

4 Ergebnisse

4.1 *Listeria monocytogenes*, nicht jedoch *Listeria innocua*, invadiert humane Endothelzellen und induziert dosisabhängig die Freisetzung von IL-8 und IFN γ

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde mittels Konfokaler Mikroskopie-Experimente sowie Invasionsassays (Daten nicht dargestellt) untersucht, inwiefern die Erreger *Listeria monocytogenes* (EGD-Stamm, Serotyp 1/2a) und *Listeria innocua* (INN), Serotyp 6b) humane Endothelzellen invadieren.

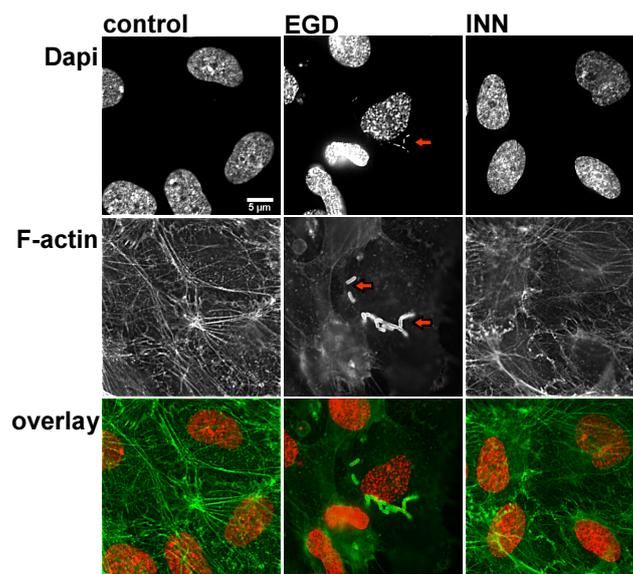


Abbildung 4.1 *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) aktivierte die Aktinschweifbildung in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden für 2 h mit den Erregern *L. monocytogenes* (EGD-Stamm, Serotyp 1/2a) und *L. innocua* (ATCC 33090 (INN), Serotyp 6b) mit einer MOI von 20 infiziert. Die intrazellulären Bakterien wurden 2 h nach Inkubation angefärbt, wobei die DNA (DAPI, rot) und F-Aktin (grün) mittels eines Konfokalen Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht wurden. Dabei konnte nur der Wildtyp *L. monocytogenes* (EGD-Stamm, Serotyp 1/2a) im Zytosol von HUVEC nachgewiesen werden, der zur Rekrutierung von Wirtszell-F-Aktin führte. *L. innocua* (ATCC 33090 (INN), Serotyp 6b) konnte nicht detektiert werden. Repräsentative Fotos aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

ERGEBNISSE

Dazu wurden HUVEC für 2 h mit den jeweiligen Bakterien infiziert und intrazellulär-befindliche Bakterien anschließend mittels F-Aktin-Färbung sichtbar gemacht. *L. monocytogenes* nicht jedoch *L. innocua* waren intrazellulär in den HUVEC lokalisiert (Abb. 4.1). 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). Deshalb wurde das Augenmerk in der vorliegenden Arbeit auf die wichtigen Modellzytokine IL-8 und IFN γ gerichtet, die für die *L. monocytogenes*-induzierte Aktivierung von Endothelzellen von großer Bedeutung sind. Wiederum wurden die Spezies *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) und *L. innocua* (ATCC 33090 (INN), Serotyp 6b) gegenübergestellt und für 15 h mit den jeweiligen Bakterien infiziert. Die Zeitspanne von 15 h und die einzusetzende Erregermenge mit einer MOI von 10 bzw. 20 hatten sich nach mehreren Vorversuchen als geeignet erwiesen, weil im Zellüberstand eine messbare Zytokinfreisetzung erreicht wurde, während die Zellen überlebten (Abb. 4.2). Im weiteren Verlauf der Arbeit musste die Erregerkonzentration zeitweise auf eine MOI von 10 (siehe Abb. 4.9 und 4.10) herabgesetzt werden, weil bedingt durch die Verwendung verschiedener Nabelschnüre und damit unterschiedlicher Anzucht von HUVEC die Zellen mehr oder weniger empfindlich auf den Erreger *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) reagierten bzw. frühzeitig abstarben.

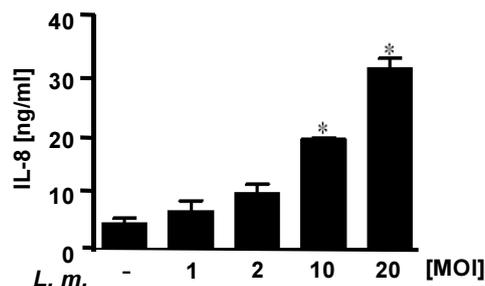


Abbildung 4.2 *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte konzentrationsabhängig die Freisetzung von IL-8. HUVEC wurden für 15 h mit verschiedenen Konzentrationen des Erregers infiziert, und die IL-8-Freisetzung im Zellüberstand mittels IL-8-ELISA gemessen. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte \pm der Standardabweichung von wenigstens drei unabhängigen Experimenten dargestellt, * $p < 0,05$ verglichen mit den nicht infizierten Zellen.

ERGEBNISSE

Humane Endothelzellen, die mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) infiziert wurden, setzten dosisabhängig IL-8 und IFN γ frei (Abb. 4.3, A und B), während der nicht-pathogene Stamm *L. innocua* (ATCC 33090 (INN), Serotyp 6b) in der gleichen Dosis- und Zeitspanne keine Zytokinsekretion auslöste (Abb. 4.3, A und B).

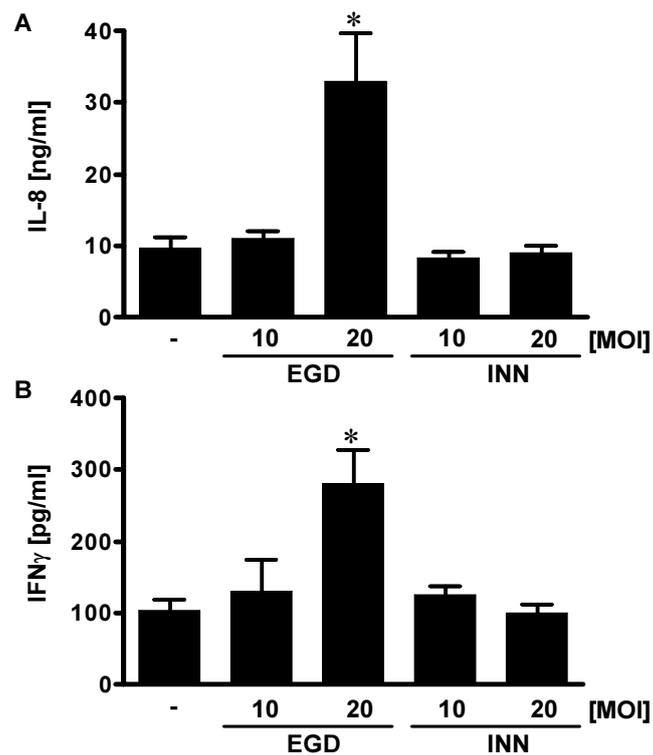


Abbildung 4.3 *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte dosisabhängig die Freisetzung von IL-8 und IFN γ in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) und *L. innocua* (ATCC 33090 (INN), Serotyp 6b) mit einer MOI von 10 und 20 für 15 h inkubiert, und die IL-8- (A) bzw. IFN γ -Freisetzung (B) wurde aus den Zellüberständen mittels IL-8-ELISA bzw. mittels Bio-Plex Cytokine Assays gemessen. Die dargestellten Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten entstanden, * $p < 0,05$ verglichen mit unstimulierten Zellen.

4.2 *Listeria monocytogenes* induziert p38-MAPK- und ERK1/2-abhängig die Freisetzung von IL-8 in humanen Endothelzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *L. innocua* weder humane Endothelzellen invadiert, noch zur Freisetzung der wichtigen Modellzytokine IL-8 und IFN γ führt, wurde im folgenden Verlauf der Arbeit nur noch mit dem pathogen invasiven Erreger *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) gearbeitet. Zunächst sollte überprüft werden, inwiefern *L. monocytogenes* zur Aktivierung von MAPK führt. Dazu wurden zwei verschiedene Konzentrationen des Erregers eingesetzt, und TNF- α (10 ng/ml, 30 min) diente als Positivkontrolle für die Induktion der MAPK. Die Zeitspanne von 30 min wurde beruhend auf eigenen Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) und einer vorangegangenen Studie (Krüll *et al.*, 2004) gewählt. *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte nach 30 min die Phosphorylierung der p38-MAPK und von ERK1/2. Auf die Phosphorylierung der JNK hatte *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) keinen Einfluss (Abb. 4.4).

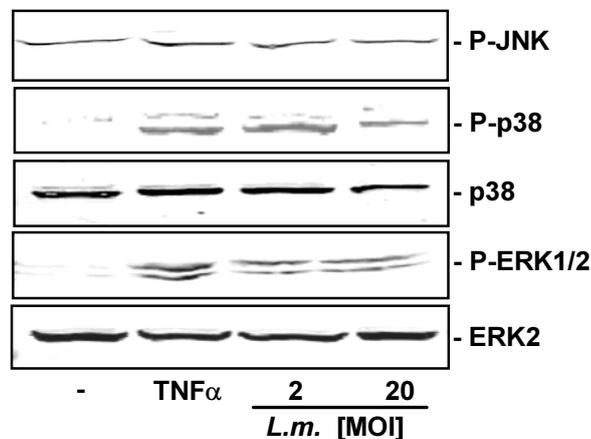


Abbildung 4.4 *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte die Phosphorylierung der p38- und ERK1/2-MAPK und hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der JNK. HUVEC wurden mit 10 ng TNF α bzw. *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 2 und 20) für 30 min infiziert, und die Phosphorylierung von p38-MAPK, ERK1/2 sowie der JNK wurde im Western Blot detektiert. p38-MAPK und ERK2 wurden als Beladungskontrolle verwendet. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot, ausgewählt aus drei unabhängigen Experimenten.

