

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung humaner Endothelzellen durch Infektionserreger am Beispiel der *L. monocytogenes*- und *C. pneumoniae*-Infektion auf molekularer Ebene untersucht. Besondere Berücksichtigung erfuhren dabei die Histonmodifikationen sowie die Signalwege der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen und der Rho-Proteine.

Die gezeigten Daten deuten darauf hin, dass Histonmodifikationen zur Aktivierung der Expression proinflammatorischer Zytokine nach Infektion mit intrazellulären Bakterien beitragen. Diese von *L. monocytogenes* und *C. pneumoniae* induzierten Histonmodifikationen in humanen Endothelzellen wurden durch spezifische intrazelluläre Signalwege gesteuert. Im Folgenden werden diese Phänomene diskutiert.

### 5.1 Diskussion der Ergebnisse

#### 5.1.1 Induktion verschiedener Zytokine nach Infektion mit *L. monocytogenes* und *C. pneumoniae*

Die Erregerelimination einer experimentell erzeugten *L. monocytogenes*-Infektion der Maus erfordert die Zytokin-induzierte Chemotaxis und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen (Conlan und North, 1994; Czuprynski *et al.*, 1994; North, 1970; Rogers und Unanue, 1993). *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte die Freisetzung der Chemoattraktoren IL-8 und MCP-1, der T<sub>H</sub>1-Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ , der T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13, die myeloiden Wachstumsfaktoren G-CSF und IL-7, sowie das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  in humanen Endothelzellen. Diese große Bandbreite von Zytokinen weist darauf hin, dass Endothelzellen eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort spielen.

Wie wichtig die Rekrutierung von Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten für die Eliminierung des Erregers *L. monocytogenes* ist, zeigte sich in Mausmodellen. Während einer Infektion mit Listerien wurden sehr viele Makrophagen in die infektiösen Herde der Mausleber rekrutiert. Die Makrophagen von Mäusen, die 4 Tage zuvor mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) infiziert wurden, wiesen eine höhere phagozytotische Aktivität auf, als zuvor nicht infizierte Tiere (North, 1970). Eine weitere Studie macht deutlich, dass auch neutrophile Granulozyten verantwortlich für die

## DISKUSSION

---

Immunabwehr gegenüber *L. monocytogenes* sind: Mäuse, denen Antikörper gegen neutrophile Granulozyten verabreicht wurden, hatten eine geringere Resistenz gegenüber einer Sekundärinfektion mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) als unbehandelte Mäuse (Czuprynski *et al.*, 1994). Hinweise darauf, welche Zytokine verantwortlich für die Rekrutierung dieser wichtigen Immunzellen in Verbindung mit der Immunantwort gegenüber *L. monocytogenes* sind, lieferten zwei weitere Studien: Im Mausmodell zeigte sich, dass eine Vorbehandlung mit rekombinantem G-CSF zu einer gesteigerten funktionellen Aktivität von Granulozyten in Bezug auf Chemotaxis und Phagozytose etc. führte (Shinomiya *et al.*, 1991). G-CSF erhöhte darüber hinaus die Resistenz gegenüber einer Infektion mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (Shinomiya *et al.*, 1991) und die Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-7 wiesen eine Synergie im Zusammenhang mit der *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-induzierten T-Zell-Proliferation in Mäusen auf (Skeen und Ziegler, 1993).

Außerdem gibt es mehrere Studien, die für verschiedene Zellen belegen, dass diese infolge einer *L. monocytogenes*-Infektion Zytokine freisetzen, die wichtig in der Immunantwort gegenüber Listerien zu sein scheinen: Es kam nach experimenteller Infektion mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) zur Freisetzung von Mip-1 und -2 in meningealen Makrophagen und Leukozyten der Maus (Seebach *et al.*, 1995), zur Freisetzung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN $\gamma$  und GM-CSF in Nierenzellen der Maus (Iizawa *et al.*, 1992), zur Freisetzung von Mip-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10 und IL-13 in Makrophagen der Maus (Fleisch *et al.*, 1998), sowie zur Freisetzung von IL-6, IL-8 und GM-CSF in humanen Endothelzellen (Rose *et al.*, 2001). Diese Vielfalt an Daten macht deutlich, dass *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) eine Vielzahl von Zellen und Zytokinen aktiviert, die wichtig für die Immunantwort sind, dennoch gibt es sicherlich einige, die für die Eliminierung des Erregers von größerer Bedeutung sind als andere. Beispielsweise kam es bei 26 Patienten, die immunsupprimierende TNF $\alpha$ -Inhibitoren einnahmen, zu einer Infektion mit *L. monocytogenes* (Bowie *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurden die Untersuchungen im Zusammenhang mit der *L. monocytogenes*-bedingten Immunantwort und Histonmodifikationen von Endothelzellen auf zwei wichtige Modellzytokine fokussiert: Zum einen auf das proinflammatorische und chemotaktische IL-8, welches zur Rekrutierung von polymorphkernigen Granulozyten an den Entzündungsort und zur lokalen Inflammation des Gewebes führt (Strieter, 2002), zum anderen auf IFN $\gamma$ , das für die frühe Immunantwort gegenüber intrazellulären Bakterien wie z. B. Listerien (Roesler *et al.*, 1999; Thale und Kiderlen, 2005) und Chlamydien (Boehm *et al.*, 1997) wichtig ist und den

bakteriellen Austritt aus den Phagosomen von Makrophagen hemmt (Portnoy *et al.*, 1989). Es bleibt offen, welche klinische Relevanz die hier in Endothelzellen zusätzlich gemessenen T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 in der Immunantwort gegenüber *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) haben.

Auch der Erreger *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) induzierte in humanen Endothelzellen nach Infektion eine Vielfalt von Chemoattraktoren, proinflammatorischen Zytokinen und myeloiden Wachstumsfaktoren, die in der Wirtsabwehr gegenüber *C. pneumoniae* eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Beispielsweise induzierte *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) Mip-1 $\beta$ , das zur Aktivierung von Leukozyten beiträgt (Kasama *et al.*, 1993), sowie den Faktor G-CSF, der für die Aktivierung ausgereifter neutrophiler Granulozyten zuständig ist (Anderlini *et al.*, 1996) und den Faktor GM-CSF, der die Proliferation von Makrophagen fördert (Biwa *et al.*, 2000).

Der endothelialen Infektion mit *C. pneumoniae* gilt ein besonderes Interesse, da sie als Auslöser endothelialer Inflammation gesehen wird, die auch vaskuläre Läsionen zur Folge haben kann (Liuba *et al.*, 2000). Die Möglichkeit, dass eine Infektion mit *C. pneumoniae* in Zusammenhang mit Arteriosklerose besteht, führte dazu, dass sich viele Studien mit den Zytokineffekten nach Stimulation mit *C. pneumoniae* in humanen Endothelzellen und glatten Muskelzellen beschäftigten, in denen IL-6, IL-8 und MCP-1 freigesetzt wurden (Yang *et al.*, 2003a), darüber hinaus löste eine Infektion mit *C. pneumoniae* auch in Makrophagen die Freisetzung von IL-6, IL-8 und IFN $\gamma$  aus (Kaukoranta-Tolvanen *et al.*, 1996).

Das proinflammatorische Zytokin IL-8 sollte in der vorliegenden Arbeit auch für den Erreger *C. pneumoniae* (ATCC VR 1310, CWL-029) als Modellzytokin in Bezug auf die Untersuchung der endothelialen Immunantwort gelten und wurde deshalb exemplarisch für die Untersuchung von intrazellulären Signalwegen und Histonmodifikationen gewählt. Fernerhin scheint auch IFN $\gamma$  bei der Immunantwort gegenüber Chlamydien eine besondere Rolle zu spielen: IFN $\gamma$  beeinträchtigte die *C. pneumoniae*-Infektion von Makrophagen (Carlin und Weller, 1995; Mannonen *et al.*, 2004); Mäuse, denen IFN $\gamma$ -Rezeptoren fehlten, waren sensitiver gegenüber einer *C. pneumoniae*-Infektion (Rottenberg *et al.*, 1999). Weiterhin wurde das chlamydiale Wachstum in HEp-2-Zellen durch IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  gehemmt (Summersgill *et al.*, 1995).

Von klinischer Relevanz in Bezug auf die *C. pneumoniae*-Infektion scheinen fast alle Zytokine zu sein, die in der vorliegenden Arbeit durch den Erreger *C. pneumoniae*

(ATCC VR-1310, CWL-029) in humanen Endothelzellen induziert wurden, wobei einige in Verbindung mit der Arteriosklerose gebracht werden können: In arteriosklerotischen Mäusen waren MCP-1 und MIP-1 $\beta$  erhöht (Lutgens *et al.*, 2005) ebenso konnte eine Erhöhung von MCP-1 und IL-6 in Patienten mit myokardialen Infarkten beobachtet werden (Ikeda, 2003). Weiterhin konnten IL-6 und IL-8 signifikant erhöht in Proben von arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (Kato *et al.*, 1999).

