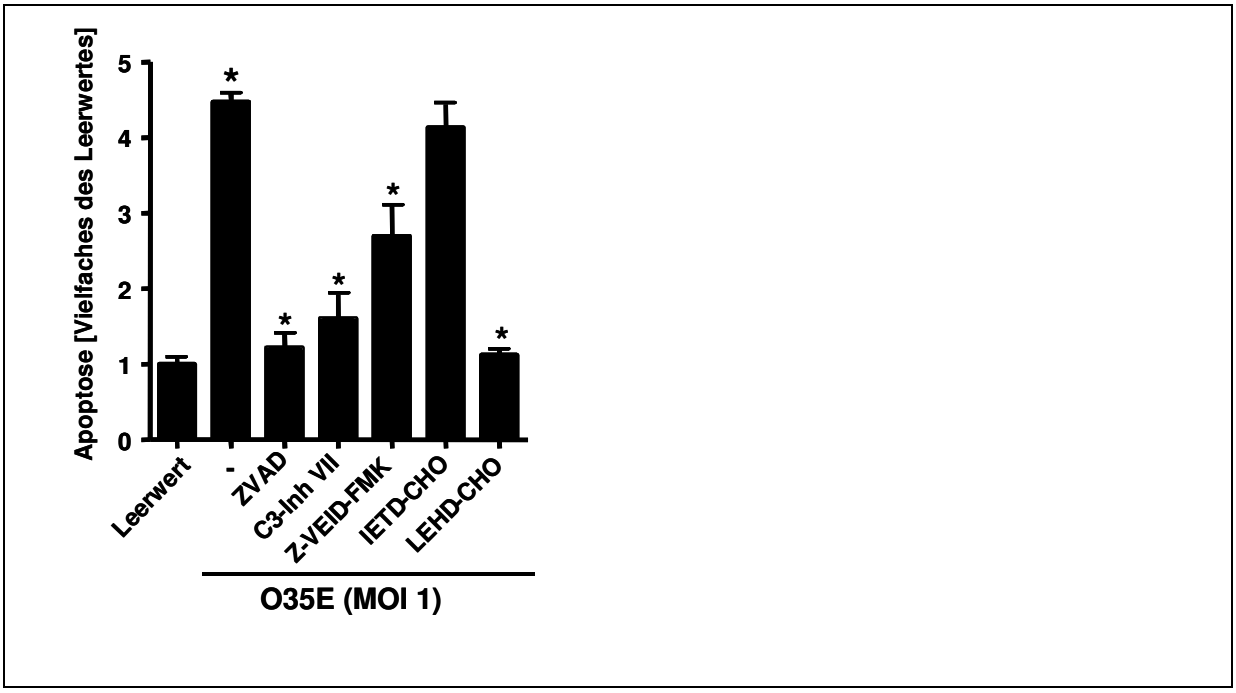

Abb. 11: Caspasenabhängigkeit der durch *M. catarrhalis* induzierten Apoptose.

A549-Zellen wurden mit Pancaspaseninhibitor zVAD, Caspase-3-Inhibitor C3-InhVII, Caspase-6-Inhibitor Z-VEID-FMK, Caspase-9-Inhibitor Z-LEHD-CHO oder mit Caspase-8-Inhibitor Z-IETD-CHO für 30 min inkubiert, bevor sie mit dem *M. catarrhalis*-Stamm O35E bei einer MOI von 1 für 8 h infiziert wurden. Anschließend wurde die DNS-Fragmentation gemessen. *P<0,05 (einfaktorielle Varianzanalyse) verglichen mit der nicht-inhibierten Kontrolle. Die Werte sind das Ergebnis des Mittelwertes aus drei unabhängigen Versuchen.

Um die Ergebnisse dieser Versuche zu verifizieren, haben wir bei mit *M. catarrhalis* infizierten A549-Zellen die Aktivitäten der Caspasen 3, 6, 8 und 9 mittels des Caspasen-Aktivitäts-Assays bestimmt. Zusätzlich konnten im Westernblot der Zellextrakte der infizierten Zellen eine Aktivierung der Spaltung der Procaspasen 3 und 9, sowie eine erhöhte Caspase 6-Aktivität gezeigt werden. Ein Nachweis für eine erhöhte Procaspase 8-Aktivität konnte erwartungsgemäß nicht erbracht werden. In den gleichzeitig mit TNF-α und Cyclohexamid stimulierten A549-Zellen konnte ebenfalls eine erhöhte Spaltung der Procaspase 3 verzeichnet werden (Abb.12 und 13).

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass *M. catarrhalis* induzierte Apoptose von der Aktivierung der Caspasen 3, 6 und 9 und nicht der Caspase 8 abhängig ist. Das deutet darauf hin, dass die Infektion von pulmonalen Epithelzellen mit

M. catarrhalis überwiegend die von Caspase 8 unabhängige Apoptoseinduktion über den mitochondrialen Weg hervorruft, und somit nur die Caspasen 3, 6 und 9 aktiviert werden.

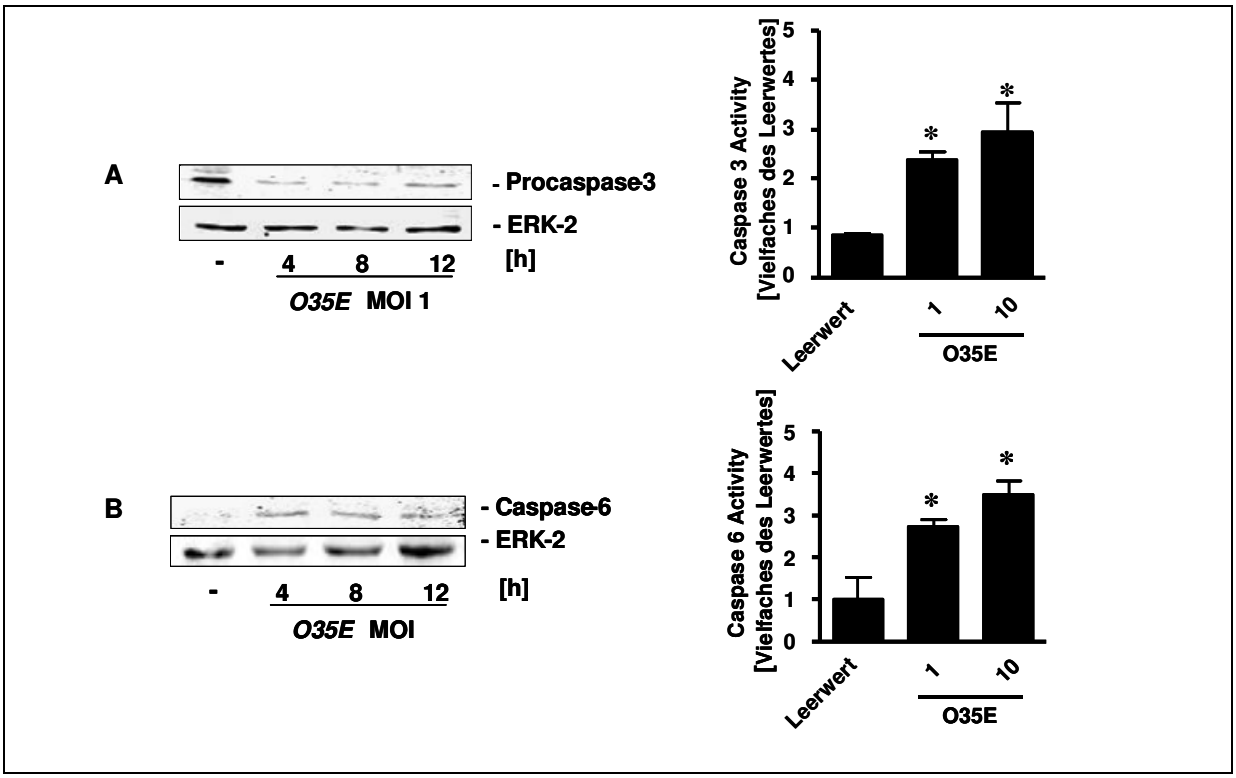

Abb.12: Ansteigende Aktivität der Caspasen 3 und 6 in apoptotischen Zellen nach Infektion mit *M. catarrhalis*.

