

2 Schrifttum

2.1 Pathogene

2.1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) ist ein Gram-positives, fakultativ intrazelluläres Bakterium, das sowohl für den Menschen als auch für das Tier pathogen ist (Seeliger, 1986). *L. monocytogenes* kann insbesondere bei immunschwachen Personen und Neugeborenen Sepsis und Meningitis hervorrufen (Pamer, 2004). Bei Schwangeren kann eine *L. monocytogenes*-Infektion Abort auslösen. Die Infektion mit dem Erreger erfolgt über die Nahrungsaufnahme in Form von unpasteurisierten Milchprodukten und unzureichend durchkochten Fleischprodukten (Bibb *et al.*, 1990). Untersuchungen mit Listerien als Modellkeim trugen wesentlich zum Verständnis der Interaktion zwischen pathogenen, intrazellulären Bakterien und dem Immunsystem bei (Portnoy *et al.*, 2002).

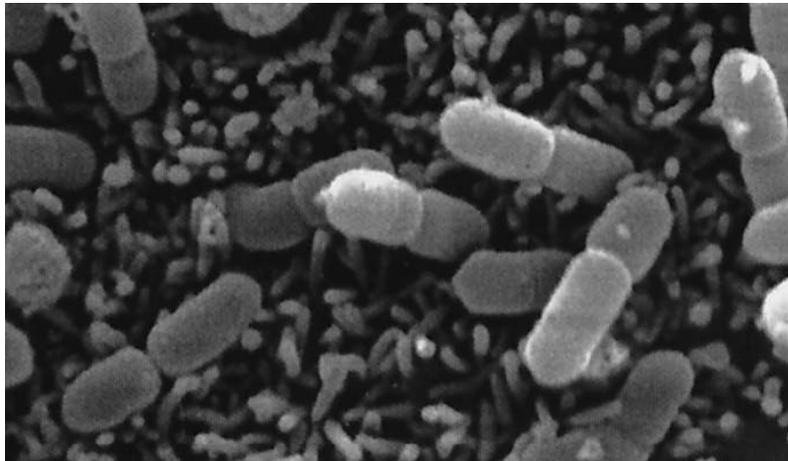


Abbildung 2.1 Mikroskopische Aufnahme von *Listeria monocytogenes*. Dargestellt sind verschiedene Listerien 30 min nach Infektion an Mikrovilli von Caco-2-Zellen gehaftet (Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Listeria monocytogenes produziert zahlreiche Virulenzfaktoren, deren Expression mit verschiedenen Stadien der Zellinfektion sehr gut koordiniert ist: Während die Invasion von Makrophagen durch *Listeria monocytogenes* passiv verläuft, erfordert der Eintritt in andere Zellen wie z. B. Enterozyten, Hepatozyten, Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen

eine Rezeptor-vermittelte Endozytose der Wirtszelle, die durch die bakteriellen Oberflächenproteine Internalin A bzw. InIB ermöglicht wird (Hamon *et al.*, 2006). Der Rezeptor für InIA ist das auf Epithelzellen befindliche E-Cadherin, demgegenüber wird Met als Rezeptor für InIB von verschiedenen Zelltypen exprimiert (Hamon *et al.*, 2006). Nach Aufnahme in die Zielzelle führt die bakterielle Freisetzung von Listeriolysin (LLO) zur Lyse der Phagosomenmembran, so dass die Listerien das freie Zytosol erreichen (Gaillard *et al.*, 1987; Vazquez-Boland *et al.*, 2001) (Abbildung 2.2).

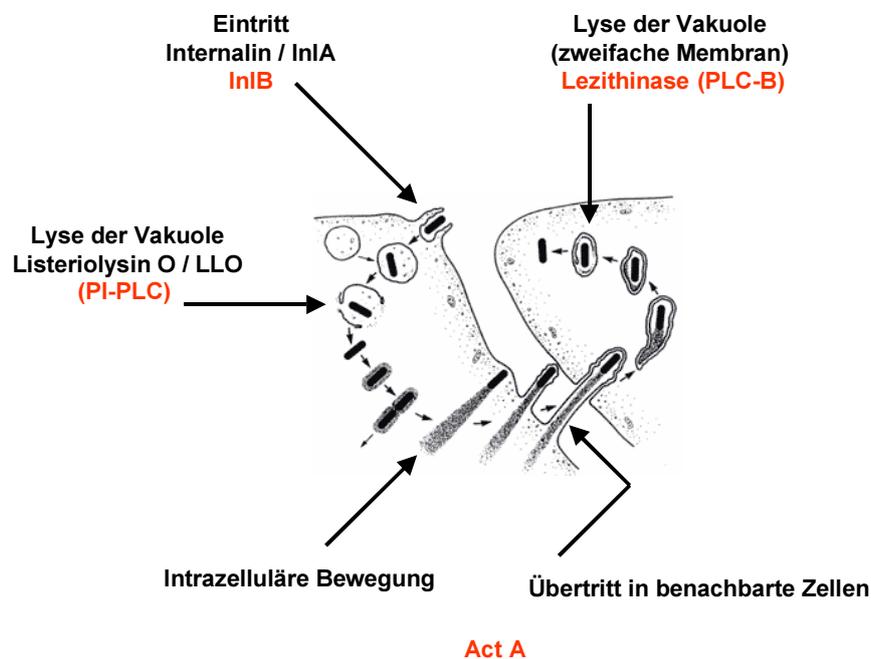


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der Zellinfektion durch *L. monocytogenes*. Die hierfür benötigten bakteriellen Pathogenitätsfaktoren von *L. monocytogenes* sind rot dargestellt: InIA und InIB für die Zellinvasion, LLO bzw. Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) für die Lyse der Vakuole, ActA für die intra- bzw. interzelluläre Bewegung und Lezithinase (PLC-B) für die Lyse der zweifachen Membran der Vakuole. Modifizierte Abbildung nach Tilney und Portnoy (Tilney und Portnoy, 1989).

Darüber hinaus trägt die Aktivität listerieller Phospholipasen zur Zerstörung der Phagosomenmembran bei. Neben der durch LLO und Phospholipasen bedingten Lyse der Phagosomenmembran führen diese Faktoren zur Aktivierung wirtseigener Signalwege, einschließlich Mitogen-aktivierter Protein Kinasen (MAPK) und dem Transkriptionsfaktor NF- κ B (Braun und Cossart, 2000; Kuhn *et al.*, 1999; Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Im

Zytosol induziert das listerielle Oberflächenprotein ActA die polarisierte Polymerisation von F-Aktin am Bakterium und ermöglicht sowohl intrazelluläre bakterielle Wanderung als auch den Übertritt von Zelle zu Zelle (Kuhn *et al.*, 1999; Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu *L. monocytogenes* ist die nicht-pathogene Spezies *L. innocua* nicht in der Lage in humane Endothelzellen einzudringen (Greiffenberg *et al.*, 2000; Slaghuis *et al.*, 2004).

Zusätzlich zu den genannten Virulenzfaktoren besitzt *Listeria monocytogenes* so genannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular pattern (PAMP)), die von transmembranösen wie auch intrazellulären Pathogen-erkennenden Rezeptoren (pattern-recognition receptors (PRR)) erkannt werden und zur Induktion von Signalwegen in Zellen führen. Diese PAMP sind z. B. Peptidoglykan, welches meso-diaminopimelic acid (DAP) enthält, Lipoteichonsäure, Lipopeptide und bakterielle DNA (Meylan *et al.*, 2006; Remer *et al.*, 2005).

2.1.2 *Chlamydophila pneumoniae*

Chlamydophila pneumoniae (*C. pneumoniae*) ist ein Gram-negatives, obligat intrazelluläres Bakterium. Es ist ein weit verbreitetes respiratorisches Pathogen, das Sinusitis, Pharyngitis, Bronchitis und Pneumonie hervorrufen kann (Cook *et al.*, 1998; Grayston *et al.*, 1990; Grayston *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 2000). Persistierende oder wiederkehrende *C. pneumoniae*-Infektionen werden als Auslöser oder Promotoren der Inflammationen diskutiert, die zu vaskulären Läsionen und Arteriosklerose führen können (Krüll *et al.*, 2005b). Diese These wird unterstützt durch eine serologische Assoziation zwischen *C. pneumoniae*-Infektionen und koronaren Herzerkrankungen oder anderen vaskulären Erkrankungen (Elkind *et al.*, 2000; Saikku *et al.*, 1992; Sander *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte *C. pneumoniae* in arteriosklerotischen Plaques mittels Elektronenmikroskopie, Immunzytochemie und PCR nachgewiesen werden, und es wurden lebende Chlamydien aus diesen Plaques isoliert (Kuo *et al.*, 1993; Maass *et al.*, 1998; Taylor-Robinson und Thomas, 2000). Darüber hinaus konnte in verschiedenen Tiermodellen demonstriert werden, dass die intranasale Infektion von Mäusen und Kaninchen mit *C. pneumoniae* zu Pneumonie, Perimyokarditis, septischen Disregulationen und schließlich zur systemischen Ausbreitung von Chlamydien in die Milz, in Lymphknoten, in das Peritoneum und zu arteriosklerotischen Plaques der arteriellen Blutgefäße führte (Gieffers *et al.*, 2004b; Moazed *et al.*, 1997; Muhlestein *et al.*, 1998).

