

Aus der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Bedeutung des Hitzeschockproteins cHsp60, *groEL*-1
von *Chlamydophila pneumoniae*
für die Aktivierung humaner Endothelzellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Scheiber

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.12.2014

Zusammenfassung

Chlamydophila pneumoniae wurde mit mehreren ernsthaften Erkrankungen in Verbindung gebracht und wird im Zusammenhang mit verschiedenen akuten und chronischen pulmonalen, neurologischen und kardiovaskulären Krankheiten diskutiert. Die Rolle verschiedener chlamydialer Virulenzfaktoren bleibt unklar. Es wurde angenommen, dass das 60-kDa Hitzeschockprotein *groEL-1* wichtig für die Zielzellaktivierung sein könnte. Die Absicht unserer Studie war, die aktivierten Signaltransduktionswege in mit *groEL-1* stimulierten Endothelzellen zu untersuchen.

Das 60-kDa Hitzeschockprotein *groEL-1* induzierte eine zeit- und dosisabhängige Phosphorylierung der endothelialen Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) p38 und ERK 1/2, wobei maximale Effekte nach 15 Minuten unter Verwendung von 20 µg/ml beobachtet wurden. Diesem Ereignis folgte eine Aktivierung und Translokation von NF-κB in den Zellkern sowie eine zeit- und dosisabhängige Expression von endotheliale IL-8. Kinetik und Effizienz der Endothelzellaktivierung waren vergleichbar zu einer Stimulation mit entwicklungsfähigen *C. pneumoniae*.

Die Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege in mit *groEL-1* stimulierten Endothelzellen wurde anschaulich bewiesen: Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38 und ERK 1/2 und NF-κB Aktivierung und Translokation. Eine erhöhte Expression des neutrophilen chemotaktischen Faktors IL-8 konnte in den nachfolgenden Stunden abgelesen werden.

Die Stimulation mit *groEL-1* induzierte eine starke Aktivierung von verschiedenen Signaltransduktionswegen in Endothelzellen. Auf diese Weise kann *groEL-1* der Hauptvirulenzfaktor bei der durch *C. pneumoniae* vermittelten Zielzellaktivierung sein.

Abstract

Chlamydomphila pneumoniae has been linked to several severe illnesses and is discussed in context with numerous acute and chronic pulmonary, neurological and cardiovascular diseases. However, the importance of different chlamydial virulence factors still remains uncertain. The 60-kDa heat-shock protein *groEL-1* has been suggested to be important for target cell activation. The purpose of our study was to investigate signal transduction pathways activated in *groEL-1*-stimulated endothelial cells.

The 60-kDa heat-shock protein *groEL-1* induced a time- and dose-dependent phosphorylation of the endothelial mitogen-activated protein kinases (MAPK) p38 and ERK1/2, maximum effects were seen after 15 minutes using 20 µg/ml, followed by a subsequently activation and translocation of NF-κB into the cell nucleus as well as a time- and dose-dependent expression of endothelial IL-8. Kinetics and efficiency of the activation of endothelial cells were comparable to a stimulation with viable *C. pneumoniae*.

Activation of different signal transduction pathways in *groEL-1*-stimulated endothelial cells has been demonstrated: phosphorylation of MAPK p38 and ERK1/2, and NF-κB activation/translocation. Increased expression of neutrophil chemotactic factor IL-8 was noted within hours.

Stimulation with *groEL-1* induced a strong activation of different signal transduction pathways in endothelial cells and thus may be a key virulence factor in *C. pneumoniae* mediated target cell activation.

Schlagworte

Humane Endothelzellen (HUVEC), rekombinantes chsp60 (*groEL-1*); *Chlamydomphila pneumoniae* (TW183, CWL029); Westernblot, Reporteragen-Assay, IL-8-ELISA

Keywords

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC); recombinant heat-shock-protein 60 (*groEL-1*, chsp60 from *C. pneumoniae*); *C. pneumoniae* strain TW183, CWL029; Western Blotting, reporter gene-Assay; IL-8-ELISA

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chlamydien	1
1.1.1	Taxonomie von Chlamydien	1
1.1.2	Humanpathogene Chlamydienarten	5
1.1.3	Der Weg zur Erstdiagnose von <i>C. pneumoniae</i> -Infektionen	5
1.1.4	Entwicklungszyklus der Chlamydien	6
1.1.5	Hitzeschockproteine.....	9
1.1.6	Virulenzfaktoren von <i>C. pneumoniae</i>	10
1.1.7	<i>C. pneumoniae</i> -assoziierte Erkrankungen	11
1.2	Arteriosklerose	14
1.2.1	Definition.....	14
1.2.2	Formen	14
1.2.3	Theorien der Pathogenese	15
1.2.3.1	Response-to-Injury Hypothese.....	16
1.2.3.2	Bedeutung der Endothelzellen	17
1.2.3.3	Einfluss von <i>C. pneumoniae</i>	17
1.2.3.4	Einfluss von Chlamydialem Hitzeschockprotein 60	18
1.2.3.5	Mechanismen der Signaltransduktion	19
1.3	Zielsetzung und Fragestellung	22
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Zelllinien und Zellkultur.....	24
2.1.1	Isolation und Kultur von HUVEC.....	26
2.1.2	Kultur von HEK293	27
2.1.3	Kultur von HEp-2.....	27
2.2	Bakterienkultur, Anzucht und Aufreinigung von <i>C. pneumoniae</i>	28
2.3	<i>groEL</i> -1 – Hitzeschockprotein 60 von <i>C. pneumoniae</i>	30

2.4	Benutzte Inhibitoren und Zytokine	30
2.5	IL-8 ELISA	31
2.6	Westernblot	32
2.6.1	Proteinextraktion	35
2.6.2	Proteinbestimmung (nach Bradford)	35
2.6.3	SDS-Gelelektrophorese	35
2.6.4	Proteinblot.....	36
2.6.5	Antikörperexposition	37
2.6.6	Antikörperdetektion	37
2.7	Transfektion.....	37
2.7.1	NF- κ B-Reportergen-Assay	37
2.7.2	Transfektion von HUVEC	38
2.7.3	Transfektion von HEK293	40
2.8	Auswertung und Software	42
3	Ergebnisse	43
3.1	<i>groEL</i> -1-stimulierte HUVEC produzieren Interleukin 8	43
3.2	aktivierte Signalwege	44
3.2.1	NF- κ B-Reportergen-Assay in HUVEC	44
3.2.2	Abhängigkeit der IL-8 Sekretion von der Aktivierung der MAPK und der Rho-Proteine	46
4	Diskussion.....	56
4.1	Bedeutung von <i>groEL</i> -1 bei der Zielzellaktivierung	56
4.2	Bedeutung von TLR2 und TLR4 in der <i>groEL</i> -1-vermittelten Zielzellaktivierung.....	57
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick.....	58
5	Literaturverzeichnis	59
6	Anhang.....	69
6.1	Publikationsverzeichnis	69

6.2	Danksagung	72
6.3	Lebenslauf	73
6.4	Eidesstattliche Erklärung	74

1 Einleitung

1.1 Chlamydien

Chlamydien sind obligat intrazelluläre gramnegative Bakterien, die weltweit verbreitet sind, und eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen beim Menschen und verschiedenen Tierarten hervorrufen können.

Für die Klinik beim Menschen sind aus der Familie der Chlamydiaceae die primär humanpathogenen Spezies *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae* und ebenso die primär tierpathogene Spezies *Chlamydophila psittaci* bedeutsam.

1.1.1 Taxonomie von Chlamydien

Chlamydien waren anfangs als Viren klassifiziert (Schachter und Caldwell 1980). Unabhängig davon, dass Chlamydien sowohl DNA als auch RNA enthalten, wurden sie dann auf der Basis ihrer Zellwandarchitektur und -zusammensetzung als gramnegative Bakterien klassifiziert (Kuo, Jackson, Campbell und Grayston 1995). Im Jahr 1999 wurde die Ordnung der Chlamydiales auf der Basis ihrer 16S und 23S rRNA Gene klassifiziert (Everett, und Andersen 1999). Dabei beinhaltet die Ordnung Chlamydiales die Familien Chlamydiaceae, Parachlamydiaceae, Waddliaceae und Simkaniaceae. Diese Untersuchungen erforderten außerdem die Unterteilung der Familie Chlamydiaceae in zwei Gattungen, die als *Chlamydia* und *Chlamydophila* bezeichnet wurden. Die Gattung *Chlamydia* umfasst drei und *Chlamydophila* sechs Arten (Everett, Bush et al. 1999). Dies schloss ein, dass fünf neue Arten eingeführt wurden: *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila felis*, *Chlamydophila caviae*, *Chlamydia suis*, *Chlamydia muridarum*. Drei davon gingen aus *Chlamydia psittaci* und zwei aus *Chlamydia trachomatis* hervor.

Neben den bekannten human- und tierpathogenen Chlamydien, die basierend auf ihrer rRNA als phylogenetisch relativ eng verwandt einzustufen sind, existieren die basierend auf der 16S rRNA phylogenetisch entfernter verwandten Umweltchlamydien (Horn et al. 2004). Diese neuentdeckten Chlamydien-ähnlichen Bakterien vermehren sich jedoch in eukaryonten Wirtszellen nach demselben Entwicklungszyklus wie Chlamydien. Diese Entdeckungen machten die Einführung von drei neuen Familien in die Ordnung Chlamydiales notwendig. Zu der Familie Parachlamydiaceae gehören die

Endosymbionten der Amöbengattungen *Acanthamoeba* und *Hartmannella* (Amann et al. 1997; Fritsche, Horn et al. 2000). Zur Familie Waddliaceae gehört *Waddlia (W.) chondrophila* (Rurangirwa et al. 1999). Ein Vertreter der Familie Simkaniaceae ist *Simkania (S.) negevensis* (Kahane et al. 1999). Die infektionsmedizinische Bedeutung von Vertretern dieser Familien bedarf weiterer Forschung.

Der Familienname Waddliaceae ist abgeleitet von der Abkürzung WADDL (Washington Animal Disease Diagnostic-Laboratory). Mitglieder der Gattung *Waddlia* haben 16S rDNA, die zu über 90% gleich mit der Art *Waddlia chondrophila* Stamm WSU 86-1044T ist (Rurangirwa et al. 1999).

Der Familienname Simkaniaceae ist abgeleitet vom Namen der Wissenschaftlerin Simona Kahane. Die Art *Simkania negevensis* beinhaltet den Stamm *Simkania negevensis* ZT = ATCCVR1471T, der als bakterielle Kontamination in Zellkulturen entdeckt wurde (Kahane et al. 1993). Es wird zunehmend eine Humanpathogenität nahegelegt. *Simkania negevensis* konnte zunächst als Erreger von Atemwegsinfekten bei Bewohnern der Negev-Wüste nachgewiesen werden. Auch außerhalb Israels, vor allem als Erreger respiratorischer Infekte beim Kind, wird *Simkania negevensis* zunehmend beschrieben (Kahane et al. 1998; Epidemiologisches Bulletin 9/2010, www.rki.de).