ERGEBNISSE

Die Tatsache, dass die p38-MAPK und ERK1/2 in die *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-bedingte Signaltransduktion involviert sind, ließ sich auch im Folgenden unter Verwendung spezifischer Inhibitoren gegen diese Kinasen bestätigen. Dazu wurde mit dem p38-MAPK-Inhibitor SB202190 (10 μ M) und dem MEK1-Inhibitor U0126 (10 μ M) gearbeitet, die in früheren Studien bereits in HUVEC getestet wurden (Krüll *et al.*, 2004; Schmeck *et al.*, 2004). Diese Studien lieferten Hinweise auf die einzusetzende Konzentration und Vorinkubationszeit der Inhibitoren.

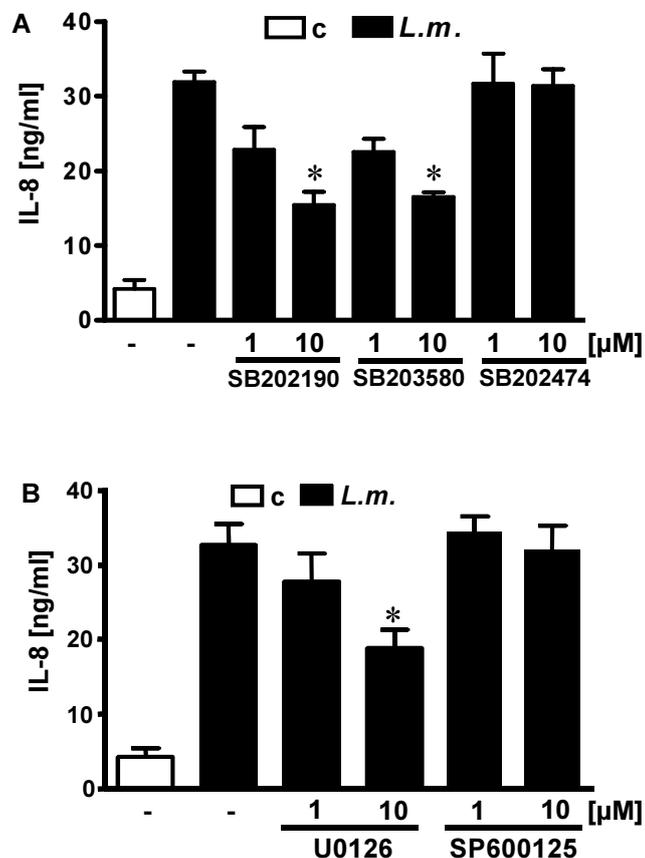


Abbildung 4.5 Die Inhibition der p38-MAPK und der MEK1 nicht jedoch der JNK reduzierte die durch *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte IL-8-Freisetzung. HUVEC wurden für 60 min mit zwei verschiedenen Konzentrationen der p38-Inhibitoren SB202190 (1 μ M, 10 μ M) und SB203580 (1 μ M, 10 μ M), sowie der Kontrollkomponente SB202474 (1 μ M, 10 μ M) (A), dem MEK1-Inhibitor U0126 (1 μ M, 10 μ M) und dem JNK-Inhibitor SP600125 (1 μ M, 10 μ M) (B) vorinkubiert und anschließend mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 20) für 15 h infiziert. Die IL-8-Freisetzung wurde in Zellüberständen mittels IL-8-ELISA gemessen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus wenigstens drei unabhängigen Experimenten, * $p < 0,05$ verglichen mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-infizierten Zellen ohne Inhibitor.

Die Inhibition der p38-MAPK durch die spezifischen chemischen Inhibitoren SB202190 und SB203580 reduzierte die durch *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte IL-8-Freisetzung konzentrationsabhängig, wohingegen die inaktive Kontrollkomponente SB202474 keinen Effekt hatte (Abb. 4.5 A). Während eine Blockade des ERK1/2-Signalweges mittels des MEK1-Inhibitors U0126 auch zu einer Reduktion des IL-8-Signals führte, hatte die Inhibition der JNK über den Inhibitor SP600125 keinen Einfluss auf die Zytokinfreisetzung (Abb. 4.5 B).

4.3 p38-MAPK- und ERK1/2-abhängige Signalwege sind teilweise in die *Listeria monocytogenes*-induzierte Freisetzung von Zytokinen involviert

Im anschließenden Teil dieser Arbeit wurde mittels eines Bioplex-Cytokine Assays untersucht, welche Zytokine zusätzlich zu IL-8 und IFN γ nach Infektion mit den Erregern *L. monocytogenes* (EGD-Stamm, Serotyp 1/2a) von humanen Endothelzellen sezerniert werden. HUVEC wurden für 15 h mit den jeweiligen Erregern infiziert und die Zytokine anschließend im Zellüberstand gemessen. Die humanen Endothelzellen setzten nach Inkubation mit dem Erreger *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) G-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-13, MCP-1 und TNF- α frei (Abb. 4.6).

Die im Bio-Plex Cytokine Assay gemessenen Zytokine wurden im Folgenden daraufhin untersucht, ob der MAPK-Signalweg für die durch *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte Zytokinfreisetzung von Bedeutung ist. Dazu wurde wiederum mit dem p38-MAPK-Inhibitor SB202190 (10 μ M) und dem MEK1-Inhibitor U0126 (10 μ M) gearbeitet.

Die Induktion von IL-4, IL-6 und IL-8 wurde durch den p38-MAPK-Inhibitor und den MEK1-Inhibitor reduziert, wohingegen die Freisetzung von IL-5, IL-7 und MCP-1 nur durch den p38-MAPK-Inhibitor gehemmt wurde (Abb. 4.6).

ERGEBNISSE

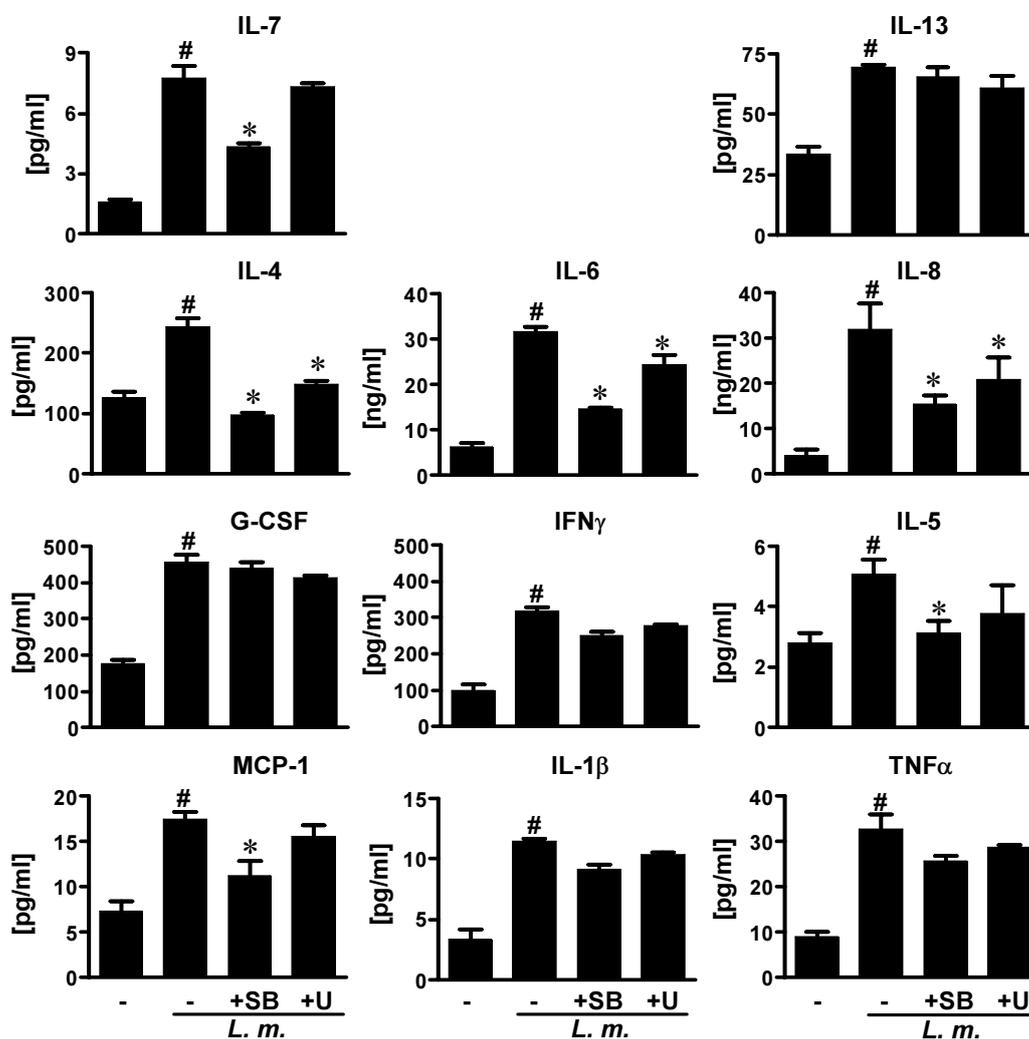


Abbildung 4.6 *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte MAPK-abhängig die Freisetzung von Zytokinen in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden für 60 min mit dem p38-MAPK-Inhibitor SB202190 (SB, 10 μ M) oder dem MEK1-Inhibitor U0126 (U, 10 μ M) vorinkubiert und anschließend mit einer MOI von 20 des Erregers *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) für 15 h infiziert. Die Zytokinfreisetzung wurde im Zellüberstand mittels des Bio-Plex Cytokine Assays gemessen. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte \pm der Standardabweichung von wenigstens drei unabhängigen Experimenten dargestellt, * $p < 0,05$ verglichen mit den infizierten Zellen ohne Inhibitor, [#] $p < 0,05$ verglichen mit unstimulierten Zellen.