Die A549 Zellen wurden mit dem Stamm O35E bei einer MOI von 1 für 4 h inkubiert. Die Procaspasen 3 (*A*) und 6 (*B*) wurden im Westernblot nachgewiesen. Die spezifische Caspasenaktivität der Caspasen 3 (*A*) und 6 (*B*) wurde mit Hilfe eines Aktivitätsassays gemessen. Die abgebildeten Blots sind repräsentativ für drei Versuche mit ähnlichem Ergebnis. *P<0,05 (einfaktorielle Varianzanalyse) verglichen mit dem Leerwert. ERK, extrazelluläre signalregulierte Kinase.

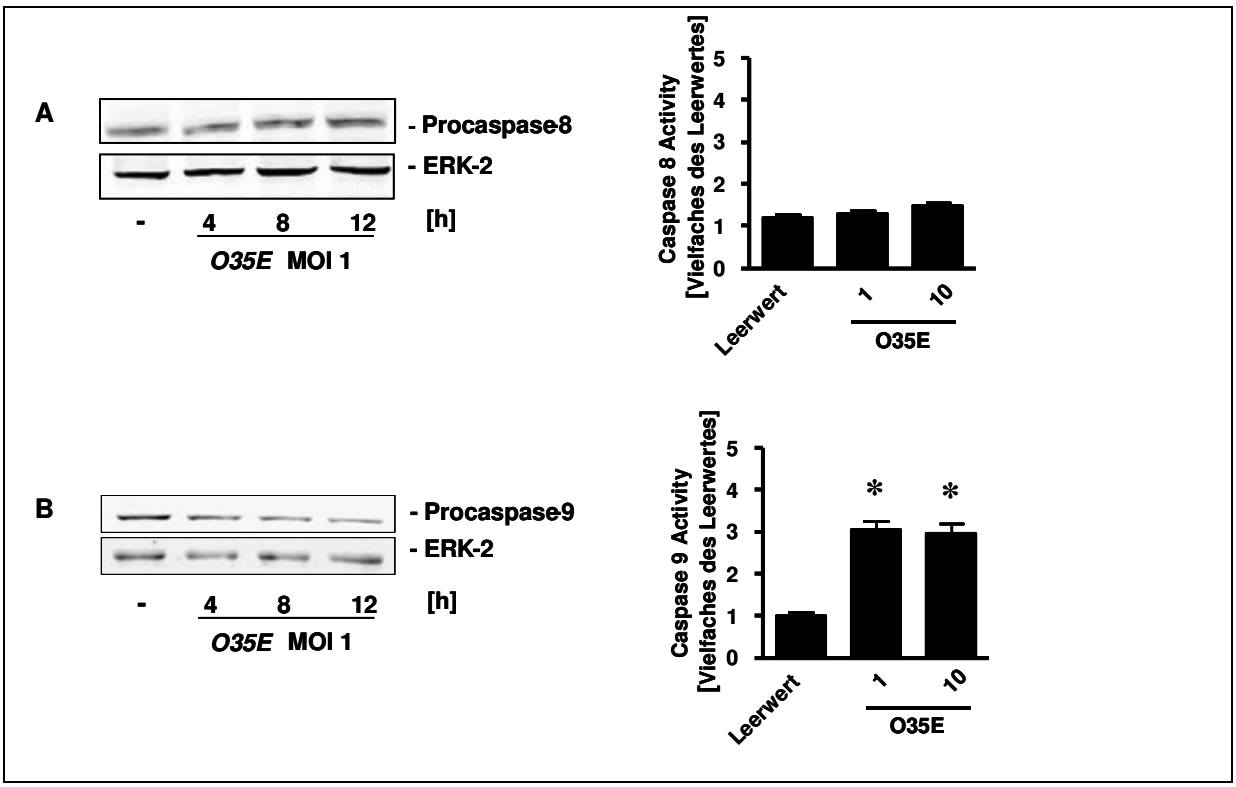

Abb.13: Ansteigende Aktivität der Caspase 9 nicht aber der Caspase 8 in apoptotischen Zellen nach Infektion mit *M. catarrhalis*

Die A549 Zellen wurden mit dem Stamm O35E bei einer MOI von 1 für 4 h inkubiert. Die Procaspasen 8 (*A*) und 9 (*B*) wurden im Westernblot nachgewiesen. Die spezifische Caspasenaktivität der Caspasen 8 (*A*) und 9 (*B*) wurde mit Hilfe eines Aktivitätsassays gemessen. Die abgebildeten Blots sind repräsentativ für drei Versuche mit ähnlichem Ergebnis. *P<0,05 (einfaktorielle Varianzanalyse) verglichen mit dem Leerwert. ERK, extrazellulär regulierte Kinase.

4.6 Mitochondrienabhängige Apoptose

Die in den mit *M. catarrhalis* infizierten pulmonalen Epithelzellen beobachtete Aktivierung der Caspasen 3, 6 und 9 lässt auf einen Zusammenhang mit der Aktivierung von mitochondrialen Faktoren schließen [124-126]. Diesbezüglich untersuchten wir die Expression von antiapoptotischen Bcl-2-Protein und proapoptotischen Bax-Protein in mit *M. catarrhalis* infizierten A549-Zellen. Wie wir im Westernblot in Abb. 14 a zeigen konnten, sank die Bcl-2-Expression mit Zunahme der Infektionszeit. Um die Lokalisation von Bax in den A549-Zellen zu ermitteln, bedienten wir uns eines subzellulären Fraktionierungs-Essays, mit dessen Hilfe wir Bax sowohl in der zytosolischen Fraktion als auch in der mitochondrialen nachweisen konnten. Nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden mit *M. catarrhalis* konnten wir eine Zunahme der mitochondrialen Bax-Menge feststellen

wie in Abb. 14 b gezeigt. Dies spricht für eine Beteiligung von Bax und ist damit ein weiterer Anhaltspunkt für die Beteiligung des intrinsischen Weges an der *M. catarrhalis* induzierten Apoptose in pulmonalen Epithelzellen. Nach Vorinkubation der Zellen mit dem Bax-inhibierenden Peptid (BIP V5) [127] zeigte sich eine signifikante Verringerung der Apoptoserate, dargestellt in Abb. 14 c. Dies bestätigt, dass die durch *M. catarrhalis* induzierte Apoptose abhängig von der Aktivierung von Bax verläuft und somit vor allem den mitochondrialen Weg der Apoptose verwendet. Wie in Abb. 14 d dargestellt, konnten wir im ELISA eine Zunahme der cytosolischen Cytochrom-C-Konzentration nachweisen, was ebenfalls für eine Beteiligung des über die Mitochondrien vermittelten intrinsischen Weges der *M. catarrhalis* induzierten Apoptose spricht. Im Zusammenhang mit der Aktivierung des mitochondrialen Wegs der Apoptose stellte sich die Frage nach einem weiteren Weg unabhängig von einer Caspasenaktivierung über die Freisetzung des mitochondrialen Proteins AIF [128]. So konnten wir einen signifikanten Anstieg des zytosolischen AIF in den infizierten Zellen nachweisen, wie in Abb. 14 e gezeigt, was auf eine caspasenunabhängige Apoptoseinduktion nach Infektion von pulmonalen Epithelzellen mit *M. catarrhalis* hinweist. Wir vermuten daher, dass hauptsächlich der intrinsische Signalweg der Apoptose für den Zelltod mit *M. catarrhalis* infizierter pulmonaler Epithelzellen verantwortlich ist.