SCHRIFTTUM

Arteriosklerotische Läsionen entstehen infolge chronisch-inflammatorischer Reaktionen der Endothelzellen und der vaskulären Intima (Ross, 1999). Obwohl Chlamydien verschiedene Zelltypen invadieren, sich in diesen replizieren (z. B. Monozyten, Makrophagen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen) (Gaydos *et al.*, 1996; Kaukoranta-Tolvanen *et al.*, 1994; Kaukoranta-Tolvanen *et al.*, 1996) und eine chronische Aktivierung der Immunantwort induzieren können, ist wenig über den Mechanismus der *C. pneumoniae*-induzierten Zielzell-Veränderung bekannt (Krüll *et al.*, 2005b).

Weiterhin wird ein Zusammenhang zwischen persistierender oder wiederkehrender *C. pneumoniae*-Infektion und der Entstehung des Erwachsenenasthmas (Hahn, 1999) und der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) diskutiert (Sethi und Murphy, 2001).

Das Bakterium durchläuft einen einmaligen Replikationszyklus mit zwei funktionell und morphologisch verschiedenen Formen, dem kondensierten, „sporenhähnlichen“ infektiösen aber metabolisch inaktiven Elementarkörperchen (EB, 0,3 µm) und dem labilen, nicht infektiösen, metabolisch aktiven Retikularkörperchen (RB, 0,9 µm).

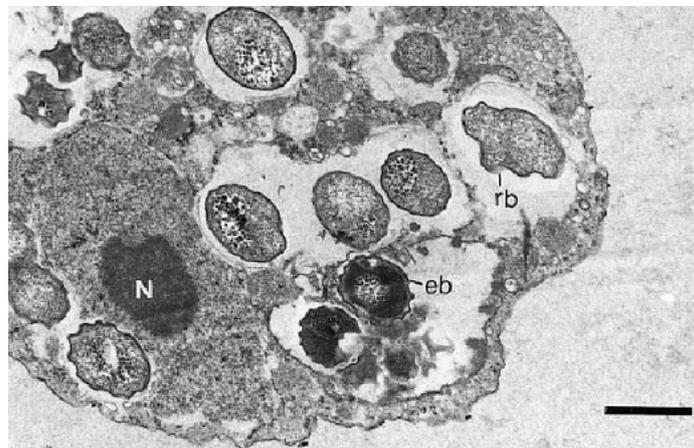


Abbildung 2.3 Elektronenmikroskopische Aufnahme der Elementarkörperchen (eb) und Retikularkörperchen (rb) von Chlamydien (Michel *et al.*, 2001).

Die Infektion oder Invasion der Zelle ist ein aktiver Prozess, der nur durch vitale Chlamydien möglich ist, hitze- oder UV-inaktivierte Chlamydien sind dazu nicht in der Lage (Krüll *et al.*, 2004). Der Wachstumszyklus von Chlamydien wird dadurch initiiert, dass sich ein infektiöses EB an eine empfängliche Zielzelle heftet und somit den Eintritt in ein zelleigenes

phagozytotisches Vesikel ermöglicht. EBs sondern sich vom endozytotischen Weg der Zelle ab, indem sie die Vakuole so modifizieren, dass sie mit exozytotischen Vesikeln fusioniert. Dieses stellt einen Pathogenitätsmechanismus von Chlamydien dar, der verhindert, dass die Vakuole mit Lysosomen fusioniert (Beatty *et al.*, 1994; Hackstadt *et al.*, 1997).

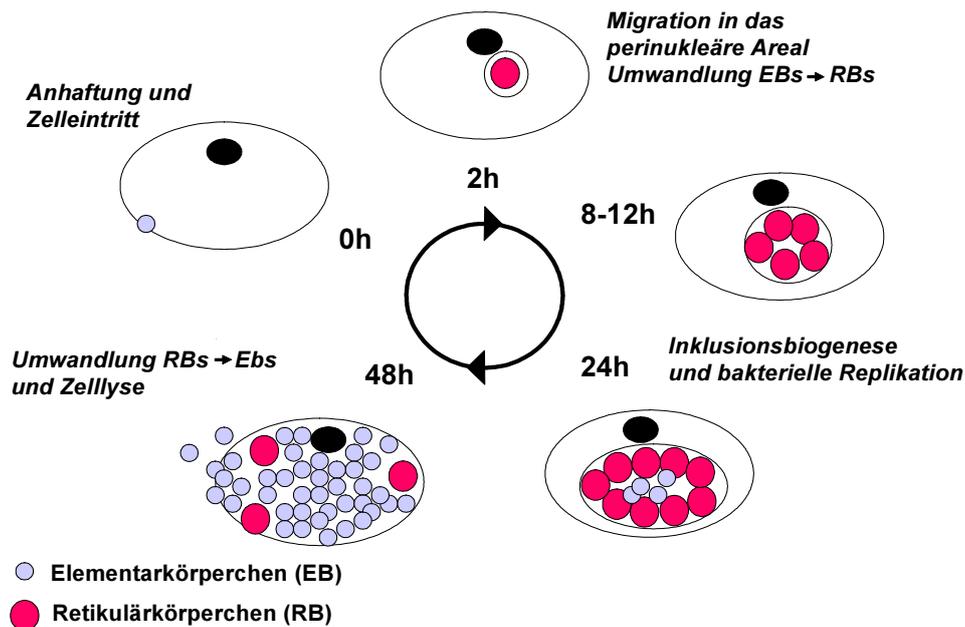


Abbildung 2.4 Die Abbildung zeigt den Entwicklungszyklus von Chlamydien. Nach Anhaftung und Zelleintritt wandeln sich die Elementarkörperchen (EBs) innerhalb von 12-15 h zu Retikularkörperchen (RBs) um. Der Entwicklungszyklus der Chlamydien ist nach ca. 48-72 h abgeschlossen und endet mit dem Wiederaustritt der EBs aus der Zelle. Modifizierte Abbildung nach Beatty (Beatty *et al.*, 1994).

Nach der Internalisierung der EBs findet die Umwandlung in RBs statt, ein Prozess, der innerhalb der ersten 15 min metabolisch detektiert werden kann, mikroskopisch erst nach 12-15 h in HEP-2 und Hela-229 Zellen (Roblin *et al.*, 1992; Wong *et al.*, 1992). RBs sind erst nach ca. 15 h durch eine binäre Teilung zu erkennen. Während sich die RBs vermehren, passt sich die expandierende Membran der wachsenden Bakterienzahl an. 48 bis 72 h nach Abschluss des Entwicklungszyklus werden EBs entweder durch Lyse der Zellmembran oder durch Fusion der Inklusionsmembran mit der Plasmamembran in die Umgebung freigesetzt (Hackstadt T., 1999; Moulder, 1991), siehe Abbildung 2.4.

Unter manchen Umständen, z. B. unter Einfluss von $\text{IFN}\gamma$, Penicillin oder unter Mangel essentieller Nährstoffe (Eisen, Tryptophan) können Chlamydien den Status einer intrazellulären, persistierenden Infektion erreichen, währenddessen sie vital, jedoch metabolisch inaktiv bleiben und sich nicht replizieren (Beatty *et al.*, 1994; Gieffers *et al.*, 2004a; Hogan *et al.*, 2004).

Es ist wenig bekannt über Strukturen auf der Oberfläche (Proteine, Glykolipide) von Chlamydien, die den bakteriellen Kontakt zur Zielzelle herstellen und somit die Zielzellaktivierung initiieren. Mögliche Virulenzfaktoren, die sowohl für *C. pneumoniae* als auch für *C. trachomatis* diskutiert werden, sind Proteine des äußeren Membrankomplexes („outer membrane complex“, OmpA/B, Omp3, OmcB, POMP), chlamydiales Lipopolysaccharid (cLPS), chlamydiales Hitzeschockprotein (chsp60/GroEL-1), ein Typ-III-Sekretionsapparat (TTS), der chlamydiale Protease- oder Proteosomen-ähnliche Aktivierungsfaktor (CPAF) oder Peptidoglykane und Peptidoglykan-ähnliche Strukturen (Krüll *et al.*, 2005b). OmpA des EBs ist eine wichtige Komponente der chlamydialen Abwehr gegenüber der Umgebung außerhalb der Wirtszelle und gegenüber der Immunantwort des Wirtes. Weiterhin ist OmpA wichtig für die Anhaftung an die Wirtszelle (Hackstadt T., 1999). Das Hitzeschockprotein scheint eine Schlüsselrolle in der Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege mit anschließender Expression eines proinflammatorischen Phänotyps in infizierten Zellen zu spielen (Bulut *et al.*, 2002; Kol *et al.*, 1998; Netea *et al.*, 2002). Als PAMP gelten für *Chlamydomphila pneumoniae* unter anderem cLPS, Glykolipide, Peptidoglykane und bakterielle DNA (Meylan *et al.*, 2006).