Die von Everett et al. (Everett, Bush et al. 1999) vorgeschlagene taxonomische Neuordnung ist zwar einerseits von offizieller Seite durch das Taxonomy Committee of the American Society for Microbiology akzeptiert worden, wird andererseits jedoch von vielen namhaften Chlamydienforschern kritisiert (Schachter et al. 2001, Stephens, Myers et al. 2009) und schlichtweg boykottiert (Pollmann 2005). Die Gegner der neuen Taxonomie kritisieren vor allem die Unterteilung der Familie Chlamydiaceae in die zwei Gattungen *Chlamydia (C.)* und *Chlamydophila (Cp.)*, weil es hierfür nur unzureichende Gründe gäbe und die Abkehr von der allgemein anerkannten Gattungsbezeichnung *Chlamydia* unnötige Verwirrung stiften würde. Ebenfalls wird die Einführung der neuen Familien Waddliaceae und Simkaniaceae abgelehnt, da die generierten Daten nur von einzelnen Isolaten stammten. Aus veterinärmedizinischer Sicht ist die neue Taxonomie durch die Unterteilung der früheren *Chlamydia psittaci*-Spezies sinnvoll und hilfreich, weil bei der Diagnose Psittakose (Synonym Ornithose), einer anzeigepflichtigen Tierseuche, tierseuchenrechtliche Maßnahmen zum Tragen kommen (Pollmann 2005).

Ob die neue Gattungsbezeichnung in der Zukunft wieder verlassen wird, bleibt offen (Kuo et al. 2010; Epidemiologisches Bulletin 9/2010, www.rki.de; Rühle, ChlamydiaNews 80/2011, www.medac.de). Es ist zu vermuten, dass die Taxonomie in jedem Fall nicht statisch bleibt, sondern den jeweiligen Erkenntnissen anzupassen ist. Die Unterteilung der Familie Chlamydiaceae in die zwei Gattungen Chlamydia und Chlamydophila ist 2010 überarbeitet worden und es wurde von den Mitgliedern des subcommittee on the taxonomy of the Chlamydiae die Verwendung der einheitlichen Gattungsbezeichnung Chlamydia vorgeschlagen. Dieser Vorschlag resultiert u.a. aus Erwägung nachstehender Gründe: Bei der Untersuchung der 16S rRNA zwischen den Arten *Chlamydophila felis* und *Chlamydophila pneumoniae*, welche beide zur Gattung Chlamydophila gerechnet wurden, besteht in 95,1% Übereinstimmung in der Gensequenz. Wohingegen zwischen den Arten *Chlamydophila felis* aus der Gattung Chlamydophila und *Chlamydia trachomatis* aus der Gattung Chlamydia eine Übereinstimmung von 94,9% gefunden wurde (Greub 03/2010, 06/2010).

Folgende Tabelle 1 versucht die alte und die aktualisierte Taxonomie der Ordnung Chlamydiales und die Arten mit den zugeordneten Wirten wiederzugeben (modifiziert nach Everett und Bush et al. 1999, Collingro und Horn 2005, Stephens, Myers et al. 2009, Horn 2010 sowie Schautteet und Vanrompay 2011).

Tabelle 1 Taxonomie der Chlamydien

	Taxonomie der Chlamydiales vor 1999		Taxonomie der Chlamydiales nach 1999 (Everett und Bush et al. 1999)				Taxonomie der Chlamydiales, wie im 21. Jahrhundert gebräuchlich (Stephens, Myers et al. 2009)	
Ordnung	Chlamydiales		Chlamydiales				Chlamydiales	
Familie	Chlamydiaceae		Chlamydiaceae, Parachlamydiaceae, Waddliaceae, Simkaniaceae				Chlamydiaceae, Parachlamydiaceae, Waddliaceae, Simkaniaceae	
Gattung	Chlamydia		Chlamydia		Chlamydophila		Chlamydia	
Art und dazu Beispiele für Wirte	<i>C. trachomatis</i>	Mensch	<i>C. trachomatis</i>	Mensch			<i>C. trachomatis</i>	Mensch
			<i>C. muridarum</i>	Maus, Hamster			<i>C. muridarum</i>	Maus, Hamster
			<i>C. suis</i>	Schwein			<i>C. suis</i>	Schwein
	<i>C. pneumoniae</i>	Mensch, Koala, Amphibien, Reptilien			<i>Cp. pneumoniae</i>	Mensch, Koala, Amphibien, Reptilien	<i>C. pneumoniae</i>	Mensch, Koala, Amphibien, Reptilien
	<i>C. psittaci</i>	Vögel, Wiederkäuer, Pferd, Schwein, Mensch, Ratte			<i>Cp. psittaci</i>	Vögel, Wiederkäuer, Pferd, Schwein, Mensch, Ratte	<i>C. psittaci</i>	Vögel, Wiederkäuer, Pferd, Schwein, Mensch, Ratte
					<i>Cp. abortus</i>	Schaf u.a. Wiederkäuer, Schwein, Vögel, Mensch	<i>C. abortus</i>	Schaf u.a. Wiederkäuer, Schwein, Vögel, Mensch
					<i>Cp. felis</i>	Hauskatze, Mensch	<i>C. felis</i>	Hauskatze, Mensch
					<i>Cp. caviae</i>	Meerschweinchen	<i>C. caviae</i>	Meerschweinchen
	<i>C. pecorum</i>	Wiederkäuer, Schwein, Koala			<i>Cp. pecorum</i>	Wiederkäuer, Schwein, Koala	<i>C. pecorum</i>	Wiederkäuer, Schwein, Koala

1.1.2 Humanpathogene Chlamydienarten

Auf *Chlamydophila pneumoniae* wird später in den Kapiteln zu *C. pneumoniae* assoziierten Erkrankungen und Arteriosklerose ausführlicher eingegangen.

Chlamydophila psittaci ist Erreger der Psittakose. Sie unterliegt der Meldepflicht und zählt zu den entschädigungspflichtigen Berufskrankheiten. Die Infektion tritt besonders bei berufsbedingter Exposition zu Ziervögeln und Schlachtgeflügel auf.

Chlamydia trachomatis wird von Mensch zu Mensch übertragen. Die Serovare A-C sind Erreger des Trachoms, Serovare D-K verursachen okulogenitale Infektionen, Einschlusskonjunktivitis, Pneumonie beim Neugeborenen und reaktive Arthritis. Durch die Serovare L1-L3 wird Lymphogranuloma venereum hervorgerufen.

Es ist abzuwarten, ob zu den etabliert als humanpathogen angesehenen Chlamydienarten weitere hinzugerechnet werden müssen, sei es auch nur als opportunistische Erreger.

1.1.3 Der Weg zur Erstdiagnose von *C. pneumoniae*-Infektionen

In den 1940iger Jahren wurden verschiedentlich atypische Pneumonien beschrieben, die klinisch z.T. Ähnlichkeiten mit der Psittakose aufwiesen. Ebenso wurden Isolate von betroffenen Patienten beschrieben, die in der Komplementreaktion Ähnlichkeiten mit dem Erreger der Psittakose aufwiesen. Anamnestisch auffällig waren fehlende vorausgegangene Kontakte der Patienten und deren Familien mit Vögeln (Eaton und Beck 1941).

1965 wurde aus dem Konjunktiva-Abstrich eines kranken Grundschulkindes aus Taiwan bei einem Impfversuch gegen das Trachom ein atypisches Isolat gewonnen (Grayston et al. 1986). Das Isolat ließ sich nicht gut im Dottersack von Hühnereiern anzüchten, einer gängigen Kultivierung für *Chlamydia trachomatis*. Auf HeLa 229 und Mc Coy Zellen ließ es sich jedoch erfolgreich kultivieren (Kuo et al. 1986). Das Isolat erhielt die Laborbezeichnung TW-183. Obwohl das Isolat aus einem Konjunktiva-Abstrich stammte, legten serologische Studien nahe, dass der Organismus nicht mit der Augenkrankheit in Beziehung stand (Kuo, Jackson et al. 1995). Von Januar 1983 bis Juni 1985 wurden aus dem Oropharynx von Studenten der University of Washington, Seattle, Washington mit akuten respiratorischen Beschwerden (Pneumonien, Bronchitiden, Sinusitiden und Pharyngitiden) Rachenabstriche gewonnen. Aus diesen

Abstrichen wurde AR-39 (Isolat vom Abstrich des 39. Studenten) isoliert (Grayston et al. 1986). Für die ursprünglich TW-183/AR-39-ähnlichen Organismen wurde TWAR als Konstrukt gewählt (Kuo et al. 1986).

Seit 1990 ist auf der Grundlage serologischer, klinischer und epidemiologischer Daten TWAR als Erreger und pathophysiologisches Korrelat von Infekten des Respirationstraktes gesichert (Saikku et al. 1985; Wang et al. 1990; Mordhorst et al. 1990; Grayston et al. 1990).

Auf Grund der unterschiedlichen elektronenmikroskopischen Morphologie, immunologischen Unterschieden und geringer Homologie in der DNA von TWAR zu *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia trachomatis* (Chi et al. 1987; Cox et al. 1988) wurde für TWAR eine neue Bezeichnung gewählt. Durch die Auswahl der neuen Bezeichnung *Chlamydia pneumoniae* sollte den häufigsten klinischen Krankheitssymptomen Rechnung getragen werden (Grayston et al. 1989).

1.1.4 Entwicklungszyklus der Chlamydien

Chlamydien wachsen obligat intrazellulär. Einzigartig für Chlamydien ist ihr biphasischer Entwicklungszyklus (Kuo, Jackson et al. 1995). Zum einen liegen sie im infektiösen Stadium als Elementarkörperchen vor. Die Elementarkörperchen mit einem Durchmesser von 200 bis 300 nm existieren frei extrazellulär, sind infektiös, weisen aber keinen eigenen Stoffwechsel auf. Zum anderen gibt es die Retikularkörperchen – die intrazelluläre Vermehrungsform. Mit einem Durchmesser von 1000 nm sind sie deutlich größer, sie besitzen einen eigenen Stoffwechsel, befinden sich innerhalb der Zelle in einer Inklusion (Vakuole), sind aber nicht infektiös. Der Entwicklungszyklus bzw. die Infektion der Wirtszelle beginnt mit einer Adhärenz der Elementarkörperchen. Die dann ablaufenden Mechanismen und die Beteiligung unterschiedlicher chlamydialer Proteine sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach der Bindung der Elementarkörperchen werden sie in eine Vakuole in die Wirtszelle aufgenommen (Moulder 1991). Sie entgehen einer lysosomalen Degradation, indem sie die Vesikelreifung zu Lysosomen verhindern (Al-Younes 2001). Innerhalb der ersten Stunden werden bakterielle Proteine exprimiert, die u.a. für den Transport der Inklusion in die den Kern umgebende Region in die Nähe des Mikrotubuli-Organisationszentrums vermitteln. Chlamydiale Proteine werden über ein Sekretionssystem Typ III in die Vesikelmembran eingebaut, die sogenannte Inklusion wird innerhalb der Zelle etabliert

(Al-Younes 2001). Durch Teilung vermehren sich die zu Retikularkörperchen gewordenen Elementarkörperchen, die Inklusion wächst. Über den exozytotischen Transportweg zwischen Golgi-Apparat und Plasmamembran werden den Bakterien Lipide zugeführt. In den Chlamydien findet man Enzyme ähnlich denen, die im Glykolyse- bzw. Phosphatzyklus aktiv sind. Somit können die Chlamydien vermutlich selbst ATP / NADPH herstellen. Zu einem späteren Zeitpunkt (16-48 Stunden post infectionem) verläuft der Zyklus asynchron, d.h. es teilen sich weiterhin Retikularkörperchen und es findet eine Rückdifferenzierung zu Elementarkörperchen statt. 72 Stunden post infectionem sind überwiegend Elementarkörperchen vorhanden, welche in die Umgebung der Zelle freigesetzt werden und neue Zellen infizieren können (Kuo, Jackson et al. 1995, Heuer 2004).

