

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

DISSERTATION

*Die Bedeutung der Protein Kinase C und ihrer Isoformen für die
Moraxella catarrhalis induzierte IL-8 Sekretion in humanem
pulmonalen Epithel*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité- Universitätsmedizin Berlin

von
Lily Qaiem Maqami
aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. H. Slevogt
 2. Prof. Dr. M. Pfeifer
 3. Priv.-Doz. Dr. K. Kotsch

Datum der Promotion: 08.04.2011

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	7
1. EINLEITUNG	1
1.1. COPD	1
1.1.1 Epidemiologie der COPD.....	1
1.1.2 Definition und klinisches Bild.....	1
1.1.3 Pathogenese der COPD	3
1.1.4 Bedeutung bakterieller Infektionen bei der COPD.....	4
1.2 <i>Moraxella catarrhalis</i>	6
1.2.1 <i>Moraxella catarrhalis</i> allgemein.....	6
1.2.2 Oberflächenantigene/ Virulenzfaktoren von <i>M. catarrhalis</i>	8
1.3 Das humane Bronchialepithel und seine Bedeutung bei der COPD	9
1.4 Das angeborene Immunsystem der Lunge	10
1.4.1 Die angeborene Immunität	10
1.4.2 Rezeptoren der angeborenen Immunität.....	10
1.5. Zytokine und Chemokine	11
1.5.1 Interleukin-8	11
1.5.2 Die Rolle von Nuclear factor- κ B für die Steuerung der Transkription von IL-8	12
1.6 Proteinkinase C	13
1.6.1 PKC allgemein.....	13
1.6.2 Struktureller Aufbau der PKC	14
1.6.3 Mechanismen der Aktivierung von PKC	16
1.6.4 Vorkommen der PKC in der Lunge	17
1.6.5 Substrate der PKC	18
1.7. Molekulare Wechselwirkungen zwischen <i>M. catarrhalis</i> und pulmonalen Epithelzellen	19
1.8 Zielsetzung und Fragestellung	20
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Material	21
2.1.1 Substanzen	21
2.1.2 Zellen.....	22
2.1.3 Kulturmedien.....	22
2.1.4 Bakterien	23
2.1.5 Zusammensetzung von Puffer und Lösungen	24
2.1.6 Antikörper.....	29
2.1.7 Protein Kinase C Inhibitoren.....	30
2.1.8 Luziferaseassay.....	30
2.1.9 siRNA	31
2.1.10 Primersequenzen	31
2.1.11 Reaktionsansätze PCR.....	32
2.1.12 PCR Cyler-Programme	33
2.1.13 Verbrauchszubehör	34
2.1.14 spezielle Geräte.....	34
2.1.15 Analysesoftware	35
2.2 Methoden	36
2.2.1 Zelllinien und Zellkultur	36
2.2.2 Bakterienkultur	37
2.2.3 Transfektion	38
2.2.4 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (PCR)	38

2.2.5 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)	40
2.2.6 Western Blot	41
2.2.8 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	43
2.2.9 PKC-Aktivitätsassay	44
2.2.10 Luziferaseassay	44
2.2.11 Konfokale Mikroskopie	45
2.2.12 Statistik	46
3. ERGEBNISSE	47
3.1 Die Infektion von Bronchialepithelzellen mit <i>M. catarrhalis</i> induziert eine gesteigerte Transkription und Freisetzung von IL-8	47
3.2 IL-8 Freisetzung nach Infektion mit inaktivierten <i>M. catarrhalis</i>	49
3.3 <i>M. catarrhalis</i> induziert die Aktivität der PKC in Bronchialepithelzellen	50
3.4 Nachweis der <i>M. catarrhalis</i> induzierten Translokation der PKC an die Zellmembran pulmonaler Epithelzellen	53
3.5 Die Rolle der UspA1 und UspA2 Expression bei <i>M. catarrhalis</i> induzierter IL-8 Sekretion und PKC Aktivierung in Bronchialepithelzellen	55
3.6 Die <i>M. catarrhalis</i> induzierte IL-8 Sekretion wird durch die PKC Isoforme α , ϵ und θ unterschiedlich reguliert.....	57
3.7 Bestätigung des Einflusses von PKC α , PKC ϵ und PKC θ auf die IL-8 Expression mittels SiRNA	59
3.8 <i>M. catarrhalis</i> aktiviert die PKC Isoformen α , ϵ und θ in pulmonalen Epithelzellen.	62
3.9 PKC und UspA2 sind an der <i>M. catarrhalis</i> -induzierten NF- κ B Aktivierung beteiligt	64
3.10 In <i>M. catarrhalis</i> infizierten Lungenepithelzellen beeinflussen die PKC Isoforme α , ϵ und θ die IL-8 Expression am IL-8 Promoter	66
4. DISKUSSION	68
4.1 <i>M. catarrhalis</i> induziert die IL-8 Sekretion in Bronchialepithelzellen.....	68
4.2 Protein Kinasen C werden bei Infektion mit <i>M. catarrhalis</i> in Bronchialepithel aktiviert.	69
4.3 Verschiedene PKC Isoformen beeinflussen die <i>M. catarrhalis</i> induzierte IL-8 Sekretion.....	70
4.4 Die Rolle der PKC und ihrer Isoforme für die Regulation zellulärer Signaltransduktionswege	73
4.5 Bedeutung der PKC bei der Regulation proinflammatorischer Genexpression	74
4.6 Das <i>M. catarrhalis</i> Oberflächenprotein UspA2 beeinflusst PKC Aktivierung.....	76
4.7 Ausblick	77
5. ZUSAMMENFASSUNG	79
6. LITERATURVERZEICHNIS	80
7. ANHANG	95
7.1 Selbstständigkeitserklärung	95
7.2 Danksagung	96
7.3 Lebenslauf	97
7.4 Publikationsverzeichnis.....	98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A549	Type II Alveoläre karzinogene Bronchialzellen
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BEAS-2B	Humane bronchiale Epithelzellen
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease; Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
cfu/ml	Colony forming units; Kolonie-bildende Einheiten
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
DNA	Desoxyribonuclein acid; Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-regulated kinase
FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
ETI	Erythrina caffra trypsin inhibitor; Sojabohnen-Trypsininhibitor
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
GAPDH	Glycerinaldehyd-3 Phosphat Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor;
HSP60	Heat-shock Protein 60
I κ B	Inhibitor κ B
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1, 4, 5-triphosphat
LOS/ LPS	Lipooligosaccharid/ Lipopolysaccharid
kDA	Kilodalton
MAPK	Mitogen-Aktivierte Protein Kinase
MARCKS	Myristolated alanine-rich C kinase substrate
MOI	multiplicity of infection; Bakterienanzahl pro Zelle
<i>M. catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
OD	Optische Dichte
OMP	Outer membrane protein
PAMP	pathogen associated molecular pattern

PBS	phosphate buffered saline; Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
PIP ₂	Phosphoinositol-4, 5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Mysitat-13-Acetat
RNA	Ribonucleinacid; Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat; Natriumdodecylsulfat
siRNA	Short interfering RNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit; Einheit
UspA1	ubiquitous surface protein A1; ubiquitäres Oberflächenprotein A1
UspA2	ubiquitous surface protein A2; ubiquitäres Oberflächenprotein A2
UV	Ultraviolett

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Circulus vitiosus Hypothese der COPD.....	5
Abbildung 1.2: PKC Isozyme.....	15
Abbildung 1.3: Aktivierung der konventionellen PKC-Isoformen	17
Abbildung 3.1A, B, C: IL-8 Produktion in pulmonalen Epithelzellen nach Infektion mit <i>M. catarrhalis</i>	48
Abbildung 3.1D: Zeitabhängiger Anstieg der IL-8 Sekretion in pulmonalen Epithelzellen nach Infektion mit <i>M. catarrhalis</i>	49
Abbildung 3.2: IL-8 Sekretion nach Infektion von BEAS-2B Zellen mit inaktivierten <i>M. catarrhalis</i> O35E	50
Abbildung 3.3: PKC Aktivität in BEAS-2B Zellen nach Infektion mit <i>M. catarrhalis</i>	51
Abbildung 3.4A: Immunolokalisation der PKC in BEAS-2B Zellen	53
Abbildung 3.4B: Immunolokalisation der PKC in A549 Zellen.....	54
Abbildung 3.5: IL-8 Freisetzung und PKC Aktivität nach Infektion mit UspA1 bzw. UspA2 defizienten Mutanten (O35E.1 und O35E.2) von <i>M. catarrhalis</i>	56
Abbildung 3.6: Rolle einzelner PKC Isoforme bei der <i>M. catarrhalis</i> induzierten IL-8 Sekretion	58
Abbildung 3.7: Funktion der Inhibition einzelner PKC Isoforme für die <i>M. catarrhalis</i> induzierte IL-8 Sekretion in A549 Zellen	60
Abbildung 3.8: Inhibition der Aktivität von PKC α , PKC ϵ und PKC θ mittels siRNA.....	61
Abbildung 3.9: Translokation der Gesamt PKC (Pan PKC) und der einzelnen Isoformen PKC α , ϵ und θ zur Zellmembran nach Infektion mit <i>M. catarrhalis</i> O35E	63
Abbildung 3.10: Rolle von UspA2 und PKC bei der <i>M. catarrhalis</i> induzierten NF- κ B Aktivierung	65
Abbildung 3.11: Einfluss der Inhibition einzelner PKC Isoforme auf die Bindung der Polymerase II an den IL-8 Promoter nach Infektion mit <i>M. catarrhalis</i>	67

1. EINLEITUNG

1.1. COPD

1.1.1 Epidemiologie der COPD

Die COPD (engl.: Chronic obstructive pulmonary disease, COPD) ist eine Krankheit mit erheblicher weltweiter Prävalenz, deren Bekämpfung auch in Zukunft für die Gesundheitssysteme eine große Herausforderung darstellen wird. Allein in den USA ist sie die vierthäufigste Ursache von Morbidität und Mortalität, gemäß einer von der WHO veröffentlichten Studie wird sie im Jahr 2030 bereits an siebter Stelle aller Erkrankungen weltweit rangieren (Lopez and Mathers, 2006; Mathers and Loncar, 2006; Mannino and Buist, 2007).

In Deutschland liegt die Prävalenz der COPD bei 13,2% über dem 40. Lebensjahr und den gesamtglobalen Daten entsprechend sind Männer etwas häufiger betroffen als Frauen (Nowak et al., 2004).

Häufigste Ursache der COPD ist das Tabakrauchen. Die Exposition inhalativer Noxen am Arbeitsplatz (Buist et al., 2007) Luftverschmutzung (Blanc et al., 2009) und offene Feuerstellen, welche in den Entwicklungsländern zum Heizen und Kochen verwendet werden, tragen ebenfalls zur Entstehung der COPD bei (Brunekreef and Holgate, 2002).

Der weltweiten Zunahme der Erkrankungshäufigkeit liegen verschiedene Faktoren zu Grunde: Der erhebliche Anstieg des Zigarettenkonsums, sowie die zunehmende Umweltverschmutzung besonders in den Entwicklungs- und Schwellenländern spielen hierbei eine tragende Rolle (Buist et al., 2008). Vor dem Hintergrund einer positiven Assoziation zwischen Lebensalter und Prävalenzanstieg stellt die COPD auch für das deutsche Gesundheitssystem einen beachtlichen Problemfaktor dar (Barnes, 2000; Chan-Yeung et al., 2004). Eine Krankheitskostenstudie zu den volkswirtschaftlichen Kosten der COPD Patienten in Deutschland ergab eine durchschnittliche jährliche Summe von 3027 € pro Patient. Davon machen Krankenhausaufenthalte, Medikamente und Frühberentung den Hauptanteil aus. Mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung ist ein deutlicher Anstieg der Behandlungskosten zu verzeichnen, während gleichzeitig aus medizinischer Sicht das Spektrum der Behandlungsmöglichkeiten abnimmt. Dies birgt ein hohes Präventionspotential, welches bei paralleler Verstärkung einer frühzeitigen Diagnosestellung und Intervention genutzt werden sollte. (Buist et al., 2007; Geldmacher et al., 2008).

1.1.2 Definition und klinisches Bild

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine chronische Erkrankung der Atemwege, welche durch eine chronisch obstruktive Bronchitis mit einer anhaltenden abnormen

Entzündungsreaktion der kleinen Atemwege (small airway disease), sowie des Lungenparenchyms gekennzeichnet ist. Sie kann im Verlauf mit der Entstehung eines Lungenemphysems einhergehen und ist insbesondere durch eine funktionell relevante, nur partiell reversible Einschränkung des Atemflusses charakterisiert. Die Atemflußminderung ist oft langsam progressiv und mit einer durch Noxen oder Gase hervorgerufenen Entzündungsreaktion verbunden. Kennzeichnend für die COPD ist die funktionelle Verminderung der Einsekundenkapazität (FEV₁), welche das forcierte expiratorische Volumen in einer Sekunde beschreibt (Nowak et al., 2005; Barnes, 2007).

Die chronische Bronchitis ist eine klinische Diagnose und ist charakterisiert durch eine vermehrte bronchiale Schleimsekretion sowie durch produktiven Husten, der sich über wenigstens 3 Monate in mindestens 2 aufeinander folgenden Jahren manifestiert. Weitere mögliche Ursachen eines chronischen produktiven Hustens wie z.B. Neoplasien oder Tuberkulose müssen zur Diagnosestellung ausgeschlossen werden (Fletcher and Pride, 1984; Pauwels et al., 2001).

Eine COPD liegt nur dann vor, wenn auch eine chronische Obstruktion der Atemwege besteht. Eine chronische Bronchitis ohne Atemwegobstruktion wird hingegen nicht zur COPD gezählt. Die COPD zeigt auch signifikante extrapulmonale Effekte, welche zum Schweregrad der Erkrankung beitragen können (Vogelmeier et al., 2007; Katz et al., 2009).

Die Diagnose COPD sollte bei allen Patienten mit anhaltenden Symptomen wie Husten, vermehrter Sputumproduktion und/ oder einer Expositionsanamnese von entsprechenden Risikofaktoren in Erwägung gezogen werden. Der bei der COPD vorliegende allenfalls partiell reversible limitierte Atemfluß ist mittels Spirometrie nach Gabe von Bronchodilatoren und/ oder Glukokortikoiden diagnostisch gut nachweisbar (Celli and MacNee, 2004; Rabe et al., 2007).

Im frühen Krankheitsstadium zeigt sich meist nur eine milde Symptomatik mit Husten und vermehrter Sputumproduktion. Im weiteren Verlauf entwickelt sich jedoch eine progrediente Abnahme der Lungenfunktion mit anhaltender Dyspnoe, welche mit einer signifikanten Verschlechterung des Allgemeinbefindens einhergeht. Bei anhaltender Progression können nun häufiger akute Episoden mit einer temporären Aggravation der respiratorischen Symptome auftreten. Diese akuten Exazerbationen sind mit einem deutlichen Anstieg der Morbidität und Mortalität verbunden (Pauwels et al., 2001; Rabe et al., 2007).

Das Lungenemphysem, eine häufige Begleitfolge der COPD, ist pathologisch-anatomisch definiert als eine abnorme irreversible Dilatation der Atemwege distal der terminalen Bronchiolen (Sethi et al., 2000; Donaldson et al., 2005). Diese geht mit einer Destruktion der Alveolarsepten mit möglicher Fibrose sowie einer konsekutiv verminderten inneren Atmungsoberfläche einher (Worth et al., 2002). Aufgrund des verminderten Gasaustausches in der Lunge kann es nun langfristig zu einer respiratorischen Globalinsuffizienz kommen, welche

mit einer chronischen pulmonalen Hypertonie und schließlich einer chronischen Rechtsherzbelastung assoziiert ist. (MacNee, 2005).

Die Einteilung der Schweregrade der COPD erfolgt in 5 Stufen, welche von der GOLD- Initiative (global initiative for chronic obstructive lung disease 2001) etabliert wurde. Sie beruht auf den im Lungenfunktionstest gemessenen Werten von forciertem expiratorischem Atemvolumen in 1 s (FEV₁) und relativer Einsekundenkapazität (FEV₁/VC Vitalkapazität) sowie den klinischen Symptomen Husten, Auswurf und Dyspnoe. Die in den GOLD-Kriterien eingeteilten Stadien korrelieren mit vorliegenden pathologischen Befunden wie beispielsweise die progressive Wandverdickung der kleinen Atemwege (Hogg et al., 2004).

Als Hauptmaßnahme zur effektiven Verhinderung einer weiteren Progression der COPD im Anfangsstadium gilt die Vermeidung von Tabakrauchexposition (Pauwels et al., 2001) Eine Pharmakotherapie der COPD wird zur Prävention, Symptomlinderung, Minderung von Frequenz und Schweregrad der Exazerbationen und zur Verbesserung des allgemeinen Gesundheitsstatus eingesetzt. Zu den angewandten Medikamenten gehören Bronchodilatoren wie β ₂- Sympathikomimetika, Anticholinergika, im weiteren Verlauf auch Theophyllin. Glukokortikoide werden eher seltener, beispielsweise bei vorangegangenen erfolglosen Therapieversuchen oder bei spätem Krankheitsstadium eingesetzt (Rabe, 2006). Bislang konnte jedoch keine medikamentöse Therapie eine Besserung der reduzierten Lungenfunktion erreichen (Anthonisen et al., 1994; Wise et al., 2003).

1.1.3 Pathogenese der COPD

Der für die COPD charakteristische chronisch limitierte Atemfluß geht mit einer erhöhten Entzündungsantwort auf inhalede toxische Partikel und Gase einher.

Die Entzündungsreaktion findet sowohl in den zentralen und peripheren Bronchien, im Alveolarepithel, als auch im Parenchym statt. Hierbei sind immunologisch wirksame Zellen wie Alveolarmakrophagen sowie T-Lymphozyten, Leukozyten und andere Mediatoren involviert. In mildem Krankheitsstadium der COPD dominieren bei einer Analyse von Bronchialbiopsien überwiegend T-Lymphozyten, vor allem die der CD8⁺ Zellreihe, aber auch CD4⁺ Zellen und Makrophagen (Worth et al., 2002; Celli and MacNee, 2004). In schwererer Verlaufsform lassen sich dagegen vermehrt polymorphkernige neutrophile Granulozyten und Makrophagen nachweisen. (Hogg et al., 2004).

Das Bronchialepithel ist direkt an der Generierung der entzündlichen Reaktion beteiligt (Mizgerd, 2008). Dabei ist es in der Lage, auf proinflammatorische Stimuli Zytokine und Chemokine zu sezernieren. Den Chemokinen, wie z.B. dem Interleukin 8 (IL-8), kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, indem diese die Granulozyten im Rahmen einer chemotaktischen Reaktion über die Kapillaren zum Infektionsherd leiten, wo sie Phagozytose

betreiben und durch Produktion verschiedener Faktoren weitere Zellen rekrutieren (Smith et al., 1991; Barnes et al., 2003). Dieser als Chemotaxis beschriebene Mechanismus führt auf diese Weise zu einer kontinuierlichen Aufrechterhaltung des lokalen Inflammationsprozesses (Di Stefano et al., 2004b; Hogg, 2004; MacNee, 2005)

Als Folge der chronischen Entzündung liegt bei der COPD eine Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance vor, einer wichtigen Abwehrfunktion des pulmonalen Flimmerepithels gegen Bakterien und Partikel. Dies führt ebenfalls zu einer vermehrten Sputumproduktion und Einschränkung des Bronchiallumens, welche schließlich eine effektive Störung des Gasaustausches zur Folge hat. (Balbi, 2003; Hogg, 2004; Spurzem and Rennard, 2005).

Die chronische Inflammation kann auch Auswirkungen auf den Erhalt der Alveolarwand haben und somit an der Pathogenese des Emphysems beteiligt sein. So führt die Mobilisierung der inflammatorischen Zellen zu einer Freisetzung destruktiver Mediatoren, wie Gewebeproteasen und Zytokine, welche direkt an Gewebsumbauprozessen und Destruktion der Lunge beteiligt sind. Ebenso spielt oxidativer Stress, vornehmlich durch Zigarettenrauchinhalation verursacht, eine wichtige Rolle, indem eine zusätzliche Aktivierung proinflammatorischer Zytokinfreisetzung hervorgerufen wird (Rahman and Adcock, 2006; Yang et al., 2006; Ito and Barnes, 2009). Vorrangige Bedeutung bei der Entstehung des Emphysems stellt das Ungleichgewicht von Proteasen-Antiproteasen dar, deren balancierte Aktivität für die Aufrechterhaltung einer adäquaten Lungenfunktion erforderlich ist (Shapiro, 2003). Ein Ungleichgewicht kann zu einer Degradation des Lungengewebes mit Elastizitätsverlust führen und den Erhalt von alveolären Strukturen beeinträchtigen (Tuder et al., 2003). Durch Interaktion mit den zuvor beschriebenen pathogenetischen Mechanismen kann ebenso Apoptose zur einer Erweiterung distaler Lufträume und Atemwege führen und zur Komplexität des Krankheitsbildes beitragen (Kasahara et al., 2000; Yokohori et al., 2004; Yoshida and Tuder, 2007). Zusammengefasst führen die dargestellten Prozesse schließlich zu einer Reduktion des maximalen expiratorischen Atemflusses (Smaldone et al., 1993; Vestbo et al., 1996).

1.1.4 Bedeutung bakterieller Infektionen bei der COPD

Einen weiteren wichtigen Faktor bei Pathogenese und dem klinischen Verlauf der COPD kommt der Kolonisierung und Infektion des Bronchialtraktes durch Bakterien zu (Sethi et al., 2002; MacNee, 2005). Unter gesunden Bedingungen liegt in den unteren Atemwegen ein steriles Mileu vor, welches durch ständiges Zusammenspiel verschiedener Mechanismen des angeborenen Immunsystems aufrechterhalten wird. Bei Patienten mit COPD wird diese Funktion jedoch gestört, so dass Bakterien persistieren können. In verschiedenen Studien konnten bei bis zu 83% der Patienten unabhängig von der klinischen Symptomatik Bakterien in den unteren Atemwegen nachgewiesen werden (Cabello et al., 1997; Murphy et al., 2004; Sethi

et al., 2006). Hauptsächliche Erreger, die die unteren Atemwege bei COPD-Patienten kolonisieren sind *H. influenza*, *M. catarrhalis* und *S. pneumoniae*. Die chronische Kolonisierung des unteren Respirationstraktes mit diesen potentiellen respiratorischen Pathogenen führt zu einer Verstärkung der bronchialen Entzündung. Hierbei kommt es zu einer signifikanten Vermehrung neutrophiler Granulozyten, welche in direkter Korrelation zur nachgewiesenen Bakterienmenge stehen (Hill et al., 2000; Stockley et al., 2000).

Mit einem entsprechenden Modell postulierten Sethi und Murphy eine Circulus Vitiosus Hypothese, mit der die Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung, insbesondere auch beeinflussende Faktoren auf das Fortschreiten der COPD, beschrieben werden (Murphy and Sethi, 1992). Hierbei wird angenommen, dass eine verminderte mukoziliäre Clearance eine Kolonisierung von Bakterien begünstigt, die ständige Anwesenheit von Bakterien übt ihrerseits potentiell schädigende Effekte auf das Bronchialepithel auf. Auf diesem Wege kommt es zu einer Verstärkung der Schädigung der mukoziliären Clearance. Einen weiteren Aspekt des beschriebenen Kreislaufs stellt die chronische Entzündungsantwort und das durch erhöhte proteolytische Aktivität resultierende veränderte Elastase/ Antielastase-Gleichgewicht der Lunge dar, was sich neben der epithelialen inflammatorischen Antwort unterstützend auf ein Fortschreiten der COPD und Emphysemgenese auswirkt (Murphy et al., 2000; Sethi and Murphy, 2001).

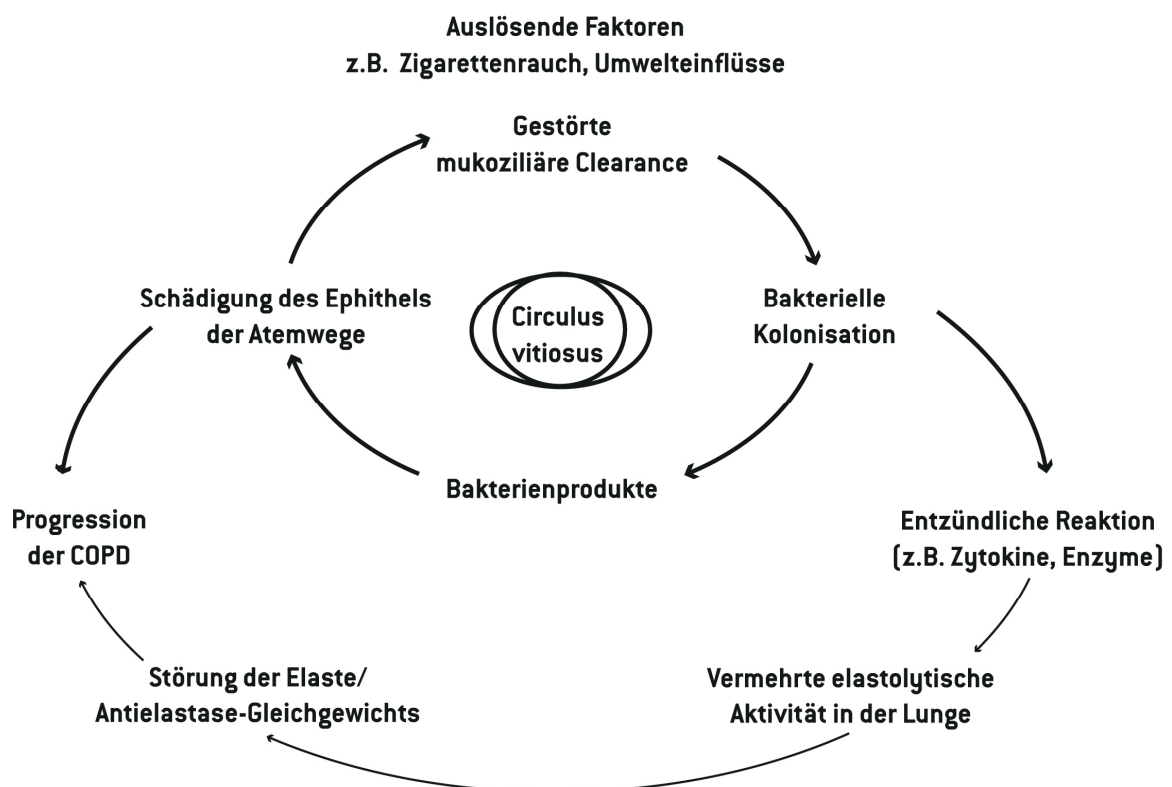


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Circulus vitiosus Hypothese der COPD

[nach (Sethi and Murphy, 2001)]

Bakterielle Infektionen des Bronchialtraktes sind zudem häufig Auslöser akuter Exazerbationen der COPD (Sethi and Murphy, 2001). Diese sind durch eine akute, jedoch nicht persistierende Verschlechterung der respiratorischen Symptome mit Zunahme von Husten und Dyspnoe sowie vermehrter Sputummenge und/ oder Sputumpurulenz charakterisiert und machen zumeist eine Veränderung der regulären medikamentösen Therapie erforderlich (Sethi, 2005). Über die Hälfte aller Exazerbationen werden durch bakterielle Pathogene verursacht (Anthonisen et al., 1987; Stoller, 2002; Anzueto et al., 2007). Dominierend sind hierbei vor allem Infektionen mit *M. catarrhalis*, *H. influenza* und *S. pneumoniae* (Murphy, 2006; Sykes et al., 2007), aber auch virale Infektionen und andere Bakterien können dazu beitragen.

1.2 *Moraxella catarrhalis*

1.2.1 *Moraxella catarrhalis* allgemein

M. catarrhalis (*Branhamella catarrhalis*), ursprünglich *Neisseria catarrhalis* oder *Micrococcus catarrhalis* genannt, ist ein gramnegativer aerober Diplokokkus. *M. catarrhalis* ist ein häufiger Erreger von Infektionen des oberen und unteren Respirationstraktes und wurde erstmals im Jahre 1896 durch Pfeiffer als *Mikrokokkus catarrhalis* erwähnt (Berk, 1990; Sethi, 2005).

Während *M. catarrhalis* bis in die 90er Jahre hinein als Bakterium ohne signifikante Pathogenität angesehen wurde, konnte mittlerweile seine Beteiligung bei der Entstehung oberer Atemwegsinfektionen bei Kindern und älteren Patienten sowie Infektionen des unteren Respirationstraktes bei Patienten mit COPD nachgewiesen werden (Verduin et al., 2002). Diese relativ späte Anerkennung als pathogener Organismus ist verschiedenen Faktoren zuzuschreiben. So kolonisiert *M. catarrhalis* beispielsweise in den oberen Atemwegen von Kindern und Erwachsenen ohne signifikante klinische Zeichen einer Entzündung aufzuweisen (Catlin, 1990; Karalus and Campagnari, 2000). Auch die morphologische Ähnlichkeit mit Spezies der *Neisseriae*, welche zur normalen Standortflora des oberen Respirationstraktes gehören, erschwert eine differenzierte Darstellung der Pathogenität.

Die Kolonisierungsrate bei gesunden Mitgliedern einer Population steht in direkter Korrelation zum Alter. So ist die Besiedelung der Atemwege von Kindern ein weit verbreitetes Phänomen. Bis zu 75% aller Kinder im ersten Lebensjahr sind mit *M. catarrhalis* kolonisiert, während bei gesunden Erwachsenen durchschnittlich nur 1-5 % betroffen sind (Faden et al., 1994; Murphy, 1996). Die Gründe hierfür sind bisher nicht geklärt. Interessanterweise weisen jedoch Patienten mit COPD Kolonisierungsraten von bis zu 32% auf. *M. catarrhalis* zählt derzeit als zweithäufigster Erreger der infektexazerbierten COPD. (Alamoudi, 2007; Sethi and Murphy, 2001).

Im Kindesalter gilt *M. catarrhalis* neben *S. pneumoniae* und *H. influenzae* als dritthäufigster Erreger von Otitis Media und Sinusitis. Hierbei handelt es sich oft um eine Koinfektion, bei den

jüngeren Kindern konnten jedoch vermehrt Reinkulturen von *M. catarrhalis* nachgewiesen werden (Wald, 1992; Murphy et al., 2009). Neben diesen relativ häufigen klinischen Manifestationen gibt es auch Berichte über eine Beteiligung von *M. catarrhalis* bei Meningitis, Endokarditis, Perikarditis, Urethritis, Epiglottitis, Osteomyelitis, Konjunktivitis und Peritonitis (Sethi and Murphy, 2001).

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass *M. catarrhalis* eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese der COPD spielt (Murphy et al., 2005). So kommt es zu einem vermehrten Auftreten akuter Exazerbationen der COPD und wirkt sich insgesamt auf Schweregrad und Progression der Erkrankung aus. In verschiedenen Studien konnte bislang beobachtet werden, dass bei COPD-Patienten die Höhe der Bakterienzahl in den Atemwegen mit einer erhöhten Entzündung korreliert und zudem mit einer Abnahme der FEV₁, als Marker der Lungenfunktion, assoziiert ist (Wilkinson et al., 2003; Banerjee et al., 2004; Rosell et al., 2005).

Bei einer Infektion mit einem neuen Bakterienstamm von *M. catarrhalis* verdoppelt sich sogar das Risiko einer akuten Exazerbation (Sethi et al., 2002).

Genau Mechanismen, welche die Rolle von *M. catarrhalis* bei der Kolonisierung des Bronchialtraktes bzw. der infektexazerbierten COPD konkreter erklären, sind bislang nicht bekannt. *In-vitro* Versuche konnten indes eine *M. catarrhalis*-induzierte Aktivierung des Bronchialepithels demonstrieren, welches eine Sekretion proinflammatorischer Zytokine zur Folge hatte (Wilkinson et al., 2003; Slevogt et al., 2006).

Zur antibiotischen Behandlung *M. catarrhalis*- bedingter Infektionen des Respirationstraktes werden vor allem Cephalosporine der 2. und 3. Generation oder Ampicillin + Clavulansäure eingesetzt. Berücksichtigt werden muss dabei die hohe Rate an BRO β -Laktamase produzierenden Isolaten, welche innerhalb der vergangenen Dekade auf annähernd 100% angestiegen ist. Diese beeinträchtigen vor allem die Aktivität von einfachem Penicillin, aber auch der Aminopenicilline, Ampicillin und Amoxicillin. (Khan et al.; Verduin et al., 2002) .

Die zunehmende Erkenntnis der Bedeutung der Pathogenität von *M. catarrhalis* hat vermehrte Bestrebungen zur Entwicklung eines möglichen Impfstoffes zur Folge. So wurden mehrere potentielle Impfantigene identifiziert und klassifiziert, eine effektive Vakzine jedoch noch nicht entwickelt (Gu et al., 1998; Hoban et al., 2001; Sethi et al., 2005).

Da *M. catarrhalis* ein ausschließlich humanpathogener Erreger ist, bietet das Tiermodell keine Aussagefähigkeit in der Erforschung der Pathogenese (McMichael, 2000b; Peng et al., 2005).

In Hinblick auf vorliegende Beschränkungen beider therapeutischer Ansätze ist es von umso größerer Bedeutung die pathogenetischen molekulareren Mechanismen einer Infektion mit *M. catarrhalis* zu verstehen.

1.2.2 Oberflächenantigene/ Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis*

Bei der Untersuchung der Virulenzfaktoren von *M. catarrhalis* sind bisher Oberflächenantigene wie beispielsweise äußere Membranproteine (engl.: outer membrane proteins, OMP) und Lipooligosaccharide (LOS), adhäsionsvermittelnde Pili sowie Eisen-regulierende Proteine (Sethi and Murphy, 2001) identifiziert worden. Dabei stellen OMPs wichtige antigenetische Determinanten von *M. catarrhalis* dar, deren Profil sich auch innerhalb verschiedener Stämme gleicht (McMichael, 2000a). Primär charakterisiert wurden CopB (outer membrane protein B2 [OMP B2]) (Bartos and Murphy, 1988), OMP CD (Aebi et al., 1996; Sethi et al., 1997) und UspA Antigene (ubiquitous surface protein A oder high-molecular weight outer membrane protein [HMW-OMP]) (Hsiao et al., 1995). Aufgrund ihrer ungewöhnlichen Charakteristik und ihres ubiquitären Vorkommens liegt ein besonderer Fokus auf den sogenannten *ubiquitous surface proteins* UspA1 und UspA2. Die weite Verbreitung dieser Proteine konnte in einer großen Studie gezeigt werden. Dabei wurden bei einer Untersuchung in über 99% von 108 nasopharyngealen, *M. catarrhalis* positiven Isolaten von Kindern mit Otitis Media die UspA1 und UspA2 Proteine detektiert (Helminen et al., 1994; Klingman and Murphy, 1994). Das UspA1 Gen ist ein 88kDa Protein, während UspA2 ein Molekulargewicht von 62kDa aufweist. Beide Proteine unterscheiden sich in ihrer biologischen Funktion.