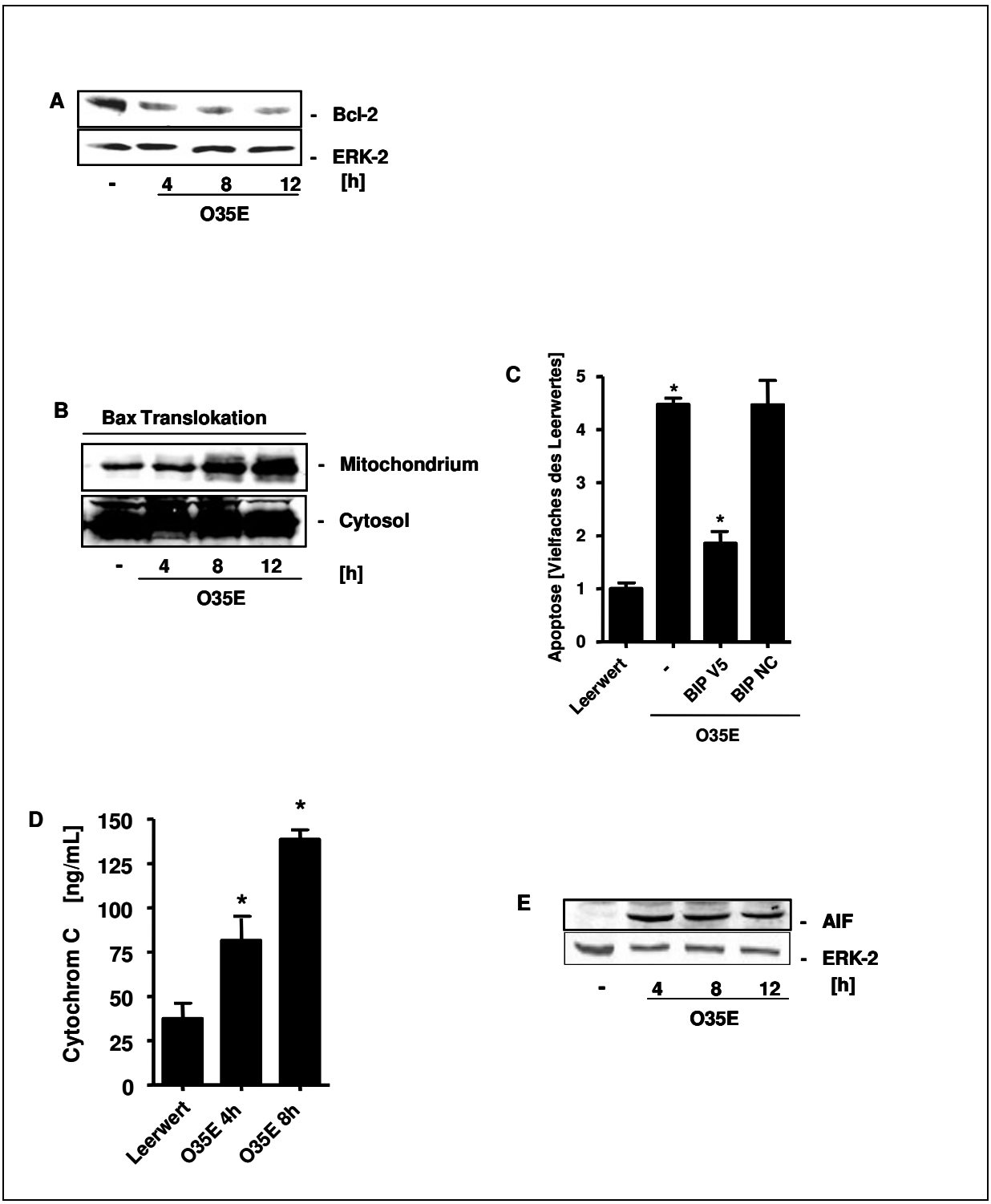

Abb. 14: Verminderte Werte von Bcl-2, mitochondrialer Anstieg von Bax sowie zytosolischer Anstieg von Cytochrom C und Apoptosis-inducing Factor (AIF) in mit *M. catarrhalis* infizierten Zellen.

***A*, A549-Zellen wurden mit dem *M. catarrhalis*-Stamm O35E mit einer MOI von 1 für 4, 8 und 12 h inkubiert. Bcl-2 und ERK-2 (Beladungskontrolle) wurden im Westernblot nachgewiesen. *B*, A549-Zellen wurden für 4, 8 und 12 h mit dem *M. catarrhalis*-Stamm O35E (MOI 1) inkubiert. Die subzelluläre Fraktionierung wurde durchgeführt, um eine zytosolische Fraktion (Zytosol) und eine Mito-**

chondrien-angereicherte Fraktion (Mitochondrium) zu erhalten. Das Gesamtprotein jeder Fraktion wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für den Immunoblot wurden Antikörper gegen Bax eingesetzt. In der Abbildung ist ein repräsentativer Blot von drei unabhängigen Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen dargestellt. *C*, A549-Zellen wurden entweder mit dem Bax-inhibierenden Peptid BIP V5 oder dem Negativkontrollpeptid BIP NC für 1 h vorinkubiert und dann mit dem *M. catarrhalis*-Stamm O35E MOI 1 für 8 h infiziert. Anschließend wurde die DNS-Fragmentation gemessen. *P<0,05 (einfaktorielle Varianzanalyse) verglichen mit dem Leerwert. *D*, Cytochrom C wurde nach 4 und nach 8 h Infektion mit *M. catarrhalis*-Stamm O35E in der zytosolischen Fraktion gemessen. *P<0,05 (einfaktorielle Varianzanalyse) verglichen mit dem Leerwert. *E*, A549-Zellen wurden mit dem *M. catarrhalis*-Stamm O35E (MOI 1) für 4, 8 und 12 h inkubiert und anschließend wurden mittels Westernblot AIF und ERK-2 (Beladungskontrolle) nachgewiesen. Die abgebildeten Blots sind repräsentativ für 3 unabhängige Versuche mit vergleichbaren Ergebnissen.

5 Diskussion

5.1 *M. catarrhalis*-induzierte Apoptose fördert Emphysembildung

In der hier vorgestellten Studie konnten wir zeigen, dass auch *M. catarrhalis* Apoptose von pulmonalen Epithelzellen auslöst. In weiterführenden Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die Apoptose von der schon o.g. Interaktion zwischen dem *M. catarrhalis*-spezifischen UspA1 und CEACAM1 abhängig ist. Daher führten uns die Ergebnisse dieser Studie zu dem Schluss, dass eine bakterielle Kolonisierung und Infektion des Respirationstraktes bei COPD Patienten für eine Emphysementstehung von wichtiger Bedeutung sein könnte.

Apoptose-induzierende Eigenschaften sind auch für andere bakterielle Erreger des Respirationstrakts in unterschiedlichen Studien beschrieben worden. So ist bekannt, dass Apoptose in pulmonalen Epithelzellen durch Infektionen mit *S. pneumoniae*, *Legionella pneumophila* und *Pseudomonas aeruginosa* ausgelöst werden kann [35, 129, 130]. Diese können den Respirationstrakt bis auf *Legionella pneumophila* zwar ebenfalls kolonisieren, alle drei sind allerdings auch in der Lage eine Pneumonie zu verursachen. Da eine Apoptoseinduktion für diese Erreger nur an pulmonalen Epithelzellen in vitro untersucht wurde, ist nicht bekannt, ob eine Apoptoseinduktion durch *S. pneumoniae* eher bei der Pneumonie oder der Kolonisierung bei COPD-Patienten und damit für die Entwicklung eines Emphysems eine Rolle spielt.

5.2 Bedeutung der Apoptose bei pulmonalen Infektionen

Studienergebnisse zeigten, dass unter bestimmten Bedingungen Apoptose sich begünstigend auf das Fortschreiten der Infektion auswirkt. In anderen Fällen erwies sich der programmierte Zelltod als nützlicher Vorgang zur Kontrolle der Entzündungsreaktion und Erregerbeseitigung. So zeigten Dockrell et al, dass die Apoptose von pulmonalen Makrophagen die Erregerbeseitigung fördert und eine Apoptosehemmung zu einer verringerten bakteriellen Clearence führt [131, 132]. Im Mausmodell fand man heraus, dass eine Hemmung der TLR-4 vermittelten Apoptose zu einem Progress der Pneumokokkensepsis führt [133]. Apoptose pulmonaler Makrophagen erleichtert das Abtöten der Erreger in direkt infizierten Zellen [132, 134] und limitiert die Invasion von Pneumokokken in die Blutbahn [131, 133]. Allerdings ist die reduzierte Gewebeinvasion nicht allein die Folge einer verbesserten Erregereleminierung [131], sondern wohl auch ein Resultat der verringerten Entzündungsreaktion apoptotischer Zellen. Denn apoptotische Zellen exprimieren nach Phagozytose durch Makrophagen kaum noch proinflammatorische Zytokine [135]. Während einer Pneumokokkenpneumonie verringert dies eine mit exzessiver Entzündungsreaktion einhergehende Gewebeschädigung.