### **5.1.2 Histonmodifikationen hervorgerufen durch TSA und SAHA führen zu Veränderungen der Erreger-bedingten Zytokinexpression**

Trichostatin A (Yoshida *et al.*, 1990), ein Produkt von *Streptomyces*, und die synthetische Substanz SAHA (Richon *et al.*, 1998) sind HDAC-Inhibitoren, die mit der katalytischen Seite von HDAC interagieren und die Substratbindung verhindern (Marks *et al.*, 2001). Dadurch unterbinden sie die katalytische Funktion von HDAC, Azetylgruppen von Lysinresten der Histone zu lösen (Marks *et al.*, 2004). In vitro bewirken sie den Stillstand des Zellzyklus und führen zur Apoptose und/oder Differenzierung in kultivierten, transformierten Zellen (Marks *et al.*, 2001). Weiterhin haben sie einen inhibierenden Effekt auf das Zellwachstum von vermutlich allen transformierten Zelltypen, einschließlich Zelllinien, die sowohl aus hämatologischen wie auch epithelialen Tumoren stammen (Marks *et al.*, 2001). Beispielsweise konnte der HDAC-Inhibitor SAHA in Tiermodellen das Tumorstadium unterbinden (Marks *et al.*, 2000) und wurde darüber hinaus bereits erfolgreich in klinischen Studien der Phase I bei Patienten mit soliden und hämatologischen Malignomen getestet (Kelly *et al.*, 2005). Der Mechanismus des antiproliferativen Effekts durch SAHA impliziert die Veränderung der Genexpression entweder durch die direkte Veränderung der Chromatinstruktur als Konsequenz der Akkumulation azetylierter Histone oder durch die Aktivitätsbeeinflussung von Transkriptionsfaktoren, weil die Azetylierung zu einer Strukturveränderung der Komponentenproteine von Transkriptionsfaktoren führt (Kelly und Marks, 2005).

TSA bewirkte in humanen Endothelzellen der Nabelvene (HUVEC) die Panazetylierung von Histon H4 des *i18*-Genpromotors. Diese Beobachtung wird durch zwei Studien unterstützt: Yoshida *et al.* fanden heraus, dass TSA bereits in sehr geringen Konzentrationen zu einer spezifischen Hemmung der HDAC und einem verstärkten Azetylierungsstatus von Histonen in verschiedenen Zelllinien der Maus, der Ratte und des Menschen führt (Yoshida *et al.*, 1990), und Hoshimoto *et al.* konnten zeigen, dass TSA einen erhöhten

## DISKUSSION

---

Azetylierungsstatus von Histon H4 des *il8*-Genpromotors in differenzierten Caco-2-Zellen bewirkte (Hoshimoto *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Azetylierung von H4 des *il8*-Genpromotors eine entscheidende Bedeutung für die Initialisierung der Gentranskription des proinflammatorischen *il8*-Gens spielt.

Ferner konnte die *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029)- und *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-induzierte proinflammatorische IL-8-Sekretion deutlich durch TSA erhöht werden konnte. Durch Valapour *et al.* wurden in Bezug auf die Zytokinproduktion in T-Zellen infolge einer TSA-Stimulation ähnliche Beobachtungen gemacht: TSA erhöhte signifikant die IL-4-Freisetzung in diesen Zellen (Valapour *et al.*, 2002).

SAHA verstärkte ebenfalls wie der HDAC-Inhibitor TSA signifikant die durch *C. pneumoniae* induzierte IL-8-Produktion in humanen Endothelzellen.

Es scheint, dass die HDAC-Inhibition durch SAHA und damit die temporäre Aufrechterhaltung der Azetylierung von Histonen nicht nur in der Tumor-Therapie von Bedeutung ist, sondern dass auch proinflammatorische Prozesse infolge einer bakteriellen Infektion durch SAHA beeinflusst werden können.

Ob eine verstärkte proinflammatorische Immunantwort gegenüber *L. monocytogenes* oder *C. pneumoniae* infolge der experimentell erzeugten HDAC-Inhibition durch TSA und SAHA positiv zu werten ist, bleibt offen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Der HDAC-Inhibitor TSA erhöhte in humanen Endothelzellen die Erreger-bedingte IL-8-Freisetzung nach einer experimentell erzeugten Infektion zweier verschiedener Erreger (*L. monocytogenes* oder *C. pneumoniae*). Dass diese Beobachtung auch für einen weiteren bakteriellen Erreger zutrifft, belegt eine Studie von Haller *et al.*: TSA blockierte den inhibitorischen Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die *B. vulgatis*/LPS-induzierte Histonphosphorylierung/-azetylierung des Histons H3 und erhöhte, wie für LPS gezeigt, durch diese Blockade signifikant die LPS-bedingte IL-6-Sekretion (Haller *et al.*, 2003). Diese Studie wurde in intestinalen Epithelzellen der Maus durchgeführt, was einen Hinweis darauf liefert, dass die HDAC-Inhibition in verschiedenen Zellen ähnliche Effekte herbeiführt. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte der gleiche Effekt von TSA und SAHA in Endothelzellen verschiedener Herkunftsorte gezeigt werden: Für den Erreger *C. pneumoniae* wurde demonstriert, dass die durch ihn hervorgerufene IL-8-Sekretion nach HDAC-Inhibition mittels SAHA und TSA in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) und Aorta (HAEC) erhöht wurde.

## DISKUSSION

---

Trotz dieser Beobachtungen lassen sich Histonmodifikationen in humanen Endothelzellen nach Erreger-bedingter Stimulation nicht generalisieren, und es erfordert näher gehende Untersuchungen hinsichtlich der Fragestellungen, ob erregerspezifisch und/oder zellabhängig Chromatinveränderungen induziert werden und welche Zytokine dabei durch Histonmodifikationen kontrolliert werden.

Die hier vorliegende Arbeit liefert erste Ansätze zur genaueren Untersuchung der Chromatinveränderung verschiedener Zytokine nach Infektion mit *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) in humanen Endothelzellen: Nach HDAC-Inhibition mittels TSA wurde neben der *C. pneumoniae*-bedingten IL-8- und IFN $\gamma$ -Sekretion auch die IL-6-, G-CSF-, MIP-1 $\beta$ - und GM-CSF-Sekretion signifikant gesteigert. Zu bedenken bleibt, dass Leoni et al. herausfanden, dass der HDAC-Inhibitor SAHA in Monozyten/Makrophagen sowohl in vitro als auch in vivo die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN- $\gamma$  hemmte (Leoni et al., 2002). Durch diese Beobachtung liegt die Vermutung nahe, dass HDAC-Inhibitoren tatsächlich zellspezifisch und zytokinspezifisch zu einer anti-inflammatorischen Immunantwort beitragen (Rahman et al., 2004b).

Ferner bleibt offen, warum es zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der IFN $\gamma$ -Freisetzung nach *L. monocytogenes*- und *C. pneumoniae*-Infektion kam: Zwar wurde durch beide Bakterien in humanen Endothelzellen IFN $\gamma$  freigesetzt, dennoch konnte die Sekretion nur im Falle der Chlamydien-Infektion nach HDAC-Inhibition mittels TSA erhöht werden. Einen Erklärungsansatz liefert möglicherweise eine Studie von Rothfuchs et al.: In Knochenmarkszellen der Maus wurde nach Infektion mit dem Erreger *C. pneumoniae* eine IFN $\gamma$ -Expression beobachtet, die zum einen über den TLR4-MyD88-IFN $\alpha/\beta$ -abhängigen Signalweg kontrolliert wurde, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 (STAT1 wird aktiviert durch die Kinase JAK) führte, zum anderen wurde die IFN $\gamma$ -Expression über einen TLR4-unabhängigen Signalweg kontrolliert, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führte (Rothfuchs et al., 2006). Da die durch *C. pneumoniae*-hervorgerufene IFN $\gamma$ -Freisetzung nach HDAC-Inhibition erhöht werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass *C. pneumoniae* in erster Linie über den TLR4-abhängigen Signalweg die IFN $\gamma$ -Expression reguliert, während *L. monocytogenes* diesen Signalweg nicht induzieren kann. Möglicherweise führt der TLR4-unabhängige Signalweg nicht zur Modifikation von Histonen und unterliegt daher keinen Chromatinveränderungen.

### 5.1.3 Histonmodifikationen des *i18*-Genpromotors nach *L. monocytogenes*- und *C. pneumoniae*-Infektion

Durch verschiedene Studien kann belegt werden, dass Chromatinveränderungen die Gentranskription in eukaryontischen Zellen kontrollieren, indem sie die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promotor beeinflussen und Transaktivierungen hervorrufen (Cheung *et al.*, 2000a; Jenuwein und Allis, 2001; Mizzen und Allis, 1998; Turner, 2002). Diese Chromatinveränderungen sind notwendig, weil die DNA im Heterochromatin fest um Histonoktamere gewunden ist und somit unzugänglich für Transkriptionsfaktoren und Enzyme bleibt, die die Transkription regulieren (Wu, 1997). Beispielsweise ändert die Azetylierung bzw. Phosphorylierung von Histonen die Polarität der Histonenden und macht das Histon-DNA-Gerüst zugänglich für Transkriptionsfaktoren und den basalen Transkriptionsapparat (Agalioti *et al.*, 2002; Imhof und Wolffe, 1998).