Während eine Expression von UspA1 durch *M. catarrhalis* dessen Adhäsion an epitheliale Zellen wie beispielsweise des Bronchialepithels dient, spielt die Präsenz von UspA2 eine protektive Rolle bei der Immunantwort und ist bei der Serumresistenz beteiligt (Meier et al., 2002). Die Aminosäuresequenzen von UspA1 und UspA2 sind zu 43% identisch, in einer Region weisen beide jedoch eine Übereinstimmung von 93% auf. Diese Domäne ist durch ihre Bindungsfähigkeit mit dem monoklonalen Antikörper (MAb) 17C7 charakterisiert und bietet somit einen weiteren Angriffspunkt für eine potentielle Vakzine (Aebi et al., 1997; Aebi et al., 1998; Lafontaine et al., 2000).

Lipopolysaccharide (LPS) sind strukturelle Komponenten der äußeren Membran gram-negativer Bakterien und essentielle Mediatoren bakterieller Virulenz. Die hitzestabilen LPS haben nach ihrer Freisetzung bedeutende endotoxische Effekte und können gravierende systemische Immunreaktionen bis hin zum septischen Schock auslösen (Aebi et al., 1997; McMichael, 2000a). *M. catarrhalis* verfügt nicht über LPS sondern Lipooligosaccharide (LOS). Diese bestehen aus einem Oligosaccharid und Lipid A, es fehlen jedoch O-Antigene Seitenketten mit Wiederholungseinheiten, ein bedeutendes Charakteristikum gram-negativer enteraler Bakterien (Morrison and Ulevitch, 1978; Raetz and Whitfield, 2002). LOS-Epitope von *M. catarrhalis* haben vielmehr Ähnlichkeit mit gram-negativen Pathogenen wie *H. influenzae*, *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae* (Edebrink et al., 1994; Masoud et al., 1994). Bei diesen Bakterien stellen diese strukturell vergleichbaren Oligosaccharid-Epitope wichtige

Pathogenitätsfaktoren dar (Rahman and Holme, 1996; Holme et al., 1999). Weitere potentielle Vakzine-Antigene sind die Rezeptorproteine TbpA und TbpB (Transferrin binding protein A und B) sowie LbpA und LbpB (Laktoferrin binding protein A und B). Diese spezifischen Proteine werden von *M. catarrhalis* bei einem Zustand limitierten Eisens expremiert und spielen so eine wichtige Rolle bei deren Wachstums- und Überlebensmechanismen (Apicella and Mandrell, 1989; Porat et al., 1995; Clemans et al., 2000).

1.3 Das humane Bronchialepithel und seine Bedeutung bei der COPD

Das humane Bronchialepithel wurde lange Zeit als eine rein physikalische Barriere zum Schutz vor pathogenen Keimen und anderen schädlichen Umwelteinflüssen betrachtet.

Große Fortschritte im Verständnis der metabolischen und biochemischen Funktion des Epithels führten schließlich jedoch zur Erkenntnis, dass es wesentlich komplexeren Vorgängen dient. Das Bronchialepithel verfügt über verschiedene Schutzfunktionen, die es ihm ermöglichen das Eindringen potentieller Krankheitserreger oder Partikel zu bekämpfen. Dabei kommen verschiedene Mechanismen zum Tragen. Durch die ziliäre Clearance, sowie die Produktion antimikrobieller Agenzien im Mukus werden pathogene Mikroorganismen sowohl nach außen transportiert als auch abgetötet bzw. in ihrem Wachstum gehemmt. Desweiteren induziert das Bronchialepithel die Rekrutierung phagozytierender Zellen, ist an der Aktivierung einer Entzündungsantwort beteiligt und sezerniert zahlreiche inflammatorische Mediatoren und Zytokine (Campagnari et al., 1994; Karalus and Campagnari, 2000). Epitheliale Zellen sind zudem auch über den Transport von IgA, welches immunmodulatorische Eigenschaften besitzt, an der erworbenen Immunantwort beteiligt (Devalia and Davies, 1993; Martin et al., 1997; Diamond et al., 2000).

Bei den genannten Vorgängen wird deutlich, dass die Bronchialepithelzellen eine Schlüsselrolle bei der Koordination von Abwehrreaktionen und der Regulation inflammatorischer Prozesse in den Atemwegen einnehmen. Dem Brochialepithel kann somit eine eine zentrale Bedeutung bei Pathogenese und Progression der COPD zugeschrieben werden (Pilette et al., 2001).

Der Einfluss von Bakterien wie *M. catarrhalis* und die genauen Abläufe einer Interaktion mit dem Bronchialepithel sind allerdings bislang nur wenig erforscht. Angesichts der Auswirkungen bakterieller Kolonisation auf den Verlauf der COPD ist eine Fokussierung auf ebendiesen Ansatz zweifelsohne unerlässlich (Patel et al., 2002).

1.4 Das angeborene Immunsystem der Lunge

1.4.1 Die angeborene Immunität

Die ständige Exposition von Pathogenen in den Atemwegen bedarf eines gut funktionierenden Abwehrmechanismus der respiratorischen Epithelzellen. Das angeborene Immunsystem bietet einen effektiven initialen Schutz gegen Mikroorganismen und stimuliert das adaptive Immunsystem. Dieses phylogenetisch ältere unspezifische Immunsystem beinhaltet die Aktivierung von Makrophagen und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, antimikrobieller Peptiden, die Komplementaktivierung, die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und damit die Etablierung und Modulation einer Immunantwort (Barnes et al., 2003; Barnes, 2008).

Die adaptive oder auch erworbene Immunität hingegen ist durch eine langsamere Immunantwort gekennzeichnet, welche Antikörper- bzw. Zell-vermittelt erfolgt. Durch klonale Selektion gebildete antigenspezifische Effektorzellen und Gedächtniszellen spielen hierbei eine wichtige Rolle (Aderem and Ulevitch, 2000; Janeway and Medzhitov, 2002). Hauptakteure der adaptiven Immunität stellen die B- und T-Lymphozyten dar (Martin and Frevert, 2005).

Eine wichtige Herausforderung für das angeborene Immunsystem ist die Fähigkeit eigene von fremden Antigenen zu unterscheiden, so dass potentielle pathogene Strukturen erkannt werden können. Diese bakterienspezifischen Strukturen wurden von Janeway und Medzhitov (Janeway and Medzhitov, 2002) als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns [PAMPs]) bezeichnet und sind von essentieller Bedeutung für die Pathogenität und das Überleben mikrobieller Organismen. Dazu gehören Lipopolysaccharide (LPS), Lipopeptide (LP) Peptidoglykane (PG), Mannane, Lipoteichonsäuren (LTA), bakterielle DNA, sowie doppelsträngige RNA (Janeway and Medzhitov, 1998).

1.4.2 Rezeptoren der angeborenen Immunität

Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, sogenannte „pattern- recognition receptors [PRRs] “ (mustererkennende Rezeptoren), spielen eine wichtige Rolle bei der Orchestrierung einer entzündlichen Reaktion. Als Teil des angeborenen Immunsystems können sie bestimmte Muster von Mikroorganismen, sogenannte „Pathogen-associated molecular pattern (PAMP) “ erkennen (Medzhitov and Janeway, 2000). Die derzeit bekannten PRRs können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden, von denen die Gruppe der Toll-like Rezeptoren (TLRs) für die Aktivierung des Bronchialepithels von besonderer Bedeutung ist (Medzhitov and Janeway, 1997; Takeda et al., 2003). Die Toll-like Rezeptoren (TLR) stellen die bedeutendste und bislang am besten untersuchte Familie der PRRs dar und werden auf einer Vielzahl von Zellen, unter anderem auch auf respiratorischem Epithel expremiert (Janeway and Medzhitov,

2002). TLR4 erkennt beispielsweise LPS gram-negativer Bakterien, möglicherweise ebenso virale Proteine, Hitzeschockproteine und Fibrinogen (Akira et al., 2006). TLR2 dagegen ist Rezeptor für Lipoteichonsäure, Lipopeptide und Glykolipide (Poltorak et al., 1998; Akira et al., 2006). Die Interaktion zwischen TLR und PAMPs führt zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, welche an der Regulation der Expression unterschiedlicher Gene beteiligt sind, die unter anderem für Zytokine, Chemokine und antimikrobielle Peptide kodieren.

1.5. Zytokine und Chemokine

Zytokine sind extrazelluläre Signalproteine und wichtige Mediatoren der angeborenen Immunität. Sie werden von verschiedenen Zellen, unter anderem Epithelzellen, sezerniert und können durch Interaktion mit Rezeptoren deren Wachstum, Differenzierung und Rekrutierung induzieren (Aliprantis et al., 1999; Lehner et al., 2001; Opitz et al., 2001). Außerdem aktivieren sie lokale Reparations-, sowie fibrotische Gewebsumwandlungsprozesse am Ort des inflammatorischen Geschehens (Riffo-Vasquez et al., 2000; Chung, 2001; Toews, 2001).

Zytokine lassen sich unter anderem nach ihren funktionellen Eigenschaften einteilen: Pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. TNF α , IL-1, IL-6 und GM-CSF spielen eine wichtige Rolle bei der Förderung einer Entzündungsreaktion, wohingegen anti-inflammatorische Zytokine (IL-10, TGF β) inhibitorische Effekte aufweisen und eine Gewebsschädigung begrenzen. Eine Balance zwischen den Mediatoren ist für die Regulation eines entzündlichen Prozesses von entscheidender Bedeutung (Toews, 2001; Strieter et al., 2003).

Eine Untergruppe der Zytokine stellen die sogenannten Chemokine dar, Polypeptide mit einer Größe von 8-13 kDa, welche mit ihrer chemotaktischen Eigenschaft an der Rekrutierung von Leukozyten beteiligt sind (Netea et al., 2003; Gomez and Prince, 2008). Chemokine lassen sich, je nach Konfiguration von N-terminalem Cystein (C) bzw. dem Vorhandensein einer zusätzlichen Aminosäure (X), unter anderem in CXC, CCC und CX³C einteilen (Chung, 2001). Vor allem die CXC-Subfamilie, mit ihrem bekannten Vertreter IL-8, sind Hauptmediatoren aktivierender und regulatorischer Effekte auf neutrophile Granulozyten (Zlotnik and Yoshie, 2000; Strieter et al., 2003).

1.5.1 Interleukin-8

IL-8 ist ein bedeutendes Chemokin der CXC-Familie und wird in der Lunge von Epithelzellen, Alveolarmakrophagen, Lymphozyten und u.a. als reaktive Antwort auf Stimulation durch proinflammatorische Stimuli sezerniert (Strieter et al., 2002; Kobayashi, 2008). IL-8 spielt vor allem eine primäre Rolle bei der Regulation der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und

Monozyten am Infektionsort und ist somit auch ein wichtiger Mediator inflammatorischer Aktivität in den Atemwegen (Baggiolini et al., 1994; Delclaux and Azoulay, 2003). Im Gegensatz zu anderen inflammatorischen Zytokinen kann IL-8 nach Freisetzung in den Extrazellulärraum über einen langen Zeitraum persistieren und somit seine chemotaktische Wirkung aufrechterhalten (Richman-Eisenstat et al., 1993; Mukaida, 2003). Bereits 60 min. nach einer zellulären Stimulation ist eine Detektion von IL-8-mRNA möglich, IL-8 gehört somit zur Gruppe der „Early-Response“-Gene. Die Regulation dieser raschen Antwort erfolgt durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, welche am IL-8-Genpromotor binden (Remick, 2005). Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren mit anschließender IL-8 Genexpression wird durch Stimulatoren wie TNF oder IL-1 (Roebuck, 1999), Bakterien (Kasahara et al., 1991; Brasier et al., 1998), Viren (Aihara et al., 1997; Hobbie et al., 1997) sowie zellulären Stress induzierende Agenzien (Murayama et al., 1997; Mastronarde et al., 1998) hervorgerufen.

Verschiedene Studien zeigten bei COPD-Patienten eine erhöhte IL-8 Expression und Sekretion in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit und Sputum, welche auch mit einer Abnahme der FEV1 korreliert (Patel et al., 2002; Beeh et al., 2003). Zudem konnte eine Korrelation von erhöhten IL-8 Werten mit der Kolonisation des unteren Respirationstraktes durch Mikroorganismen wie *M. catarrhalis* demonstriert werden. (DeForge et al., 1993). Diese Beobachtungen zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen der Menge des sezernierten IL-8s und der Pathogenese und dem Verlauf der COPD.

1.5.2 Die Rolle von Nuclear factor- κ B für die Steuerung der Transkription von IL-8

Wie zuvor erwähnt wird die Sekretion von IL-8 durch zahlreiche Stimulatoren wie proinflammatorische Zytokine oder bakterielle Produkte induziert (Slevogt et al., 2006; Nakanaga et al., 2007). IL-8 kann auf diesem Wege auf das 100-fache des Basalwertes ansteigen (Yamamoto et al., 1997; Patel et al., 2002; Schulz et al., 2003; Wilkinson et al., 2003; Di Stefano et al., 2004a; Donaldson et al., 2005). Maximale IL-8 Werte werden im Lungenepithel jedoch erst durch eine Kombination verschiedener regulatorischer Signalmechanismen ermöglicht, wobei vor allem der Transkriptionsfaktor NF- κ B beteiligt ist (Hoffmann et al., 2002). Transkriptionsfaktoren sind Proteine, welche an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Sie binden mit hoher Spezifität am Promotor und kontrollieren die Transkription, indem sie unter anderem die DNA-Bindung der RNA-Polymerase beeinflussen. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine zentrale Rolle bei der Expression vieler Gene, welche in die Regulation von inflammatorischen Antworten involviert sind (Mukaida, 2000; Ghosh and Hayden, 2008). Dazu gehören proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1 und IL-6, Chemokine wie IL-8 oder MIP-1 α , sowie Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 oder ICAM-1 (Hayden and Ghosh, 2004).

NF- κ B gehört zur Familie der Rel Proteine und besteht aus den Untereinheiten p50, p52, p65 (auch RelA genannt), Rel und RelB. In unstimulierten Zellen werden diese von einer Familie inhibitorischer Proteinen, sogenannter I κ -B Proteine, im Zytoplasma verankert.

NF- κ B abhängige Signalwege werden durch verschiedene Immunrezeptoren wie Toll-like Rezeptoren (TLRs), TNF Rezeptoren oder Antigenrezeptoren aktiviert (Kawai and Akira, 2007; Sun and Ley, 2008). Nach Ligandenbindung kommt es zu einer Aktivierung des I κ -B Kinase Komplexes. Dieser bewirkt eine Phosphorylierung des I κ -B Proteins, es kommt zur Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Degradation und schließlich zu einer Freisetzung der gebundenen zytoplasmatischen NF- κ B-Untereinheiten. Nun kann eine Translokation dieser NF- κ B Untereinheiten zum Zellkern erfolgen. Dort können sie an κ B Bindungsstellen des Promotors binden und schließlich eine NF- κ B abhängige Gentranskription initiieren (Hayden and Ghosh, 2008). Die Aktivierung der IL-8 Gentranskription erfolgt ebenfalls über diesen Mechanismus: Die p65 Untereinheit bindet an die IL-8 Promotorregion (Jimi and Ghosh, 2005). Dies hat eine Bindung von RNA Polymerase II an den Promotor und damit eine Aktivierung der IL-8 Gentranskription zur Folge (Li et al., 1994; Wickremasinghe et al., 1999; Hoffmann et al., 2002; Griffin and Moynagh, 2006).

Bei Patienten mit COPD konnte im Lungengewebe eine erhöhte NF- κ B Aktivität nachgewiesen werden (Baeuerle and Baltimore, 1996; Schmitz et al., 2001).

Die Bedeutung der Aktivierung von NF- κ B für die Aktivierung des Bronchialepithels mit anschließender Freisetzung von IL8 konnte ebenfalls, unter anderem durch unsere Arbeitsgruppe demonstriert werden. (Di Stefano et al., 2002; Hayden and Ghosh, 2004; Slevogt et al., 2006; Yagi et al., 2006).

1.6 Proteinkinase C

1.6.1 PKC allgemein

Die Proteinkinase C (PKC) ist ein ubiquitäres, phospholipid- abhängiges Enzym und besitzt eine zentrale Aufgabe bei der intrazellulären Signaltransduktion.

Individuelle PKC Isozyme spielen eine bedeutende Rolle bei zellulären Mechanismen der Lunge wie der Regulation von endothelialer Permeabilität (Karin and Ben-Neriah, 2000), Mukussekretion (Lynch et al., 1990; Lum and Malik, 1994), Apoptose (Kai et al., 1994) Kontraktion, Migration, Hypertrophie, Proliferation, (Lucas and Sanchez-Margalet, 1995) und der Expression inflammatorischer Mediatoren (Dempsey et al., 2000). So konnte beispielsweise nach Exposition pulmonaler Epithelzellen mit TNF α , durch Einsatz spezifischer PKC Inhibitoren eine deutliche Reduktion der Immunantwort erzielt werden (Reibman et al., 2000).

Weitere experimentelle Studien deuten darauf hin, dass die PKC eine wichtige Funktion in der Steuerung NF- κ B abhängiger Genexpression und der Kontrolle einer IL-8 Freisetzung durch

Interleukin 1 β oder TNF α zugeschrieben werden kann (Wyatt et al., 1997). Die Aktivierung der PKC ist somit ein integraler Bestandteil bei der Abwehr von Pathogenen. PKC Signalwege sind zudem bei der Regulation der GM-CSF Produktion von Tumorzellen beteiligt (Jordan et al., 1996; Dempsey et al., 2000; Page et al., 2003).

1.6.2 Struktureller Aufbau der PKC

Die Proteinkinasen C gehören zur Familie der Serin/ Threoninkinasen und bestehen aus einem Polypeptidstrang mit einer regulatorischen N-terminalen (R), sowie einer katalytischen C-terminalen Domäne. Dieser Polypeptidstrang lässt sich in vier Abschnitte C1-C4 und 5 variable Regionen (V1- V5) untergliedern (Uemura et al., 2005). C1 und C2 stellen die beiden regulatorischen Basismodule dar. Die C1-Domäne verfügt über zwei Cystein-reiche Motive, welche die Bindungsstelle für Diacylglycerol (DAG) und Phorbolster (z.B. PMA) bilden. Diacylglycerol und Phorbolster fungieren als hydrophobe Anker zur Bindung des Enzyms an die Zellmembran (Coussens et al., 1986). Dieser Domäne N-terminal anschließend befindet sich eine autoinhibitorische Pseudosubstratsequenz, welche dazu beiträgt, den inaktiven Zustand des Enzyms beizubehalten (Newton, 1995).

Die C2-Domäne besitzt eine Erkennungssequenz für saure Lipide und verfügt in einigen Isoenzymen über eine Ca²⁺ Bindungsstelle. Die katalytischen Domänen C3 und C4 weisen ein ATP bindendes Motiv bzw. eine Substratbindungsstelle und eine Phosphatsetransfer-Region auf (House and Kemp, 1987).

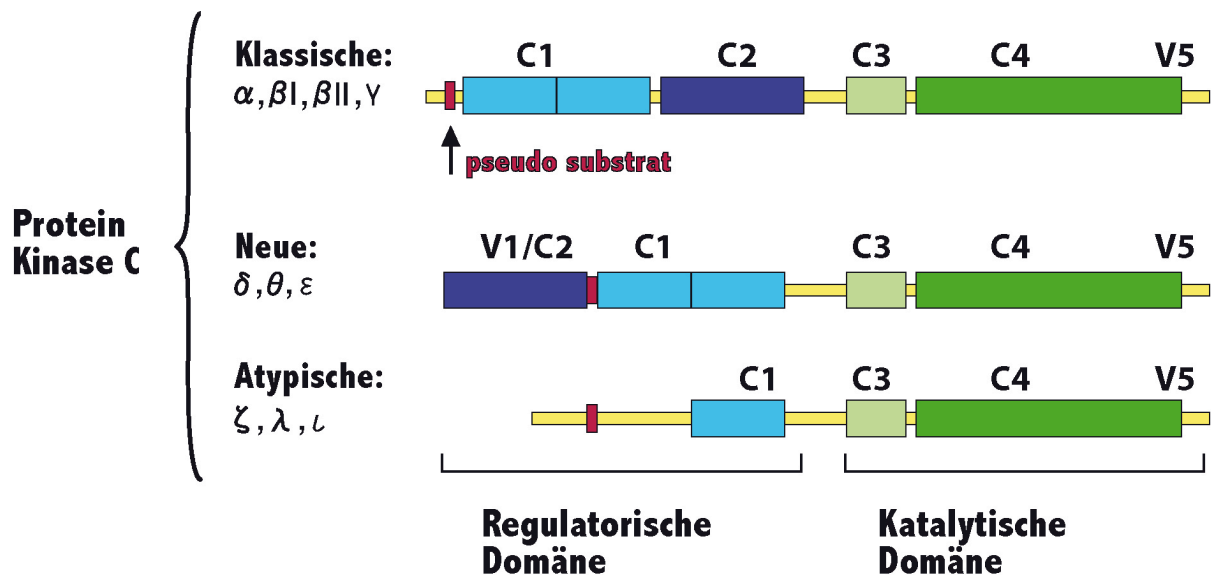
Die Familie der Proteinkinase C besteht aus zwölf Isoformen welche sich nach Aminosäuresequenz und Regulationsmechanismen in drei Gruppen unterteilen lassen: klassische, neue und atypische PKC Isozyme (Hug and Sarre, 1993; Newton, 2003).

Die klassischen Proteinkinasen C (cPKC) gehören zur am besten charakterisierten Gruppe. Sie besteht aus den Isoformen PKC- α , PKC- β_1 , PKC- β_2 und PKC- γ , ihre Aktivierung ist von Ca²⁺, Diacylglycerol und Phosphatidylserin abhängig (Liu and Heckman, 1998; Dempsey et al., 2000; Newton, 2001).

Die neuen Proteinkinasen C (nPKC), zu denen PKC- ϵ , PKC- δ , PKC- η , PKC- θ und PKC- μ gehören, verfügen über eine funktionelle C1-Domäne, der C2-Domäne fehlt jedoch eine Ca²⁺-Bindungsmöglichkeit, so dass sie nur über Diacylglycerolsignale und Phosphatidylserin aktiviert werden (Newton, 1995; Webb et al., 2000; Newton, 2001; Siflinger-Birnboim and Johnson, 2003).

Im Gegensatz dazu weisen die atypischen Proteinkinasen C (aPKC) PKC- ζ , PKC- λ und PKC- ι signifikante strukturelle Unterschiede auf. Da die C1-Domäne nur ein Cystein-reiches Motiv enthält, kann kein Diacylglycerol gebunden werden. Zusätzlich fehlen entsprechende Schlüsselsequenzen, die für die Faltung der C2 Domäne zuständig sind. Die Aktivierung

atypischer PKCs erfolgt daher ausschließlich über Phosphatidylserin (Webb et al., 2000; Newton, 2003; Siflinger-Birnboim and Johnson, 2003).



(modifizierte Abbildung nach Kheifets Mochly-Rosen 2007)

Abbildung 1.2: PKC Isozyme

Die PKC Isozyme bestehen aus 3 Klassen: Klassische, Neue und Atypische PKC.

Die regulatorische Domäne besteht aus C1 und C2 Domänen, sowie variablen Regionen (V) 1-3. Die V1 Region beinhaltet die Substratsequenz (rot), welche an die Substratbindungsseite der katalytischen Domäne bindet. Die Familie der klassischen und neuen Isozyme haben eine doppelte C1 Domäne (hellblau), die DAG und Analoga bindet, während Mitglieder der atypischen Familie nur über eine einfache C1 Domäne verfügen. Klassische und Neue PKC haben zudem eine C2 Domäne (dunkelblau), welche Phosphatidylserin (PS) bindet. Die klassische geht die Bindung mit PS in Abhängigkeit von Ca^{2+} ein. Die katalytische Domäne verfügt über eine ATP- Bindungsdomäne, C3 (hellgrün), sowie die Substratbindungsdomäne C4 (dunkelgrün). Die C-terminal gelegene V5 Domäne hat Phosphorylierungsstellen, welche an der Regulation der PKC Aktivität beteiligt sind.

1.6.3 Mechanismen der Aktivierung von PKC

Wie bereits erwähnt befindet sich die inaktive Form der Proteinkinase C im Zytosol.

Die Aktivierung der klassischen PKC Isozyme erfolgt durch die Bindung spezifischer Liganden an entsprechende Rezeptoren der Zelle. Dies bewirkt eine Phosphorylierung der membranständigen Phospholipase C (PLC), welche daraufhin die Membrankomponente Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1, 4, 5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) hydrolysiert. IP₃ bindet nun an Rezeptoren in der Membran intrazellulärer Kalziumspeicher des Endoplasmatisches Retikulums und induziert die Freisetzung von Ca²⁺ in das Zytosol. Die Ca²⁺ Ionen binden hier an die C2- Domäne der klassischen PKC- Isoformen und führen zu einer Konformationsänderung. Der PKC-Ca²⁺ Komplex verlagert sich nun zur Zellmembran, wo durch Bindung an DAG eine Dissoziation des Pseudosubstrates ausgelöst und somit eine Substratbindung ermöglicht wird (Webb et al., 2000; Newton, 2003; Siflinger-Birnboim and Johnson, 2003).

Die Familie der neuen PKC Isozyme bindet kein Ca²⁺, verfügt jedoch über eine höhere Affinität zu Diacylglycerin (House and Kemp, 1987; Nalefski and Newton, 2001; Schaefer et al., 2001; Siflinger-Birnboim and Johnson, 2003). Die Signalkaskade zur Aktivierung der neuen und atypischen PKC ist bislang noch nicht hinreichend geklärt.

In einer Zelle können gleichzeitig verschiedene PKC Isozyme vorliegen und auf den gleichen Stimuli hin zu unterschiedlichen subzellulären Strukturen translozieren (Nishizuka, 1986). Diesem Vorgang liegt die Vorstellung zugrunde, daß jedes individuelle Isozym über bestimmte selektive Rezeptoren verfügt, sogenannte Rezeptoren für aktivierte C Kinase (RACKs), die in direkter Nähe des entsprechenden Substrats lokalisiert sind. Auf diese Weise können die einzelnen Isoformen eine funktionell spezifische Wirkung eingehen (Disatnik et al., 1994). Neben der Zellmembran können auch der Zellkern (Mochly-Rosen, 1995; Kheifets and Mochly-Rosen, 2007) oder auch der Golgiapparat (Leach et al., 1989; Wagner et al., 2000) den Zielort subzellulärer Translokation von PKC darstellen.

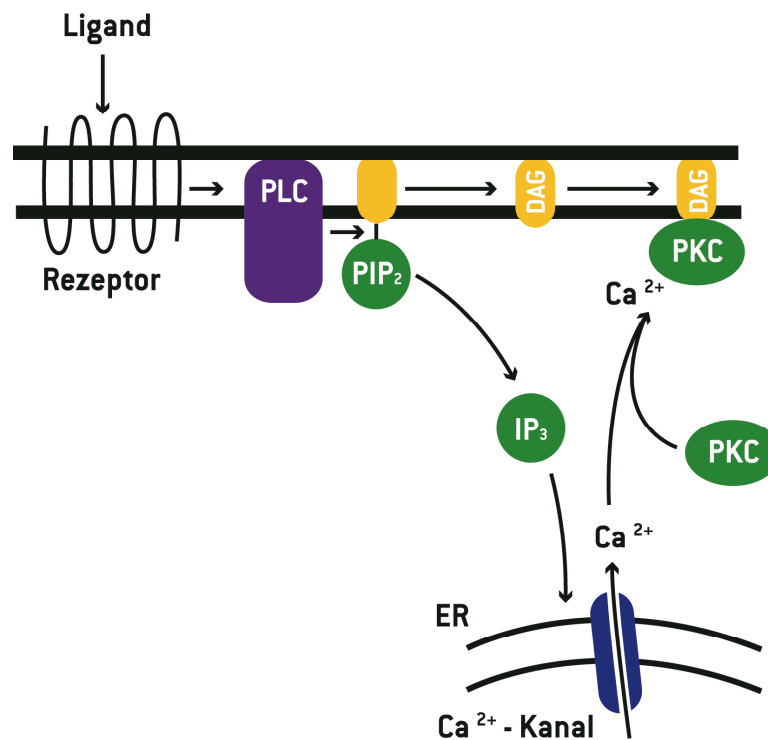


Abbildung 1.3: Aktivierung der konventionellen PKC-Isoformen

Nach Ligandenbindung an einen Rezeptor erfolgt die Phosphorylierung der membranständigen Phosphorylase C (PLC). Diese spaltet ebenfalls membranständiges Phosphoinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Isonitol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). IP₃ transloziert zu einem intrazellulären Kalziumspeicher und bindet an einen spezifischen Rezeptor, worauf Ca²⁺-Ionen frei werden. Diese binden zytosolische cPKC und induzieren deren Translokation zur Zellmembran. Das noch inaktive Enzym bindet über seine C1-Domäne an membranständiges DAG und wird aktiviert. (Ca²⁺ = Kalzium-Ionen; ER = endoplasmatisches Retikulum; PKC = Proteinkinase C) Quelle: Promega

1.6.4 Vorkommen der PKC in der Lunge

Das Lungenepithel zeigt eine heterogene Expression einzelner Isoformen der PKC. So sind Isoformen der klassischen PKCs, die PKC- α und PKC- β , der neuen PKCs, die PKC- δ , PKC- ϵ und PKC- θ , sowie der atypischen PKC, die PKC- ζ vertreten (Parker and Murray-Rust, 2004).

Wie in einigen Studien demonstriert, werden verschiedene PKC Isoformen mit charakteristischen Merkmalen der COPD in Zusammenhang gebracht. Das proinflammatorische Neuropeptid Bradykinin führt in Zellen der Bronchialwand zu einer Aktivierung von PKC α , β , δ , ϵ und μ und induziert die COX Expression und PGE₂-Akkumulation in Abhängigkeit von PKC ϵ (Webb et al., 2000; Clark et al., 2003; Woo et al., 2005). PKC α ist bei

Patienten mit COPD erhöht und scheint eine wichtige Aufgabe bei der Hypertrophie und Proliferation von smooth muscle cells (SMC) in den Atemwegen zu erfüllen (Dempsey et al., 2007), ebenso nimmt PKC ζ hierbei Einfluss auf proliferative Prozesse (Zhang et al., 2004). Hypoxische Zustände des Lungengewebes führen zu einer Aktivierung von PKCs (unter anderem PKC α) in vaskulären Zellen und bewirken hier eine Vasokonstriktion sowie eine Erhöhung endothelialer Permeabilität (Zhou and Hershenson, 2003). Interessanterweise zeigten Harrington et al. dass eine vermehrte Expression von PKC α die endotheliale Barrierefunktion vermindert, im Gegensatz dazu jedoch PKC δ einen Beitrag zu einer Verbesserung dieser Funktion leistet (Dempsey et al., 1997; Ding et al., 2001; Siflinger-Birnboim and Johnson, 2003).

Im Lungenepithel zeigt PKC δ einen regulatorischen Einfluss auf die Produktion proinflammatorischer Mediatoren (Harrington et al., 2003; Klinger et al., 2007). Erhöhte PKC δ Aktivität führt zu einer Potenzierung der NF- κ B abhängigen pro-inflammatorischen Zytokinproduktion in humanen Pulmonalepithelzellen. Ebenfalls konnten Catley et al. zeigen, dass PKC ϵ und andere PKCs wichtige Aktivatoren NF- κ B abhängiger Transkription sind, welche nach Einsatz des Pan-PKC Inhibitor Ro 31-8220 inhibiert werden konnten (Page et al., 2003). Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass PKCs einen nennenswerten Einfluss auf die mukosale Hypersekretion des Bronchialepithels zeigen (Catley et al., 2004). Zusammengefasst demonstrieren diese Studien, dass PKCs sowohl an der Atemwegskonstriktion, chronischen Inflammation, erhöhten Mukusproduktion und Zellwachstum, allesamt typische Befunde der COPD, beteiligt sind.

1.6.5 Substrate der PKC

Verschiedene Studien zeigten, dass eine erhebliche Anzahl von Substraten an PKC-gesteuerten zellulären Reaktionen beteiligt sind (Hewson et al., 2004). Sie können in drei große Gruppen klassifiziert werden:

- a) Proteine die an Signaltransduktionswegen und Aktivierung der PKC beteiligt sind (T-Zell- und Insulin- Rezeptoren, EGF, MEK-ERK),
- b) Proteine metabolischer Wege (Kanäle, Austauscher), sowie
- c) Proteine der Regulation der Genexpression (Transkriptions- und Translationsfaktoren) (Kikkawa and Nishizuka, 1986).

Eines der prominentesten Substrate stellt das „Myristolated alanine rich C kinase substrate“ (MARCKS) dar. Da es nahezu ubiquitär in verschiedenen Geweben vorhanden ist, kommt MARCKS eine bedeutende Rolle als Indikator der PKC- Aktivität zu (Hug and Sarre, 1993). Die MARCKS Proteine sind an der Zellmembran lokalisiert. Durch PKC werden sie phosphoryliert und anschließend von der Zellmembran abgespalten.

Die Affinität der einzelnen PKC Isozyme zu MARCKS ist sehr unterschiedlich (Blackshear, 1993; Aderem, 1995; Li et al., 2001), auch die Spezifität zu anderen Substraten ist unter anderem von Lokalisation und Rezeptorbindung abhängig und innerhalb der Isoformen verschieden.