4.4 *Listeria monocytogenes* bewirkt die Phosphorylierung und Azetylierung an Histon H3 sowie die Azetylierung an Histon H4

Im folgenden Teil der Arbeit sollte nun untersucht werden, ob *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) Histonmodifikationen in humanen Endothelzellen bewirkt. *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 20) führte zur Phosphorylierung von Ser¹⁰ und zur Azetylierung von Lys¹⁴ an Histon H3, sowie zur Panazetylierung an Histon H4 nach 60-180 min (Abb.4.7).

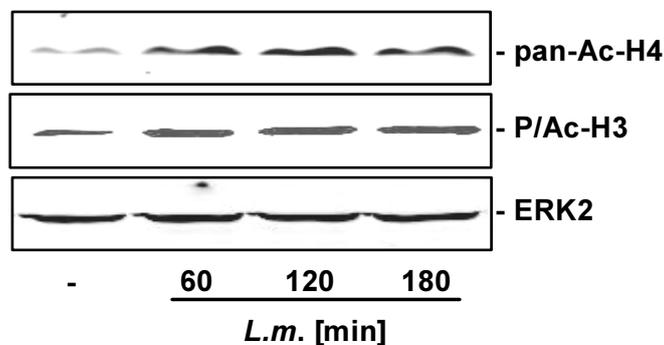


Abbildung 4.7 *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) bewirkte die Phosphorylierung/Azetylierung (Ser¹⁰/Lys¹⁴) an H3 und die Panazetylierung an H4. HUVEC wurden für 60-180 min mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 20) infiziert. Histonmodifikationen wurden mittels säurestabiler Histonextraktion und Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper zur Detektion einer Panazetylierung an H4 oder einer Phosphorylierung/Azetylierung (Ser¹⁰/Lys¹⁴) an H3 dargestellt. Es ist ein repräsentativer Blot gezeigt, der aus drei unabhängigen Experimenten hervorgegangen ist.

Um dieses Phänomen genauer zu überprüfen, wurde im weiteren Verlauf der Studie der Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die *Listerien*-bedingte Zytokinfreisetzung untersucht und Histonmodifikationen infolge einer Infektion mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) spezifisch an den Promotorregionen der Modellzytokine IL-8 und IFN γ detektiert.

4.5 Die Inhibition von HDAC erhöht die durch *Listeria monocytogenes* hervorgerufene IL-8-Sekretion nicht jedoch die IFN γ -Produktion

Um den Einfluss der Histonazetylierung auf die Zytokinexpression nach vorangegangener Infektion mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) näher zu untersuchen, wurde im ELISA bzw. Bio-Plex Cytokine Assay eine Erhöhung des Azetylierungsstatus mittels des HDAC-Inhibitors TSA (0,01 ng/ml) erzeugt. Dabei wurde eine geringe MOI (MOI 1) des Bakteriums gewählt, die nicht bereits zu einer maximalen IL-8-Freisetzung führte (vergleiche auch Abbildung 4.2). TSA (Yoshida *et al.*, 1990), dessen Konzentration von 0,01 ng/ml und Vorinkubationszeit von 60 min einen maximalen Effekt erzielten (Daten nicht gezeigt), hatten sich nach mehreren Vorversuchen als optimal für die Verwendung in HUVEC erwiesen. Eine Vorinkubationszeit von 60 min wurde in Anlehnung an die gängige Literatur zwischen 30 min in BEAS2B-Zellen (Tomita *et al.*, 2003) bis hin zu 2 h in Zellen der Maus gewählt (Lea *et al.*, 2001).

Nach Vorinkubation mit TSA konnte eine signifikante Erhöhung der *L. monocytogenes*-bedingten IL-8-Freisetzung beobachtet werden, nicht jedoch der IFN γ -Freisetzung (Abb. 4.8)

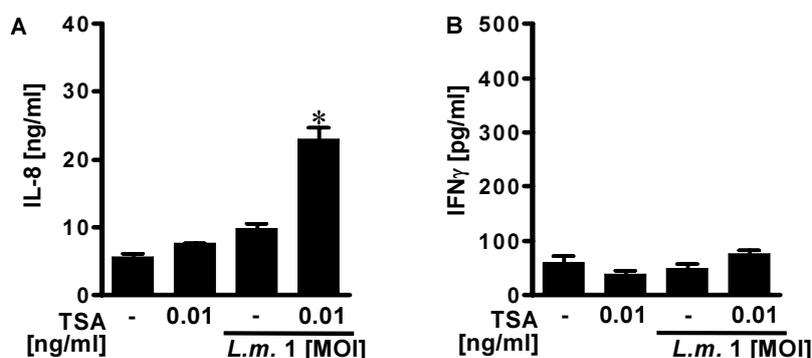


Abbildung 4.8 TSA verstärkte die *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-induzierte IL-8-Freisetzung. HUVEC wurden für 60 min mit dem HDAC-Inhibitor TSA (0,01 ng/ml) vorinkubiert und anschließend mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 1) für 15 h infiziert. Die Freisetzung von IL-8 (A) und IFN γ (B) wurde in Zellüberständen mittels ELISA oder entsprechend mittels Bio-Plex Cytokine Assays gemessen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von wenigstens drei unabhängigen Experimenten, * $p < 0,05$ verglichen mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)- oder TSA-exponierten Zellen.

4.6 *Listeria monocytogenes* bewirkt spezifisch Histonmodifikationen des *i18*-Genpromotors

Um nun zu überprüfen, inwieweit Histonmodifikationen spezifisch an den Promotoren wichtiger Zytokine nach Infektion mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) stattfinden, wurde zunächst der *i18*-Genpromotor untersucht. HUVEC wurden wiederum mit dem Erreger *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 10) für verschiedene Zeitspannen infiziert. Um herauszufinden, ob Modifikationen am *i18*-Genpromotor bereits früher stattfinden, wurde der erste Messzeitpunkt diesmal bereits nach 30 min gewählt. Darüber hinaus wurde hier zusätzlich für eine Zeitspanne von 60 min, die der Vorinkubationszeit für die ELISA-Versuche entspricht, der HDAC-Inhibitor TSA eingesetzt (0,01 ng/ml).

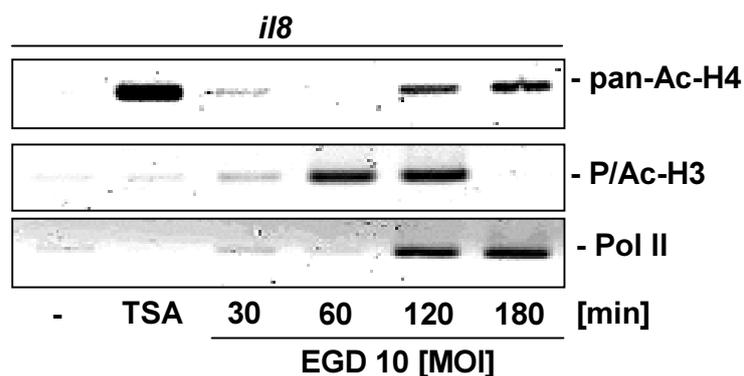


Abbildung 4.9 *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte die Phosphorylierung/Azetylierung an H3 und die Azetylierung an H4 spezifisch des *i18*-Genpromotors. HUVEC wurden entweder mit TSA (0,01 ng/ml) für 60 min behandelt oder mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 10) für 30-180 min infiziert. Die Bindung der RNA Polymerase II und die Modifikation der Histone (panazetyliertes H4 und phosphoryliertes/azetyliertes (Ser¹⁰/Lys¹⁴) H3) wurden am *i18*-Genpromotor mittels ChIP detektiert. Eine repräsentative Abbildung aus drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Die durch *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) hervorgerufene Phosphorylierung/Azetylierung (Ser¹⁰/Lys¹⁴) an H3 des *i18*-Genpromotors wurde 60 min nach der Stimulation detektiert, vergleichbar mit der H3-Analyse im Western Blot (siehe Abb. 4.7). Demgegenüber konnte keine mit der H3-Modifikation im Western Blot vergleichbare Modifizierung der Histone des *i18*-Genpromotors nach 180 min festgestellt werden (Abb. 4.9, vergleiche Abb. 4.7). Eine Panazetylierung des Histons H4 war erstmals 120 min nach

bakterieller Infektion zu sehen und wurde auch bis zu 180 min nach Infektion noch aufrechterhalten (Abb. 4.9). Weiterhin konnte die Bindung der RNA Polymerase II, die einen Hinweis auf den Beginn der Gentranskription gibt, an den *i18*-Genpromotor 120 min nach Infektion erstmals beobachtet werden und war nach 180 min immer noch vorhanden. Wie zu erwarten war, erhöhte die HDAC-Inhibition mittels TSA die Panazetylierung des Histons H4 (Abb. 4.9).

4.7 Die *L. monocytogenes*-Infektion führt zu p38-MAPK- und ERK-abhängiger Histonmodifikation des *i18*-Promotors nicht jedoch des *ifn γ* -Promotors

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) in HUVEC MAPK-abhängig die Freisetzung von IL-8 induziert und außerdem Histonmodifikationen des *i18*-Genpromotors hervorruft, wurde nun folgend die Bedeutung des p38-MAPK- und ERK1/2-Signalweges in Bezug auf Histonmodifikationen und deren Transformierung untersucht. Zusätzlich zum *i18*-Genpromotor war das Augenmerk auch auf den *ifn γ* -Genpromotor gerichtet. Vorab wurde im Western Blot ermittelt, ob der MAPK-Signalweg grundsätzlich in die *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-bedingte Histonmodifikation involviert ist. Dazu wurden HUVEC mit dem p38-MAPK-Inhibitor SB202190 und dem MEK1-Inhibitor U0126 für 60 min vorinkubiert und anschließend für 2 h mit dem Erreger *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 20) infiziert. Es wurde der Zeitpunkt von 2 h gewählt, weil nach dieser Zeitspanne mit Sicherheit Histonmodifikationen festzustellen waren (siehe Abb. 4.7 und 4.9). Danach wurden Histonmodifikationen mittels säurelöslicher Proteinextraktion für Histone und anschließendem Western Blot detektiert. Die Inhibition sowohl des p38-MAPK- als auch des ERK1/2-Signalweges blockierte die durch *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) hervorgerufene Phosphorylierung/Azetylierung an H3 (Ser¹⁰/Lys¹⁴) und die Panazetylierung an Histon H4 (Abb. 4.10 A). Anschließend wurde diese Beobachtung spezifisch für den *i18*-Genpromotor mittels ChIP überprüft. Die Inhibitoren SB202190 und U0126 reduzierten die durch *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-bedingte Polymerase II-Bindung an den *i18*-Genpromotor und somit die Gentranskription (Abb. 4.10 B). Zusätzlich wurden spezifische Histonmodifikationen an H3 (Phosphorylierung/Azetylierung, Ser¹⁰/Lys¹⁴) bzw. an H4 (Panazetylierung) am *i18*-Genpromotor nach Inhibition des p38-MAPK und des ERK1/2 Signalweges reduziert (Abb. 4.10 B).

