

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN II  
PROF. DR. MED. G. RIEGGER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Etablierung eines zellkulturellen Modells zur Beurteilung der  
Pathogenität von *Haemophilus influenzae***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

von Marie-Christine Hahn

2010



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN II  
PROF. DR. MED. G. RIEGGER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Etablierung eines zellkulturellen Modells zur Beurteilung der  
Pathogenität von *Haemophilus influenzae***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von Marie-Christine Hahn

2010

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber  
1. Berichterstatter: PD Dr. Christian Schulz  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Jilg  
Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2011

# **Etablierung eines zellkulturellen Modells zur Beurteilung der Pathogenität von *Haemophilus influenzae*.**

	<b>Seite</b>
Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	7

## **1. Einleitung**

1.1	Risikofaktoren zur Entwicklung einer COPD	9
1.2	Modulatoren der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung	10
1.3	Der bakterielle Erreger <i>Haemophilus influenzae</i>	11
1.4	Molekulare Mechanismen der Pathogenese	15
1.5	Zielsetzung der Arbeit	16

## **2. Methodenteil und Material**

2.1	Zellkulturelles Arbeiten mit bronchialen Epithelzellen BEAS-2B	18
2.2	Bakterienkultur Nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i>	
	ATCC 49247	20
2.3	Bestimmung der MOI	21
2.4	Inaktivierung von <i>Haemophilus influenzae</i> (Stamm NTHi 29247)	22
2.5	Proteinpräparation von <i>Haemophilus influenzae</i> (bakt. Sonikate)	22
2.6	Sterile Filtrate	23
2.7	IL-8-ELISA	24
2.8	Konzentrations- und zeitabhängige Stimulation bronchialer Epithelzellen mit <i>Haemophilus influenzae</i>	24

2.9	Stimulation mit inaktivierten Haemophilus influenzae	26
2.10	Stimulation mit sterilfiltrierten bakteriellen Überständen	27
2.11	Stimulation mit gemischter bakterieller Proteinpräparation (Sonikaten)	27
2.12	Statistik	28
2.13	Auflistung der Reagenzien	28

	<b>Seite</b>	
<b>3. Ergebnisse</b>		
3.1	MOI- und Zeitabhängigkeit	30
3.2	Formalin-Inaktivierte NTHi und Interleukin-8 Produktion	35
3.3	Sterile Überstände und Interleukin-8 Produktion	37
3.4	Sonikate und Interleukin-8 Produktion	39
3.5	Gesamtergebnis	41
<b>4. Diskussion</b>		
4.1	Hochregulation von Interleukin-8	43
4.2	Bindung der Nontypeable Haemophilus influenzae an bronchoepitheliale Zellen	45
4.3	Bakterielle Proteinpräparationen	47
4.4	Intrazelluläre Aktivierung der Zellen und Therapiemöglichkeiten	49
<b>5. Zusammenfassung</b>	53	
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	55	
<b>7. Danksagung</b>	60	
<b>8. Lebenslauf</b>	61	

## Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest	Aqua destillata
Akt	Serin-Threonin Kinase
ATCC	American type cell culture collection
BAL	bronchoalveolare Lavage
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CFU	Colony forming Unit
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (-acid)
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Fetal Calf Serum
FEV <sub>1</sub>	forciertes Expirationsvolumen in der ersten Sekunde
FVC	forcierte Vitalkapazität bei schneller Expiration
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-colony stimulating factor
h	Stunden
Ig	Immunglobulin
IKK	IκB Kinase
IκBα	Inhibitor des NF-κB
IL	Interleukin
IU	International units
kDa	Kilo-Dalton
LOS	Lipooligosaccharid
MAP-Kinase p38 α/β	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MKK	MAP-Kinase Kinase
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	Multiplicity of infection
MUC 2, MUC5 AC	Gene zur Expression von Glycoproteinen (Muzine)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

NTHi	Nontypeable Haemophilus influenzae
NF-κB	nukleärer Faktor κB
OD	optische Dichte
OMP	outer membrane protein Ribotypisierung,
p	Abkürzung für Protein, in Verbindung mit einer Ziffer (z.B. 38) beschreibt sie dessen Molekulargewicht. p38 steht für ein Protein mit dem Molekulargewicht 38 kDa.
P6	Transmembranprotein 6
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pg	Picogramm
PI3K	Phosphat-Inositol 3 Kinase
P/S	Penicillin/Streptomycin
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
RNA	Ribonukleinsäure (-acid)
rpm	Rotations per minute
RPMI	Rooswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean
sec	Sekunde
Smad	Signalübertragungsprotein; die Abkürzung ist eine Fusion aus den Nematoden Genen SMA 2, 3 und 4 sowie dem Drosophilagen mad (mothers against decapentaplegic), unterschieden werden inhibitorische (I-), Rezeptor- (R-) SMAD und Co-SMADs
SO <sub>2</sub>	Schwefeldioxid
TAK1	TGF-β-aktivierte Kinase 1
TGF-β R	Transforming growth Factor-β-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrose Faktor α
TLR	Toll-like Rezeptor
U	Unit
usw.	und so weiter
v. a.	vor allem
vol/vol	Volumen pro Volumen
WHO	World Health Organisation
w/v	Gewicht pro Volumen
well	Vertiefung
z.B.	Zum Beispiel

## **1. Einleitung**

Eine chronisch obstruktive Bronchitis liegt laut Definition der WHO vor, wenn bei einem Patienten in zwei aufeinander folgenden Jahren während mindestens drei aufeinander folgenden Monaten pro Jahr produktiver Husten bestand. Bei diesen Patienten führt eine Infektion der unteren Atemwege zu einer signifikant schlechteren Erholung, mit potentiell anhaltender Einschränkung der Lungenfunktion. Als pathogene Keime kommen hier zum einen *Haemophilus influenzae* - oft gemeinsam mit Pneumokokken - *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella pneumoniae*, zum anderen Viren wie *Rhinovirus*, *Influenzaviren* oder *Adenoviren* und Mykoplasmen vor. Bei fortgeschrittenen schweren Fällen tritt zudem ein Wandel des Erregerspektrums ein, man findet zum Beispiel Enterobakterien, *Proteus* oder *Pseudomonas*. Besonders auffallend und in dieser Arbeit von besonderem Interesse sind Infektionen mit Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi), ein Bakterium, welches bei einem immunkompetenten Erwachsenen nur selten zu einer manifesten Erkrankung führt.

### 1.1 Risikofaktoren zur Entwicklung einer COPD

Eine wichtige Ursache zur Entwicklung einer chronischen Bronchitis stellt Tabakrauch dar, etwa 90 % der Bronchitiker sind Raucher oder Ex-Raucher. Allerdings entwickeln nur 20% der Zigarettenraucher eine COPD, so dass genetische Faktoren eine Rolle spielen müssen.

An zweiter Stelle der Ursachen steht die Luftverschmutzung durch Feinstaub oder Schwefeldioxid (SO<sub>2</sub>), vor allem im Bergbau.

Interessant ist, dass Kinder, die in einem Alter unter 14 Jahren an einer Bronchitis, Pneumonie oder Keuchhusten erkrankten, als Erwachsene niedrigere FEV<sub>1</sub>- und FVC-Werte (forciertes Expirationsvolumen in der ersten Sekunde und forcierte Vitalkapazität bei schneller Expiration) als vergleichbare gesunde Erwachsene zeigten. Das allein zeigt zwar noch keine pathologischen Auswirkungen, diese Personen sind aber auch anfälliger gegenüber den negativen Auswirkungen weiterer inhalativer Noxen wie Tabakrauch oder Luftverschmutzungen. Insgesamt weisen sie durchschnittlich kleinere Lungen auf – das Wachstum wird anscheinend gemindert (22). Die Ursache-Wirkungs-Beziehung ist dabei allerdings fraglich, da die Lunge nur in den ersten beiden Lebensjahren wesentlich an Größe zunimmt.

## 1.2 Modulatoren der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung

Die Infktionsexazerbation spielt als Modulator der COPD eine entscheidende Rolle. Als Krankheitserreger kommen wie oben bereits genannt vor allem Haemophilus influenzae, Moraxella catharralis und Streptococcus pneumoniae in Frage. Es wurde in Studien (12) in 40 bis 50% der Fälle eine Exazerbation der COPD aufgrund der bakteriellen Besiedlung und daraus resultierender Infektion festgestellt. Genutzt wurden die folgenden Nachweismethoden: Die bronchoalveolare Lavage (= BAL) zeigte eine bakterielle Infektion bei ca. 50 % der Patienten mit Exazerbation der COPD im Vergleich zur Kontrollgruppe (Patienten mit stabiler COPD). Gemessen wurden Unterschiede bei Neutrophilen- und Lymphozytenzahl sowie bei Lysozym-Mengen. Auf molekularer Ebene wurden die Oberflächen-Antigene der Erreger in

einer longitudinalen Studie erfasst, um unterschiedliche Stämme von Haemophilus unterscheiden zu können, und zu entscheiden, wie es zu einer Exazerbation kommen kann. Dabei kam heraus, dass Haemophilusstämme, die eine Verschlechterung der COPD auslösen signifikant höhere Adhärenz an Epithelzellen und größerer Mengen Ausschüttung von Interleukin 8 zeigen (15).

Eine prospektive Studie (22), in welcher Bakterienisolate von Patienten mit COPD untersucht wurden, zeigte, dass der Erwerb eines neuen Stamms von NTHi, M. catarrhalis oder S. pneumoniae mit einem deutlich erhöhten Risiko einer Exazerbation verbunden ist. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass stamm-spezifische Immunantworten auf pathogene Keime auftreten, und keine generelle Immunität gegenüber dem Erreger zu erwarten ist. Dies erklärt zumindest teilweise die rezidivierenden Infektionen bei COPD-Patienten bei gleich bleibendem Erregerspektrum. Patel et al. (17) untersuchten Symptome, Sputum-Kulturen und Exazerbationsraten und stellten fest, dass Besiedlung des unteren Respirationstrakts während der stabilen Phase den Charakter und die Häufigkeit von Exazerbationen bei COPD verändert. Eine Erklärung für diese Feststellung konnten sie jedoch nicht finden.

### 1.3 Der bakterielle Erreger Haemophilus influenzae

Haemophili influenzae sind kleine ( $1 \times 0,3 \mu\text{m}$ ), nicht-sporenbildende, gramnegative Bakterien. Das Bakterium benötigt Wachstumsfaktoren, die von Erythrozyten bereitgestellt werden können, daher erhielt es den Namen Haemophilus („Blutliebend“). Neben den nontypeable Haemophilus influenzae gibt es sechs Typen, die mittels ihrer Kapsel klassifiziert werden können (Typ A bis F). Die

Fähigkeit zur Ausbildung einer Kapsel ist von Bedeutung für die Klinik, da sie einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt. *Haemophilus influenzae* Typ B ist der wichtigste Keim der kapseltragenden Gruppe.

Manifestationen einer Infektion mit *Haemophilus influenzae* Typ B zeigen sich in multiplen Krankheitsbildern. Die schwerste Manifestation ist mit Sicherheit die akute Meningitis, welche vor allem bei Kindern unter 2 Jahren auftritt. Häufig geht dieser eine Infektion des oberen Respirationstraktes voraus. Die klinischen Symptome sind Fieber und Defizite des zentralen Nervensystems, wobei eine Nackensteife oft fehlt. Bei Fortschreiten der Infektion treten epileptische Anfälle oder Koma auf, fulminante Formen können mit dem Tod des Kindes innerhalb weniger Stunden enden. In den meisten Fällen entwickelt sich die Infektion allerdings über mehrere Tage, beginnend mit einer milden Infektion der Atemwege, gefolgt von einer ausgeprägten Verschlechterung des Allgemeinzustandes, fokalen oder generalisierten epileptischen Anfällen, Hemiparese oder anderen neurologischen Ausfällen sowie einer gespannten vorderen Fontanelle als Zeichen des gesteigerten Hirndrucks. Die Mortalität bei optimaler Therapie liegt bei weniger als 5 %, viele der Patienten behalten allerdings Residuen für den Rest ihres Lebens.

Eine weitere lebensgefährliche Manifestation ist die Epiglottitis, die eine akute und fulminante Obstruktion der Atemwege darstellt. Auch hier sind die Patienten meist zwischen zwei und sieben Jahren alt. Klinisch zeigen sich Halsschmerzen, Fieber, und Dyspnoe, die sich rasend schnell zu einer Dysphagie entwickelt. Innerhalb weniger Stunden tritt eine Verschlechterung auf, die ohne adäquate Therapie zum Tod des Patienten durch Sauerstoffmangel und fulminanter Sepsis führt. Mildere Formen der Epiglottitis können sich über 7 Tage hinziehen, bevor es zur akuten Verschlechterung kommt.

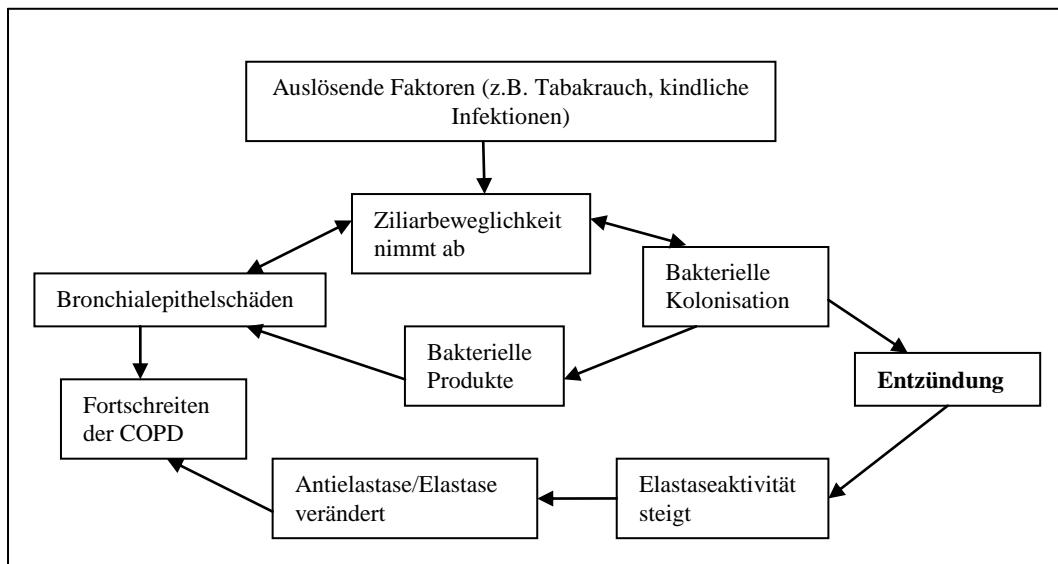
In der Pädiatrie manifestieren sich Infektionen mit *Haemophilus influenzae* Typ B des Weiteren durch Pneumonien, septische Arthritiden sowie Bakteriemien ohne Fokus.

Nontypeable *Haemophilus influenzae* - Stämme (NTHi), die keine Kapsel bilden können, sind keine Variation, sondern eine genetisch eigenständige Form. Sie sind in ihren Genotypen sehr viel heterogener als die kapselbildenden Bakterien. Dementsprechend vielfältig sind die klinischen Manifestationen: Otitis media (25 % aller Fälle durch NTHi), Exazerbationen einer COPD, Sinusitis, neonatale bzw. postpartale Sepsis und Konjunktivitis sind die Wichtigsten.