1.7. Molekulare Wechselwirkungen zwischen *M. catarrhalis* und pulmonalen Epithelzellen

Die Erkennung pathogen-assoziiertes molekularer Muster (PAMPs) durch Toll-like Rezeptoren (TLR) sind Teil eines angeborenen Detektionsmechanismus, welcher an der Expression verschiedener Mediatoren beteiligt ist und eine Immunantwort induziert (Park et al., 2007).

TLR4, TLR2 und NOD1 sind in die Wirtsabwehr verschiedener gramnegativer Bakterien involviert (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Fritz et al., 2006). Während TLR4 eine wahrscheinlich untergeordnete Funktion für die *M. catarrhalis* bedingte Aktivierung von Epithelzellen spielt (Slevogt et al. unveröffentlichte Daten), konnte jedoch gezeigt werden dass TLR2 und NOD1 an der epithelialen Immunantwort gegen *M. catarrhalis* beteiligt sind (Wang et al., 2002; Chamillard et al., 2003; Girardin et al., 2003; Opitz et al., 2005; Travassos et al., 2005; Mogensen et al., 2006). Darüber hinaus wurde demonstriert dass die transmembranösen und zytoplasmatischen Rezeptoren TLR2 und NOD1 eine Rolle bei der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Produktion spielen (Slevogt et al., 2007).

Zu den Signaltransduktionswegen des Lungenepithels, welche vor allem bei der COPD aktiviert sind, zählen die Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinasen, die extrazellulär regulierte Kinase (ERK), die c-Jun Kinase (JNK), die p38 MAP Kinase, sowie der Transkriptionsfaktor NF- κ B (Slevogt et al., 2007). Welche Signalwege bei einer Infektion mit *M. catarrhalis* aktiviert werden ist bisher nur teilweise untersucht worden. Bislang konnte demonstriert werden, dass die *M. catarrhalis* induzierte Stimulation der p38 und ERK 1/2 MAP Kinasen, sowie von NF- κ B essentiell für die Aktivierung einer proinflammatorischen Zytokinsekretion zu sein scheint. Die Aktivierung der JNK MAP Kinase zeigte im Gegensatz dazu jedoch keinen Einfluß auf die Zytokinfreisetzung epithelialer Zellen (Di Stefano et al., 2004b; Gomez and Prince, 2008). Von der Proteinkinase C ist bekannt, dass in die Signalwege eine Aktivierung von NF- κ B und der p38, ERK 1/2 und JNK MAP Kinasen involviert sind (Uemura et al., 2005). Über die genaue Rolle von *M. catarrhalis* bei der Aktivierung der PKC, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, liegen bislang keine veröffentlichten Daten vor.

M. catarrhalis ist an der Induktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass *M. catarrhalis* die Freisetzung von IL-8, IL-6 und GM-CSF in epithelialen Zellen erhöht (Uemura et al., 2005; Slevogt et al., 2006). In Monozyten führt eine Stimulation durch *M. catarrhalis* ebenfalls zu einer erhöhten IL-8 Sekretion (Rosseau et al.,

2005; Fink et al., 2006; Slevogt et al., 2006; Slevogt et al., 2007). Zudem hat eine Infektion mit *M. catarrhalis* eine Aktivierung von Mastzellen sowie eine selektive Sekretion von IL-6 und MCP-1 (monocyte chemotactic Protein 1) zur Folge (Xie and Gu, 2008).

1.8 Zielsetzung und Fragestellung

In der Lunge werden zahlreiche PKC Isoformen expremiert und sind an der Vermittlung funktionell unterschiedlicher Signalwege beteiligt. Dies lässt die Hypothese zu, dass verschiedene PKC Isoformen eine bedeutende Rolle bei der Steuerung der proinflammatorischen Zytokinexpression spielen. Die differentiellen Regulationsmechanismen der einzelnen Isoformen sind hierbei möglicherweise von ihrem Expressionsprofil sowie ihrer Funktion in der Lunge abhängig.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung der Protein Kinase C und ihrer einzelnen Isoformen für die Expression und Freisetzung von Interleukin 8 (IL-8) in *Moraxella catarrhalis* infizierten humanen Bronchialepithelzellen *in vitro* zu untersuchen. Grundlage der vorliegenden Arbeit stellt folgende Fragestellung dar:

1. Induziert eine Infektion humaner Bronchialepithelzellen mit *M. catarrhalis* die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-8?
2. Wird bei einer Infektion humaner Bronchialepithelzellen mit *M. catarrhalis* die Protein Kinase C aktiviert?
3. Welche Aufgabe haben die *M. catarrhalis* Oberflächenproteine UspA1 und UspA2 bei der IL-8 Sekretion und der PKC Aktivierung?
4. Welche PKC Isoformen spielen für die IL-8 Freisetzung *M. catarrhalis* infizierter Bronchialepithelzellen eine Rolle?
5. Besteht ein Einfluß der PKC Isoformen auf das Verhalten der RNA Polymerase II am IL-8 Promoter nach Infektion mit *M. catarrhalis*?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Substanzen

Produkt	Hersteller
Acrylamid	Serva
Agarose	Promega
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Amphotericin	Boehringer
Antipain	Sigma
Aprotinin	Sigma
Bromphenolblau	Pharma Biotech
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Eisessig	Merck
Ethidiumbromid	Invitrogen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen Gibco
Glyzin	Serva
L-Glutamin	Invitrogen Gibco
Leupeptin	Sigma
β -Mercaptoethanol	Serva
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdeoxycholat, minimum 97%	Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Nonidet P-40	BioChemika
Orange G	Sigma
Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (Dulbecco`s PBS -/-)	Invitrogen Gibco
Pepstatin A	Sigma
Permafluor Aqueous Mounting Medium	Beckman Coulter
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Sigma
Sodiumdodezylsulfat (SDS)	Serva
Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva

Produkt	Hersteller
Trichloressigsäure 50%	Merck
Triton x100	Boehringer
Trizma Base, min 99,9% Titration	Sigma
Trypsin EDTA	Invitrogen Gibco
Tween 20	Sigma
Ziegenserum 5%	AAP Laboratories

2.1.2 Zellen

Alveolarzellkarzinomzellen A549

Die Alveolarzellkarzinom-Zelllinie A549 wurde ursprünglich aus einem Patienten mit einem humanen Lungenadenokarzinom isoliert. Für diese Arbeiten wurden Zellen dieser Linie von der American Type Culture Collection™ (ATCC), Rockville, USA bezogen.

BEAS-2B-Zellen

Die humane Bronchialzelllinie BEAS2-B wurde freundlicherweise von C. Harris, NIH, Bethesda, MD zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie wurde aus humanen bronchoepithelialen Zellen gewonnen und mittels SV40 Transformation immortalisiert (Reddel 1988).

2.1.3 Kulturmedien

Produkt	Hersteller
A549-Kultivierungsmedium	
Medium HAM's F12	Invitrogen Gibco
L-Glutamin	Invitrogen Gibco
FCS (Fötale Kälberserum)*	PAA Laboratories
BEAS- 2B Kultivierungsmedium	
Medium Keratinozyte-SFM	Invitrogen Gibco
EGF (Endothelial Growth Factor)	Invitrogen Gibco
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
ETI (Erythrina Trypsin Inhibitor)	Böhringer

Produkt	Hersteller
Coating-Lösung	
BSA10mg	Sigma
Vitronektin 5µg	Sigma
Fibronektin 1mg	Sigma
Keratinocyten-SFM ad 100ml	Invitrogen Gibco
PBECs Stimulationsmedium	
Epitheliales Basalzellmedium 500 ml	Clonetics
Epidermaler Growth Factor (EGF) 0,5 ng/ml	Clonetics
Insulin 5 µg/ml	Clonetics
Transferrin 10 µg/ml	Clonetics
Epinenephrine 0,5 µg/ml	Clonetics
Tri-iodthyronin 6,5 ng/ml	Clonetics
Bovine pituary gland extract 52 µg/ml	Clonetics
All trans Retinolsäure 0,1 ng/ml	Clonetics
PBECs Zellkulturmedium	
Nystatin 20 µl	Sigma
Gentamycin 50 µg/ml	Clonetics
Amphotericin 50 ng/ml	Clonetics
Ciprofloxacin 10 µl	Sigma
PBECs Adhäsionsmedium	
Kollagen 400 µl	Vitrogen 100
Essigsäure 31,6 ml	Merck

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

2.1.4 Bakterien

***Moraxella catarrhalis* Stamm O35E (Serotyp A)**

Der verwendete *Moraxella catarrhalis* Wildtypstamm O35E (Serotype A) wurde uns freundlicherweise von Eric Hansen, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas Texas, USA zur Verfügung gestellt.

Moraxella catarrhalis Stamm ATCC 25238 (Serotyp A)

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

Moraxella catarrhalis Mutanten

Die UspA1 und/ oder UspA2 defizienten Mutanten O35E.1, O35E 1.2 und O35E.2 wurden uns ebenfalls freundlicherweise von Eric Hansen, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas Texas, USA zur Verfügung gestellt.

Bakterienvermehrung:

Produkt	Hersteller
Anzuchtmedium <i>M. catarrhalis</i>	
Brain Heart Infusion (BHI)	Becton, Dickinson and Company
Aqua bidest	
Anzuchtplatten	
Columbia Agar mit 5% Schafsblut	Columbia BD

2.1.5 Zusammensetzung von Puffer und Lösungen

Substanz	Eingesetzte Menge
Blockpuffer ELISA	
PBS-/- 1x	45,0ml
inaktiviertes FCS 1%	5,0ml
Blotpuffer Western Blot 10x	
Glycin	144g
Tris Base	30g
Aqua bidest	ad 1000ml
Blotpuffer Western Blot 1x	
Methanol	200ml
Blotpuffer 10x	80ml
Aqua bidest	ad 1000ml
Carbonatpuffer ELISA (0,1M pH 9,5)	
NaHCO ₃	4,2g
Na ₂ CO ₃	1,78g
Aqua bidest	ad 500ml

Substanz	Eingesetzte Menge
ChIP-RIPA-Puffer	
NaCl	150mM
Tris HCl pH 7,5	10mM
EDTA	1mM
Nonidet P-40	1%
Desoxycholat	1%
Aprotinin	1%
DNA-Färbung	
Ethidiumbromid	0,4%
DNA-Ladepuffer ChIP (Orange G 5x)	
Glycerol	5ml
EDTA 0,5M	1ml
Orange G 2%	1ml
SDS 10%	0,1ml
Aqua bidest	2,9ml
Elektrophoresegel PCR 1,5%	
Agarose	1,5g
TAE Puffer (1x)	100ml
Elektrophoresegel Western Blot	
Trenngel-Puffer 1,5 M, pH 8,8	
Tris Base	18,15 g
Aqua bidest.	ad 100 ml
Sammelgel-Puffer 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	
Tris Base	6 g
Aqua bidest.	ad 100 ml
Trenngel (10%)	
Aqua bidest	4ml
Tris HCl, pH 8,8	2,5ml
Bis-Acrylamid 40%	3,55ml
Ammoniumpersulfat 10%	0,05ml
TEMED	0,005ml

Substanz	Eingesetzte Menge
Sammegel (6%)	
Aqua bidest	6ml
Tris HCl, pH 6,8	2,5ml
Bis-Acrylamid 40%	1,33ml
SDS 10%	0,1ml
Ammoniumpersulfat 10%	0,05ml
TEMED	0,01ml
High-Salt-Puffer	
NaCl	2M
Tris pH 7,5	10mM
Nonidet P-40	1%
Desoxycholat	0.5%
EDTA	1 mM
Laufpuffer 5x Western Blot	
Glycin	144g
Tris Base	30g
SDS	10%
Aqua bidest	ad 2000ml
Laufpuffer 1x Western Blot	
Laufpuffer 5x	200ml
Aqua bidest	1000ml
Lämmli-puffer Western Blot	
Glyzerol	0,8ml
Tris-HCl, 0,5 M, pH 8,3	1,0ml
SDS 10%	1,6ml
Bromphenolblau 1%	0,4ml
2-Mercaptoethanol 1%	0,4ml
Aqua bidest	3,8ml

Substanz	Eingesetzte Menge
Lysispuffer Proteinextraktion	
Gesamtproteinextraktion	
Tris-HCl, pH 7,4 , 50mM	100µl
PMSF 1mM	10µl
Antipain 10µg/ml	5µl
Leupeptin 10µg/ml	5µl
Pepstatin 10µg/ml	5µl
Nonidet P-40	50µl
Phosphoproteinwaschpuffer	833µl
Zytosol-Membran-Fraktionierung	
Lyse-Puffer A	
NaCl 0,1 M	666µl aus 1,5M Stocklösung
Triton 1%	1ml aus 10% Stocklösung
HEPES 10 mM	200µl aus 500µl Stocklösung
EDTA 2 mM	80µl aus 250µl Stocklösung
Na ₃ VO ₄ 4 mM	200µl aus 200mM Stocklösug
NaF 40 mM	400µl aus 1M Stocklösung
PMSF 1 mM	400µl aus 100mM Stocklösung
Aqua bidest.	ad 10ml
Substanz	Eingesetzte Menge
Lyse-Puffer B	
Lysepuffer A	900µl
SDS 1%	100µl SDS 10%
Phosphoproteinwaschpuffer	
Na ₃ VO ₄	200mM
NaF	1M
Na ₄ P ₂ O ₇	150mM
Aqua bidest	ad 505ml
PBS 0,1M	
NaH ₂ PO ₄	1,8g
Na ₂ HPO ₄	15,49g
Aqua bidest	ad 1000ml

Substanz	Eingesetzte Menge
Ponceau-S-Proteinfärbung	
Ponceau S	1,0g
Eisessig	50ml
Aqua bidest	ad 1000ml
Permeabilisierungsmedium Konfokalmikroskopie	
Triton 1% x 100	200µl
PBS 0.1M	ad 20ml
Verdünnungsmedium Konfokalmikroskopie	
Tween20 0,05%	0,01g
BSA 1%	0,2g
PBS	ad 20ml
Stopplösung ELISA	
H ₂ SO ₄ 97%	27,47ml
Aqua bidest	472,53ml
TAE-Puffer 50x, pH 8,6	
Tris Base	242g
Essigsäure 100%	51.1ml
EDTA	18.6g
Aqua bidest	ad 1000ml
TE-Puffer ChIP	
Tris, pH 7.5	10mM
EDTA	1mM
Aqua bidest	ad 500ml
Verdünnungsmedium Konfokalmikroskopie	
Tween20 0,05%	0,01g
BSA 1%	0,2g
PBS	ad 20ml
Waschpuffer ELISA	
Tween	0.05%
PBS-/- 1x	

2.1.6 Antikörper

ChIP

Antikörper	Spezies	Hersteller
Pol II (N-20) sc-899	Kaninchen	Santa Cruz

Western Blot

Primärantikörper	Spezies	Hersteller
PKC α	Kaninchen	Santa Cruz
PKC β I	Kaninchen	Santa Cruz
PKC β II	Kaninchen	Santa Cruz
PKC ϵ	Kaninchen	Santa Cruz
ERK-2 (D-2) sc-1647	Maus	Santa Cruz
Aktin (I-19) sc-1616	Ziege	Santa Cruz

Sekundärantikörper	Spezies	Hersteller
Anti Maus IgG IR-DYE 800	Ziege	Odyssey Infrared Imaging System
Anti Kaninchen IgG IR-DYE 800	Ziege	Odyssey Infrared Imaging System
Anti- Maus IgG CY5.5	Ziege	Odyssey Infrared Imaging System

Konfokalmikroskopie

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper		
PKC (A-9): sc-17804	1:100	Santa Cruz
Sekundärantikörper		
Alex Fluor 488	1:8000	Invitrogen

ELISA

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Capture Antikörper anti-humanes GM-CSF	1:250	BD Biosciences
Capture Antikörper anti-humanes IL-8	1:250	BD Biosciences
Detektionsantikörper anti-humanes GM-CSF	1:250	BD Biosciences
Detektionsantikörper anti-humanes IL-8	1:250	BD Biosciences

2.1.7 Protein Kinase C Inhibitoren

Inhibitor	Ziel	Endkonzentration	Hersteller
CalphostinC UCN-1028C	klassische, neue PKC	1µM	Calbiochem
Gö 6976	PKC α , β	10µM	Calbiochem
PKC Inhibitor 20-28, myristoyliert	PKC α	10µM	Calbiochem
PKC β Inhibitor	PKC β I, β II	10nM	Calbiochem
PKC ϵ Translocation Inhibitor Peptide	PKC ϵ	10µM	Calbiochem
PKC θ myristoyliert	PKC θ	25µM	Calbiochem
PKC ζ myristoyliert	PKC ζ	25µM	Calbiochem
Staurosporine	alle PKC	50nM	Calbiochem
PKC Inhibitor 19- 36	alle PKC	10µM	Calbiochem

2.1.8 Luziferaseassay

Produkt	Hersteller
Luciferase Reporter Gene Assay System	Promega

2.1.9 siRNA

siRNA	Sequenz	Konzentration	Hersteller
PKC α	5'-AAG CAC AAG UUC AAA AUC CAC TT-3'	2 μ g/ml	MWG-Biotech AG
PKC ϵ	5'-AAG CCC CUA AAG ACA AUG AAG TT-3'	2 μ g/ml	MWG-Biotech AG
Kontroll- siRNA	5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT- 3'	2 μ g/ml	MWG-Biotech AG

2.1.10 Primersequenzen**Primer Standard-PCR**

Primer	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz	Annealing- temperatur	Zyklenzahl	Hersteller
GAPDH	5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3'	5'-TCT AGA CGGG CAG GTC AGG TCC ACC-3'	60°C	27	TIB Molbiol
GM-CSF	5'-GTC TCC TGA ACC TGA GTA GAG ACA-3'	5'-AAG GGG ATG ACA AGC AGA AAG TCC-3'	68°C	37	TIB Molbiol
IL-8	5'-CTA GGA CAA GAG CCA GGA AGA-3'	5'-AAC CCT CTG CAC CCA GTT TTC-3'	60°C	29	TIB Molbiol

Promoterprimer ChIP-PCR

Primer	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz	Annealing-temperatur	Zyklenzahl	Hersteller
IL-8	5'-AAG AAA ACT TTC GTC ATA CTC CG-3'	5'-TGG CTT TTT ATA TCA TCA CCC TAG-3'	60°C	33	TIB Molbiol
GM-CSF	5'-TGT CGG TTC TTG GAA AGG TT-3'	5'-GGG CTC ACT GGC AAA AGA-3'	65°C	34	TIB Molbiol

2.1.11 Reaktionsansätze PCR

	Substanz	Menge	Hersteller
RT - PCR	5x AMV Puffer	4µl	Promega
	Nukleotide, 100mM 2µl	2µ	Promega
	Hexamerprimer 1µl	1µl	Promega
	RNasin® 0,75µl (Rnase Inhibitor)	0,75µl	Promega
	H2O variabel	variabel	
	AMV-Reverse Transkriptase 1U/µl	0.75µl	Promega
PCR	10xRed Taq Puffer	2,5µl	Sigma
	Nukleotide 10mM	0,5µl	Promega
	Vorwärtsprimer 0,5µg/µl	0,25µl	Tib MolBiol
	Rückwärtsprimer 0,5µg/µl	0,25µl	Tib MolBiol
	H2O	15,5µl	

	Red Taq Polymerase	0,75µl	Sigma
ChIP-PCR	10x PAN Taq Puffer	5µl	Qiagen
	Nukleotide, 100mM	1µl	Promega
	Vorwärtsprimer, 10mM	3µl	Tib MolBiol
	Rückwärtsprimer, 10mM	3µl	Tib MolBiol
	50x Mg2Cl	4µ	Sigma
	H2O	31,5µl	
	PAN Taq Polymerase, 1U/µ	0,5µl	Qiagen

2.1.12 PCR Cyclers-Programme

	Vorgang	T in °C	Dauer	Zyklen
RT-PCR	Denaturierung	70	5min	1
	Transkription	42	1h	1
	Denaturierung	95	5min	1
PCR	Denaturierung	95	3min	1
	Denaturierung	95	1min	
	Annealing	variabel	1min	x (variabel)
	Elongation	72	1min	
	Elongation	72	5min	1
ChIP-PCR	Denaturierung	95	7min	1
	Denaturierung	94	20s	
	Annealing	variabel	20s	x (variabel)
	Elongation	72	20s	
	Elongation	72	7min	1

2.1.13 Verbrauchszubehör

Material	Hersteller
Hybond-ECL-Membran	Amersham Biosciences
Whatman Filterpapier	Whatman
Zellkulturflaschen (T25,T75)	Falcon
Zellkulturschalen (10cm)	Falcon
Pasteurpipetten (230mm)	Brand
Platten (24,-6-Well)	Falcon
Plastikröhrchen (15ml, 50ml)	Falcon
Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Falcon
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf
Zellschaber	Costar
Kunststoffküvetten	Hellma
Quarzküvetten	Serva

2.1.14 spezielle Geräte

Axioskop(Objectiv: mot PlanNeoFluar X 100 NA 1.4)	Zeiss
AxioCam MRm Kamera	Zeiss
ELISA – Reader MR 5000	Dynatech
Digitalkamera Olympus Camedia	Olympus
Inverses Forschungsmikroskop BX60	Olympus Optical CO.GmbH
Kühlzentrifuge J2 HS	Beckmann
Laborwaage	Sartorius
Lumat LB 9501	Berthold
Mastercycler Gradient	Eppendorf
Mastercycler Personal	Eppendorf
Membran Vakuumpumpe	Vacuubrand
Mini-Q-Anlage	Millipore Corporation
MS 2 Minishaker (Vortexer)	IKA
Nukleofector1 Amaxa	Biotechnologies
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences
Odyssey Infrared Imager, Odyssey v 1.2	LI-COR Biosciences
pH Meter 526	WTW

Rotanta/ RP (Zentrifuge)	Hettich
Spektrophotometer 922	Uvicon
Sterilbank Laminair HB 2448	Heraeus
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Ultraschallgerät Sonopuls HD 200	Bandelin
Ultraschallgerät-Aufsatz MS 72	Bandelin
UVC 500 UV Crosslinker Lichtgerät	Eppendorf
Zellkultur Inkubator	Heraeus

2.1.15 Analysesoftware

ImageProPlus 5.0 Software Media Cybernetics
Bio-Imaging-Control-Software, argus X1, Version 2 Biostep GmbH
Infrared Odyssey Imaging System Application Software Version 1.2
GraphPad Prism, Version 4.02

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien und Zellkultur

Die Alveolarzellkarzinom-Zelllinie A549

Zellen der Alveolarzellkarzinomzelllinie A549 weisen Eigenschaften alveolärer Epithelzellen (Pneumozyten) Typ II auf (Lieber et al., 1976) und stellen somit ein gutes in vitro Zellkulturmodell für pulmonales Epithel dar. Die Zellen wurden ursprünglich aus einem Patienten mit einem Lungenadenokarzinom isoliert und wurden von der American Type Culture Collection™ ATCC, Rockville, USA bezogen.

Für die Versuche wurden Zellen in den Passagen 10 bis 35 verwendet. Die Kultivierung der A549-Zellen erfolgte in T75-Flaschen in HAM's-Medium mit Zusatz von L-Glutamin und 10% FCS bei 37°C und einer 5% CO₂-Sättigung. Das Wachstumsmedium wurde jeden dritten Tag gewechselt bis die Zellen eine Konfluenz von 70- 90% erreicht haben. Konfluente Zellen wurden je nach Versuchsaufbau in 6 Well-Platten, 24 Well-Platten oder Petrischalen ausgesät. Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS +/- gewaschen und unter Zugabe von 2ml 0.5% Trypsin EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Anschließend wurden die gelösten Zellen in 10ml Medium resuspendiert und auf entsprechende Kulturgefäße verteilt. 24h vor einer Stimulation wurden die Zellen auf ein HAM's Medium ohne FCS Zusatz umgefüttert.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mikroskopisch, unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer.

Die NF-κB-abhängige Reporterzelllinie A549 6Btkluc wurde uns von freundlicherweise von R. Newton (University of Warwick, Coventry, UK) zur Verfügung gestellt. Diese Zellen verfügen über ein stabil integriertes Plasmid mit 3 Tandem- Wiederholungen der Sequenz 5'-AGCTTACAAGGGATTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGA-3', diese beinhalten zwei Kopien der dekamerischen NF-κB Bindungsseite, welche mit einem Luziferase Gen gekoppelt sind (Bergmann et al., 1998).

Humane Bronchialzelllinie BEAS-2B

Die BEAS-2B Zelllinie besteht aus humanen Bronchialepithelzellen, welche durch SV40 Transformation immortalisiert wurde (Reddel et al., 1988).

Die Kultivierung der BEAS-2B Zellen erfolgte mit dem Keratinozyten SFM-Medium mit Zusatz von 2mM L- Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin in T75-Flaschen. Bei 37°C und einer 5% CO₂-Sättigung wurden sie im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von 70- 90% gezüchtet. Die Zellen wurden in den Passagen 10 bis 35 verwendet. Für die entsprechenden Versuche wurden die konfluenten Zellen auf 6-Well-Platten, 24-Well-Platten

oder Petrischalen verteilt. Um eine bessere Adhäsion der Zellen zu gewährleisten wurden die Kulturgefäße mindestens 30 Minuten mit Coating Lösung vorbehandelt.

Die konfluenten Zellen wurden nun einmal mit PBS-/- gewaschen, zunächst mit 2ml 0.5% Trypsin EDTA und schließlich mit 10ml Medium gänzlich vom T75 Flaschenboden abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 12000 U/min 5min zentrifugiert und das erhaltene Pellet mit 200µl des Trypsininhibitors ETI resuspendiert.

Nach Zusatz der erforderlichen Menge an Zellkulturmedium wurden die Zellen auf die vorbehandelten Kulturgefäße verteilt. Am Tag vor einer Stimulation wurden die Zellen auf ein Keratinozyten-SFM- Medium ohne Zusätze umgefüttert.

Humane primäre Bronchialepithelzellen (PBECs)

Die humanen primären Bronchialepithelzellen wurden durch endobronchiales Bürsten während einer Bronchoskopie bei gesunden freiwilligen Testpersonen gewonnen. Die Durchführung dieser Methode erfolgte nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Charité Berlin.

Die Zellkulturen primärer Bronchialepithelzellen (PBECs) können direkt Aufschluss über das Aktivierungsverhalten primärer Bronchialepithelzellen *in vitro* geben. Zur Kultivierung wurden die gewonnenen PBEC-Zellen in ein spezielles basales Zellmedium gegeben, welches zuvor mit entsprechenden Zusätzen angereichert wurde (siehe Material). Anschließend wurden sie in Kulturgefäße gegeben, welche zuvor mit humanem Kollagen behandelt worden waren. Die Experimente erfolgten alle mit Zellen der Passage 2.

2.2.2 Bakterienkultur

Bakterienkultivierung und Bakterieninfektion

Die Bakterien wurden als Glycerinstocks bei -80°C bzw. in Gefriermedium bei -20°C gelagert und bei Bedarf mit einer Impföse auf Agarplatten ausgestrichen und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ Sättigung über Nacht (maximal 16h) inkubiert.

Für die Bakterieninfektion wurden die Bakterien von der Agarplatte in das entsprechende Medium der verwendeten Zellen gegeben und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen. Daraufhin erfolgte die Verdünnung auf eine Konzentration von 1x10⁶ CFU/ml, was einer optischen Dichte von 0,3 entspricht.

Vor einer Infektion der vorbereiteten Zellen wurde eine MOI („multiplicity of infection“) von 0,1, 1 oder 10 Bakterien pro Zelle errechnet. Die Bakteriensuspension wurde nun auf die für die Versuche benötigten Infektionsdosen verdünnt. Die Infektionsdauer variierte je nach Versuchsaufbau, die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ Sättigung.

Inaktivierung von *Moraxella catarrhalis*

Hitzeinaktivierung

Zur Hitzeinaktivierung wurde *Moraxella catarrhalis* Stamm O35E in entsprechender Konzentration in dem jeweiligen Zellkulturmedium resuspendiert und bei 95°C im Wärmeblock 30 Minuten inkubiert.

UV-Inaktivierung

M.catarrhalis wurden in entsprechender Konzentration als Suspension im jeweiligen Zellkulturmedium 1 Stunde unter Einwirkung von UV-Licht inaktiviert.

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Inaktivierung durch Hitze oder UV-Licht wurden die Bakterien nach jeweiliger Behandlung auf Columbia Agar Platten ausgestrichen und 2 Tage bei 37°C inkubiert. Die inaktivierten Bakteriensuspensionen wurden nur verwandt, wenn kein Wachstum nachweisbar war.

2.2.3. Transfektion

In A549 Zellen wurden unter Verwendung des Amaxa Cell Line Nucleofactor KitV Amaxa Bioscience *Short interfering RNAs* (siRNA) transient eingeführt.

siRNAs sind in Zellen natürlich vorkommende Moleküle, die ein post- transkriptionelles sequenzspezifisches Ausschalten gewünschter Proteine durch RNA-Interferenz ermöglichen (Williams, 2005). Die Einführung gewünschter siRNA in die Zielzelle erfolgt durch kurzzeitige Permeabilisierung der Zellmembran anhand eines elektrischen Impulses. Auf diese Weise aufgenommene siRNA kann nun innerhalb der Zelle an die mRNA Sequenz des Zielproteins binden und deren Abbau bewirken.

Für die Versuche wurden A549 Zellen bei 60- 70% Konfluenz mit je 2µg siRNA gegen PKCα, ε und theta oder Kontroll-siRNA nukleofektiert. Die Bestimmung des Zeitpunktes, an dem der Grossteil des Zielproteins ausgeschaltet worden ist, erfolgte unter Anwendung eines Western Blots. Mithilfe eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde die Auswirkung der Nukleofektion untersucht.

2.2.4 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die RT- PCR dient der quantitativen Bestimmung geringer Mengen RNA. Die mRNA aus den verwendeten Zellen kann mit diesem Verfahren in cDNA transkribiert werden, um anschließend als Amplifikationsvorlage in der Standard PCR eingesetzt werden zu können.

RNA Isolierung

Zur RNA Gewinnung wurde 1% Mercaptoethanol-haltiger RLT-Puffer aus dem RNeasy-Mini-Kit (Qiagen), auf die verwendeten Zellen gegeben und diese mit einem Gummischaber von der Oberfläche abgelöst. Die RNA Isolierung aus dem Zelllysate wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers unter Verwendung des RNeasy-Mini-Kit (Qiagen) durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde bei 260nm und 280nm bestimmt. Dabei wurden die Proben 1:100 in DNase freien Wasser (RNeasy-Mini-Kit Qiagen) verdünnt und in Quarz- Präzisionsküvetten (Hellma) mit einer Schichtdicke von 10mm im Photometer gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht 40µg/ml, anhand des Quotienten aus 260nm/280nm läßt sich die Reinheit der isolierten RNA ermitteln. So wurde zur reversen Transkription der mRNA in cDNA nur RNA verwendet, deren Quotient zwischen 1,5 und 2 lag.

RT- Reaktion

Für die RT-PCR wurden 1µg RNA pro Probe eingesetzt, mit Aqua dest auf 11,5 µl verdünnt und 5min bei 70°C denaturiert. Anschließend wurden zu jeder Probe 8,5µl des Reaktionsgemisches (siehe Materialteil) gegeben und für 1h bei 42°C, dem Arbeitsoptimum der AMV-reversen Transkriptase inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden die Proben schließlich für 5min auf 95°C erhitzt. Die nun fertigen Proben wurden mit 80µl destilliertem Wasser versetzt und bei -20°C gelagert oder direkt im Anschluß in einer Standard PCR weiterverwendet.

Polymerase- Kettenreaktion

Zum Nachweis von IL-8 oder GM-CSF wurden die Proben unter Anwendung einer Standard-PCR untersucht. Hierzu wurden jedem Ansatz 3µl der cDNA entnommen und mit 27µl Reaktionsgemisch versetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches sowie das entsprechende PCR-Programm sind im Materialteil beschrieben. Im Anschluß an die finale Elongation wurden die PCR Produkte auf 4°C herabgekühlt. Die optimalen Annealingtemperaturen der verwendeten Primer waren mittels Gradienten-PCR bestimmt worden. Zur Bestätigung einer gleichmäßigen cDNA Konzentration wurde parallel eine PCR mit Primern für Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt und mittels Gelelektrophorese visualisiert. GAPDH wird in den Zellen ständig expremiert („house keeping gene“) und dient als geeignete Ladungskontrolle.

Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Nukleinsäuren oder Proteinen. Die Trennung erfolgt entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld, welches an eine Gelmatrix angelegt wird.

Zur Vorbereitung wurde 1,5% Agarosegel in einen Gelträger gegossen und in spezielle Elektrophoresekammern, welche 1x TAE als Laufpuffer enthielten, gegeben. Um die DNA Banden darstellen zu können, wurde das Gel mit Ethidiumbromid (nach Verdünnung 1:25000) versetzt, welches in die DNA-Doppelstränge interkalierend eingreift.

Je 12µl der zu untersuchenden PCR Produkte wurden nun in die Gelkammern pipettiert und nach Einstellung des elektrischen Feldes auf 100V in einer Laufzeit von ca. 30min aufgetrennt. Die entstandenen Banden wurden mittels UV Licht visualisiert und anschließend mithilfe einer Olympus Digital Kamera gespeichert. Zur weiteren Dokumentation wurde das Fotodokumentationsprogramm Argus X1.V3 verwendet.

2.2.5 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin Immunopräzipitation ermöglicht eine Erforschung der Auswirkungen einer Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege direkt auf die Aktivierung der Promotoren. Diese Methode detektiert die modifizierten Histone, Transkriptionsfaktoren und nicht-chromosomalen Proteine und repräsentiert somit alle Ereignisse, die in den Prozessierungsprozess der DNA involviert sind (Spencer et al., 2003).