2.2 Endothel

Das Endothel kleidet die innere Oberfläche von Gefäßwänden aus und stellt damit eine multifunktionelle, semi-permeable zelluläre Barriere zwischen dem Blut und dem Gewebe her. Die gesamte Oberfläche des Endothels ist Pathogenen und deren Produkten bei einer systemischen Infektion ebenso ausgesetzt wie Agenzien aus der aktivierten Wirtsabwehr während einer inflammatorischen Reaktion (Hippenstiel und Suttorp, 2003). Pathogene haben eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um das Endothel zu attackieren und aktivieren dadurch diverse rezeptorvermittelte Signalwege. Diese pathophysiologischen Einflüsse resultieren in einer Änderung des Phänotyps des Endothels, in einer endothelialen Barrierefunktion, in einer erhöhten Leukozyten-Endothel-Interaktion, in der Freisetzung

von Entzündungsmediatoren, sowie in einer prokoagulatorischen Aktivität (Hippenstiel und Suttorp, 2003). Endothelzellen sind wichtige Zielzellen für den fakultativ intrazellulären Erreger *Listeria monocytogenes* und den obligat intrazellulären Erreger *Chlamydomphila pneumoniae*. Durch die Freisetzung chemotaktischer Substanzen, einschließlich Interleukin 8 (IL-8) können diese Zellen wesentlich zur Rekrutierung von Entzündungszellen beitragen. Die angeborene Immunität gegen diese intrazellulären Erreger unterliegt im humanen Endothel einer engen Kontrolle durch zelluläre Signalwege (Hoefen und Berk, 2002; Tzima, 2006).

2.3 Angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort erkennt hoch konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP). Die Umbenennung in die terminologisch richtige Bezeichnung microbe-associated molecular pattern MAMP (Sirard *et al.*, 2006) hat sich bislang noch nicht durchgesetzt. Neben den PAMP (wie z. B. Peptidoglykane, LPS, Lipoteichonsäuren etc.) erkennt das Immunsystem auch endogen Gefahr-assoziierte molekulare Muster (DAMP). Diese von verschiedenen Mikroorganismen stammenden PAMP und DAMP werden über so genannte Muster-erkennende Rezeptoren (PRR) erkannt. Diese PRR können klassifiziert werden in transmembranöse Moleküle wie Toll-ähnliche Rezeptoren (Toll-like Receptors (TLRs)) oder zytosolische Moleküle einschließlich Nod-ähnlicher Rezeptoren (Nod-like Receptors (NLR)) oder CARD-Helikase Proteine (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002). So ist beispielsweise TLR4 der Rezeptor für LPS von Gram-negativen Bakterien, eventuell für virale Proteine, für Hitzeschockproteine und Fibrinogen (Akira *et al.*, 2006; Poltorak *et al.*, 1998), und TLR2 erkennt Lipoteichonsäure, di- oder triazetylierte Lipopeptide und Glykolipide (Aliprantis *et al.*, 1999; Lehner *et al.*, 2001; Opitz *et al.*, 2001). Nod1 erkennt meso-Diaminopimelinsäure-enthaltendes Peptidoglykan, welches hauptsächlich in Gram-negativen Bakterien zu finden ist (Girardin *et al.*, 2003), und Nod 2 erkennt das Muramyldipeptid MurNAc-L-Ala-D-isoGln, welches in allen Peptidoglykanen vorkommt (Girardin *et al.*, 2003; Inohara *et al.*, 2003). Alle Klassen der PRR haben gemeinsame Eigenschaften: Erstens sind sie Keimbahn-kodiert, zweitens werden sie von einer großen Vielfalt von Wirtszellen, inklusive Endothelzellen exprimiert und drittens erkennen sie eine limitierte Anzahl konservierter (mikrobiologischer) Moleküle. Die PRR induzieren Signalkaskaden, die schließlich zur Genexpression führen. Dennoch sind diese durch PRR induzierten Signalkaskaden von Rezeptor zu Rezeptor verschiedenen (Akira *et al.*, 2006).

2.3.1 Toll-like Rezeptoren

Die TLRs sind charakterisiert durch eine extrazelluläre Leuzin-reiche-Domäne (leucine-rich-repeat (LRR)), welche die Bindung von Liganden bewirkt sowie durch eine zytoplasmatische Interleukin-1-Rezeptor-homologe (TIR) Domäne, die verantwortlich für die Signalinduktion „downstream“ ist (Akira *et al.*, 2006; Beutler *et al.*, 2006). Die Fähigkeit von TLRs, Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, die zur Genexpression führen, ist verschieden und abhängig von den vier TIR-Domäne-enthaltenden Adapter-Molekülen MyD88 (myeloid differentiation factor 88), Mal (MyD88-adaptor-like), TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN β) und TRAM (TRIF-related adaptor molecule). Alle TLRs, ausgenommen TLR3, führen über MyD88 zur Aktivierung von NF- κ B: MyD88 rekrutiert zu den TLRs über TIR-TIR-Interaktionen, die ihrerseits IRAK4 (interleukin receptor-associated factor 4), IRAK1, TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6), TAK1 (TGF β -activated kinase 1) und den IKK (inhibitory κ B kinase)-Komplex aktivieren, der schließlich zur Aktivierung von NF- κ B führt (Akira und Takeda, 2004; O'Neill, 2006). TAK1 aktiviert darüber hinaus die MAPK-Kaskade und stellt eine Verbindung zwischen TLRs und MAPK her (Takeda und Akira, 2005). Weiterhin besteht eine Verbindung zwischen TLRs und den Rho-GTPasen, die beispielsweise als molekulare Schalter in den zellaktivierenden Signalweg von TLR2 (Arbibe *et al.*, 2000) und TLR4 (Hippenstiel *et al.*, 2000) involviert sind.

2.3.2 Nod-ähnliche Rezeptoren

Nod-ähnliche Rezeptoren (NLR) beinhalten u. a. eine Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne (Nod) sowie Leuzin-reiche Regionen (LRR) an den Carboxyl-Termini, welche für die Bindung von Liganden verantwortlich zu sein scheinen (Inohara *et al.*, 2005). Darüber hinaus weisen sie beispielsweise an den Amino-Termini eine Caspase-rekrutierende Domäne (CARD) auf. Am besten untersucht sind Nod1 und Nod2, die eine CARD enthalten. Sowohl Nod1 als auch Nod2 aktivieren NF- κ B, ein Prozess, in den das CARD-haltige Molekül Rip2 ebenso wie IRAK1 und TAK1 und der IKK-Komplex involviert sind (Inohara *et al.*, 2000; Ogura *et al.*, 2001). Auch Nod-Proteine scheinen in wichtige zelluläre Signalwege wie MAPK involviert zu sein: Für Nod1 konnte gezeigt werden, dass es an der Aktivierung der p38-MAPK (Opitz *et al.*, 2006) sowie der JNK beteiligt ist (Girardin *et al.*, 2001). Bislang ist unklar, inwieweit Interaktionen zwischen Nod-Proteinen und Rho-GTPasen bestehen.

2.4 Aktivierung von intrazellulären Signalwegen

2.4.1 Mitogen-aktivierte Protein Kinasen

Die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) sind in die TLR- bzw. Nod-abhängigen intrazellulären Signalwege involviert (Girardin *et al.*, 2001; Opitz *et al.*, 2006; Takeda und Akira, 2005) und führen z. B. zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Rahman *et al.*, 2004a).

MAPK stellen eine große Gruppe von Proteinen dar, die in der Lage sind, sehr schnell eine Vielzahl von extrazellulären Signalen, die die Oberfläche von Zellen erreichen, weiterzuleiten und Transkriptionsfaktoren zu aktivieren (Whitmarsh und Davis, 1999). Ihre Signalwege spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Genexpression in eukaryontischen Zellen (Yang *et al.*, 2003b). Die Familie besteht hauptsächlich aus drei Subfamilien: Den extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (ERK1 und ERK2), den stressaktivierten Protein Kinasen, bekannt als die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK1, JNK2 und JNK3) und den p38-MAPK (α, β, γ und δ) (Chang und Karin, 2001). Die Signaltransduktion, initiiert durch jeden MAPK-Weg, erfolgt durch die sequentielle Aktivierung von MAPK Kinasen Kinasen (MAPKKK), und zwar durch membranassoziierte Kinasen wie Rezeptoren von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren und eine MAPK Kinase (MAPKK), die anschließend zu einer Aktivierung einer MAPK durch Phosphorylierung führt (Lowes *et al.*, 2002). Die MAPK-Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung nukleärer Kinasen oder üblicherweise zu einer Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren (Javelaud und Mauviel, 2005). ERK werden durch die MAPKK MEK1 und MEK2 phosphoryliert, die selber Substrate der MAPKKK Raf-1 sind. Raf-1 wird z. B. aktiviert durch das membrangebundene kleine G-Protein Ras als Folge einer Induktion durch mitogene Stimuli wie den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), der an seinen Rezeptor bindet und diesen aktiviert. Die Mitglieder der JNK Familie sind die Substrate der MKK4 und MKK7. Die p38-MAPK wird durch MKK3 und MKK7 phosphoryliert, welche wiederum Substrate verschiedener MAPKKK (z. B. Apoptose Signal-regulierende Kinase-1 (ASK1)) sind (Ip und Davis, 1998) (siehe Abbildung 2.5). ERK-bedingte Signalwege sind überwiegend in die Proliferation, Differenzierung und Inflammation von Zellen involviert. JNK- und p38-Signalwege werden durch Stresstimuli aktiviert, welche Apoptose induzieren. In einigen zellulären Systemen haben sie jedoch auch Proliferation und Differenzierung zur Folge (Eferl und Wagner, 2003).