Alternativ ist aber auch eine persistierende Infektion möglich. Hierbei findet keine Rückdifferenzierung zu Elementarkörperchen statt, externe Stimuli induzieren diesen Prozess. Durch Wegfall dieser Stimuli ist eine Rückverwandlung in das infektiöse Stadium möglich (Beatty et al 1994).

Die Abbildung 1 zeigt den Entwicklungszyklus schematisch.

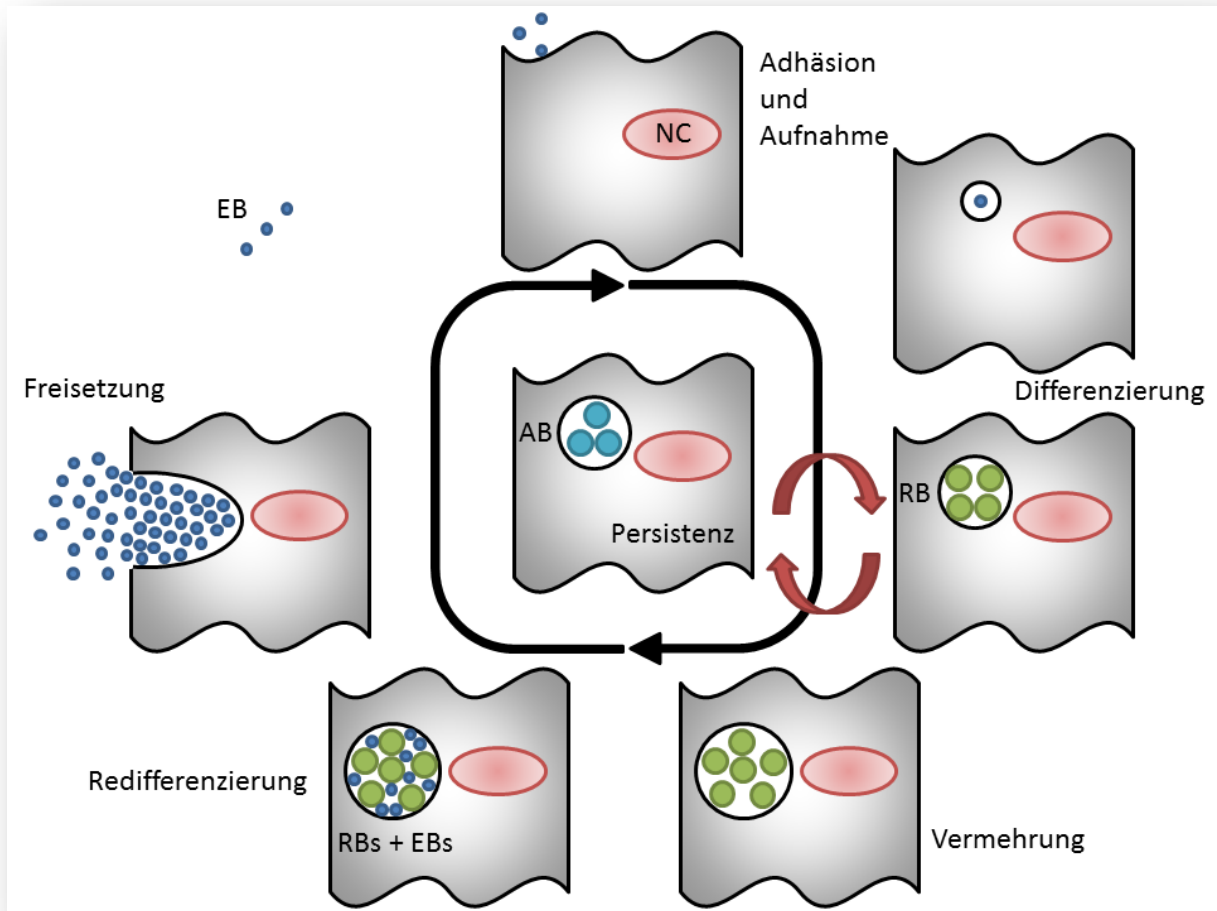


Abbildung 1 Entwicklungszyklus der Chlamydien (modifiziert nach Byrne und Ojcius, 2004)

EB (Elementarkörperchen), RB (Retikularkörperchen), AB (aberrante Form); NC (Zellkern).

1.1.5 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (HSP) sind hochkonservierte zelluläre Stressproteine. Sie haben sich im Verlauf der Evolution nicht wesentlich geändert und sie werden sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten in ausgeprägter Homologie exprimiert. Hitzeschockproteine werden anhand ihres Molekulargewichts klassifiziert z.B. HSP10, HSP25, HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110. Es existieren ständig von der Zelle bereitgestellte konstitutive Hitzeschockproteine und adaptiv im Bedarfsfall synthetisierte induzierbare Hitzeschockproteine (Lindquist 1988).

Die Expression einiger Hitzeschockproteine, auch Chaperone genannt, wird unter Stress-Stimuli z.B. durch Temperaturerhöhung induziert, weshalb der Name Hitzeschockproteine entstand. Sie können eine ATP-abhängige Rückfaltung denaturierter Proteine bewirken. Nicht alle Hitzeschockproteine sind Chaperone. Chaperone assistieren auch unter physiologischen Bedingungen bei Proteinfaltung und -zusammenlagerung oder verhindern Aggregation von Proteinen in der Zelle und helfen beim Zusammenbau von Proteinuntereinheiten u. v. a. m. Folglich ist der Begriff Hitzeschockprotein irreführend.

Bakterielle Hitzeschockproteine sind beim Menschen stark immunogen. Während einer Infektion wird ihre Expression gesteigert, vermutlich um sich vor der Immunabwehr des Wirts zu schützen.

Das chlamydiale 60-kDa Hitzeschockprotein (chlamydiales HSP60) ist eines der am intensivsten untersuchten Hitzeschockproteine. Bei Chlamydieninfektionen ist eine chronische Persistenz der Erreger möglich. In der Persistenz wird das chlamydiale 60-kDa Hitzeschockprotein fortdauernd überexprimiert. Das Immunsystem muss sich permanent mit diesem Antigen auseinandersetzen. Es werden zelluläre und humorale Immunantworten eingeleitet. Des Weiteren wird auch das humane HSP60 überexprimiert, möglicherweise um die menschlichen Zellen zu schützen. Die gegen die konservierten Abschnitte des chlamydialen HSP60 gerichteten Antikörper könnten mit den konservierten Regionen des humanen HSP60 kreuzreagieren. Es wird versucht, Spätfolgen von Infektionen mit Chlamydien mit von chlamydialem HSP60 induzierten Autoimmunreaktionen zu erklären. Reaktive Arthritis, Asthma, Arteriosklerose und koronare Herzerkrankungen werden als mögliche Autoimmunerkrankungen in Folge von Sensibilisierungsprozessen gegen HSP60 kontrovers diskutiert. Die in mancher

Hinsicht widersprüchlichen Ergebnisse könnten sich teilweise darauf zurückführen lassen, dass die Untersuchungen mit verschiedenen, nicht standardisierten, laborinternen Tests durchgeführt wurden. Deshalb sind unmittelbare Vergleiche unzulässig.

1.1.6 Virulenzfaktoren von *C. pneumoniae*

Als Pathogenität wird die Fähigkeit eines Erregers Wirtsorganismen zu infizieren und pathologische Zustände herbeizuführen bezeichnet. Das Ausmaß der Pathogenität ist die Virulenz eines Erregers und hängt von der Infektiosität (Kontagiosität, Adhärenz, Invasivität, Reproduktionsvermögen), Toxizität und Gewebeaffinität ab. Die Virulenz ist ein Maß für die Aggressivität. Die Virulenz ist relativ, da sie immer auch von der Abwehrlage des befallenen Organismus abhängt. So bedeutet eine hohe Virulenz, dass schon geringe Erregermengen schwere Infektionen hervorrufen. Während eine geringe Virulenz ausdrückt, dass große Erregermengen oder eine Immunschwäche des Wirtsorganismus zum Hervorrufen einer Infektion notwendig sind.

Es wird angenommen, dass Chlamydien Effektorproteine in das Zytoplasma der Wirtszelle sezernieren, welche die MHC-I und MHC-II Synthese und die Apoptose inhibieren (Heuer 2004).

Mögliche Virulenzfaktoren von *C. pneumoniae* könnten ein Typ-III-Sekretionssystem sowie die Chlamydienprotease CPAF (chlamydial protease- or proteasome-like activity factor, chlamydealer Proteasen- oder Proteasom-ähnlicher Aktivitätsfaktor) sein (Heuer 2004).

C. trachomatis kann durch Sekretion von CPAF in das Zytosol sowohl die MHC Klasse I und Klasse II Antigenexpression unterdrücken (Zhong et al. 2001). In *C. pneumoniae* konnte ein CPAF-Homolog CPAFcp (CPAF von *C. pneumoniae*) gefunden werden (Fan et al. 2002). CPAF käme als vorstellbare Achillesferse der Chlamydien, im Kontext einer durch Impfung induzierten Immunerkennung, in Betracht. Versuche mit nasaler Vakzination von Mäusen verliefen vielversprechend (Murthy et al. 2007).

Wie beim Entwicklungszyklus der Chlamydien betont, kann es unter bestimmten Stimuli zur Persistenzinduktion mit der Bildung von aberranten Retikularkörperchen kommen, welche unter Wegfall der Stimuli auch nach längerer Zeit wieder in den Zyklus eintreten können (Beatty et al 1994). Chlamydien exprimieren das 60 kDa große Hitzeschockprotein (chlamydiales Hitzeschockprotein 60 bzw. *groEL-1*) auf ihrer Oberfläche. Hitzeschockproteine entstammen der Gruppe der Chaperone. Sie werden vor allem unter Vorliegen von Stressoren gebildet und haben die Aufgabe die Proteinfaltung zu unterstützen.

