

# Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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