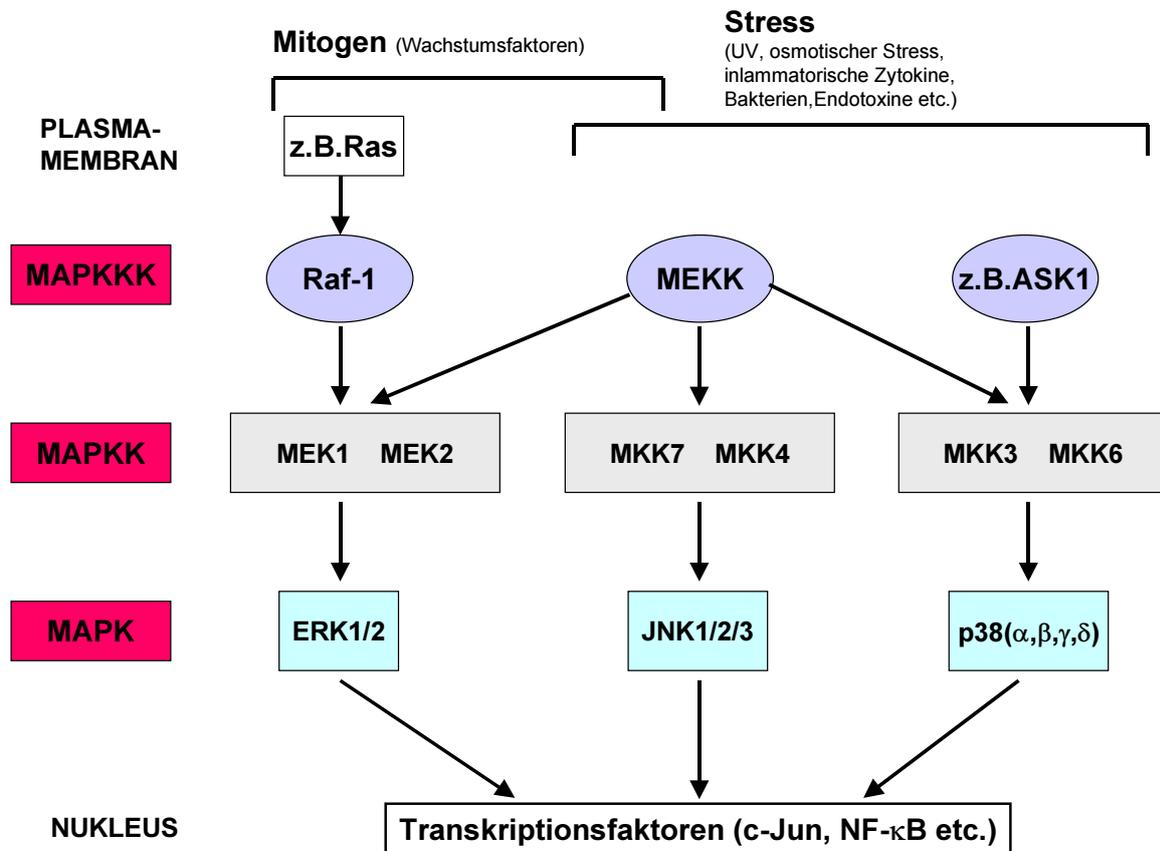


Abbildung 2.5 Vereinfachte Darstellung der MAPK-Kaskade. Bei der zellulären Signaltransduktion von der Plasmamembran zum Nucleus kommt es zu einer sequenziellen Aktivierung von MAPKKK, MAPKK, MAPK und ihren direkten Substraten (Transkriptionsfaktoren und Kinasen). Modifizierte Abbildung nach Yang (Yang *et al.*, 2003b).

2.4.2 Rho-GTPasen

Rho-GTPasen stehen im direkten Zusammenhang mit TLR-abhängigen Signalwegen, die zur Aktivierung von NF-κB führen: Es konnte gezeigt werden, dass ein Rac1-abhängiger Signalweg in die TLR2-bedingte Aktivierung von NF-κB involviert ist (Arbibe *et al.*, 2000) und dass die Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 wichtig für die TLR4-vermittelte Aktivierung von NF-κB sind (Hippenstiel *et al.*, 2000). Demgegenüber konnte ein Zusammenhang zwischen Nod1 und 2 und diesen Molekülen bisher noch nicht gezeigt werden.

Rho-GTPasen stellen eine eigene Familie innerhalb der Ras Superfamilie der kleinen GTPasen dar und sind in allen bislang untersuchten eukaryontischen Zellen zu finden. Zu

SCHRIFTTUM

den Rho-GTPasen gehören drei Rho-Isoformen (RhoA, B, C), drei Rac-Isoformen (Rac1, 2, 3), Cdc42, Rho D, Rnd1, Rnd2, RhoE/Rnd3, RhoG, TC10 und TCL, Rhoh/ttf, Chp und Wrch-1, Rif, RhoBTB1 und 2, Miro-1 und 2 (Aspenstrom *et al.*, 2004). Ähnlich wie andere regulatorische GTPasen fungieren die Rho-GTPasen als molekulare Schalter, die zwischen einem GTP-gebundenen aktiven Zustand (der mit Ziel(Effektor)-Proteinen interagiert) und einem GDP-gebundenen inaktivem Zustand wechseln. Dieser Wechsel wird durch Guanine nucleotide Exchange Factors (GEFs) kontrolliert, die den Austausch von GDP und GTP katalysieren und somit den Schalter aktivieren (Schmidt und Hall, 2002), weiterhin durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), die die intrinsische GTPase-Aktivität stimulieren, um den Schalter zu inaktivieren (Bernards, 2003) und schließlich durch Guanine nucleotide Dissoziation Inhibitors (GDIs), deren Bedeutung die Blockade spontaner Aktivierungen zu sein scheint (Olofsson, 1999) (Abbildung 2.6).

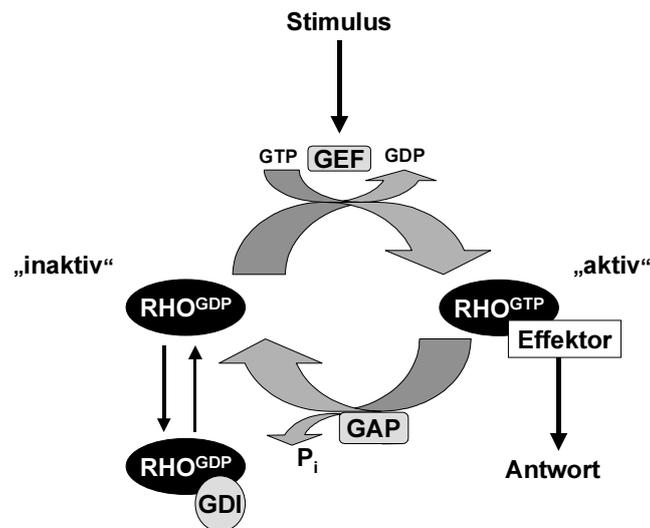


Abbildung 2.6 Rho-GTPase-Zyklus. Die Abbildung zeigt den Wechsel der inaktiven GDP-gebundenen Form und der aktiven GTP-gebundenen Form der Rho-GTPasen. Regulatoren dieser GTPasen sind die Guanine nucleotide Exchange Factors (GEF), GTPase-aktivierende Proteine (GAP) und Guanine nucleotide Dissoziation Inhibitors (GDI). Die aktiven GTPasen interagieren mit Effektorproteinen und „antworten“ somit auf den Stimulus. Modifizierte Abbildung nach Jaffe und Hall (Jaffe und Hall, 2005).

Zusätzlich können Rho-GTPasen durch direkte Phosphorylierung oder Ubiquitinierung reguliert werden (Lang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2003), aber die physiologische Bedeutung

dieser kovalenten Modifikationen ist noch unklar (Jaffe und Hall, 2005).

Die Aktivierung von Rho, Rac oder Cdc42 führt zu einer Gruppierung kontraktiler Aktin/Myosin-Filamente, zu vorstehenden Aktin-reichen Lamellipodien und Filopodien (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Diese Effekte machen die wichtige Funktion der Rho-GTPasen im Hinblick auf das Aktin-Zytoskelett deutlich (Jaffe und Hall, 2005): Eine Rho-GTPase-Inaktivierung induzierte in humanen Endothelzellen Apoptose (Hippenstiel *et al.*, 2002a). Darüber hinaus gibt es Studien, die Effekte von Rho-GTPasen auf die Signaltransduktion zeigen konnten: Loucks *et al.* konnten in Neuronen der Ratte einen Rac-abhängigen MAPK-Signalweg demonstrieren (Loucks *et al.*, 2006) und Wolfrum *et al.* zeigten in Endothelzellen, dass die Inhibition der Rho-Kinase zur Aktivierung des PI3-Kinase/Akt/eNOS-Signalwegs führte (Wolfrum *et al.*, 2004).