Wiederum kann eine ausufernde Apoptoseinduktion in der Lunge auch schädigende Folgen haben. Eine schwere Schädigung des Lungengewebes kann zum akuten Lungenversagen (ARDS = acute respiratory distress syndrome) führen. Matute-Bello et al [136] konnten zeigen, dass beim ARDS eine lösliche Form des proapoptotischen Fas Liganden (FasL) die Apoptose epithelialer Pulmonalzellen auslöst.

Die Hemmung der Apoptose von Lymphozyten hingegen könnte eine vielversprechende Möglichkeit in der Therapie der Sepsis bedeuten. So konnte durch Hemmung von lymphozytären CD40-Rezeptoren mit speziellen Antikörpern die sepsisinduzierte Apoptose von Lymphozyten im Mausmodell verringert werden und eine höhere Überlebensrate der Versuchstiere erzielt werden [137].

In den letzten Jahren wurde immer häufiger über hohe Apoptoseraten in emphysematösen Lungen berichtet und in Verbindung mit der abnehmenden alveolären Oberfläche gebracht [26-28]. Weiterhin beschrieben 2003 Tuder et al einen auch als Efferozytose bezeichneten Prozess des Wegräumens und Beseitigens apoptotischer Zellen, wodurch eine Aufrechterhaltung der Lungenstruktur gewährleistet werden soll [17]. Bei Erwachsenen mit normaler Lungenfunktion führt dieser Prozess zum Austausch sterbender Zellen und schützt somit gegen einen ausgeprägten apoptotischen

Zellverlust [138, 139]. Ist die Entfernung apoptotischer Zellen fehlerhaft, wird der Entzündungsprozess weiter aufrechterhalten [139, 140].

Es gibt zunehmend Hinweise dafür, dass bei der COPD im Lungengewebe eine Störung der Balance zwischen Apoptose und Proliferation besteht [141]. Verschiedene Arbeitsgruppen haben dies durch Analyse von Lungengewebe von COPD-Patienten und Kontrollen evaluiert. Dabei zeigte sich eine vermehrte Endothelzellapoptose bei COPD-Patienten. In anderen Untersuchungen wurden auch apoptotische Alveolarepithelzellen, interstitielle Zellen und Entzündungszellen (Neutrophile und Lymphozyten) in den Lungen von COPD-Patienten beschrieben [25]. Kasahara et al. [24] demonstrierten eine gesteigerte Anzahl von apoptotischen Epithel- und Endothelzellen in den Alveolarsepten von Emphysemlungen im Vergleich zu Lungen von Nichtrauchern, gesunden Rauchern und Patienten mit primärer pulmonaler Hypertonie. Darüber hinaus fanden sie eine signifikant reduzierte Expression von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und VEGF-Rezeptoren. Darauf aufbauend formulierten sie die Hypothese, dass die Verminderung für das Überleben von Endothelzellen notwendiger Faktoren zu einem Absterben derselben in den Alveolarsepten führt und auf diesem Weg die Emphysementstehung begünstigt. Die Quintessenz aus diesen Studien am Menschen: Bei Patienten mit COPD findet sich eine erhöhte Apoptoserate der ortsständigen Lungenzellen, die die Lungenstruktur definieren.

Die Tatsache, dass *M. catarrhalis* zu den häufigsten Erregern bei einer Exazerbation der COPD gehört und dass programmierter Zelltod in der Pathogenese von Emphysemen eine wichtige Rolle spielt, führt zu der Annahme, dass die *M. catarrhalis*-induzierte Apoptose von pulmonalen Epithelzellen möglicherweise die Dysfunktion von Zellen und Organ begünstigt, welche folglich in sekundärer Entzündung und Emphysembildung resultiert. Die Komplexität der Auswirkungen der Apoptoseinduktion in unterschiedlichen Zelltypen während einer Infektion stellen weiterhin ein weites Forschungsfeld dar und bedarf sicherlich noch weiterer Untersuchungen.

5.3 Einfluss der UspA1-CEACAM1-Interaktion

Ein interessantes Ergebnis dieser Arbeit zeigt, dass für die Induktion der Apoptose in alveolären Epithelzellen das bakterielle Oberflächenprotein UspA1 eine entscheidende Rolle spielt. Die Infektion der pulmonalen Epithelzellen mit der UspA1-defizienten Mutante O35E.1 führt zu einer deutlich geringeren Rate der DNS-Fragmentation als bei Zellen, die mit dem Wildstamm O35E inkubiert werden. In verschiedenen Studien wurde die Bedeutung des UspA1-Proteins als wichtiges Adhesin aufgeführt, welches unter anderem den gewebeständigen Rezeptor CEACAM1 zum Ziel hat [70, 123]. Bekannt ist, dass CEACAM1 auf verschiedenen epithelialen und endothelialen Zellen expressiert wird, aber auch auf Leukozyten, aktivierten T-Zellen, B-Zellen und $CD16^-/CD56^+$ natürlichen Killerzellen [73, 142, 143]. Wir konnten mittels Immunoblot nachweisen, dass CEACAM1 außerdem in den von uns verwendeten SAE-, A549- und transfizierten HeLa-Zellen gebildet wird.

Dass die CEACAM1-UspA1-Interaktion für das Ausmaß der durch *M. catarrhalis* induzierten Apoptose in pulmonalen Epithelzellen durchaus bedeutsam ist, zeigte sich in einer verminderten Apoptoserate nach Blockade des CEACAM1-Rezeptors mittels des spezifischen Antikörpers YTH.71.3. Nach Bindung des Antikörpers beobachteten wir eine signifikant geringere DNS-Fragmentationsrate als bei den unbehandelten Zellen. Auch die Infektion von CEACAM1-transfizierten HeLa-Zellen mit dem Wildtyp O35E führte zu einer deutlich höheren Apoptoserate, als bei nicht transfizierten Zellen. Vergleichbares konnten Pantelic et al bei der Apoptoseinduktion peripherer B-Zellen durch Interaktion von CEACAM1 mit dem Erreger *Neisseria gonorrhoeae* zeigen [144].

Hierbei wird die Bedeutsamkeit der Interaktion von Oberflächenproteinen wie CEACAM1 und UspA1 für die Induktion des durch *M. catarrhalis* hervorgerufenen programmierten Zelltodes in pulmonalen Epithelzellen ersichtlich. Die Bedeutung der Apoptoseinduktion für den schon in anderen Arbeiten gezeigten modulatorischen Einfluss von CEACAM1 auf die Immunantwort des Wirtes [73, 144] gilt es in weiteren Versuchen zu klären.

Slevogt et. al konnten in einer Arbeit zeigen, dass die Interaktion von CEACAM1 und UspA1, nach Infektion von pulmonalen Epithelzellen mit *M. catarrhalis*, zu einer Abnahme der über TLR2 und NF-κ-B vermittelten inflammatorischen Antwort führt. Weiterhin wird postuliert, dass diese Hemmung durch inhibitorische Einflüsse von CEACAM1

auf die von TLR2 vermittelte Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-OH kinase–Akt kinase (AKT) Signalweges möglich ist [72]. Da dem Onkogen AKT antiapoptotische Eigenschaften eigen sind [145, 146], wäre durch weitere Experimente herauszufinden, inwiefern die Apoptose der mit *M. catarrhalis* infizierten pulmonalen Epithelzellen durch einen TLR2-abhängigen Mechanismus induziert wird.

5.4 Caspasenaktivierung und Bedeutung für die mitochondriale Apoptose

Die Apoptoseinduktion durch *M. catarrhalis* wird von einer Aktivierung der Caspasen-3, -6 und -9 begleitet. Schon in vorangegangenen Studien wurde eine Aktivierung dieser Caspasen durch Infektion von Lungenepithelzellen mit anderen Erregern nachgewiesen [35, 147]. Eine signifikante Reduktion der Apoptoserate der mit *M. catarrhalis* infizierten pulmonalen Epithelzellen konnten wir durch Hemmung der Caspasenaktivierung mit spezifischen Inhibitoren herbeiführen. Die Aktivierung einer caspasenabhängigen Signaltransduktion, sowie die Apoptosereduktion durch Caspaseninhibition sind bei Infektionen von Lungenepithel mit *S. pneumoniae* und *P. aeroginosa* bereits bekannt [35, 147]. Auch konnten Aoshiba et. al im Mausmodell zeigen, dass die Installation von Caspase-3 in den distalen Atemwegen der Tiere eine Emphysementstehung bewirkt [29].