ERGEBNISSE

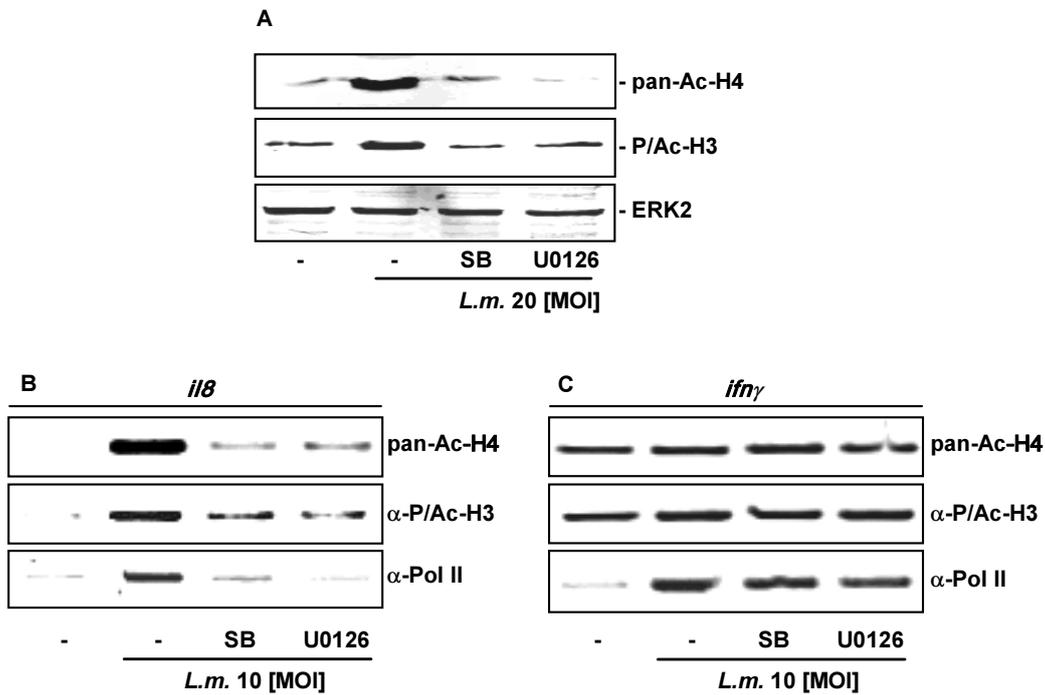


Abbildung 4.10 *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte Histonmodifikationen, die für den *il8*-Genpromotor, jedoch nicht für den *ifn γ* -Genpromotor p38-MAPK- und MEK1-abhängig waren. HUVEC wurden mit dem p38-MAPK-Inhibitor SB202190 (10 μ M) und dem MEK1-Inhibitor U0126 (10 μ M) für 60 min vorinkubiert und anschließend mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 10) für 120 min infiziert (A). Histonmodifikationen wurden nach vorhergegangener Histonextraktion mittels Western Blot detektiert, wobei spezifische Antikörper gegen die Phosphorylierung/Azetylierung (Ser¹⁰/Lys¹⁴) an H3 und die Panazetylierung an H4 verwendet wurden (A). Histonmodifikationen (Panazetylierung an H4 oder Phosphorylierung/Azetylierung von Ser¹⁰/Lys¹⁴ an H3) und RNA Polymerase II wurden für den *il8*- (B) und *ifn γ* -Genpromotor (C) mittels ChIP detektiert. Repräsentative Abbildungen ausgewählt aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Wie in Abschnitt 4.1 erwähnt, spielt IFN γ eine zentrale Rolle in der Immunreaktion des Wirtes gegenüber *L. monocytogenes* (Harty und Bevan, 1995) und kann in Zellüberständen von *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) gemessen werden. Jedoch scheint die Induktion der IFN γ -Sekretion nicht abhängig von p38-MAPK und ERK1/2 zu sein, da die Inhibition dieser Kinasen keine Reduktion der *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-bedingten IFN γ -Freisetzung zur Folge hatte (Abb. 4.6). Um diese Beobachtung weiter zu untersuchen, wurde parallel zum *il8*-Genpromotor auch der *ifn γ* -Genpromotor mittels ChIP-Analyse im Hinblick auf die p38-MAPK- und ERK1/2-abhängige Rekrutierung von IFN γ überprüft. Zwar kam es nach Infektion mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) zu einer vermehrten

ERGEBNISSE

Bindung der Polymerase an den *ifn γ* -Genpromotor, der p38-MAPK- und ERK1/2-Inhibitor reduzierten diese Bindung jedoch nicht (Abb. 4.10 C). Dieses unterstützt das Ergebnis in Abb. 4.6. Darüber hinaus zeigten sich im Gegensatz zu den IL-8-Daten nach Infektion mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) weder vermehrte Histonmodifikationen an H3 (Phosphorylierung/Azetylierung, Ser¹⁰/Lys¹⁴) bzw. an H4 (Panazetylierung) noch konnten diese durch p38-MAPK- und MEK1-Inhibition beeinflusst werden (Abb. 4.10 C).

4.8 *Listeria monocytogenes* reguliert p38-MAPK- und ERK1/2-abhängig die Bindung von Histon-modifizierenden Enzymen

Zum Abschluss der MAPK-Histon-Studie für den *i18*-Genpromotor wurden wiederum mittels Chromatin-Immunpräzipitation Mechanismen untersucht, denen die Histon-modifizierenden Enzyme unterliegen.

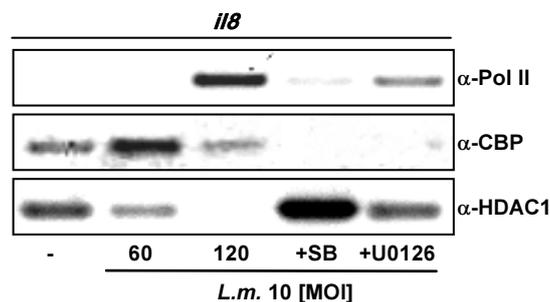


Abbildung 4.11 *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) regulierte die Lokalisation von Histon-modifizierenden Enzymen abhängig von der p38-MAPK und ERK1/2. HUVEC wurden für 60 oder 120 min mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 10) infiziert oder mit dem p38-MAPK Inhibitor SB202190 (10 μ M) bzw. mit dem MEK1 Inhibitor U0126 (10 μ M) für 60 min vorinkubiert und anschließend mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 10) für 120 min infiziert. Die Bindung der RNA Polymerase, CBP und HDAC1 an den *i18*-Genpromotor wurde mittels CHIP detektiert. Gezeigt ist eine repräsentative Abbildung ausgewählt aus drei unabhängigen Experimenten.

Dabei standen an zentraler Stelle die Histon-Azetyltransferase CBP und die Histon-Deazetylase 1 (HDAC1). HUVEC wurden für 60-120 min mit dem Erreger *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) infiziert bzw. für 60 min mit dem p38-MAPK-Inhibitor und MEK1-Inhibitor vorinkubiert und anschließend infiziert. Die Bindung der RNA Polymerase, von CBP und

HDAC1 an den Promotor wurden mittels spezifischer Antikörper am *i18*-Genpromotor detektiert.

Die Infektion mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 10) erhöhte die Bindung von CBP an den *i18*-Genpromotor nach 60 min (Abb. 4.11). Die Inhibition der p38-MAPK sowie der MEK1 reduzierte die CBP-Bindung an den Promotor und war sogar geringer als in nicht infizierten Zellen. HDAC1 war in nicht stimulierten Zellen an den *i18*-Genpromotor gebunden, aber eine Bindung nach Infektion mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) war nicht mehr festzustellen. Die Inhibition der p38-MAPK induzierte die Rekrutierung der HDAC1 an den *i18*-Genpromotor in infizierten Zellen (Abb. 4.11).

4.9 *L. monocytogenes* induziert Rac1-abhängig die Freisetzung von IL-8

Nachdem im ersten Teil der Arbeit MAPK im Zusammenhang mit der *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-induzierten Signaltransduktion und Histonmodifikationen untersucht wurden, waren im nun anschließenden Abschnitt die kleinen GTP-bindenden Proteine, insbesondere Rac1, von besonderem Interesse.

Rho-GTPasen kontrollieren viele Aspekte des Zellverhaltens durch die Regulation verschiedener Signaltransduktionswege (Schmidt und Hall, 2002) und sollten im Zusammenhang mit der *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-bedingten IL-8-Freisetzung untersucht werden. Dazu wurden HUVEC für 24 h mit dem Rac1-Inhibitor NSC23766 (Gao *et al.*, 2004) (200 µM) vorinkubiert und schließlich für 15 h mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 20) infiziert. Die Vorinkubationszeit und einzusetzende Konzentration des Rac1-Inhibitors NSC23766 wurde in einer früheren Studie getestet (Schmeck *et al.*, 2006b). Rac1 reduzierte mit einer Dosis von 200 µM signifikant die *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-bedingte IL-8-Freisetzung (Abb. 4.12).