Für die ChIP Versuche wurden A549 Zellen bis zur 90% Konfluenz in T75-Flaschen gezüchtet und am Vorabend der Infektion auf Medium ohne FCS-Zusatz umgefüttert. Am Versuchstag wurden die Zellen für eine Stunde mit dem gewünschten Inhibitor vorbehandelt und daraufhin mit *M. catarrhalis* O35E und der Mutante O35E.1 in einer Konzentration von 1Mio cfu/ml für einen Zeitraum von 30min bis 2h infiziert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 1min mit 1% Formaldehyd in PBS inkubiert. Dadurch wurden die Proteine, die zu diesem Zeitpunkt an spezifische DNA- Sequenzen gebunden waren, fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer eiskalten 0,125M Glycin-PBS Lösung gewaschen, in PBS vom Boden abgelöst und zweimal je 5min bei 4°C und 252x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 2 ml ChIP-Ripa Puffer lysiert und das gewonnene Lysat 4 mal für 1min bei 50% Schallintensität mit einer Sonifikatorsonde auf Eis geschallt, wodurch das Chromatin fragmentiert wurde. Die verbleibenden Zelltrümmer wurden nun für 20min bei 4°C und 21530x g zentrifugiert und als Pellet verworfen. Der Überstand wurde zu je 250µl aliquotiert und bei – 80°C gelagert.

Für die Immunpräzipitation des Zielproteins wurde das Lysats mit den jeweiligen Antikörpern, gemäß den Instruktionen des Herstellers verdünnt.

Die eingesetzten Antikörper Pol II (N-20), NFκB p65 (C-20) wurden im Drehinkubator bei 4°C inkubiert, wobei die Inkubationszeit zwischen 1 und 12 Stunden variierte.

Die Extraktion des Antikörper-Proteinkomplexes erfolgte mittels Protein A und G Agarose für 1h im Drehinkubator bei 4°C. Anschließend wurden die Immunkomplexe zunächst zweimal mit ChIP-Ripa Puffer, dann einmal mit High-Salt Puffer und schließlich erneut mit ChIP-Ripa Puffer

gewaschen. Zum Abschluß wurden die Antikörper-Agarose und Transkriptionsfaktor-DNA Komplexe mit TE-Puffer gewaschen und in den Heizschüttler gegeben, um sie bei 30°C und 1200rpm 15min in Anwesenheit von EB-Puffer von der Agarose zu extrahieren.

Um nun die DNA, die mit den immunpräzipitierten Proteinen assoziiert ist, erfolgreich zu isolieren, wurden die Immunkomplexe erst für 30min bei 37° C mit RNase (1mg/µl) im Brutschrank und anschließend unter Verwendung von Proteinase K (1µg/ 8µl) für mindestens 6h bei 37°C und für 6h bei 65° C im Thermocycler verdaut. Die nun isolierte DNA wurde mittels PCR QIAquickPCR purification Kit (Qiagen) extrahiert, in einer Promoter-Primer-PCR amplifiziert und anschließend in der Gelelektrophorese analysiert. PCR-Programm und Zusammensetzung des Reaktionsgemisches sind dem Materialteil zu entnehmen.

2.2.6 Western Blot

Zytosol-Membran Fraktionierung

Die Proteinextraktion erfolgte fraktioniert, d.h. zytosolische und membranständige Proteine wurden unabhängig voneinander extrahiert. Für dieses Verfahren wurde das Mem- PER Eukaryotic Membrane Kit nach dem Protokoll des Herstellers verwendet, zur Kontrolle diente eine im Labor etablierte Methode der Zytosol-Membran Fraktionierung.

Proteinextraktion Mem-Per Eukaryotic Membrane Kit

Nach Infektion der Zellen mit *M.catarrhalis* und entsprechender Inkubationszeit wurde das Medium in den verwendeten Kulturgefäßen auf Eis abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 10ml kaltem PBS -/- gewaschen. Nach 5 minütiger Inkubation mit 2ml Akkutase (bei 37°C) vom Flaschenboden gelöst, in 10 ml PBS -/- resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Dann wurde eine Suspension von 5×10^6 Zellen in 10ml PBS -/- hergestellt und diese bei 830g 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 150µl Reagenz A des Mem-PER Eukaryotic Membrane Kits resuspendiert und die Zellen somit lysiert. Das Lysat wurde bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen 10min inkubiert. Auf Eis gelagert wurden nun jeder Probe jeweils 300µl Reagenz B und 150µl Reagenz C zugegeben. Bei 30 minütiger Inkubationszeit auf Eis wurden sie nun alle 5min erneut gemischt und anschließend bei 10000rpm 3min bei 4°C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde nun bei 37°C für 20 min inkubiert.

Nach erneuter Zentrifugation (10000rpm, 2 min, Raumtemperatur) hatte sich eine zytosolische Fraktion (obere Phase) von einer Membranfraktion (untere Phase) sichtbar abgesetzt. Beide Fraktionen wurden rasch aufgeteilt und konnten nun bei -20°C gelagert werden

Proteinextraktion mittels Lysepuffer

Nach erfolgter Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS -/- gewaschen. Anschließend erfolgte eine Zellyse mit 500µl Lysepuffer A, nach einer 5 minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Zellen mit einem Gummischaber von dem Gefäßboden abgeschabt. Die Lysate wurden nun 10 malig durch eine 22G-Kanüle gepresst, was zu einer mechanische Zerstörung der Zellmembranen führte. Nach 30 minütiger Zentrifugation (4°C, 10000rpm) konnte die zytosolische Fraktion aus dem Überstand entnommen und bei -20°C gelagert werden.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte durch Einsatz des BioRad Protein Assays (Bio Rad Laboratories). Diese Methode dient der Quantifizierung der Proteine um gleiche Mengen jeder Probe auftragen zu können. Der in der Bradford Reagenz enthaltene Farbstoff Coomassie Blau verändert nach Bindung an basische oder aromatische Aminosäuren sein Absorptionsmaximum, anhand einer durch BSA (bovines Serumalbumin) erstellten Standardkurve lässt sich so die jeweilige Proteinkonzentration ermitteln.

Die Bestimmung wurde gemäß den Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Nach einer 1:5 Verdünnung das Bradford-Reagenz mit Aqua dest. wurden die Proteinproben im Verhältnis 1:200 hinzugegeben und die optische Dichte bei 595 nm spektralphotometrisch gemessen.

SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese)

Die Proteinproben mit β-Mercaptoethanol-haltigem Ladepuffer 1:1 versetzt und zur Proteindenaturierung 5min bei 95°C geschüttelt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach Auftragung von 50-100µg Proteinprobe in einem 10%igen Trenngel und 6%igen Sammelgel bei 100V und einer Laufzeit von 2 Stunden.

Western Blot

Nach Abschluß der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Proteintransfer erfolgte in eiskaltem Blotpuffer 60min bei 100V. Anschliessend wurde die Membran für 2h unter Schütteln bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Primärantikörper (Verdünnung mit Blockpuffer 1:1000) inkubiert. Durch dreimaliges Waschen je 5min mit Waschpuffer (PBS -/- + 0,1% Tween20) und einmaligem 5 minütigem Waschen mit PBS -/- wurden die ungebundenen Antikörper herausgewaschen, und es erfolgte eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Diese wurde 1h bei Raumtemperatur im abgedunkelten Gefäß durchgeführt.

Der Sekundärantikörper (Verdünnung mit Blockpuffer 1:2000) richtet sich gegen die Spenderspezies des ersten Antikörper und ist mit einem Infrarot-Farbstoff markiert.

Nach abschließendem Waschen (3x 5min mit PBS -/- + 0,1% Tween20, 1x 5min PBS-/-) erfolgte die Detektion des markierten Proteins mit dem Scanner Odyssey Infrared Imager (Li-Cor). Die weitere Bearbeitung wurde mit Hilfe der zugehörigen Software durchgeführt.

2.2.8 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay ist ein Verfahren, dass zur Quantifizierung der Interleukin-8 (IL-8) Konzentration genutzt werden kann.

Grundlage hierfür ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion unter Einsatz monoklonaler Antikörper. Ein zusätzlich eingesetzter enzymgekoppelter sekundärer Antikörper katalysiert eine Farbreaktion, wodurch nach photometrischer Messung der optischen Dichte die Zytokinzentration ermittelt werden kann. Die ELISA erfolgten unter Verwendung des IL-8 ELISA-Detection Kit (BD Biosciences).

Für die Versuche wurden konfluente A549 Zellen über Nacht mit verschiedenen Inhibitoren und *M.catarrhalis* inkubiert. Bei einigen verwendeten PKC Inhibitoren handelte es sich um myristoylierte Inhibitoren. Myristoylierung spielt eine wichtige Rolle bei der Membraninteraktion und erhöht die inhibitorische Potenz der Pseudosubstratinhibitoren.

Nach Inkubation wurden die Überstände entnommen, zur Entfernung von Zellresten bei 4°C 24980x g 10min zentrifugiert und die Proben für den IL-8 ELISA mit Blockpuffer 1:200 verdünnt. Zur Vorbereitung wurde eine 96-Well Mikrotiterplatte 12 Stunden mit einem gegen das zu untersuchende Zytokin gerichteten monoklonalen Primärantikörper (Capture Antikörper) in 0,1M Carbonatpuffer bei 4°C inkubiert (Verdünnung 1:250).

Vor Einsatz der Proben wurde die Mikrotiterplatte 3x mit Waschpuffer gewaschen und 1h bei Raumtemperatur mit jeweils 200µl Blockadepuffer pro Well inkubiert. Anschließend wurden je 100µl der Proben auf die Platte aufgetragen, doppelwertig daneben die in Blockadepuffer verdünnten Standards in abfallender Konzentration (je 100µl).

Die Standards für IL-8 wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 200 pg/ml, 100 pg/ml, 50 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,3 pg/ml, 3,1 pg/ml. Nach einer Inkubationszeit von 2h wurde die Platte 5 x mit Waschpuffer gewaschen. Nun erfolgte der Einsatz der gegen das entsprechende Zytokin gerichtete enzymgekoppelten Detektionsantikörper (Verdünnung 1:250 mit 0,1M Carbonatpuffer), welche für 1h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend erfolgte nach 7x waschen mit Waschpuffer die 20 minütige Inkubation mit Enzymsubstrat in abgedunkeltem Umfeld. Die Farbreaktion wurde mit 50µl 2N H₂SO₄ abgestoppt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450nm photometrisch bestimmt. Anhand einer Standardkurve mit rekombinantem IL-8 konnte nun die Konzentration ermittelt werden.

2.2.9 PKC-Aktivitätsassay

Der Proteinkinase C Aktivitätsassay basiert auf der Methode des ELISA. Hierbei werden spezifische synthetische Peptide als PKC Substrate eingesetzt und deren phosphorylierte Form durch polyklonale Antikörper erkannt. Auf diese Weise kann eine PKC Aktivität in Zelllösungen nachgewiesen werden.

Der PKC-Aktivitätsassay wurde mit dem StressXpress non-radioactive PKC-Kinase Activity Assay Kit (Stressgen Bioreagents Corp.) durchgeführt. Sämtliche verwendeten Reagenzien stammen aus dem verwendeten Kit, zur Verdünnung des Waschpuffers wurde Aqua dest. eingesetzt.

Zur Vorbereitung wurden die Mikrotiterplatten mit 50µl Verdünnungspuffer bei Raumtemperatur vorbehandelt und nach 10 minütiger Inkubationszeit sorgfältig abgesaugt. Nachdem jeweils 30µl der Proben und der Kontrollen (PKC Aktivitäts-Kontrolle + Verdünnungspuffer) aufgetragen wurden, erfolgte die Zugabe von 10µl ATP (mit 1mg/ml Verdünnungspuffer) in jedes Well. Im Anschluß an eine 90 minütige Inkubationsdauer von 90min bei 30°C wurde die Platte geleert und auf einem sauberen Tuch durch Klopfen vollständig getrocknet. Nach Zugabe von 40µl phosphospezifischem Substratantikörper (Konzentration 1mg/ml) erfolgte eine erneute Inkubation für 60min bei Raumtemperatur. Nun wurde die Platte 4x mit 1x-Waschpuffer gewaschen und ebenfalls auf einem Tuch trocken geklopft. Nach Inkubation von 40µl eines peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers (1mg/ml) für 30 min bei Raumtemperatur, folgten erneut 4 Waschschrte mit 1x Waschpuffer. Abschließend erfolgte die Zugabe von 60µl Tetramethylbenzidine (TMB)- Substrat welches bei Raumtemperatur inkubierte. Die Reaktion wurde nach 30min mit 20µl Säure abgestoppt und die Messung der optischen Dichte bei 450nm durchgeführt.

2.2.10 Luziferaseassay

Zur Bestimmung der NF-κB Aktivität wurden NF-κB transfizierte A549 Zellen (A549 6Btkluc) verwendet. Diese sind an ein Luziferasegen gekoppelt, so dass sich eine Aktivierung von NF-κB anhand der Luziferaseaktivität darstellen lässt. Nach Inkubation mit dem PKC Inhibitor und Stimulation mit *M. catarrhalis* wurden die Zellen mit PBS -/- gewaschen.

Anschließend wurden sie entsprechend den Herstellerangaben des „Luciferase Reporter Gene Assays“ aufbereitet. Für die Messung der Luziferaseaktivität wurde die Lumineszenz mittels Luminometer jeweils 5s je Probe bestimmt.

2.2.11 Konfokale Mikroskopie

Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wird mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops das Objekt Punkt für Punkt und in einer dünnen Fokusebene, die man schrittweise verschieben kann, aufgenommen. Damit ist eine exakte räumliche Verteilung und semiquantitative Analyse von Fluoreszenzfarbstoffen bzw. Fluorochrom-markierten Antigenen in biologischen Objekten möglich.

Die A549- und BEAS-2B-Zellen wurden auf Glasplättchen in 24-Well-Platten kultiviert, bis sie zu ca. 70% konfluent waren. Die Fixierung und Vernetzung der Epithelzellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS/- in 3%igem Paraformaldehyd (PFA) für 20 min. Dann erfolgte eine erneute dreimalige Waschung mit warmem PBS -/-. Anschließend wurden die Zellen mit 400µl pro Well 1% Triton in 0,1M PBS permeabilisiert. Bei Raumtemperatur folgte nun ein 30 minütiges Blocken mit 400µl Verdünnungsmedium + 5% Ziegen Serum (AAP Laboratories, Wien). Nachdem das Verdünnungsmedium mit PBS/- abgenommen wurde, wurde der primäre Antikörper (PKC (A-9): sc-17804) in einer Konzentration von 1:100 in Verdünnungsmedium eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C wurde der primäre Antikörper in drei Waschschrritten mit PBS/- entfernt. Der sekundäre Antikörper (Alex Fluor 488) wurde in einer Verdünnung 1:8000 eingesetzt. Auch er wurde in Verdünnungsmedium aufgenommen und pro Well 200 µl verwendet. Die Inkubation erfolgte in einer abgedunkelten Kammer ebenfalls für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nachdem der sekundäre Antikörper mit PBS/- entfernt wurde, erfolgte die Anfärbung des Aktin-Zytoskeletts mit Phalloidin A546. Phalloidin, das Gift des Knollenblätterpilzes, bindet spezifisch an F-Aktin des Zytoskeletts. Der an das Phalloidin gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Alexa-546 zeigt nach einer Anregung bei 546nm eine rote Fluoreszenz.

Die Proben wurden vor starker Lichteinstrahlung geschützt, die Inkubationszeit mit dem Farbstoff betrug 30 min bei Raumtemperatur. Zum Schluss wurde das Phalloidin mittels Spülung mit PBS/- entfernt und die einzelnen Glasplättchen mit Permafluor-Aqueous Mounting Medium auf Objektträger aufgebracht und mit Nagellack fixiert. Die Fluoreszenzbilder wurden mittels eines motorisierten Axioskops, welches mit einer AxioCam MRm Kamera ausgestattet ist, aufgenommen. Die Kamera verfügt über eine gekühlte Graustufenskalierung. Die digitale Bildausarbeitung erfolgte über die ImageProPlus 5.0 Software.

2.2.12 Statistik

Die Ergebnisse aller gezeigten Versuche wurden als Mittelwerte dargestellt. Alle verwendeten Abbildungen entstanden aus mindestens drei unabhängigen erfolgreich durchgeführten Versuchen. Die Mittelwerte und deren Standardabweichungen wurden mittels Prism 5.0 (Graph Pad Prism ®) analysiert und anschließend in einem Newman-Keuls`Posttest verglichen.

Die Ergebnisse wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5% ($p < 0,05$) als signifikant bezeichnet und sind mit einem Stern markiert. Zur Evaluation des Effekts nach Stimulation mit *M. catarrhalis* sowie nach Einsatz der siRNA wurde der gepaarte T-Test angewandt. Zur Darstellung der Western Blot, Konfokalmikroskopie und PCR Ergebnisse wurden jeweils repräsentative Abbildungen verwendet, welche aus mindestens drei unabhängigen Versuchen stammen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Die Infektion von Bronchialepithelzellen mit *M. catarrhalis* induziert eine gesteigerte Transkription und Freisetzung von IL-8

Um die Interaktionen von *M. catarrhalis* mit Bronchialepithelzellen zu untersuchen, wurde zunächst eine *in vitro* Bestimmung der IL-8 Produktion bei mit *M. catarrhalis* infizierten Zellen durchgeführt. Hierzu wurde die Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B verwendet, welche vergleichbare Eigenschaften mit den primären isolierten Bronchialepithelzellen (PBECs) aufweist (Yang et al., 2005; Slevogt et al., 2006; Slevogt et al., 2007), die ebenfalls in dieser Versuchsreihe verwendet wurden. Ergänzend wurden diese Versuche mit der Alveolarzelllinie A549 durchgeführt.

Die BEAS-2B Zellen, die primären Bronchialepithelzellen (PBECs) und die A549 Zellen wurden in einer Konzentrationsreihe von 0,1, 1 und 10 Mio cfu/ ml mit *M. catarrhalis* infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 12h wurden die Zellüberstände mittels ELISA untersucht. Zum Ausschluss Bakterien- Stamm- spezifischer Unterschiede wurden bei den BEAS-2B Zellen jeweils zwei verschiedene *M. catarrhalis*- Stämme, der O35E und der ATCC 25238 Stamm verwendet. In weiteren Versuchen wurden die primären Bronchialepithelzellen (PBECs) jeweils 60, 120 und 240min mit dem *M. catarrhalis* Stamm O35E (10^7 cfu/ml) inkubiert. Zur Detektion von IL-8 mRNA wurde anschließend eine RT-PCR durchgeführt. Als Kontrolle für den Einsatz gleicher Mengen an cDNA wurden parallel PCR-Amplifikationen mit Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Die GAPDH ist ein Glykolyseenzym, dessen Expression von den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht beeinflusst wird und somit als quantitative endogene Kontrolle der PCR-Produkte dient.

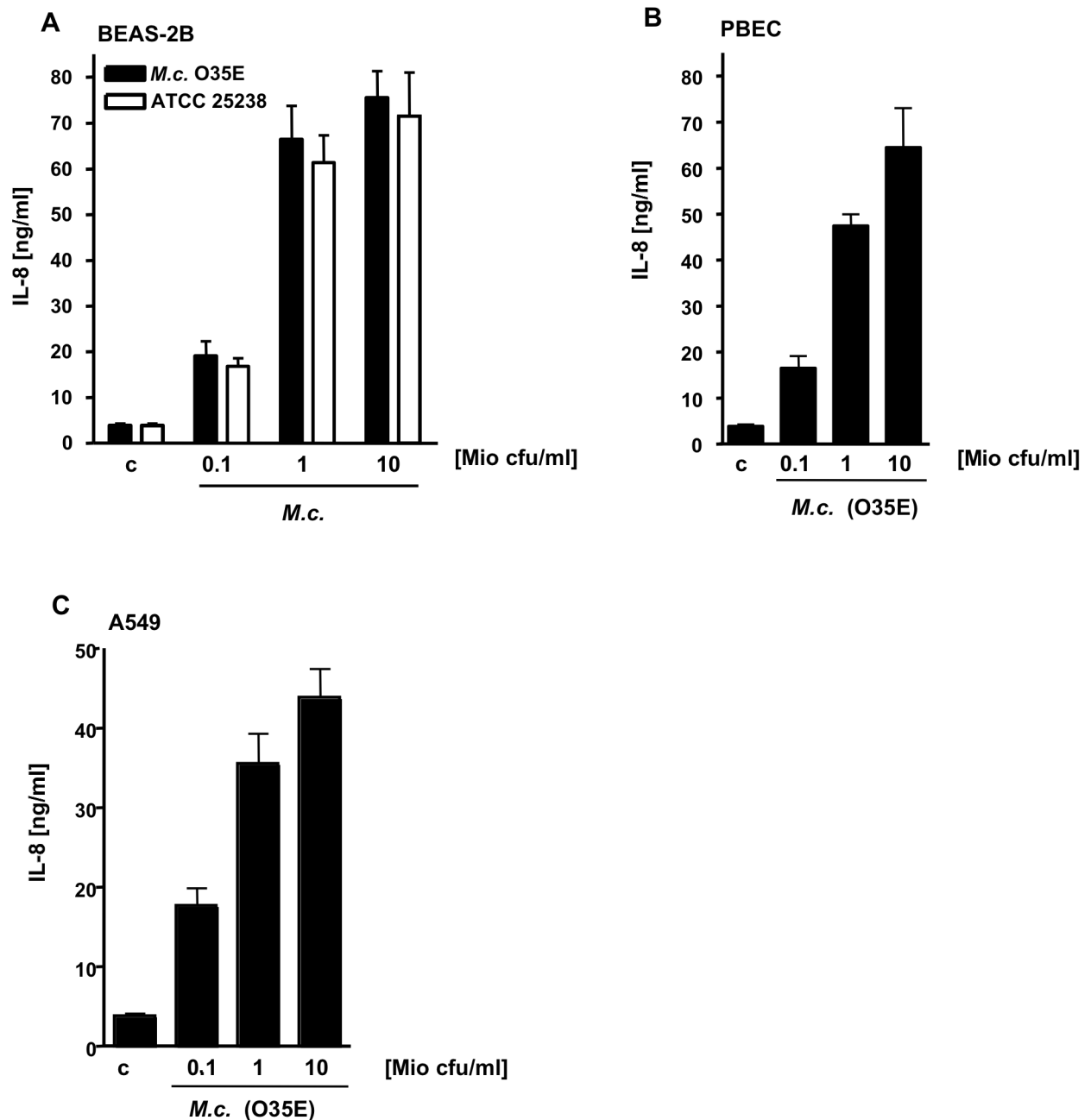


Abbildung 3.1A, B, C: IL-8 Produktion in pulmonalen Epithelzellen nach Infektion mit *M. catarrhalis*

BEAS-2B Zellen (**Abb. 3.1A**), primäre Bronchialepithelzellen PBEC- Zellen (**Abb. 3.1B**) und A549 Zellen (**Abb. 3.1C**) wurden mit *M. catarrhalis* (*M.c.*) Stamm O35E in unterschiedlichen Konzentrationen (0.1, 1 und 10 Mio CFU/ml) infiziert und für 12h inkubiert. Die IL-8 Freisetzung wurde mittels ELISA in den Zellüberständen bestimmt. Ebenso wurde die IL-8 Sekretion der BEAS-2B Zellen nach Infektion mit dem *M. catarrhalis* Stamm ATCC 25238 untersucht. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen. (*M.c.*= *Moraxella catarrhalis*, c= control)

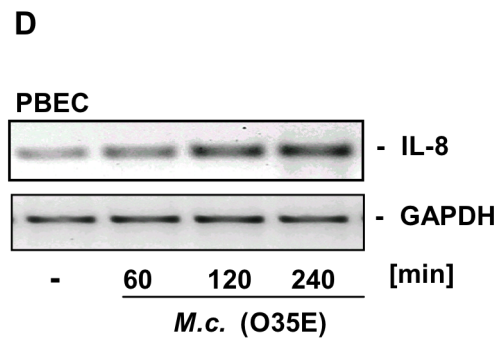


Abbildung 3.1D: Zeitabhängiger Anstieg der IL-8 Sekretion in pulmonalen Epithelzellen nach Infektion mit *M. catarrhalis*.

Primäre Bronchialepithelzellen PBEC- Zellen wurden für 60, 120 und 240 min mit *M. catarrhalis* Stamm O35E [10^7 cfu/ml] infiziert und anschließend mittels PCR untersucht. Als Kontrolle diente die Expression von GAPDH („-“ = keine Infektion mit *M. catarrhalis*). Die Abbildung zeigt das Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen (*M.c.*= *Moraxella catarrhalis*, c= control)

Bei diesen Versuchen konnten ein ein konzentrationsabhängiger (3.1A, B und C) und ein zeitabhängiger (3.1D) Anstieg der IL-8 Transkription nach Infektion mit *M. catarrhalis* Stamm O35E nachgewiesen werden. Eine Infektion der BEAS-2B Zellen mit dem *M. catarrhalis* Stamm ATCC 25238 zeigte im Vergleich zum Wildtypstamm O35E ebenfalls einen vergleichbar starken Anstieg der IL-8 Freisetzung, so dass nicht von Stamm- spezifischen Unterschieden auszugehen ist.

3.2 IL-8 Freisetzung nach Infektion mit inaktivierten *M. catarrhalis*

Um zu überprüfen inwieweit die lebendigen Bakterien im Vergleich zu den Proteinstrukturen der Bakterienoberfläche („outer membrane proteins“) einen Einfluss auf die IL-8 Freisetzung haben, wurden Bakterien des *M. catarrhalis* Stammes O35E vor Infektion der BEAS-2B Zellen mit Hitze (HI) bzw. mit UV-Licht (UV) inaktiviert. Bei der Hitzeinaktivierung kommt es im Vergleich zur UV-Inaktivierung zu einer Denaturierung der Oberflächenproteine. Bei einer Bestrahlung durch UV-Licht bleiben diese hingegen intakt. Auf diese Weise zeigen sich mögliche Effekte einzelner Bakterienkomponenten.

Die IL-8 Freisetzung von BEAS-2B Zellen durch inaktivierte Bakterien wurde im ELISA gemessen, es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu einer Infektion mit lebenden *M. catarrhalis* gleicher Dosis.

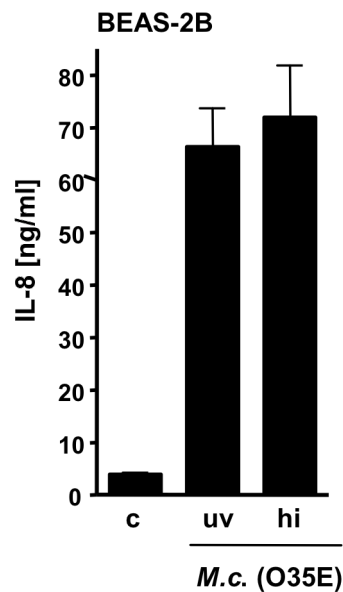


Abbildung 3.2: IL-8 Sekretion nach Infektion von BEAS-2B Zellen mit inaktivierten *M. catarrhalis* O35E

Vor Infektion der BEAS-2B Zellen mit *M. catarrhalis* O35E wurden die Bakterien hitzeinaktiviert (hi) oder UV-inaktiviert (v). Die Untersuchung der IL-8 Sekretion erfolgte durch Einsatz des ELISA.

Die Abbildung zeigt das Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen. (M.c.= *Moraxella catarrhalis*, c= control)

3.3 *M. catarrhalis* induziert die Aktivität der PKC in Bronchialepithelzellen

Wie bereits erwähnt kann der Proteinkinase C eine Schlüsselrolle bei der intrazellulären Signalvermittlung zur Bildung einer Immunantwort zugeschrieben werden.

Um nun genauer zu überprüfen, welchen Einfluss eine *M. catarrhalis*-induzierte Zellaktivierung auf die Aktivierung der PKC aufweist, wurden Zellen mit *M. catarrhalis* stimuliert und anschließend die Zellüberstände in einem PKC-Aktivitätsassay untersucht.

Hierzu wurden BEAS-2B Zellen jeweils für 60, 120 und 240min mit *M. catarrhalis* Stamm O35E (10^7 cfu/ml) infiziert. Desweiteren erfolgte eine 240 minütige Infektion der BEAS-2B Zellen mit dem *M. catarrhalis* Wildtyp- Stamm ATCC 25238. Als Kontrolle diente eine 1 stündige Behandlung der Zellen mit Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA), einem starken Stimulator der klassischen und neuen PKC (Dermitzaki et al., 2004).

Die Untersuchung im PKC Aktivitätsassay zeigte einen 2 bis 4 fachen, zeitabhängigen Anstieg der PKC Aktivität nach einer Infektion mit *M. catarrhalis*. Eine 2 stündige Stimulation der Zellen mit dem *M. catarrhalis* Stamm O35E war in der Höhe der gemessenen PKC-Aktivität vergleichbar mit einer Infektion des Wildtyp- Stammes ATCC 25238.

Zur Bestätigung einer *M. catarrhalis* induzierten Aktivierung der PKC erfolgte zudem eine Untersuchung der Phosphorylierung des PKC-Substrates MARCKS (myristolated, alanine rich

C-kinase substrate) als Folge einer Infektion der BEAS-2B Zellen mit *M. catarrhalis* O35E. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot untersucht (Abb. 3.3B). Die im Western Blot verwendete Nitrozellulosemembran wurde zusätzlich mit einem Antikörper gegen Aktin inkubiert. Da eine Expression von Aktin unabhängig von einer Bakterieninfektion erfolgt, dient es als geeignete Kontrolle zur Überprüfung einer gleichmäßigen Auftragung der Proteine. Im Western Blot zeigte sich ein zeitabhängiger Anstieg von MARCKS nach Stimulation für 60, 120 und 240 Minuten mit *M.catarrhalis* O35E.

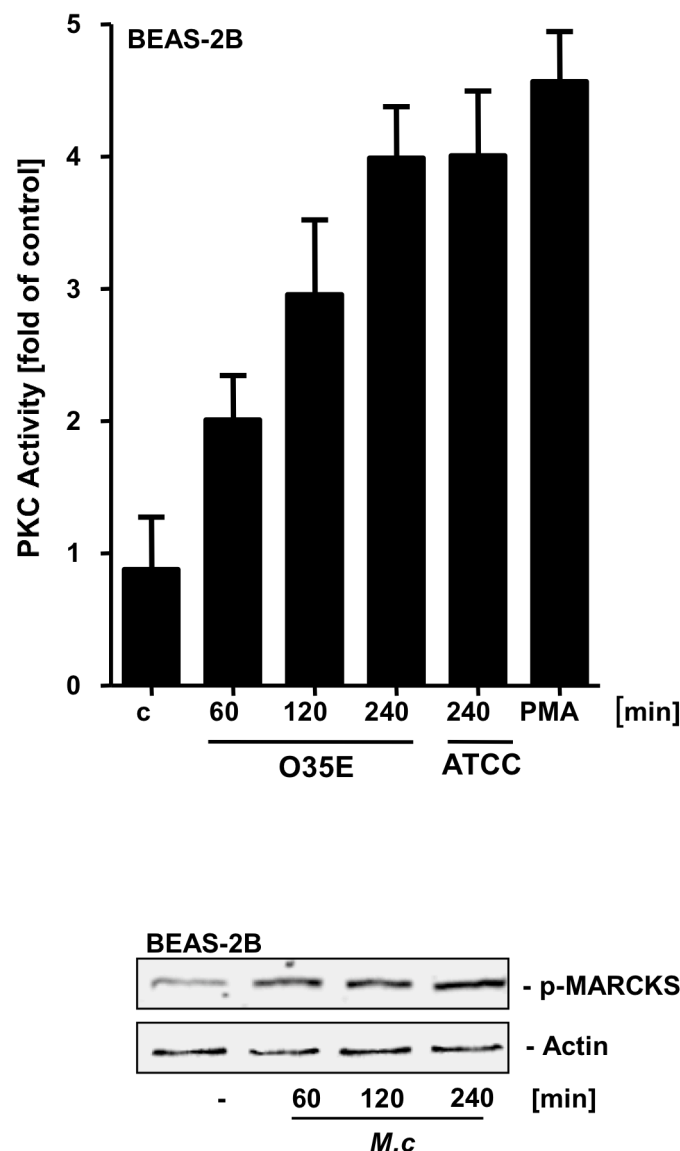


Abbildung 3.3: PKC Aktivität in BEAS-2B Zellen nach Infektion mit *M. catarrhalis*

BEAS2-B Zellen wurden mit *M. catarrhalis* Stamm O35E für 60, 120 oder 240 min oder *M. catarrhalis* 25238 (ATCC) für 240min infiziert .Zur Kontrolle erfolgte eine 1 stündige Stimulation der Zellen mit 50ng/ml PMA. Die Zellüberstände wurden anschließend im PKC-Aktivitätsassay untersucht.

Die untere Abbildung zeigt einen zeitabhängigen Anstieg von phosphoryliertem MARCKS im Western Blot: BEAS-2B Zellen wurden für 60, 120 und 240min mit *M.catarrhalis* [10^7 cfu/ml] stimuliert. Aktin wurde als Kontrolle für die Auftragung gleicher Proteinmengen eingesetzt. („ – “ = keine Infektion mit *M. catarrhalis*). Die Abbildungen zeigen das Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen (M.c.= *Moraxella catarrhalis*, c= control)

Zusammenfassend konnte bei diesen Versuchen gezeigt werden, dass bei der *in vitro* Infektion mit *M. catarrhalis* die Protein Kinasen C Aktivität bronchialer Epithelzellen steigt.

3.4 Nachweis der *M. catarrhalis* induzierten Translokation der PKC an die Zellmembran pulmonaler Epithelzellen

Anhand des Verfahrens der konfokalen Mikroskopie sollen die Beobachtungen der *M. catarrhalis* induzierten PKC Aktivierung dargestellt werden. Hierbei wird die Translokation der PKC an die Zellmembran nach Stimulation mit *M. catarrhalis* sichtbar gemacht.