Im oberen Atmungstrakt sind die NTHi Teil der Normalflora, im Zusammenhang mit chronischer Bronchitis finden sie sich auch im unteren Respirationstrakt - allerdings handelt es sich um einen dynamischen Prozess, bei dem es zu periodischen Wechseln der Stämme kommt. Die Typisierung kann hierbei über OMP (= outer membrane protein), Restriktionsendonuklease, Elektrophorese, RAPD (= randomly amplified polymorphic DNA), Ribotypisierung, PCR (= Polymerase chain reaction) und Pulsfeldelektrophorese erfolgen. All diese Untersuchungen tragen zur Klärung der Frage bei, ob bei Erwerb eines neuen Stamms auch eine Verschlechterung der COPD eintritt.

NTHi wurde lange als ein extrazellulärer Keim betrachtet, basierend auf der Bindung an Muzin und der Adhärenz an bronchiale Epithelzellen. Neuere Erkenntnisse (3,4) zeigen, dass es sowohl extra- als auch intrazelluläre Nischen des Keims gibt. *Haemophilus influenzae* bindet danach über seine Oberflächenmembran-Proteine, beispielsweise OMP 2, 5 und 6, an Muzin der Epithelzellen und dringt so in diese ein (22). Diese Membranproteine unterliegen häufig Punktmutationen, die das Bakterium gegen die Immunabwehrreaktion des menschlichen Körpers resistent machen. Außerdem sind die intrazellulären Bakterien vor einer antibiotischen Behandlung

geschützt. Direkt folgt daraus eine chronische Entzündung, indirekt wird der schädigende Effekt von beispielsweise Tabakrauch verstärkt. Hieraus resultiert dann eine anhaltende Epithelzellaktivierung mit prolongierter Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Die Auswirkungen sind Bronchokonstriktion, erhöhte Schleimproduktion und Epitheldurchlässigkeit, dargestellt in Abb. 1.



**Abb.1** Teufelskreistheorie

Bei diesem Teufelskreis nimmt die Ziliarkarbidigkeit ab, es wird mehr Schleim gebildet – im Zusammenwirken mit Tabakrauch führt das zur Persistenz der Bakterien. Daraus resultieren wiederum Epithelschäden und Ausschüttung erhöhter Mengen an proinflammatorischen Zytokinen, verantwortlich v. a. für neutrophile Chemotaxis (22).

Nachgewiesen wurden die intrazellulären Bakterien und das Eindringen über Hybridisation und Immunofluoreszenz-Mikroskopie. Intrazelluläre Bakterien wurden bei keinem gesunden Probanden gefunden, jedoch bei etwa einem Drittel der stabilen COPD-Patienten und bei etwa 85% der Patienten mit exazerbierter COPD – diese Beobachtung bestätigt den Verdacht einer intrazellulären Infektion bei der Pathogenese der Exazerbation. Es zeigt außerdem, dass *H. influenzae* die Ursache

von Exazerbationen sein kann, auch wenn kein Nachweis des Bakteriums im Sputum erfolgen konnte.

#### 1.4 Molekulare Mechanismen der Pathogenese

Zu Beginn dieser Arbeit war zur Pathogenese und den Wechselwirkungen zwischen NTHi und Wirtszelle nicht viel bekannt, mittlerweile gibt es ein paar interessante Erkenntnisse.

Das Bakterium exprimiert verschiedene Adhäsine, deren Expression unterschiedlichen Regulationen unterliegen. Interaktionen mit extrazellulären Matrixproteinen wie Vitronektin, Laminin und Kollagen IV spielen wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Kolonisation des Respirationstrakts. In einer Studie (27) wurden die Gene des NTHi während der Interaktion mit epithelialen Zellen des Bronchialsystems charakterisiert. Verschiedene Gengruppen konnten unterschieden werden, darunter Gene für metabolische Prozesse, Stress-Antwort und Zellhüllens-Biosynthese. Des Weiteren wurden einige Gene ohne bekannte Funktion vermehrt exprimiert.

Die Lipooligosaccharide (LOS) der NTHi spielen vermutlich eine wesentliche Rolle für Adhärenz, Pathogenese und Wirt-Antwort. Viele Studien untersuchten bereits die Struktur und die Biosynthese dieser Moleküle, momentan wird ihre komplexe Rolle bei der Kolonisation untersucht. Es konnte gezeigt werden (26), dass die Acetylierung von Lipid A eine wichtige Rolle in der Kolonisation spielt, und dass die Acetylierung von LOS die humane Abwehrempfindlichkeit beeinflusst, indem es sowohl die Fähigkeit der Kolonisation als auch die der Invasion verändern kann (24). Die LOS verändern ihre Struktur durch Acetylierungen, Inkorporation von Cholinen

und Schwefelbrückenbindungen und beeinflussen dadurch die Interaktion zwischen Wirt und Mikroben – die genauere Untersuchung dieser Mechanismen könnte dazu beitragen, neue Strategien zur Prävention der Kolonisation zu etablieren.

Der Schritt von der Kolonisation, also der Besiedelung des Wirts ohne dass es zu einer Krankheit kommt, zur Infektion – der manifesten Krankheit mit typischen Symptomen wie Fieber - erfolgt durch lokale Invasion der Schleimhäute - nicht wie bei *Haemophilus influenzae* Typ B, welches sich über die Blutbahn ausbreitet. Bei einer durch NTHi ausgelösten Otitis media breitet sich das Bakterium direkt vom Nasopharynx über die Eustach'sche Röhre bis in das Ohr aus. Bei Patienten mit COPD, die eine chronische Kolonisation mit *Haemophilus* zeigen, kommt es zu einer Infektion, wenn bisher weitgehend unbekannte Faktoren das Verhältnis von Wirt und Keim stören.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die bisher genannten Informationen geben Anlass, die Interaktion zwischen NTHi und bronchialen Epithelzellen genauer zu untersuchen und sind die Grundlage zu dieser Doktorarbeit. Zu Beginn war geplant, zellkulturelle Bedingungen, unter denen das Bakterium eine epitheliale Immunantwort hervorrufen kann, zu testen. Es sollten verschiedene Versuchsbedingungen geschaffen werden, um Faktoren, die von der Kolonisation zur Infektion führen, zu identifizieren.

In einem weiteren Schritt sollten verschiedene Stämme des nicht typisierbaren *Haemophilus influenzae* auf Unterschiede der Entzündungsreaktion hin untersucht

werden. Letzteres bildete die Basis einer zweiten Doktorarbeit, die noch nicht vollendet wurde.

Zielsetzung der Arbeit war die Entwicklung eines zellkulturellen Modells an bronchialen Epithelzellen zur Untersuchung der Pathogenität einzelner Isolate von *Haemophilus influenzae*.

Als Marker für die Stärke der Entzündungsreaktion wurde Interleukin 8 eingesetzt, ein proinflammatorisches Regulatorprotein. Dieses Protein spielt eine Hauptrolle in der Immunantwort indem es neutrophile Granulozyten im entzündeten Gewebe rekrutiert.

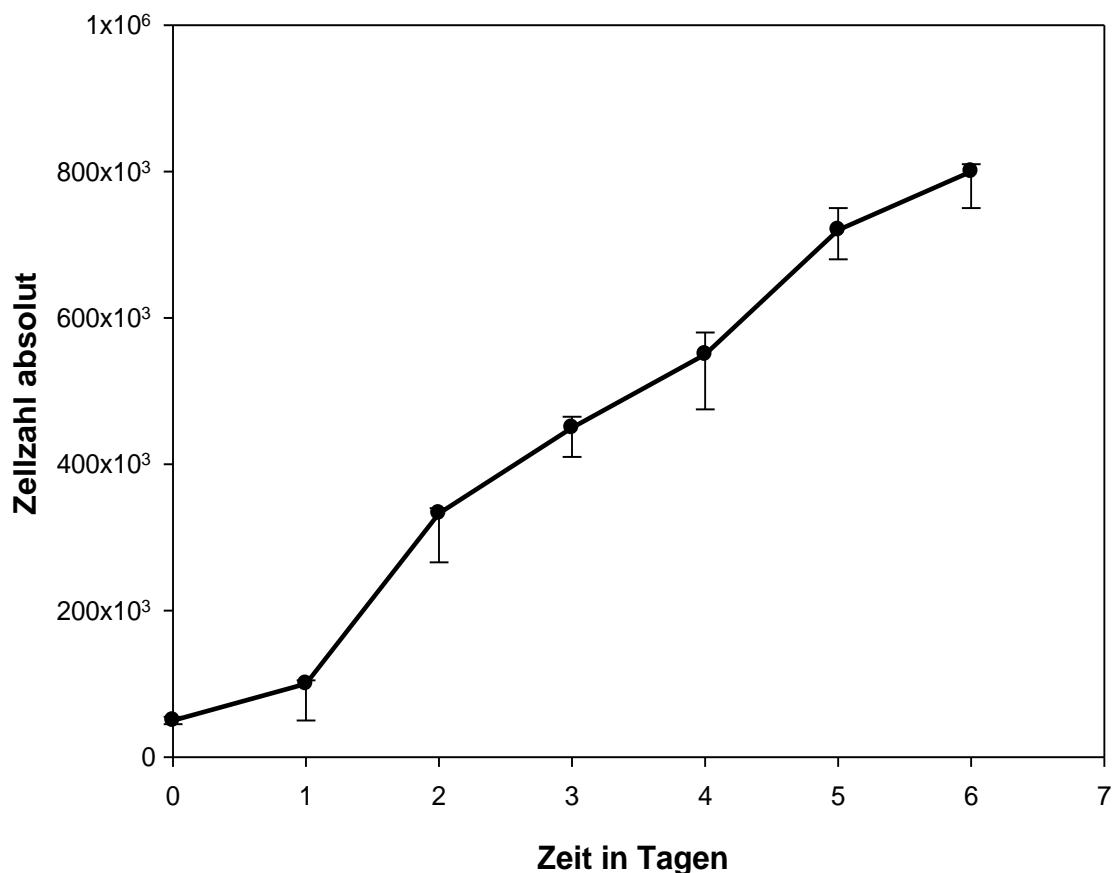
## **2. Methodenteil und Material**

### 2.1 Zellkulturelles Arbeiten mit BEAS-2B

Die bronchoepitheliale Zelllinie BEAS-2B stammt von einer normalen menschlichen bronchialen Epithelzelle, welche durch Transformation mit SV40-Adenoviren immortalisiert wurde, ab (American Type Culture Collection, Rockville, MD, 21). Werden diese Zellen fetalem Rinderserum ausgesetzt, induziert dies die Ausdifferenzierung in bronchiale Epithelzellen. Diese Zellen eignen sich sehr gut für zellkulturelles Arbeiten, da sie auch nach vielen Passagen unveränderte Eigenschaften aufweisen. Die Zellenlinie BEAS-2B wurde kultiviert in mit Kollagen beschichteten Kulturflaschen ( $75 \text{ cm}^3$ , Sarstedt) in 15 ml Medium RPMI 1640, versetzt mit 10% fetalem Rinderserum und 1% der Antibiotika Penicillin und Streptomycin (= P/S). Sie wurden in einem Brutschrank bei  $37^\circ \text{ C}$  und 5%-CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Bei einer Zelldichte von etwa 75% wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurden sie mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in gepufferter Salzlösung PBS, Ca- und Mg-Ionenfrei) 1 Minute angedaut, resuspendiert in 10 ml RPMI 1640, zentrifugiert für 10 Minuten bei 1200 RPM (= Rotations per minute) und Raumtemperatur (= RT), erneut suspendiert in 15 ml frischem Medium und mit einer Zelldichte von etwa 100.000 Zellen pro Flasche neu ausgesät. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt, zur Berechnung der Zellzahl pro Milliliter in der Kulturflasche wurde folgende Formel genutzt:

$$\text{Mittelwert der 4 Quadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000 = \text{Zellzahl/ml}$$

Vor der Stimulation mit NTHi wurden je 50.000 Zellen pro Well in einer kollagenbeschichteten Six-Well-Platte (Sarstedt) ausgesät. Es wurden jeweils 3 ml komplettes Medium RPMI 1640 zugefügt. Nach 36 Stunden bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> waren die Platten zu 60% (300.000 Zellen/Well) bewachsen. Dieses Wachstumsverhalten wurde mit Hilfe einer Wachstumskurve ermittelt.



**Abb.2:** Wachstumskurve der BEAS-2B-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n = 5 Einzelexperimenten +/- Standardabweichung.

Die Bakterien konnten dann mit den NTHi stimuliert werden. Dazu wurde während der Dauer des Versuchs das reguläre Nährmedium durch 3ml Medium RPMI 1640 ohne Antibiotikazusatz ersetzt. Nach der Einwirkdauer der Bakterien von 30 bzw. 60 Minuten wurden 3 ml RPMI 1640, versetzt mit 1 % Penicillin und Streptomycin, 0,05 % Ciprofloxacin sowie 10% fetalem Rinderserum (= FCS) in die Six-Well-Platten gegeben.

## 2.2 Bakterienkultur NTHi ATCC 49247 und Wachstumsbedingungen

Der NTHi-Stamm 49247 (ATCC) ist ein Isolat eines 76jährigen Patienten mit Pneumonie. Er wurde im Januar 1984 aus dem Sputum dieses Patienten isoliert. Er wird unter anderem zur Qualitätskontrolle für Antibiotika-Streifen genutzt.

Das Bakterium benötigt zum Wachstum zwei Wachstumsfaktoren, die als X- und V-Faktor bezeichnet werden. Diese beiden Faktoren enthalten nicht eine einzelne Substanz. X-Faktor enthält ein hitzeresistentes eisenhaltiges Pigment, welches Protoporphyrine, notwendig zur Katalase, Peroxidase und Zytochromierung der Elektronentransportkette, beinhaltet. V-Faktor ist ein hitzebeständiges Koenzym, welches aus Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP) oder aus Nikotinamid-Nukleotid stammen kann. Diese Stoffe sind in Erythrozyten enthalten, sie müssen aber, um das Wachstum der Bakterien zu ermöglichen, aus den Zellen freigesetzt sein. Aus diesem Grund wird Kochblutagar zur Kultivierung verwendet. Das Bakterium wächst auf diesem Agar (auch „Schokoladenagar“ genannt) bei 5% CO<sub>2</sub> und einer Temperatur von 37° C im Brutschrank. Alle 36 Stunden wurden die Platten überimpft.

## 2.3 Bestimmung der MOI

Eine MOI (= Multiplicity of Infection) entspricht der Anzahl der pathogenen Keime, die auf eine Epithelzelle kommen, also bedeutet MOI 10, dass auf eine Epithelzelle zehn Bakterien kommen.