2.5 Aktivierung von NF- κ B

Sowohl TLRs als auch Nod1 und Nod2 führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (Inohara *et al.*, 2000; O'Neill, 2006; Ogura *et al.*, 2001). Die NF- κ B/Rel Familie besteht aus fünf Mitgliedern: p65 (RelA), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50/p105) und NF- κ B2 (p52/p100). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist an der Expression einer großen Vielzahl von Genen beteiligt, die in die Regulation von Immunantworten und inflammatorischen Antworten involviert sind (Bonizzi und Karin, 2004; Ghosh und Karin, 2002; Hayden und Ghosh, 2004). Gene, die durch NF- κ B aktiviert werden, schließen viele proinflammatorische Zytokine (TNF α , IL-1 und IL-6), Chemokine (IL-8 und Mip-1 α) und Adhäsionsmoleküle (VCAM-1, ICAM-1) mit ein (Jimi und Ghosh, 2005). Die Aktivität von NF- κ B führt zu einer Lokalisationsänderung vom Zytoplasma in den Zellkern als Folge einer zellulären Stimulation. In unstimulierten Zellen ist NF- κ B überwiegend im Zytoplasma lokalisiert, und zwar in einem Komplex mit den inhibitorischen I κ B Proteinen (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ). Infolge einer Antwort auf eine Vielzahl von Stimuli (z. B. TLR, TLR-Agonisten) werden die I κ Bs durch den aktivierten IKK-Komplex phosphoryliert (Bonizzi und Karin, 2004; Ghosh und Karin, 2002; Hayden und Ghosh, 2004). Der IKK-Komplex besteht aus zwei katalytischen Kinase-Untereinheiten, IKK α und IKK β , und einer regulatorischen Untereinheit NEMO (IKK γ) (Jimi *et al.*, 2004). IKK β ist überwiegend in den klassischen (kanonischen) NF- κ B-Weg involviert, der von der I κ B-Degradierung abhängt und das Heterodimer p50/p65 freisetzt, welches an die DNA bindet. Obwohl sich IKK α und IKK β strukturell sehr ähnlich sind, haben

biologische und genetische Studien gezeigt, dass IKK β die dominantere Kinase ist, die in die Phosphorylierung von I κ B α involviert ist (Xiao *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2004) (Abbildung 2.7).

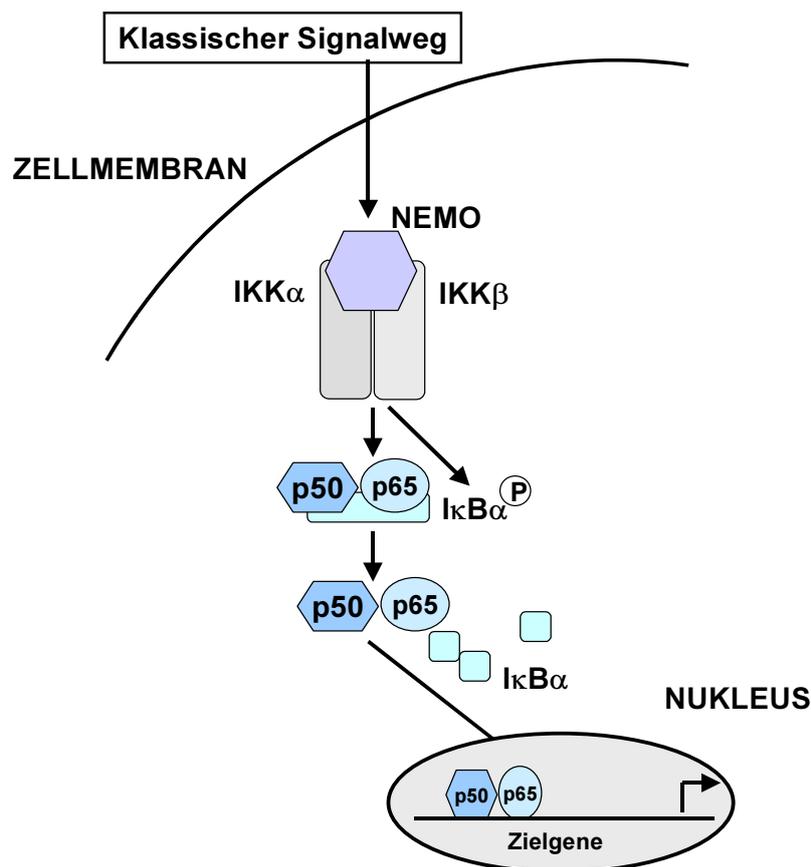


Abbildung 2.7 Schematische Darstellung vom klassischen (kanonischen) NF- κ B-Signalweg. Der klassische (kanonische) Signalweg wird durch eine Vielzahl von Stimuli (z. B. TNF α , IL-1, LPS, T-Zellrezeptor) aktiviert. Die Aktivierung dieses Signalweges ist abhängig von dem NF- κ B Kinase (IKK)-Komplex (bestehend aus IKK α/β und dem essentiellen Modulator von NF- κ B (NEMO)), welcher I κ B α phosphoryliert und somit zu dessen Degradation führt und das Dimer p50/p65 freisetzt. Dieser Signalweg ist essentiell für die Immunantwort, Inflammation, Tumorgenese und das Zellüberleben. Modifizierte Abbildung nach Jimi und Ghosh (Jimi und Ghosh, 2005).

2.6 Histonmodifikationen

Im Gegensatz zur Genetik untersucht die Epigenetik vererbare Unterschiede der Genexpression, die von einer Zell- oder Organismen-Generation in die nächste gelangen. Diese vererbaren Unterschiede beruhen nicht auf der Basensequenz der DNA, sondern auf

der Modifikation von DNA, Chromatin sowie auf posttranskriptionellen Mechanismen (Roloff und Nuber, 2005). Die wichtigsten Mechanismen der Epigenetik sind die DNA-Methylierung und Chromatinstrukturveränderungen; letztere beruhen besonders häufig auf Histonmodifikationen. Chromatinstrukturveränderungen (Chromatinveränderungen) scheinen einem kombinatorischen Code, dem „Histone Code“ für die transkriptionelle Aktivität oder Empfänglichkeit eines DNA-Abschnittes zu dienen, indem sie DNA-Histon-Verbindungen lockern und Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren demaskieren (Claus und Lubbert, 2003; Muegge, 2002).

In dieser Arbeit wurden Histonmodifikationen in humanen Endothelzellen nach bakterieller Infektion untersucht, die nicht im Zusammenhang mit vererbaren Unterschieden der Genexpression (Epigenetik) stehen. Aus diesem Grund wird im Folgenden nicht von Epigenetik, sondern von Chromatinveränderungen, insbesondere Histonmodifikationen gesprochen.

2.6.1 Nukleosom

Histone sind kleine basische Proteine mit einem Molekulargewicht von 11-21 kD. Der Nukleoproteinkomplex aus DNA, Histonen und Nicht-Histonproteinen wird als Chromatin bezeichnet. Im Chromatin ist die DNA mit 146 Basenpaaren (bp) in 1,65 Windungen um Histon-Oktamere (je 2 H2A, H2B, H3 und H4) gewickelt (Wolffe und Kurumizaka, 1998). Im zentralen Histonoktamer sind (H2A-H2B)-Dimere auf jeder Seite des zentralen (H3-H4)₂Tetramers gebunden (Klug *et al.*, 1980). Diese Struktur stellt eine funktionelle, sich wiederholende Einheit des Chromatins dar und wird als Nukleosom, mit enthaltenem Nukleosomkern („Core“) bezeichnet. Einzelne „Core“-Komplexe des Nukleosoms sind über „Linker“-DNA-Einheiten unterschiedlicher Länge miteinander verbunden. An diese binden Histone vom H1-Typ, die an der Kompaktierung des Chromatins zu Strukturen höherer Ordnung beteiligt sind (Carruthers *et al.*, 1998) (Abbildung 2.8).

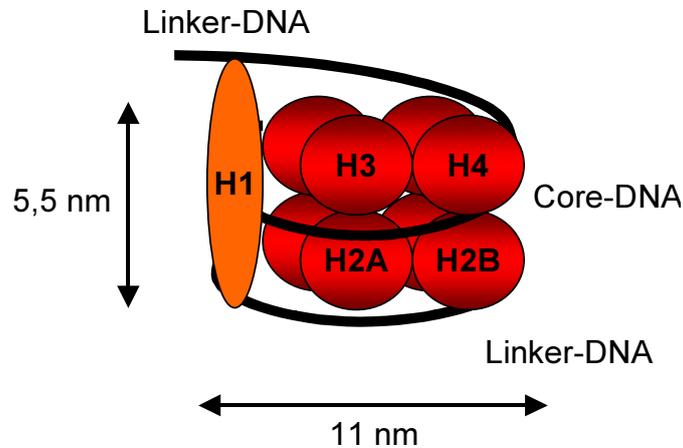


Abbildung 2.8 Schematische Darstellung eines Nucleosoms. Das Nucleosom, als funktionelle, sich wiederholende Einheit des Chromatins, besteht aus einem so genannten Nucleosomkern („Core“). Dabei sind 146 bp DNA (Core-DNA) in 1,65 Windungen einer linksgängigen Helix um ein Oktamer der so genannten Core-Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 gewunden. Core-Komplexe des Nucleosoms sind über Linker-DNA-Einheiten unterschiedlicher Länge miteinander verbunden. An diese binden Histone vom H1-Typ, die an der Kompaktierung des Chromatins zu Strukturen höherer Ordnung beteiligt sind.