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass Histonmodifikationen auch die Interaktion zwischen den Erregern *L. monocytogenes* bzw. *C. pneumoniae* und der Aktivierung der humanen Endothelzelle beeinflussen. Derzeit sind nur wenige Studien bekannt, in denen Bakterien-induzierte Histonmodifikationen beschrieben wurden. Dennoch gibt es eine Studie von Haller *et al.* (siehe auch Abschnitt 5.1.2), die belegt dass *Bacteroides vulgatis*, ebenso wie in der vorliegenden Studie für die Erreger *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) und *C. pneumoniae* (ATCC VR11310, CWL-029) gezeigt, zur Phosphorylierung und Azetylierung des Histons H3 führt (Haller *et al.*, 2003). Diese Beobachtung wurde in einer intestinalen Epithelzelllinie der Maus nach 15-60 min gemacht, wobei die Phosphorylierung in diesem Fall an Serin 10 und die Azetylierung an Lysin 9 des Histons H3 detektiert wurden (Haller *et al.*, 2003). Histonmodifikationen im Zusammenhang mit der Zellaktivierung durch bakterielle Erreger scheinen sich somit nicht nur auf einen Zelltyp/Lebewesen zu beschränken. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Phosphorylierung/Azetylierung des Histons H3 und die Panazetylierung des Histons H4 des *i18*-Genpromotors sowohl durch *L. monocytogenes* als auch durch *C. pneumoniae* hervorgerufen wurden. Dabei war zu beobachten, dass es zeitliche Unterschiede zwischen den Erregern gab: Auf Proteinebene konnten 60-180 min nach *L. monocytogenes*-Infektion H3- und H4-Modifikationen beobachtet werden, wohingegen im Falle der *C. pneumoniae*-Infektion nach 120-180 min bereits eine starke Abnahme der Histonmodifikationen erkennbar war. Demgegenüber induzierte *L. monocytogenes* die Phosphorylierung/Azetylierung von Histon H3 des *i18*-Genpromotors bereits nach 60-120 min, die Panazetylierung von Histon H4

## DISKUSSION

---

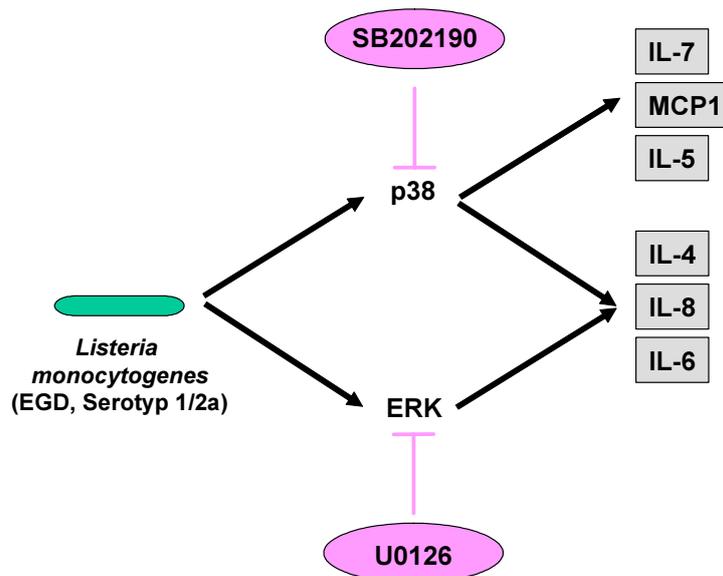
des *i18*-Genpromotors jedoch erst nach 120-180 min. Ferner zeigte der *i18*-Genpromotor nach *C. pneumoniae*-Infektion eine Phosphorylierung/Azetylierung des Histons H3 zeitgleich mit der Panazetylierung des Histons H4 nach 60 min, die jedoch nach 120 min für beide Histone nicht mehr nachweisbar war. Hier wird deutlich, dass Histonmodifikationen infolge verschiedener Bakterien in humanen Endothelzellen ganz anders aktiviert werden. *Listeria monocytogenes* und *Chlamydomphila pneumoniae* haben unterschiedliche Virulenzfaktoren über die sie in die Zelle gelangen. Dadurch gibt es sicherlich zeitliche Unterschiede im Hinblick auf die Invadierung von Endothelzellen und Replikation in diesen Zellen, die schließlich auch zu zeitlichen Unterschieden bzgl. der Aktivierung von Histonmodifikationen führen kann. Darüber hinaus werden beide Bakterien teilweise von unterschiedlichen PRR erkannt: z. B. wird *C. pneumoniae* über TLR4 erkannt, *L. monocytogenes* nicht. Dadurch können zusätzlich zu gemeinsamen Signalwegen (z. B. über Nod1) unterschiedliche Signalwege aktiviert werden, die verantwortlich für zeitliche Unterschiede im Hinblick auf Histonmodifikationen sein können. Des Weiteren bleibt zu bedenken, dass es weitere, bislang unbekannte PRR gibt, über die möglicherweise *L. monocytogenes* und *C. pneumoniae* erkannt werden. Offen bleibt, warum im Falle der Listerien-Infektion zeitliche Unterschiede hinsichtlich der Modifikation von H3 und H4 bestehen.

Bestätigt werden konnte für die *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-bedingte Genaktivierung von *i18*, dass Histon-Azetyltransferasen und Histon-Deazetylasen als Gegenspieler fungieren (Struhl, 1998): Während die HAT CBP nach Bakterieninfektion vermehrt an den *i18*-Genpromotor band, konnte die HDAC1 nur noch vermindert am Promotor des *i18*-Gens detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) und *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) zeitabhängig zur Phosphorylierung/Azetylierung des Histons H3 und zur Panazetylierung des Histons H4, insbesondere am *i18*-Genpromotor führen. Es besteht jedoch weiterhin Unklarheit darüber, welche spezifischen Histonmodifikationen außerdem nach bakterieller Infektion induziert werden, ob Histonmodifikationen an weiteren Promotoren auftreten, durch welche bakteriellen Strukturen (PAMP) sie aktiviert werden und über welche PRR diese Modifikationen vermittelt werden.

### MAPK-abhängige Histonmodifikationen am *il8*-Genpromotor nach *L. monocytogenes*-Infektion

*L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte eine p38-MAPK- und MEK1-abhängige, Freisetzung von IL-4, IL-6 und IL-8. Die Regulation der IL-8-Expression war Inhalt einer Vielzahl von Studien (Strieter, 2002). Es konnte unter anderem ein Zusammenhang zwischen MAPK und der Expression von IL-8 gefunden werden: MAPK waren notwendig für die maximale Genexpression von IL-8 in TNF $\alpha$ -exponierten Epithelzellen der Lunge (Li *et al.*, 2002) und LPS-stimulierten humanen Endothelzellen (Hippenstiel *et al.*, 2000). Im Modell der Pneumokokken-infizierten Bronchialepithelzellen wurde die IL-8 Expression durch eine p38-abhängige Phosphorylierung von Serin 536 des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B/p65 reguliert (Schmeck *et al.*, 2004) und auch die *C. pneumoniae* (ATCC VR2282, TW 183)-bedingte IL-8-Freisetzung in humanen Endothelzellen war abhängig von den MAPK p38 und ERK.



**Abbildung 5.1** *Listeria monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte abhängig von ERK1/2 und p38-MAPK die Freisetzung von IL-4, IL-6 und IL-8. Die Freisetzung von IL-7, MCP1 und IL-5 stand nur in Abhängigkeit der p38-MAPK.

Der p38-MAPK Signalweg wird bereits als therapeutisches Target inflammatorischer Erkrankungen angesehen: In Tiermodellen zeigten spezifische p38-Inhibitoren eine antiinflammatorische Wirkung (Kumar *et al.*, 2003; Saklatvala, 2004).

*L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) führte zur JNK-unabhängigen Freisetzung von IL-8. Interessanterweise war in mehreren Studien für die Induktion von Chemokinen in Endothelzellen der JNK-Signalweg nicht von Bedeutung: Sowohl *C. pneumoniae* (ATCC VR2282, TW 183) (Krüll *et al.*, 2004) als auch der intrazelluläre Erreger *Rickettsia rickettsii* aktivierten die p38-MAPK jedoch nicht die JNK (Rydkina *et al.*, 2005). Es ist daher denkbar, dass der JNK-Signalweg in Endothelzellen nach bakterieller Infektion eher von geringerer Bedeutung ist.