ERGEBNISSE

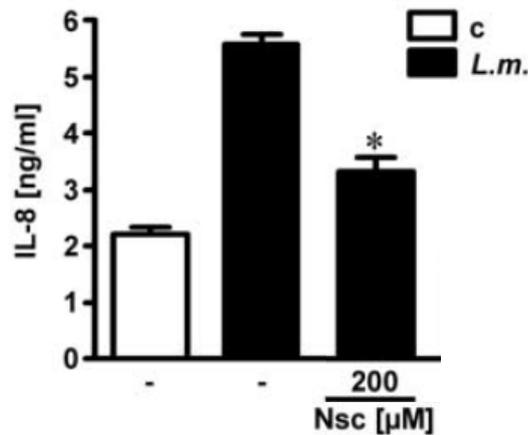


Abbildung 4.12 *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte Rac1-abhängig die IL-8-Freisetzung in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden für 24 h mit dem Rac1-Inhibitor NSC23766 vorinkubiert und anschließend für 15 h mit dem Erreger *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 20) infiziert. IL-8 wurde nach 15 h mittels ELISA im Zellüberstand gemessen. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von wenigstens drei unabhängigen Experimenten dargestellt, * $p < 0,05$ verglichen mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-infizierten Zellen ohne Inhibitor.

4.10 *L. monocytogenes*-bedingte Histonmodifikationen des *i18*-Genpromotors sind Rac1-abhängig

Da in Abb. 4.12 gezeigt werden konnte, dass die durch *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) hervorgerufene IL-8-Sekretion im ELISA abhängig von Rac1 war, wurde diese Beobachtung auf Promotorebene des *i18*-Gens überprüft. HUVEC wurden wiederum für 24 h mit NSC23766 (200 μ M) vorinkubiert und folgend mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 20, 2 h) infiziert. Anschließend wurde im CHIP mittels spezifischer Antikörper die Bindung der RNA Polymerase II, sowie zusätzlich die Bindung der Untereinheit p65 des Transkriptionsfaktors NF- κ B an den *i18*-Genpromotor detektiert. Weiterhin waren die Histone H3 und H4 von besonderem Interesse. Es konnte gezeigt werden, dass neben der RNA Polymerase II auch p65 nach 2 h Infektion mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) an den *i18*-Genpromotor band, und dass der Rac1-Inhibitor NSC23766 signifikant diese Bindung reduzierte. Darüber hinaus war sowohl die *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-bedingte Phosphorylierung/Azetylierung (Ser¹⁰/Lys¹⁴) von H3 als auch die Panazetylierung von H4 nach Rac1-Inhibition deutlich vermindert (Abb. 4.13).

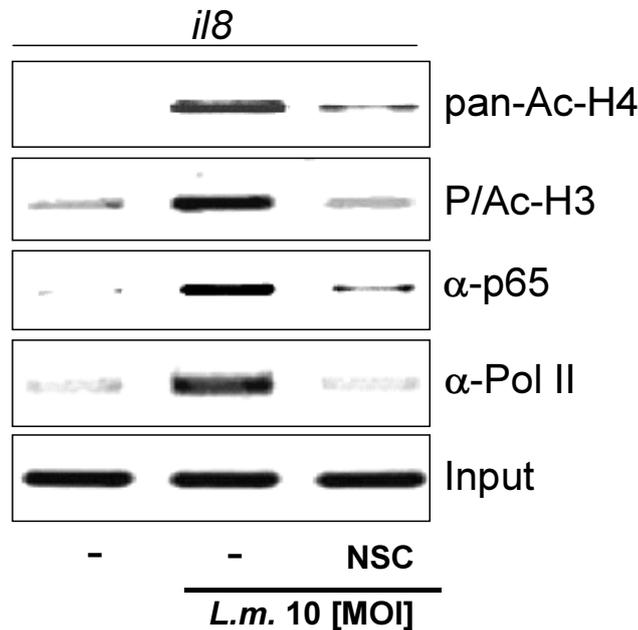


Abbildung 4.13 *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-induzierte Histonmodifikationen des *i18*-Genpromotors waren in humanen Endothelzellen Rac1-abhängig. HUVEC wurden für 24 h mit dem Rac1-Inhibitor NSC23766 (200 μ M) vorinkubiert und anschließend für 2 h mit dem Erreger *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) (MOI 20) infiziert. NSC23766 reduzierte signifikant die *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-bedingte Bindung der RNA Polymerase II und p65 an den *i18*-Genpromotor, als auch die Phosphorylierung/Azetylierung (Ser¹⁰/Lys¹⁴) von H3 bzw. Panazetylierung von H4 des *i18*-Genpromotors. Gezeigt ist eine repräsentative Abbildung ausgewählt aus drei unabhängigen Experimenten.

4.11 *Chlamydomonas pneumoniae* induziert abhängig von Rho-GTPasen die Zytokinfreisetzung in humanen Endothelzellen

Im Anschluss an die Untersuchungen mit dem Gram-positiven Modellorganismus *L. monocytogenes* sollten im folgenden Teil dieser Arbeit Histonmodifikationen nach Infektion mit dem Gram-negativen Bakterium *C. pneumoniae* untersucht werden. Vorausgegangene Studien unserer und anderer Arbeitsgruppen fanden heraus, dass sowohl *L. monocytogenes* als auch *C. pneumoniae* durch Nod1 in Endothelzellen erkannt werden. Darüber hinaus scheint auch eine Beteiligung von Mitgliedern der TLR-Familie in der Endothelzellaktivierung durch beide Erreger wahrscheinlich, wie es für andere Zellarten gezeigt wurde. Weiterhin konnte in Endothelzellen, wie auch hier für den Modellorganismus *L. monocytogenes* gezeigt, eine Beteiligung von MAPK in der Zellaktivierung beobachtet werden (Krüll *et al.*, 2004). Diese Vorüberlegung führte zu der Annahme, dass beide Erreger teilweise gleiche

Signalwege aktivieren, so dass hinsichtlich der Chlamydien-Studie die Beteiligung von MAPK bei der Histonmodifikation nicht untersucht wurde, sondern vielmehr davon ausgegangen wird, dass bzgl. IL-8 gleiche Ergebnisse zu erwarten sind. Das Augenmerk der Chlamydien-Studie war somit auf die Beteiligung von Rho-GTPasen im Hinblick auf Histonmodifikationen gerichtet.

Zusätzlich zum Rac1-Inhibitor NSC23766 (Gao *et al.*, 2004) wurde die Studie der Rho-GTPasen im Zusammenhang mit Chlamydien auf den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Simvastatin (Tesfamariam, 2006) ausgedehnt, der zusätzlich Rho-GTPasen inhibiert. Da eine Chlamydieninfektion im Zusammenhang mit der Entstehung arteriosklerotischer Plaques diskutiert wird (siehe Schrifttum) und Simvastatin zur Cholesterinsenkung eingesetzt wird, war es interessant zu untersuchen, inwiefern Simvastatin durch seine Rho-inhibierenden Effekte auch eine Wirkung auf die *C. pneumoniae*-bedingte Endothelzellaktivierung hat.

Als erstes wurde ermittelt, welche Zytokine in humanen Endothelzellen zusätzlich zu IL-8 durch den Erreger *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) sezerniert werden. Dabei wurde mit einer MOI von 5 des Erregers gearbeitet, da sich in Vorversuchen zeigte, dass eine messbare Konzentration des Zytokins IL-8 innerhalb von 15 h freigesetzt wurde, während die Zellen überlebten (Abb. 4.14 A). Weiterhin wurden HUVEC für 24 h mit dem Rac1-Inhibitor NSC23766 (200 µM) und dem Rho-Inhibitor Simvastatin (15 mg/ml) vorinkubiert und anschließend für 15 h mit dem Bakterienstamm ATCC VR-1310, CWL-029 des Erregers *C. pneumoniae* mit einer MOI von 5 infiziert. Die eingesetzte Konzentration für Simvastatin in vitro von 15 mg/ml stellte sich in eigenen Vorversuchen in HUVEC als geeignet heraus (siehe auch Abb. 4.15 A), eine Vorinkubationszeit von 24 h wurde in Anlehnung an eine vorangegangene Studie in dendritischen Zellen gewählt (Yilmaz *et al.*, 2004). Die humanen Endothelzellen setzten nach Inkubation mit dem Erreger IL-6, G-CSF, IL-8, Mip-1β, GM-CSF und IFN γ frei. Die Freisetzung von IL-6, G-CSF, IL-8, Mip-1β, GM-CSF und IFN γ konnte durch beide Inhibitoren signifikant reduziert werden (Abb. 4.14 B).