2.6.2 Histonmodifikationen

Molekulare Mechanismen der Chromatinveränderung sind die DNA-Methylierung, sowie die Chromatin-/Histonmodifikationen (Cheung und Lau, 2005). Die N-terminalen Histonden können Ziel kovalenter Modifikationen sein, wobei die Effekte je nach Gen Aktivierung oder Blockade der Expression bedeuten können (Strahl und Allis, 2000). Diese spezifischen Modifikationen schließen die Phosphorylierung (Ser/Thr), Azetylierung, Methylierung, ADP-Ribosylierung und Ubiquitinierung (van Holde, 1988) von Histonen ein, die die Ladung und damit die Zugänglichkeit des DNA-Histon-Komplexes für Transkriptionsfaktoren und den basalen Transkriptionsapparat bestimmen. Das Muster dieser Modifikationen trägt in vielen zellulären Prozessen entscheidend zur Regulation der Genexpression bei (Avni *et al.*, 2002).

Eine besondere Bedeutung hat die Histon-Azetylierung. Sie ist die am besten untersuchte Histonmodifikation (Lin *et al.*, 2006). Durch die Entdeckung der Enzyme, die verantwortlich sind für die Aufrechterhaltung einer Balance zwischen dem azetylierten und dem nicht-azetylierten Zustand eines Histons – Histon-Azetyltransferasen (HAT) und Histon-Deazetylasen (HDAC) – konnte gezeigt werden, dass die Azetylierung spezifischer Lysinreste an den N-terminalen Histonden eine fundamentale Bedeutung in der Regulation

der Transkription hat (Struhl, 1998). Hyperazetylierte Histone sind meist mit einer aktivierten genomischen Region assoziiert. Demgegenüber resultiert eine Deazetylierung von Histonen meist in der Repression bzw. in einer Deaktivierung von Genregionen (Arney und Fisher, 2004). Zusätzlich zu der Hyperazetylierung der Aminosäure Lysin ist die Aktivierung eines Gens durch die Methylierung an verschiedenen Aminosäuren der Histone H3 (Lysin, Arginin) und H4 (Arginin) gekennzeichnet (Arney und Fisher, 2004).

Neben der Azetylierung von Histonen ist auch die Phosphorylierung, insbesondere an H1 und H3 von besonderer Bedeutung. Die Phosphorylierung wurde lange Zeit mit der Kondensierung des Chromosoms während der Mitose in Verbindung gebracht (Bradbury, 1992; Koshland und Strunnikov, 1996). Es mehren sich jedoch Hinweise dafür, dass die Phosphorylierung von H3 (speziell an Serin 10) auch an der Regulation und Induktion so genannter "immediate-early genes" wie z. B. *c-jun*, *c-fos* etc. beteiligt ist, die infolge von Umweltreizen aktiviert bzw. deaktiviert werden (Arney und Fisher, 2004).

Weiterhin haben Studien gezeigt, dass eine Phosphorylierung von H3 an Serin 10 nach Stimulation mit einem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) mit einer Hyperazetylierung des Histons einhergeht (Cheung *et al.*, 2000b). Die Azetylierung von Lysinresten (insbesondere von Lysin 14) zusätzlich zu einer Phosphorylierung an Serin 10 des Histons H3 ruft ein ausgeprägtes transkriptionelles Signal hervor. Beleg dafür liefert eine weitere Studie, bei der es zu einer Aktivitätserhöhung der Azetyltransferase GCN5 der Hefe kam, zu der ein spezifischer Rest (R164) gegeben wurde, der benachbart zu Serin 10 des Histons H3 im Enzym-Substrat-Komplex liegt (Lo *et al.*, 2000).

Ansätze zur Klärung der Regulation dieser Histonmodifikationen in der inflammatorischen Antwort liefert zum einen eine Studie, in der gezeigt werden konnte, dass ein inflammatorischer Stimulus (LPS) p38-MAPK-abhängig zu einer Phosphorylierung bzw. Phosphoazetylierung des Histons H3 an den Genpromotoren von *il8* und *mcp1*, jedoch nicht *tnf α* und *mip1 α* in dendritischen Zellen führte (Saccani *et al.*, 2002). Eine weitere Studie zeigte, dass Histon H3 an Serin 10 abhängig von p38-MAPK-Effektoren, und zwar der Mitogen- und Stress-aktivierten Protein Kinasen 1 und 2 phosphoryliert wird (Soloaga *et al.*, 2003).

2.6.3 Histon-modifizierende Enzyme

Die Histon-Azetylierung ist die am besten untersuchte Modifikation, die die Gentranskription beeinflusst und wird durch Histon-Azetyltransferasen (HAT) kontrolliert (Minucci und Pelicci, 2006). Die Histon-Azetyltransferasen (HAT) bewirken die Azetylierung von Histonen und rufen in der Regel einen aktiven Zustand des entsprechenden Genabschnitts hervor. Demgegenüber entfernen Histon-Deazetylasen (HDAC) Azetylgruppen von hyperazetylierten Histonen und bewirken, dass die Histone zu ihrem basalen Status zurückkehren, der mit einer Suppression der Gentranskription einhergeht (Abbildung 2.9).

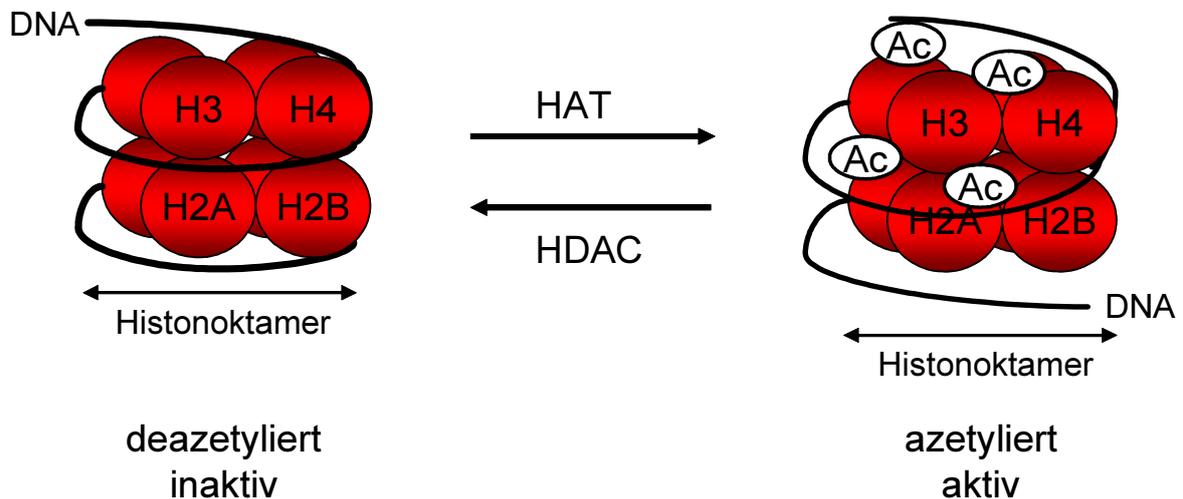


Abbildung 2.9 Die gezeigten Histonenden, die aus dem Nukleosom herausragen, können durch Histon-Azetyltransferasen (HAT) azetyliert werden und weisen einen aktivierten Zustand auf, oder sie werden durch Histon-Deazetylasen (HDAC) deazetyliert und sind inaktiv.

Gentranskription ist nur möglich, wenn die Chromatinstruktur geöffnet ist und die DNA frei zugänglich ist, so dass die RNA Polymerase II und basale Transkriptionskomplexe an die freie DNA binden können und somit die Transkription initiieren (Barnes *et al.*, 2005). Wenn proinflammatorische Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF- κ B aktiviert sind, binden sie an spezifische DNA-Sequenzen und interagieren anschließend mit großen Coaktivator-Molekülen wie CREB-binding Protein (CBP), p300 und p300/CBP-assoziiierter Faktor (PCAF). Diese Coaktivator-Moleküle agieren als molekulare Schalter, die die

SCHRIFTTUM

Gentranskription kontrollieren und haben alle eine intrinsische HAT-Aktivität (McManus und Hendzel, 2003). Normalerweise ist hypoazetyliertes Chromatin mit Geninaktivität, hyperazetyliertes Chromatin dagegen mit Genaktivierung verbunden (Lin *et al.*, 2006).

Es sind mittlerweile elf in drei Hauptklassen (Klasse I, II und IV) charakterisierte HDAC in humanen Zellen bekannt (de Ruijter *et al.*, 2003; Minucci und Pelicci, 2006; Thiagalingam *et al.*, 2003). Klasse I umfasst HDAC 2, 3 und 8, Klasse II HDAC 4, 5, 6, 7, 9 und 10, Klasse IV besteht nur aus HDAC 11 (Minucci und Pelicci, 2006). Die HDAC der Klasse I weisen eine Homologie zu dem HAD-1-ähnlichen Enzym der Hefe auf und können zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma hin- und herwechseln. Die HDAC der Klasse I sind weit verbreitet und in den meisten Zelltypen zu finden, während die HDAC der Klasse II eine geringere Verbreitung haben und in die Zelldifferenzierung involviert zu sein scheinen (Peterson und Laniel, 2004). Studien haben gezeigt, dass verschiedene HDAC verschiedene Azetylierungsmuster erkennen und verschiedene Gene regulieren (Peterson und Laniel, 2004). HDAC interagieren mit Corepressor-Molekülen wie mit dem Nukleären Rezeptor Repressor, Liganden-abhängigem Corepressor, NuRD und mSin3, welche HDAC in der Genrepression unterstützen und eine Spezifität bei der Selektion von Genen ermöglichen, die entweder aktiviert oder deaktiviert werden sollen (Fernandes *et al.*, 2003; Jones und Shi, 2003). Histone sind die am besten untersuchten Substrate der HDAC, dennoch belegen aktuelle Studien, dass HDAC auch für die Modifikation der Aktivität verschiedener Nicht-Histonproteine (z. B. Transkriptionsfaktoren, Mediatoren der Signaltransduktion, mikrotubuläre Komponenten und molekulare Chaperone) verantwortlich sind (Lin *et al.*, 2006).