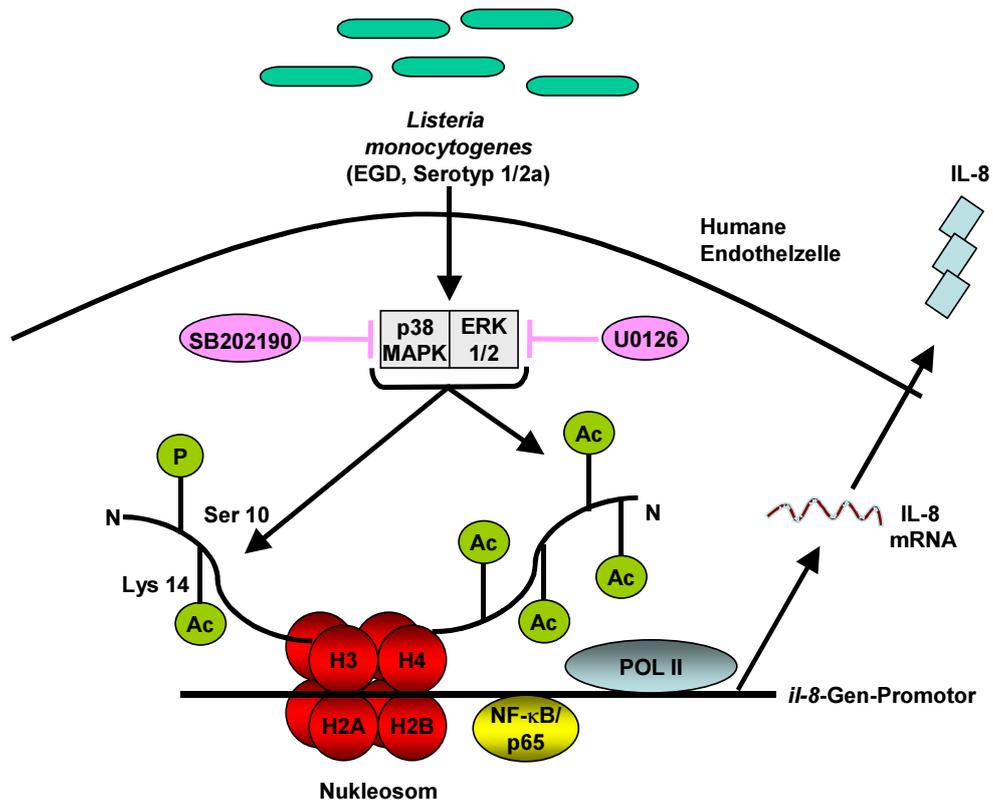
Eine Infektion mit dem Erreger *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) führte in Abhängigkeit der p38-MAPK und ERK zu Histonmodifikationen des *i18*-Genpromotors. Verschiedene Studien geben Hinweise darauf, dass MAPK in Zusammenhang mit Histonveränderungen stehen. Beispielsweise zeigten Crosio *et al.*, dass nach Inkubation mit verschiedenen Rezeptorantagonisten (Dopamin, Azetylcholin) die Kinetik der ERK-Phosphorylierung parallel zur Phosphorylierung des Histons H3 an Serin 10 in Zellen des Maus-Hippocampus stattfindet (Crosio *et al.*, 2003). Eine weitere Studie beobachtete, dass inflammatorische Stimuli (z. B. LPS) p38-MAPK-abhängig zur Phosphorylierung (Ser<sup>10</sup>) und Phosphorylierung/Azetylierung (Ser<sup>10</sup>/Lys<sup>14</sup>) am Histon H3 in dendritischen Zellen des Menschen führen (Saccani *et al.*, 2002). Weiterhin wurde auch eine ERK-Abhängigkeit im Zusammenhang mit der Phosphorylierung an H3 (Ser<sup>10</sup>) und der Azetylierung an H3 (Lys<sup>14</sup>) des Promotors der Protoonkogene *c-jun* und *c-fos* in humanen Fibroblasten beschrieben (Li *et al.*, 2003).

Ferner wurde eine MAPK-Abhängigkeit der Histon-modifizierenden Enzyme CBP (abhängig von p38-MAPK und ERK1/2) und HDAC1 (Abhängig von p38-MAPK) gezeigt. Diese Beobachtung bezüglich CBP erscheint im Zusammenhang mit der Reduktion der Phosphorylierung/Azetylierung von Histon H3 nach MAPK-Inhibition sehr schlüssig, da McManus *et al.* zeigen konnten, dass Histon-Azetyltransferasen wie CBP verantwortlich für die Azetylierung des Histons H3 sind (McManus und Hendzel, 2003).

CBP und HDAC1, die offensichtlich als Gegenspieler in der Regulation der *L. monocytogenes*-bedingten Histonmodifikationen in humanen Endothelzellen fungieren, wurden exemplarisch zur Untersuchung der Histon-modifizierenden Enzyme infolge der *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) gewählt und geben nur einen kleinen Ausschnitt von regulierenden Enzymen wieder. Inwiefern weitere Histon-modifizierende Enzyme an der durch *L. monocytogenes*-vermittelten IL-8-Induktion beteiligt sind, bleibt offen, ebenso die Frage, inwiefern MAPK weitere Enzyme kontrollieren, die zur Phosphorylierung/Azetylierung

## DISKUSSION

von H3 bzw. Panazetylierung von H4 des *il8*-Genpromotors führen.



**Abbildung 5.2** *Listeria monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) führte zu einer Phosphorylierung/Azetylierung am Histon H3 (Ser10/Lys14) und einer Panazetylierung am Histon H4 des *il8*-Genpromotors. Diese Modifikationen konnten mittels des p38-MAPK-Inhibitors SB202190 und des MEK1-Inhibitors U0126 gehemmt werden. Auch die Bindung der RNA Polymerase II und der NF-κB-Untereinheit p65 an den *il8*-Genpromotor waren abhängig von p38-MAPK und ERK1/2. Darüber hinaus wurde die *L. monocytogenes*-bedingte Freisetzung von IL-8 nach Inhibition mittels SB202190 und U0126 signifikant reduziert.

MAPK hatten keinen Einfluss auf die Modifikationen des *ifn $\gamma$* -Genpromotors. Diese Beobachtung macht die genspezifische Regulation von Chromatinveränderungen sehr deutlich. Hinweise auf dieses Phänomen lieferten bereits die Ergebnisse hinsichtlich der Zytokinsekretion in Abbildung 4.6: Das durch *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte IFN $\gamma$ -Signal in humanen Endothelzellen war weder durch den p38-MAPK- noch durch den ERK1/2-Inhibitor signifikant zu hemmen. Vielmehr wiesen unbehandelte HUVEC eine vermehrte basale Phosphorylierung/Azetylierung der Histone H3/H4 des Promotors auf,

---

die nach *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-Infektion nicht steigerbar war. Dass es dennoch zur Gentranskription und Produktion von IFN $\gamma$  kam, wurde nach Infektion durch die Bindung der Polymerase an den Promotor deutlich, die ein Indikator für die Initiierung der Transkription ist. Diese wurde jedoch nicht in Abhängigkeit von MAPK induziert. Stetson et al. stellten fest, dass es fundamentale Unterschiede in der Regulation der Aktivität des *ifn $\gamma$* -Genpromotors in verschiedenen Zelltypen gibt (Stetson et al., 2003). Diese Beobachtung könnte zu der Hypothese passen, dass die *ifn $\gamma$* -Genregulation in humanen Endothelzellen unabhängig von MAPK erfolgen kann. Unterstützt wird diese Vermutung durch zwei weitere Studien: In T<sub>H</sub>1-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von IFN $\gamma$  abhängig von der p38-MAPK (Rincon et al., 1998), jedoch nicht von ERK1/2 oder JNK war (Zhang und Kaplan, 2000). Fraglich bleibt, warum es zur IFN $\gamma$ -Freisetzung ohne Histonmodifikationen kam. Hinweise liefert eine Studie von Tato et al., die herausfanden, dass NK-Zellen der Maus in der Lage waren, IFN $\gamma$  ohne Chromatinveränderungen des *ifn $\gamma$* -Genpromotors zu produzieren (Tato et al., 2004). Darüber hinaus konnte in einer Studie von Zhu et al. gezeigt werden, dass in die Determinierung gewebsspezifischer und signalspezifischer Expression von IFN $\gamma$  in T-Zellen Regionen weiter distal vom Promotor involviert waren (Zhu et al., 2001) und auch in NK-Zellen und T<sub>H</sub>1-Zellen kam es im Bereich distal des *ifn $\gamma$* -Genpromotors nach Stimulation mit IL-2 zur Azetylierung von Histon H3 und H4 (Bream et al., 2004). Es ist denkbar, dass humane Endothelzellen, die IFN $\gamma$  kurz nach der Infektion mit Listerien freisetzen, keine Chromatinveränderungen des *ifn $\gamma$* -Genpromotors benötigen und somit schnell zu einer Genexpression fähig sind. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass die Regulation des IFN $\gamma$ -Promotors der Induktion verschiedener Signalwege zu unterliegen scheint (Rothfuchs et al., 2006), die stimulusspezifisch aktiviert werden und möglicherweise nicht prinzipiell die Chromatinveränderung des Promotors in humanen Endothelzellen ausschließen: In der vorliegenden Arbeit wurde nach HDAC-Inhibition die *C. pneumoniae*-bedingte IFN $\gamma$ -Freisetzung signifikant erhöht (siehe auch Abschnitt 5.1.2).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *L. monocytogenes*-vermittelte Phosphorylierung/Azetylierung des Histons H3 und die Panazetylierung des Histons H4, insbesondere am *i18*-Genpromotor, abhängig von der p38-MAPK und von ERK1/2 sind. Darüber hinaus besteht auch eine p38-MAPK- und ERK1/2-Abhängigkeit im Hinblick auf die Bindung der RNA Polymerase II, von p65 und CBP an den *i18*-Genpromotor sowie eine p38-MAPK-Abhängigkeit der Bindung des Histon-modifizierenden Enzyms HDAC1 an den Promotor. Ob diese Beobachtung spezifisch für bestimmte Histonmodifikationen ist, lässt

sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht sagen. Am *ifn $\gamma$* -Genpromotor fand sich jedoch, dass durchaus Unterschiede bzgl. der Chromatinveränderung eines Genpromotors bestehen. Dies weist darauf hin, dass die Regulation verschiedener Gene sehr spezifisch verläuft und dass individuell für jedes Gen Chromatinveränderungen geprüft werden müssen.