Für diese Versuche wurden die pulmonalen Epithelzelllinien BEAS-2B (Abb. 3.4A) und A549 (Abb. 3.4B) verwendet. Die Zellen wurden jeweils 4h mit *M. catarrhalis* inkubiert und anschließend die Lokalisation der Gesamt-PKC mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Als Positiv-Kontrolle wurde PMA verwendet

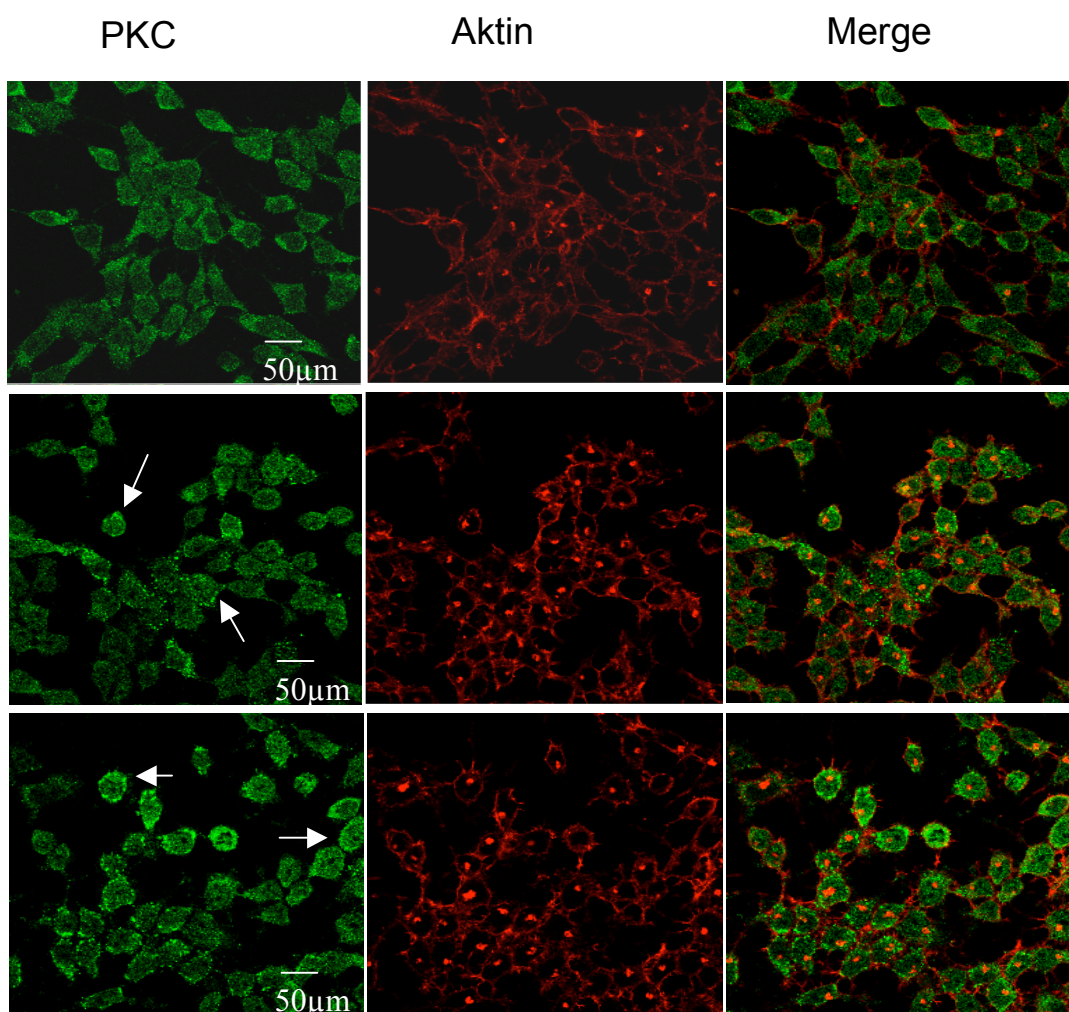


Abbildung 3.4B: Immunolokalisation der PKC in BEAS-2B Zellen

Die Färbung der PKC ist grün dargestellt (Alexa Fluor 488). Das Zytoskelett wurde mit Phalloidin A-546 rot angefärbt zur besseren Visualisierung der Zellmorphologie. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 1h mit PMA (160 nM) inkubiert. Zur Untersuchung der *M. catarrhalis* induzierten Translokation wurden die Zellen über 4h mit *M. catarrhalis* inkubiert. (PMA = phorbol 12-myristate 13-acetate; M.c. = *Moraxella catarrhalis*; Merge = PKC- und Aktinfärbung übereinander projiziert

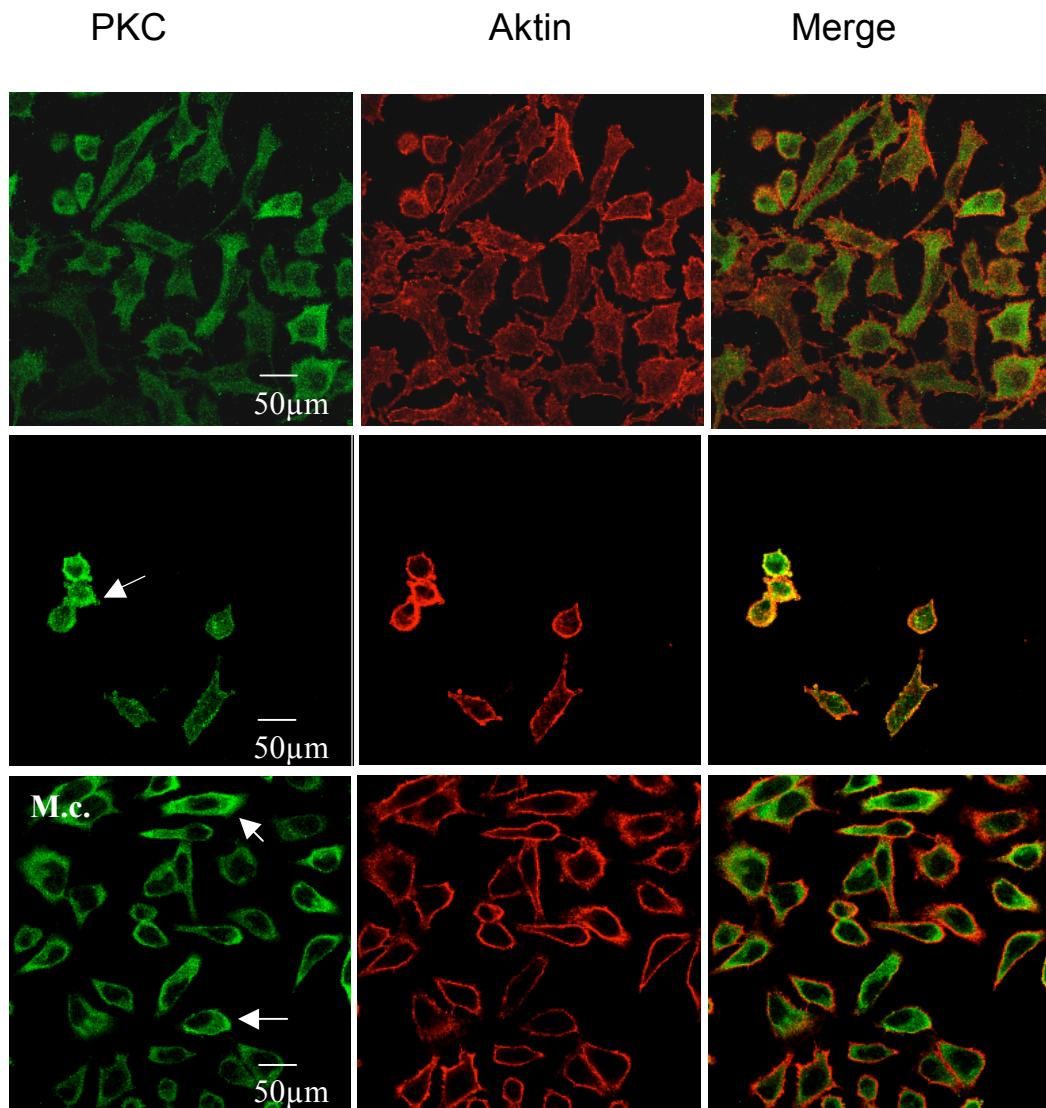


Abbildung 3.4B: Immunolokalisation der PKC in A549 Zellen

Die Färbung der PKC ist grün dargestellt (Alexa Fluor 488). Das Zytoskelett wurde mit Phalloidin A-546 rot angefärbt zur besseren Visualisierung der Zellmorphologie. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 1h mit PMA (160 nM) inkubiert. Zur Untersuchung der *M. catarrhalis* induzierten Translokation wurden die Zellen über 4h mit *M. catarrhalis* inkubiert. (PMA = phorbol 12-myristate 13-acetate; M. c. = *Moraxella catarrhalis*; Merge = PKC- und Aktinfärbung übereinander projiziert).

Beide Zelllinien weisen eine vergleichbar signifikante *M. catarrhalis* induzierte Translokation der PKC vom Zytosol an die Zellmembran als Zeichen einer erfolgten Aktivierung der PKC auf (anhand von Pfeilen markiert).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Stimulation mit *M. catarrhalis* eine Aktivierung der PKC zur Folge hat.

3.5 Die Rolle der UspA1 und UspA2 Expression bei *M. catarrhalis* induzierter IL-8 Sekretion und PKC Aktivierung in Bronchialepithelzellen

Mit dem Ziel genauere Erkenntnisse über die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Freisetzung und die PKC Aktivierung in Bronchialepithelzellen zu erhalten, wurden die Einflüsse der beiden *M. catarrhalis* Oberflächenproteine UspA1 und UspA2 näher untersucht.

Zur Überprüfung der IL-8 Freisetzung wurden BEAS-2B Zellen entweder mit dem *M. catarrhalis* Wildtyp-Stamm O35E, der UspA1-defizienten Mutante O35E.1 oder der UspA2-defizienten Mutante O35E.2 für jeweils 12h infiziert.

Im Anschluß daran erfolgte mittels ELISA eine Messung der IL-8 Sekretion im Zellüberstand. Weiterhin wurde die Bedeutung von UspA1 und UspA2 hinsichtlich der PKC Aktivierung untersucht. Hierzu wurden BEAS-2B-Zellen jeweils mit dem *M. catarrhalis* Wildtyp O35E oder einem der beiden Mutanten O35E.1 und O35E.2 stimuliert und anschließend die PKC Aktivität im PKC Aktivitätsassay gemessen.

Um bei diesen Versuchen mögliche Unterschiede in den Wachstumsraten der verwendeten *M. catarrhalis*-Stämme auszuschließen, wurden die jeweiligen Bakteriensuspensionen des Wildtypstammes und der beiden Mutantenstämme bei einer initialen OD von 0,01 (bei 450nm) in BHI-Lösung bei 37°C geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Messung der OD bei unterschiedlichem Einsatz von CFU (Daten nicht gezeigt).

Wie auch von Aebi et al beschrieben (Aebi et al., 1998) ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Wachstumsraten der einzelnen Stämme.

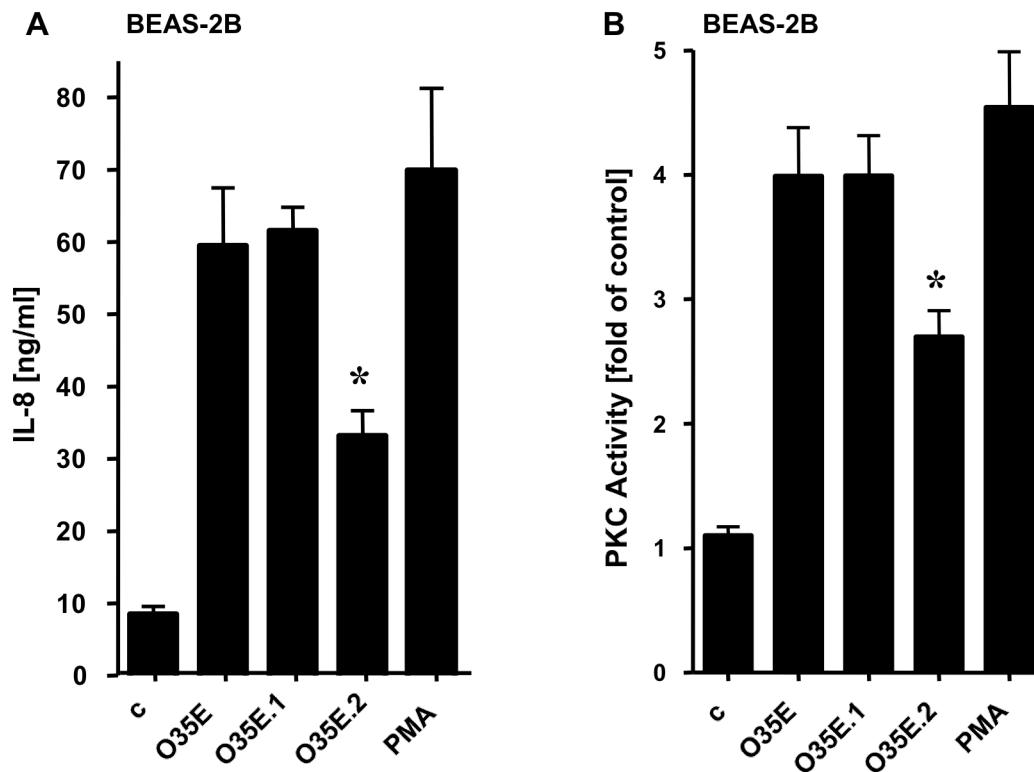


Abbildung 3.5: IL-8 Freisetzung und PKC Aktivität nach Infektion mit UspA1 bzw. UspA2 defizienten Mutanten (O35E.1 und O35E.2) von *M. catarrhalis*

A) BEAS-2B Zellen wurden jeweils 12h mit dem *M. catarrhalis* Stamm O35E und den UspA1 defizienten Mutanten O35E.1 oder den UspA2 defizienten Mutanten O35E.2 stimuliert und die IL-8 Sekretion im ELISA untersucht.

B) BEAS-2B Zellen wurden mit dem *M. catarrhalis* Wildtypstamm O35E und den UspA1-defizienten Mutanten O35E.1 oder O35E.2 für 2h stimuliert und anschließend die PKC Aktivität im PKC Aktivitätsassay gemessen. Zur Kontrolle diente bei beiden Versuchen eine Inkubation mit 160nM PMA. Die Abbildung ist das Resultat von jeweils drei unabhängigen Versuchen. c= nicht infizierte Proben. * = $p < 0.05$.

Wie aus Abbildung 3.5A ersichtlich, ergab die gemessene IL-8 Sekretion keinen Unterschied zwischen einer Induktion durch die Mutante O35E.1 oder dem Wildtyp O35E.

Im Gegensatz dazu zeigte die Messung einer O35E.2 induzierten IL-8 Freisetzung signifikant niedrigere Werte. Dies weist darauf hin, dass eine Interaktion zwischen dem *M. catarrhalis* Protein UspA2 und den Bronchialepithelzellen eine bedeutende Rolle bei der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Sekretion spielt.

Eine Messung der PKC Aktivität (Abbildung 3.5B) ergab, dass auch die Expression von UspA1 keinen Einfluss auf die PKC Aktivierung aufweist. Eine Erhöhung der PKC Aktivität durch eine Infektion mit der UspA2 depletierten Mutante O35E.2 zeigte jedoch im Gegensatz dazu und korrespondierend zu den Ergebnissen des IL-8 ELISAs in Abb. 3.5.A eine Beteiligung des *M. catarrhalis*- Proteins UspA2 an der PKC Aktivierung.

In diesen Versuchen konnte gezeigt werden dass die Expression des *M. catarrhalis*-spezifischen Oberflächenproteins UspA2, nicht jedoch UspA1 eine wichtige Rolle bei der *M. catarrhalis* induzierten PKC-Aktivierung und IL-8 Freisetzung in pulmonalen Epithelzellen spielt.

3.6 Die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Sekretion wird durch die PKC Isoforme α , ϵ und θ unterschiedlich reguliert

Wie bereits beschrieben, lässt sich die Familie der PKC in verschiedene Isozyme untergliedern, denen jeweils unterschiedliche Eigenschaften zugeschrieben werden konnten (Dempsey et al., 2000). Zur Untersuchung der Beteiligung der PKC an der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Freisetzung wurde nun in weiteren Versuchen ein besonderer Fokus auf die Rolle der einzelnen PKC- Isoforme gelegt.

Zunächst wurde untersucht, welche Bedeutung die PKC für die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Sekretion hat. Dafür wurden BEAS-2B Zellen mit dem Pan-PKC Inhibitor Staurosporin oder Calphostin C, einem Inhibitor der regulatorischen Domäne klassischer und neuer PKC Isoformen für 1h vorinkubiert. Daraufhin erfolgte eine Infektion mit dem *M. catarrhalis* Stamm O35E. Die IL-8 Freisetzung wurde anschließend mittels ELISA analysiert.

In weiteren Versuchen haben wir nun die Bedeutung der individuellen PKC Isozyme näher untersucht, von denen bekannt ist, dass sie im Lungenepithel expremiert werden. Hierzu wurden die vorbereiteten BEAS-2B Zellen mit den verschiedenen PKC Isoform-Inhibitoren vorinkubiert und anschließend mit *M. catarrhalis* infiziert. Folgende PKC Inhibitoren kamen zum Einsatz: Die chemischen Inhibitoren Gö 6976, ein Inhibitor der katalytischen Domänen von PKC α und β , sowie PKC 20/28, der gegen die katalytische Domäne von PKC α gerichtet ist. Außerdem wurde der gegen die regulatorische Domäne von PKC β gerichtete PKC β Inhibitor verwendet, welcher beide Formen von PKC β (β I und β II) hemmt. Desweiteren erfolgte der Einsatz von Inhibitoren gegen PKC δ (Rottlerin), PKC ϵ (PKC ϵ Translocation Inhibitor Peptide), PKC θ (PKC θ Pseudosubstratinhibitor, myristoyliert) und PKC ζ (PKC ζ Pseudosubstratinhibitor, myristoyliert).

Nach 16 stündiger Inkubationszeit mit *M. catarrhalis* wurden die Zellüberstände im ELISA quantitativ auf sekretiertes IL-8 untersucht.

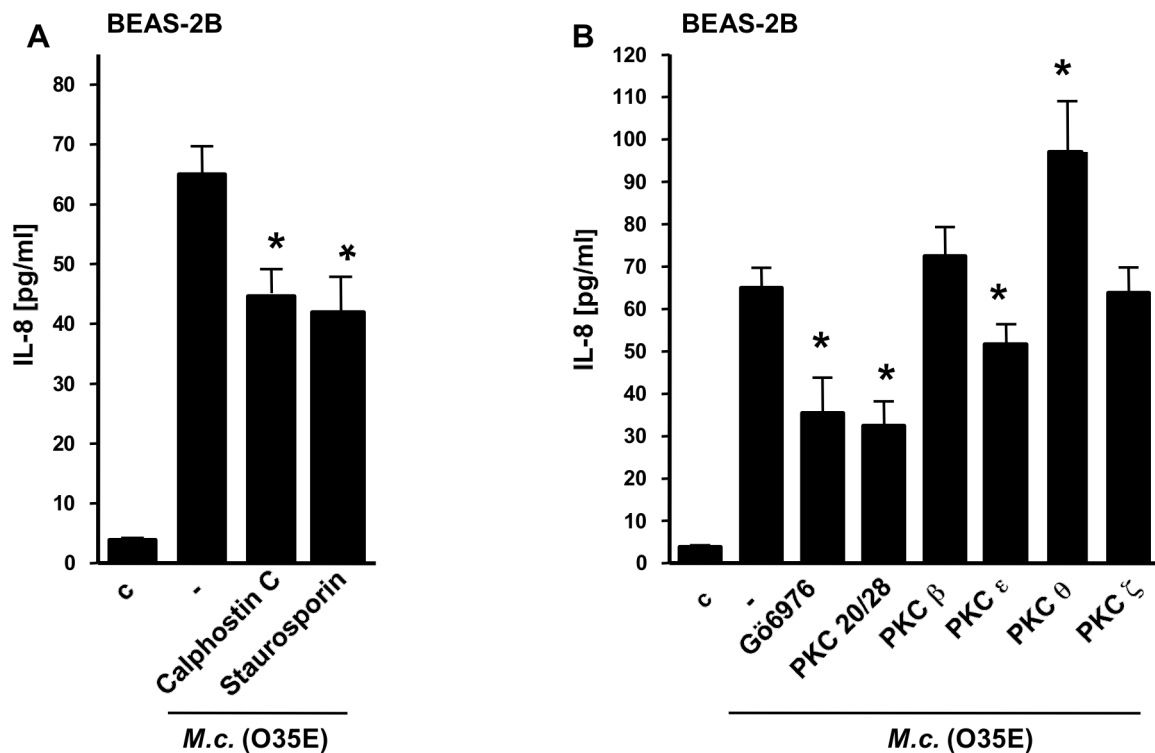


Abbildung 3.6: Rolle einzelner PKC Isoforme bei der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Sekretion

A) BEAS-2B Zellen wurden jeweils vor Infektion mit dem *M. catarrhalis* Stamm O35E 1h mit den PKC Inhibitoren Calphostin (1µM) oder Staurosporin (50nM) vorinkubiert.

B) BEAS-2B Zellen wurden jeweils vor Infektion mit dem *M. catarrhalis* Stamm O35E 1h mit den PKC Inhibitoren Gö 6976 (Inhibitor von PKC α und β) und PKC 20/28 (Inhibitor PKC α) sowie den Inhibitoren gegen PKC β, PKC ε, PKC θ und PKC ζ vorinkubiert.

Nach einer Gesamtinkubationszeit von 16h wurden die Zellüberstände im ELISA untersucht (A und B).(* = p<0.05.)

Die Abbildung zeigt das Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen.

Wie in Abbildung 3.6A zu erkennen, führten beide eingesetzten Pan-Inhibitoren, sowohl Calphostin C, als auch Staurosporin zu einer Reduktion der IL-8 Freisetzung. Dies deutet darauf hin, dass die PKC für die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Sekretion von wichtiger Bedeutung ist.

Aus Abbildung 3.6B wird außerdem ersichtlich, dass zudem eine spezifische Inhibition von PKC α und PKC ε zu einer Reduktion der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Freisetzung führt. Im Gegensatz dazu bewirkte eine Hemmung der PKC θ einen signifikanten Anstieg der IL-8 Sekretion.

Die Inhibition der anderen PKC Isoformen zeigten keinen Einfluß auf die IL-8 Freisetzung, wie exemplarisch durch PKC β und PKC ζ in Abbildung 3.6B dargestellt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Sekretion durch die PKC Isoforme differentiell reguliert wird.

Zusätzlich wurden die chemischen Inhibitoren, welche in diesen Versuchen verwendet wurden, daraufhin getestet, ob sie einen Einfluss auf die Zellproliferation zeigen oder zytotoxische Aktivitäten aufweisen. Alle Inhibitoren führten in unseren Zellkultursystemen weder zu einer Reduktion der Zellanzahl, noch zeigten sie morphologische Anzeichen einer Zytotoxizität oder einen modifizierenden Einfluß auf das Bakterienwachstum innerhalb des getesteten Zeitrahmens.

3.7 Bestätigung des Einflusses von PKC α , PKC ϵ und PKC θ auf die IL-8 Expression mittels SiRNA

In den vorangegangenen Versuchen war beobachtet worden, dass insbesondere die PKC α , PKC ϵ und PKC θ eine Rolle bei der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Freisetzung spielen. Um die Beobachtungen mittels eines zweiten unabhängigen Verfahrens bestätigen zu können, sollten gezielt die Funktionen der Expression von PKC α , PKC ϵ und PKC θ in pulmonalen Epithelzellen mit der Technik des siRNA vermittelten *Gensilencing* untersucht werden. SiRNAs (small interfering RNAs) sind kurze 21–23nt lange doppelsträngige RNA-Moleküle, welche die spezifische Degradierung von mRNA hervorrufen. Dazu bilden sie einen siRNA-Proteinkomplex RISC (RNA induced silencing complex) welcher spezifisch mRNA durch Ribonuclease H abbaut, oder zumindest die Transkription verhindert. Durch den siRNA-vermittelter Gen-„Knock-Out“ kann die Funktion des entsprechenden Gens untersucht werden. Da die eingesetzten BEAS-2B Zellen während des Gen-knockdown Prozesses erhebliche Einschränkungen in ihrer Lebensfähigkeit aufwiesen, wurden in diesen Versuchen mit der Alveolarzelllinie A549 gearbeitet. Die A549 Zellen hatten sich bereits in anderen Versuchen als effektive Zellen in der Anwendung von Gensilencingmethoden erwiesen (Opitz et al., 2006; Slevogt et al., 2007).

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewähren zu können, wurden die Beobachtungen der vorherigen Versuche zusätzlich an A549 Zellen getestet. Die A549 Zellen wurden hierzu mit den PKC Inhibitoren Gö 6976, PKC ϵ , PKC ζ und PKC θ 1h vor Infektion mit *M.catarrhalis* O35E vorinkubiert. Nach einer Gesamtstimulationszeit von 12h wurde die IL-8 Freisetzung im ELISA untersucht (Abb. 3.7).

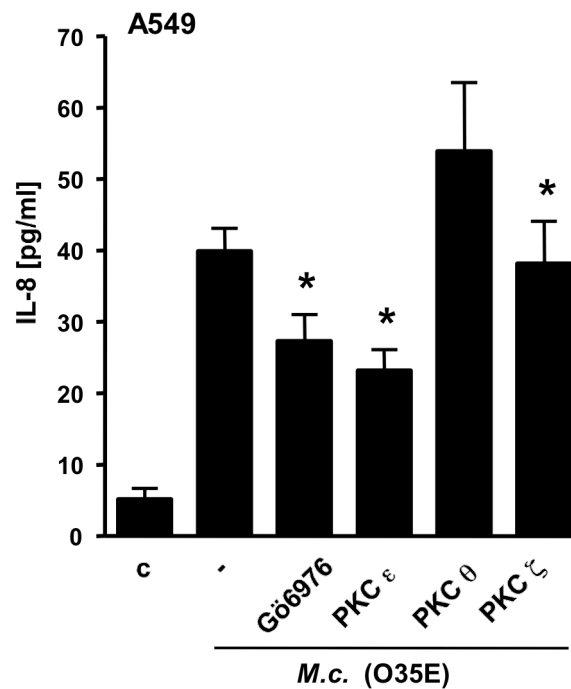


Abbildung 3.7: Funktion der Inhibition einzelner PKC Isoforme für die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Sekretion in A549 Zellen

A549 Zellen wurden 1h vor einer Infektion mit *M. catarrhalis* O35E mit den PKC Inhibitoren Gö 6976 (Inhibitor von PKC α und β) PKC ϵ , PKC θ und PKC ζ vorinkubiert. Nach einer Gesamtinkubationszeit von 12h wurden die Zellüberstände im ELISA untersucht (* = $p < 0.05$). Die Abbildung zeigt das Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen.

Wie in Abbildung 3.7 ersichtlich, führte eine Inhibition sowohl von PKC α/β (Gö 6976) als auch PKC ϵ zu einer deutlichen Reduktion der IL-8 Freisetzung in *M. catarrhalis* infizierten A549 Zellen. Im Gegensatz dazu bewirkte die Inhibition der PKC θ einen Anstieg der IL-8 Sekretion. Der Einsatz des PKC ζ - Inhibitors zeigte im Vergleich zur O35E infizierten Kontrolle keinen Effekt. Diese Versuche entsprechen in ihrer Aussage den Ergebnissen der BEAS-2B Zellen, wodurch eine Vergleichbarkeit beider Zelllinien in den nachfolgenden Versuchen gegeben ist.

Um die Nukleofektion der A549 Zellen erfolgreich durchführen zu können testeten wir zunächst die eingesetzte siRNA auf ihre Fähigkeit eines effektiven *Silencings*, d.h. eine verminderte Expression der Zielproteine zu erreichen und ermittelten außerdem den Zeitpunkt des ausgeprägtesten *Silencing* Effektes. Dazu wurden A549 Zellen mit siRNA und Kontroll-siRNA transfiziert und die Gesamtproteinfraktion nach 24h, 48h, 72h, und 96h extrahiert (Daten nicht alle abgebildet). Die Nukleofektion sowohl der PKC α , der PKC ϵ als auch der PKC θ -spezifischen si-RNA bewirkte in allen Fällen eine Reduktion der Proteinexpression der entsprechenden PKC Isotypen. Nach 48h konnte ein starkes Silencing der PKC ϵ und nach 72h der PKC α und PKC θ beobachtet werden (Abbildung 3.8 A, B, C). Als Beladungskontrolle wurde die Nitrozellulosemembran mit einem Antikörper gegen die konstitutiv expremierte von

einer *M. catarrhalis* Infektion unbeeinflusste Mitogen Activated Protein (MAP)- Kinase, ERK-2 (Extracellular Regulated Kinase-2), inkubiert.

Im weiteren Verlauf wurde eine Ausschaltung der PKC α , PKC ϵ und PKC θ unter Einsatz der siRNA Transfektion durchgeführt, anschließend erfolgte eine Infektion der Zellen mit *M. catarrhalis* Stamm O35E. Zur Überprüfung der Zytokinfreisetzung wurden die Zellüberstände im ELISA untersucht.

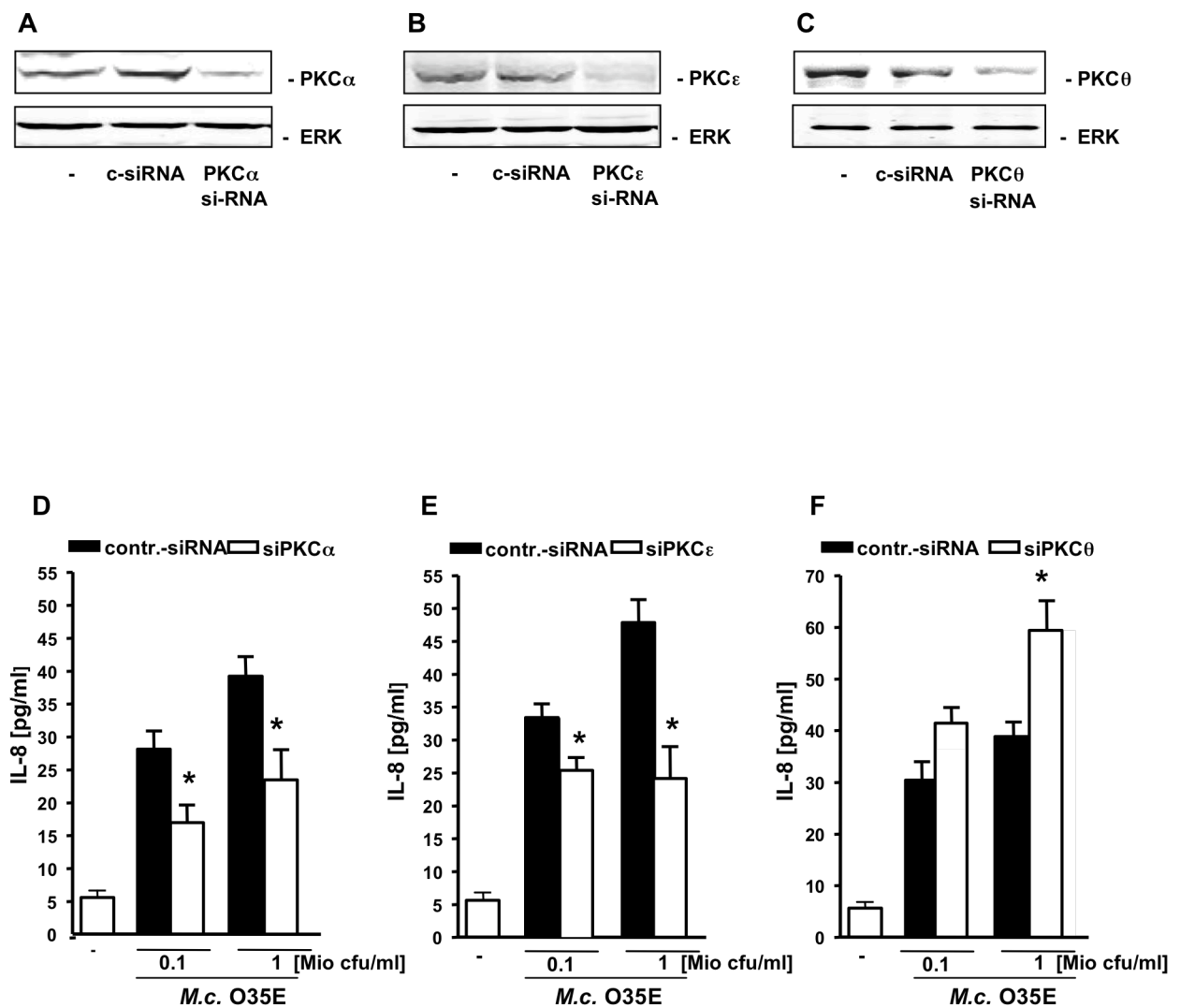


Abbildung 3.8: Inhibition der Aktivität von PKC α , PKC ϵ und PKC θ mittels siRNA

A549 Zellen wurden mit siRNA gegen PKC α , PKC ϵ und PKC θ nukleofektiert und für 72h bzw. PKC ϵ für 48h inkubiert (A,B,C) Zum Vergleich wurde die Gesamtproteinfraktion aus nicht-infizierten Zellen im Western Blot untersucht, als Kontrolle wurde ERK-2 eingesetzt. Nach 72h ist ein starkes Silencing der PKC α (A) und PKC θ (C), nach 48h der PKC ϵ (B) Expression festzustellen. A549 Zellen wurden mit jeweils mit siRNA gegen PKC α , PKC ϵ und PKC θ nukleofektiert und anschließend mit *M. catarrhalis* O35E in verschiedenen Konzentrationen (0.1 und 1 Mio cfu/ml) infiziert (c-siRNA = Kontroll-siRNA. * = $p < 0.05$). Die Abbildung zeigt das Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen.

Die im ELISA untersuchten Zellüberstände zeigten nach Behandlung mit PKC α und PKC ϵ siRNA eine deutliche Reduktion der IL-8 Freisetzung (D, E) im Vergleich zu den nicht-nukleofektierten infizierten Proben. Nach Nukleofektion mit PKC θ siRNA ergaben die ELISA Tests der entsprechenden Zellüberstände eine signifikante Erhöhung der IL-8 Sekretion (F).

Wie in der Abbildung 3.8 erkennbar zeigte die Untersuchung der Zellüberstände im ELISA eine Verminderung der O35E induzierten IL-8 Produktion durch den *knock-down* der PKC α und PKC ϵ . Hierbei stehen die nukleofektierten Zellen auch in direktem Unterschied zur O35E infizierten Kontrolle.