Die Analyse persistent infizierter Zellen durch Immunfluoreszenzmikroskopie und Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern enthüllte, dass die aberranten chlamydialen Retikularkörperchen nahezu normale Spiegel an chlamydialem 60-kDa Hitzeschockprotein aufweisen (Beatty et al 1993). Dies ist vor dem Hintergrund besonders interessant, wenn man Arteriosklerose als atypische *C. pneumoniae*-Infektion ansieht, bei der eine persistent unterhaltene Infektion fortbesteht und man versucht chlamydiales Hitzeschockprotein 60 als den Mediator der proinflammatorischen Endothelzellaktivierung zu betrachten. Beachtet man die insgesamt abnehmende Proteinsynthese in den aberranten Formen - u.a. wird weniger chlamydiales LPS und MOMP synthetisiert - wird das weiter konstant bzw. überexprimierte chlamydiale Hitzeschockprotein 60 ein möglicher Kandidat als Virulenzfaktor.

1.1.7 *C. pneumoniae*-assoziierte Erkrankungen

C. pneumoniae wird im Zusammenhang mit zahlreichen akuten und chronischen pulmonalen, neurologischen und kardiovaskulären Erkrankungen diskutiert. *C. pneumoniae* erfüllt für akute Erkrankungen der Atemwege die Henle-Koch-Postulate um als ein Erreger bezeichnet zu werden.

Das klinische Bild der *C. pneumoniae*-Infektion ähnelt der Mycoplasmenpneumonie mit Pharyngitis, Sinusitis, Bronchitis und Pneumonie. Betroffen sind vor allem ältere Kinder und junge Erwachsene. Die meisten Patienten haben Husten, Fieber und Auswurf. Hinweisend ist bei einer Pneumonie das gleichzeitige Auftreten von Symptomen der oberen Luftwege, wie Laryngitis oder Pharyngitis. Die respiratorischen Infektionen durch *C. pneumoniae* können jedoch oft symptomarm bis asymptomatisch verlaufen (Mielke 2004).

Bei zahlreichen anderen Erkrankungen ist der ursächliche Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von *C. pneumoniae* und der untersuchten Erkrankung noch immer weitgehend unbekannt. Eine Assoziation von *C. pneumoniae* wird mit den unterschiedlichsten akuten oder chronischen Erkrankungen diskutiert. Eine Auflistung von Beispielen zeigt die Tabelle 2.

Tabelle 2 Erkrankungen assoziiert mit *C. pneumoniae* (modifiziert nach Stratton 2000, Gabler-Sandberger 2000, Saikku 1999)

	akute Erkrankungen	chronische Erkrankungen
Respirationstrakt	Pneumonie, Bronchitis	Asthma bronchiale, chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Sarkoidose
HNO	Non-Streptokokken-Tonsillitis, Pharyngitis, Sinusitis	chron. Pharyngitis / Tonsillitis / Laryngitis / Sinusitis / Otitis media
neurologisch	Meningo-Enzephalitis, Radikulitis, Guillian-Barré-Syndrom	Multiple Sklerose, Morbus Alzheimer
kardiovaskulär	Endokarditis, Myokarditis	Vaskulitis, Arteriosklerose, Kardiomyopathie
Weitere	Erythema nodosum, reaktive Arthritis	Lungenkrebs, chronisches Müdigkeitssyndrom (chronic fatigue syndrome), kutanes T-Zell-Lymphom, maligne Lymphome, Pyoderma gangraenosum, Ulcus cruris bei Diabetes mellitus, diabetische Nephropathie, interstitielle Zystitis

Es ist ungeklärt wie *C. pneumoniae* kausal oder verstärkend an derart vielen Erkrankungen beteiligt sein könnte, welche nicht zwingend miteinander in einem Zusammenhang stehen. Eine Vermutung besteht darin, dass der Erreger *C. pneumoniae* nach pulmonaler Infektion über direktem Zugang zum Blutstrom bei kurzzeitiger Bakteriämie in den Systemkreislauf gelangt respektive mit Hilfe der Monozyten transportiert wird (Krüll 1999). In vitro konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* in Monozyten persistieren können (Köhler et al. 1997). Unter der Infektion weisen die Monozyten, die entscheidende Eigenschaft auf, den Blutkreislauf zu verlassen und in die Gewebe eindringen zu können. Diese Beweglichkeit sowie die Synthese proinflammatorischer Moleküle trägt zu einer lokalen Entzündung bei – ein typisches Kennzeichen aller Krankheiten, die mit Chlamydia in Verbindung gebracht werden (Szczeppek 2004).

Mehrere Autoren haben einen ätiologischen Zusammenhang zwischen einer chronischen Chlamydieninfektion und dem vermehrten Auftreten von koronarer Herzkrankheit (KHK) und Arteriosklerose postuliert.

1988 wurde erstmals von Saikku et al. in einer Seroprävalenzstudie ein Zusammenhang zwischen erhöhten Antikörpern gegen *C. pneumoniae* und dem Auftreten von koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt beschrieben. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt fanden sich in 68% der Patienten Antikörper gegen *C. pneumoniae*, bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit in 50%, bei Kontrollpersonen in 17% (Saikku et al. 1988).

1992 wiesen Shor und Kuo *C. pneumoniae* in Autopsiematerial mittels Polymerasekettenreaktion und Elektronenmikroskopie nach (Shor et al. 1992). Mittels Elektronenmikroskopie, Polymerasekettenreaktion, Immunhistochemie und Zellkultur gelang es weiteren Arbeitsgruppen diesen Zusammenhang zu unterstützen (Saikku et al. 1992; Campbell et al. 1995; Kuo, Grayston et al. 1995; Muhlestein et al. 1996; Maass und Gieffers 1996; Maass et al. 1998; Bartels et al. 1999; Grayston und Campbell 1999).

1.2 Arteriosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Krankheits- und Todesursache in den Industrieländern. Ihre Inzidenz nimmt in den weniger entwickelten Ländern rapide zu. Der hauptsächlich zugrunde liegende Prozess ist die Atherosklerose (Watson und Alp 2008).

1.2.1 Definition

Nach der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist die Atherosklerose eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen verbunden mit Veränderung der Arterienmedia (Böcker, Denk und Heitz 2004).

Zu den Risikofaktoren erster Ordnung, die statistisch in der Framingham-Studie nachgewiesen wurden, zählen u.a. Hypertonie, Dyslipoproteinämie, Hypercholesterinämie, erhöhtes Lipoprotein(a), Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Alter, männliches Geschlecht.

1.2.2 Formen

Arteriosklerose, synonym wird auch der Begriff Atherosklerose verwendet, welcher die histopathologischen Veränderungen betont, ist eine Erkrankung der Arterien. Sie tritt erstens in Form der Atherosklerose, zweitens als Mediasklerose Mönckeberg und drittens als Arteriosklerose/-hyalinose auf (Böcker, Denk und Heitz 2004).

Die Mönckeberg-Mediasklerose ist besonders in der Media von muskulären Arterien der Extremitäten und des Genitaltraktes älterer Menschen lokalisiert. Es tritt eine Hyalinose mit Verkalkung und Verknöcherung auf (Böcker, Denk und Heitz 2004).

Bei der Arteriosklerose/-hyalinose kommt es durch eine Dysfunktion des Endothels mit Insudation von Plasmabestandteilen und abnormer Syntheseleistung der Endothelzellen zur Anreicherung von hyalinem Material. Dies beginnt in der Intima, später auch in der Media. Dadurch kommt es zur konsekutiven Gefäßlumeneinengung (Böcker, Denk und Heitz 2004).

Wenn im folgenden Teil dieser Arbeit von Arteriosklerose gesprochen wird, ist immer die erste Form (Atherosklerose) gemeint. Ätiologisch handelt es sich um ein komplexes multifaktorielles Geschehen, worauf bereits die unterschiedlichen gefundenen Risikofaktoren hindeuten.

1.2.3 Theorien der Pathogenese

Auf die entzündliche Natur arteriosklerotischer Veränderungen wurde bereits von Virchow im 19. Jahrhundert hingewiesen (Mawhorter und Lauer 2001).

Die bisher gefundenen Risikofaktoren können nicht vollständig die Prävalenz der koronaren Herzerkrankung (KHK) erklären und die wirksamsten Medikamente gegen die KHK können 70-80% der Krankheitsfälle nicht verhindern. Es werden neue Mittel zur Heilung dieser führenden Todesursache benötigt (Saikku 2000). Die Cholesterinhypothese benötigte ein Jahrhundert und 30 Jahre massiver Forschungsarbeit bevor sie akzeptiert wurde. Es gibt immer noch Einzelne, die betonen, dass Statine, von welchen man annahm der endgültige Beweis zu sein, viele Wirkungen neben der Cholesterinsenkung haben (Saikku 1999).

Arteriosklerose ist sicher multifaktoriell bedingt. Impliziert durch Hinweise, wird seit vielen Jahren von Infektionserregern angenommen mit der Krankheit assoziiert zu sein (Mawhorter und Lauer 2001; Watson und Alp 2008). Nach Böcker et al. (Böcker, Denk und Heitz 2004) versuchen verschiedene Theorien die Pathogenese der Arteriosklerose zu erklären: Filtrationstheorie, Perfusionstheorie, thrombotische Theorie, Endothelläsionstheorie, monoklonale Theorie, Response-to-Injury Theorie.

Gemäß der Filtrationstheorie werden Lipide aus dem Blut filtriert und in der Intima akkumuliert. Die Perfusionstheorie betont die Perfusion von Lipiden durch die Gefäßwand in Lymphkapillaren der Adventitia. Die thrombotische Theorie sieht die Aufnahme von thrombotischem Material als ursächlich an. Eine Endothelläsion soll nach der Endothelläsionstheorie für Thrombozytenaggregation und Wachstum glatter Muskelzellen verantwortlich sein. Die monoklonale Theorie postuliert zur Entstehung der Arteriosklerose die monoklonale oder zumindest oligoklonale Proliferation einer mutierten glatten Muskelzelle der Tunica media. Die Response-to-Injury Theorie setzt eine endotheliale Dysfunktion bzw. eine Verletzung des Endothels als Ursache voraus.

1.2.3.1 Response-to-Injury Hypothese

Im Sinne der Response-to-Injury Theorie verursachen chronische oder wiederholte Endothelläsionen eine Erhöhung der Permeabilität für Plasmabestandteile und eine Steigerung der Adhäsion von Monozyten und Thrombozyten. Außerdem kommt es zu einer Veränderung der Expression endothelialer Genprodukte z.B. von intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1) und von vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1, vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1), welche vom luminalen Endothelium, das dem sich entwickelnden Plaque aufliegt, exprimiert werden. Diese Genprodukte sollen die Adhäsion von zirkulierenden Monozyten und Lymphozyten und ihr Eindringen in die Plaque vermitteln (Cybulsky und Gimbrone 1991; O'Brien et al. 1996; Ross 1986; Ross 1993; Ross 1999, Klucken 2008).