### **5.1.4 Bedeutung der Rho-GTPasen für die *C. pneumoniae*- und *L. monocytogenes*-bedingten Histonmodifikationen des *i18*-Genpromotors**

Rho-Proteine, insbesondere Rac1, fungieren als Signalmoleküle innerhalb der intrazellulären Signalwege von z. B. IL-1 $\beta$  (Singh *et al.*, 1999), TNF $\alpha$  (Hippenstiel *et al.*, 2002b), TLR2 (Arbibe *et al.*, 2000) und TLR4 (Hippenstiel *et al.*, 2000). Weiterhin stehen Rho-Proteine mit der inflammatorischen Aktivierung von Endothelzellen in Verbindung (Hippenstiel *et al.*, 2000; Hippenstiel *et al.*, 2002a; Schmeck *et al.*, 2003).

Darauf beruhend wurde in dieser Arbeit die Hypothese geprüft, dass Rho-GTPasen die proinflammatorische Zytokinexpression, insbesondere des Modellzytokins IL-8, infolge einer Endothelzell-Infektion mit den Erregern *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) und *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) steuern. Es kam bei beiden Erregern zu einer Rac1-abhängigen IL-8-Freisetzung in humanen Endothelzellen. Dass Rac1 eine entscheidende Rolle in der Endothelzell-vermittelten Induktion proinflammatorischer Zytokine nach *L. monocytogenes*-Infektion spielt, wurde unter anderem durch eine Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt, die auch für die Zytokine G-CSF, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-7, IL-13, MIP-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  eine Rac1-abhängige Freisetzung in Endothelzellen feststellen konnten (Schmeck *et al.*, 2006a). Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit deutlich, dass *C. pneumoniae* neben IL-8 auch IL-6, G-CSF, MIP-1 $\beta$ , GM-CSF und IFN $\gamma$  Rac1-abhängig freisetzte. Inwiefern Rho-GTPasen eine kontrollierende Funktion auf Histonmodifikationen in humanen Endothelzellen haben, war bislang ungeklärt.

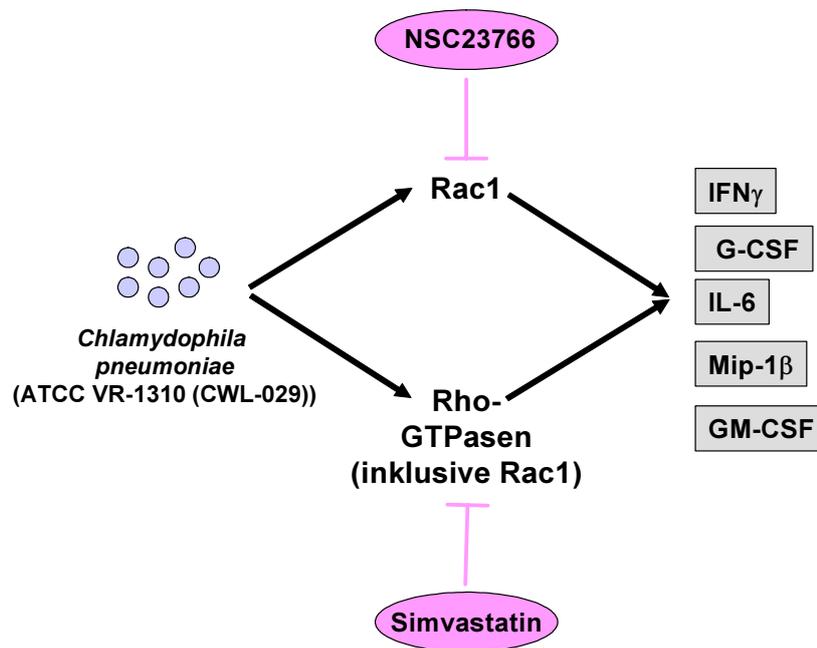
Die Expression von IL-8 ist abhängig von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Hoffmann *et al.*, 2002), darüber hinaus fanden Arbibe *et al.* heraus, dass eine Rac1-abhängige Phosphorylierung von NF- $\kappa$ B einen regulierenden Einfluss auf die IL-8-Expression hat (Arbibe *et al.*, 2000).

Neben der Phosphorylierung/Aktivierung von NF- $\kappa$ B wurde gezeigt, dass auch die Bindung dieses Transkriptionsfaktors an den *i18*-Genpromotor in direkter Abhängigkeit von Rac1 steht.

Diese Beobachtung scheint tatsächlich Rac1-abhängigen Histonmodifikationen zu unterliegen: So reduzierte der Rac1-Inhibitor NSC23766 die durch *L. monocytogenes* und *C. pneumoniae* hervorgerufene Phosphorylierung/Azetylierung von H3 und die Panazetylierung von H4 des *i18*-Genpromotors. Die hier fehlenden Histonmodifikationen von H3 und H4 nach Inhibition von Rac1 scheinen dafür verantwortlich zu sein, dass weder die RNA Polymerase II noch NF- $\kappa$ B an den *i18*-Genpromotor binden konnten. Ob diese Beobachtung generell für bakterielle Erreger zutrifft bleibt offen.

Neben Rac1 hemmte auch Simvastatin die durch *C. pneumoniae* induzierte IL-6-, IL-8-, G-CSF-, MIP-1 $\beta$ -, GM-CSF- und IFN $\gamma$ -Freisetzung. Simvastatin gehört zur Gruppe der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, die nicht nur durch die Cholesterinreduktion protektiv auf das Gefäßsystem wirken, sondern zusätzlich einen hemmenden Effekt auf Rho-Proteine haben (Rikitake und Liao, 2005; Takemoto und Liao, 2001). Einige Studien haben in Tiermodellen und in vitro einen antiinflammatorischen Effekt der Statine gezeigt. Dieser wird zum Teil auf die inhibitorische Wirkung dieser Substanzklasse auf die Rho-Proteine zurückgeführt (Ni *et al.*, 2001). Neben Simvastatin gibt es weitere Statine, die die inhibitorische Wirkung auf Rho-Proteine deutlich machen: Mevastatin hemmte die *C. pneumoniae*-bedingte Expression von Rac1 und RhoA (Wissel *et al.*, 2005), und Cerivastatin inhibierte in glatten Gefäßmuskelzellen die *C. pneumoniae*-induzierte Aktivierung von Rac1 und RhoA und die Expression von NF- $\kappa$ B (Dechend *et al.*, 2003). Darüber hinaus wird auch eine inhibierende Funktion der Statine auf Chlamydien in zwei weiteren Studien deutlich: Simvastatin verminderte während einer akuten Infektion mit *C. pneumoniae* in Mäusen die Anzahl von Chlamydien in der Lunge und verstärkte die pulmonale inflammatorische Antwort der Maus (Erkkilä *et al.*, 2005). Mevastatin blockierte die Invasion von *C. pneumoniae* in HEp-2-Zellen (Mahony, 2002).

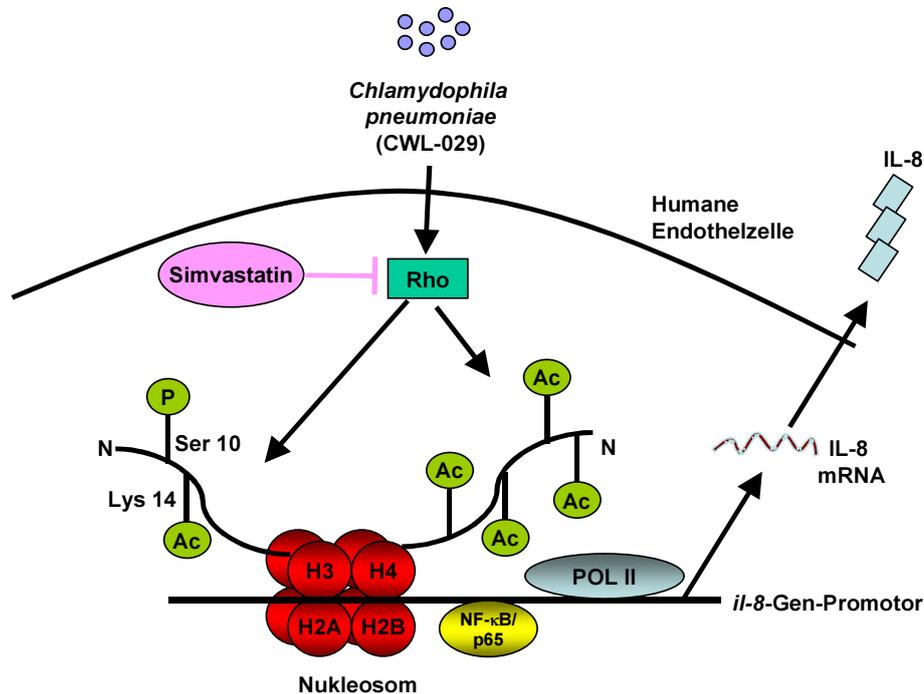
Da verschiedene Studien einen Zusammenhang zwischen dem Erreger *C. pneumoniae* und der Arteriosklerose nachgewiesen haben (Arteriosklerose kann aus der Kombination von chronischer Inflammation und einer Überladung von Cholesterin in Gefäßmakrophagen entstehen) (Ross, 1999), darüber hinaus Simvastatin als Rho-Inhibitor sowie Cholesterinsenker der Entstehung von Arteriosklerose entgegen zu wirken scheint und zusätzlich eine hemmende Wirkung auf Chlamydien hat, war es in der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse den Einfluss von Simvastatin auf die Chlamydien-vermittelte Aktivierung von Rho-GTPasen in humanen Endothelzellen zu untersuchen.