Im Gegensatz zu den soeben beschriebenen Beobachtungen PKC α und ϵ steht der Effekt einer Inaktivierung der PKC θ durch siRNA. Hier zeigte sich als Folge des Gen-Silencing eine Erhöhung der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Antwort.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigten die vorherigen Beobachtungen, dass die PKC Isoformen α , ϵ und θ unterschiedliche regulatorische Funktionen auf die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Freisetzung ausüben.

3.8 *M. catarrhalis* aktiviert die PKC Isoformen α , ϵ und θ in pulmonalen Epithelzellen

Wie bereits beschrieben, stellt die Translokation der Kinasen vom Zytosol zur Zellmembran einen guten Indikator für die Aktivierung der PKC und ihrer Isoforme dar (Hippenstiel et al., 1998; San-Juan-Vergara et al., 2004). In den folgenden Versuchen wurde untersucht, welche Auswirkungen eine *M. catarrhalis* Infektion auf die Aktivierung der PKC Isoformen α , ϵ und θ hat. Dabei wurde die Translokation der einzelnen Isoformen zur Zellmembran mittels Western Blot nach fraktionierter Zellyse nachgewiesen. Dafür wurde der membranäre von dem übrigen Proteinanteil der Zelle durch eine Membran-Zytosol Fraktionierung aufgetrennt und unter Einsatz eines Pan-spezifischen PKC Antikörpers untersucht. Zunächst wurde die Aktivierung der Gesamt-PKC durch *M. catarrhalis* mittels des Nachweises einer Translokation an die Zellmembran in Western Blot Verfahren nachgewiesen. Dazu wurden zunächst BEAS-2B Zellen in einer Zeitreihe (60, 120, 240min) mit *M. catarrhalis* O35E infiziert. (Abbildung 3.9A). In weiteren Versuchen wurden dann an BEAS-2B Zellen spezifische Antikörper gegen die Isoformen PKC α , PKC ϵ und PKC θ eingesetzt und diese auf eine Translokation in die Membran hin untersucht (Abbildung 3.9B-D).

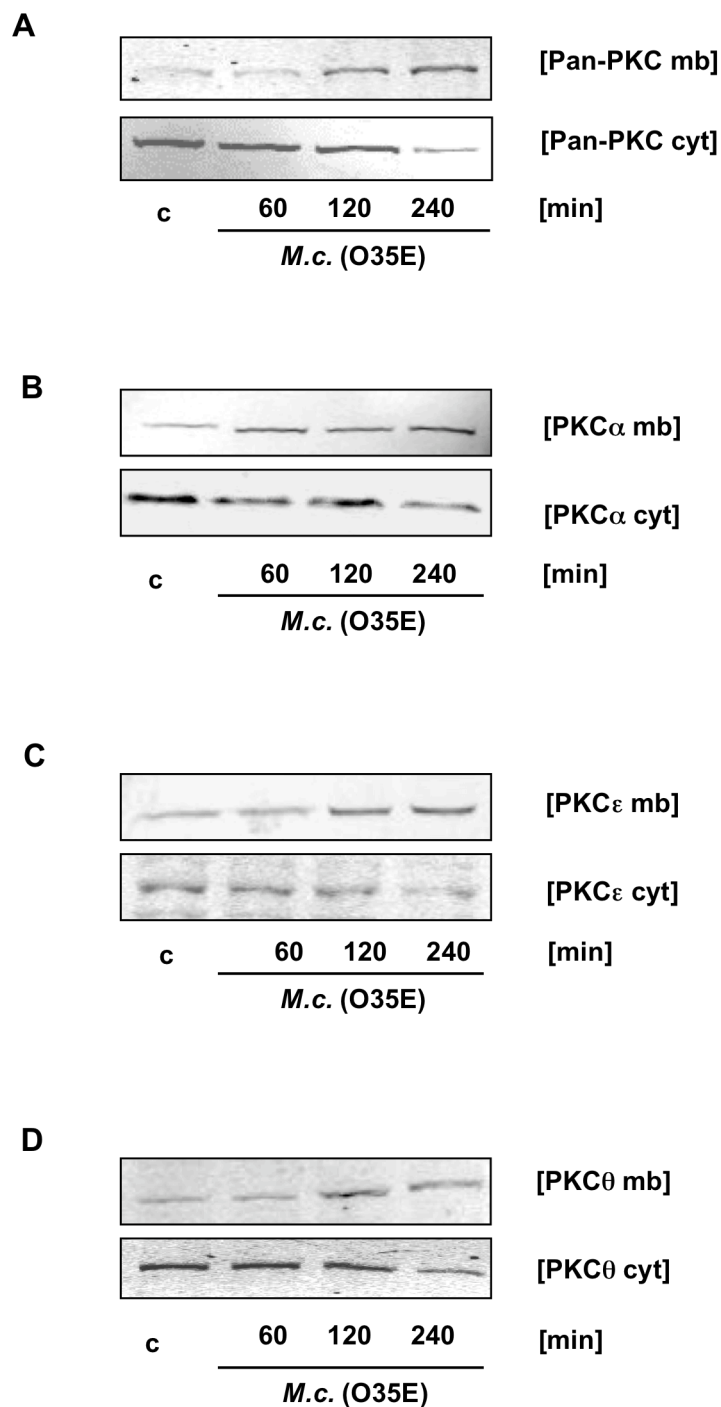


Abbildung 3.9: Translokation der Gesamt PKC (Pan PKC) und der einzelnen Isoformen PKC α , ϵ und θ zur Zellmembran nach Infektion mit *M. catarrhalis* O35E

Zeitabhängiger Anstieg der PKC in der Membranfraktion und zeitabhängige Abnahme der PKC in der Zytosolfraction. Die BEAS-2B Zellen wurden für 60, 120 und 240min mit *M. catarrhalis* [10^7 cfu/ml] stimuliert.

Die Nitrozellulosemembranen wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen die jeweiligen PKC-Isoformen entwickelt (3.9 A-D) (cyt= Zytosol; mb= Membran; c= Kontrolle; M.c. = *M. catarrhalis*). Dargestellt ist je ein repräsentativer Blot von drei unabhängigen Untersuchungen.

Wie in Abbildung 3.9A erkennbar, fand nach Stimulation der BEAS-2B Zellen mit *M. catarrhalis* eine deutliche PKC Translokation vom Zytosol zur Zellmembran statt, welche durch Einsatz spezifischer PKC α , ϵ und θ Antikörper auch einzeln für die entsprechenden Isoformen gezeigt werden konnte.

In Abbildung 3.9B zeigt sich eine deutliche *M. catarrhalis* induzierte Translokation der PKC α . Auf dem repräsentativen Blot ist in der Membranfraktion eine zeitabhängige Zunahme der PKC α , bei gleichzeitiger diskreter Abnahme in der zytosolischen Fraktion zu erkennen.

Wie in Abbildung 3.9C ersichtlich, zeigt sich nach einer 240 minütigen Stimulation der BEAS-2B Zellen mit *M. catarrhalis* eine deutliche Zunahme der PKC ϵ in der Membranfraktion. Der Blot der Zytosolfraktion zeigt hingegen eine zeitabhängige Abnahme der PKC. Dies weist darauf hin, dass die PKC ϵ nach Stimulation mit *M. catarrhalis* aktiviert wird und eine Translokation an die Membran erfolgt. Bei der PKC θ ist ebenso eine starke Zunahme in der Membranfraktion bei gleichzeitiger Abnahme in der Zytosolfraktion nach einer Infektion mit *M. catarrhalis* zu beobachten (Abbildung 3.9D).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine *M. catarrhalis* Infektion eine Translokation der PKC, bzw. ihrer Isoformen PKC α , PKC ϵ und PKC θ zur Zellmembran in pulmonalen Epithelzellen bewirkt, welches ein deutliches Zeichen für eine *M. catarrhalis* induzierte Aktivierung dieser Isoformen ist.

3.9 PKC und UspA2 sind an der *M. catarrhalis*-induzierten NF- κ B Aktivierung beteiligt

In vorangegangenen Arbeiten war von Slevogt et al. gezeigt worden, dass die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Antwort von einer Aktivierung und Translokation von NF- κ B und dessen Bindung an den IL-8 Promotor abhängig ist (Slevogt et al., 2006).

Wie in einigen Studien demonstriert, wird für eine Aktivierung von NF- κ B in den verschiedenen Zelltypen eine Aktivierung der PKC durch PMA und TNF α benötigt (Lallena et al., 1999). Um nun herauszufinden, welche Rolle die PKC bei der *M. catarrhalis* induzierten NF- κ B Aktivierung spielt, wurden stabil mit NF- κ B transfizierte A549 Zellen (A549 6Btkluc) verwendet. Das NF- κ B Gen ist dabei an ein Luziferasegen gekoppelt, so dass eine NF- κ B Aktivierung zu einer entsprechenden messbaren Luziferase-Aktivität führt. Diese Zellen wurden zunächst mit dem Pan-PKC Inhibitor Calphostin C vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Infektion der Zellen mit *M. catarrhalis* Stamm O35E. Die Messung der NF- κ B Aktivierung wurde mit dem NF- κ B Luziferase Assay durchgeführt.

Nach vergleichbarem Versuchsprinzip erfolgte außerdem eine Infektion mit *M. catarrhalis* O35E.2, der UspA2 defizienten Mutante.

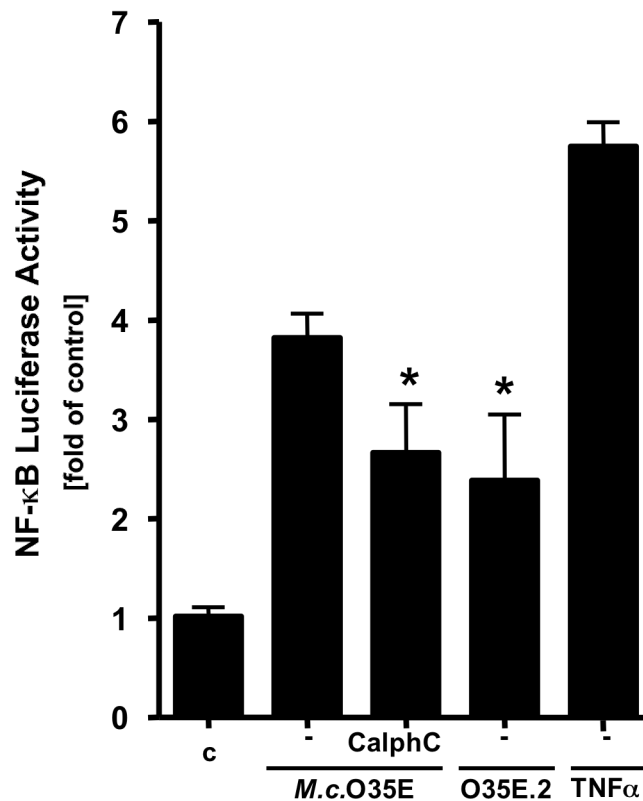


Abbildung 3.10: Rolle von UspA2 und PKC bei der *M. catarrhalis* induzierten NF-κB Aktivierung

A549 6Btkluc- Zellen wurden mit dem *M. catarrhalis* [10^7 cfu/ml] Stamm O35E und O35E.2, der UspA2 defizienten Mutante für 4h infiziert. Die Inkubation des Pan PKC Inhibitor Calphostin C erfolgte bereits 1h vor Infektion. Als Positivkontrolle für die NF-κB Aktivierung wurde TNF-α eingesetzt. (c= Kontrolle; „-“ = kein Einsatz von Calphostin C) (* = $p < 0.05$). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von 3 unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse bestätigten, dass eine Infektion mit *M.catarrhalis* Stamm O35E zu einer deutlichen NF-κB Aktivierung in den A549 6Btkluc-Zellen führte. Wie aus Abbildung 3.10 ersichtlich, führt eine Inhibition mit einem Pan-PKC Inhibitor (Calphostin C) zu einer signifikanten Abnahme dieser *Moraxella* induzierten NF-κB Aktivierung.

Interessanterweise zeigte sich in den Versuchen, dass Verglichen mit einer Infektion durch den Wildtypstamm O35E eine Infektion mit der UspA2 defizienten Mutante eine geringere NF-κB Aktivierung zur Folge hatte. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die PKC an der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Aktivierung beteiligt ist. Außerdem zeigen sie, dass das *M. catarrhalis* spezifische Oberflächenmembranprotein UspA2 für die PKC vermittelten Aktivierung von NF-κB eine wichtige Rolle spielt.

3.10 In *M. catarrhalis* infizierten Lungenepithelzellen beeinflussen die PKC Isoforme α , ϵ und θ die IL-8 Expression am IL-8 Promoter

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt zu seiner Translokation vom Zytosol zum Zellkern. Dort erfolgt durch Bindung an die NF- κ B Bindungsdomäne des IL-8 Promoters der Einsatz der Transkription (Wickremasinghe et al., 1999).

Um die Rolle der einzelnen PKC Isoformen für die *M. catarrhalis* induzierte Aktivierung am IL-8 Promoter zu untersuchen, wurde die Technik der Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) angewandt. Bei dieser Fragestellung wurde geprüft, ob eine *M. catarrhalis* induzierte NF- κ B Aktivierung in pulmonalen Epithelzellen zu einer erhöhten Bindung der RNA-Polymerase II (Pol II) an den IL-8 Promoter führt. Die Bindung der RNA- Pol II an den IL-8 Promoter stellt einen guten Indikator für den Start der Gentranskription dar (Griffin and Moynagh, 2006).

In vorangegangenen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Infektion von BEAS-2B Zellen mit *M. catarrhalis* zu einer erhöhten Bindung von Pol II an den IL-8 Promoter führt (Slevogt et al., 2006). Diese Beobachtung sollte nun bestätigt und gezeigt werden, dass in *M. catarrhalis* infizierten Zellen ein deutlicher Anstieg der Transkription von IL-8 Genen zu verzeichnen ist.

Zum genaueren Verständnis dieses Prozesses wurde der Fokus auf die Rolle der PKC Isoformen PKC α , ϵ und θ gerichtet. Für diese Versuche wurden konfluente BEAS-2B Zellen 60min. mit dem spezifischen Inhibitor von PKC α (Gö6976), PKC ϵ (PKC ϵ translocation inhibitor peptide) oder PKC θ (PKC θ pseudosubstrate inhibitor) vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine 2 stündige Infektion mit *M. catarrhalis* (10^7 cfu/ml). Eine Vorinkubation der Zellen mit dem PKC ζ Inhibitor zeigte keinen Einfluss auf die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Freisetzung und wurde daher als interne Kontrolle verwendet.

Zur Detektion der RNA Polymerase II (POL II) am IL-8 Promoter wurde eine Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) durchgeführt, anschließend erfolgte die Amplifizierung mittels PCR.

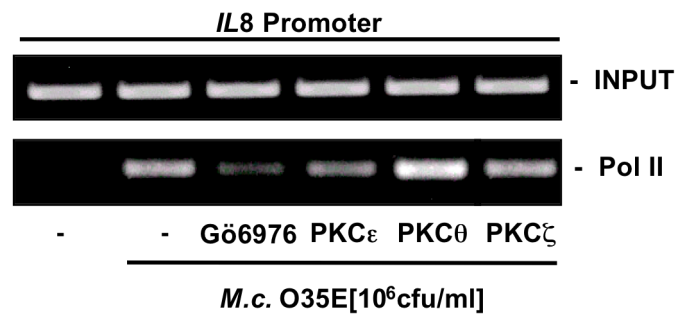


Abbildung 3.11: Einfluss der Inhibition einzelner PKC Isoforme auf die Bindung der Polymerase II an den IL-8 Promoter nach Infektion mit *M. catarrhalis*

BEAS-2B Zellen wurden 1h mit dem spezifischen Inhibitor von PKC α (Gö6976), PKC ϵ (PKC ϵ translocation inhibitor peptide), PKC θ (PKC θ pseudosubstrate inhibitor) oder PKC ζ Inhibitor vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Infektion mit *M. catarrhalis* (10^6 cfu/ml). Nach einer Inkubationszeit von 2h wurden mittels Chromatin Immunopräzipitation die DNA Bereiche, an denen die RNA-Polymerase II (Pol II) bindet, aufgereinigt und nachfolgend durch PCR amplifiziert. (O35E= *M. catarrhalis* Stamm O35E; Pol II=RNA-Polymerase II; Input= Gesamt-DNA- Menge). Dargestellt ist eine repräsentative Abbildung von drei unabhängigen Untersuchungen.

Die Ergebnisse des Versuches zeigten, dass eine Inhibition der PKC α und PKC ϵ zu einer signifikanten Reduktion der *M. catarrhalis* gesteuerten Bindung der Pol II an den IL-8 Promoter führt (Abb. 3.11). Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung der Inhibition von PKC θ . Diese bewirkt bei Infektion mit *M. catarrhalis* eine erhöhte Pol II Bindung an den IL-8 Promoter. Die Inhibition der PKC ζ zeigte im Vergleich zu unbehandelten *M. catarrhalis* infizierten Zellen keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten der Pol II.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass PKC α und PKC ϵ einen stimulierenden Einfluss auf die *M. catarrhalis* gesteuerte Rekrutierung der Pol II an den IL-8 Promoter mit nachfolgender IL-8 Transkription aufweisen. Im Gegensatz dazu kann der PKC θ hierbei eine Rolle bei der Negativregulation der IL-8 Expression zugeschrieben werden.

4. DISKUSSION

4.1 *M. catarrhalis* induziert die IL-8 Sekretion in Bronchialepithelzellen

Bei der Pathogenese der COPD und auch dem weiteren Krankheitsverlauf spielt die Infektion des Bronchialepithels mit *M. catarrhalis* eine wichtige Rolle. Neben dem bekannten Einfluss von Bakterien wie *H. influenzae* und *S. pneumoniae* konnte ebenfalls eine bedeutende Beteiligung von *M. catarrhalis* nachgewiesen werden (Murphy et al., 2005). Mit der Darstellung verschiedener Aspekte der molekularen Interaktion zwischen *M. catarrhalis* und dem pulmonalen Epithel tragen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu einem besseren Verständnis demzugrunde liegender Prozesse bei.

Die Inflammation bei der COPD ist durch vermehrte Infiltration von Neutrophilen, Lymphozyten und Makrophagen in den Atemwegen gekennzeichnet (Barnes et al., 2003). Dies wird vor allem durch die Stimulation proinflammatorischer und chemotaktischer Zytokine begünstigt. Der Mediator IL-8, welcher an der Rekrutierung und Aktivierung polymorphkerniger Granulozyten an den Entzündungsort beteiligt ist und zur lokalen Gewebsinflammation führt (Strieter et al., 2003), ist bei der Immunantwort pulmonaler Epithelzellen von zentraler Bedeutung. (Slevogt et al., 2006; Slevogt et al., 2007; Barnes, 2008).

In dieser Arbeit lag zunächst die Konzentration auf den Einfluss von *M. catarrhalis* auf die IL-8 Sekretion in Pulmonalepithelzellen. Hierbei konnte unter Verwendung primärer Bronchialepithelzellen, BEAS-2B und A549 Zellen sowohl im Bronchial- als auch im Alveolarepithel eine deutliche *M. catarrhalis* induzierte Erhöhung der Zytokinexpression nachgewiesen werden. In vorangegangenen Studien war bereits gezeigt worden, dass *M. catarrhalis* die IL-8 Freisetzung in infizierten Zellen induziert. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass dies über eine Aktivierung von NF- κ B erfolgt (Slevogt et al., 2006). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt durch seine regulatorische Funktion bei der Expression proinflammatorischer Gene eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Infektionsabwehr (Hayden and Ghosh, 2004).

Neben der Rolle von *M. catarrhalis* wurde bislang auch der Einfluss anderer bakterieller Pathogene auf die IL-8 Freisetzung nachgewiesen. So zeigten Infektionen humaner Bronchialepithelzellen mit *L.pneumophila* ebenfalls einen deutlichen Anstieg der IL-8 Sekretion (Schmeck et al., 2007; Teruya et al., 2007), ebenso Infektionen mit *S. pneumoniae* (N'Guessan et al., 2006; Schmeck et al., 2006) oder *Cryptococcus neoformans* (Guillot et al., 2008).

Bei der COPD ist nachweislich die Expression und Sekretion von IL-8 signifikant erhöht (Schulz et al., 2003). Auch Umweltfaktoren wie Zigarettenrauchexposition induzieren einen Anstieg der IL-8 Sekretion in Bronchialepithelzellen (Mio et al., 1997; Moretto et al., 2009), besonders in Kombination mit bakteriellem LPS (Pace et al., 2008). Der Einfluss von Zigarettenrauch

begünstigt daher möglicherweise den Effekt der chronischen Atemwegsinflammation, der mit einer Progression der COPD assoziiert ist (Kulkarni et al.; Laan et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass *M. catarrhalis* an der IL-8 Freisetzung in Bronchialepithelzellen und somit der Entzündungsantwort beteiligt ist. Eine bakterielle Infektion ist somit ein zusätzlicher Faktor, welcher einen Anstieg von IL-8 bewirkt und somit die inflammatorische Komponente der Symptomatik deutlich begünstigt.

Vor diesem Hintergrund ist ein besseres Verständnis der Mechanismen, welche an der epithelialen Freisetzung von IL-8 bei einer Infektion mit *M. catarrhalis* beteiligt sind, von besonderer Relevanz.

4.2 Protein Kinasen C werden bei Infektion mit *M. catarrhalis* in Bronchialepithel aktiviert.

In dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Produktion des Lungenepithels die Aktivierung der Proteinkinase C eine wichtige Rolle spielt.

Nach einer Infektion von BEAS-2B Zellen mit *M. catarrhalis* konnte, in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer, eine Erhöhung der PKC Aktivität beobachtet werden (Abb. 3.3)

Die PKC Aktivität wurde zum einen direkt mittels Aktivitätsassay gemessen, zum anderen wurde zusätzlich die Zunahme des phosphorylierten PKC Substrats (MARCKS) im Western Blot bestimmt. Proteine der MARCKS Familie sind prominente Substrate der PKC, welche in zelluläre Signaltransduktionsprozesse zum Zytoskelett involviert sind. Sie sind in verschiedenen Zelltypen in hohen Konzentrationen expremiert und stellen einen geeigneten Marker der PKC Aktivität dar (Arbuzova et al., 2002; Larsson, 2006). In der Lunge ist MARCKS beispielsweise durch Regulation neutrophiler Migration am inflammatorischen Geschehen beteiligt (Eckert et al.).

Um die Beobachtung der PKC Aktivierung nach Infektion mit *M. catarrhalis* zu präzisieren, wurde nach Infektion von A549 und BEAS-2B Zellen die Konfokalmikroskopie angewandt. Hiermit konnte eine Translokation der PKC zur Zellmembran direkt dargestellt werden.

Die Funktion der PKC und ihrer einzelnen Isoformen bei der Abwehr von Pathogenen in der Lunge ist bislang nur wenig erforscht. Im Lungengewebe werden, wie bereits erwähnt, alle bekannten PKC Isoformen, mit Ausnahme von PKC γ expremiert (Webb et al., 2000). Bislang konnte eine Aktivierung der PKC α in Lungenepithelzellen bei viralen Infektionen nachgewiesen werden (San-Juan-Vergara et al., 2004; Ennaciri et al., 2007). Monick et al. zeigten, dass eine Infektion mit dem Respiratory Syncytial Virus (RSV) zu einer Aktivierung der PKC Isoformen β , δ , ϵ , ζ und μ in A549 Zellen führt (Monick et al., 2001).

Über die PKC Aktivierung im Lungenepithel nach Einfluss von Bakterienbestandteilen liegen hingegen bislang kaum Daten vor. Die Stimulation dendritischer Zellen mit LPS, dem Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien, zeigte eine Aktivierung der Isoformen α , β

und ϵ , dargestellt durch eine Translokation zur Zellmembran (Aksoy et al., 2002). Zudem konnten Kotny et al. demonstrieren, dass LPS die PKC Isoformen PKC α , β -II, δ und ϵ in humanen Monozyten aktiviert und auf diese Weise die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 beeinflusst wird (Kontny et al., 1999). Desweiteren konnte eine modulatorische Beteiligung von PKC α und PKC β in LPS induzierter Aktivität von Makrophagen gezeigt werden, sowie der Einfluss von PKC ϵ an der LPS vermittelten Aktivierung von NF-kB und MAPK (St-Denis et al., 1998; Castrillo et al., 2001; Zhou et al., 2006). Kürzlich demonstrierten Varadarova et al. eine erhöhte Aktivität von PKC α und PKC ϵ in *L. pneumophila* infiziertem Lungenepithel. Darüberhinaus zeigten sie eine Beteiligung von PKC α an der NF-kB vermittelten GM-CSF Expression, sowie einen regulatorischen Einfluss von PKC ϵ auf die GM-CSF Produktion über das activator protein 1 (AP-1) (Vardarova et al., 2009).

In dieser Studie konnte nach Infektion von BEAS-2B Zellen mit *M. catarrhalis* die Aktivierung mehrerer PKC Isoformen demonstriert werden (Abb 3.7). So wurde eine Translokation der Isoformen PKC α , PKC ϵ und PKC θ vom Zytosol zur Zellmembran beobachtet. Diese konnte im Western Blot, anhand der zeitabhängigen Zunahme der Bandenstärke in der Membranfraktion bei gleichzeitiger Abnahme in der zytosolischen Fraktion (Abb 3.9 gut dargestellt werden, was einem geeigneten Nachweis einer PKC Aktivierung entspricht (Webb et al., 2000; Aksoy et al., 2001).

Die klinisch relevanteste Methode zur Untersuchung der Rolle von PKCs in der Lunge ist die direkte Messung der Expression und Aktivität in humanem Lungengewebe. Bislang gibt es jedoch kaum Studien, welche diese Methode beschreiben. Zudem handelt es sich hierbei um Messungen in Tumorgeweben, deren Aussagekraft sicherlich eingeschränkt zu beurteilen ist (Lahn et al., 2004; Bae et al., 2007). Eine weitere mögliche Methode die pulmonale PKC Aktivität darzustellen, sind Versuche an isolierten Organpräparaten und Tiermodellen wie knockout- und transgenen Mäusen (Dorn et al., 1999; Sun et al., 2000; Leitges et al., 2002).

4.3 Verschiedene PKC Isoformen beeinflussen die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Sekretion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde genauer untersucht, welche Aufgabe den einzelnen Isoformen der PKC bei der Infektion von Lungenepithelzellen mit *M. catarrhalis* zugeschrieben werden kann. Über die Aufgabe von PKC bei einer Infektion mit *M. catarrhalis* und ihre konkrete Beteiligung an der inflammatorischen Zytokinfreisetzung sind bislang keine Studien bekannt.

Nach Einsatz chemischer Inhibitoren der PKC Isozyme PKC α und PKC ϵ zeigte sich in den untersuchten BEAS-2B Zellen eine signifikante Abnahme der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Sekretion. Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PKC Isoformen α und ϵ einen aktivierenden Effekt auf die *M. catarrhalis*- induzierte IL-8 Produktion aufweisen. PKC θ kommt hingegen eine inhibitorische Funktion bei der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Sekretion zu.

In den vorliegenden Versuchen zeigte eine Hemmung des Isozyms PKC θ eine Zunahme der IL-8 Freisetzung. Weitere untersuchte PKC Isoforme waren PKC β , PKC δ und PKC ζ , welche ebenfalls im Lungenepithel expremiert werden. Sie zeigten jedoch unter gleichen Versuchsbedingungen keinen signifikanten Effekt (Daten nicht gezeigt) und wurden daher in den Folgeversuchen nicht weiter behandelt.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Slager et al., welche ebenfalls keine pathogen assoziierte Aktivierung von PKC δ und PKC ζ in BEAS-2B Zellen beobachteten (Slager et al., 2007).

Die verwendeten Inhibitoren hemmen die PKC Aktivität entweder durch direkte Zielrichtung auf die katalytische bzw. regulatorischen Domäne der Kinasen oder inhibieren direkt die Translokation der PKC zum Zielkompartiment in der Zelle (PKC ϵ -TIP). Viele der derzeit angewandten PKC Inhibitoren weisen jedoch Schwierigkeiten bei der spezifischen Diskriminierung zwischen den einzelnen Isoformen auf. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Isoformen strukturell sowie funktionell nur geringfügige Unterschiede zeigen und in einem Zelltyp oft mehrere Isoformen parallel expremiert werden, welche zudem eine gegenseitige Erhöhung bewirken können (Ways et al., 1995; Romanova et al., 1998). Viele der Inhibitoren können daher, sobald bestimmte Konzentrationen überschritten werden, auf mehrere Isoformen hemmend einwirken. Eine genaue Validierung der Spezifität einzelner Inhibitoren ist dringend erforderlich. So zeigte sich beispielsweise, dass Inhibitoren wie Gö 6976 (PKC α/β Inhibitor), welcher seine Wirkung an der katalytischen Domäne entfaltet, ein kompetitives Verhalten zu ATP aufweist (Gschwendt et al., 1996). Ebenso verfügt der PKC- δ Inhibitor Rottlerin über Einschränkungen in seiner Spezifität (Leitges et al., 2001).

Die verwendeten Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren lagen bei diesen Versuchen zwar im Bereich der vom Hersteller zugesicherten spezifischen Wirkungsweise, dennoch ist es notwendig verbleibende Restunsicherheiten auszuschließen.

Aus diesem Grund wurden die gewonnenen Beobachtungen zusätzlich durch siRNA vermitteltes Gensilencing der gewählten Isozyme α , ϵ , und θ überprüft. Bei diesem Verfahren wird durch den Einsatz der siRNA die Translation der entsprechenden Proteine verhindert, wodurch die spezifische Zellantwort individueller PKC Isozyme gut dargestellt werden kann (Choi et al., 2006; Lahn et al., 2006).

Bei der Gensilencing Methode wurden A549 Zellen verwendet, da die BEAS-2B Zellen während des Knockdown Prozesses eine erhöhte Zelltodrate aufwiesen.

Aufgrund der Tatsache, dass nach Überprüfung der vorangegangenen Versuche an den A549 Zellen übereinstimmende Ergebnisse beider Zelllinien erzielt worden waren, kann davon ausgegangen werden, dass eine Vergleichbarkeit der Daten von A549 Zellen und BEAS-2B Zellen gewährleistet ist.

Der Einsatz der siRNA bestätigte die Beobachtungen eines gleichermaßen aktivierenden Einflusses der PKC Isoformen α und ϵ , und einer hemmenden Wirkung von PKC θ auf die IL-8 Sekretion. Dies entspricht den von Dempsey et al genannten Erkenntnissen, dass einzelne PKC Isoforme auch in gleichen Zellen gegensätzliche Effekte aufweisen können (Dempsey et al., 2007).

Interessanterweise gehören die genannten Isoformen unterschiedlichen Gruppen an. Während PKC α zur Gruppe der klassischen PKC (cPKC) zugeordnet wird, welche über Calcium und Diacylglycerol (DAG) aktiviert werden, zählen PKC ϵ und θ zu den neuen PKC (nPKC), deren Aktivierung unabhängig von Calcium ist, jedoch ebenfalls die Anwesenheit von DAG erfordert.

Wie bereits erwähnt ist eine gegensätzliche biologische Funktion verschiedener Isoformen bereits in anderen Studien beschrieben worden. So wurden beispielsweise PKC α und β mit mikrovaskulärer Leckage von Endothelzellen bei inflammatorischer Stimulation in Verbindung gebracht (Ferro et al., 2000; Yuan et al., 2000), während PKC δ eine protektive Barrierefunktion übernimmt (Klinger et al., 2007; Gaudreault et al., 2008). Von gegensätzlichen Aufgaben der PKC α und PKC ϵ ist bei der Gliomzellmigration und in intestinalen Epithelzellen berichtet worden (Besson et al., 2001; Song et al., 2002). Eine weitere Studie zeigte konträre Rollen beider Isoformen bei der Regulation der Kollagenexpression im Lungengewebe (Tourkina et al., 2005). Auch wurde bereits demonstriert, dass innerhalb einer Gruppe sowohl entgegengesetzte, als auch parallele Funktionen im gleichen Zellsystem vorliegen können. Chen et al. zeigten diesen Effekt an PKC δ und PKC ϵ in Myokardzellen, wo die Aktivierung von PKC δ eine Erhöhung ischämischer Zellschädigung bewirkt, während PKC ϵ eine kardioprotektive Wirkung zeigte. Gleichzeitig führt eine Aktivierung beider Isozyme zu einer nicht-pathologischen kardialen Hypertrophie (Chen et al., 2001).

PKC zeigt demnach nicht ein einzig zellspezifisches Expresssionsprofil, sondern verfügt über unterschiedliche Funktionen, welche zudem dem Einfluss von verschiedenen Aktivierungsformen unterliegen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Isoformen sind zwei verschiedenen Gruppen zuzuordnen und weisen somit unterschiedliche Aktivierungswege auf. Da auch hier innerhalb einer Gruppe gegensätzliche Funktionen vorliegen, wäre die Möglichkeit denkbar, dass nach der Aktivierung der einzelnen Isoformen ein bislang unbekannter zusätzlicher Aktivierungsmechanismus der Zellen eine Rolle spielt, welcher über unterschiedliche Signaltransduktionswege verlaufen könnte. Die Zelle wird so über verschiedene Wege aktiviert, um eine anschließende Immunantwort zu generieren.

Einen weiteren möglichen Erklärungsansatz bietet die Vorstellung, dass in Lungenepithelzellen unter normalen, unstimulierten Konditionen die Aktivitäten von PKC α , ϵ und θ in einem bestimmten ausbalancierten Zustand vorliegen. Diese Balance ist jedoch unter pathologischen Verhältnissen, wie bei einer Infektion mit *M.catarrhalis*, verschoben und führt daher zu

gegensätzlichen Antworten, wie sich in den vorliegenden Versuchen anhand der IL-8 Antwort darstellt. Vertiefende Untersuchungen sowohl in gesundem, als auch in pathogen-stimuliertem Lungengewebe wären zur weiteren Klärung dieses Ansatzes notwendig.

4.4 Die Rolle der PKC und ihrer Isoforme für die Regulation zellulärer Signaltransduktionswege

In Epithelzellen ist bislang nur wenig über die spezifischen pathogen- induzierten Regulationsmechanismen der PKC bekannt. Vor allem die Rolle der einzelnen Isoformen hinsichtlich der NF- κ B abhängigen proinflammatorischen Zytokintranskription ist nicht ausreichend geklärt.