Ein zentrales Ereignis der zellulären Antwort des Immunsystems auf eine Gewebeschädigung oder auf entzündliche Reize ist die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut über das vaskuläre Endothel. Die Interaktionen dieser Leukozyten mit den Endothelzellen sind zentrale Ereignisse im Rahmen beginnender inflammatorischer Prozesse. In der Frühphase dominieren vor allem polymorphkernige neutrophile Granulozyten. Im weiteren Verlauf sind Monozyten und Lymphozyten beteiligt. Zeitlicher Ablauf und Spezifität der Immunantwort sind hierbei aktive Prozesse. Diese Prozesse setzen sich aus verschiedenen Schritten zusammen: Aktivierung der Endothelzellen, Rekrutierung von Leukozyten sowie der Interaktion zwischen Endothel und Leukozyten mit Margination, Rollen, Adhäsion und Transmigration (Krüll 2000). Der erste Schritt der Interaktionen ist das Rollen der Leukozyten mit kurzen reversiblen Anbindungen entlang der Oberfläche von inflammatorisch veränderten Endothelzellen. Das Rollen bremst die Zellen ab und führt sie zum Ort des Geschehens. Im nächsten Schritt adhären die Leukozyten fest. Es folgt die Transmigration und Diapedese der Leukozyten. Jeder dieser Schritte wird durch spezifische molekulare Mechanismen charakterisiert. Substrat dieser Mechanismen sind Adhäsionsmoleküle, die auf der Oberfläche von Leukozyten und Endothelzellen exprimiert werden sowie proinflammatorische Zytokine und prokoagulatorische Proteine, die die Leukozyten-Endothel-Interaktion vermitteln. Der individuelle zeitliche Verlauf der Expression dieser Moleküle ist von zentraler Bedeutung. Die Einteilung der Adhäsionsmoleküle erfolgte an Hand vergleichender Studien der Primärsequenzen in verschiedene Gruppen: Die Selektine, die Integrine, die Cadherine sowie die Moleküle der Immunglobulin-Gensuperfamilie. Weiterhin gibt

es noch eine ganze Reihe von Kohlenhydraten, die vor allem als Liganden der Selektine eine wichtige Rolle spielen (Klucken 2008).

1.2.3.2 Bedeutung der Endothelzellen

Endothelzellen sind spezialisierte Plattenepithelzellen, welche die luminale Seite von Gefäßen auskleiden. Sie haben verschiedenste Funktionen und spielen in den Prozessen zur Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase eine mannigfache Rolle. Werden diese Prozesse gestört, kann dies die Ausbildung eines proatherogenen Phänotyps in den Blutgefäßen zur Folge haben. Ihre physiologische Hauptfunktion ist die einer regulierbar permeablen Barriere für Moleküle mit unterschiedlichen Größen und korpuskuläre Elemente des Blutes. Außerdem existieren unterschiedlich durchlässige Formen von Endothel. Als kontinuierliches Endothel mit tight junctions kleidet es die Gehirnkapillaren aus. In der Niere kommt es als fenestriertes und in der Leber als diskontinuierliches Endothel vor. Dazu kommen weitere wichtige Funktionen. Das Endothel beteiligt sich maßgeblich an der Regulation von Proliferation und Migration glatter Muskelzellen der Gefäße (Böcker, Denk und Heitz 2004). Die Endothelzellen regulieren den Tonus glatter Gefäßmuskelzellen durch Synthese vasoaktiver Substanzen und beeinflussen so das Gefäßlumen. Zu den vasodilatatorisch wirkenden Substanzen, welche durch das Endothel produziert werden, gehören u.a. Stickstoffmonoxid und Prostaglandin I₂ und zu den produzierten Vasokonstriktoren zählen u.a. Endothelin, Thromboxan A₂. Hinzu kommen zahlreiche Vasoaktiva die am Endothel wirken und nicht durch es selbst freigesetzt werden z.B. Histamin und Bradykinin. Weiterhin beeinflusst das Endothelium die Fließeigenschaften des Blutes durch Steuerung der Blutgerinnung. Die immunologische Funktion der Endothelzellen gipfelt im Potential zur Modulation der Leukozyten-Endothelzellen-Interaktion als eine Kaskade von Ereignissen. Hierbei steuert das Endothel durch Sekretion von Mediatoren und Expression von Adhäsionsmolekülen (Krüll 2000, Klucken 2008).

1.2.3.3 Einfluss von *C. pneumoniae*

Umweltfaktoren wie Infektionen fördern die inflammatorischen Reaktionen in der Plaque. Über ausgeschüttete Zytokine kommt es zur vermehrten Expression von Oberflächenrezeptoren und Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, Entzündungszellen und glatten Muskelzellen. Unterschiedliche Erreger bzw. deren Toxine induzieren eine deutlich vermehrte Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen. Mit *C. pneumoniae* infizierte glatte Muskelzellen produzieren vermehrt

Interleukin-6 (IL-6) und basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF, basic fibroblast growth factor) und stimulieren Proliferation und Migration glatter Muskelzellen sowie die Progression fibröser Plaque (Böcker, Denk und Heitz 2004).

Szczepek und Mitarbeiter erachten die Arteriosklerose als das bestuntersuchte Modell für eine atypische Chlamydieninfektion (Szczepek 2004).

In In-vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* in der Lage ist, alle im Rahmen arteriosklerotischer Prozesse beteiligten Zelltypen (Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen) zu infizieren und zu aktivieren. Folge dieser Aktivierung ist das Auftreten eines proinflammatorischen Phänotyps in allen betroffenen Zellen mit der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und prokoagulatorischer Proteine, sowie der vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen (Krüll et al. 1999).

Die Inkubation von Endothelzellen mit *C. pneumoniae* führt zu einer Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege: Innerhalb weniger Minuten nach Zellkontakt erfolgt eine deutliche Zunahme der globalen Proteintyrosinphosphorylierung sowie der spezifischen Phosphorylierung und Aktivierung von p38-, p42/44-MAPK und SAPK/JNK. Im Verlauf ereignet sich eine vermehrte NF- κ B-Aktivierung/Translokation mit nachfolgender mRNA- und Proteinexpression proinflammatorischer Mediatoren (Adhäsionsmolekülen, IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES). Die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen führt zu einer Rekrutierung (Adhäsion und Transmigration) von Monozyten über infizierte Endothelzellen (Krüll et al. 1999, Krüll et al. 2005, Klucken 2008).

1.2.3.4 Einfluss von Chlamydialem Hitzeschockprotein 60

Chlamydiales Lipopolysaccharid und chlamydiales Hitzeschockprotein 60 fördern die Phagozytose von Low Density Lipoprotein (LDL) durch Makrophagen durch Förderung der Oxidation von LDL und senken deren Cholesterinabgabe (LaVerda et al. 1999). Chlamydiales Hitzeschockprotein 60 aktiviert Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Matrix-Metalloproteinasen, welche zur Degradation des Bindegewebes führen können, wodurch eine erhöhte Rupturgefahr der Plaque besteht (Böcker, Denk und Heitz 2004).

1.2.3.5 Mechanismen der Signaltransduktion

Die Chlamydien präsentieren Oberflächenmuster (PAMPS, pathogen-associated molecular pattern), welche durch die transmembranär auf der Zelloberfläche oder in Organellen lokalisierten PRRs (Pattern Recognition Rezeptoren) z.B. Toll-like-Rezeptoren (TLR) oder im Zytosol lokalisierte Rezeptoren erkannt werden. Die Reaktion der Wirtszelle auf die Pathogenerkennung ist die Aktivierung von Signalkaskaden z.B. von Kinasen (Silverman und Maniatis 2001).

Die Mitglieder der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sind ubiquitär exprimierte Proteinkinasen, welche als Antwort auf eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei Zellwachstum, zellulärer Differenzierung, Aktivierung und Stressantwort (Boutros et al. 2008). Eingeteilt werden die MAP-Kinasen in drei Gruppen p38, ERK, JNK.

Bisher wurden vier Isoformen der p38 MAP-Kinase (p38 alpha, beta, gamma, delta) identifiziert. Für p38 alpha und beta2 wurde herausgefunden, dass sie die Aktivatorprotein 1-bezogene Genexpression aktivieren, während gamma und delta inhibitorische Effekte auf die Genexpression haben. Aktivatorprotein 1 (AP1) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher verschiedene zelluläre Prozesse einschließlich Zelldifferenzierung, -proliferation und -apoptose kontrolliert. Dominant-negative Mutanten der p38 α , p38 β 2 können nicht phosphoryliert und dadurch aktiviert werden (Pramanik et al. 2003). Die Funktion der verschiedenen Isoformen von p38 in der bakterieninduzierten Zellaktivierung ist noch unbekannt.

Die ERK (extracellular signal-related kinases) existiert in Isoformen. In dieser Arbeit werden die Isoformen ERK-1 und ERK-2 betrachtet. Zur dritten Gruppe der Familie der MAP-Kinasen gehört die c-Jun N-terminal-Kinase (JNK), welche ebenfalls in Isoformen existiert und bei Stress aktiviert wird, aber ebenso an vielen physiologischen Prozessen beteiligt sein soll.

Von den Mitgliedern der TLR-Familie befasst sich diese Arbeit mit TLR2 und TLR4. Auf der Zelloberfläche lokalisierte TLR richten sich gegen mikrobielle Strukturen, in dem sie Lipopolysaccharide oder Lipoproteine von Bakterien erkennen. Endosomal lokalisierte TLR erkennen Doppel- oder Einzelstrang-RNA und Doppelstrang-DNA. Im Zytosol sind neben den TLR noch weitere PRR lokalisiert. Dazu gehören RIG-I (retinoic acid inducible gene I)-like Rezeptoren (RLRs), welche z.B. im Fall von RIG-I und melanoma

differentiation-associated gene 5 (MDA5) RNA-Viren erkennen und eine angeborene antivirale Immunantwort typisiert durch die Produktion von Typ I Interferon in Zellen aktivieren. NLR (NOD-like-Rezeptoren), wie NOD1 und NOD2 (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 und 2), detektieren zytosolische Peptidoglykanfragmente welche von Bakterienzellwänden stammen. Außerdem werden DAMP (Damage-associated-molecular-pattern) wie Hitzeschockproteine erkannt. Die Signalkaskade, welche nach der Erkennung beginnt, mündet in die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors. Die entsprechende Aktivierung von Genen lässt die Zelle Zytokine ausschütten (Palm und Medzhitov 2009; Huang und Pope 2010; Iwasaki und Medzhitov 2010).