**Abbildung 5.3** *C. pneumoniae* induzierte abhängig von Rho-GTPasen, speziell abhängig von Rac1 die Freisetzung von IL-6, G-CSF, IL-8, Mip-1 $\beta$ , GM-CSF und IFN $\gamma$ .

Simvastatin inhibierte die *C. pneumoniae*-induzierte Panazetylierung von H4 und die Phosphorylierung/Azetylierung von H3 des *il8*-Genpromotors, sowie die Rekrutierung der RNA Polymerase II und NF- $\kappa$ B/p65 an den *il8*-Genpromotor. (Simva)Statine scheinen somit, ebenso wie der Rac1-Inhibitor NSC23766, die *C. pneumoniae*-bedingte inflammatorische Aktivierung der (Endothel)Zellen zu reduzieren. Dies würde bedeuten, dass Statine im Falle einer arteriosklerotischen Erkrankung, den gefäßschädigenden Effekt der Chlamydien reduzieren könnten. Diese Überlegungen sind jedoch rein hypothetisch, und es bedarf weiterer Untersuchungen insbesondere in vivo, um diese These zu unterstützen.

Bislang konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029)-bedingte Histonmodifikationen in humanen Endothelzellen durch Rho-Proteine, insbesondere Rac1 gesteuert werden und es abhängig von Rho-GTPasen zur proinflammatorischen Freisetzung verschiedener Zytokine in humanen Endothelzellen kommt.



**Abbildung 5.4** Die *C. pneumoniae*-bedingte Phosphorylierung/Azetylierung am Histon H3 (Ser10/Lys14) und Panazetylierung am Histon H4 des *il8*-Genpromotors sowie die Bindung der RNA Polymerase II und der NF-κB-Untereinheit p65 an den *il8*-Genpromotor wurden durch Simvastatin reduziert. Darüber hinaus reduzierte Simvastatin signifikant die *C. pneumoniae*-bedingte IL-8-Freisetzung in humanen Endothelzellen.

### 5.1.5 Zytokininduktion und Histonmodifikationen im Zusammenhang mit Intrazellularität und Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* und *C. pneumoniae*

Während es sich bei dem Erreger *L. monocytogenes* um einen fakultativ intrazellulären Erreger handelt, stellt *C. pneumoniae* einen obligat intrazellulären Erreger dar. In dieser Arbeit wurde in Ansätzen versucht festzustellen, inwieweit die Intrazellularität der Bakterien bzw. das Vorhandensein von Virulenzfaktoren für die Zytokininduktion und für Histonmodifikationen in humanen Endothelzellen von Bedeutung sein könnten.

Im Vergleich zum pathogenen Stamm EGD (Serotyp 1/2a) von *L. monocytogenes* wurden in der vorliegenden Arbeit apathogene Listerien des Stammes *L. innocua* (ATCC 33090 (INN), Serotyp 6b) verwendet. Während die chromosomale Region von *L. monocytogenes* einen so genannten „Virulenz-Gen-Cluster“ (prfA, plcA, hly, mpl, actA und plcB) beinhaltet, der für Virulenzgene kodiert, die wichtig für das Überleben der Listerien nach einer bakteriellen

Infektion sind, ist dieser Virulenz-Gen-Cluster in der chromosomalen Region der apathogenen Spezies *L. innocua* nicht vorhanden (Chakraborty *et al.*, 2000). Die apathogene Spezies *L. innocua* war nicht in der Lage, Endothelzellen zu invadieren. Die pathogene Spezies *L. monocytogenes* konnte demgegenüber in die Endothelzelle gelangen. Dieses wird durch die Rekrutierung des Wirtszell-F-Aktins deutlich, welches zur Aktinschweifbildung (Stevens *et al.*, 2006) in Abbildung 4.1 führte. Selbiges fanden Greiffenberg *et al.* bzw. Slaghuis *et al.* heraus (Greiffenberg *et al.*, 2000; Slaghuis *et al.*, 2004). Darüber hinaus führte *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) in der vorliegenden Arbeit in humanen Endothelzellen zur Freisetzung der Zytokine IL-8 und IFN $\gamma$ , während diese Zytokine infolge einer Infektion mit *L. innocua* (ATCC 33090 (INN), Serotyp 6b) nicht freigesetzt wurden. Die Ursache dafür, dass *L. innocua* weder in die humane Endothelzelle gelangte, noch in der Lage war, die Freisetzung von Zytokinen zu bewirken, scheint tatsächlich im Fehlen des „Virulenz-Gen-Clusters“ begründet zu sein. Diese Vermutung wird durch eine Studie von Opitz *et al.* unterstützt: Listerienmutanten, denen wichtige Virulenzfaktoren wie z. B. Internalin B oder Listeriolysin O fehlten, gelangten nur vermindert oder gar nicht in humane Endothelzellen und induzierten im Vergleich zu *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) kaum IL-8 in humanen Endothelzellen (Opitz *et al.*, 2006). Darüber hinaus zeigte sich in der humanen Enterozyten-ähnlichen Zelllinie Caco-2, dass nur pathogene Listerienspezies in der Lage waren, ihre eigene Phagozytose zu induzieren (Gaillard *et al.*, 1987). Diese Studien und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Grund zu der Annahme, dass die Invasion von Endothelzellen durch Listerien die Voraussetzung für die Aktivierung von Endothelzellen ist und dass das Vorhandensein von Virulenzfaktoren notwendig für die Expression des Zytokins IL-8 zu sein scheint, dessen Promotor nach Infektion mit *L. monocytogenes* Chromatinveränderungen in Form von Histonmodifikationen unterliegt.

Unter diesen Gesichtspunkten stellte sich auch für den Erreger *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) die Frage, inwieweit die Intrazellularität bzw. Virulenzfaktoren dieses Bakteriums verantwortlich für die Induktion von Zytokinen und Chromatinveränderungen in humanen Endothelzellen sind.

Hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) führten nicht zu Histonmodifikationen. Krüll *et al.* konnten zeigen, dass die aktive Endothelzellinvasion durch *C. pneumoniae* nach Hitzeinaktivierung nicht mehr stattfindet (Krüll *et al.*, 2004) und die Aktivierung von humanen Endothelzellen ausbleibt (Opitz *et al.*, 2005). Weiterhin führten die Hitzeinaktivierung des Hitzeschockproteins GroEl-1 sowie die Hitzeinaktivierung von

*C. pneumoniae* (ATCC, TW-183) zu einer signifikanten Reduktion der GM-CSF-Freisetzung (Krüll *et al.*, 2005a). Diese Beobachtung konnte bzgl. GroEl-1 in humanen Endothelzellen für IL-8 bestätigt werden (persönliche Mitteilung, M. Krüll). Es ist denkbar, dass Histonmodifikationen, die nach Hitzeinaktivierung nicht mehr auftreten, tatsächlich auf das Hitzeschockprotein oder weitere Virulenzfaktoren zurückzuführen sind, die über eine extrazellulär-induzierte Signalkaskade (z. B. über TLR4) die Chromatinveränderungen des *il8*-Genpromotors und schließlich die Freisetzung des Zytokins IL-8 in humanen Endothelzellen bewirken. Neben dem chlamydialen Hitzeschockprotein scheint auch *ompA* eine Rolle bei der Zellaktivierung zu spielen: Ein Antikörper gegen *ompA* gerichtet reduzierte die *C. pneumoniae* (ATCC, TW-183)-bedingte Freisetzung von GM-CSF, und das rekombinante Hitzeschockprotein 60 von *C. pneumoniae* (cHsp60, GroEL-1) erhöhte signifikant die GM-CSF-Freisetzung in Epithelzellen (Krüll *et al.*, 2005a), während die *C. pneumoniae* (ATCC, TW-183)-bedingte Freisetzung von GM-CSF nicht durch Polymyxin B gehemmt wurde, welches chlamydiales LPS blockiert (Krüll *et al.*, 2005a).

Offen bleibt, ob die Invasion von Endothelzellen durch Chlamydien im Zusammenhang mit Histonmodifikationen notwendig ist. Hitzelabile äußere Membranproteine und Hitzeschockproteine der Chlamydienmembran scheinen verantwortlich für die Zielzellaktivierung zu sein, die durchaus von extrazellulär erfolgen kann. Hitzeresistente Strukturen wie das chlamydiale LPS erscheinen bei der Zellaktivierung von geringerer Bedeutung.

Weitaus klarer aber dennoch erstaunlich stellte sich die Interaktion des Erregers *C. trachomatis* (CTK, Serovar K) mit humanen Endothelzellen in Bezug auf die Notwendigkeit der Zellinvasion dar. *C. trachomatis* (CTK, Serovar K) infizierte zwar in der vorliegenden Arbeit humane Endothelzellen (Daten nicht gezeigt), induzierte jedoch keine Histonmodifikationen. Es besteht die Vermutung, dass humane Endothelzellen (in diesem Fall HUVEC) nicht effizient von *C. trachomatis* infiziert werden: Die Infektion von HUVEC mit *C. trachomatis* spiegelte sich in nur vielen kleinen atypischen Einschlusskörperchen (Serovar K) wieder, und diese „suboptimale“ Infektion scheint verantwortlich für die beschriebenen Effekte zu sein (Krüll *et al.*, 2004). Ferner führte *C. trachomatis*, speziell das Serovar K, im Gegensatz zu *C. pneumoniae* (ATCC VR2282, TW-138) weder zur Phosphorylierung oder Azetylierung von MAPK noch zur Expression proinflammatorischer Zytokine (z. B. IL-8) oder Adhäsionsfaktoren (ICAM-1) (Krüll *et al.*, 2004). Es besteht die Vermutung, dass Endothelzellen nicht die primären Zielzellen für das Serovar K sind:

Ogleich HUVEC produktiv infiziert wurden, scheint das Wachstum von *C. trachomatis* (CTK, Serovar K) in diesen Zellen gehemmt zu sein (Krüll *et al.*, 2004). Auch die Serovare E und L2 von *C. trachomatis* zeigten ähnliche Ergebnisse wie das Serovar K: Das Serovar L2 war durchaus in der Lage humane Monozyten zu infizieren, führte jedoch weder zur Aktivierung dieser Zellen noch zu deren Adhäsion an Endothelzellen (May *et al.*, 2003).