Es wurde die nephelometrische Methode nach McFarland genutzt um Bakterienmengen zu bestimmen. Der McFarland-Standard (eine Barium-Sulfat-Trübung) dient der Einstellung der Keimdichte (Kolonie bildenden Einheiten = CFU/ml) einer Bakteriensuspension. Es wird zur Herstellung des McFarland-Standard 0,5 (gemessen mit Licht einer Wellenlänge von 600 nm) eine Lösung mit 0,05 ml 1%-iger Bariumchlorid-Lösung und 9,95 ml 1%-iger Schwefelsäure hergestellt, deren Trübungsgrad mit den Bakteriensuspensionen verglichen wurde. Mit einer sterilen Öse wird eine Bakterienkolonie von einer Platte genommen und in 1000 µl PBS suspendiert. Die Bakteriensuspension wird durch Hinzufügen von PBS auf die gleiche Dichte wie der McFarland-Standard 0,5 eingestellt. Sie enthält  $10^8$  Haemophilus/ml. Von dieser ersten Suspension werden 100 µl in 900 µl PBS gelöst, aus diesem Gemisch dann erneut 100 µl in wiederum 900 µl PBS usw., sodass in jedem Gefäß ein Mischungsverhältnis von 1/10 vorliegt. Aus den Verdünnungsstufen werden jeweils 100 µl auf Kulturplatten ausgestrichen und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wird die Anzahl der Kolonien einer Platte ausgezählt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Ausgangskonzentration der Bakterienlösung zu bestimmen.

<b>Verdünnungsreihe der Bakteriensuspension</b>	<b>Bakterienanzahl/100µl (CFU)</b>
OD <sub>600</sub> 0,5	10 <sup>8</sup> /ml (per Definition)
10 <sup>0</sup>	4x10 <sup>6</sup> /100µl
10 <sup>-1</sup>	400.000/100µl
10 <sup>-2</sup>	40.000/100µl
10 <sup>-3</sup>	4000/100µl
10 <sup>-4</sup>	400/100µl
10 <sup>-5</sup>	25/100µl
10 <sup>-6</sup>	1/100µl

**Tab.1.** Verdünnungsreihe ausgehend von einem McFarland 0,5 bei einer OD von 600 nm. Dies entspricht laut Definition einer Bakterienkonzentration von 10<sup>8</sup> /ml. Von den Verdünnungen wurden jeweils 100 µl auf eine Kochblutagarplatte pipettiert und ausgestrichen, nach einer Wachstumszeit von 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die CFU ausgezählt bzw. hochgerechnet. Dies bildet die Grundlage zur Bestimmung der MOI.

## 2.4 Inaktivierung von Haemophilus influenzae (Stamm NTHi 29247)

NTHi wurde für die Dauer von 24 Stunden in eine Lösung 0,3%iges Formalin gegeben, die Konzentration der Bakterien wurde nach McFarland auf 0,5 OD<sub>600</sub> eingestellt. Nach einem Tag wurden die Bakterien drei Mal mit PBS gewaschen, dazu wurden sie bei 5000 RPM 5 Minuten lang abzentrifugiert.

Die erhaltenen abgetöteten Bakterien wiesen auf Kochblutagar kein Wachstum mehr auf. Sie wurden in Aliquots bei -80° C aufbewahrt und jeweils für die Versuchsreihen aufgetaut.

## 2.5 Proteinpräparation von Haemophilus influenzae (bakterielle Sonikate)

Zwei gut mit Haemophilus influenzae bewachsene Platten (48-Stunden-Kultur) wurden in 5 ml PBS eingerührt und auf Eis in 5ml Falcon-Tubes gestellt. Danach

wurden die Lösungen bei 5000 RPM für 7 Minuten zentrifugiert, resuspendiert in 2 ml PBS und in einer Verdünnung von 1/10 wurde die optische Dichte gemessen. Alle Suspensionen wurden auf einen McFarland-Standard 5 (600 nm) eingestellt, indem das entsprechende Volumen in die Falcon-Tubes gefüllt wurde. Die erhaltene Suspension wurde wieder bei 5000 RPM für 7 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 400 µl steriles Wasser resuspendiert, dadurch wurden die Bakterienwände osmotisch aufgelöst. Es folgte die Behandlung mit Ultraschall (auf Eis), je 2 Minuten bei einer Intensität von 80 Watt – das ganze wurde pro Versuchsansatz zweimal durchgeführt. In der Zwischenzeit wurden die Proben auf Eis gelagert. Die Sonikate wurden bei 14000 RPM und Raumtemperatur 20 Minuten lang zentrifugiert. Der erhaltene Überstand entsprach einem gemischten Proteinextrakt (Membranproteine und zytosolische Proteine) und wurde nach dem Protein-Test nach Lowry auf seinen Proteingehalt getestet. Die Aliquots wurden bei -80°C eingefroren.

## 2.6 Sterile Filtrate

Die sterilen Filtrate wurden aus NTHi 49247 hergestellt. Die Bakterien der Konzentration MOI 10 wurden mit 0,3 Prozentigem Formalin abgetötet, für 24 Stunden in PBS in Falcon-Tubes bei Zimmertemperatur belassen. Anschließend wurden sie zentrifugiert bei 5000 RPM und durch sterile Filter (Minisart sartorius) der Porengröße 0,20 µm geschickt. Die erhaltene Lösung zeigte nach Auftragen auf Kochblutagar nach 48 Stunden kein Wachstum. Die Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt und innerhalb weniger Wochen verwendet.

## 2.7 Interleukin-8 ELISA

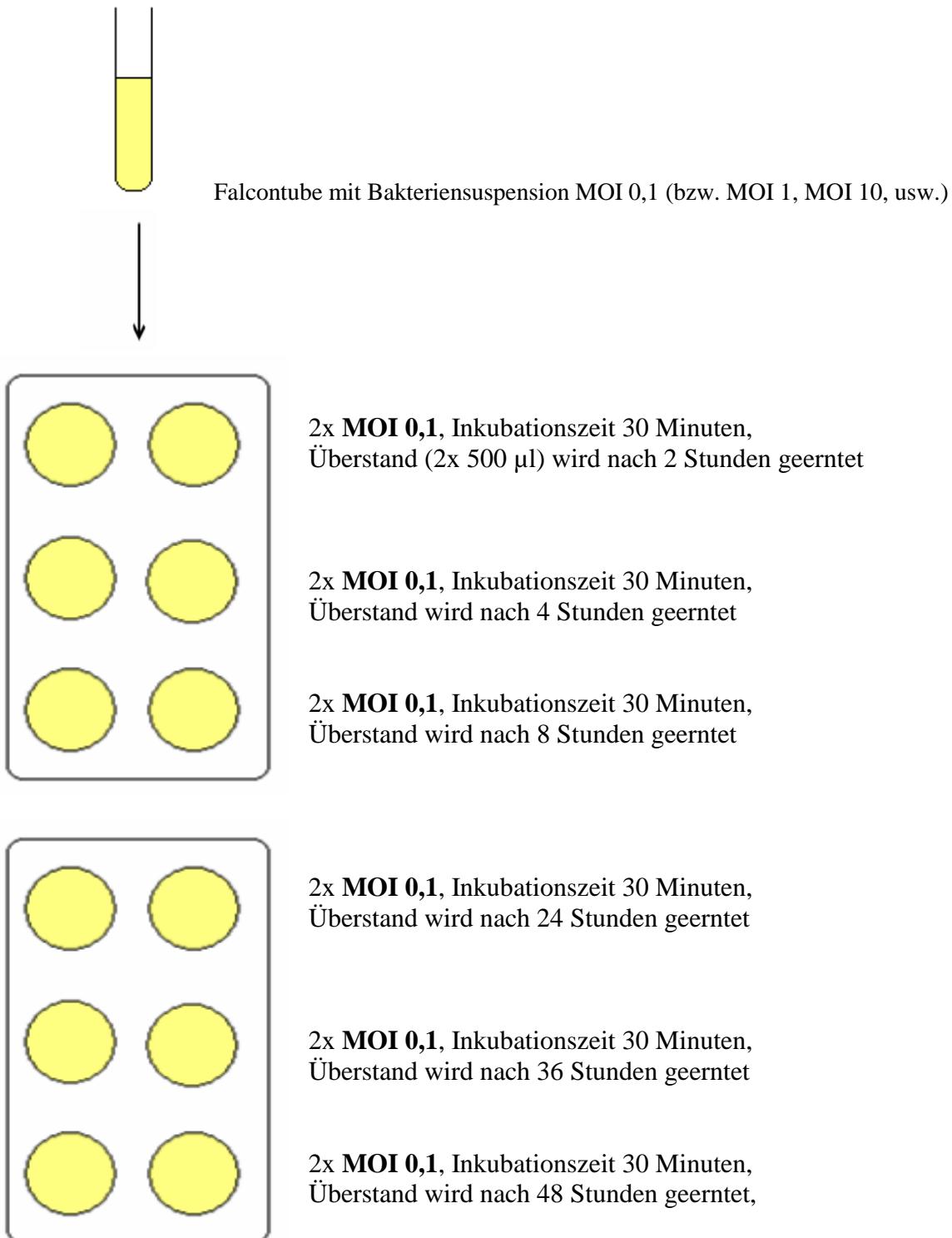
Es wurde ein Endogen Human Interleukin-8 ELISA (EH2-IL8) verwendet. Die Proben wurden in Duplikaten auf 96 Wells aufgetragen, als Negativ-Probe wurde destilliertes Wasser (Aqua dest.) eingesetzt. Als Standard-Verdünnungsmittel kam ebenfalls destilliertes Wasser zum Einsatz. Nach einer Inkubation von 1 Stunde wurde die Platte drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Es wurden 50 µl des biotynilierten Antikörpers zugefügt, die Antikörper wurden ebenfalls 1 Stunde auf der Platte belassen. Nach dreimaligem Waschen wurden 100µl Streptavidin-Lösung aufgetragen. Nach 30 Minuten erfolgte ein Waschschnitt, danach wurden 100µl TMB (= Tetramethylbenzidin) Substratlösung hinzugefügt. Die Reaktion wurde nach 30 Minuten in Dunkelheit durch Zugabe von 100µl Stopplösung angehalten. Die Absorption wurde in einem Standard ELISA-Reader bei 450 und 550 nm gemessen. Die Daten wurden anschließend mit den Programmen Sigma-Plot und Sigma-Stat analysiert.

## 2.8 Konzentrations- und zeitabhängige Stimulation bronchialer Epithelzellen

Im ersten Versuch wurden die bronchialen Epithelzellen mit verschiedenen Konzentrationen und für verschiedene Inkubationszeiten mit NTHi stimuliert. Es wurden MOIs von 0,1; 1; 10; 25 und 100 eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug für jede MOI 30 und 60 Minuten (siehe Skizze zum Versuchsaufbau).

## Versuchsaufbau:

NTHi gelöst in PBS, in einer Konzentration von MOI 0,1. Es werden je 0,66 µl der Lösung auf die Six-Well-Platten pipettiert.



Six-Well-Platten mit je 2 Wells unter den gleichen Versuchsbedingungen. Die Wells enthalten je 300.000 BEAS-2B Zellen, 3 ml RPMI-Medium und 66 µl der Bakterienlösung.

**Abb.3:** Versuchsaufbau der MOI- und Zeitabhängigkeit. Es wurden alle weiteren Versuche nach dem gleichen Aufbau durchgeführt.

Nach der Inkubationszeit wurden die Bakterien samt des Nährmediums aus den Wells abgesaugt, die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 3ml kompletten Medium RPMI 1640, versetzt mit Penicillin, Streptomycin und Ciprofloxacin, aufgefüllt. Dieser Zeitpunkt entsprach dem Punkt Null. In Zeitabständen von 2, 4, 8, 24, 36 und 48 Stunden wurden Überstände (2 x 500 µl) aus den Wells entnommen, für zehn Minuten bei RPM 2000 zentrifugiert, und in Eppendorfcups bei -20 °C aufbewahrt. Kurze Zeit später wurden die Interleukin-8 ELISA durchgeführt und die restlichen Proben auf Dauer bei -80°C gelagert. Als Negativprobe wurden die Überstände von unbehandelten Epithelzellen verwendet. Eine Positiv-Kontrolle erfolgte bei jeder Versuchsreihe durch Stimulation mit 10 µg/ml TNF-α.

## 2.9 Bronchialepitheiale Stimulation mit inaktivierten Haemophilus influenzae

Es wurden bronchiale Epithelzellen mit der MOI 10 und abgetöteten NTHi der gleichen Konzentration für 60 Minuten behandelt. Außerdem wurden abgetötete NTHi der MOI 10 für 24 Stunden auf den Epithelzellen gelassen, der Mediumwechsel zu antibiotikahaltiger Nährlösung entfiel hierbei. Als Negativkontrolle wurde komplettes Nährmedium benutzt, als Positiv-Probe TNF $\alpha$  (10 µg/ml). Der Überstand wurde nach 4, 8 und 24 Stunden entnommen.

## 2.10 Stimulation mit sterilfiltrierten bakteriellen Überständen

Es wurden alle Versuchbedingungen der vorangegangenen Versuche übernommen. Zusätzlich wurden die sterilen Filtrate der NTHi in MOI 10 für 24 Stunden in den Wells belassen. Ein Mediumwechsel wurde nur bei den lebenden Bakterien und bei der Negativkontrolle durchgeführt, die Überstände wurden nach 4, 8 und 24 Stunden entnommen. Als Negativ-Kontrolle wurde Nährmedium, als Positiv-Kontrolle abgetötete NTHi in der Konzentration MOI 10 eingesetzt.

## 2.11 Bronchialepitheiale Stimulation mit Proteinpräparation von Haemophilus influenzae (Sonikate)

Die Sonikate wurden in den Proteinmengen 1, 3 und 10 µg eingesetzt und für 24 Stunden auf den BEAS-2B Epithelzellen belassen. Ein Mediumwechsel wurde nicht durchgeführt. Die Überstände wurden nach 4, 8 und 24 Stunden entnommen und mittels ELISA wurde die IL-8 Konzentration bestimmt. Als Negativ-Kontrolle wurde Nährmedium, als Positiv-Kontrolle abgetötete NTHi in der Konzentration MOI 10 verwendet.

## 2.12 Statistik

Es wurden jeweils acht bis zehn Vertiefungen der Six-well-Platte mit einer Bedingung stimuliert ( $n = 8$  bis 10). Nach Auswertung der Proben mittels ELISA-Reader der Firma Molecular Devices wurden die Standardkurve und die Ergebniswerte mit dem

Programm Softmax (Molecular Device) ermittelt. Die Daten wurden unter Verwendung der Software SigmaStat 2.0 (SPSS, Jandel Scientific, Erkrath) auf ihre statistische Signifikanz getestet. Alle Daten wurden als Median +/- Standardfehler des Medianwertes (SEM) dargestellt. Sofern keine Normalverteilung der Einzelwerte vorlag, wurde für Gruppenvergleiche der nicht-parametrische Mann-Whitney-Rank-Sum-Test verwendet. Außerdem wurde der Student's t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant gewertet. Die in den Abbildungen dargestellten Signifikanzzeichen sind wie folgt abgekürzt: n.s. bedeutet nicht signifikant, \* entspricht einem p zwischen 0,05 und 0,01 und \*\* entspricht einem p unter 0,01.

## 2.13 Auflistung der Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Alle unten nicht erwähnten Standardlösungen wurden bezogen von Roche, Mannheim.