Bislang konnte demonstriert werden, dass *Candida albicans* über eine Aktivierung der PKC die Cyclooxygenase (COX)-2 Expression in Epithelzellen erhöht (Deva et al., 2003). Des Weiteren führten auch Infektionen epithelialer Zellen mit *Helicobacter Pylori* und *Staphylococcus aureus* zu einer PKC-vermittelten COX-2 Expression (Lin et al., 2001; Chang et al., 2004). Von N'Guessan et al wurde beobachtet, dass eine Infektion von A549 Zellen mit *Legionella pneumophila* eine COX-2 Expression mit nachfolgender PGE₂-Synthese in Abhängigkeit von einer PKC α und NF- κ B Aktivierung zur Folge hatte (N'Guessan et al., 2007). Eine weitere Arbeit konnte bisher zeigen, dass auch andere Pathogene, wie Stäube aus der landwirtschaftlichen Tierzucht, die proinflammatorische Zytokinfreisetzung von IL-6 und IL-8 in humanen Lungeneithelzellen über einen PKC abhängigen Mechanismus steuern (Slager et al., 2007). Wang et al. zeigten zuvor, dass die bakteriellen Pili von *S. typhi* zu einer Aktivierung der PKC in monozytischen Zellen führen und über diesen Weg eine erhöhte NF- κ B und IL-6 Produktion bewirken (Wang et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun demonstriert werden, dass eine Infektion von Lungeneithelzellen mit *M. catarrhalis* zu einer Aktivierung der PKC führt, was wiederum über eine differentielle Aktivierung von NF- κ B die Transkription und anschließende Freisetzung von IL-8 zur Folge hat. Es konnten einzelne PKC Isoforme, welche in diesen Prozess involviert sind bestimmt werden. So wurde herausgefunden, dass PKC α , PKC ϵ und PKC θ durch unterschiedliche Regulation der IL-8 Transkription an der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Freisetzung beteiligt sind. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei der IL-8 Induktion *M. catarrhalis* infizierter Lungeneithelzellen die PKC Isoformen α , ϵ und θ eine spezifische regulatorische Rolle einnehmen. Interessant wäre an diesem Punkt die Rolle der PKC und ihrer Isoformen bei einer Infektion des Lungeneithels mit anderen Pathogenen zu vergleichen.

4.5 Bedeutung der PKC bei der Regulation proinflammatorischer Genexpression

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit lag die Konzentration auf den differentiellen Regulationsmechanismen der einzelnen Isoformen PKC α , PKC ϵ und PKC θ auf die proinflammatorische Genexpression.

Nach genauerer Untersuchung der induzierten IL-8 Freisetzung konnte demonstriert werden, dass die drei beschriebenen Isoformen eine bedeutende regulatorische Funktion bei der Rekrutierung der RNA Polymerase II an den IL-8 Promoter respiratorischer Zellen einnehmen. Die Bindung der RNA Polymerase II an den IL-8 Promoter ist ein bekannter Bestandteil der IL-8 Transkription, welche zur IL-8 Expression führt (Muegge, 2002; Schmeck et al., 2005).

Der Einfluss von *M. catarrhalis* auf die Bindung der Pol II an dem IL-8 Promoter war in einer vorangegangenen Studie bereits gezeigt worden (Slevogt et al., 2006). Die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Sekretion erfolgte über die Aktivierung der MAP Kinasen p38 und ERK 1/2, einen Mechanismus, der auch bereits bei anderen pulmonalen Pathogenen wie *H. influenzae* und *S. pneumoniae* dargestellt worden war (Shuto et al., 2001; Schmeck et al., 2004; Chin et al., 2005). Die *M. catarrhalis* gesteuerte inflammatorische Genexpression von IL-8 entspricht auch der Steuerung der IL-8 Regulation durch *C. neoformans* und weitere mikrobielle Pathogene (Hoffmann et al., 2002; Guillot et al., 2008).

Bei diesen Versuchen konnte interessanterweise demonstriert werden, dass die Isoformen PKC α , PKC ϵ und PKC θ einen kontrollierenden Einfluss auf die *M. catarrhalis* gesteuerte IL-8 Genexpression aufweisen. Bei differenzierter Betrachtung der einzelnen Isoformen ließ sich hierbei, entsprechend den vorangegangenen Versuchen, eine Divergenz in der Funktion beobachten. Während PKC α und PKC ϵ Mediatoren mit stimulatorischem Effekt darstellten, zeigte PKC θ eine hemmende Funktion bei der IL-8 Expression.

Der Einfluss der Protein Kinasen C auf die Regulation proinflammatorischer Genexpression in Lungenepithelzellen ist bereits in einigen Studien beschrieben worden. Eine PKC Aktivierung durch das Diacylglycerol- (DAG) Mimetikum Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) zeigte einen stimulatorischen Effekt auf die NF- κ B Aktivierung und die Induktion von Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in A549 Zellen und humanen Bronchialepithelzellen (Newton et al., 1998; Bergmann et al., 2000). Page et al. konnten zeigen, dass PKC δ eine Schlüsselfunktion in der Regulation von NF- κ B abhängiger Genexpression in pulmonalen Epithelzellen zukommt (Page et al., 2003).

Ebenfalls konnte kürzlich demonstriert werden, dass neben einer Induktion der Bindung von NF- κ B an die DNA über den Klassischen I κ B α abhängigen Weg, der PKC Aktivator PMA die Beteiligung eines weiteren Signalwegs zur Folge hat. Dieser zusätzliche Weg führt über die neuen PKC Isoforme, vor allem PKC δ und ϵ , zur Transkriptionsaktivierung von NF- κ B in A549

Zellen indem die Proteinkinase D (PKD) aktiviert wird. Diese ist gehört wie die PKC zur Proteinkinase Subfamilie der AGC Kinasen (Holden et al., 2008).

Ferner konnte in einigen Studien nachgewiesen werden, dass PKC Inhibitoren beeinflussende Wirkung auf die TNF α Antwort in Lungenepithelien aufweisen. In humanen Bronchialepithelzellen wurden sowohl eine Tabakrauch induzierte, C5a vermittelte IL-8 Expression (Wyatt et al., 1999) als auch eine TNF α induzierte intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1 Expression (ICAM-1) (Krunkosky et al., 2000) durch den Pan-PKC Inhibitor Calphostin C inhibiert. Eine TNF α induzierte GM-CSF Expression wurde durch den Pan-PKC Inhibitor Staurosporin gehemmt (Reibman et al., 2000). Der Einsatz des PKC Aktivators PMA führte in pulmonalen Epithelzellen, welche zuvor mit Calphostin C behandelt worden waren, zu einer NF- κ B abhängigen Expression der Atemwegsmuzine MUC5B und MUC5AC (Hewson et al., 2004). Diese sind Ausdruck einer Hypersekretion von Becherzellen und submuköser Drüsen, welche durch erhöhte Mukusansammlung zu bronchoalveolärer Okklusion führt (Saetta et al., 2000). Wie von Catley et al. beschrieben sind PKC ϵ sowie weitere PKCs bei der NF- κ B abhängigen Gentranskription bronchialer BEAS-2B Zellen beteiligt (Catley et al., 2004).

In den genannten Studien konnte zwar nur im Ansatz dargestellt werden welche PKC Isozyme bei den PMA induzierten Reaktionen eine Rolle spielen, interessanterweise stimmen die Beobachtungen jedoch in einem nennenswerten Punkt mit den vorliegenden Daten dieser Arbeit überein: So weisen alle Anhaltspunkte zusammengefasst deutlich darauf hin, dass die Regulation der PKC induzierten Genexpression im Lungenepithel NF- κ B abhängig erfolgt. Wenn man berücksichtigt, dass Zhang et al. bereits zeigen konnten, dass bei COPD Patienten eine erhöhte Expression von PKC α vorliegt und ebenso die Aktivität von NF- κ B signifikant erhöht ist (Zhang et al., 2004), bieten diese Beobachtungen neue strategische Forschungsansätze zur Entwicklung von Therapiestrategien zur Behandlung der COPD.

Die Aktivierung des NF- κ B vermittelten Signaltransduktionsweges ist bei der Pathogenese der COPD von zentraler Bedeutung. In Bronchialbiopsien von COPD Patienten wiesen Di Stefano et al eine deutlich gesteigerte Expression der NF- κ B Untereinheit p65 mit vermehrter Lokalisation im Zellkern nach (Di Stefano et al., 2002; Di Stefano et al., 2004b). Zusätzlich korrelierte diese mit dem Schweregrad der Erkrankung. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass eine erhöhte Kernlokalisierung von NF- κ B zu einer gesteigerten Sekretion proinflammatorischer Zytokine im Bronchialepithel von COPD Patienten führt und somit den weiteren Erkrankungsverlauf entscheidend beeinflusst (Schulz et al., 2003; Di Stefano et al., 2004a)

Schon seit einiger Zeit ist bekannt, dass die Familie der PKC eine herausragende Rolle bei der Regulation von Inflammation, Zellwachstum und –differenzierung und Apoptose spielt, indem sie die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B kontrolliert (Dempsey et al., 2000; Page

et al., 2003; Griner and Kazanietz, 2007). Der biologische Effekt nach der Aktivierung durch die PKC scheint jedoch abhängig von Stimulus bzw. zell- oder gewebsspezifisch zu sein. Daher ist es zum einen wichtig, die Rolle einzelner Pathogene oder anderer Stimulatoren, welche zur PKC Aktivierung führen in pulmonalen Zellen genauer zu erforschen. Zum anderen ist der Erwerb zusätzlicher Kenntnisse über die Signalwege, welche zur NF- κ B Transkriptionsaktivierung führen, von großer Bedeutung.

4.6 Das *M. catarrhalis* Oberflächenprotein UspA2 beeinflusst PKC Aktivierung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine zusätzliche Fokussierung auf die Beteiligung verschiedener Oberflächenproteine (OMPs) von *M. catarrhalis* bei der Aktivierung der PKC.

Es zeigte sich, dass die Expression des *M. catarrhalis* spezifischen Oberflächenproteins UspA2 (outer membrane protein UspA2) die Aktivierung der PKC beeinflusst.

Das UspA2 Protein gehört zur Familie bakterieller Autotransporter (Henderson et al., 2000) und besteht aus relativ kurzen filamentösen Strukturen welche sich an der Oberfläche von *M. catarrhalis* befinden (Hoiczky et al., 2000; Pearson et al., 2002). UspA2 stellt ein geeignetes Ziel biologisch aktiver Antikörper dar (Chen et al., 1999; Attia and Hansen, 2006). Im Gegensatz zu UspA1 fungiert es nicht als ein Adhesin sondern ist direkt an der Expression der Serumresistenz von *M. catarrhalis* beteiligt (Attia et al., 2005; Attia et al., 2006). Somit hat das UspA2 Protein eine für das Bakterium protektive Funktion, indem es Schutz vor der angeborenen Immunantwort des Wirts bietet.

Nordström et al. konnten zeigen, dass UspA2 durch Bindung an C3, einen bedeutenden Faktor des alternativen Wegs des Komplementsystems, die Komplementaktivierung inhibiert (Nordstrom et al., 2005). Ebenfalls spielt UspA2 über Bindung von C4BP (C4b-binding protein), welche zu einer Hemmung des klassischen Wegs des Komplementsystems führt, eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung der angeborenen Immunabwehr (Nordstrom et al., 2004).

Zellen, welche mit der UspA2 defizienten *M. catarrhalis* Mutante O35E.2 infiziert wurden, zeigten im Vergleich zu einer Infektion mit dem Wildtypstamm O35E und der UspA1 defizienten Mutante O35E.1 eine verminderte PKC Aktivität. Diese wirkte sich mindernd auf die NF- κ B abhängige IL-8 Freisetzung aus.

Die Beobachtungen eines kontrollierenden Einflusses von UspA2 auf die PKC Aktivierung und die anschließende IL-8 Freisetzung deuten möglicherweise auf einen neuen Virulenzmechanismus von *M. catarrhalis* in respiratorischen Epithelzellen hin. UspA2 wäre somit nicht nur an der Serumresistenz von *M. catarrhalis* beteiligt sondern würde zusätzlich eine aktive Funktion bei der Steuerung einer inflammatorischen Immunantwort übernehmen.

Manolov et al. haben kürzlich ebenfalls einen möglichen neuen Virulenzmechanismus von *M. catarrhalis* demonstriert, welcher einen Einfluss des Erregers auf das inflammatorische

Geschehen am Infektionsort aufwies. So konnte gezeigt werden, dass sowohl UspA1 als auch UspA2 zu einer Bindung und Inaktivierung des Akute Phase Proteins und Protease Inhibitors α -1 Antichymotrypsin führt (Manolov et al., 2008). Antichymotrypsin verfügt über eine suppressive Wirkung auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten und ist auf diese Weise an der Einschränkung eines weiteren Anstiegs des inflammatorischen Prozesses mit nachfolgendem Gewebeschaden beteiligt (Kilpatrick et al., 1991).

Weitere Forschung innerhalb des Ansatzes, welcher die explizite Beteiligung von UspA2 auf die Zytokinfreisetzung über eine Aktivierung der PKC zeigt, zum Beispiel die Identifikation eines möglichen Rezeptors, der den PKC abhängigen Signalweg vermittelt wäre sicherlich notwendig um genauere Aussagen treffen zu können. Da bei der Entwicklung eines geeigneten Impfstoffes gegen *M. catarrhalis* neben den Lipooligosacchariden (LOS), das UspA2- Protein als möglichen Kandidaten gesehen wird (McMichael, 2000a), wären vertiefende Kenntnisse dieses Mechanismus von zusätzlichem Interesse.

4.7 Ausblick

Die nachgewiesenen Aktivitätsgrade sowie unterschiedlichen Zusammensetzungen der einzelnen PKC Isoformen repräsentieren eine gewebsabhängige Balance zwischen Expression und Degradation, welche bei zellulären Stresszuständen, wie akuten oder chronischen Entzündungen, oder nach Einfluss von Tabakrauch verändert sein können. Änderungen in der Expression von Protein Kinase C Isoformen können zudem die inflammatorische Immunantwort bei einer Infektion mit *M. catarrhalis* beeinflussen.

Da bislang nur limitierte Informationen über das Verhalten von PKC in humanen Lungenepithelien vorliegen, bedarf es weiterer Studien um die Expressionsmuster der PKC Isoformen sowohl in gesundem, als auch in pathologischen Lungenepithelzellen zu analysieren. Wie bereits beschrieben werden PKCs mit Entzündungen der Atemwege, Bronchokonstriktion und Mukusproduktion in Verbindung gebracht und gewinnen somit bei der Pathogenese der COPD zunehmend an Bedeutung.

Eine genauere Untersuchung der Beteiligung individueller PKC Isozyme bei bakteriellen Infektionen von Patienten mit COPD ist daher zukünftig von besonderem Interesse. Gleichwohl stellt in diesem Zusammenhang eine Vertiefung des Wissens hinsichtlich der Wechselwirkungen zwischen *M. catarrhalis* und den pulmonalen Epithelzellen eine ebenso wichtige Aufgabe dar.

Vor dem Hintergrund der erheblichen Tragweite einer Implementierung aktiver Strategien gegen die COPD, bietet ein besseres Verständnis der pathologischen Mechanismen vor allem für die Entwicklung einer effektiven Therapie einen wesentlichen Schritt.

Beispielsweise könnte durch gezielte Hemmung der einzelnen PKC Isozyme eine differentielle antiinflammatorisch wirksame Therapie entwickelt werden, um den chronischen Verlauf der durch *M. catarrhalis* verursachten Komplikationen der COPD positiv zu beeinflussen. An diesem Punkt sind weitere Studien, insbesondere *in vivo* erforderlich.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die COPD zählt zu einer der häufigsten Ursachen von Morbidität und Mortalität weltweit, deren symptomorientierte Therapie bislang kaum Einfluss auf das Fortschreiten der Erkrankung zeigt. Bei der Pathogenese und Progression der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) spielt die bakterielle Infektion der Atemwege eine bedeutende Rolle. *Moraxella catarrhalis* ist einer der Haupterreger akuter Exazerbationen der COPD. Von zentraler Bedeutung bei der Atemwegsinflammation ist das proinflammatorische Zytokin Interleukin 8 (IL-8).

M. catarrhalis führt zu einer erhöhten Freisetzung von IL-8 im Lungenepithel und ist an der Aufrechterhaltung des inflammatorischen Geschehens beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Protein Kinase C (PKC) bei einer Infektion mit *M. catarrhalis* aktiviert wird und einen regulatorischen Effekt auf die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Freisetzung aufweist. Hierbei zeigte sich zudem ein Einfluss des *Moraxella catarrhalis* spezifischen ubiquitären Oberflächenproteins UspA2. Die *M. catarrhalis* induzierte IL-8 Transkription erfolgt über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und wird über die PKC Isoforme α , ϵ und θ unterschiedlich reguliert. Die verschiedenen PKC Isoforme zeigten bei der Kontrolle der *il8* Promoter Aktivität einen gegenläufigen Einfluss auf die Feinsteuerung der NF- κ B abhängigen IL-8 Genexpression. Während PKC α und ϵ zu einer signifikanten Erhöhung der *M. catarrhalis* induzierten IL-8 Freisetzung führten, zeigte PKC θ hingegen einen inhibitorischen Effekt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können dazu beitragen, ein tiefergehendes Verständnis der molekularen Mechanismen einer *M. catarrhalis* Infektion des pulmonalen Epithels zu erlangen. An diesem Punkt sind weitere Versuche notwendig, deren Erkenntnisse zur Entwicklung antiinflammatorischer Strategien für die Therapie von COPD-Patienten genutzt werden können.

Schlagworte:

Moraxella catarrhalis, IL-8, COPD, Proteinkinase C Isoformen, Bronchialepithel, UspA2, NF-kappa B

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aderem A (1995) The MARCKS family of protein kinase-C substrates. *Biochem Soc Trans* 23:587-591.
- Aderem A, Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406:782-787.
- Aebi C, Lafontaine ER, Cope LD, Latimer JL, Lumbley SL, McCracken GH, Jr., Hansen EJ (1998) Phenotypic effect of isogenic *uspA1* and *uspA2* mutations on *Moraxella catarrhalis* 035E. *Infect Immun* 66:3113-3119.
- Aebi C, Maciver I, Latimer JL, Cope LD, Stevens MK, Thomas SE, McCracken GH, Jr., Hansen EJ (1997) A protective epitope of *Moraxella catarrhalis* is encoded by two different genes. *Infect Immun* 65:4367-4377.
- Aebi C, Stone B, Beucher M, Cope LD, Maciver I, Thomas SE, McCracken GH, Jr., Sparling PF, Hansen EJ (1996) Expression of the CopB outer membrane protein by *Moraxella catarrhalis* is regulated by iron and affects iron acquisition from transferrin and lactoferrin. *Infect Immun* 64:2024-2030.
- Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A, Wakebe H, Ohmoto Y, Imagawa K, Kikuchi M, Mukaida N, Matsushima K (1997) Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun* 65:3218-3224.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- Aksoy E, Amraoui Z, Goriely S, Goldman M, Willems F (2002) Critical role of protein kinase C epsilon for lipopolysaccharide-induced IL-12 synthesis in monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 32:3040-3049.
- Aksoy MO, Bin W, Yang Y, Yun-You D, Kelsen SG (2001) Nuclear factor-kappa B augments beta(2)-adrenergic receptor expression in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L1271-1278.
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285:736-739.
- Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA (1987) Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 106:196-204.
- Anthonisen NR, Connett JE, Kiley JP, Altose MD, Bailey WC, Buist AS, Conway WA, Jr., Enright PL, Kanner RE, O'Hara P, et al. (1994) Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV1. The Lung Health Study. *Jama* 272:1497-1505.
- Anzueto A, Sethi S, Martinez FJ (2007) Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 4:554-564.
- Apicella MA, Mandrell RE (1989) Molecular mimicry as a factor in the pathogenesis of human neisserial infections: in vitro and in vivo modification of the lipooligosaccharide of *Neisseria gonorrhoeae* by N-acetylneuraminic acid. *Pediatr Infect Dis J* 8:901-902.
- Arbuzova A, Schmitz AA, Vergeres G (2002) Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem J* 362:1-12.
- Attia AS, Hansen EJ (2006) A conserved tetranucleotide repeat is necessary for wild-type expression of the *Moraxella catarrhalis* *UspA2* protein. *J Bacteriol* 188:7840-7852.
- Attia AS, Ram S, Rice PA, Hansen EJ (2006) Binding of vitronectin by the *Moraxella catarrhalis* *UspA2* protein interferes with late stages of the complement cascade. *Infect Immun* 74:1597-1611.
- Attia AS, Lafontaine ER, Latimer JL, Aebi C, Syrogiannopoulos GA, Hansen EJ (2005) The *UspA2* protein of *Moraxella catarrhalis* is directly involved in the expression of serum resistance. *Infect Immun* 73:2400-2410.

- Bae KM, Wang H, Jiang G, Chen MG, Lu L, Xiao L (2007) Protein kinase C epsilon is overexpressed in primary human non-small cell lung cancers and functionally required for proliferation of non-small cell lung cancer cells in a p21/Cip1-dependent manner. *Cancer Res* 67:6053-6063.
- Baeuerle PA, Baltimore D (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell* 87:13-20.
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55:97-179.
- Balbi B (2003) COPD: is chemotaxis the key? *Chest* 123:983-986.
- Banerjee D, Khair OA, Honeybourne D (2004) Impact of sputum bacteria on airway inflammation and health status in clinical stable COPD. *Eur Respir J* 23:685-691.
- Barnes PJ (2000) Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 343:269-280.
- Barnes PJ (2007) Chronic obstructive pulmonary disease: a growing but neglected global epidemic. *PLoS Med* 4:e112.
- Barnes PJ (2008) Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*.
- Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA (2003) Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 22:672-688.
- Bartos LC, Murphy TF (1988) Comparison of the outer membrane proteins of 50 strains of *Branhamella catarrhalis*. *J Infect Dis* 158:761-765.
- Beeh KM, Kornmann O, Buhl R, Culpitt SV, Giembycz MA, Barnes PJ (2003) Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B4. *Chest* 123:1240-1247.
- Bergmann M, Barnes PJ, Newton R (2000) Molecular regulation of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human lung epithelial cells by interleukin (IL)-1beta, IL-4, and IL-13 involves both transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:582-589.
- Bergmann M, Hart L, Lindsay M, Barnes PJ, Newton R (1998) IkappaBalpha degradation and nuclear factor-kappaB DNA binding are insufficient for interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha-induced kappaB-dependent transcription. Requirement for an additional activation pathway. *J Biol Chem* 273:6607-6610.
- Berk SL (1990) From *Micrococcus* to *Moraxella*. The reemergence of *Branhamella catarrhalis*. *Arch Intern Med* 150:2254-2257.
- Besson A, Davy A, Robbins SM, Yong VW (2001) Differential activation of ERKs to focal adhesions by PKC epsilon is required for PMA-induced adhesion and migration of human glioma cells. *Oncogene* 20:7398-7407.
- Blackshear PJ (1993) The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *J Biol Chem* 268:1501-1504.
- Blanc PD, Iribarren C, Trupin L, Earnest G, Katz PP, Balmes J, Sidney S, Eisner MD (2009) Occupational exposures and the risk of COPD: dusty trades revisited. *Thorax* 64:6-12.
- Brasier AR, Jamaluddin M, Casola A, Duan W, Shen Q, Garofalo RP (1998) A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF-kappaB1, and c-Rel transcription factors. *J Biol Chem* 273:3551-3561.
- Brunekreef B, Holgate ST (2002) Air pollution and health. *Lancet* 360:1233-1242.
- Buist AS, Vollmer WM, McBurnie MA (2008) Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part I. The burden of obstructive lung disease (BOLD) initiative. *Int J Tuberc Lung Dis* 12:703-708.
- Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AM, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB, Jensen RL, Marks GB, Gulsvik A, Nizankowska-Mogilnicka E (2007) International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 370:741-750.
- Cabello H, Torres A, Celis R, El-Ebiary M, Puig de la Bellacasa J, Xaubet A, Gonzalez J, Agusti C, Soler N (1997) Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study. *Eur Respir J* 10:1137-1144.

- Campagnari AA, Shanks KL, Dyer DW (1994) Growth of *Moraxella catarrhalis* with human transferrin and lactoferrin: expression of iron-repressible proteins without siderophore production. *Infect Immun* 62:4909-4914.
- Castrillo A, Pennington DJ, Otto F, Parker PJ, Owen MJ, Bosca L (2001) Protein kinase Cepsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *J Exp Med* 194:1231-1242.
- Catley MC, Cambridge LM, Nasuhara Y, Ito K, Chivers JE, Beaton A, Holden NS, Bergmann MW, Barnes PJ, Newton R (2004) Inhibitors of protein kinase C (PKC) prevent activated transcription: role of events downstream of NF-kappaB DNA binding. *J Biol Chem* 279:18457-18466.
- Catlin BW (1990) *Branhamella catarrhalis*: an organism gaining respect as a pathogen. *Clin Microbiol Rev* 3:293-320.
- Celli BR, MacNee W (2004) Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 23:932-946.
- Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Nunez G, Inohara N (2003) An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 4:702-707.
- Chan-Yeung M, Ait-Khaled N, White N, Ip MS, Tan WC (2004) The burden and impact of COPD in Asia and Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 8:2-14.
- Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Sheu BS, Muta T, Inoue H, Chen CC (2004) Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation. *Mol Pharmacol* 66:1465-1477.
- Chen D, Barniak V, VanDerMeid KR, McMichael JC (1999) The levels and bactericidal capacity of antibodies directed against the UspA1 and UspA2 outer membrane proteins of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* in adults and children. *Infect Immun* 67:1310-1316.
- Chen L, Hahn H, Wu G, Chen CH, Liron T, Schechtman D, Cavallaro G, Banci L, Guo Y, Bolli R, Dorn GW, 2nd, Mochly-Rosen D (2001) Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11114-11119.
- Chin CL, Manzel LJ, Lehman EE, Humlicek AL, Shi L, Starner TD, Denning GM, Murphy TF, Sethi S, Look DC (2005) *Haemophilus influenzae* from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers. *Am J Respir Crit Care Med* 172:85-91.
- Choi SH, Hyman T, Blumberg PM (2006) Differential effect of bryostatin 1 and phorbol 12-myristate 13-acetate on HOP-92 cell proliferation is mediated by down-regulation of protein kinase Cdelta. *Cancer Res* 66:7261-7269.
- Chung KF (2001) Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 34:50s-59s.
- Clark AS, West KA, Blumberg PM, Dennis PA (2003) Altered protein kinase C (PKC) isoforms in non-small cell lung cancer cells: PKCdelta promotes cellular survival and chemotherapeutic resistance. *Cancer Res* 63:780-786.
- Clemans DL, Bauer RJ, Hanson JA, Hobbs MV, St Geme JW, 3rd, Marrs CF, Gilsdorf JR (2000) Induction of proinflammatory cytokines from human respiratory epithelial cells after stimulation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 68:4430-4440.
- Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng TL, Chen E, Waterfield MD, Francke U, Ullrich A (1986) Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* 233:859-866.
- DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG (1993) Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 268:25568-25576.
- Delclaux C, Azoulay E (2003) Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *Eur Respir J Suppl* 42:10s-14s.
- Dempsey EC, Cool CD, Littler CM (2007) Lung disease and PKCs. *Pharmacol Res* 55:545-559.

- Dempsey EC, Frid MG, Aldashev AA, Das M, Stenmark KR (1997) Heterogeneity in the proliferative response of bovine pulmonary artery smooth muscle cells to mitogens and hypoxia: importance of protein kinase C. *Can J Physiol Pharmacol* 75:936-944.
- Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L429-438.
- Dermitzaki I, Tsatsanis C, Alexaki VI, Castanas E, Margioris AN (2004) Roles of protein kinase A (PKA) and PKC on corticotropin-releasing hormone (CRH)-induced elevation of cytosolic calcium from extra- and intra-cellular sources. *Hormones (Athens)* 3:252-258.
- Deva R, Shankaranarayanan P, Ciccoli R, Nigam S (2003) *Candida albicans* induces selectively transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in HeLa cells: pivotal roles of Toll-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa B. *J Immunol* 171:3047-3055.
- Devalia JL, Davies RJ (1993) Airway epithelial cells and mediators of inflammation. *Respir Med* 87:405-408.
- Di Stefano A, Capelli A, Donner CF (2004a) Role of interleukin-8 in the pathogenesis and treatment of COPD. *Chest* 126:676-678.
- Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FL, Capelli A, Adcock IM, Donner CF (2004b) Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin Exp Allergy* 34:1156-1167.
- Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, Ioli F, Chung KF, Donner CF, Barnes PJ, Adcock IM (2002) Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 20:556-563.
- Diamond G, Legarda D, Ryan LK (2000) The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev* 173:27-38.
- Ding Y, Xu Y, Zhang Z, Duan Q, Chen J (2001) [Effects of hypoxia on the expression of protein kinase C mRNA in pulmonary artery smooth muscle and endothelial cell]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 30:202-206.
- Disatnik MH, Buraggi G, Mochly-Rosen D (1994) Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp Cell Res* 210:287-297.
- Donaldson GC, Seemungal TA, Patel IS, Bhowmik A, Wilkinson TM, Hurst JR, Maccallum PK, Wedzicha JA (2005) Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. *Chest* 128:1995-2004.
- Dorn GW, 2nd, Souroujon MC, Liron T, Chen CH, Gray MO, Zhou HZ, Csukai M, Wu G, Lorenz JN, Mochly-Rosen D (1999) Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12798-12803.
- Eckert RE, Neuder LE, Park J, Adler KB, Jones SL Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) protein regulation of human neutrophil migration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42:586-594.
- Edebrink P, Jansson PE, Rahman MM, Widmalm G, Holme T, Rahman M, Weintraub A (1994) Structural studies of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* serotype A (strain ATCC 25238). *Carbohydr Res* 257:269-284.
- Ennaciri J, Ahmad R, Menezes J (2007) Interaction of monocytic cells with respiratory syncytial virus results in activation of NF-kappaB and PKC-alpha/beta leading to up-regulation of IL-15 gene expression. *J Leukoc Biol* 81:625-631.
- Faden H, Harabuchi Y, Hong JJ (1994) Epidemiology of *Moraxella catarrhalis* in children during the first 2 years of life: relationship to otitis media. *J Infect Dis* 169:1312-1317.
- Ferro T, Neumann P, Gertzberg N, Clements R, Johnson A (2000) Protein kinase C-alpha mediates endothelial barrier dysfunction induced by TNF-alpha. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:L1107-1117.
- Fink J, Mathaba LT, Stewart GA, Graham PT, Steer JH, Joyce DA, McWilliam AS (2006) *Moraxella catarrhalis* stimulates the release of proinflammatory cytokines and prostaglandin E from human respiratory epithelial cells and monocyte-derived macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46:198-208.

- Fletcher CM, Pride NB (1984) Definitions of emphysema, chronic bronchitis, asthma, and airflow obstruction: 25 years on from the Ciba symposium. *Thorax* 39:81-85.
- Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE (2006) Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 7:1250-1257.
- Gaudreault N, Perrin RM, Guo M, Clanton CP, Wu MH, Yuan SY (2008) Counter Regulatory Effects of PKC β II and PKC δ on Coronary Endothelial Permeability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
- Geldmacher H, Biller H, Herbst A, Urbanski K, Allison M, Buist AS, Hohlfeld JM, Welte T (2008) [The prevalence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in Germany. Results of the BOLD study]. *Dtsch Med Wochenschr* 133:2609-2614.
- Ghosh S, Hayden MS (2008) New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8:837-848.
- Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ (2003) Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300:1584-1587.
- Gomez MI, Prince A (2008) Airway epithelial cell signaling in response to bacterial pathogens. *Pediatr Pulmonol* 43:11-19.
- Griffin BD, Moynagh PN (2006) In vivo binding of NF-kappaB to the IkappaBbeta promoter is insufficient for transcriptional activation. *Biochem J* 400:115-125.
- Griner EM, Kazanietz MG (2007) Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer* 7:281-294.
- Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, Johannes FJ (1996) Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett* 392:77-80.
- Gu XX, Chen J, Barenkamp SJ, Robbins JB, Tsai CM, Lim DJ, Battey J (1998) Synthesis and characterization of lipooligosaccharide-based conjugates as vaccine candidates for *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. *Infect Immun* 66:1891-1897.
- Guillot L, Carroll SF, Badawy M, Qureshi ST (2008) *Cryptococcus neoformans* induces IL-8 secretion and CXCL1 expression by human bronchial epithelial cells. *Respir Res* 9:9.
- Harrington EO, Brunelle JL, Shannon CJ, Kim ES, Mennella K, Rounds S (2003) Role of protein kinase C isoforms in rat epididymal microvascular endothelial barrier function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28:626-636.
- Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18:2195-2224.
- Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132:344-362.
- Helminen ME, Maciver I, Latimer JL, Klesney-Tait J, Cope LD, Paris M, McCracken GH, Jr., Hansen EJ (1994) A large, antigenically conserved protein on the surface of *Moraxella catarrhalis* is a target for protective antibodies. *J Infect Dis* 170:867-872.
- Henderson IR, Cappello R, Nataro JP (2000) Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. *Trends Microbiol* 8:529-532.
- Hewson CA, Edbrooke MR, Johnston SL (2004) PMA induces the MUC5AC respiratory mucin in human bronchial epithelial cells, via PKC, EGF/TGF-alpha, Ras/Raf, MEK, ERK and Sp1-dependent mechanisms. *J Mol Biol* 344:683-695.
- Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA (2000) Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med* 109:288-295.
- Hippenstiel S, Kratz T, Krull M, Seybold J, von Eichel-Streiber C, Suttrop N (1998) Rho protein inhibition blocks protein kinase C translocation and activation. *Biochem Biophys Res Commun* 245:830-834.
- Hoban DJ, Doern GV, Fluit AC, Roussel-Delvallez M, Jones RN (2001) Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 32 Suppl 2:S81-93.

- Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galan JE (1997) Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* 159:5550-5559.
- Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M (2002) Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 72:847-855.
- Hogg JC (2004) Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 364:709-721.
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD (2004) The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350:2645-2653.
- Hoiczyk E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A, Heesemann J (2000) Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *Embo J* 19:5989-5999.
- Holden NS, Squires PE, Kaur M, Bland R, Jones CE, Newton R (2008) Phorbol ester-stimulated NF-kappaB-dependent transcription: Roles for isoforms of novel protein kinase C. *Cell Signal* 20:1338-1348.
- Holme T, Rahman M, Jansson PE, Widmalm G (1999) The lipopolysaccharide of *Moraxella catarrhalis* structural relationships and antigenic properties. *Eur J Biochem* 265:524-529.
- House C, Kemp BE (1987) Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* 238:1726-1728.
- Hsiao CB, Sethi S, Murphy TF (1995) Outer membrane protein CD of *Branhamella catarrhalis*: sequence conservation in strains recovered from the human respiratory tract. *Microb Pathog* 19:215-225.
- Hug H, Sarre TF (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* 291 (Pt 2):329-343.
- Ito K, Barnes PJ (2009) COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest* 135:173-180.
- Iwasaki A, Medzhitov R (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5:987-995.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R (1998) Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 10:349-350.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
- Jimi E, Ghosh S (2005) Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone. *Immunol Rev* 208:80-87.
- Jordan NJ, Watson ML, Yoshimura T, Westwick J (1996) Differential effects of protein kinase C inhibitors on chemokine production in human synovial fibroblasts. *Br J Pharmacol* 117:1245-1253.
- Kai H, Yoshitake K, Isohama Y, Hamamura I, Takahama K, Miyata T (1994) Involvement of protein kinase C in mucus secretion by hamster tracheal epithelial cells in culture. *Am J Physiol* 267:L526-530.
- Karalus R, Campagnari A (2000) *Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen. *Microbes Infect* 2:547-559.
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663.
- Kasahara T, Mukaida N, Yamashita K, Yagisawa H, Akahoshi T, Matsushima K (1991) IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. *Immunology* 74:60-67.
- Kasahara Y, Tudor RM, Cool CD, Voelkel NF (2000) Expression of 15-lipoxygenase and evidence for apoptosis in the lungs from patients with COPD. *Chest* 117:260S.
- Katz P, Julian L, Omachi TA, Gregorich SE, Eisner MD, Yelin EH, Blanc PD (2009) The impact of disability on depression among individuals with COPD. *Chest*.
- Kawai T, Akira S (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13:460-469.

- Khan MA, Northwood JB, Levy F, Verhaegh SJ, Farrell DJ, Van Belkum A, Hays JP β -lactamase and antibiotic resistances in a global cross-sectional study of *Moraxella catarrhalis* from children and adults. *J Antimicrob Chemother* 65:91-97.
- Kheifets V, Mochly-Rosen D (2007) Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: design of specific modulators of kinase function. *Pharmacol Res* 55:467-476.
- Kikkawa U, Nishizuka Y (1986) The role of protein kinase C in transmembrane signalling. *Annu Rev Cell Biol* 2:149-178.
- Kilpatrick L, Johnson JL, Nickbarg EB, Wang ZM, Clifford TF, Banach M, Cooperman BS, Douglas SD, Rubin H (1991) Inhibition of human neutrophil superoxide generation by alpha 1-antichymotrypsin. *J Immunol* 146:2388-2393.
- Klinger JR, Murray JD, Casserly B, Alvarez DF, King JA, An SS, Choudhary G, Owusu-Sarfo AN, Warburton R, Harrington EO (2007) Rottlerin causes pulmonary edema in vivo: a possible role for PKC δ . *J Appl Physiol* 103:2084-2094.
- Klingman KL, Murphy TF (1994) Purification and characterization of a high-molecular-weight outer membrane protein of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Infect Immun* 62:1150-1155.
- Kobayashi Y (2008) The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* 13:2400-2407.
- Kontny E, Ziolkowska M, Ryzewska A, Maslinski W (1999) Protein kinase c-dependent pathway is critical for the production of pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha, IL-1beta, IL-6). *Cytokine* 11:839-848.
- Krunkosky TM, Fischer BM, Martin LD, Jones N, Akley NJ, Adler KB (2000) Effects of TNF-alpha on expression of ICAM-1 in human airway epithelial cells in vitro. Signaling pathways controlling surface and gene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:685-692.
- Kulkarni R, Rampersaud R, Aguilar JL, Randis TM, Kreindler JL, Ratner AJ Cigarette smoke inhibits airway epithelial innate immune responses to bacteria. *Infect Immun*.
- Laan M, Bozinovski S, Anderson GP (2004) Cigarette smoke inhibits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory cytokines by suppressing the activation of activator protein-1 in bronchial epithelial cells. *J Immunol* 173:4164-4170.
- Lafontaine ER, Cope LD, Aebi C, Latimer JL, McCracken GH, Jr., Hansen EJ (2000) The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro. *J Bacteriol* 182:1364-1373.
- Lahn M, Sundell K, Kohler G (2006) The role of protein kinase C-alpha in hematologic malignancies. *Acta Haematol* 115:1-8.
- Lahn M, Su C, Li S, Chedid M, Hanna KR, Graff JR, Sandusky GE, Ma D, Niyikiza C, Sundell KL, John WJ, Giordano TJ, Beer DG, Paterson BM, Su EW, Bumol TF (2004) Expression levels of protein kinase C-alpha in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 6:184-189.
- Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Bren G, Paya CV, Moscat J (1999) Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol* 19:2180-2188.
- Larsson C (2006) Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal* 18:276-284.
- Leach KL, Powers EA, Ruff VA, Jaken S, Kaufmann S (1989) Type 3 protein kinase C localization to the nuclear envelope of phorbol ester-treated NIH 3T3 cells. *J Cell Biol* 109:685-695.
- Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T (2001) Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 166:5161-5167.
- Leitges M, Elis W, Gimborn K, Huber M (2001) Rottlerin-independent attenuation of pervanadate-induced tyrosine phosphorylation events by protein kinase C-delta in hemopoietic cells. *Lab Invest* 81:1087-1095.
- Leitges M, Plomann M, Standaert ML, Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Farese RV (2002) Knockout of PKC alpha enhances insulin signaling through PI3K. *Mol Endocrinol* 16:847-858.

- Li Y, Flanagan PM, Tschochner H, Kornberg RD (1994) RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* 263:805-807.
- Li Y, Martin LD, Spizz G, Adler KB (2001) MARCKS protein is a key molecule regulating mucin secretion by human airway epithelial cells in vitro. *J Biol Chem* 276:40982-40990.
- Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 17:62-70.
- Lin CH, Kuan IH, Lee HM, Lee WS, Sheu JR, Ho YS, Wang CH, Kuo HP (2001) Induction of cyclooxygenase-2 protein by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in human pulmonary epithelial cells: involvement of a nuclear factor-kappa B-dependent pathway. *Br J Pharmacol* 134:543-552.
- Liu WS, Heckman CA (1998) The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal* 10:529-542.
- Lopez AD, Mathers CD (2006) Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030. *Ann Trop Med Parasitol* 100:481-499.
- Lucas M, Sanchez-Margalet V (1995) Protein kinase C involvement in apoptosis. *Gen Pharmacol* 26:881-887.
- Lum H, Malik AB (1994) Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol* 267:L223-241.
- Lynch JJ, Ferro TJ, Blumenstock FA, Brockenauer AM, Malik AB (1990) Increased endothelial albumin permeability mediated by protein kinase C activation. *J Clin Invest* 85:1991-1998.
- MacNee W (2005) Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2:258-266; discussion 290-251.
- Mannino DM, Buist AS (2007) Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 370:765-773.
- Manolov T, Tan TT, Forsgren A, Riesbeck K (2008) Moraxella-dependent alpha1-antichymotrypsin neutralization: a unique virulence mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38:609-617.
- Martin LD, Rochelle LG, Fischer BM, Krunkosky TM, Adler KB (1997) Airway epithelium as an effector of inflammation: molecular regulation of secondary mediators. *Eur Respir J* 10:2139-2146.
- Martin TR, Frevert CW (2005) Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2:403-411.
- Masoud H, Perry MB, Richards JC (1994) Characterization of the lipopolysaccharide of *Moraxella catarrhalis*. Structural analysis of the lipid A from *M. catarrhalis* serotype A lipopolysaccharide. *Eur J Biochem* 220:209-216.
- Mastrorarde JG, Monick MM, Mukaida N, Matsushima K, Hunninghake GW (1998) Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. *J Infect Dis* 177:1275-1281.
- Mathers CD, Loncar D (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3:e442.
- McMichael JC (2000a) Vaccines for *Moraxella catarrhalis*. *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
- McMichael JC (2000b) Progress toward the development of a vaccine to prevent *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* infections. *Microbes Infect* 2:561-568.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91:295-298.
- Medzhitov R, Janeway C, Jr. (2000) Innate immunity. *N Engl J Med* 343:338-344.
- Meier PS, Troller R, Grivea IN, Syrogiannopoulos GA, Aebi C (2002) The outer membrane proteins UspA1 and UspA2 of *Moraxella catarrhalis* are highly conserved in nasopharyngeal isolates from young children. *Vaccine* 20:1754-1760.
- Mio T, Romberger DJ, Thompson AB, Robbins RA, Heires A, Rennard SI (1997) Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 155:1770-1776.
- Mizgerd JP (2008) Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med* 358:716-727.

- Mochly-Rosen D (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 268:247-251.
- Mogensen TH, Paludan SR, Kilian M, Ostergaard L (2006) Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *J Leukoc Biol* 80:267-277.
- Monick M, Staber J, Thomas K, Hunninghake G (2001) Respiratory syncytial virus infection results in activation of multiple protein kinase C isoforms leading to activation of mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 166:2681-2687.
- Moretto N, Facchinetti F, Southworth T, Civelli M, Singh D, Patacchini R (2009) alpha,beta-Unsaturated aldehydes contained in cigarette smoke elicit IL-8 release in pulmonary cells through mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296:L839-848.
- Morrison DC, Ulevitch RJ (1978) The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. *Am J Pathol* 93:526-617.
- Muegge K (2002) Preparing the target for the bullet. *Nat Immunol* 3:16-17.
- Mukaida N (2000) Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* 72:391-398.
- Mukaida N (2003) Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L566-577.
- Murayama T, Ohara Y, Obuchi M, Khabar KS, Higashi H, Mukaida N, Matsushima K (1997) Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. *J Virol* 71:5692-5695.
- Murphy TF (1996) *Branhamella catarrhalis*: epidemiology, surface antigenic structure, and immune response. *Microbiol Rev* 60:267-279.
- Murphy TF (2006) The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Infect Dis* 19:225-230.
- Murphy TF, Sethi S (1992) Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 146:1067-1083.
- Murphy TF, Sethi S, Niederman MS (2000) The role of bacteria in exacerbations of COPD. A constructive view. *Chest* 118:204-209.
- Murphy TF, Bakaletz LO, Smeesters PR (2009) Microbial interactions in the respiratory tract. *Pediatr Infect Dis J* 28:S121-126.
- Murphy TF, Brauer AL, Schiffmacher AT, Sethi S (2004) Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 170:266-272.
- Murphy TF, Brauer AL, Grant BJ, Sethi S (2005) *Moraxella catarrhalis* in chronic obstructive pulmonary disease: burden of disease and immune response. *Am J Respir Crit Care Med* 172:195-199.
- N'Guessan PD, Etouem MO, Schmeck B, Hocke AC, Scharf S, Vardarova K, Opitz B, Flieger A, Suttorp N, Hippenstiel S (2007) *Legionella pneumophila*-induced PKCalpha-, MAPK-, and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L267-277.
- N'Guessan PD, Hippenstiel S, Etouem MO, Zahlten J, Beermann W, Lindner D, Opitz B, Witzentrath M, Rosseau S, Suttorp N, Schmeck B (2006) *Streptococcus pneumoniae* induced p38 MAPK- and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L1131-1138.
- Nakanaga T, Nadel JA, Ueki IF, Koff JL, Shao MX (2007) Regulation of interleukin-8 via an airway epithelial signaling cascade. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L1289-1296.
- Nalefski EA, Newton AC (2001) Membrane binding kinetics of protein kinase C betaII mediated by the C2 domain. *Biochemistry* 40:13216-13229.

- Netea MG, van der Meer JW, van Deuren M, Kullberg BJ (2003) Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends Immunol* 24:254-258.
- Newton AC (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 270:28495-28498.
- Newton AC (2001) Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101:2353-2364.
- Newton AC (2003) Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* 370:361-371.
- Newton R, Hart LA, Stevens DA, Bergmann M, Donnelly LE, Adcock IM, Barnes PJ (1998) Effect of dexamethasone on interleukin-1beta-(IL-1beta)-induced nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and kappaB-dependent transcription in epithelial cells. *Eur J Biochem* 254:81-89.
- Nishizuka Y (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233:305-312.
- Nordstrom T, Blom AM, Forsgren A, Riesbeck K (2004) The emerging pathogen *Moraxella catarrhalis* interacts with complement inhibitor C4b binding protein through ubiquitous surface proteins A1 and A2. *J Immunol* 173:4598-4606.
- Nordstrom T, Blom AM, Tan TT, Forsgren A, Riesbeck K (2005) Ionic binding of C3 to the human pathogen *Moraxella catarrhalis* is a unique mechanism for combating innate immunity. *J Immunol* 175:3628-3636.
- Nowak D, Berger K, Lippert B, Kilgert K, Caeser M, Sandtmann R (2005) Epidemiology and health economics of COPD across Europe: a critical analysis. *Treat Respir Med* 4:381-395.
- Nowak D, Dietrich ES, Oberender P, Uberla K, Reitberger U, Schlegel C, Albers F, Ruckdaschel S, Welsch R (2004) [Cost-of-illness Study for the Treatment of COPD in Germany]. *Pneumologie* 58:837-844.
- Opitz B, Forster S, Hocke AC, Maass M, Schmeck B, Hippenstiel S, Suttorp N, Krull M (2005) Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydomydia pneumoniae*. *Circ Res* 96:319-326.
- Opitz B, Schroder NW, Spreitzer I, Michelsen KS, Kirschning CJ, Hallatschek W, Zahringer U, Hartung T, Gobel UB, Schumann RR (2001) Toll-like receptor-2 mediates *Treponema glycolipid* and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem* 276:22041-22047.
- Opitz B, Vinzing M, van Laak V, Schmeck B, Heine G, Gunther S, Preissner R, Slevogt H, N'Guessan PD, Eitel J, Goldmann T, Flieger A, Suttorp N, Hippenstiel S (2006) *Legionella pneumophila* induces IFNbeta in lung epithelial cells via IPS-1 and IRF3, which also control bacterial replication. *J Biol Chem* 281:36173-36179.
- Pace E, Ferraro M, Siena L, Melis M, Montalbano AM, Johnson M, Bonsignore MR, Bonsignore G, Gjomarkaj M (2008) Cigarette smoke increases Toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated responses in airway epithelial cells. *Immunology* 124:401-411.
- Page K, Li J, Zhou L, Iasvovskaia S, Corbit KC, Soh JW, Weinstein IB, Brasier AR, Lin A, Hershenson MB (2003) Regulation of airway epithelial cell NF-kappa B-dependent gene expression by protein kinase C delta. *J Immunol* 170:5681-5689.
- Park JA, Crews AL, Lampe WR, Fang S, Park J, Adler KB (2007) Protein kinase C delta regulates airway mucin secretion via phosphorylation of MARCKS protein. *Am J Pathol* 171:1822-1830.
- Parker PJ, Murray-Rust J (2004) PKC at a glance. *J Cell Sci* 117:131-132.
- Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA (2002) Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* 57:759-764.
- Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS (2001) Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1256-1276.

- Pearson MM, Lafontaine ER, Wagner NJ, St Geme JW, 3rd, Hansen EJ (2002) A hag mutant of *Moraxella catarrhalis* strain O35E is deficient in hemagglutination, autoagglutination, and immunoglobulin D-binding activities. *Infect Immun* 70:4523-4533.
- Peng D, Hong W, Choudhury BP, Carlson RW, Gu XX (2005) *Moraxella catarrhalis* bacterium without endotoxin, a potential vaccine candidate. *Infect Immun* 73:7569-7577.
- Pilette C, Ouadrhiri Y, Godding V, Vaerman JP, Sibille Y (2001) Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited. *Eur Respir J* 18:571-588.
- Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Du X, Thompson P, Chan EK, Ledesma J, Roe B, Clifton S, Vogel SN, Beutler B (1998) Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 24:340-355.
- Porat N, Apicella MA, Blake MS (1995) A lipooligosaccharide-binding site on HepG2 cells similar to the gonococcal opacity-associated surface protein Opa. *Infect Immun* 63:2164-2172.
- Rabe KF (2006) Guidelines for chronic obstructive pulmonary disease treatment and issues of implementation. *Proc Am Thorac Soc* 3:641-644.
- Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J (2007) Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 176:532-555.
- Raetz CR, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71:635-700.
- Rahman I, Adcock IM (2006) Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 28:219-242.
- Rahman M, Holme T (1996) Antibody response in rabbits to serotype-specific determinants in lipopolysaccharides from *Moraxella catarrhalis*. *J Med Microbiol* 44:348-354.
- Reddel RR, Ke Y, Kaighn ME, Malan-Shibley L, Lechner JF, Rhim JS, Harris CC (1988) Human bronchial epithelial cells neoplastically transformed by v-Ki-ras: altered response to inducers of terminal squamous differentiation. *Oncogene Res* 3:401-408.
- Reibman J, Talbot AT, Hsu Y, Ou G, Jover J, Nilsen D, Pillinger MH (2000) Regulation of expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human bronchial epithelial cells: roles of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* 165:1618-1625.
- Remick DG (2005) Interleukin-8. *Crit Care Med* 33:S466-467.
- Richman-Eisenstat JB, Jorens PG, Hebert CA, Ueki I, Nadel JA (1993) Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am J Physiol* 264:L413-418.
- Riffo-Vasquez Y, Pitchford S, Spina D (2000) Cytokines in airway inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 32:833-853.
- Roebuck KA (1999) Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 19:429-438.
- Romanova LY, Alexandrov IA, Nordan RP, Blagosklonny MV, Mushinski JF (1998) Cross-talk between protein kinase C-alpha (PKC-alpha) and -delta (PKC-delta): PKC-alpha elevates the PKC-delta protein level, altering its mRNA transcription and degradation. *Biochemistry* 37:5558-5565.
- Rosell A, Monso E, Soler N, Torres F, Angrill J, Riise G, Zalacain R, Morera J, Torres A (2005) Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 165:891-897.
- Rosseau S, Wiechmann K, Moderer S, Selhorst J, Mayer K, Krull M, Hocke A, Slevogt H, Seeger W, Suttrop N, Seybold J, Lohmeyer J (2005) *Moraxella catarrhalis*-infected alveolar epithelium induced monocyte recruitment and oxidative burst. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32:157-166.
- Saetta M, Turato G, Baraldo S, Zanin A, Braccioni F, Mapp CE, Maestrelli P, Cavallisco G, Papi A, Fabbri LM (2000) Goblet cell hyperplasia and epithelial inflammation in peripheral airways of smokers with both symptoms of chronic bronchitis and chronic airflow limitation. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1016-1021.

- San-Juan-Vergara H, Peeples ME, Lockey RF, Mohapatra SS (2004) Protein kinase C- α activity is required for respiratory syncytial virus fusion to human bronchial epithelial cells. *J Virol* 78:13717-13726.
- Schaefer M, Albrecht N, Hofmann T, Gudermann T, Schultz G (2001) Diffusion-limited translocation mechanism of protein kinase C isotypes. *Faseb J* 15:1634-1636.
- Schmeck B, Gross R, N'Guessan PD, Hocke AC, Hammerschmidt S, Mitchell TJ, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S (2004) Streptococcus pneumoniae-induced caspase 6-dependent apoptosis in lung epithelium. *Infect Immun* 72:4940-4947.
- Schmeck B, Moog K, Zahlten J, van Laak V, N'Guessan PD, Opitz B, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S (2006) Streptococcus pneumoniae induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1 -dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. *Respir Res* 7:98.
- Schmeck B, N'Guessan PD, Ollomang M, Lorenz J, Zahlten J, Opitz B, Flieger A, Suttorp N, Hippenstiel S (2007) Legionella pneumophila-induced NF- κ B- and MAPK-dependent cytokine release by lung epithelial cells. *Eur Respir J* 29:25-33.
- Schmeck B, Beermann W, van Laak V, Zahlten J, Opitz B, Witzenrath M, Hocke AC, Chakraborty T, Kracht M, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S (2005) Intracellular bacteria differentially regulated endothelial cytokine release by MAPK-dependent histone modification. *J Immunol* 175:2843-2850.
- Schmitz ML, Bacher S, Kracht M (2001) I κ B-independent control of NF- κ B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci* 26:186-190.
- Schulz C, Wolf K, Harth M, Kratzel K, Kunz-Schughart L, Pfeifer M (2003) Expression and release of interleukin-8 by human bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease, smokers, and never-smokers. *Respiration* 70:254-261.
- Sethi S (2005) Pathogenesis and treatment of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Semin Respir Crit Care Med* 26:192-203.
- Sethi S, Murphy TF (2001) Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev* 14:336-363.
- Sethi S, Surface JM, Murphy TF (1997) Antigenic heterogeneity and molecular analysis of CopB of Moraxella (Branhamella) catarrhalis. *Infect Immun* 65:3666-3671.
- Sethi S, Anzueto A, Farrell DJ (2005) Antibiotic activity of telithromycin and comparators against bacterial pathogens isolated from 3,043 patients with acute exacerbation of chronic bronchitis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 4:5.
- Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF (2002) New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 347:465-471.
- Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS (2006) Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 173:991-998.
- Sethi S, Muscarella K, Evans N, Klingman KL, Grant BJ, Murphy TF (2000) Airway inflammation and etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest* 118:1557-1565.
- Shapiro SD (2003) Proteolysis in the lung. *Eur Respir J Suppl* 44:30s-32s.
- Shuto T, Xu H, Wang B, Han J, Kai H, Gu XX, Murphy TF, Lim DJ, Li JD (2001) Activation of NF- κ B by nontypeable Hemophilus influenzae is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK α / β -I κ B α and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8774-8779.
- Siflinger-Birnboim A, Johnson A (2003) Protein kinase C modulates pulmonary endothelial permeability: a paradigm for acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L435-451.
- Slager RE, Allen-Gipson DS, Sammut A, Heires A, DeVasure J, Von Essen S, Romberger DJ, Wyatt TA (2007) Hog barn dust slows airway epithelial cell migration in vitro through a PKC α -dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L1469-1474.
- Slevogt H, Seybold J, Tiwari KN, Hocke AC, Jonatat C, Dietel S, Hippenstiel S, Singer BB, Bachmann S, Suttorp N, Opitz B (2007) Moraxella catarrhalis is internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and initiates a TLR2- and partly NOD1-dependent inflammatory immune response. *Cell Microbiol* 9:694-707.

- Slevogt H, Schmeck B, Jonatat C, Zahlten J, Beermann W, van Laak V, Opitz B, Dietel S, N'Guessan PD, Hippenstiel S, Suttorp N, Seybold J (2006) *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* 290:L818-826.
- Smaldone GC, Foster WM, O'Riordan TG, Messina MS, Perry RJ, Langenback EG (1993) Regional impairment of mucociliary clearance in chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 103:1390-1396.
- Smith WB, Gamble JR, Clark-Lewis I, Vadas MA (1991) Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology* 72:65-72.
- Song JC, Rangachari PK, Matthews JB (2002) Opposing effects of PKCalpha and PKCepsilon on basolateral membrane dynamics in intestinal epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1548-1556.
- Spencer VA, Sun JM, Li L, Davie JR (2003) Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* 31:67-75.
- Spurzem JR, Rennard SI (2005) Pathogenesis of COPD. *Semin Respir Crit Care Med* 26:142-153.
- St-Denis A, Chano F, Tremblay P, St-Pierre Y, Descoteaux A (1998) Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 273:32787-32792.
- Stockley RA, Hill AT, Hill SL, Campbell EJ (2000) Bronchial inflammation: its relationship to colonizing microbial load and alpha(1)-antitrypsin deficiency. *Chest* 117:291S-293S.
- Stoller JK (2002) Clinical practice. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 346:988-994.
- Strieter RM, Belperio JA, Keane MP (2002) Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest* 109:699-705.
- Strieter RM, Belperio JA, Keane MP (2003) Host innate defenses in the lung: the role of cytokines. *Curr Opin Infect Dis* 16:193-198.
- Sun SC, Ley SC (2008) New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol* 29:469-478.
- Sun Z, Arendt CW, Ellmeier W, Schaeffer EM, Sunshine MJ, Gandhi L, Annes J, Petrzilka D, Kupfer A, Schwartzberg PL, Littman DR (2000) PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404:402-407.
- Sykes A, Mallia P, Johnston SL (2007) Diagnosis of pathogens in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 4:642-646.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.
- Teruya H, Higa F, Akamine M, Ishikawa C, Okudaira T, Tomimori K, Mukaida N, Tateyama M, Heuner K, Fujita J, Mori N (2007) Mechanisms of *Legionella pneumophila*-induced interleukin-8 expression in human lung epithelial cells. *BMC Microbiol* 7:102.
- Toews GB (2001) Cytokines and the lung. *Eur Respir J Suppl* 34:3s-17s.
- Tourkina E, Gooz P, Pannu J, Bonner M, Scholz D, Hacker S, Silver RM, Trojanowska M, Hoffman S (2005) Opposing effects of protein kinase Calpha and protein kinase Cepsilon on collagen expression by human lung fibroblasts are mediated via MEK/ERK and caveolin-1 signaling. *J Biol Chem* 280:13879-13887.
- Travassos LH, Carneiro LA, Girardin SE, Boneca IG, Lemos R, Bozza MT, Domingues RC, Coyle AJ, Bertin J, Philpott DJ, Plotkowski MC (2005) Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 280:36714-36718.
- Tuder RM, McGrath S, Neptune E (2003) The pathobiological mechanisms of emphysema models: what do they have in common? *Pulm Pharmacol Ther* 16:67-78.
- Uemura Y, Kobayashi M, Nakata H, Kubota T, Saito T, Bandobashi K, Taguchi H (2005) Role of protein kinase C in expression of granulocyte-colony stimulating factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor in lung cancer cells. *Int J Mol Med* 16:873-881.

- Vardarova K, Scharf S, Lang F, Schmeck B, Opitz B, Eitel J, Hocke AC, Slevogt H, Flieger A, Hippenstiel S, Suttorp N, N'Guessan P D (2009) PKC(alpha) and PKC(epsilon) differentially regulate Legionella pneumophila-induced GM-CSF. *Eur Respir J* 34:1171-1179.
- Verduin CM, Hol C, Flier A, van Dijk H, van Belkum A (2002) *Moraxella catarrhalis*: from emerging to established pathogen. *Clin Microbiol Rev* 15:125-144.
- Vestbo J, Prescott E, Lange P (1996) Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 153:1530-1535.
- Vogelmeier C, Buhl R, Criege CP, Gillissen A, Kardos P, Kohler D, Magnussen H, Morr H, Nowak D, Pfeiffer-Kascha D, Petro W, Rabe K, Schultz K, Sitter H, Teschler H, Welte T, Wettengel R, Worth H (2007) [Guidelines for the diagnosis and therapy of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin]. *Pneumologie* 61:e1-40.
- Wagner S, Harteneck C, Hucho F, Buchner K (2000) Analysis of the subcellular distribution of protein kinase C α using PKC-GFP fusion proteins. *Exp Cell Res* 258:204-214.
- Wald ER (1992) Microbiology of acute and chronic sinusitis in children. *J Allergy Clin Immunol* 90:452-456.
- Wang F, Zhang XL, Zhou Y, Ye L, Qi Z, Wu J (2005) Type IVB piliated *Salmonella typhi* enhance IL-6 and NF- κ B production in human monocytic THP-1 cells through activation of protein kinase C. *Immunobiology* 210:283-293.
- Wang X, Moser C, Louboutin JP, Lysenko ES, Weiner DJ, Weiser JN, Wilson JM (2002) Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J Immunol* 168:810-815.
- Ways DK, Kukoly CA, deVente J, Hooker JL, Bryant WO, Posekany KJ, Fletcher DJ, Cook PP, Parker PJ (1995) MCF-7 breast cancer cells transfected with protein kinase C- α exhibit altered expression of other protein kinase C isoforms and display a more aggressive neoplastic phenotype. *J Clin Invest* 95:1906-1915.
- Webb PR, Wang KQ, Scheel-Toellner D, Pongracz J, Salmon M, Lord JM (2000) Regulation of neutrophil apoptosis: a role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase. *Apoptosis* 5:451-458.
- Wickremasinghe MI, Thomas LH, Friedland JS (1999) Pulmonary epithelial cells are a source of IL-8 in the response to *Mycobacterium tuberculosis*: essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF- κ B-dependent network. *J Immunol* 163:3936-3947.
- Wilkinson TM, Patel IS, Wilks M, Donaldson GC, Wedzicha JA (2003) Airway bacterial load and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1090-1095.
- Williams BR (2005) Dicing with siRNA. *Nat Biotechnol* 23:181-182.
- Wise RA, Kanner RE, Lindgren P, Connett JE, Altose MD, Enright PL, Tashkin DP (2003) The effect of smoking intervention and an inhaled bronchodilator on airways reactivity in COPD: the Lung Health Study. *Chest* 124:449-458.
- Woo CH, Lim JH, Kim JH (2005) VCAM-1 upregulation via PKC δ -p38 kinase-linked cascade mediates the TNF- α -induced leukocyte adhesion and emigration in the lung airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L307-316.
- Worth H, Buhl R, Cegla U, Criege CP, Gillissen A, Kardos P, Kohler D, Magnussen H, Meister R, Nowak D, Petro W, Rabe KF, Schultze-Werninghaus G, Sitter H, Teschler H, Welte T, Wettengel R (2002) [Guidelines for the diagnosis and treatment chronic obstructive bronchitis and pulmonary emphysema issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für pneumologie]. *Pneumologie* 56:704-738.
- Wyatt TA, Ito H, Veys TJ, Spurzem JR (1997) Stimulation of protein kinase C activity by tumor necrosis factor- α in bovine bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 273:L1007-1012.
- Wyatt TA, Heires AJ, Sanderson SD, Floreani AA (1999) Protein kinase C activation is required for cigarette smoke-enhanced C5a-mediated release of interleukin-8 in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:283-288.

- Xie H, Gu XX (2008) *Moraxella catarrhalis* lipooligosaccharide selectively upregulates ICAM-1 expression on human monocytes and stimulates adjacent naive monocytes to produce TNF- α through cellular cross-talk. *Cell Microbiol.*
- Yagi O, Aoshiba K, Nagai A (2006) Activation of nuclear factor- κ B in airway epithelial cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 73:610-616.
- Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, Narita N (1997) Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest* 112:505-510.
- Yang F, Haile DJ, Wang X, Dailey LA, Stonehuerner JG, Ghio AJ (2005) Apical location of ferroportin 1 in airway epithelia and its role in iron detoxification in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L14-23.
- Yang SR, Chida AS, Bauter MR, Shafiq N, Seweryniak K, Maggirwar SB, Kilty I, Rahman I (2006) Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF- κ B and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291:L46-57.
- Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A (2004) Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 125:626-632.
- Yoshida T, Tuder RM (2007) Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol Rev* 87:1047-1082.
- Yuan SY, Ustinova EE, Wu MH, Tinsley JH, Xu W, Korompai FL, Taulman AC (2000) Protein kinase C activation contributes to microvascular barrier dysfunction in the heart at early stages of diabetes. *Circ Res* 87:412-417.
- Zhang HP, Xu YJ, Zhang ZX, Ni W, Chen SX (2004) [Expression of protein kinase C and nuclear factor κ B in lung tissue of patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 43:756-759.
- Zhou L, Hershenson MB (2003) Mitogenic signaling pathways in airway smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol* 137:295-308.
- Zhou X, Yang W, Li J (2006) Ca²⁺- and protein kinase C-dependent signaling pathway for nuclear factor- κ B activation, inducible nitric-oxide synthase expression, and tumor necrosis factor- α production in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 281:31337-31347.
- Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127.

7. ANHANG

7.1 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Lily Qaiem Maqami, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Bedeutung der Protein Kinase C und ihrer Isoformen für die *Moraxella catarrhalis* induzierte IL-8 Sekretion“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 21.7.2010

7.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Hortense Slevogt für die herausragende engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit. Danken möchte ich ihr für die Bereitstellung des Themas, die Einführung in dieses Teilgebiet der Forschung, ihr offenes Ohr und ihre stets bestärkende Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Norbert Suttrop danke ich, dass ich die Möglichkeit erhielt, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe umsetzen zu dürfen.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Fakultät der Charité für die Bereitstellung des Promotionsstipendiums.

Herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Philippe Dje N Guessan, der mit seinen wertvollen Anregungen ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die freundschaftliche, produktive Zusammenarbeit zu jeder Tages- und Nachtzeit. Hierbei gilt mein Dank vor allem Frau Dr. Solveig Zabel, Frau Kremena Vardarova und Frau Amira Rejaibi.

Bei den medizinisch- technischen Assistentinnen Frau Jacqueline Hellwig und Frau Frauke Schreiber, möchte ich mich ganz herzlich für ihr Engagement, ihre Geduld und ihre Organisation bedanken.

Zuguterletzt ein ganz besonderes Dankeschön an meine Freunde und meine Familie: Frau Gwendolyn Billig für das Korrekturlesen, Herrn Benjamin Lackner für sein Verständnis und seine Geduld und vor allem meiner Mutter ohne deren vorbehaltlose Unterstützung die erfolgreiche Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

7.3 Lebenslauf

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

7.4 Publikationsverzeichnis

Publikation:

„Differential regulation of *Moraxella catarrhalis*- induced interleukin 8 response by protein kinase C isoforms“

H. Slevogt, **L. Maqami**, K. Vardarova, W. Beermann, A.C. Hocke, J. Eitel, B. Schmeck, A. Weimann, B. Opitz, S. Hippenstiel, N. Suttorp and P.D. N' Guessan

Eur Respir J 2008, 31: 725-735

Kongressbeitrag/ Abstract:

„Differential regulation of *Moraxella catarrhalis*- induced IL-8 response by PKC isoforms“

H. Slevogt, **L. Maqami**, K. Varadarova, S. Hippenstiel, N. Suttorp, P.D. N' Guessan

11th STS Meeting 2007 Signal Transduction- Receptors, Mediators and Genes, Weimar