Mehrere Studien belegen, dass eine Imbalance zwischen HAT und HDAC zu einer Fehlfunktion der Aktivierung bzw. Repression der Transkription und somit zur Entstehung von Tumoren führen kann. Somit wird HDAC-Inhibitoren eine große Bedeutung in Bezug auf die Tumorthherapie beigemessen (Hess-Stumpp, 2005). Dennoch ist der Mechanismus von HDAC-Inhibitoren, der schließlich den antiproliferativen Effekt hervorruft, noch nicht eindeutig geklärt (Lin *et al.*, 2006). HDAC-Inhibitoren beeinflussen durch Chromatinveränderungen die Transkription weniger Gene (weniger als 10% der exprimierten Gene, die entweder aktiviert oder deaktiviert vorliegen) (Lin *et al.*, 2006). Viele der Gene, die durch HDAC-Inhibition beeinflusst werden, sind solche, die für Proteine codiert sind, die die Tumorgenese oder Tumorsuppression bewirken (Lin *et al.*, 2006). Darüber hinaus werden nicht-chromatinverändernde Mechanismen beschrieben, die möglicherweise auch die

antiproliferative Wirkungsweise von HDAC-Inhibitoren hervorrufen: Tumor-assoziierte Proteine, die die Proliferation und den progressiven Zellzyklus bewirken, scheinen durch HDAC-Inhibitoren in ihrem Azetylierungsstatus verändert zu werden (Lin *et al.*, 2006). Trichostatin A (TSA) ist ein nicht-selektiver HDAC-Inhibitor (Yoshida *et al.*, 2003), dessen Effekt auf HDAC allerdings sehr spezifisch ist: TSA hatte z. B. keinen Effekt auf andere Enzyme wie z. B. Protein Kinasen, Proteinphosphatasen, DNA-Topoisomerasen und Calmodulin *in vitro* (Yoshida *et al.*, 1990). TSA führte in alveolären Makrophagen und epithelialen Zelllinien der Atemwege nach Aktivierung mit inflammatorischen Stimuli zu einer Erhöhung der Expression inflammatorischer Gene wie *gmcsf* und *il8* führte (Cosio *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2000; Tomita *et al.*, 2003). Diese Tatsache lässt vermuten, dass HDAC normalerweise die Repression der Expression inflammatorischer Gene bewirken (Barnes *et al.*, 2005). Ein weiterer HDAC-Inhibitor ist Suberoylanilid Hydroxamid Säure (SAHA) (Richon *et al.*, 1998), der bereits in der Phase I und II klinischer Studien bei Patienten mit hämatologischen Tumoren eingesetzt wird (Kelly und Marks, 2005).

2.7 Zytokine/Chemokine

Durch die Erkennung von Pathogenen über PRR (z. B. TLR, Nod) kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege wie MAPK und Rho-GTPasen, die schließlich die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B herbeiführen. NF- κ B bindet an die Promotorregion verschiedener Zytokine und induziert deren Expression.

Zytokine und Chemokine sind sezernierte Proteine mit Wachstums-, Differenzierungs- und Aktivierungsfunktion, die die Immunantwort und die Kontrolle über Zellen von Organen, die wichtig für das Immunsystem sind, regulieren und determinieren (Borish und Steinke, 2003).

Die Zytokine unterliegen einer Einteilung nach ihrer klinischen Relevanz, und zwar in pro- und antiinflammatorische Zytokine, die mit T-Helferzellen vom Typ T_H1/T_H2 assoziiert sind: Beim Menschen gehören zu den T_H1 -Zytokinen in erster Linie IL-2, TNF, $IFN\gamma$ und IL-12 (Mosmann und Sad, 1996). Die Aktivierung von T_H1 -Zellen dient der Eliminierung intrazellulärer Pathogene (Mosmann und Sad, 1996). Humane T_H2 -Zellen induzieren dagegen über die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 humorale Reaktionen (Mosmann und Sad, 1996). $TNF\alpha$, IL-1 β und IL-6 werden als proinflammatorische Zytokine bezeichnet und auch von Makrophagen und Monozyten produziert (Mosmann und Sad, 1996).

Chemokine, als Untergruppe der Zytokine, sind eine Gruppe von kleinen Molekülen (8 bis 12 kD), die in der Lage sind, chemotaktisch auf verschiedene Zellen inklusive neutrophiler Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, eosinophiler Granulozyten, Fibroblasten und Keratinozyten zu wirken. (Borish und Steinke, 2003). Sowohl IL-8 als auch MCP-1 haben eine starke chemotaktische Wirkung und spielen eine zentrale Rolle bei der Migration von neutrophilen Granulozyten an den Infektionsort (Baggiolini, 1998).

In dieser Arbeit war das Augenmerk insbesondere auf die Modellzytokine Interleukin 8 und Interferon γ gerichtet, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

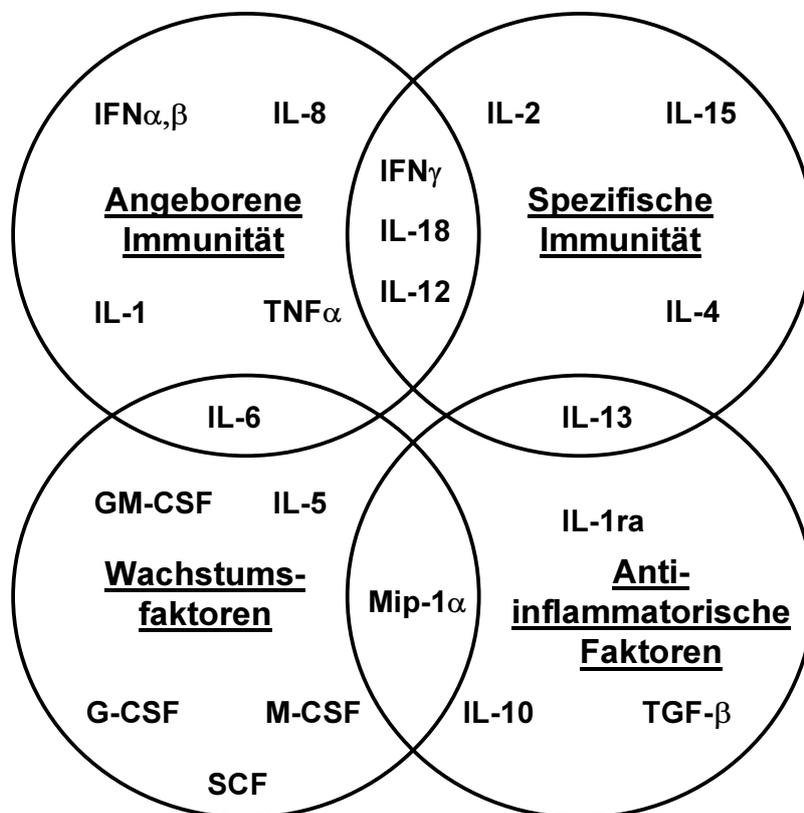


Abbildung 2.10 Zytokine - Einteilung nach Funktion. Modifizierte Abbildung nach Mantovani/Dinarelo/Ghezzi (Mantovani und Dinarelo und Ghezzi, 2000).

2.7.1 Interleukin 8 (IL-8)

Interleukin 8 (IL-8) ist ein Mitglied der Familie von Chemokinen/Zytokinen, deren Hauptfunktion es ist, chemotaktisch zu wirken (Baggiolini, 1998). Es ist ein wichtiger Aktivator von neutrophilen Granulozyten und steht in Verbindung mit einer Vielzahl von inflammatorischen Erkrankungen. IL-8 wird abhängig vom Stimulus von verschiedenen Zelltypen freigesetzt (Roebuck, 1999) und führt zur Rekrutierung von Leukozyten während der akuten Inflammation. Andererseits kann IL-8 jedoch auch schädliche Effekte haben, wenn es lokal vermehrt produziert wird (Baggiolini, 1998; Okamoto *et al.*, 1993). Aus diesem Grund wird die IL-8-Genexpression gezielt auf verschiedenen Ebenen kontrolliert (Okamoto *et al.*, 1993): Zum einen initiativ auf der Ebene der Gentranskription, zum anderen auch posttranskriptionell. Nach zellulärer Stimulation lässt sich IL-8-mRNA bereits nach 60 min detektieren (Roebuck, 1999). IL-8 gehört somit zu den „Early-Response Genen“. Die schnelle Induktion von IL-8 wird durch latente Transkriptionsfaktoren reguliert, die an den *i18*-Genpromotor binden (Roebuck, 1999). Der *i18*-Genpromotor beinhaltet Bindungsstellen für verschiedene induzierbare Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF- κ B, AP-1 und NF-IL-6, die für die proinflammatorische IL-8-Geninduktion verantwortlich sind. Nach Aktivierung binden diese Transkriptionsfaktoren an den *i18*-Genpromotor und aktivieren diesen z. T. synergistisch (Roebuck, 1999). Die Transkriptionsfaktoren und damit die IL-8-Synthese, niedrig oder nicht nachweisbar in normalen nicht-stimulierten Geweben, kann durch proinflammatorische Zytokine wie z. B. IL-1 oder TNF (Brasier *et al.*, 1998; Kasahara *et al.*, 1991) oder infolge des Kontaktes mit Pathogenen wie Bakterien (Pamer, 2004), Viren (Mastronarde *et al.*, 1998; Murayama *et al.*, 1997) und zellstressenden Agenzien (DeForge *et al.*, 1993) aktiviert werden.