Letztendlich scheint die Zytokinantwort der Endothelzelle von der Erkennung des Erregers durch transmembranöse und zytosolische Pattern-Recognition Rezeptoren (PRR) abzuhängen (Bulut *et al.*, 2002; Netea *et al.*, 2002; Opitz *et al.*, 2005; Sasu *et al.*, 2001). Ferner sind Rho-Proteine in den TLR2- und TLR4-Weg integriert (Arbibe *et al.*, 2000; Hippenstiel *et al.*, 2002b; Schmeck *et al.*, 2006b). Die gezeigten Effekte von Simvastatin und NSC23766 scheinen auf die Inhibition von Rho-Protein-abhängigen Signalwegen zurückzuführen zu sein, die nach Erkennung der Erreger initiiert wurden. Offen bleibt, ob eine Notwendigkeit der Zellinvasion durch den Erreger *C. pneumoniae* für die Zytokininduktion und die Modifikation von Histonen besteht.

## 5.2 Diskussion der eingesetzten Materialien und Methoden

### 5.2.1 Auswahl der Zellen

Während des Verlaufs einer systemischen Erkrankung nach Infektion mit den Bakterien *L. monocytogenes* und *C. pneumoniae* stellen Endothelzellen Zielzellen für beide Erreger dar (Drevets *et al.*, 1995; Gieffers *et al.*, 2004b).

Die meisten Versuche wurden unter Verwendung von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) durchgeführt, die wöchentlich frisch isoliert wurden. Dabei wurden diese Zellen in der Regel in der ersten Passage verwendet, wobei zur Erstellung dreier unabhängiger Ergebnisse zu einem Versuch drei verschiedene Nabelschnüre Verwendung fanden. Dabei lieferten die unterschiedlichen Nabelschnüre vergleichbare Ergebnisse. Es ist zu bedenken, dass zeitweise bei der Listerien-Studie die Erregermenge mit einer MOI von 20 auf 10 herabgesetzt werden musste, da die Zellen sonst frühzeitig abstarben. Dieses Phänomen ist eventuell damit zu begründen, dass nicht jede Nabelschnur bzw. die aus ihr isolierten Zellen gleich sensibel auf den Erreger reagierten. Dennoch sind Ergebnisse untereinander durchaus zu vergleichen. HUVEC, als primäre Endothelzellen, eignen sich besonders für Studien, weil sie relativ einfach zu gewinnen sind, mehrfach passagiert (bis zu 3x) werden können und in der Vergangenheit häufig zur Untersuchung

molekularer Mechanismen der Listerien- bzw. Chlamydieninfektion mit Erfolg eingesetzt wurden (Krüll *et al.*, 2004; Rose *et al.*, 2001; Summersgill *et al.*, 2000).

Um die in den venösen Endothelzellen (HUVEC) gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen, wurden ferner für die Studien mit dem Erreger *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) auch humane Endothelzellen aus der Aorta verwendet. Die Vermutung, dass Chlamydien in die Pathogenese der Arteriosklerose involviert sind, begründet zusätzlich die Auswahl dieser primären Endothelzellen.

### 5.2.2 Auswahl der Bakterien

#### A) *Listeria monocytogenes*

Wenigstens 13 Serovare des Erregers *Listeria monocytogenes* wurden bisher in der Umgebung oder bei Nahrungsmittelinfektionen gefunden. Die Serovare 1/2a, 1/2b und 4b sind verantwortlich für die meisten humanen Infektionen (Milohanic *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde mit dem Wildtyp-Stamm EGD, Serotyp 1/2a gearbeitet, weil sich dieser Stamm etabliert hat, sein Genom bereits sequenziert wurde (Glaser *et al.*, 2001) und verschiedene Mutanten dieses Stamms existieren, welche erfolgreich in weiterführenden Arbeiten Verwendung finden (Krüll *et al.*, 1997; Lingnau *et al.*, 1995; Opitz *et al.*, 2006; Pamer, 2004; Parida *et al.*, 1998; Rose *et al.*, 2001; Schwarzer *et al.*, 1998; Sibelius *et al.*, 1999).

#### B) *Chlamydomydia pneumoniae*

Vor kurzem wurden die Genome von drei *C. pneumoniae*-Stämmen komplettiert und veröffentlicht: CWL-029, AR39 und J138. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm CWL-029 gilt als respiratorischer Referenzstamm, der ursprünglich aus einem Patienten mit Bronchitis isoliert wurde (Maass *et al.*, 1998). Vergleichende Analysen lassen vermuten, dass die genomische Organisation und Reihenfolge der Gene in jedem Genom von *C. pneumoniae* hoch konserviert ist (Viratyosin *et al.*, 2002). Verschiedene Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass *C. pneumoniae*-Stämme, die Menschen infizieren, nahezu identische Sequenzen für verschiedene Gene haben (z. B. ompA, ompB, 16S RNA Gen etc.) (Cochrane *et al.*, 2005).

Zieht man die Funktionsweise des angeborenen Immunsystems mit der Erkennung von hoch konservierten PAMP durch Pathogen-erkennende Rezeptoren (Keimbahn-kodiert, ubiquitär auftretend) in Betracht (Akira *et al.*, 2006; Beutler *et al.*, 2006) lässt sich die Hypothese

aufstellen, dass sich die Antwort von Endothelzellen auf verschiedene Stämme von *L. monocytogenes* bzw. *C. pneumoniae* nicht grundlegend unterscheidet. Es ist jedoch zu bedenken, dass neben den konservierten PAMP wie z. B. Lipoteichonsäure, Peptidoglykan, CpG-DNA (*L. monocytogenes*) oder z. B. cLPS, Hitzeschockproteine (*C. pneumoniae*) weitere Virulenzfaktoren existieren, die in ihrer Expression variieren können. So haben beispielsweise Molestina et al. für verschiedene *C. pneumoniae*-Stämme (A-03, BAL-16, TW-183 und T-2634) herausgefunden, dass diese zur Freisetzung gleicher Zytokine in humanen Endothelzellen (HUVEC) führten, jedoch verschiedene Mengen dieser Zytokine (wie z. B. IL-8, MCP-1 und ICAM-1) nach Infektion mit verschiedenen Stämmen sezerniert wurden (Molestina et al., 1998). Darüber hinaus konnten Krüll et al. belegen, dass sowohl der in dieser Arbeit verwendete *C. pneumoniae*-Stamm CWL-029 als auch der Stamm TW-183 in humanen Endothelzellen zu einer vergleichbaren IL-8-Freisetzung führten (mündliche Mitteilung, M. Krüll). Daher liegt die Vermutung nahe, dass verschiedene *C. pneumoniae*-Stämme (insbesondere CWL-029 und TW-183) ähnliche Wirtszellantworten hervorrufen.

Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich bezüglich anderer Stämme von *L. monocytogenes* und *C. pneumoniae* Unterschiede hinsichtlich der Aktivierung von Endothelzellen ergeben.

### 5.2.3 Chromatin-Immunpräzipitation

Die Chromatin-Immunpräzipitation ist eine viel verwandte Technik, die es ermöglicht, Histonmodifikationen, Transkriptionsversuche und Nicht-Histonproteine im Detail zu untersuchen (Spencer et al., 2003). Diese in situ Technik erlaubt es, eine relativ „physiologische“ Sicht auf nukleäre Ereignisse zu liefern (Spencer et al., 2003). Dennoch gibt es eine Reihe von Fehlerquellen (z. B. Formaldehyd-Fixierung, Lysatgewinnung, Sonifikation, Immunpräzipitation) bei dieser Technik, was nicht zuletzt auf die Länge der Durchführung des Versuchs und auf die sorgfältige Arbeit des Durchführenden zurückzuführen ist. Hier soll nur auf zwei mögliche Fehler hingewiesen werden. Die erste Gefahr dieser Methode liegt bereits in der Gewinnung gleicher Mengen Zellysat, die notwendig ist, um verschiedene Werte untereinander vergleichen zu können. Um dies zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit eine so genannte Inputkontrolle durchgeführt, die einen Hinweis darauf lieferte, ob in jedem Zellysat die gleiche Menge DNA vorhanden war. Eine weitere Fehlerquelle stellt die Immunpräzipitation dar, bei der es wichtig ist, spezifische Antikörper zu verwenden, die ausschließlich an das gewünschte Target (Histon,

Transkriptionsfaktor etc.) binden. In der vorliegenden Arbeit wurde mit sehr spezifischen Antikörpern gearbeitet. Hinweise auf die Spezifitäten der Antikörper ergaben sich (zusätzlich zu den Hinweisen aus Herstellerangaben) in den Western-Blot-Experimenten, bei denen jeweils nur ein Protein repräsentiert durch eine Bande detektiert werden konnte. Weiterhin wurden auch für die RNA Polymerase II, die NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65, die HAT CBP und die HDAC1 spezifische Antikörper gewählt.