Agar-Agar, IsoVitalex, getrocknetes Hämoglobin (ergibt Kochblutagar)	Merck, Darmstadt
BEAS-2B Zellen	American type cell culture collection (ATCC, Manassas, VA).
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Formaldehydlösung 37%	Grüssing GmbH, Filsum
IL-8 ELISA Set	Pierce-Endogen (Rockford, IL).
Haemophilus influenzae 49247	American type cell culture collection (ATCC, Manassas, VA).

PBS	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin, Ciprofloxacin, Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
RPMI 1640 Medium	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
TNF- $\alpha$	Sigma (München, Deutschland)
Kollagen beschichtete Kulturflaschen	75 cm <sup>3</sup> , Sarstedt, Nürnbrecht
kollagen-beschichtete Six-Well-Platten	Sarstedt, Nürnbrecht
Pasteur Pipetten	Sterile Einmal-Pipetten, LP ITALIANA SPA, Mailand, Italien
Reaktionsröhrenchen	BD Falcon TM 5 ml, BD Biosciences, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Gefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml; Eppendorf AG, Hamburg
sterile Filter	Porengröße 0,20 µm Minisart, Sartorius (Göttingen)
Petrischalen	Böttger oHG, Bodenmais

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Konzentrations- und zeitabhängige Stimulation bronchialer Epithelzellen**

IL-8 Proteinkonzentrationen in den Überständen humaner bronchialer Epithelzellen wurden mittels IL-8 ELISA gemessen. NTHi führt zu einer signifikanten zeit- und konzentrationsabhängigen Aktivierung humaner bronchialer Epithelzellen. Inkubation der Epithelzellen mit ausschließlich komplettem Medium für eine Dauer von 2 bis 48 Stunden zeigten kaum ansteigende IL-8-Spiegel. Wurden die Epithelzellen mit Bakterien stimuliert, stieg die IL-8-Produktion nach 4 Stunden signifikant an, der Peak wurde nach 24 Stunden erreicht. Auch nach 48 Stunden wurden noch erhöhte Werte von IL-8 in den Überständen gefunden. Für den deutlichen Anstieg wurde eine Konzentration von MOI 10 benötigt. Dies bedeutet, dass auf eine Epithelzelle 10 Bakterien kommen müssen, damit eine Entzündungsreaktion stattfindet. Kein wesentlicher Anstieg zeigten Epithelzellen nach einer Behandlung mit NTHi der Konzentrationen MOI 0,1 und 1. Die Interleukin-8-Ausschüttung bei Stimulation mit diesen geringen Bakterienkonzentrationen erreichte maximal die Mengen der Negativkontrolle, sowohl bei einer Inkubation von 30 Minuten als auch bei 60 Minuten. Zwischen der MOI 10 und der MOI 25 zeigten sich Unterschiede besonders deutlich nach 4 Stunden (205,5 pg/ml vs. 996,1 pg/ml IL-8), im weiteren Verlauf glichen sich die gemessenen IL-8-Werte an. Nach 24 Stunden war der Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen nicht mehr signifikant.

Die stärkste Reaktion trat bei der Konzentration von MOI 100 bei der Inkubationszeit von 60 Minuten auf, der maximal gemessene Wert lag bei 2985 pg/ml IL-8. Nach 36 Stunden fällt der Wert deutlich ab, was auf eine Schädigung der BEAS-

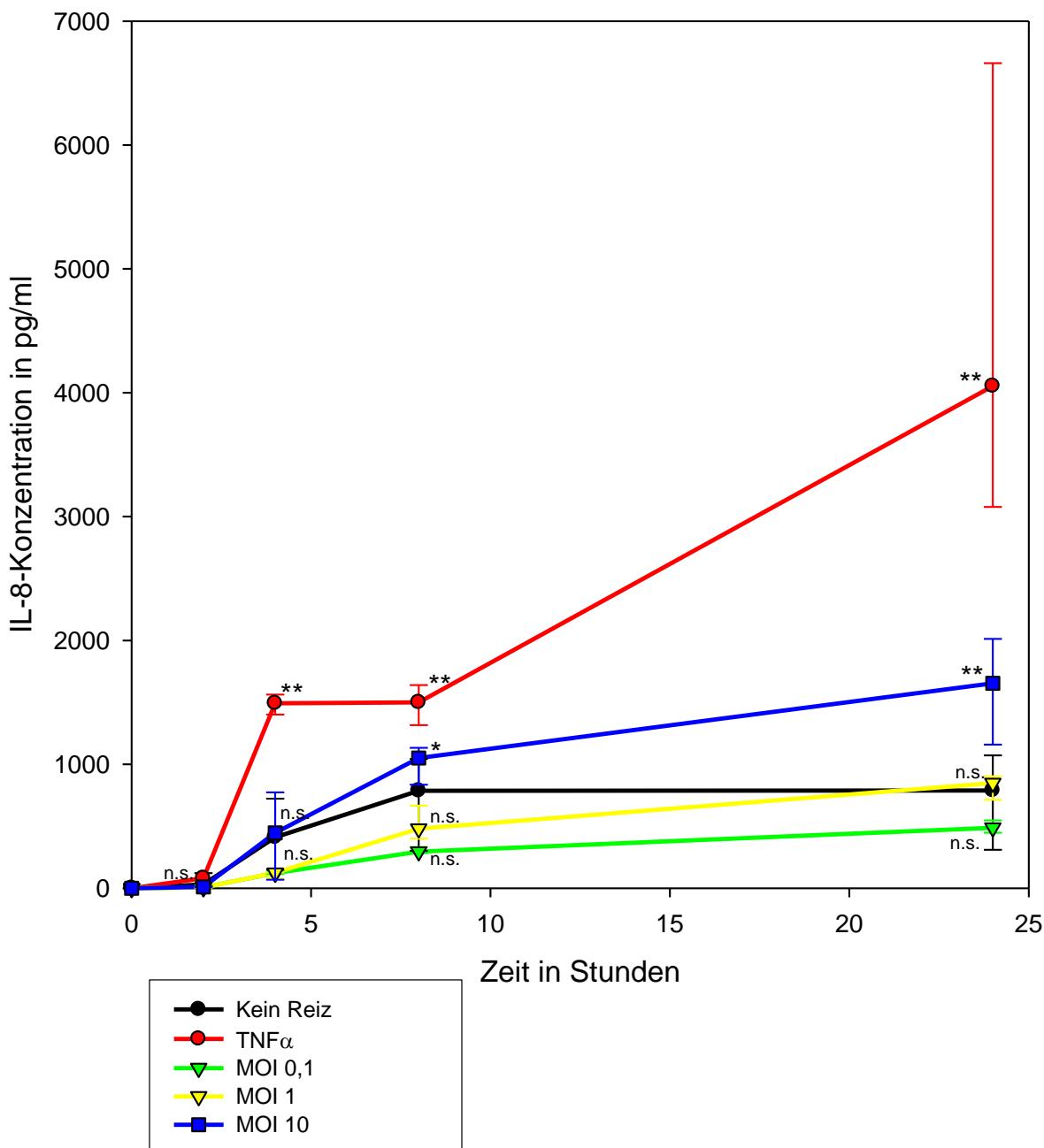
2B-Zellen hinweist. Bestätigt wird dies auch durch den stabilen Verlauf der Reaktion auf eine MOI 10 – hier tritt nach 36 Stunden kein deutlicher Abfall der ausgeschütteten Interleukinmenge auf, da die Epithelzellen nicht absterben.

Verglichen mit der Positiv-Kontrolle TNF- $\alpha$  war die Stimulation mit NTHi ein schwächerer Reiz, das Niveau der Interleukinproduktion wurde durch keine der eingesetzten Bakterienkonzentrationen erreicht. Der letzte Anstieg 48 Stunden nach Stimulation mit TNF $\alpha$  ist ebenfalls als eine Schädigung der epithelialen Zellen zu betrachten, mit nachfolgender Freisetzung von intrazellulärem IL-8.

Der Unterschied in den IL-8-Werten nach einer Inkubationszeit von 30 oder 60 Minuten war in keiner der relevanten Bakterienkonzentrationen signifikant – einzige Ausnahme ist die MOI von 1, dort gab es einen signifikanten Unterschied zwischen 30 und 60 Minuten. Wegen der besseren Durchführbarkeit der Versuche wurde die längere Inkubationszeit zur Fortsetzung der Versuche beibehalten. Die MOI 10 reicht aus, um eine signifikante Reaktion der Epithelzellen auszulösen, auf der anderen Seite führt sie nicht zu einer Epithelzellschädigung, welche die Ergebnisse beeinflusst hätte. Für die Fortsetzung der Versuche wurde daher die MOI 10 beibehalten. Nach 24 Stunden zeigte sich die klarste Reaktion der BEAS-2B Zellen auf die Stimulation mit NTHi – ohne Verfälschung durch Störfaktoren wie Epithelzellschädigung. Daher wurden die weiteren Versuche für die Dauer von 24 Stunden durchgeführt.

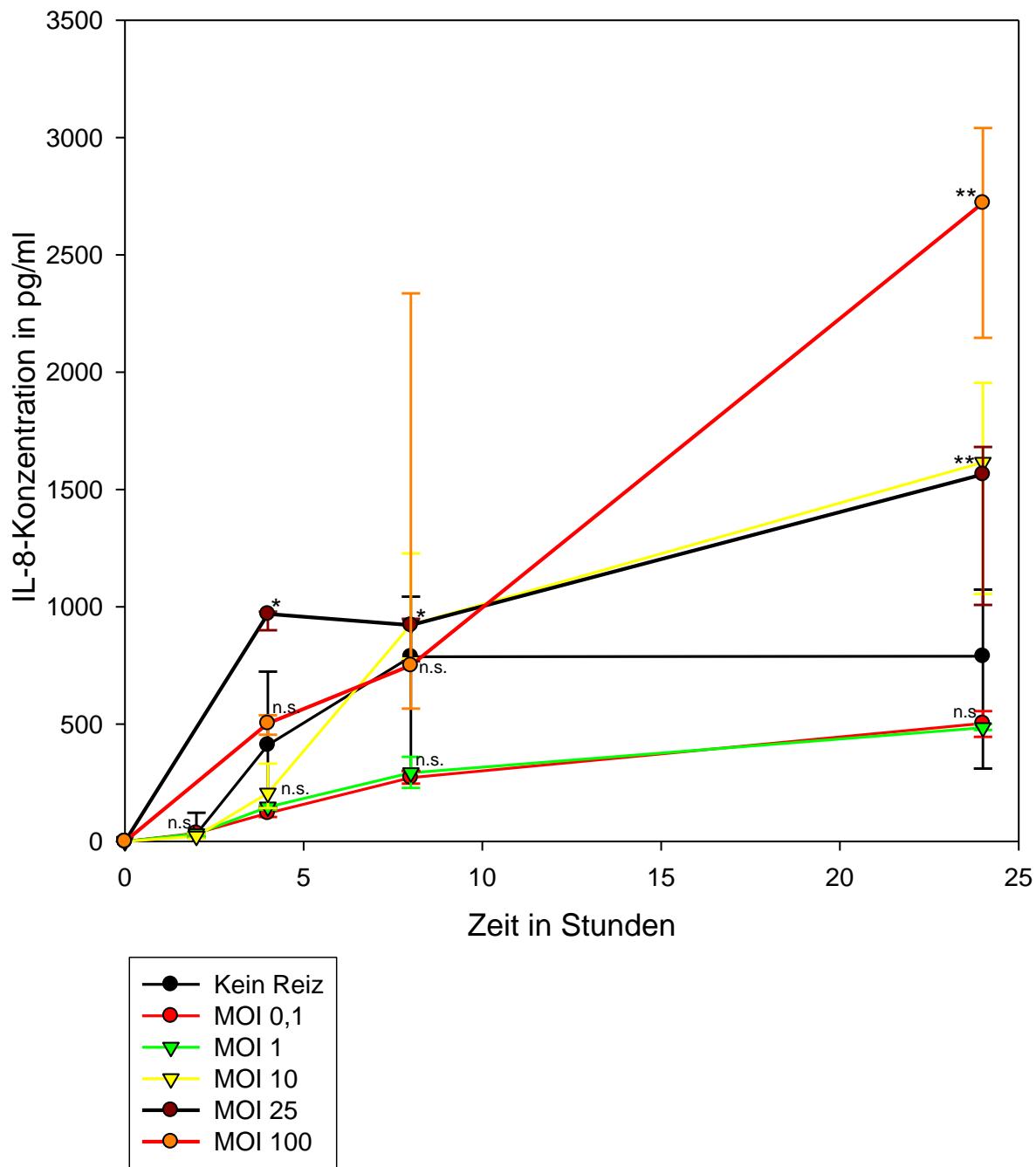
Abbildungen 4 bis 6 fassen die Ergebnisse zusammen.

**Kokultur BEAS-2B und Haemophilus influenza, MOI 0,1, 1 und 10,  
 Inkubationszeit 30 min**



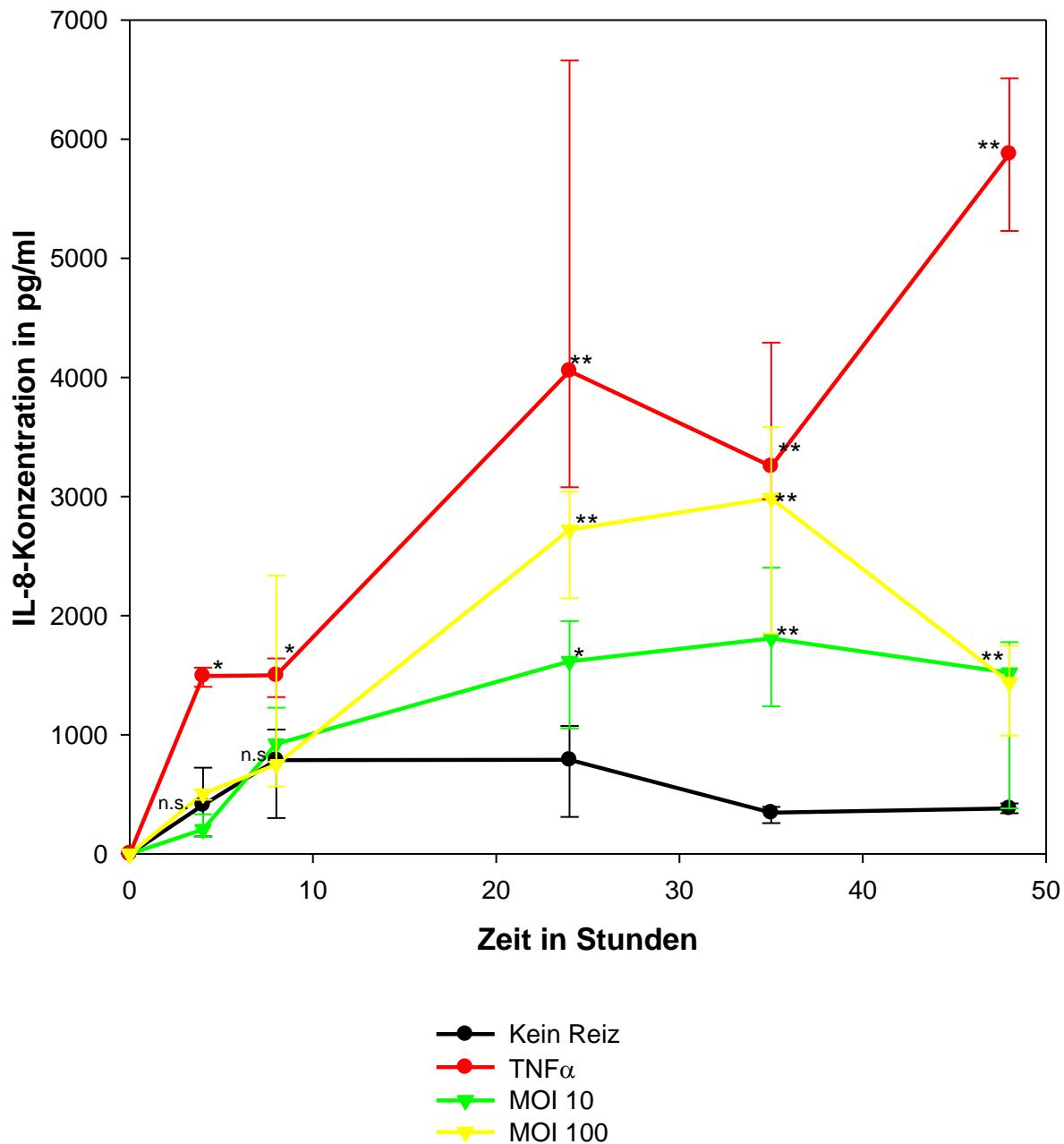
**Abb. 4:** IL-8-Konzentrationen nach Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit NTHi in der Konzentration MOI 0,1, 1 und 10 für eine Dauer von 30 Minuten. Als Positivkontrolle dient TNF- $\alpha$ , die Negativkontrolle entspricht komplettem Nährmedium. Anzahl der Einzelexperimente  $n = 8$ . N.s. nicht signifikant, \*  $p = 0,05-0,01$ , \*\*  $p < 0,01$ .

