

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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