ERGEBNISSE

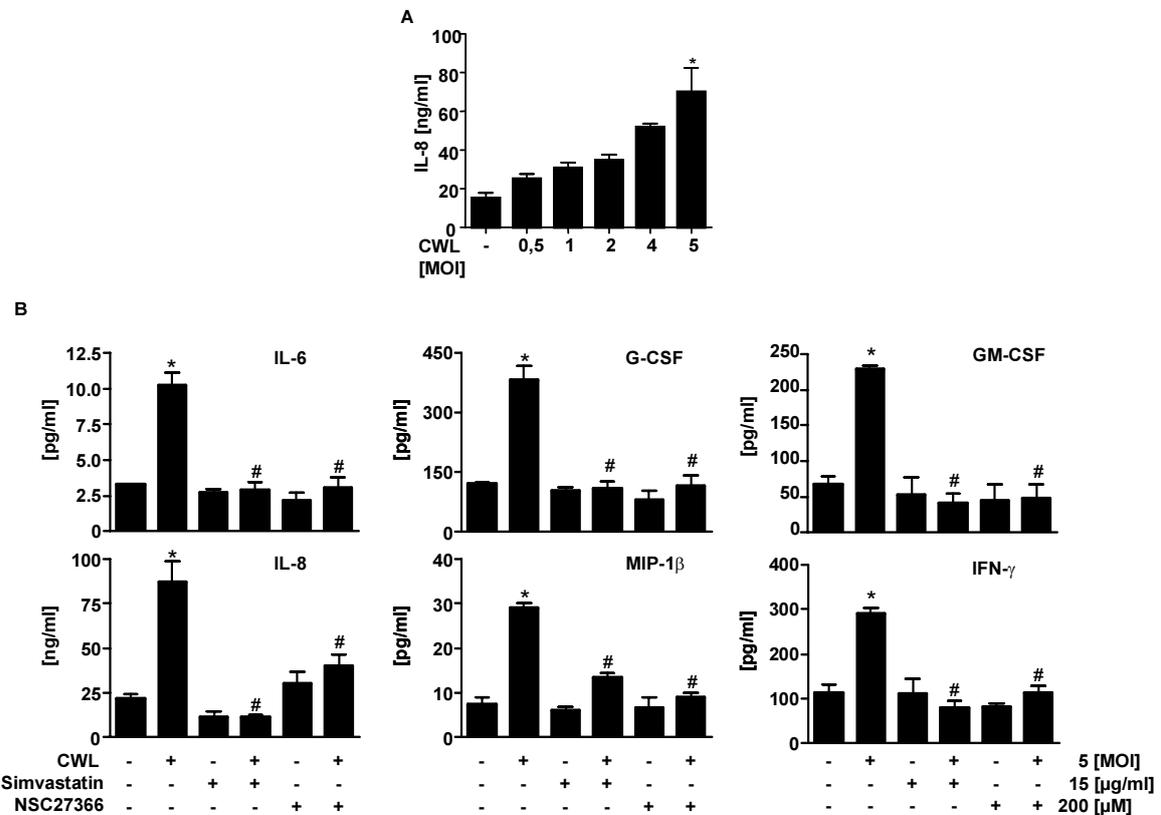


Abbildung 4.14 *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) induzierte konzentrationsabhängig die Freisetzung von IL-8 (A). HUVEC wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Erregers für 15 h infiziert. Die IL-8-Freisetzung wurde anschließend mittels IL-8-ELISA im Zellüberstand gemessen. Die dargestellten Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten entstanden, * $p < 0,05$ verglichen mit unstimulierten Zellen (A). *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) induzierte Rho-GTPasen-abhängig die Freisetzung von Zytokinen in humanen Endothelzellen (B). HUVEC wurden für 24 h mit dem Rac1-Inhibitor (NSC23766, 200 μM) sowie mit dem Rho-Inhibitor (Simvastatin, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) vorinkubiert und anschließend für 15 h mit dem Erreger *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) (MOI 5) infiziert. Die Zytokinfreisetzung wurde im Überstand mittels Bio-Plex Cytokine Assays gemessen (B). Die dargestellten Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten entstanden, * $p < 0,05$ verglichen mit unstimulierten Zellen, # $p < 0,05$ verglichen mit den infizierten Zellen ohne Inhibitor.

4.12 Simvastatin und NSC23766 reduzieren konzentrationsabhängig die durch *Chlamydomphila pneumoniae* induzierte IL-8-Freisetzung

Um zu überprüfen, ob eine Dosisabhängigkeit der Inhibitoren hinsichtlich der Chlamydien-induzierten IL-8-Freisetzung besteht, wurden HUVEC für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen des Rho-Inhibitors Simvastatin (5, 10 und 15 mg/ml) (Abb. 4.15 A) sowie des Rac1-Inhibitors NSC23766 (100, 150 und 200 μ M) (Abb. 4.15 B) vorinkubiert.

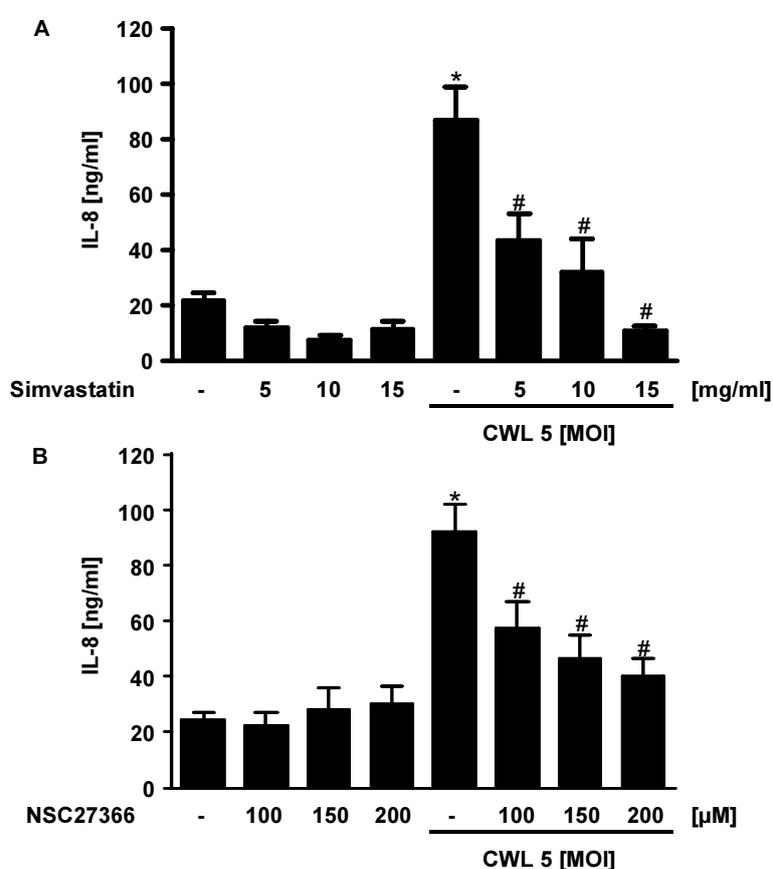


Abbildung 4.15 Simvastatin und NSC23766 reduzierten konzentrationsabhängig die durch *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) induzierte IL-8-Freisetzung. HUVEC wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen des Rho-Inhibitors Simvastatin (5, 10 und 15 mg/ml) (A) und des Rac1-Inhibitors NSC23766 (100, 150 und 200 μ M) (B) vorinkubiert und anschließend mit *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) (MOI 5) für 15 h infiziert. Die IL-8-Freisetzung wurde mittels IL-8-ELISA im Zellüberstand gemessen. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von wenigstens drei unabhängigen Experimenten dargestellt, * $p < 0,05$ verglichen mit unstimulierten Zellen, # $p < 0,05$ verglichen mit den infizierten Zellen ohne Inhibitor.

Anschließend erfolgte die Infektion mit dem Erreger *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) für 15 h mit einer MOI von 5. Es konnte bei beiden Inhibitoren eine konzentrationsabhängige Reduktion der *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029)-induzierten IL-8-Sekretion beobachtet werden. Wie auch schon in der Listerien-Infektion, zeigte sich eine maximale Reduktion der IL-8-Freisetzung durch NSC23766 bei einer Konzentration von 200 μ M (siehe auch Abb. 4.12).

4.13 *Chlamydomphila pneumoniae* bewirkt zeitabhängig Modifikationen am Histon H3 und H4

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029)-vermittelte IL-8-Sekretion in HUVEC abhängig von Rac1 und Rho war, sollte im folgenden Teil der Arbeit überprüft werden, inwieweit auch *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) zu Histonmodifikationen in HUVEC führt, und ob auch diese abhängig von Rac1 bzw. darüber hinaus abhängig von Rho sind. Dazu wurden HUVEC mit dem Erreger *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) mit einer MOI von 5 für 30 bis 180 min infiziert und anschließend Histonmodifikationen mittels spezifischer Antikörper zunächst im Western Blot nach säurelöslicher Histonextraktion detektiert. In Anlehnung an die Listerien-Studie wurde zusätzlich der HDAC-Inhibitor TSA (0,01 ng/ml) für 60 min eingesetzt. *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) führte nach 30-180 min zur Phosphorylierung von Ser¹⁰ und zur Azetylierung von Lys¹⁴ an Histon H3 sowie zur Panazetylierung an Histon H4, wobei nach 180 min eine Reduktion der induzierten Sekretion zu beobachten war (Abb. 4.16 A). Darüber hinaus verstärkte TSA die Panazetylierung an H4. ERK2 wurde als Kontrolle für die Beladung des Western Blots ausgewählt.

Auch innerhalb der Chlamydienspezies gibt es, wie bei Listerien durch *L. innocua* gezeigt, speziesspezifische Unterschiede in der Invasion von HUVEC bzw. innerhalb der Vermehrung in HUVEC. Untersuchungen mit *C. trachomatis* (CTK, Serovar K) ergaben Hinweise zu der Annahme, dass das Wachstum in HUVEC gehemmt ist und hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* nicht in Endothelzellen gelangen können (Krüll *et al.*, 2004). Unter diesen Gesichtspunkten wurde untersucht, ob *C. trachomatis* (CTK, Serovar K) (MOI 5) und hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) (MOI 5) innerhalb von 60 min dennoch zu Modifikationen an den Histonen führen.