Ein weiteres Ergebnis ist die Aktivierung von Caspase-9 in pulmonalen Epithelzellen nach Infektion mit *M. catarrhalis* ohne Aktivierung der Caspase-8. Diese Beobachtung impliziert, unter Berücksichtigung der bisherigen Kenntnisse der Signalwege der Apoptose, eine mitochondriale Beteiligung. Durch Veränderungen der Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie wird Cytochrom-C aus dem intermembranösen Raum in das Zytosol freigesetzt und kann nun durch Bindung Apaf-1 aktivieren. Dieser Komplex aus Apaf-1 und Cytochrom-C ist nun in der Lage in Anwesenheit von ATP die Procaspase-9 zu rekrutieren und in die aktive Form der Caspase-9 zu überführen. Die aktivierte Caspase-9 ermöglicht wiederum die Aktivierung der Downstream-Caspasen-3 und – 6 [124], was in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden konnte. Die Freisetzung des Cytochrom-C kann durch das antiapoptotische Bcl-2-Protein gehemmt werden [111]. In den mit *M. catarrhalis* infizierten Zellen zeigte sich allerdings eine verminderte Expression dieses Proteins.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass nach Infektion mit *M.catarrhalis* eine mitochondriale Translokation vom proapoptotischen Bcl-2-Protein Bax stattfindet. Bax spielt eine zentrale Rolle für die Aktivierung der mitochondrienabhängigen Apoptose.

Wie von Neumeister et al auch für Infektionen von Jurkat-T-Zellen und humanen Monozyten mit *L. pneumophila* gezeigt werden konnte, basiert die Apoptoseinduktion durch *M. catarrhalis* auf der Aktivierung des intrinsischen Signalweges [129]. Unsere Beobachtung einer ausbleibenden Aktivierung der Caspase-8 bekräftigt diese Feststellung und lässt auf eine von äußeren Todesrezeptoren unabhängige Apoptoseinduktion schließen. Zur ausführlichen Untersuchung dieser These wären weitere Versuche mit CD95-, FADD- oder Caspase-8-defizienten Zellen zu erwägen.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich festhalten, dass eine Infektion pulmonaler Epithelzellen mit *M. catarrhalis* zu einer Aktivierung des mitochondrialen Signalweges ohne Einbeziehung des extrinsischen Weges der Apoptose führt.

5.5 Caspasenunabhängige Apoptose Beziehung AIF und Caspase

In vorangegangenen Studien konnte durch Bakterien induzierte Apoptose unabhängig von caspasenabhängigen Signalwegen beobachtet werden [36]. Bekanntes Schlüssel-Enzym dieses Signalweges ist AIF [148]. Um eine mögliche Induktion der caspasenunabhängigen Apoptose durch *M. catarrhalis* zu untersuchen, bestimmten wir die Freisetzung von AIF im Zytosol. Wie unsere Ergebnisse zeigen, führt die Infektion von pulmonalen Epithelzellen mit *M. catarrhalis* zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien.

Weiterhin konnten wir eine vollständige Hemmung der Apoptose durch Einsatz von Pancaspasen-Inhibitor zVAD erzielen. Schon in anderen Arbeiten ließ sich in endothelialen, HeLa und Jurkat Zelllinien, die entweder mit Bakterien infiziert bzw. mit Staurosporin oder Actinomycin stimuliert wurden, die mitochondriale Freisetzung von AIF durch den Einsatz von Caspaseninhibitoren unterdrücken [36, 148]. Dawson et al beobachteten eine über Caspasen und durch das caspasenaktivierte Protein t-Bid verstärkte Freisetzung von AIF.

Diese Ergebnisse lassen an eine durch Caspasenaktivierung hervorgerufene mitochondriale AIF-Freisetzung nach Infektion mit *M. catarrhalis* denken. Zur Klärung der

AIF-Freisetzung zugrundeliegenden Signalwege in mit *M. catarrhalis* infizierten pulmonalen Epithelzellen sind weitere Versuche notwendig. Auch wäre interessant zu erfahren inwiefern sich die Apoptoseinduktion in mit *M. catarrhalis* infizierten pulmonalen Epithelzellen durch Hemmung der AIF-Freisetzung beeinflussen lässt.

In den bisher veröffentlichen Arbeiten finden sich sowohl caspasenabhängige als auch –unabhängige Mechanismen, die zur AIF-Freisetzung führen. Welcher Signalweg letztendlich eingeschlagen wird, scheint vom jeweiligen Zelltodstimulus als auch vom vorliegenden Zelltyp abhängig zu sein [148, 149].

5.6 Ausblick

Da sämtliche Ergebnisse dieser Arbeit auf in vitro gewonnen Daten basieren, ist eine Bestätigung dieser in Vivo noch ausstehend und werden seitens der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Slevogt derzeit in weiteren Studien bearbeitet. Dies erfolgt mit Hilfe von humanen CEACAM1-exprimierenden transgenen Mäusen. Weiterhin wird hierbei untersucht, inwiefern eine Kolonisierung oder wiederkehrende Infektion mit *M. catarrhalis* die Emphysementstehung begünstigt.

H. influenzae als ein ebenfalls häufig die Lunge besiedelnder Erreger ist bezüglich apoptoseinduzierender Eigenschaften weitgehend unerforscht. Da er mit zu den häufigsten Erregern bei der infektexazerbierten COPD gehört und ebenfalls an CEACAM1 bindet [70], wäre eine genauere Untersuchung in Bezug auf die Emphysementwicklung durch Apoptoseinduktion äußerst informativ und der weiteren Entwicklung therapeutischer Strategien in der Behandlung der COPD sicherlich dienlich.

6 Zusammenfassung

Die Therapie der COPD steht trotz intensivierter Forschung vor bisher schwer überwindbaren Schwierigkeiten das Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten. Die Eindämmung der Progression stellt dabei ein wesentliches Ziel dar. Eine Exazerbation der COPD entsteht meist in Folge einer Infektion mit Erregern wie *M. catarrhalis, Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae.* Folgen wie die Entstehung von Emphysemen werden durch Zelltod fördernde Mechanismen beschleunigt. Pathomechanismen, die bei der Infektexazerbation der COPD durch *M. catarrhalis* eine Rolle spielen, wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Daher überprüften wir in dieser Dissertation die Hypothese, ob die Infektion von pulmonalen Epithelzellen mit *M. catarrhalis* die Apoptose in diesen Zellen induziert und welche Signalwege dabei genutzt werden. Insbesondere wurde auf die Rolle, die Oberflächenproteine wie UspA1 und CEACAM1 bei der Induktion spielen, eingegangen. Wir konnten zeigen, dass die Infektion pulmonaler Epithelzellen mit *M. catarrhalis* zu einer erhöhten Apoptoserate führt. Das *M. catarrhalis*-spezifische UspA1 und das gewebeständige CEACAM1 sind wichtige Faktoren während der Apoptoseinduktion. So ist die durch *M. catarrhalis* induzierte Apoptoserate in CEACAM1-transfizierten HeLa-Zellen signifikant höher als in HeLa-Zellen, die CEACAM1 nicht exprimieren. Die infizierten Zellen wiesen eine erhöhte Aktivität der Caspasen-3, -6 und –9 auf, ohne eine Aktivierung der Caspase-8. Das spricht für die überwiegende Aktivierung des mitochondrialen intrinsischen Signalweges durch Infektion mit *M. catarrhalis.* Eine Einbeziehung von mitochondrialen Signalwegen lässt sich auch aus einer verringerten Bcl-2-Expression, einer mitochondrialen Translokation von Bax und einem Anstieg von AIF im Zytosol in mit *M. catarrhalis* infizierten pulmonalen Epithelzellen herleiten. *M. catarrhalis* induziert Apoptose in pulmonalen Epithelzellen, die durch Interaktion der Oberflächenproteine CEACAM1 und UspA1 verstärkt wird. Unsere Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass durch *M. catarrhalis* induzierte Apoptose das Fortschreiten der COPD und die Emphysementstehung fördert und damit möglicherweise einen neuen wichtigen Pathomechanismus für die Emphysementstehung bei der COPD darstellt.