2.7.2 Interferon γ (INF γ)

Es gibt drei Mitglieder der INF-Familie, die in verschiedene Typen eingeteilt werden: IFN α und β gehören zur Gruppe der Typ-I-Interferone und IFN γ zu der Familie der Typ-II-Interferone. IFN α und β sind antivirale Mediatoren, die über IFN α -/ β -Rezeptoren erkannt werden, welche Signalwege über JAK/STAT aktivieren. Die Expression dieser Zytokine wird über latente Transkriptionsfaktoren der Familie der IFN-regulierenden Faktoren (IRF) kontrolliert (Barnes *et al.*, 2002). IFN γ scheint neben der antiviralen Wirkungsweise auch eine antiproliferative Funktion zu haben, ferner ist es ein wichtiger Regulator der

T-Helfer-Zellen und führt zur Erhöhung der Expression von MHC-Molekülen u. a. in Endothelzellen (Battle *et al.*, 2006). Weiterhin ist IFN γ durch die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten essentiell für die Immunabwehr gegenüber intrazellulären Bakterien, insbesondere Listerien (Harty und Bevan, 1995; Roesler *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2001). IFN γ wird von verschiedenen Zellen (u. a. auch von Endothelzellen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten) sezerniert, primär jedoch von T-Zellen und NK-Zellen und zu einem geringeren Teil auch von Makrophagen (Frucht *et al.*, 2001). Aufgrund der Tatsache, dass IFN γ unter anderem von T-Zellen gebildet wird, wird es der Familie der Interleukine zugeordnet (Borish und Steinke, 2003). Die Regulation des IFN γ -Promotors scheint in verschiedenen Zellen sehr unterschiedlich zu sein (Zhu *et al.*, 2001) und unterliegt darüber hinaus sehr unterschiedlichen Signalwegen: In Knochenmarkszellen der Maus konnte nach Infektion mit dem Erreger *C. pneumoniae* eine IFN γ -Expression beobachtet werden, die zum einen über den TLR4-MyD88-IFN α/β -abhängigen Signalweg kontrolliert wurde, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 (STAT1 wird aktiviert durch die Kinase JAK) führte, zum anderen wurde die IFN γ -Expression über einen TLR4-unabhängigen Signalweg kontrolliert, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führte (Rothfuchs *et al.*, 2006).

2.8 Angeborene Immunantwort gegenüber den bakteriellen Erregern

***L. monocytogenes* und *C. pneumoniae* in humanen Endothelzellen**

Verschiedene Zelltypen exprimieren unterschiedliche TLRs, und auch die Expression von TLRs in Endothelzellen verschiedener Herkunftsorte scheint zu variieren (Akira *et al.*, 2006). Dem ungeachtet konnte in Endothelzellen gezeigt werden, dass es zur Expression von TLR1, TLR3-6, TLR9 jedoch nicht TLR7 und TLR8 kommt (Faure *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Maaser *et al.*, 2004; Tissari *et al.*, 2005). Die latente Expression von TLR2 ist in Endothelzellen gering (Faure *et al.*, 2001), dennoch konnte zumindest in humanen Endothelzellen der Vene (HUVEC) und Aorta (HAEC) gezeigt werden, dass TLR2/1- und TLR2/6-Agonisten in diesen Zellen ein Signal induzierten (Opitz, unveröffentlichte Daten) und (Dunzendorfer *et al.*, 2004; Opitz *et al.*, 2006). Während TLR2 nicht verantwortlich für die *L. monocytogenes*- und *C. pneumoniae*-bedingte Aktivierung von Endothelzellen zu sein scheint (Opitz *et al.*, 2005; Opitz *et al.*, 2006), ist TLR4 in die endotheliale Wirtsabwehr gegenüber *C. pneumoniae* und chlamydialen Komponenten involviert (Bulut *et al.*, 2002).

Neben transmembranösen TLRs werden die intrazellulären Rezeptoren Nod1 und zu einem geringeren Maße auch Nod2 in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) und Aorta (HAEC) exprimiert (Opitz *et al.*, 2005; Opitz *et al.*, 2006) und aktivieren unter anderem über Rip2 den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Inohara *et al.*, 2000; Opitz *et al.*, 2004). Für *L. monocytogenes* und *C. pneumoniae* konnte gezeigt werden, dass sie abhängig von Nod1 zur Aktivierung von humanen Endothelzellen führen (Opitz *et al.*, 2005; Opitz *et al.*, 2006).

Welche Signalwege, insbesondere Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPK) und Rho-Proteine, in humanen Endothelzellen darüber hinaus durch *C. pneumoniae* und *L. monocytogenes* aktiviert werden, ist nur in Teilen untersucht. Im Falle einer Infektion von Endothelzellen mit *C. pneumoniae* (ATCC VR2282, TW-183) wurden bereits MAPK untersucht: Zum einen konnte wenige Minuten nach Kontakt der Elementarkörperchen (EBs) von *C. pneumoniae* (ATCC VR2282, TW-183) mit Endothelzellen eine Phosphorylierung und Aktivierung von p38-MAPK, ERK1/2 und JNK nachgewiesen werden, zum anderen wurde eine p38- und ERK1/2-abhängige, jedoch nicht JNK-abhängige Induktion von IL-8 ermittelt (Krüll *et al.*, 2004). Bezüglich der MAPK-Aktivierung von Endothelzellen durch *L.-monocytogenes*, die Gegenstand von Untersuchungen dieser Arbeit war, gab es bisher keine veröffentlichten Daten.

Von Rho-GTPasen weiß man, dass sie durch viele intrazelluläre Bakterien aktiviert werden. Im Hinblick auf die Beteiligung von Rho-GTPasen in der Zellaktivierung durch *C. pneumoniae* gibt es bereits verschiedene Hinweise: *C. pneumoniae* (Stamm CV-6, isoliert aus einer arteriosklerotisch veränderten Herzarterie) aktivierte RhoA und Rac1 in Typ2 Epithelzellen der Lunge (Wissel *et al.*, 2005) und der TW-183-Stamm von *C. pneumoniae* aktivierte RhoA und Rac1 in glatten Muskelzellen (Dechend *et al.*, 2003). Weiterhin ist von glatten Muskelzellen bekannt, dass RhoA und Rac1 in die *C. pneumoniae* (Stamm CV-6)-bedingte NF- κ B Aktivierung involviert sind (Dechend *et al.*, 2003). Die Aktivierung von Rho-GTPasen in Endothelzellen durch *C. pneumoniae* bzw. *L. monocytogenes* ist derzeit noch nicht näher untersucht.

Die Bedeutung einer Aktivierung von NF- κ B durch *C. pneumoniae* und *L. monocytogenes* wird in zwei vorangegangenen Studien deutlich: Krüll *et al.* konnten demonstrieren, dass *C. pneumoniae* (Stamm GiD) eine Aktivierung und Translokation von NF- κ B in Endothelzellen bewirkte, einhergehend mit einer erhöhten mRNA-Bildung und Oberflächenexpression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 (Krüll *et al.*, 1999). Dieses führt

zu einer erhöhten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und ist somit wichtig für die Wirtsabwehr. Auch für *L. monocytogenes* gibt es Daten, die belegen, dass es über die *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-bedingte Bildung von Ceramiden zur Aktivierung der NF- κ B-abhängigen Expression von E-Selektin verbunden mit einer erhöhten Adhäsion polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) in humanen Endothelzellen kam (Schwarzer *et al.*, 1998).

L. monocytogenes und *C. pneumoniae* scheinen in humanen Endothelzellen verschiedene Zytokine zu induzieren, wobei IL-8 und IFN γ sicherlich von großer Bedeutung sind. Kothe *et al.* untersuchten in Ansätzen die endotheliale Zellaktivierung durch *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029): Es kam zu einer vermehrten Freisetzung der Chemokine MCP-1 und IL-8 (Kothe *et al.*, 2000). Wichtig für die Hemmung des intrazellulären Wachstums von Chlamydien ist darüber hinaus IFN- γ (Rottenberg *et al.*, 2000). Bezüglich der *L.-monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-bedingten Zytokininduktion in Endothelzellen gibt es ebenfalls verschiedene Studien: Zum einen wurden IL-8, IL-6, GM-CSF, und MCP-1 freigesetzt (Kayal *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 2001), zum anderen konnte die Expression von Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 festgestellt werden (Kayal *et al.*, 1999; Krüll *et al.*, 1997). Wesentlich für die Tilgung der *L. monocytogenes*-Infektion ist die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten durch Zytokine wie IL-8, IFN γ und TNF- α (Harty und Bevan, 1995; Pamer, 2004; Roesler *et al.*, 1999).