Diese Signalwege bestehen aus hierarchisch und sich durch gegenseitige Phosphorylierung aktivierenden Kinasen z.B. den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p38, ERK1/2. Nachfolgend wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B (nukleärer Faktor κ B, nuclear factor κ -light chain-enhancer of activated B cells) an die DNA rekrutiert.

Sein Inhibitor I κ B α (nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) im Zytosol muss zuvor abhängig von der p38 MAP-Kinase und der Rac1-GTPase phosphoryliert werden. Die Degradation von I κ B α ermöglicht dann die Translokation von NF- κ B in den Zellkern. NF- κ B ist ein zentraler proinflammatorischer Transkriptionsfaktor. Kraft seiner Translokation in den Nucleus und Bindung an die DNA kommt es zur Transkription z.B. des IL-8-Gens.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde 1986 erstmalig in reifen B-Lymphozyten als nukleärer Faktor, der in der Promotorregion eines Immunglobulin-Gens der κ -Kette bindet, entdeckt (Sen, Baltimore 1986). NF- κ B reguliert die Genexpression in vielfältigen Bereichen der Abwehr, Inflammation und Stressantwort. Zahlreiche Stimuli können ihn aktivieren. NF- κ B existiert als Homo- bzw. Heterodimer. In Säugetierzellen ist am häufigsten das Heterodimer p50 / p65 enthalten (Chen und Greene 2004).

Er liegt im Zytoplasma der Zellen vor und unterscheidet sich darin von vielen anderen Aktivatorproteinen, weil er erst nach Translokation in den Zellkern eine Genexpression induzieren kann. Im Zytoplasma ist er an I κ Bs (inhibitorische Proteine der IKK-Familie, I κ B-Kinasen) gebunden, die die nukleäre Lokalisationsfrequenz maskieren. Nach Phosphorylierung und Ubiquitinierung werden diese Inhibitoren dissoziiert.

RAS (Rat sarcoma) ist ein Proto-Onkogen, welches ein GTP-bindendes Protein kodiert und zentraler Regulator verschiedener Signaltransduktionswege ist. Die Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 gehören zur RAS-Superfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine, anfangs als Regulatoren des Zytoskeletts charakterisiert, spielen sie als molekulare Schalter eine wichtige Rolle in den Signalübertragungswegen (Hippenstiel et al. 2002).

Es existieren chemische Inhibitoren der MAP-Kinasen und der Proteine der Rho-Familie. Von PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen) wird angenommen ein vorgeschalteter Aktivator der Rho-GTPase Signalkaskade zu sein (Schmeck et al. 2006). Simvastatin hat neben der bekannten Hemmung der β -HMG-CoA-Reduktase pleiotrope Effekte, es inhibiert u.a. die Rho-Kinase.

Die Inaktivierung der Rho-Proteine, kleine GTP-bindende Proteine, kann durch Glykosylierung mittels Clostridium difficile Toxin B-10463 (TcdB-10463) erfolgen (Hippenstiel et al. 2002). Bei Clostridium difficile Toxin B-10463 (TcdB-10463) handelt es sich um ein Einzelstrang 270 kDa Molekül, das durch Rezeptor-vermittelte Endozytose leicht in Zellen eindringt und Rho-Proteine glykosiliert und zwar an Threonin 37 im Falle von Rho A oder Threonin 35 im Falle von Rac/Cdc42, wodurch diese spezifisch inaktiviert werden (Hippenstiel et al 2000).

Im Speziellen wurde untersucht inwieweit chlamydiales Hitzeschockprotein 60 respektive *groEL-1* Mechanismen der Signaltransduktion in die Zielzellen aktiviert.

Das Hitzeschockprotein *groEL-1* induziert eine zeit- und dosisabhängige Phosphorylierung der endothelialen Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinasen, mitogen-activated protein kinases) p38 (p38 kinase), ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) und JNK (c-Jun N-terminal kinase) (maximale Effekte mit 20 μ g nach 15 Minuten). Nachfolgend beobachtet man eine vermehrte Aktivierung und Translokation von NF- κ B in den Zellkern sowie eine ebenfalls zeit- und dosisabhängige Expression von endotheliale IL-8. Kinetik und Effizienz der Zielzellaktivierung sind dabei vergleichbar zur Stimulation mit lebenden *C. pneumoniae*.

Als Positivkontrolle wurde TNF- α (10 ng/ml) (R & D Systems, Wiesbaden) ausgewählt, da es bereits in vorangegangenen Arbeiten (Krüll et al. 2004) für die Induktion der MAPK in HUVEC geeignet war.

1.3 Zielsetzung und Fragestellung

C. pneumoniae ist ein nahezu ubiquitär vorkommender Erreger respiratorischer Infekte bis hin zur atypischen Pneumonie mit negativem Auskultationsbefund und interstitieller Zeichnungsvermehrung (Rosseau et al. 2004). Trotz der wenig eindrucksvollen Befunde bei der körperlichen Untersuchung im Verhältnis zu den Beschwerden der Patienten und den Veränderungen in der Thoraxröntgendiagnostik bei einer akuten Infektion, hat der Erreger großes Forschungsinteresse auf sich gelenkt. Obwohl *C. pneumoniae*-induzierte Atemwegsinfekte oft asymptomatisch verlaufen, hat ihre Assoziation mit Arteriosklerose eine bemerkenswerte Aufmerksamkeit vieler Forscher auf sich gezogen. In-vitro-Untersuchungen zeigten, dass *C. pneumoniae* mit Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen alle pathogenetisch relevanten Zellen infizieren können und die befallenen Zellen mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie vermehrter Expression prothrombotischer Substanzen reagieren (Mielke 2004).

Wie der Erreger die infizierten Wirtszellen aktiviert, ist bis jetzt noch nicht in Gänze aufgeklärt worden. Besonders die Bedeutung verschiedener chlamydialer Virulenzfaktoren ist noch nicht vollständig geklärt. Das 60-kDa Hitzeschockprotein 60 cHsp60 respektive *groEL*-1 wird als wichtig für die Zielzellaktivierung erachtet (Kol et al. 1998; Kol et al. 1999). Es scheint eine zentrale Rolle bei der Zielzellaktivierung zu spielen.

Auf Basis dieser Fakten wurde die Hypothese *groEL*-1 induziert Signaltransduktionswege in Endothelzellen aufgestellt. Die Zielsetzung war es zu untersuchen welche Kaskaden der Signaltransduktion in durch *groEL*-1 stimulierten Endothelzellen aktiviert werden.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte die Pathogenese der Infektion durch *C. pneumoniae* auf der Ebene der Interaktion des 60-kDa Hitzeschockproteins von *C. pneumoniae* mit humanen Endothelzellen untersucht werden.

Diese Arbeit untersucht die Zellaktivierung des Endothels während einer *C. pneumoniae*-Infektion anhand folgender Fragen:

1. Kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer und chemotaktische Zytokine durch das Endothel nach Infektion mit *C. pneumoniae* respektive nach Stimulation mit dem möglichen chlamydialen Virulenzfaktor *groEL-1*?
2. Welche intrazellulären Signaltransduktionswege sind in der Zellaktivierung durch *groEL-1* von Bedeutung und spielen hierbei die epithelialen Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2, p38 und die Proteine der Rho-Familie eine Rolle?
3. Ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B an der durch *groEL-1* induzierten Genexpression beteiligt?

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien und Zellkultur

Die Tabelle 3 listet die verwendeten Zelllinien auf.

Tabelle 3 Verwendete Zelllinien

Verwendete Zelllinien	Quelle
HUVEC (human umbilical vein endothelial cells, humane endotheliale Nabelschnurvenenzellen)	laboreigene Isolation (s.u.)
HEK293 (human embryonic kidney cells, humane embryonale Nierenzellen), (Graham et al. 1977)	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig)
HEp-2 (human laryngeal epidermoid carcinoma cells, humane Larynx-Karzinomzellen) (Moore, Sabachewsky und Toolan 1955)	ATCC (American Type Culture Collection)

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte sofern nicht anders angegeben bei 20% O₂, 5% CO₂, 37 °C und 98% Luftfeuchtigkeit im Inkubator.

HUVEC-Zellkulturmedium

Endothelial Basal Medium (PAA, Linz, Österreich) mit folgenden Zusätzen: 10% inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) (Gibco), 1% L-Glutamin (Gibco), 1% Penicillin-Streptomycin (Biochrom), 0,02% Amphotericin B, 0,04% EGF (Gibco), 10% Endothelial Cell Growth Medium (ECGM, PromoCell, Heidelberg).

HUVEC-Infektionsmedium/Versuchsmedium

Endothelial Basal Medium (PAA, Linz, Österreich) mit 1% inaktiviertem FCS (Gibco), 1% L-Glutamin (Gibco), 0,02% EGF (Gibco)

HEK293-Zellkulturmedium

DMEM-Medium (Invitrogen, Paisley, Großbritannien) mit 1% L-Glutamin (Gibco), 1% Penicillin-Streptomycin (Biochrom), 10% inaktiviertem FCS (Gibco)

HEK293-Transfektionsmedium/Versuchsmedium

DMEM-Medium (Invitrogen, Paisley, Großbritannien)

HEp-2-Zellkulturmedium

Minimal Essential Medium EARLE (EARLEs MEM, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% inaktiviertem FCS (PAA, Linz), 1% L-Glutamin (Seromed/Biochrom, Berlin), 1% nichtessentielle Aminosäuren (Gibco), 0,1% Gentamycin (Gibco), 0,2% Amphotericin B (Sigma, München)

HEp-2-Infektionsmedium

Minimal Essential Medium EARLE (EARLEs MEM, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), 1% L-Glutamin (Seromed/Biochrom, Berlin), 1% nichtessentielle Aminosäuren (Gibco), 0,1% Gentamycin (Gibco), 0,2% Amphotericin B (Sigma, München), 0,1% Cyclohexamid (Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz)

2.1.1 Isolation und Kultur von HUVEC

Die Nabelschnüre wurden uns freundlicherweise von der Klinik für Gynäkologie und Geburtsmedizin des Vivantes Humboldt-Klinikums Berlin zur Verfügung gestellt.