ERGEBNISSE

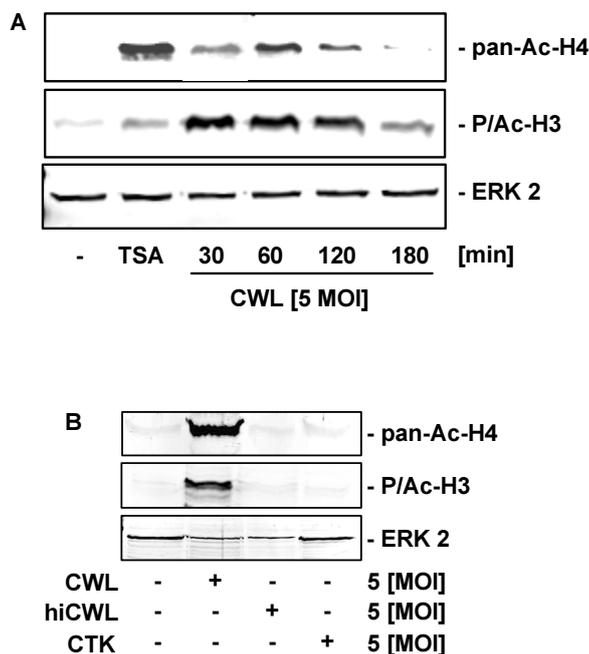


Abbildung 4.16 *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) bewirkte zeitabhängig die Phosphorylierung/Azetylierung an H3 sowie die Azetylierung an H4. HUVEC wurden für 30-180 min mit *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) (MOI 5) infiziert. Die Histonmodifikationen wurden mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper zur Detektion der Panazetylierung an H4 und der Phosphorylierung/Azetylierung (Ser¹⁰/Lys¹⁴) an H3 ermittelt (A). Als Positivkontrolle der Azetylierung wurden die HUVEC zusätzlich mit dem HDAC-Inhibitor TSA (0,01 ng/ml) für 60 min inkubiert. ERK2 diente im Western Blot als Beladungskontrolle. Es wurde ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Experimenten gewählt (A). *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029), jedoch weder hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) noch *C. trachomatis* (CTK, Serovar K), bewirkte Histonmodifikationen an H3 und H4. HUVEC wurden für 60 min mit den Erregern *C. pneumoniae* (MOI 5), *C. trachomatis* (CTK, Serovar K) (MOI 5) sowie hitzeinaktivierten *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) (30 min bei 90 °C, MOI 5) infiziert und Histonmodifikationen anschließend im Western Blot detektiert. Weder *C. trachomatis* (CTK, Serovar K) noch hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) führten zu einer Phosphorylierung/Azetylierung (Ser¹⁰/Lys¹⁴) an H3 oder Panazetylierung an H4. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot ausgewählt aus drei unabhängigen Experimenten (B).

HUVEC wurden für 60 min mit den jeweiligen Spezies mit einer MOI von 5 infiziert und Histonmodifikationen im Western Blot nach vorangegangener Histonextraktion detektiert. Es konnte im Western Blot gezeigt werden, dass weder hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) noch *C. trachomatis* (CTK, Serovar K) Histonmodifikationen am Histon H3 und H4 herbeiführten, obwohl sie unter gleichen Bedingungen wie *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) eingesetzt wurden (Abb. 4.16 B).

4.14 Die Inhibition von HDAC mittels TSA erhöht die durch *Chlamydomphila pneumoniae* hervorgerufene IL-6-, G-CSF-, IL-8-, Mip-1 β -, GM-CSF- und IFN γ -Freisetzung

Auch im folgenden Abschnitt wurde in Anlehnung an Beobachtungen aus der Listerien-Studie die Bedeutung der Azetylierung im Hinblick auf die *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029)-bedingte Zytokinexpression näher untersucht.

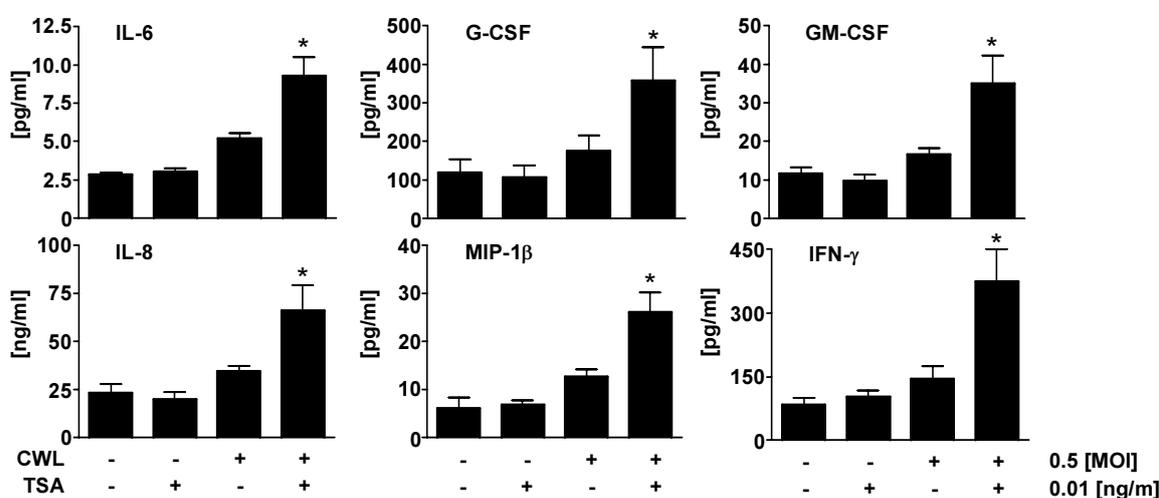


Abbildung 4.17 TSA erhöhte die durch *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) hervorgerufene Zytokinexpression in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden für 60 min mit dem HDAC-Inhibitor TSA (0,01 ng/ml) vorinkubiert und anschließend für 15 h mit *C. pneumoniae* (CWL-029, MOI 0,5) infiziert. TSA erhöhte deutlich die *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029)-induzierte IL-6-, G-CSF-, IL-8-, Mip-1 β -, GM-CSF- und IFN γ -Freisetzung. Die Zytokinfreisetzung wurde im Überstand mittels Bio-Plex Cytokine Assays gemessen. Die dargestellten Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten entstanden, *p<0,05 verglichen mit unstimulierten Zellen.

Neben IL-8 und IFN γ , welches wichtig für die Hemmung des intrazellulären Wachstums von Chlamydien ist (Rottenberg *et al.*, 2000), wurde die Studie in diesem Fall auf weitere Zytokine ausgedehnt. Nach 60 min Vorinkubation mit dem HDAC-Inhibitor TSA (0,01 ng/ml) wurden HUVEC anschließend für 15 h mit dem Erreger *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) und einer niedrigen MOI (MOI von 0,5) infiziert. Nach 15 h wurde die Zytokinkonzentration mittels Bio-Plex Cytokine Assays im Überstand gemessen. TSA allein

fürte zu keiner signifikanten Zytokinfreisetzung, in Kombination mit dem Erreger konnte jedoch eine deutliche Erhöhung der IL-6-, G-CSF-, IL-8-, Mip-1 β -, GM-CSF- und IFN γ -Freisetzung festgestellt werden (Abb. 4.17).

4.15 Die Inhibition von HDAC mittels SAHA erhöht die *C. pneumoniae*-induzierte IL-8-Sekretion in HUVEC und HAEC

Nachdem sowohl für die *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029)- und *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)-Infektion gezeigt werden konnte, dass TSA die Bakterien-induzierte IL-8-Freisetzung steigert, wurde für *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) einerseits überprüft, ob weitere HDAC-Inhibitoren gleiche Effekte hervorrufen, zum anderen, ob bzgl. der Azetylierung von Histonen Unterschiede zwischen verschiedenen Endothelzellen bestehen. Dazu wurden neben den umbilikal-venösen HUVEC auch die aortalen HAEC mit dem HDAC-Inhibitor SAHA (Richon *et al.*, 1998) für 60 min vorinkubiert, HAEC zusätzlich mit dem TSA-Inhibitor. Eine Konzentration für SAHA von 1 nM führte in eigenen Versuchen in HUVEC zu einem maximalen Effekt (Daten nicht gezeigt), die Vorinkubationszeit von 60 min wurde in Anlehnung an die Vorinkubationszeit von TSA gewählt. Anschließend wurden HUVEC und HAEC mit *C. pneumoniae* (CWL-029, MOI von 0,5) für 15 h infiziert und die IL-8-Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Dabei wurde eine geringe MOI gewählt, die nur zu einer geringen IL-8-Freisetzung führte, siehe Abb. 4.14 A. TSA führte auch in HAEC zu einer Erhöhung der durch *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029)-induzierten IL-8-Sekretion (Abb. 4.18 B). Der HDAC-Inhibitor SAHA erhöhte signifikant die *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029)-bedingte IL-8-Sekretion sowohl in HUVEC als auch in HAEC (Abb. 4.18 A und C).

ERGEBNISSE

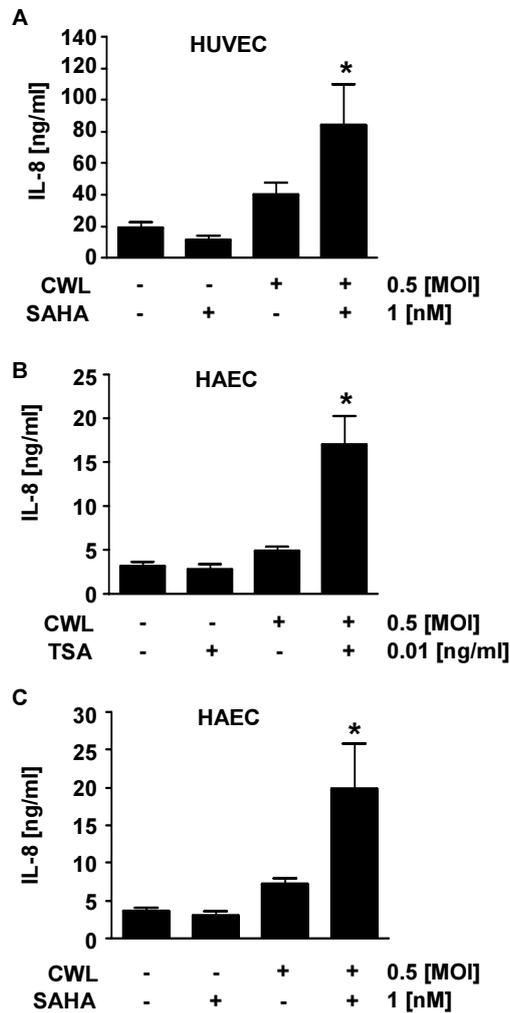


Abbildung 4.18 Der HDAC-Inhibitor SAHA erhöhte sowohl in HUVEC als auch in HAEC die *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029)-induzierte IL-8-Sekretion. Auch TSA zeigte in HAEC einen vergleichbaren Effekt. HUVEC und HAEC wurden für 60 min mit dem HDAC-Inhibitor SAHA (1 nM) bzw. TSA (0,01 ng/ml) vorinkubiert und anschließend mit dem Erreger *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) (MOI 0,5) für 15 h infiziert. Die IL-8-Freisetzung wurde im Zellüberstand mittels IL-8-ELISA gemessen. In HUVEC und HAEC führte SAHA zu einer signifikanten Erhöhung der *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029)-IL-8-Freisetzung (A, C). In HAEC (wie auch in HUVEC (Abb. 4.17)) konnte dieses Ergebnis ebenso für TSA bestätigt werden (B). Dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, * $p < 0,05$ verglichen mit den *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029)-infizierten oder TSA-/SAHA-exponierten Zellen.