**Kokultur BEAS-2B und Haemophilus influenzae, MOI 0,1 bis 100  
Inkubationszeit 60 min**



**Abb. 5:** IL-8-Konzentration nach Behandlung der BEAS-2B-Epithelzellen mit NTHi in der Konzentration MOI 0,1 bis 100 für eine Dauer von 60 Minuten. Die Negativkontrolle entspricht komplettem Nährmedium. Anzahl der Einzelexperimente  $n = 8$ . n.s. nicht signifikant, \*  $p = 0,05-0,01$ , \*\*  $p < 0,01$ .

**Kokultur BEAS-2B und Haemophilus influenzae, MOI 10 und 100  
Inkubationszeit 60 min**



**Abb. 6:** IL-8-Konzentration nach Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit NTHi in der Konzentration MOI 10 und 100 für die Dauer von 60 Minuten. Entnahme der Überstände über einen Zeitraum von 48 Stunden. Negativkontrolle komplettes Medium, Positivkontrolle TNF  $\alpha$ . Anzahl der Versuchsansätze n=10. n.s. nicht signifikant, \* p=0,05-0,01, \*\* p<0,01.

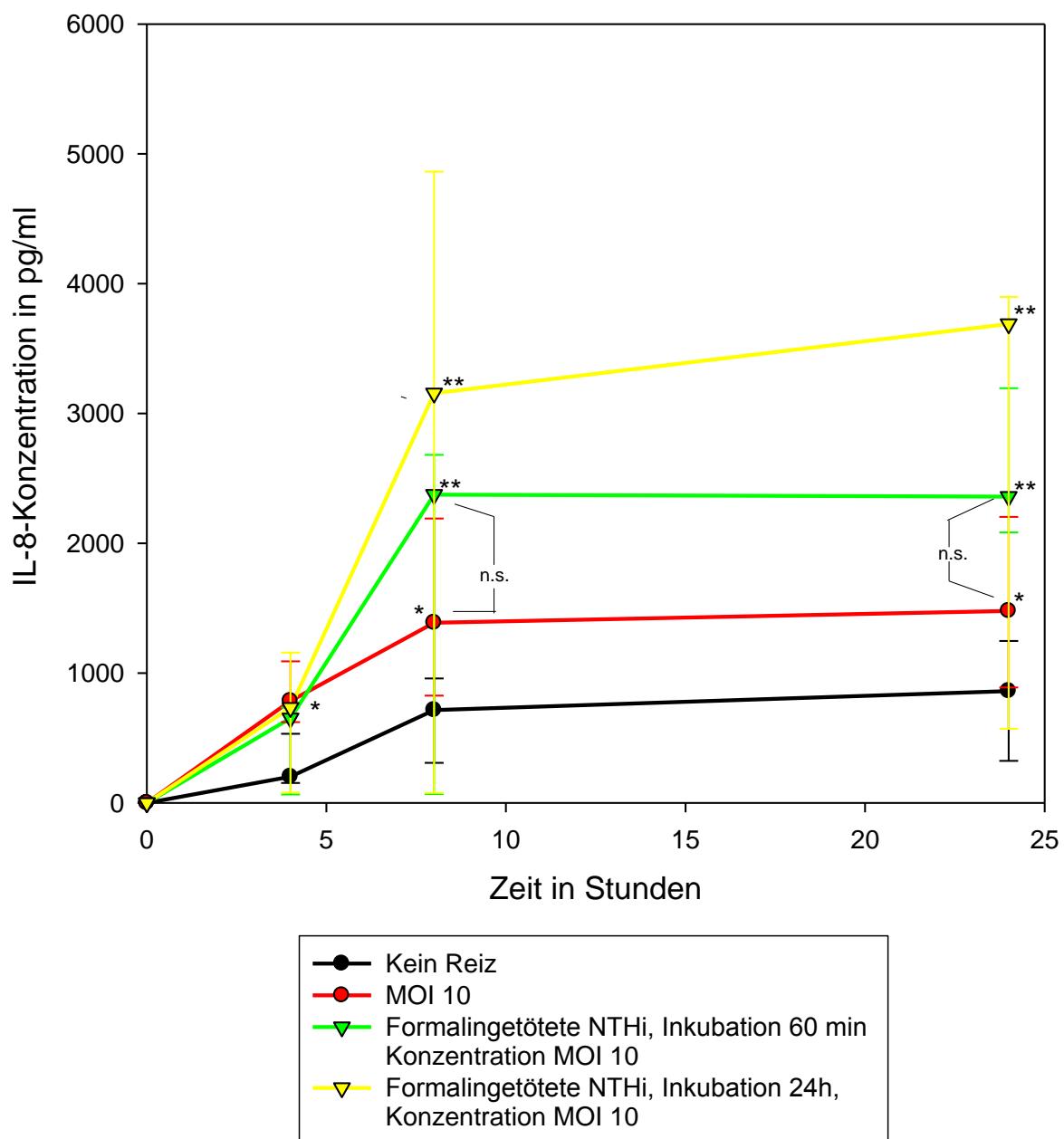
### 3.2 Formalin-Inaktivierte NTHi und Interleukin-8 Produktion

Um heraus zu finden, ob lebende Bakterien für die Entzündungsreaktion notwendig sind oder ob abgetötete Bakterien allein schon ausreichen, wurden die NTHi mit 0,3%igem Formalin abgetötet. Nach der Behandlung mit Formalin war kein Wachstum von *Haemophilus influenzae* auf Kochblutagar mehr nachweisbar. Bei dem Versuchsansatz mit einer Inkubation von 60 Minuten wurde das Medium ausgetauscht, bei der Inkubation für 24 Stunden unterblieb dieser Austausch. Nach 4 Stunden wurden die ersten Überstände entnommen, insgesamt lief der Versuch über 24 Stunden.

Nach 4 Stunden zeigt sich sowohl bei den Epithelzellen, die 60 Minuten abgetöteten NTHi ausgesetzt waren als auch bei denjenigen, die den NTHi-Reiz dauerhaft erhielten, eine deutliche Immunantwort, vergleichbar hoch mit lebenden NTHi der MOI 10. Die Menge der abgetöteten Bakterien entsprach ebenfalls einer MOI von 10. Nach 8 Stunden zeigen Epithelzellen, die anhaltend dem Entzündungsreiz ausgesetzt waren, eine signifikant höhere IL-8-Ausschüttung. Lebende und abgetötete Bakterien, die 60 Minuten in Kontakt mit den Epithelzellen waren, zeigen eine nahezu gleich starke Antwort, der Unterschied ist statistisch nicht signifikant ( $p = 0,235$ ).

Nach 24 Stunden findet sich hinsichtlich der bronchoepithelialen Aktivierung weiterhin kein signifikanter Unterschied zwischen formalininaktivierten *Haemophilus influenzae* (MOI 10) und lebenden Bakterien der MOI 10 ( $p = 0,078$ ). Die Stimulation über 24 Stunden mit formalininaktivierten *H. influenzae* führte gegenüber den Vergleichsgruppen zu einer signifikant ( $p = 0,034$ ) stärkeren Epithelzellaktivierung unter Berücksichtigung der IL-8 Freisetzung. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt.

**Kokultur BEAS-2B und Haemophilus influenzae, formalinabgetötete Hain  
Inkubationszeit 60 min und 24 Stunden**



**Abb. 7:** IL-8-Konzentration nach Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit MOI 10 lebender NTHi und MOI 10 formalinabgetöteter NTHi für die Dauer von 60 Minuten sowie mit MOI 10 abgetöteter NTHi für die Dauer von 24 Stunden. Als Negativkontrolle dient komplettes Medium. Anzahl der Versuchsansätze n = 10. n.s. nicht signifikant, \* p=0,05-0,01, \*\* p<0,01.

### 3.3 Sterile Überstände und IL-8-Produktion

Sterile Überstände wurden von abgetöteten NTHi hergestellt. Dazu wurden die NTHi zunächst mit 0,3 %igem Formalin abgetötet. Sie wurden für 24 Stunden in physiologischer Lösung (PBS) bei Raumtemperatur belassen, danach durch einen sterilen Filter der Porengröße 0.20 µm geschickt. Die Lösung zeigte auf Schokoplatten nach Bebrütung auch nach 48 Stunden kein Wachstum von *Haemophilus influenzae*.

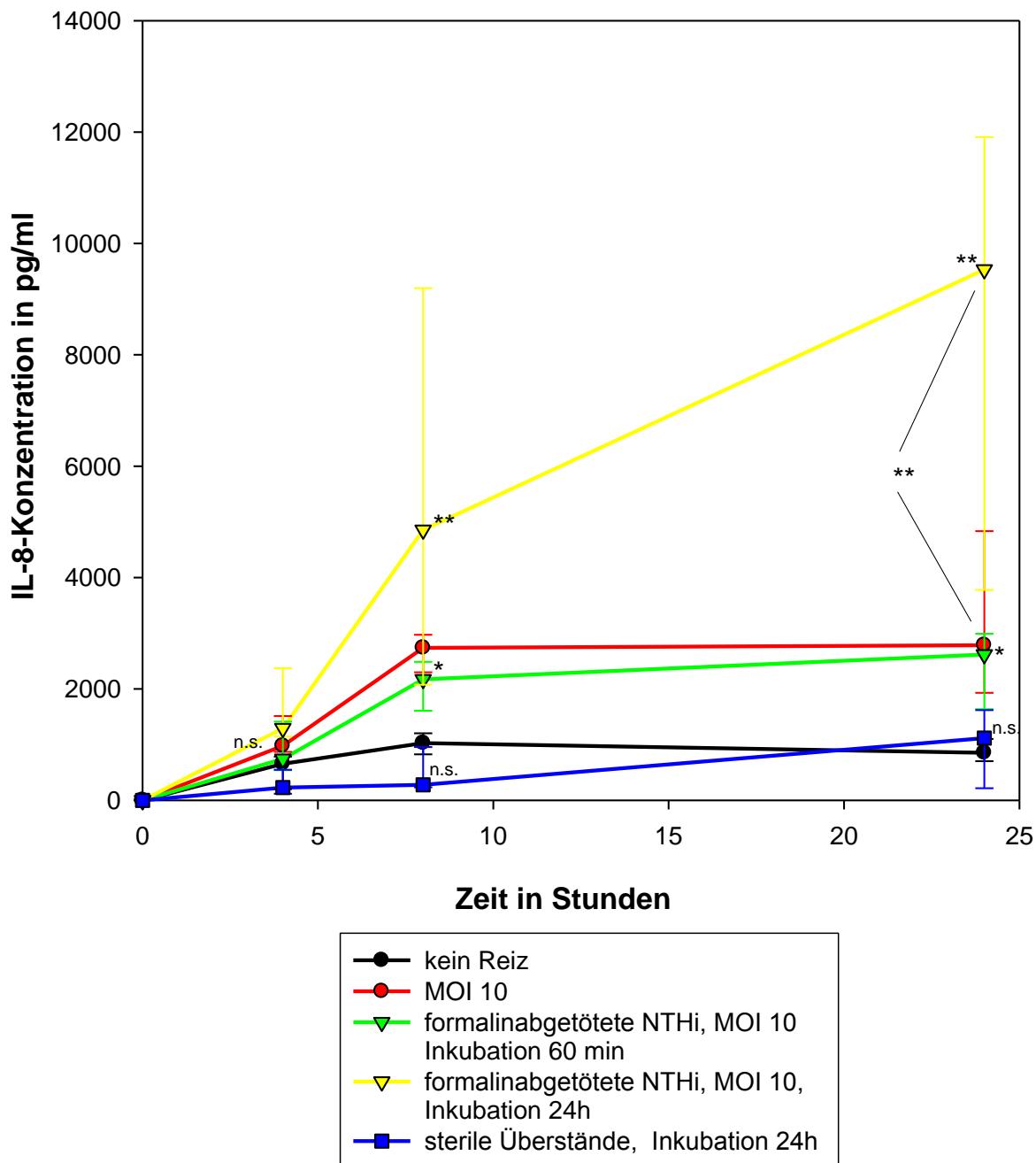
Der sterile Überstand löst keine Immunantwort der Epithelzellen aus, wohingegen in allen parallel durchgeführten Kontrollexperimenten (MOI 10, formalininaktivierte NTHi) eine signifikante Epithelaktivierung erreicht werden konnte.

Die Überstände wurden nach 4, 8 und 24 Stunden entnommen. Während der gesamten Dauer des Versuchs stieg die IL-8-Produktion bei Stimulation durch sterile Überstände nur geringfügig und nicht signifikant ( $p = 0,429$ ) über die Produktion der Negativkontrolle an.

Die Ergebnisse nach Stimulation durch formalininaktivierte *Haemophilus influenzae* werden erneut dargestellt, die Reaktion auf einen Dauerreiz mit inaktivierten NTHi ist signifikant stärker als auf lebende NTHi, die für 60 Minuten auf den Epithelzellen belassen wurden. Der Unterschied zwischen lebenden NTHi und inaktivierten Bakterien ist bei gleicher Stimulationsdauer nicht signifikant. Die Ergebnisse zeigt

Abb. 8.

**Kokultur BEAS-2B und Haemophilus influenzae,  
sterile Überstände für 24h**



**Abb. 8:** IL-8-Konzentration nach Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit MOI 10 lebender NTHi und MOI 10 formalinabgetöteter NTHi für die Dauer von 60 Minuten bzw. für 24 Stunden. Vergleich mit Reaktion auf steril filtrierte Überstände von NTHi, MOI 10. Anzahl der Versuchansätze  $n = 10$ . n.s. nicht signifikant, \*  $p=0,05-0,01$ , \*\*  $p<0,01$ .