### 5.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Histonmodifikationen in die inflammatorische Genexpression des Modellzytokins IL-8 infolge einer Infektion mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) oder *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) involviert sind.

Inwiefern Histonmodifikationen zu der bakteriellen Signaltransduktion in humanen Zellen beitragen, ist nahezu unerforscht. Am Beispiel der endothelialen Infektion durch die Modellerreger *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) und *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) konnte in dieser Arbeit erstmalig demonstriert werden, dass Histonmodifikationen eine Rolle in der Erreger-bedingten IL-8-Freisetzung spielen und dass diese Modifikationen durch zelluläre Signalwege reguliert werden.

Erreger-bedingte Histonmodifikationen wurden ausschließlich für die Histone H3 und H4 untersucht und beschränkten sich auf die Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 10 und auf die Azetylierung der Aminosäure Lysin 14 des Histons H3 bzw. auf die Panazetylierung an den Aminosäuren Lysin 5, 8, 12 und 16 des Histons H4. Histone sind jedoch posttranslational einer Vielzahl von Modifikationen ausgeliefert, die auch die Azetylierung und Methylierung der Aminosäuren Lysin und Arginin, die Phosphorylierung der Aminosäuren Serin und Threonin sowie die Ubiquitinierung der Aminosäure Lysin und die Ribosylierung mit einschließen (Peterson und Laniel, 2004). Ferner ist bekannt, dass es zusätzlich zu der Phosphorylierung der Aminosäure Serin 10 und der Azetylierung der Aminosäure Lysin 14 am Histon H3 die Möglichkeit gibt, dass dieses Histon an weiteren Aminosäuren azetyliert (z. B. Lysin 4, 9, 18, 23 und 27), methyliert (z. B. Arginin 2, 17, 26 bzw. Lysin 4, 9, 27, 36, 79) oder phosphoryliert (z. B. Threonin 3, 11 bzw. Serin 28) wird (Peterson und Laniel, 2004). Des Weiteren ist zusätzlich zu der Azetylierung der Aminosäuren Lysin 5, 8, 12 und 16 des Histons H4 die Phosphorylierung der Aminosäure Serin 1 und die Methylierung der

## DISKUSSION

---

Aminosäure Arginin 3 und Lysin 20 möglich (Peterson und Laniel, 2004). Darüber hinaus ist zu beachten, dass die Aminosäure Lysin mono-, di- oder trimethyliert und die Aminosäure Arginin mono- oder dimethyliert vorliegen können (Peterson und Laniel, 2004). Hier wird deutlich, dass die in dieser Arbeit untersuchten Modifikationen nur einen sehr kleinen Einblick auf Histonveränderungen ergeben, nicht zu vergessen, dass sich in dem Histonoktamer auch noch die Histone H2A und H2B befinden, die in dieser Arbeit keine Berücksichtigung fanden. Dennoch gibt es Hinweise dafür, dass die Kombination der Azetylierung an H4 (Lys 8), der Azetylierung an H3 (Lys 14) und der Phosphorylierung an H3 (Ser 10) mit der Transkription von Genen in Verbindung stehen (Peterson und Laniel, 2004), und die Beziehung zwischen der Phosphorylierung (Ser 10) und Azetylierung (Lys 14) wurde bereits in der Hefe und in Säugetierzellen in verschiedenen Studien beschrieben (Cheung *et al.*, 2000b; Lo *et al.*, 2000). Demgegenüber wird die Trimethylierung an H3 (Lys 9) und das Fehlen einer Azetylierung an H3 und H4 mit der Repression der Gentranskription assoziiert (Peterson und Laniel, 2004). Die Tatsache, dass beispielsweise die inhibierende Methylierung an H3 (Lys 9) auch zu einer Aktivierung der Gentranskription führen kann (Peterson und Laniel, 2004), macht deutlich, dass es in der Zukunft notwendig ist, Histonmodifikationen zellspezifisch, stimulusspezifisch und im Hinblick auf Promotor-Unterschiede zwischen beispielsweise verschiedenen Zytokinen zu untersuchen, nicht zuletzt, um eventuell einmal therapeutisch eingreifen zu können.

Hinsichtlich der unterschiedlichen Chromatinveränderungen am *i18*-Genpromotor und *ifn $\gamma$* -Genpromotor nach Infektion mit *L. monocytogenes* hat sich gezeigt, dass eine genspezifische Regulation besteht. Dies macht deutlich, dass Histonmodifikationen im Detail für jedes Gen spezifisch analysiert werden müssen und dass Beobachtungen hinsichtlich Chromatinveränderungen nicht von einem Gen auf das andere übertragbar sind. Darüber hinaus bestehen sicherlich Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen. Gegenstand weiterführender Untersuchungen könnte z. B. der *ifn $\gamma$* -Promotor sein, dessen Regulation in vielen Zellen, insbesondere humanen Endothelzellen, viele Fragen aufwirft. Von großem Interesse wäre es dabei, klären zu können, weshalb eine HDAC-Inhibition zu einer Erhöhung der IFN $\gamma$ -Freisetzung nach Chlamydien-Infektion, jedoch nicht nach Listerien-Infektion führt. Möglicherweise wird durch *Chlamydomphila pneumoniae* ein anderer Signalweg zur Regulation der IFN $\gamma$ -Expression induziert als durch *Listeria monocytogenes*, zumindest ist *L. monocytogenes* nicht in der Lage, den TLR4-MyD88-IFN $\alpha/\beta$ -STAT1 (Rothfuchs *et al.*, 2006) zu aktivieren, der zur IFN $\gamma$ -Expression führt.

Darüber hinaus stellen sich viele Fragen im Hinblick auf die genauen Signalwege „downstream“ von TLRs, Nod etc., die schließlich zu Histonmodifikationen führen. In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant zu erfahren, inwiefern bestimmte Virulenzfaktoren Einfluss auf diese Signalwege nehmen, z. B. Listeriolysin, dass das Austreten der Listerien aus der intrazellulären Vakuole ermöglicht.

Die Azetylierung von Histonen durch Coaktivator-Proteine wie z. B. CBP vereinfacht die Transkription (Cheung *et al.*, 2000b). Das Histon-modifizierende Enzym CBP trägt zur Regulation der *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-bedingten Histonmodifikation bei und unterliegt einer Regulation durch den p38-MAPK-Signalweg. Weiterhin ist bekannt, dass die Phosphorylierung an H3 (Ser 10) die GCN5-bedingte Azetylierung an H3 (Lys 14) fördert (Lo *et al.*, 2001). Unter diesen Gesichtspunkten ist es sicherlich erstrebenswert, in weiteren Studien die Regulation der Histon-Azetyltransferase GCN5 zu untersuchen, insbesondere im Hinblick auf die Regulation durch MAPK und andere Signalwege. Des Weiteren gibt es eine Vielzahl von HAT (z. B. p300/CBP, Gcn5, Tip60, ATF2, Esa1 etc.) (Peterson und Laniel, 2004), die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden konnten, sicherlich jedoch eine Rolle spielen. Gleiche Überlegungen treffen auch auf die HDAC zu, von denen bislang 18 verschiedene identifiziert wurden (de Ruijter *et al.*, 2003). HDAC1 wurde im Hinblick auf die Beteiligung bei den *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-bedingten Histonmodifikationen untersucht, ebenso ihre Regulation durch MAPK. Im Angesicht der Tatsache, dass es eine große Anzahl weiterer HDAC gibt, die sicherlich in die Regulation von Histonmodifikationen in humanen Endothelzellen involviert sind, könnte auch dies zum Gegenstand weiterer Untersuchungen werden. Aufschluss darüber könnten Experimente mit spezifischer siRNA geben, die zur Depletion einzelner HDAC führen.

Des Weiteren führten die unspezifischen HDAC-Inhibitoren TSA und SAHA, die auch in der Krebsforschung von besonderer Bedeutung sind, zu einer gesteigerten proinflammatorischen Zytokinfreisetzung. Ob dieses Phänomen förderlich für die Immunantwort des Wirtes gegenüber intrazellulären Erregern ist, bleibt offen und bietet Anreiz für weitergehende Untersuchungen in Form von in vivo Experimenten.

Auch im Falle der schon in klinischen Studien getesteten MAPK-Inhibitoren ist eine Evaluierung in in vivo Experimenten unter dem Aspekt der bakteriellen Infektion mit intrazellulären Erregern von großem Interesse, da auch diese Substanzen eine weitere klinische Anwendung finden werden.

## DISKUSSION

---

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der klinisch relevante Cholesterinsenker Simvastatin die *C. pneumoniae*-induzierte Zytokinfreisetzung signifikant reduzierte und zu reduzierten Histonmodifikationen des *il8*-Genpromotors führte. Somit stellt sich die Frage, ob Simvastatin auch in der bakteriellen Pathogenese als antiinflammatorisches Agens eine Rolle spielen könnte. Hier ist sicher eine Evaluierung in komplexeren Infektionsmodellen notwendig.