Sie wurden in PBS ++ (mit Mg⁺/Ca²⁺) gesammelt. Die Isolation von HUVEC erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Jaffé et al. (Jaffé et al. 1973). Die Arbeit wurde unter einer Sicherheitswerkbank (Laminair HB 2448, Hereaus, Berlin) ausgeführt. Die Nabelschnurvene wurde über eine in sie eingelegte Kanüle (18G, Braunüle, Braun Melsungen) mit sterilem PBS ++ (mit Mg⁺/Ca²⁺) ausgespült. Anschließend wurde sie mit 0,025%iger Typ II Kollagenase gefüllt, an beiden Enden verschlossen und für 20 Minuten im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Die Extraktion der HUVEC gelang durch behutsames Massieren und Ausspülen mit Medium 199 EARLE (Biochrom, Berlin). Die Zellsuspension wurde bei 350 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Pellet mit den HUVEC wurde in Zellkulturmedium resuspendiert. Das HUVEC-Zellkulturmedium bestand aus Endothelial Basal Medium (PAA, Linz, Österreich) mit folgenden Zusätzen 10% inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS), 1% L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin (Biochrom), 0,02% Amphotericin B, 0,04% EGF (Gibco), 10% Endothelial Cell Growth Medium (ECGM, PromoCell, Heidelberg). Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren wurde das fetale Kälberserum (FCS) für 45 Minuten bei 56 °C erhitzt. Alle für die weitere Inkubation (37 °C, 5% CO₂) benutzten Gefäße wurden eine Stunde vor ihrer Verwendung mit 0,5%iger Gelatinelösung behandelt. Sämtliche verwendete Kulturzusätze und Medien wurden auf 37 °C vorgewärmt. Die Primärkultur wurde in T75 Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden. Die nach morphologischen und immunologischen Kriterien Jaffés (Jaffé 1984) charakterisierten HUVEC wuchsen nach 4 bis 5 Tagen zu einem konfluenten Monolayer, ähnlich einem Kopfsteinpflaster heran. In turnusmäßigen größeren zeitlichen Abständen wurden die frisch isolierten Zellen immunhistochemisch untersucht (zur Methode siehe Krüll 2000; Klucken 2008). Die untersuchten konfluenten Monolayer waren zu mehr als 98% von-Willebrand-Faktor-positiv, CD31-positiv, Vimentin-positiv und Zytokeratin-negativ sowie nach Stimulation mit Interleuktin-1 β VCAM-1-positiv und E-Selektin-positiv (Daten nicht gezeigt; Krüll 2000). Außerdem war als weiteres Charakterisierungsmerkmal die Aufnahmefähigkeit von Dil-Acetyl-LDL vorhanden (Daten nicht gezeigt; Krüll 2000).

Für die Versuche wurden diese frisch isolierten Primärkulturen verwendet und je nach Verwendungszweck in geeignete Well-Platten gesplittet. Die Aussaat betrug bei 6-Lochplatten $1,2 \times 10^6$ Zellen pro well bzw. bei 24-Lochplatten $2,5 \times 10^5$ Zellen pro well. Die konfluenten HUVEC wurden mit sterilem PBS +/- gewaschen, mit 0,5%iger Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco) gelöst, vom Boden abgeklopft und in frischem Medium aufgenommen. Das HUVEC-Infektionsmedium/Versuchsmedium bestand aus Endothelial Basal Medium (PAA, Linz, Österreich) mit 1% inaktiviertem FCS, 1% L-Glutamin und 0,02% EGF (Gibco).

2.1.2 Kultur von HEK293

Die Kultur von HEK293 (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) erfolgte in HEK293-Zellkulturmedium, welches sich aus DMEM-Medium (Invitrogen, Paisley, Großbritannien) mit 1% L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin, 10% inaktiviertem FCS zusammensetzt. Nach Kultivierung in T75 Zellkulturflaschen wurden die HEK293 mit PBS +/- gewaschen und abgelöst. Im folgenden Arbeitsschritt wurde bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert (Hettich Rotina 48 RC). Das Pellet wird in HEK293-Zellkulturmedium resuspendiert. Für die Transfektionsexperimente war eine Konfluenz von 80% erforderlich. Um diese nach 60 Stunden zu erreichen, wurden 80 000 Zellen pro Loch bei 24-Loch-Platten respektive 120 000 Zellen pro Loch bei 12-Loch-Platten ausgesät. Für die Stimulation im Rahmen der Transfektionsexperimente wurde später jeweils der Überstand behutsam abgesaugt und DMEM ohne FCS, Penicillin, Streptomycin verwendet.

2.1.3 Kultur von HEp-2

Die Kultur von HEp-2 (ATCC, American Type Culture Collection) erfolgte in HEp-2-Zellkulturmedium für 72-96 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂. Das HEp-2-Zellkulturmedium setzt sich zusammen aus: Minimal Essential Medium EARLE (EARLEs MEM, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% inaktiviertem FCS (PAA, Linz), 1% L-Glutamin (Seromed/Biochrom, Berlin), 1% nichtessentielle Aminosäuren (Gibco), 0,1% Gentamycin (Gibco), 0,2% Amphotericin B (Sigma, München).

Die HEp-2 wurden in T75 Zellkulturflaschen mit Kulturmedium ausgesät. Durch Kultivierung wuchs ein konfluenten Monolayer heran. Dieser wurde mit PBS -/- gewaschen. Zum Ablösen der HEp-2 vom Boden der Kulturflasche wurde Trypsin zugesetzt. Das Ablösen konnte sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch kontrolliert werden. Spätestens nach 2 Minuten wurde der Prozess durch Zugabe von HEp-2-Zellkulturmedium abgestoppt. Die Suspension wurde bei 1500 rpm und 18 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde in HEp-2-Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension konnte für die weitere Verwendung gesplittet werden.

2.2 Bakterienkultur, Anzucht und Aufreinigung von *C. pneumoniae*

Das HEp-2-Infektionsmedium setzt sich zusammen aus: Minimal Essential Medium EARLE (EARLEs MEM, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), 1% L-Glutamin (Seromed/Biochrom, Berlin), 1% nichtessentielle Aminosäuren (Gibco), 0,1% Gentamycin (Gibco), 0,2% Amphotericin B (Sigma, München), 0,1% Cyclohexamid (Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz).

Die Anwesenheit von Cyclohexamid im Medium inhibiert die DNA- und Proteinsynthese eukaryonter Zellen, jedoch nicht den Metabolismus von Prokaryonten wie Chlamydien. Dadurch reduziert sich die Konkurrenz um Nährstoffe zwischen Wirtszelle und Parasit und verstärkt das Wachstum der Chlamydien (Ripa und Mårdh 1977).

In dieser Arbeit wurden folgende Stämme von *C. pneumoniae* benutzt: Stamm TW183 (American Type Culture Collection, ATCC VR2282, TW 183) und Stamm CWL-029 (ATCC VR-1310, CWL-029). CWL-029 gilt als respiratorischer Referenzstamm, der ursprünglich aus einem Patienten mit Bronchitis isoliert wurde (Maass et al. 1998).

Die Kultivierung und Aufreinigung erfolgte nach der von Maass et al. publizierten Methodik (Maass et al. 1993).

HEp-2 wurden in HEp-2-Zellkulturmedium in T25-Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) kultiviert. Nach Erreichen eines zu zirka 50% konfluenten Zellrasens, wurden die HEp-2 mit PBS -/- (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gewaschen, mit *C. pneumoniae* in einer Konzentration von $1,75 \times 10^4$ IFU/ml infiziert und für 60 Minuten bei 800 x g und 37 °C zentrifugiert (Hettich, Rotina 48 RC).

Nach drei Tagen Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die infizierten HEp-2 mit einem cell scraper (Costar cell scraper, Corning Incorporated, Corning, USA)

abgeschabt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Schütteln mit sterilen Glasperlen (Durchmesser 2mm) für 2 Minuten auf dem Vortex-Mixer (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Deutschland). Die Zelltrümmer mit den Elementarkörperchen wurden weiter aufgereinigt (s.u.) oder im Verhältnis 1:4 mit einem neuen Infektionsmedium gemischt und zur erneuten Infektion weiterer HEp-2-Zellen verwendet bzw. bei -80 °C bis zur späteren Verwendung gelagert. Zur Aufreinigung wurden die aufgeschlossenen Zellen in 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und 15 Minuten bei 250 x g und 4 °C zentrifugiert (Hettich Rotanta MR), um die Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand mit den Elementarkörperchen wurde für 60 Minuten in einer Ultrazentrifuge (Sorvall® RC5C Plus, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold) bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig dekantiert. Die Pellets mit den chlamydialen Elementarkörperchen wurden in SPG (Saccharose-Phosphat-Glutamat)-Puffer mit 20% hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS) gelöst. Zur weiteren Reinigung wurden die Elementarkörperchen durch ein 40 µm-Nylon-Sieb (Falcon) filtriert. Die Aliquots wurden in Kryoröhrchen (NUNC CryoTube™ Vials) bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Die Erfolgskontrolle der Anzucht und die Konzentrationsbestimmung geschahen durch einen neuen Infektionsansatz in einer Lochplatte. Die Lochplatte war zuvor durch Einlegen von sterilen Plättchen (Thermanox, Nunc, Wiesbaden) in die wells (Bohrlöcher) präpariert. Von der Stocklösung der geernteten Elementarkörperchen wurde vor Infektion eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen angelegt. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden. Im Anschluss wurden die infizierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10 Minuten bei -20 °C mit Methanol fixiert und gefärbt. Zum Färben wurde ein FITC-konjugierter (FITC = Fluoreszin-5-isothiozyanat) spezifischer Chlamydienantikörper (IMAGEN Chlamydia, DAKO, Zug, Schweiz) benutzt. Nach 20 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde der überschüssige FITC-Chlamydienantikörper von den Thermanox-Plättchen gewaschen. Die Thermanox-Plättchen mit der Zellschicht wurden entnommen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus Phase Kontrast ULWCD 0.30) konnten die Chlamydien mit den gebundenen Antikörpern begutachtet und ggf. fotodokumentiert werden (Olympus Digitalkamera C-4040).

Durch Auszählen der Einschlüsse unter dem Konfokalmikroskop konnte die Konzentration an infektiösen Einheiten (infection forming units, IFU) / ml der Chlamydien bestimmt werden, da theoretisch ein Elementarkörperchen einen

Einschluss verursacht. Der Begriff Multiplizität der Infektion (MOI, multiplicity of infection) bezeichnet die Bakterien relativ zur Zellzahl. Daraus ergibt sich das Maß für die eingesetzte Menge an Chlamydien.

Zusätzlich wurde nach der oben beschriebenen Vorgehensweise ein Extrakt aus Hep2-Zellen jedoch ohne Infektion mit *C. pneumoniae* erzeugt. Dieses wurde bei den Versuchen parallel getestet, um eine Zellstimulation durch Reste von HEp-2 oder durch Reste der verwendeten Chemikalien auszuschließen.

Die in der Aufreinigung gewonnenen *C. pneumoniae* wurden mittels PCR und Kultur auf mögliche bakterielle Kontaminationen (z.B. Mykoplasmen) hin untersucht.

2.3 *groEL-1* – Hitzeschockprotein 60 von *C. pneumoniae*

Das in dieser Arbeit verwendete gereinigte rekombinante *groEL-1* (Hitzeschockprotein 60) aus dem *C. pneumoniae* Stamm TW183 wurde freundlicherweise von J. H. Hegemann (Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die Aufreinigung erfolgte in Anlehnung an Jantos et al. (Jantos et al. 2000). Während der gesamten Reinigung und Extraktion wurde Polymyxin B (20 µg/ml) eingesetzt und abschließend eine Dialyse mit PBS +/- (ohne Calcium, ohne Magnesium) durchgeführt.