In spite of extensive investigation there are unsettled therapeutically difficulties in therapy of COPD. During the course of COPD development of emphysema is of particular importance for the progression of the disease. COPD patients are prone to bacterial

colonization and infections with *Moraxella catarrhalis (M.catarrhalis), Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae.* Little is known about their contribution to the chronic course of the disease. In recent years apoptosis has been recognized as important additional factor for emphysema development. In this work we investigated the mechanisms of *M.catarrhalis* induced apoptosis in pulmonary epithelial cells. We found a significant increase of apoptosis in *M.catarrhalis* infected pulmonary epithelial cells. In addition, we found that the interaction between *M.catarrhalis* specific UspA1 and the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM1) were required to induce apoptosis. Our results of specific *M.catarrhalis* induced apoptosis was confirmed in a HeLa-cell model stably transfected with CEACAM1, compared with untransfected cells. pulmonary epithelial cells infected with *M.catarrhalis* showed increased activity of caspases 3, 6, and 9 but not of caspase 8. Reduced expression of Bcl-2, translocation of Bax into the mitochondria, and cytosolic increase of apoptosis-inducing factor in *M.catarrhalis*-infected cells implicated the involvement of mitochondrial death pathways. In conclusion, *M.catarrhalis*-induced apoptosis in pulmonary epithelial cells was triggered by interaction between CEACAM1 and UspA1. Thus, *M.catarrhalis*-induced apoptosis of pulmonary epithelial cells may contribute the development of COPD and emphysema.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1. Murphy, T.F., et al., *Moraxella catarrhalis in chronic obstructive pulmonary disease: burden of disease and immune response.* Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(2): p. 195-9.
2. Finkelstein, R., et al., *Morphometry of small airways in smokers and its relationship to emphysema type and hyperresponsiveness.* Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(1): p. 267-76.
3. Cote, C., et al., *Haemoglobin level and its clinical impact in a cohort of patients with COPD.* Eur Respir J, 2007. **29**(5): p. 923-9.
4. Sabit, R., et al., *Arterial stiffness and osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(12): p. 1259-65.
5. Pauwels, R.A., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(5): p. 1256-76.
6. Worth, H., et al., *[Guidelines for the diagnosis and treatment chronic obstructive bronchitis and pulmonary emphysema issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft fur pneumologie].* Pneumologie, 2002. **56**(11): p. 704-38.
7. Mullen, J.B., et al., *Reassessment of inflammation of airways in chronic bronchitis.* Br Med J (Clin Res Ed), 1985. **291**(6504): p. 1235-9.
8. O'Shaughnessy, T.C., et al., *Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1.* Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(3): p. 852-7.
9. Saetta, M., et al., *Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis.* Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(2): p. 301-6.
10. Hill, A.T., D. Bayley, and R.A. Stockley, *The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis.* Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(3): p. 893-8.
11. Keatings, V.M., et al., *Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma.* Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(2): p. 530-4.
12. Pesci, A., et al., *Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease.* Eur Respir J, 1998. **12**(2): p. 380-6.
13. Yamamoto, C., et al., *Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8.* Chest, 1997. **112**(2): p. 505-10.
14. Mueller, R., et al., *Different cytokine patterns in bronchial biopsies in asthma and chronic bronchitis.* Respir Med, 1996. **90**(2): p. 79-85.
15. Saetta, M., et al., *CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(3 Pt 1): p. 822-6.
16. Leopold, J.G. and J. Gough, *The centrilobular form of hypertrophic emphysema and its relation to chronic bronchitis.* Thorax, 1957. **12**(3): p. 219-35.

17. Tuder, R.M., S. McGrath, and E. Neptune, *The pathobiological mechanisms of emphysema models: what do they have in common?* Pulm Pharmacol Ther, 2003. **16**(2): p. 67-78.
18. Mc, L.K., *The pathogenesis of pulmonary emphysema.* Am J Med, 1958. **25**(1): p. 62-74.
19. *The definition of emphysema. Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute, Division of Lung Diseases workshop.* Am Rev Respir Dis, 1985. **132**(1): p. 182-5.
20. Filley, G.F., *Emphysema and chronic bronchitis: clinical manifestations and their physiologic significance.* Med Clin North Am, 1967. **51**(2): p. 283-92.
21. Snider, G.L., *Chronic obstructive pulmonary disease: risk factors, pathophysiology and pathogenesis.* Annu Rev Med, 1989. **40**: p. 411-29.
22. Suki, B., K.R. Lutchen, and E.P. Ingenito, *On the progressive nature of emphysema: roles of proteases, inflammation, and mechanical forces.* Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(5): p. 516-21.
23. Tuder, R.M., et al., *Apoptosis and emphysema: the missing link.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **28**(5): p. 551-4.
24. Kasahara, Y., et al., *Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(3 Pt 1): p. 737-44.
25. Segura-Valdez, L., et al., *Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD.* Chest, 2000. **117**(3): p. 684-94.
26. Imai, K., et al., *Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema.* Eur Respir J, 2005. **25**(2): p. 250-8.
27. Yokohori, N., K. Aoshiba, and A. Nagai, *Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema.* Chest, 2004. **125**(2): p. 626-32.
28. Calabrese, F., et al., *Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema.* Respir Res, 2005. **6**: p. 14.
29. Aoshiba, K., N. Yokohori, and A. Nagai, *Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **28**(5): p. 555-62.
30. Gardai, S.J., et al., *Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte.* Cell, 2005. **123**(2): p. 321-34.
31. Walsh, G.M., et al., *Resting and cytokine-stimulated human small airway epithelial cells recognize and engulf apoptotic eosinophils.* Blood, 1999. **94**(8): p. 2827-35.
32. Henson, P.M., D.L. Bratton, and V.A. Fadok, *Apoptotic cell removal.* Curr Biol, 2001. **11**(19): p. R795-805.
33. Henson, P.M., *Possible roles for apoptosis and apoptotic cell recognition in inflammation and fibrosis.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(3 Suppl): p. S70-6.
34. Lauber, K., et al., *Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses.* Mol Cell, 2004. **14**(3): p. 277-87.
35. Schmeck, B., et al., *Streptococcus pneumoniae-induced caspase 6-dependent apoptosis in lung epithelium.* Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 4940-7.
36. N'Guessan, P.D., et al., *Streptococcus pneumoniae R6x induced p38 MAPK and JNK-mediated caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells.* Thromb Haemost, 2005. **94**(2): p. 295-303.
37. Sethi, S. and T.F. Murphy, *Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease.* N Engl J Med, 2008. **359**(22): p. 2355-65.

38. Sethi, S. and T.F. Murphy, *Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review.* Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(2): p. 336-63.

39. Elmes, P.C., K. Knox, and C.M. Fletcher, *Sputum in chronic bronchitis; effects of antibiotics.* Lancet, 1953. **265**(6792): p. 903-6.

40. May, J.R., *The bacteriology of chronic bronchitis.* Lancet, 1953. **265**(6785): p. 534-7.

41. Zalacain, R., et al., *Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease.* Eur Respir J, 1999. **13**(2): p. 343-8.

42. Verduin, C.M., et al., *Moraxella catarrhalis: from emerging to established pathogen.* Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(1): p. 125-44.

43. Singh, S., et al., *Selection of optimum laboratory tests for the identification of Moraxella catarrhalis.* Pathology, 1997. **29**(2): p. 206-8.

44. Enright, M.C. and H. McKenzie, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis--clinical and molecular aspects of a rediscovered pathogen.* J Med Microbiol, 1997. **46**(5): p. 360-71.

45. Sethi, S. and T.F. Murphy, *Bacterial Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease in 2000: a State-of-the-Art Review.* Clin. Microbiol. Rev., 2001. **14**(2): p. 336-363.

46. Slevogt, H., et al., *Moraxella catarrhalis is internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and initiates a TLR2- and partly NOD1-dependent inflammatory immune response.* Cell Microbiol, 2007. **9**(3): p. 694-707.

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

48. Slevogt, H., et al., *Adhesion of Moraxella catarrhalis to human bronchial epithelium characterized by a novel fluorescence-based assay.* Med Microbiol Immunol, 2006. **195**(2): p. 73-83.

49. N'Guessan, P.D., et al., *Moraxella catarrhalis induces ERK- and NF-kappaB-dependent COX-2 and prostaglandin E2 in lung epithelium.* Eur Respir J, 2007. **30**(3): p. 443-51.

50. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity.* Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.

51. Soong, G., et al., *TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells.* J Clin Invest, 2004. **113**(10): p. 1482-9.

52. Klingman, K.L. and T.F. Murphy, *Purification and characterization of a high-molecular-weight outer membrane protein of Moraxella (Branhamella) catarrhalis.* Infect Immun, 1994. **62**(4): p. 1150-5.

53. Murphy, T.F., *Studies of the outer membrane proteins of Branhamella catarrhalis.* Am J Med, 1990. **88**(5A): p. 41S-45S.

54. McMichael, J.C., *Vaccines for Moraxella catarrhalis.* Vaccine, 2000. **19 Suppl 1**: p. S101-7.

55. Peng, D., et al., *Moraxella catarrhalis bacterium without endotoxin, a potential vaccine candidate.* Infect Immun, 2005. **73**(11): p. 7569-77.

56. Vaneechoutte, M., et al., *Serological typing of Branhamella catarrhalis strains on the basis of lipopolysaccharide antigens.* J Clin Microbiol, 1990. **28**(2): p. 182-7.

57. Song, W., et al., *Role of lipooligosaccharide in Opa-independent invasion of Neisseria gonorrhoeae into human epithelial cells.* J Exp Med, 2000. **191**(6): p. 949-60.

58. Gorter, A.D., et al., *Involvement of lipooligosaccharides of Haemophilus influenzae and Neisseria meningitidis in defensin-enhanced bacterial adherence to epithelial cells.* Microb Pathog, 2003. **34**(3): p. 121-30.

59. Swords, W.E., et al., *Acylation of the lipooligosaccharide of Haemophilus influenzae and colonization: an htrB mutation diminishes the colonization of human airway epithelial cells.* Infect Immun, 2002. **70**(8): p. 4661-8.

60. Aebi, C., et al., *Phenotypic effect of isogenic uspA1 and uspA2 mutations on Moraxella catarrhalis 035E.* Infect Immun, 1998. **66**(7): p. 3113-9.

61. Lafontaine, E.R., et al., *The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of Moraxella catarrhalis to human epithelial cells in vitro.* J Bacteriol, 2000. **182**(5): p. 1364-73.

62. Cope, L.D., et al., *Characterization of the Moraxella catarrhalis uspA1 and uspA2 genes and their encoded products.* J Bacteriol, 1999. **181**(13): p. 4026-34.

63. Tan, T.T., et al., *The respiratory pathogen Moraxella catarrhalis adheres to epithelial cells by interacting with fibronectin through ubiquitous surface proteins A1 and A2.* J Infect Dis, 2005. **192**(6): p. 1029-38.

64. Tan, T.T., A. Forsgren, and K. Riesbeck, *The respiratory pathogen moraxella catarrhalis binds to laminin via ubiquitous surface proteins A1 and A2.* J Infect Dis, 2006. **194**(4): p. 493-7.

65. Attia, A.S., et al., *Binding of vitronectin by the Moraxella catarrhalis UspA2 protein interferes with late stages of the complement cascade.* Infect Immun, 2006. **74**(3): p. 1597-611.

66. Manolov, T., et al., *Moraxella-dependent alpha 1-antichymotrypsin neutralization: a unique virulence mechanism.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **38**(5): p. 609-17.

67. Nordstrom, T., et al., *Ionic binding of C3 to the human pathogen Moraxella catarrhalis is a unique mechanism for combating innate immunity.* J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3628-36.

68. Attia, A.S., et al., *The UspA2 protein of Moraxella catarrhalis is directly involved in the expression of serum resistance.* Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 2400-10.

69. Perez Vidakovics, M.L. and K. Riesbeck, *Virulence mechanisms of Moraxella in the pathogenesis of infection.* Curr Opin Infect Dis, 2009. **22**(3): p. 279-85.

70. Hill, D.J. and M. Virji, *A novel cell-binding mechanism of Moraxella catarrhalis ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1.* Mol Microbiol, 2003. **48**(1): p. 117-29.

71. Hill, D.J., et al., *The variable P5 proteins of typeable and non-typeable Haemophilus influenzae target human CEACAM1.* Mol Microbiol, 2001. **39**(4): p. 850-62.

72. Slevogt, H., et al., *CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells.* Nat Immunol, 2008. **9**(11): p. 1270-8.

73. Gray-Owen, S.D. and R.S. Blumberg, *CEACAM1: contact-dependent control of immunity.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 433-46.

74. Lanier, L.L., *Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition.* Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 495-502.

75. Barrow, A.D. and J. Trowsdale, *You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling.* Eur J Immunol, 2006. **36**(7): p. 1646-53.

76. Nagaishi, T., et al., *SHP1 phosphatase-dependent T cell inhibition by CEACAM1 adhesion molecule isoforms.* Immunity, 2006. **25**(5): p. 769-81.

77. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, *Immune inhibitory receptors.* Science, 2000. **290**(5489): p. 84-9.

78. McMichael, J.C., *Progress toward the development of a vaccine to prevent Moraxella (Branhamella) catarrhalis infections.* Microbes and Infection, 2000. **2**: p. 561-568.

79. Peng, D., et al., *Moraxella catarrhalis Bacterium without Endotoxin, a Potential Vaccine Candidate.* Infect. Immun., 2005. **73**(11): p. 7569-7577.

80. Strasser, A., L. O'Connor, and V.M. Dixit, *Apoptosis signaling.* Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 217-45.

81. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.* Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.

82. Ravagnan, L., T. Roumier, and G. Kroemer, *Mitochondria, the killer organelles and their weapons.* J Cell Physiol, 2002. **192**(2): p. 131-7.

83. Sun, E.W. and Y.F. Shi, *Apoptosis: the quiet death silences the immune system.* Pharmacol Ther, 2001. **92**(2-3): p. 135-45.

84. Ishizaki, Y., et al., *Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts, and cancer cells.* Mol Biol Cell, 1995. **6**(11): p. 1443-58.

85. Weil, M., et al., *Constitutive expression of the machinery for programmed cell death.* J Cell Biol, 1996. **133**(5): p. 1053-9.

86. Richardson, H. and S. Kumar, *Death to flies: Drosophila as a model system to study programmed cell death.* J Immunol Methods, 2002. **265**(1-2): p. 21-38.

87. Cecconi, F., *Apaf1 and the apoptotic machinery.* Cell Death Differ, 1999. **6**(11): p. 1087-98.

88. Van Cruchten, S. and W. Van Den Broeck, *Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis.* Anat Histol Embryol, 2002. **31**(4): p. 214-23.

89. Denault, J.B. and G.S. Salvesen, *Caspases: keys in the ignition of cell death.* Chem Rev, 2002. **102**(12): p. 4489-500.

90. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.* Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.

91. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 420-30.

92. Naismith, J.H. and S.R. Sprang, *Modularity in the TNF-receptor family.* Trends Biochem Sci, 1998. **23**(2): p. 74-9.

93. Sartorius, U., I. Schmitz, and P.H. Krammer, *Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis.* Chembiochem, 2001. **2**(1): p. 20-9.

94. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways.* Embo J, 1998. **17**(6): p. 1675-87.

95. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points.* Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.

96. Bernardi, P., et al., *Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues.* Eur J Biochem, 1999. **264**(3): p. 687-701.

97. Loeffler, M. and G. Kroemer, *The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita.* Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 19-26.

98. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.* Nature, 1999. **397**(6718): p. 441-6.

99. Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang, *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria.* Nature, 2001. **412**(6842): p. 95-9.

100. Verhagen, A.M., et al., *Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.* Cell, 2000. **102**(1): p. 43-53.

101. Verhagen, A.M., et al., *HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins.* J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 445-54.

102. Kroemer, G. and J.C. Reed, *Mitochondrial control of cell death.* Nat Med, 2000. **6**(5): p. 513-9.

103. Acehan, D., et al., *Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation.* Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 423-32.

104. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.* Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.

105. Slee, E.A., et al., *Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner.* J Cell Biol, 1999. **144**(2): p. 281-92.

106. Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams, *Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells.* Nature, 1988. **335**(6189): p. 440-2.

107. Borner, C., *The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions.* Mol Immunol, 2003. **39**(11): p. 615-47.

108. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 647-56.