4.16 *Chlamydophila pneumoniae* bewirkt zeitabhängig Histonmodifikationen des *il8*-Genpromotors sowie die Rekrutierung von RNA Polymerase II und p65 an den *il8*-Genpromotor

L. monocytogenes (EGD, Serotyp 1/2a) induzierte spezifisch Histonmodifikationen des *il8*-Genpromotors (vergleiche Abb. 4.9). Darauf aufbauend stellte sich die Frage, in wie weit *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) zum gleichen Ergebnis führt.

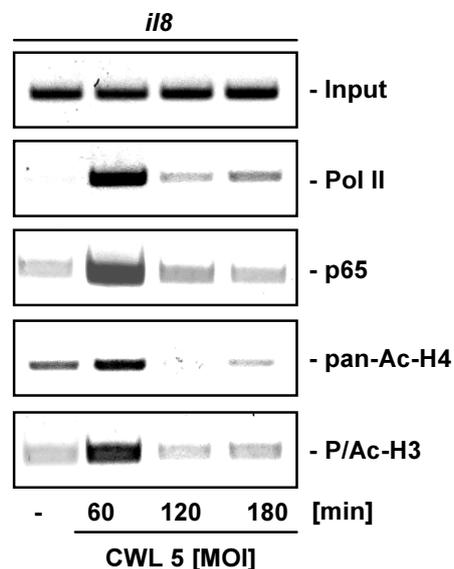


Abbildung 4.19 *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) bewirkte zeitabhängig in humanen Endothelzellen die Rekrutierung der RNA Polymerase II und der NF- κ B-Untereinheit p65 an den *il8*-Genpromotor sowie die Modifikation von Histonen. HUVEC wurden für 60-180 min mit dem Erreger *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) (MOI 5) infiziert und anschließend dem Verfahren der Chromatin-Immünpräzipitation unterzogen. Dabei wurde zum einen die Bindung der RNA Polymerase II und p65 an den Promotor und zum anderen Histonmodifikation mittels spezifischer Antikörper detektiert. Die RNA Polymerase II und p65 banden nach 60 min an den Promotor. Eine Panazetylierung von H4 sowie eine Phosphorylierung/Azetylierung von H3 (Ser¹⁰/Lys¹⁴) des *il8*-Genpromotors waren ebenfalls nach 60 min feststellbar. Dargestellt ist eine repräsentative Abbildung, ausgewählt aus drei unabhängigen Experimenten.

Dabei wurde wiederum nach Stimulation mit *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) die Rekrutierung der RNA Polymerase II und der NF- κ B-Untereinheit p65 an den *il8*-Promotor überprüft und Histonmodifikationen am Histon H3 und H4 detektiert. Dazu wurden HUVEC

mit dem Erreger *C. pneumoniae* für 60-180 min infiziert. Anschließend wurde mittels ChIP die Rekrutierung der RNA Polymerase II sowie der NF- κ B-Untereinheit p65 an den Promotor unter Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen. Parallel dazu konnte eine Panazetylierung am Histon H4 sowie eine Phosphorylierung/Azetylierung am Histon H3 (Ser¹⁰/Lys¹⁴) festgestellt werden. *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) führte somit in humanen Endothelzellen zeitabhängig zur Rekrutierung der RNA Polymerase II und von p65 an den *i18*-Genpromotor, sowie zu Modifikationen an den Histonen H3 und H4 (Abb. 4.19).

4.17 Inhibition von Rac1 und Rho hemmt spezifisch die durch *C. pneumoniae* hervorgerufenen Histonmodifikationen

Nachdem auf Zytokinebene gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition der Rho-GTPasen mittels Simvastatin und NSC23766 (Abb. 4.15 A und B) zu einer Reduktion der durch *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) induzierten IL-8-Freisetzung führte, wurde zum Abschluss der Chlamydien-Studie der Einfluss von Rho-GTPasen auf Histonmodifikationen sowohl im Western Blot nach säurelöslicher Histonextraktion als auch spezifisch mittels ChIP für den *i18*-Genpromotor untersucht. HUVEC wurden für 24 h mit dem Rho-Inhibitor Simvastatin (15 μ g/ml) bzw. mit dem Rac1-Inhibitor NSC23766 (200 μ M) vorinkubiert und anschließend mit einer MOI von 5 des Erregers *C. pneumoniae* (CWL-029) für 60 min infiziert. Es zeigte sich im Western Blot, dass *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) nach 60 min zu einer deutlichen Phosphorylierung/Azetylierung an Histon H3 (Ser¹⁰/Lys¹⁴) und zu einer Panazetylierung an Histon H4 führte. Simvastatin und NSC23766 allein riefen bei beiden keine Histonmodifikationen hervor, reduzierten jedoch signifikant die durch *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) bedingte Phosphorylierung/Azetylierung an H3 bzw. die Panazetylierung an H4 (Abb. 4.20 A). Im ChIP wurde darüber hinaus exemplarisch der Einfluss der Rho-GTPasen auf die Rekrutierung der RNA Polymerase II und p65 an den *i18*-Genpromotor bzw. auf die Modifikation von Histonen des *i18*-Genpromotors nach Infektion mit *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) untersucht. Dazu wurden HUVEC für 24 h mit dem Rho-Inhibitor Simvastatin (15 μ g/ml) vorinkubiert und anschließend für 60 min mit *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) infiziert. *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) induzierte nach 60 min die Rekrutierung der RNA Polymerase II und der NF- κ B-Untereinheit p65 an den *i18*-Genpromotor. Simvastatin reduzierte signifikant die Bindung der RNA Polymerase II und von p65 an den Promotor.

ERGEBNISSE

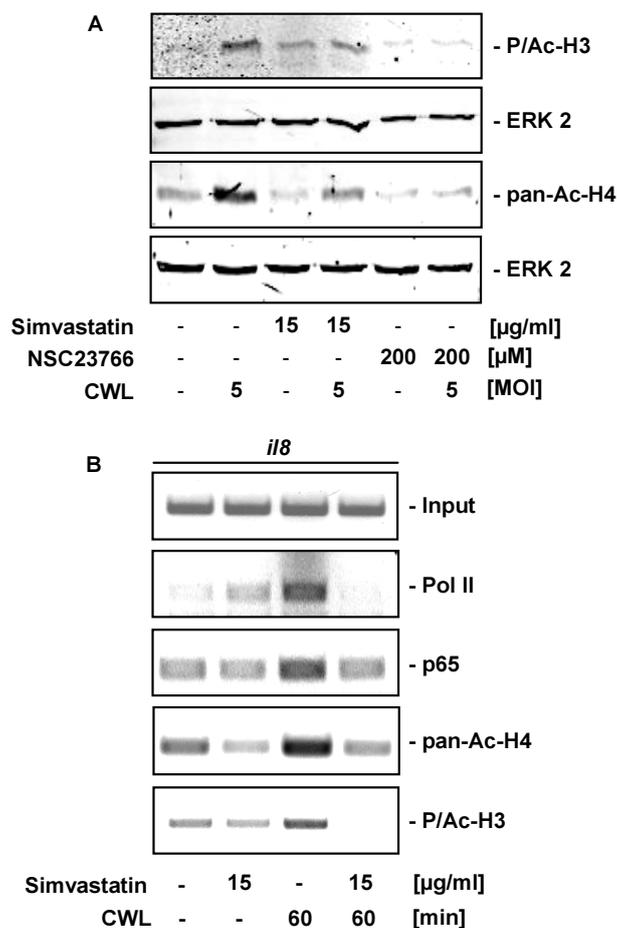


Abbildung 4.20 NSC23766 und Simvastatin hemmten signifikant *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029)-bedingte Histonmodifikationen. HUVEC wurden für 24 h mit dem Rac1-Inhibitor NSC23766 (200 µM) bzw. mit dem Rho-Inhibitor Simvastatin (15 µg/ml) vorinkubiert und anschließend mit *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) (MOI 5) für 60 min infiziert. Histonmodifikationen wurden nach säurelöslicher Histonextraktion und anschließendem Western Blot mittels spezifischer Antikörper detektiert. NSC23766 und Simvastatin hemmten signifikant die durch *C. pneumoniae* hervorgerufene Phosphorylierung/Azetylierung an H3 sowie die Panazetylierung an H4 (A). Um die Veränderungen der Histonmodifikationen, spezifisch des *il8*-Genpromotors, nach Stimulation mit *C. pneumoniae* und Vorinkubation mit Simvastatin näher zu untersuchen, wurde das Verfahren der Chromatin-Immünpräzipitation angewandt. Simvastatin hemmte sowohl die *C. pneumoniae*-bedingte Rekrutierung von RNA Polymerase II und p65 an den Promotor als auch die *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029)-bedingte Phosphorylierung/Azetylierung an H3 (Ser¹⁰/Lys¹⁴) und die Panazetylierung an H4 (B). Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Abbildung, ausgewählt aus drei unabhängigen Experimenten.

Simvastatin allein führte weder zur Rekrutierung der RNA Polymerase II noch von p65 an den *il8*-Genpromotor. *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) bewirkte weiterhin eine

ERGEBNISSE

Phosphorylierung/Azetylierung an H3 (Ser¹⁰/Lys¹⁴) und eine Panazetylierung an H4 nach 60 min. Simvastatin allein führte wiederum nicht zu Modifikationen an den Histonen, hemmte jedoch signifikant die durch *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) hervorgerufenen Modifikationen an H3 und H4 (Abb. 4.20 B). Zusammenfassend zeigt sich somit, dass *C. pneumoniae*-bedingte Histonmodifikationen abhängig von Rho-GTPasen reguliert werden.