### 3.4 Bronchoepitheliale Aktivierung durch Membranpräparation von Haemophilus influenzae

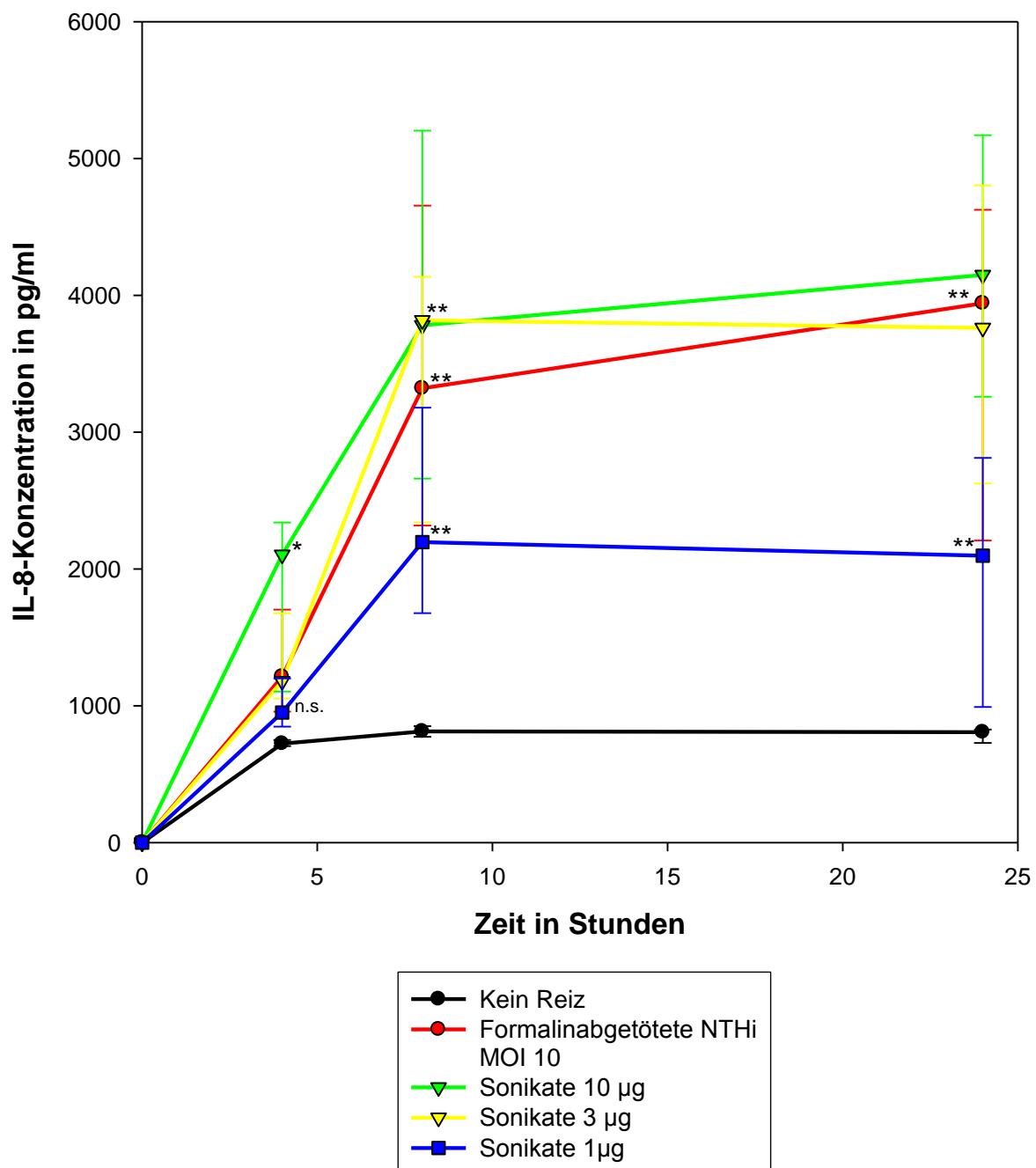
Sonikate lösen eine Immunreaktion der BEAS-2B-Zellen aus. Die Sonikate wurden aus NTHi hergestellt indem die Zellwände zunächst durch destilliertes Wasser aufgebrochen wurden, dann wurden sie mit 80 W für je zwei Mal zwei Minuten behandelt. Die Proteinmengen wurden mittels Lowry-Test bestimmt. In den Versuchen wurden Proteinmengen von 10 µg, 3 µg und 1 µg eingesetzt.

Nach 8 Stunden zeigte sich der Maximaleffekt der Stimulation für alle untersuchten Bedingungen. 10 µg und 3 µg Proteingemisch führten zu einer mit MOI 10 vergleichbaren Epithelzellaktivierung. Unter Stimulation mit 1 µg Proteingemisch fand sich weiterhin eine signifikant gesteigerte bronchoepitheliale Aktivierung gegenüber der unstimulierten Zeitkontrolle, wenn auch die Immunantwort geringer ausfiel als bei den beiden höheren Proteinmengen.

Nach 24 Stunden zeigte sich gegenüber kürzeren Stimulationszeiten keine ausreichend signifikante Veränderung mehr. Einzig die Stimulation durch formalininaktivierte Haemophilus influenzae zeigte noch einen signifikanten Anstieg der sezernierten Proteinmenge ( $p= 0,03$ ).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

**Kokultur BEAS-2B und Haemophilus influenzae-Sonikate, 1 bis 10 µg**



**Abb. 9:** IL-8-Konzentration nach Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit Proteinpräparationen von 10 µg, 3 µg und 1 µg. Als Positivkontrolle wurde die MOI 10 formalin-inaktivierter NTHi für die Dauer von 60 Minuten. Als Negativkontrolle dient komplettes Medium. Anzahl der Versuchsansätze n = 8. n.s. nicht signifikant, \* p=0,05-0,01, \*\* p<0,01.

### 3.5 Gesamtergebnisse

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Immunantwort der BEAS-2B-Zellen auf Stimulation mit dem Bakterium *Haemophilus influenzae* sowohl zeit- als auch dosisabhängig ist.

Die Bakterien müssen dabei nicht voll funktionsfähig sein, die Reaktion auf NTHi, die mit Formalin behandelt wurden, ist genauso stark. Bei einer Reizdauer von nur 30 Minuten tritt bereits eine maximal um den Faktor 2,5 erhöhte Produktion von IL-8 in den Überständen auf, die noch nach 48 Stunden nachweisbar ist. Der Peak wird nach 24 Stunden erreicht.

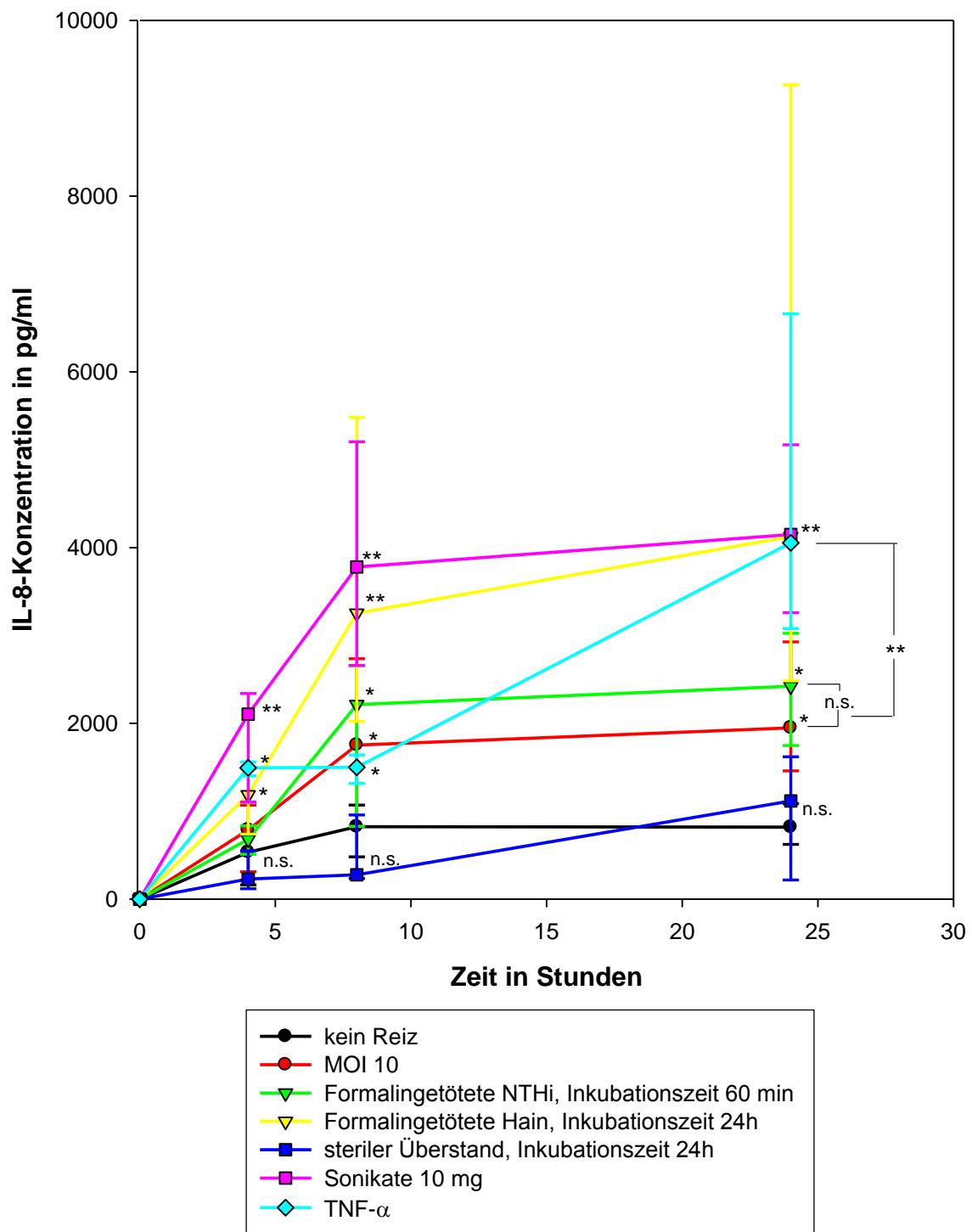
Steril filtrierte Überstände von abgetöteten NTHi lösen im Vergleich mit der Negativkontrolle keine signifikant stärkere Immunantwort der Epithelzellen aus.

Sonikate ab einer Konzentration von 3 µg Protein verursachen eine Interleukin-8 Produktion ähnlich stark derer durch NTHi der MOI 10. Die Fraktionen der durch Ultraschall zerstörten Bakterien wurden nicht weiter untersucht, es handelt sich also um ein Gemisch von Membranproteinen und zytosolischen Proteinen.

Im Vergleich mit dem zu Beginn der Versuche eingesetzten TNF- $\alpha$  sind die Immunantworten ausgelöst durch inaktivierte NTHi und 10 µg der bakteriellen Proteinpräparation vergleichbar. Allerdings waren BEAS-2B Zellen dem Reiz durch TNF- $\alpha$  nur für 60 Minuten ausgesetzt, wohingegen sowohl die inaktivierten Bakterien als auch das bakterielle Proteingemisch für 24 Stunden auf die bronchoepithelialen Zellen einwirkten.

Einen Überblick über alle Ergebnisse gibt Abbildung 10.

## Gesamtergebnis der Versuche



**Abb. 10:** Gesamtergebnis aller Versuche mit NTHi über den Zeitraum von 24 Stunden. n.s. nicht signifikant, \* p=0,05-0,01, \*\* p<0,01.

## **4. Diskussion**

NTHi ist ein Bakterium das sowohl im oberen als auch im unteren Respirationstrakt Entzündungsreaktionen hervorruft. Die Bindung an und das Eindringen der Bakterien in humane Epithelzellen und in Makrophagen wurden mittlerweile mehrfach untersucht. Es wurde festgestellt, dass NTHi das respiratorische Epithelgewebe aktivieren und so die Produktion von inflammatorischen Zytokinen steigern kann (5, 6, 10).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion zwischen NTHi und BEAS-2B genauer zu untersuchen und ein in-vitro Modell zu entwickeln, welches den entscheidenden Faktor bzw. die entscheidende Struktur der Bakterien für die Auslösung einer Infektion – im Gegensatz zur Kolonisation – identifizieren kann.

Es wurden verschiedene Versuchsbedingungen geschaffen, die eine zeit- und dosisabhängige Aktivierung der bronchoepithelialen Zellen nach Stimulation mit lebenden NTHi, inaktivierten NTHi und bakteriellen Proteinpräparation bestätigen. Als Marker für die Stärke der Entzündungsreaktion wurde Interleukin 8 eingesetzt, welches eine Hauptrolle in der Immunantwort spielt, indem es neutrophile Granulozyten im entzündeten Gewebe rekrutiert.

Nur steril filtrierte Überstände von abgetöteten NTHi lösten im Vergleich mit der Negativkontrolle keine signifikant stärkere Immunantwort der Epithelzellen aus.

### 4.1 Hochregulation von IL-8

NTHi ist einer der Wichtigsten pathogenen Faktoren die zu Entzündungen des unteren Atmungstrakts bei COPD führen. Die Entzündung wird über neutrophile

Infiltration in das geschädigte Gewebe vermittelt. Die neutrophilen Granulozyten werden durch Chemokine wie beispielsweise Interleukin 8 angelockt. Im Weiteren werden dann Mediatoren wie Elastase und reaktive Sauerstoffradikale freigesetzt, die die Bakterien eradizieren sollen. Allerdings können Überreaktionen und unkontrollierte Mediatoren - Freisetzung zu einem indirekten Gewebeschaden führen. Viele verschiedene Studien (2, 5, 6, 10) haben inzwischen gezeigt, dass NTHi die IL-8-Sekretion signifikant steigern kann, auch diese Arbeit belegt dies. Für 30 Minuten mit einer MOI 100 stimulierte Granulozyten produzierten signifikant erhöhte Mengen an Hydrogenperoxid, der IL-8-Spiegel war dreimal so hoch, IL-8 mRNA 1,5 mal so hoch wie in unstimulierten eosinophilen Granulozyten. In diesen Versuchen wird ebenfalls eine Dosisabhängigkeit der Immunantwort festgestellt (2).

Die bakterielle Aktivierung der epithelialen Zellen läuft über eine entzündungstriggerte Genexpression, einerseits durch direkten Kontakt mit den Bakterien, andererseits durch Interaktion mit anderen Zellarten (Makrophagen oder Granulozyten), darauf wird in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen.

Inzwischen wurden NTHi - Stämme von Patienten, die an COPD leiden isoliert und miteinander verglichen. Diese Vergleiche zeigen erste Unterschiede in der Virulenz der Bakterien, die mit der klinischen Situation korrelieren. NTHi-Isolate von Patienten mit einer Exazerbation zeigten eine stärkere Aktivierung epithelialer Zellen in-vitro als NTHi-Isolate von stabilen COPD-Patienten, gemessen wurde dies per Interleukin-8 Ausschüttung (6, 9). Damit wurde gezeigt, dass nicht allein die Zahl der Bakterien im unteren Respirationstrakt entscheidend für die Exazerbation ist, sondern zu einem großen Teil der Erwerb eines neuen, virulenteren Stamms desselben Bakteriums. Dieses Ergebnis bestätigt und ergänzt die vorliegende Arbeit und ermutigt, die Unterschiede der einzelnen NTHi-Stämme weiter zu untersuchen.