109. Mund, T., et al., *Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum.* Faseb J, 2003. **17**(6): p. 696-8.

110. Kluck, R.M., et al., *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.* Science, 1997. **275**(5303): p. 1132-6.

111. Yang, J., et al., *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked.* Science, 1997. **275**(5303): p. 1129-32.

112. Lindsten, T., et al., *The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues.* Mol Cell, 2000. **6**(6): p. 1389-99.

113. Wei, M.C., et al., *Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death.* Science, 2001. **292**(5517): p. 727-30.

114. Nechushtan, A., et al., *Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis.* J Cell Biol, 2001. **153**(6): p. 1265-76.

115. Antonsson, B., et al., *Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria.* Biochem J, 2000. **345 Pt 2**: p. 271-8.

116. Tsujimoto, Y. and S. Shimizu, *VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins.* Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1174-81.

117. Scorrano, L. and S.J. Korsmeyer, *Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(3): p. 437-44.

118. Unhanand, M., et al., *Pulmonary clearance of Moraxella catarrhalis in an animal model.* J Infect Dis, 1992. **165**(4): p. 644-50.

119. Smith, B.T., *Cell line A549: a model system for the study of alveolar type II cell function.* Am Rev Respir Dis, 1977. **115**(2): p. 285-93.

120. Nardone, L.L. and S.B. Andrews, *Cell line A549 as a model of the type II pneumocyte. Phospholipid biosynthesis from native and organometallic precursors.* Biochim Biophys Acta, 1979. **573**(2): p. 276-95.

121. Rahbari, R., et al., *A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification.* Biotechniques, 2009. **46**(4): p. 277-84.

122. Furihata, K., K. Sato, and H. Matsumoto, *Construction of a combined NotI/SmaI physical and genetic map of Moraxella (Branhamella) catarrhalis strain ATCC25238.* Microbiol Immunol, 1995. **39**(10): p. 745-51.

123. Conners, R., et al., *The Moraxella adhesin UspA1 binds to its human CEACAM1 receptor by a deformable trimeric coiled-coil.* Embo J, 2008. **27**(12): p. 1779-89.

124. Desagher, S. and J.C. Martinou, *Mitochondria as the central control point of apoptosis.* Trends Cell Biol, 2000. **10**(9): p. 369-77.

125. Eskes, R., et al., *Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(3): p. 929-35.

126. Martinou, J.C., S. Desagher, and B. Antonsson, *Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(3): p. E41-3.

127. Sawada, M., et al., *Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria.* Nat Cell Biol, 2003. **5**(4): p. 320-9.

128. van Gurp, M., et al., *Mitochondrial intermembrane proteins in cell death.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(3): p. 487-97.

129. Neumeister, B., et al., *Legionella pneumophila induces apoptosis via the mitochondrial death pathway.* Microbiology, 2002. **148**(Pt 11): p. 3639-50.

130. Grassme, H., et al., *CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to Pseudomonas aeruginosa.* Science, 2000. **290**(5491): p. 527-30.

131. Dockrell, D.H., et al., *Alveolar macrophage apoptosis contributes to pneumococcal clearance in a resolving model of pulmonary infection.* J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5380-8.

132. Marriott, H.M., et al., *Dynamic changes in Mcl-1 expression regulate macrophage viability or commitment to apoptosis during bacterial clearance.* J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 359-68.

133. Srivastava, A., et al., *The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease.* Infect Immun, 2005. **73**(10): p. 6479-87.

134. Dockrell, D.H., et al., *Immune-mediated phagocytosis and killing of Streptococcus pneumoniae are associated with direct and bystander macrophage apoptosis.* J Infect Dis, 2001. **184**(6): p. 713-22.

135. Fadok, V.A., et al., *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF.* J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 890-8.

136. Matute-Bello, G., et al., *Blockade of the Fas/FasL system improves pneumococcal clearance from the lungs without preventing dissemination of bacteria to the spleen.* J Infect Dis, 2005. **191**(4): p. 596-606.

137. Schwulst, S.J., et al., *Agonistic monoclonal antibody against CD40 receptor decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis.* J Immunol, 2006. **177**(1): p. 557-65.

138. Taraseviciene-Stewart, L., et al., *Is alveolar destruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease an immune disease?* Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(8): p. 687-90.

139. Tuder, R.M., et al., *Role of lung maintenance program in the heterogeneity of lung destruction in emphysema.* Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(8): p. 673-9.

140. Tuder, R.M., et al., *State of the art. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective.* Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(6): p. 503-10.

141. Demedts, I.K., et al., *Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema.* Respir Res, 2006. **7**: p. 53.

142. Moller, M.J., et al., *Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural-killer-cell sub-population.* Int J Cancer, 1996. **65**(6): p. 740-5.

143. Singer, B.B., et al., *CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes.* Eur J Immunol, 2005. **35**(6): p. 1949-59.

144. Pantelic, M., et al., *Neisseria gonorrhoeae kills carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 (CD66a)-expressing human B cells and inhibits antibody production.* Infect Immun, 2005. **73**(7): p. 4171-9.

145. Franke, T.F., D.R. Kaplan, and L.C. Cantley, *PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis.* Cell, 1997. **88**(4): p. 435-7.

146. Bao, S., et al., *Keratinocyte growth factor induces Akt kinase activity and inhibits Fas-mediated apoptosis in A549 lung epithelial cells.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(1): p. L36-42.

147. Hotchkiss, R.S., et al., *Role of apoptosis in Pseudomonas aeruginosa pneumonia.* Science, 2001. **294**(5548): p. 1783.

148. Dawson, V.L. and T.M. Dawson, *Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk.* J Bioenerg Biomembr, 2004. **36**(4): p. 287-94.

149. Cande, C., et al., *Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?* J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 24): p. 4727-34.

7.2 Publikationsverzeichnis

7.2.1 Originalarbeiten

„The UspA1 protein of Moraxella catarrhalis induces CEACAM-1-dependent Apoptosis in Alveolar Epithelial Cells"; Philippe Dje N'Guessan, **Manuel Vigelahn**, Sebastian Bachmann, Solveig Zabel, Bastian Opitz, Bernd Schmeck, Stefan Hippenstiel, Janine Zweigner, Kristian Riesbeck, Bernhard B. Singer, Norbert Suttorp, Hortense Slevogt; 2007 The Journal of Infectious Diseases

7.2.2 Öffentliche Vorträge

„Moraxella catarrhalis-induced apoptosis in respiratory epithelial cells"; M. Vigelahn, H. Slevogt, B. Schmeck, S. Hippenstiel, N. Suttorp; 16th European Students Conference (ESC) – Charité (2005)

„Moraxella catarrhalis induziert Apoptose in pulmonalen Epithelzellen" M. Vigelahn, H. Slevogt, B. Schmeck, S. Hippenstiel, N. Suttorp; 47. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (2006), Posterdiskussion

7.3 Danksagung

Für die außerordentlich engagierte Förderung und Betreuung während der gesamten Zeit meiner Dissertation möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Hortense Slevogt bedanken. Hervorheben möchte ich dabei die stetige Bereitschaft zur Unterstützung und die erfrischende Motivation während des gesamten Arbeitsprozesses.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Philippe Dje N'Guessan für die gewissenhafte und geduldige Einführung in die Laborarbeit und fortwährende Unterstützung während der Ausführung der Versuche durch hilfreiche Tipps und Erklärungen.

Herrn Prof. Dr. Norbert Suttorp danke ich, dass ich die Möglichkeit erhielt, diese Arbeit in der von ihm geleiteten Abteilung umzusetzen.

Weiterhin danke ich Petra Schrade, Jaqueline Hellwig, Frauke Schreiber, und Kerstin Möhr für die hervorragende technische und praktische Unterstützung der Laborarbeit.

Auch möchte ich mich bei Solveig Zabel und Krishna Tiwari für die angenehme Teamarbeit in der Arbeitsgruppe bedanken sowie bei Annina Heinrich für das Korrekturlesen.

Abschließend danke ich meiner Familie, die mir während der gesamten Zeit unterstützend zur Seite stand.

7.4 Lebenslauf

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

7.5 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Manuel Vigelahn, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "*Molekulare Mechanismen der Moraxella catarrhalis induzierten Apoptose pulmonaler Epithelzellen*" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -*www.**icmje**.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum Unterschrift