#### 4.2 Bindung der NTHi an bronchoepitheliale Zellen

Die Bindung der NTHi an epitheliale Zellen könnte eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Entzündungsreaktion spielen – allerdings ist die Art der Bindung umstritten. Ist es notwendig, dass Bakterien einen direkten Kontakt mit bronchoepithelialen Zellen haben oder passiert die Aktivierung der bronchialen Zellen durch Ausschüttung von bakteriellen Mediatoren, welche an Rezeptoren der bronchialen Zellen binden? Diese Frage kann durch die vorliegende Arbeit nicht eindeutig beantwortet werden, es wären dazu weitere Versuche beispielsweise durch Trennung der BEAS-2B Zellen und der NTHi durch eine semipermeable Membran, notwendig.

In der Literatur finden sich mittlerweile verschiedene Hypothesen zur Aktivierung der epithelialen Zellen. Es gibt in der epithelialen Membran mindestens drei Rezeptoren, die intrazelluläre Reaktionsmechanismen starten können. Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) ist der erste dieser Rezeptoren, welcher eine zentrale Rolle spielt. Er kann eine Kaskade von Reaktionen auslösen, die letztendlich zur vermehrten Ausschüttung von Interleukin-8 führt. Der Rezeptor TLR2 ist grundsätzlich zugänglich für Lipoproteine, Peptide und Lipopolysaccharide, die stabilste Bindung besteht jedoch zwischen Lipoproteinen und TLR2. Aus diesem Grund wurden NTHi - Lysate auf den Gehalt an Lipoproteinen untersucht (16, 23), es wurde eine hohe Konzentration an OMP 6 (= outer membrane protein 6) gefunden. Gereinigtes OMP 6 wurden dann zur in-vitro Stimulation von bronchoepithelialen Zellen genutzt und bewirkte bereits bei einer Konzentration von 0,25 µg/ml eine gesteigerte Immunantwort der epithelialen Zellen (gemessen durch NF-κB-Transkription, 23). Damit ist eines der Lipoproteine identifiziert, welches über TLR2 eine Aktivierung der Lungenzellen erreichen kann. Klar ist noch nicht, ob nicht noch weitere bakterielle Lipoproteine für die Bindung an

diesen Rezeptor in Frage kommen. Ausgeschlossen werden konnten bisher große Membranproteine (HWM 1 und 2 = high weight molecules 1 und 2).

Ein zweiter Rezeptor, der eine Rolle zu spielen scheint, ist ein PAF-Rezeptor (= platelet activating factor Rezeptor). Dieser Rezeptor scheint ebenfalls Auslöser für eine Reaktionskette zu sein, die zur vermehrten Produktion und Ausschüttung von Muzinen führt. Gleichzeitig reguliert er die Aktivität von NF-κB herunter und schützt Zellen so vor einer Apoptose. Welches Molekül an diesen Rezeptor bindet und ihn somit aktivieren kann, ist durch die bisher durchgeführten Studien nicht eindeutig belegt. Es wird eine Bindung von Lipooligosacchariden an PAF-R beschrieben (26), die zum einen elektronenmikroskopisch, zum anderen durch Blockade des PAF-Rezeptors durch ein spezifisches Antigen nachgewiesen wurde. Eine andere Studie (28) zeigte, dass Interleukin-8 an diesen Rezeptor bindet und über die gleiche Reaktionskette die Muzinausschüttung reduziert. Ob der PAF-Rezeptor eventuell beide Funktionen erfüllt, und damit eine überschießende Entzündungsreaktion der epithelialen Zellen verhindert werden soll, ist ungeklärt. Weitere Untersuchungen sind hier notwendig.

Der dritte Rezeptor, der in der Interaktion zwischen NTHi und bronchoepithelialen Zellen eine Rolle spielt, ist wahrscheinlich ein TGF-β Rezeptor (= transforming growth factor β Rezeptor). Hier ist noch offen, welche bakterielle Struktur an diesen Rezeptor bindet.

Die intrazelluläre Kaskade ist dagegen weitgehend bekannt, sie wird in den folgenden Abschnitten dargestellt.

Mit der Entwicklung von Impfstoffen zur Prävention einer Infektion mit NTHi ist die Forschung schon seit einigen Jahren beschäftigt. Ein solcher Impfstoff zur Vermeidung von Mittelohrentzündung bei Kindern und zur Verminderung der

Exazerbation der COPD bei Erwachsenen hätte einen enormen Einfluss auf Morbidität, Mortalität und die Kosten des Gesundheitssystems. Ein Hauptgesichtspunkt bei der Entwicklung eines funktionierenden Impfstoffs liegt mit Sicherheit bei der Heterogenität der Antigene der Bakterienhülle innerhalb der Stämme. Dabei sollten die verschiedenen Membranproteine, Adhäsine, eisenregulierte Proteine und Lipooligosaccharide sowie zytosolischen Proteine noch genauer unter die Lupe genommen werden. Die Ergebnisse werden in den nächsten zehn Jahren zeigen, ob sich ein Impfstoff gegen NTHi entwickeln lässt.

#### 4.3 Bakterielle Proteinpräparationen

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Proteinpräparation löste eine starke Immunantwort der epithelialen Zellen aus, die sich in ihrer Stärke nicht von der Immunantwort auf lebende NTHi unterschied. Die Proteine wurden allerdings nicht näher untersucht, es erfolgte keine Untergruppierung über die Größe der Moleküle oder durch enzymatische Spaltung der Proteine. Dies ist zur Klärung der Frage, welches Molekül den stärksten pathogenen Stimulus darstellt, aber von entscheidender Wichtigkeit. Weitere Versuche wären an dieser Stelle notwendig. Mittlerweile sind verschiedene Ergebnisse aus anderen Studien vorhanden, danach scheint es, als ob lösliche Zytoplasma - Fraktionen eine stärkere Aktivierung der Gene für Mucine zeigen als die Lipooligosaccharide (LOS) und outer membrane Proteine (OMP). LOS zeigten in einer Studie (28) in einer Konzentration von 10 µg/ml zwar einen Effekt, dieser entspricht aber nur 4% der Aktivierung durch Zytoplasma - Fraktionen. Reine Membranprotein-Präparationen haben in einigen Untersuchungen (7, 9) überhaupt keinen Effekt gezeigt.

Man vermutet daher zum jetzigen Zeitpunkt, dass NTHi - Zytoplasmafraktionen für die Überproduktion von IL-8 und dem daraus entstehenden Gewebeschaden verantwortlich sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit können nicht mit diesen Studien verglichen werden, da keine Differenzierung zwischen Membran- und Zytoplasma-Proteinen erfolgte. Da eine Stimulation mit 3 µg Proteinpräparation einen signifikanten Anstieg der Interleukin-8 Produktion bewirkte, steht das Ergebnis der vorliegenden Arbeit soweit beurteilbar im Einklang mit den genannten Studien.

Um festzustellen, ob die Stärke der Entzündungsreaktion der Epithelzellen von Bakterienstämmen abhängig ist, wurden Zytoplasma - Fraktionen von neun verschiedenen NTHi-Stämmen untersucht (28). Alle neun stimulierten die Zellen, das Ausmaß war allerdings unterschiedlich – die Fähigkeit zur Induktion von IL-8 ist demnach eine Eigenschaft, die alle NTHi besitzen.

Außerdem wurde die Proteinpräparation enzymatisch weiter differenziert. Die löslichen Zytoplasma - Fraktionen waren sensibel für Peptidase und Lipase. Fraktionen, die nur Moleküle größer als 50 kDa enthielten, erzielten 50% der Maximalantwort durch die Gesamtfraktion. Die volle Aktivität zeigten dagegen Fraktionen der Molekülgröße  $\leq$  3 kDa. Nach Behandlung der kleinen Moleküle mit Peptidase und Lipase sank die Stimulation um 90%, bei Hinzufügen von DNase und RNase dagegen ergab sich kein Absinken der Immunantwort. Daraus lässt sich schließen, dass Peptide mit Esterverbindungen zur Aktivierung der Zellen benötigt werden.

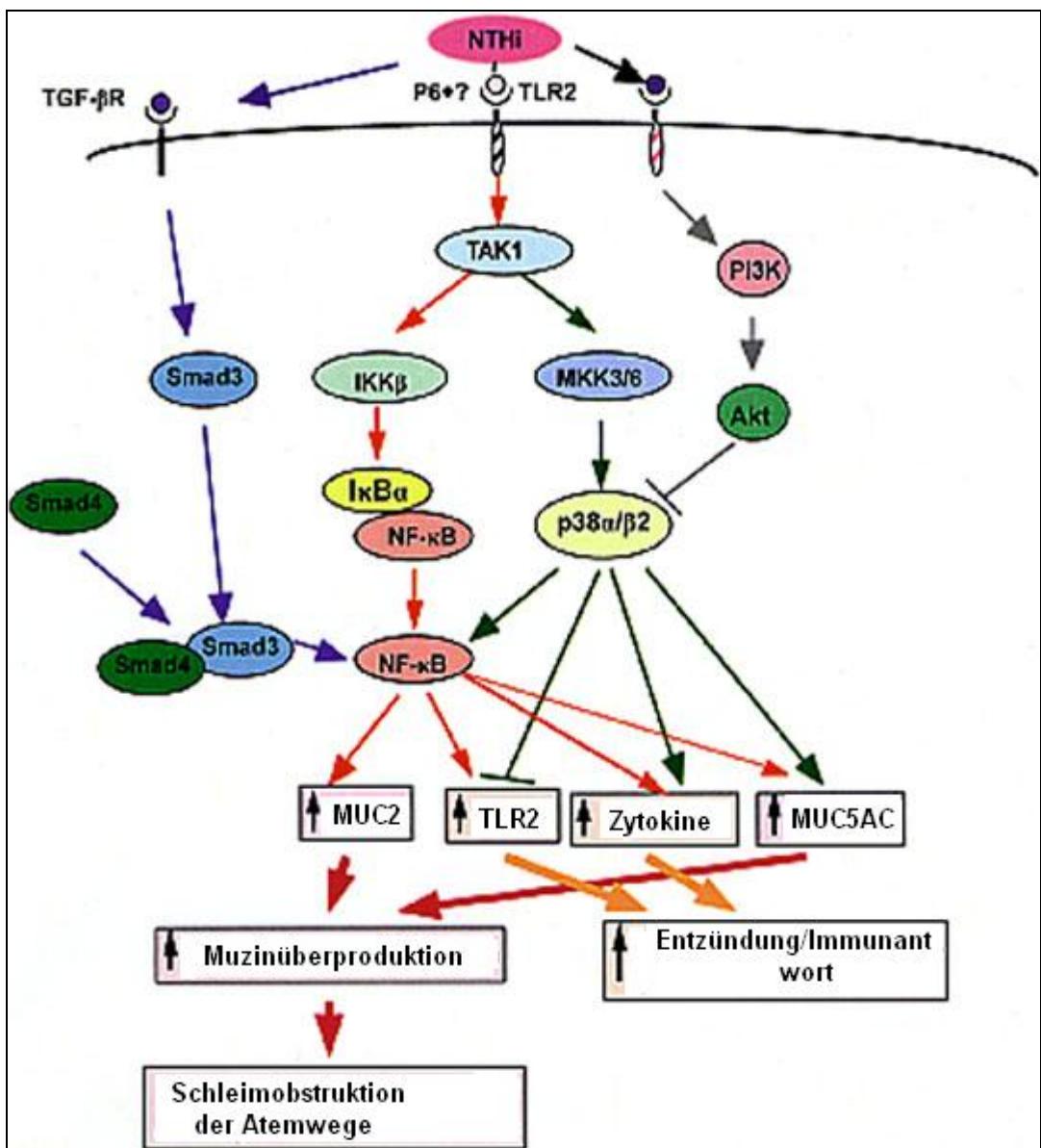
Versuche mit filtrierten Überständen von NTHi wurden von der gleichen Forschungsgruppe durchgeführt (28). Wie bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit zeigte sich nur eine unerhebliche Stimulation der Epithelzellen. Dieses Ergebnis spricht gegen einen löslichen (humoralen) Faktor zur Aktivierung der bronchialen Epithelzellen.

#### 4.4 Intrazelluläre Aktivierung der epithelialen Zellen und Therapiemöglichkeiten

Die intrazellulären Reaktionsketten wurden in der vorliegenden Arbeit gar nicht untersucht, obwohl dies ein wichtiger Schritt zur Entwicklung neuer Therapieansätze und zum Verständnis der Unterschiede der Virulenz der NTHi ist. Es sind inzwischen Teile der komplexen intrazellulären Reaktionsmechanismen identifiziert worden, wobei die Ergebnisse nicht immer übereinstimmend sind.

Die Abbildung 11 verdeutlicht bereits, dass die durch Stimulation mit NTHi ausgelösten Reaktionen äußerst komplex sind. Ein zentrales Molekül, welches in allen Studien (13, 23, 29) gleichermaßen zur Aktivierung der Immunantwort epithelialer Zellen führt, scheint Nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), ein eukaryoter Transkriptionsfaktor, zu sein.

Dieser Transkriptionsfaktor ist für die Expression der Entzündungsgene von Interleukin 1 $\beta$ , Interleukin 8 und TNF- $\alpha$  verantwortlich (23). Er besteht aus zwei Untereinheiten, p50 (auch genannt NF- $\kappa$ B1) und p65 (auch genannt RelA. Die Bezeichnung „p“ beschreibt die Größe der Proteine). Es handelt sich um ein zytoplasmatisches Molekül, welches nach Stimulation in den Zellnukleus wandert. Die Aktivierung wird über eine inhibitorische Untereinheit geregelt (I $\kappa$ B = Inhibitor des NF- $\kappa$ B), da I $\kappa$ B den Transkriptionsfaktor im Zytoplasma hält.



**Abb. 11.** Schematische Darstellung der intrazellulären Reaktionsketten nach Stimulation durch NTHi in bronchoepithelialen Epithelzellen.

NTHi = nontypeable Haemophilus influenzae; P6 = transmembranöses Protein 6; TLR = Toll-like Rezeptor; TGF- $\beta$ R = transforming growth Faktor  $\beta$  Rezeptor; TAK1 = TGF- $\beta$ -aktivierte Kinase 1; IKK = I $\kappa$ B Kinase; MKK = MAP-Kinase Kinase; I $\kappa$ B $\alpha$  = Inhibitor des NF- $\kappa$ B; NF- $\kappa$ B = nuklearer Faktor  $\kappa$ B; MAPK p38  $\alpha/\beta$  = Mitogen-aktivierte Proteinkinase; PI3K = Phosphat-Inositol 3 Kinase; Akt = Serin-Threonin Kinase; Smad 3/4 = Similar mothers against decapentaplegic 3/4); MUC 2 = Muzingen 2; MUC5AC = Muzingen 5AC, (13).

Sie erfolgt durch Phosphorylierung, Ubiquitinierung und mehrfachen Reduktionen von I $\kappa$ B durch Kinasen (IKK  $\alpha$  und  $\beta$ ). Diese Kinasen werden wiederum aktiviert durch Phosphorylierung, identifiziert wurde bisher ein dafür verantwortliches Enzym, die NF- $\kappa$ B induzierende Kinase (= NIK). Ein zweiter Weg der Aktivierung von NF- $\kappa$ B

läuft über mitogenaktivierende Proteinkinase-Kinase (MKK 3 und 6) und mitogenaktivierende Proteinkinase (MAPK) p38. Beide Signalwege werden über ein gemeinsames Enzym begonnen, die TGF- $\beta$  aktivierende Kinase (TAK 1), die selbst in Verbindung mit dem TLR 2 steht. Dieser Rezeptor wird mit großer Wahrscheinlichkeit durch ein Membranprotein der NTHi, OMP 6, aktiviert. Ob auch andere Proteine an diesen Rezeptor binden können, ist noch nicht bekannt. An dieser Stelle könnten Ansätze für neue Therapien gefunden werden.

Es gibt Hypothesen von zwei weiteren intrazellulären Signalwegen nach Stimulation von NTHi (13). Einer läuft über Phosphat-Inositol-3 Kinase (PI3K) und eine Serin-Threonin-Kinase (Akt). PI3K besteht aus zwei Untereinheiten p85 und p110, es katalysiert die Phosphorylierung von Phosphat - Inositol, welches dann an Akt bindet. Die Aktivierung von Akt hat zur Folge, dass die epithelialen Zellen vor Apoptose geschützt werden und Gene für die Muzinbildung (MUC5AC) induziert werden. Die Aktivität von MAPK wird dagegen herunterreguliert. Die Wirkung von Akt auf intrazelluläre Regulationsmechanismen ist jedoch nicht vollkommen geklärt, weitere Studien sind hier notwendig.

Ein zweiter Signalweg läuft über TGF- $\beta$  und Smad (= similar mothers against decapentaplegic homolog) zur Regulierung von Prozessen wie Zellproliferation, Ausdifferenzierung von Zellen, Apoptose sowie Entzündungs- und Immunantwort der Zellen. Der Name Smad ist zusammengesetzt aus zwei Bezeichnungen von Proteinen: MAD und SMA wurden bei Drosophila bzw. C. elegans entdeckt, es sind transformierte Proteine, die bei den Insekten eine Form der Paralyse entstehen lassen und von der Mutter vererbt werden. Der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ , Teil einer großen Gruppe von Wachstumsfaktoren, beginnt die Aktivierung durch Phosphorylierung eines heterogenen Rezeptorkomplexes bestehend aus zwei Typen

(TGF- $\beta$  Rezeptor 1 und 2). Es folgt die Phosphorylierung von R-Smad (= Smad 2 und 3), dieses löst sich anschließend vom Rezeptor und bindet an Co-Smad (auch Smad 4 genannt). Dieser Komplex wandert in den Zellkern und beginnt die Regulierung der Zielgene. Fraglich ist, ob TGF- $\beta$  auch an der Hochregulation von Muzinen beteiligt ist, es gibt Erkenntnisse, dass TGF- $\beta$  gemeinsam mit NF- $\kappa$ B an der vermehrten Transkription von Muzin-2 Gen beteiligt ist (13).

Die Immunreaktion der epithelialen Zellen ist und bleibt ein sehr komplexer Vorgang, die bisherigen Studien entdecken Teilschritte in den Reaktionsketten, die Hoffnung auf neue Therapieansätze zulassen. Die vorliegende Arbeit kann in der Aufklärung über intrazelluläre Reaktionsketten keine neuen Erkenntnisse bringen.

## **5. Zusammenfassung**

NTHi ist eine der Hauptursachen für Infektionen des Respirationstrakts bei Kindern und Erwachsenen, des Weiteren eine häufige Ursache bei Mittelohrentzündung, Sinusitis, Lungenentzündung im Erwachsenenalter und Infektionen des tiefen Respirationstrakts bei COPD-Patienten. Wie es trotz oft ständiger Kolonisation zu Exazerbationen ausgelöst durch NTHi kommen kann, ist weitgehend unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion zwischen NTHi und BEAS-2B genauer zu untersuchen und ein in-vitro Modell zu entwickeln, welches den entscheidenden Faktor bzw. die entscheidende Struktur der Bakterien für die Auslösung einer Infektion – im Gegensatz zur Kolonisation – identifizieren kann. Als Marker für die Stärke der Entzündungsreaktion wurde Interleukin 8 eingesetzt, welches eine Hauptrolle in der Immunantwort spielt, indem es neutrophile Granulozyten im entzündeten Gewebe rekrutiert.

Die Immunantwort der bronchoepithelialen Zellen auf Stimulation mit dem Bakterium *Haemophilus influenzae* ist in den durchgeführten Versuchen sowohl zeit- als auch dosisabhängig. Die Bakterien müssen dabei nicht voll funktionsfähig sein, mit Formalin inaktivierte NTHi oder eine bakterielle Proteinpräparation lösen eine vergleichbar starke Reaktion der Zellen aus. Bei einer Reizdauer von nur 30 Minuten trat eine maximal um den Faktor vier erhöhte Produktion von IL-8 in den Überständen auf, die noch nach 48 Stunden nachweisbar ist. Steril filtrierte Überstände von abgetöteten NTHi lösen im Vergleich mit der Negativkontrolle keine signifikant stärkere Immunantwort der Epithelzellen aus. Dieses Ergebnis spricht gegen einen humoralen Faktor zur Aktivierung der bronchialen Epithelzellen. Ein in-vitro Modell zur Beurteilung der Pathogenität von NTHi konnte erarbeitet werden,

auch wenn der Auslöser für eine Entzündungsreaktion der Epithelzellen nicht eindeutig identifiziert werden konnte.

Die Fraktionen der bakteriellen Sonikate wurden nicht weiter untersucht, es handelt sich also um ein Gemisch von Membranproteinen und zytosolischen Proteinen. Diese Differenzierung ist zur Klärung der Frage, welches Molekül den stärksten pathogenen Stimulus darstellt, aber von entscheidender Wichtigkeit. Weitere Versuche wären an dieser Stelle notwendig, die vorliegende Arbeit ist hier limitiert. Des Weiteren sollten Bakterienisolate von Patienten in diesem Modell auf Unterschiede der Virulenz untersucht werden. Die Wahrscheinlichkeit ist groß, dass Abweichungen bei potentiell pathogenen Substanzen, wie Endotoxinen, Membranproteinen, bakteriellen Toxinen, Peptidoglykanen oder Lipoteichoïdsäuren gefunden werden können. Neue Studien sollten sich mit diesen Antigenen beschäftigen, um Therapien, die die Kolonisation des Respirationstraktes gerade bei COPD - Patienten reduzieren, entwickeln zu können.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Abe Y., Murphy T. F., Sethi S. Lymphocyte Proliferative Response to P6 of *Haemophilus influenzae* Is Associated with Relative Protection from Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165: 967-971. (2002).
2. Ahrén I., Eriksson E., Egesten A. Non-typable *Haemophilus influenzae* activates human eosinophils through  $\beta$ -glucan receptors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*; 29: 598-605. (2003).
3. Bandi V., Apicella M. A., Mason E., Murphy T. F. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the Lower Respiratory Tract of Patients with Chronic Bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 164: 2114-2119. (2001).
4. Bandi V., Jakubowsz M., Kinyon C. Infectious exacerbations of chronic pulmonary disease associated with respiratory viruses and non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 37: 69-75. (2003).
5. Berenson C. S. ,Murphy T. F.,Wrona C. T.,Sethi S. Outer Membrane Protein P6 of Nontypeable *Haemophilus influenzae* Is a Potent and Selective Inducer of Human Macrophage Proinflammatory Cytokines. *Infect. Immun..* 73 (5):2728-2735.(2005)

6. Chin C. L., Manzel L. J., Lehman E. E., Humlincek A. L. *Haemophilus influenzae* from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers. *Am J Respirat Crit Care Med.* 172: 85 – 91. (2005).
7. Clemans D. I., Bauer R. J., Hanson J. A. Induction of Proinflammatory Cytokines from Human Respiratory Epithelial Cells after Stimulation by Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun.*, 68 (8): 4430-4440. (2000).
8. Farkas L., Hahn M.-C., Schmoczer M., Jentsch N., Krätznel K., Pfeifer M., Schulz C. Expression of CXC Chemokine Receptors 1 and 2 in Human Bronchial Epithelial Cells. *Chest.* 128: 3724 – 3734. (2005).
9. Frick A.G., Joseph T. D., Pang L. *Haemophilus influenzae* Stimulates ICAM-1 Expression on Respiratory Epithelial Cells. *J. Immun.*, 4185-4196. (2000).
10. Hurst J. R., Perera W. R., Wilkinson T. M. et al. Systemic and upper and lower airway inflammation at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006. 173: 71-78. (2005).
11. Imasato A., Desbois-Mouthon C., Han J., Kai H., Cato A. Inhibition of p38 MAPK by Glucocorticoids via Induction of MAPK Phosphatase-1 Enhances Nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced Expression of Toll-like Receptor 2. *J Biolog Chem.* 277 (49): 47444–47450. (2002)

12. Khair O. A., Davies R. J., Devalia J. L. Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *Eur Respir J.* 9: 1913 – 1922. (1996).
13. Li, J. D. Exploitation of Host Epithelial Signaling Networks by Respiratory Bacterial Pathogens. *J Pharmacol Sci.* 91: 1 – 7 (2003)
14. Look, D. C. Keller B. T. Rapp S. R., Holtzman M. J. Selective induction of intercellular adhesion molecule 1 by interferon  $\gamma$  in human airway epithelial cells. *Am J Physiol.* 263: 79-87. (1992).
15. Look D. C., Chin C. L., Manzel L. J., Lehman E. E., Humlincek A. L. et al. Modulation of Airway infalmmation by Haemophilus infeleunzae isolates associated with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Proc Am Thorac Soc.* 3: 482-483. (2006).
16. Monso E. Bronchial Colonization in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: What's Hiding Under the Rug. *Arch Broncopneumol;* 40 (12): 543-546. (2004).
17. Murphy T. F. Respiratory infections caused by non-typeable Haemophilus influenzae . *Curr Opinion Infect Dis.* 16: 129-134. (2003).
18. Murphy T. F. The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opinion Infect Dis.* 19: 225 – 230. (2006).

19. Naylor E. J., Bakstad D., Biffen M., Thong B., Calverley P. *Haemophilus influenzae* induces neutrophil necrosis. A role in chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 37: 135 – 143. (2007).
20. Patel I. S., Seemungal T. A. R., Wilks M. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax;* 57: 759-764.. (2002).
21. Reddel R. R., Gerwin B. I., Miyashita M., McMenamin M. Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. *Cancer Res* 48: 1904 – 1909. (1989).
22. Sethi S., Murphy T. F. Bacterial Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease in 2000: a State-of-the-Art Review. *Clinical Microbiology Reviews.* 336-363. (2001).
23. Shuto T., Xu H., Wang B. Activation of NF- $\kappa$ B by nontypeable *Haemophilus* is mediated by toll-like receptor 2 Tak1-dependent NIK-IKK $\alpha$ /β-I $\kappa$ B $\alpha$  and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *PNAS.* 98 (15): 8774-8779. (2001).
24. Starner T. D., Swords W. E., Apicella M. A., et al. Susceptibility of nontypeable *Haemophilus inflleunzae* to human beta-defensins is influenced by lipooligosaccharide acylation. *Infect Immun.* 70: 5287-5289. (2002).
25. St. Geme J. W. Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion. *Cell Microbiol;* 4: 191-200. (2002).

26. Swords W. E., Chance D. L., Cohn L. A., et al. Acylation of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* and colonisation : an *htrB* mutation diminishes the colonisation of human airway epithelial cells. *Infect Immun.* 70: 4661-4668. (2002).
27. Van Ulzen P., van Schilfgaarde M., Dankert J., et al. Genes of non-typeable *Haemophilus influenzae* expressed during interaction with human epithelial cell lines. *Mol microbiol.*; 45: 485-500. (2002).
28. Wang B., Cleary P. P., Xu H. Up-Regulation of Interleukin-8 by Novel Small Cytoplasmic Molecules of nontypeable *Haemophilus influenzae* via p38 and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways. *Infect Immun.* 71: 5523-5530. (2003).
29. Watanabe T., Jono H., Han J. Synergistic activation of NF- $\kappa$ B by nontypeable *Haemophilus influenzae* and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *PNAS.* 101: 3563-3568. (2004).

## **7. Danksagung**

Zuletzt bedanke ich mich bei all jenen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. med. Riegger für die Möglichkeit, in seiner Klinik für Innere Medizin II des Uniklinikums Regensburg diese Dissertation zu erstellen. Herrn Prof. Dr. med. Pfeifer und Herrn Prof. Dr. med. Hans Wolf für die Unterstützung der Forschungsgruppen, die wissenschaftliche Betreuung und Hilfestellung.

Den Mitarbeitern der Forschungsgruppen, Frau Kirsten Krätzel, Frau Regine Birngruber und Herrn PD Dr. med. Wulf Schneider welche durch ihre Unterstützung, Ratschläge und Anleitungen die experimentellen Versuche und Auswertung ermöglichten.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Christian Schulz, welcher als Ansprechpartner bei allen Fragen und Problemen sowie als Erstleser des Manuskriptes die Entstehung dieser Arbeit erst ermöglicht hat.

Herzlich Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie, die mich immer unterstützt hat, bei meiner Kommilitonin Dr. Christine Schifferer sowie bei Dr. Yasser Abdel Maguid, die mich mit ihrer Motivation bis zur Vollendung der Dissertation unterstützt haben.

## **8. Lebenslauf**

<b>Name</b>	Hahn, Marie-Christine
<b>Anschrift</b>	Grhz.-Friedrich-Str. 96 66121 Saarbrücken
<b>Geburtsdatum/ -ort</b>	22.06.1979, Bad Neuenahr-Ahrweiler
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Schulabschluss</b>	Abitur im Juni 1998 (Note: 1,5), Frauenlobgymnasium Mainz
<b>Studium</b>	Medizinstudium an der Universität Regensburg, 11/1998 bis 04/2005 Physikum im Herbst 2000 1. Staatsexamen im Herbst 2001 2. Staatsexamen im Frühling 2004 3. Staatsexamen im April 2005
<b>Ärztliche Tätigkeit</b>	August 2005 bis Mai 2007: Assistenzärztin in der Hämato-Onkologie, St. Theresia Klinikum Saarbrücken Juni 2007 bis Juni 2008: Assistenzärztin in der Gastroenterologie, St. Theresia Klinikum Saarbrücken. Juli 2008 bis Juli 2009: Assistenzärztin in der Psychiatrie im CHL Luxemburg Seit Oktober 2009: Assistenzärztin der Allgemeinmedizin an der Universität Luxemburg
<b>Publikationen</b>	Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in folgender Publikation: Farkas L, Hahn MC, Schmoczer M, Jentsch N, Krätsel K, Pfeifer M, Schulz C.; „Expression of CXC chemokine receptors 1 and 2 in human bronchial epithelial cells.“ Chest. 2005 nov; 128(5):3724-34.

Saarbrücken, den 15. Februar 2011