2.4 Benutzte Inhibitoren und Zytokine

SB202190	inhibiert p38 MAP-Kinase	Calbiochem
U0126	inhibiert ERK1/2 Kaskade	Calbiochem
SP600125	inhibiert JNK	Calbiochem
LY294002	inhibiert PI3K	Calbiochem
Simvastatin	inhibiert Rho-Kinase	Calbiochem
TcdB-10463	inaktiviert Rho A, Rac/Cdc42	*

*freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Hippenstiel (Infektiologie, Charité, Berlin)

Als Positivkontrolle für die Induktion der MAPK diene TNF- α (10 ng/ml) (R & D Systems, Wiesbaden), welcher bekanntermaßen die MAPK aktiviert (Roux und Blenis 2004). TNF- α (10 ng/ml) war bereits in vorangegangenen Arbeiten (Krüll et al. 2004) als Positivkontrolle für die Induktion der MAPK in HUVEC geeignet.

2.5 IL-8 ELISA

Human IL-8 ELISA Set

OptEIA Human IL-8 Set	BD Bioscience PharMingen, San Diego, USA
-----------------------	--

Carbonatpuffer zur Beschichtung pH 9,5

NaHCO ₃	8,40 g	Merck
Na ₂ CO ₃	3,56 g	Merck
Aqua bidest.	ad 1000,00 ml	

Waschpuffer pH 7,0

Dulbecco PBS	1000 ml	PAA
Tween20	0,05%	Sigma-Aldrich

Blockierungspuffer pH 7,0

Dulbecco PBS	45 ml	PAA
10% inaktiviertes FCS	5 ml	Gibco

Mit dem Human IL-8 ELISA-Set (OptEIA Human IL-8 Set, BD Bioscience PharMingen, San Diego, USA) wurde die Konzentration von Interleukin-8 in den Überständen der stimulierten Zellkulturen bestimmt. Zur Protektion der Proteine wurden Proben und Standardreihen in Eppendorfgläsern (Eppendorf Safe-Lock Gefäße, Eppendorf, Hamburg) auf Eis gestellt.

Die ELISA-Lochplatten (96-Well NUNC ELISA Platten) werden am Boden mit dem monoklonalen humanen IL-8-Antikörper beschichtet. Nach mehreren Waschschritten werden die freien Proteinbindungsstellen mit dem Blockierungspuffer (PBS, 10% inaktiviertes FCS, pH 7) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In einer vorgegebenen Reihenfolge, jeweils immer durch Waschschrritte mit PBS (Dulbecco PBS, PAA, Linz) mit 0,05% Tween (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) zur Entfernung ungebundener Proteine unterbrochen, erfolgt die Inkubation bei

Raumtemperatur mit dem Antigen (Verdünnungen der Überstände der stimulierten Zellkulturen) für 2 Stunden und einem Biotin-konjugierten Detektionsantikörpers (Antigen-Antikörper) + Avidin-Meerrettich-Peroxidase entsprechend der Anleitung des Herstellers für eine Stunde. Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid und dem Substrat Tetramethylbenzidin wurde für 20 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Die Peroxidase katalysiert die Umwandlung von Tetramethylbenzidin (farblos) in eine farbige Lösung (blau). Die enzymatische Farbreaktion wurde mit 2 M Schwefelsäure (H₂SO₄) (Merck) gestoppt und bewirkt zugleich einen gelblichen Farbumschwung. Die Extinktion wurde mit einem ELISA-Photometer (Dynatech MR 5000, Rückersdorf) bei 450 nm ermittelt. Anhand der Standardkurve und unter Berücksichtigung der vorgenommenen Verdünnung der Proben wurden die jeweiligen IL-8-Konzentrationen abgeleitet.

2.6 Westernblot

Lyse-Puffer für Proteinextraktion

Tris-HCl, pH 7,4	50 mM	Sigma
EDTA	0,25 mM	Roth
PMSF	1 mM	Sigma
Antipain	10 µg/ml	Sigma
Leupeptin	10 µg/ml	Sigma
Pepstatin	10 µg/ml	Sigma
NP-40 (v/v)	1%	Fluka

Lösungen und Puffer für Westernblot:

Auftragepuffer

Tris-HCl, 0,5 M, pH 6,8	1,0 ml	Roth
Glycerol	0,8 ml	Merck
SDS (10%, w/v)	1,6 ml	Serva
Bromphenolblau (1% w/v)	0,4 ml	Pharmacia Biotech
β-Mercaptoethanol (1% v/v)	0,4 ml	Sigma
Aqua bidestillata	3,8 ml	

Sammelgel

Tris-HCl, pH 6,8 0,5 M		Sigma
SDS 10%		Serva
Acrylamidlösung (Acrylamid/Bisacrylamid), 19:1, 40%		Serva
Aqua bidest.		
TEMED 0,05%		R&D Systems
Ammoniumpersulfat 10%		Serva

Trenngel 10%ig

Tris-HCl, pH 8,8 1,5 M		Sigma
SDS 10%		Serva
Acrylamidlösung (Acrylamid/Bisacrylamid), 19:1, 40%		Serva
Aqua bidest.		
TEMED 0,05%		R&D Systems
Ammoniumpersulfat 10%		Serva

Laemmli-Puffer (5x)

Tris-Base	15 g	Sigma
Glycerin	72 g	Merck
SDS	5 g	Serva
Aqua bidest.	1000 ml	

Ponceau-S-Proteinfärbung

Ponceau S	1 g	Sigma
Eisessig	50 ml	Merck
Aqua bidest.	950 ml	

Blotting-Puffer (10x)

Tris-Base	15 g	Sigma
Glycerin	72 g	Merck
Aqua bidest.	500 ml	

Blotting-Puffer

Blotting-Puffer (10x)	80 ml	
Methanol	10-20%	Merck
Aqua bidest.	720 ml	

Primäre Antikörper

P-p38 MAP-Kinase AK (Kaninchen)	New England Biolabs
P-ERK1/2 (p42/44 MAP-Kinase) AK (Maus)	Santa Cruz
ERK-2 AK (Maus)	Santa Cruz
p38 AK (Kaninchen)	Santa Cruz

Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen-IgG gekoppelt an IRDye	Li-Cor
Anti-Maus-IgG gekoppelt an Cy5.5	Li-Cor

Der Westernblot beruht auf der SDS-Gelelektrophorese, bei der Proteine nach Maskierung ihrer Eigenladungen durch das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS), nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Natriumdodecylsulfat kann mit einem Massenverhältnis von 1,4:1 an das Polypeptidgerüst der Proteine binden. Ausgenutzt wird dabei, dass die mit einer negativen Außenladung versehenen Proteine größenabhängig unterschiedlich schnell zur Anode wandern. Die einzelnen Proteine werden dann auf eine Membran (Nitrozellulose, PVDF Membran) übertragen und mit spezifischen Antikörpern immundetektiert.

2.6.1 Proteinextraktion

Alle Arbeitsschritte zur Extraktion der löslichen Gesamtproteine wurden auf Eis durchgeführt. Die extrahierten Proben aus einer 6-Loch-Platte wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und je well mit 30 µl eiskaltem Lysepuffer (Tris-HCl, pH 7,4 50 mM, EDTA 0,25 mM, PMSF 1 mM, Antipain 10 µg/ml, Leupeptin 10 µg/ml, Pepstatin 10 µg/ml, NP-40 (v/v) 1%) und einem Zellschaber (Scraper) abgeschabt. Das gewonnene Lysat jeder well (~ 10⁶ Zellen) wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 3 Minuten bei 4 °C und 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem anderen Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt. 5 µl wurden zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet und der Rest bei -20 °C. eingefroren.

2.6.2 Proteinbestimmung (nach Bradford)

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem BioRad Protein-Assay (BioRad) bestimmt, dem die Methode nach Bradford (Bradford 1976) zugrunde liegt. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue verlagert sein Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm, in Gegenwart von Proteinen, wenn er deren basische und aromatische Aminosäuren bindet.

Nach fünfminütiger Inkubation von 5 µl der Proteinlösung mit 1000 µl der 1:5 verdünnten Farbstofflösung wird mit einem Spektralphotometer (UVICON 922) die Absorption bei 595 nm gemessen. Aus einer zuvor mit Rinderserumalbumin (BSA bzw. RSA) hergestellten Standardkurve (1-8 µl einer Stocklösung mit 1 mg/ml Protein) wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Das Spektralphotometer wurde mit 1,0 ml der 1:5 verdünnten Farbstofflösung ohne Proteinlysate, dafür mit 5 µl Aqua dest. geeicht (Leerwert).

2.6.3 SDS-Gelelektrophorese

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut. Die gleiche Proteinmenge (80 µg) wurde entnommen und mit dem gleichen Volumen an mit β-Mercaptoethanol-haltigem Gelladepuffer gemischt und 5 Minuten unter Schütteln im Wärmeblock (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) bei 95 °C erhitzt.

Zur Vorbereitung der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wird die Elektrophoresekammer (BioRad) aufgebaut und die Gele (Trenngel, Sammelgel) hergestellt. Das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid, das den Vernetzungsgrad bestimmt, betrug 19:1.

Der Prozentsatz an Acrylamidlösung im Sammel- und Trenngel wurde so gewählt, dass der Durchmesser der Poren in dem entstehenden Gel für die zu untersuchenden Proteine geeignet ist. Für die Auftrennung der p-38-MAPK, ERK und JNK wurde ein 10%iges Acrylamidgel verwendet.

In jede Geltasche wurden nach dem Abkühlen der Proben je 80 µg Protein separat aufgetragen, ebenso ein Amersham Rainbow high-Größenmarker. Die Elektrophorese erfolgte in BioRad Minigel-Kammern mit Laemmli-Puffer bei 100 Volt bis die Proben nach 15 Minuten in das Trenngel eintraten, danach folgten 90 Minuten bei 120 Volt. (Laemmli 1970)

2.6.4 Proteinblot

Damit die getrennten Proteine optimal mit den Antikörpern detektiert werden können, wurden die Proteine auf eine geeignete Polymermembran geblottet. Dies gelingt, weil die negativ geladenen Proteine wieder zur Anode, nun senkrecht zur Gelebene, wandern.

Hierfür wurde die Elektrophoresekammer auseinandergelöst und das Gel behutsam entnommen. Das Sammelgel wurde mit dem Skalpell vorsichtig entfernt und das Trenngel, für 15 Minuten in eiskaltem Blottingpuffer äquilibriert. Im nächsten Schritt wurde das Trenngel luftblasenfrei auf eine Blottingpuffer-getränkte Hybond-Nitrozellulosemembran (Amersham) gelegt.

Auf beide Seiten der Einheit aus Trenngel und Membran wurde eine Doppellage puffergetränktes 3M-Whatman-Filterpapier (Whatman) gelegt und jeweils darauf ein puffergetränktes Fliespad aus der Blotvorrichtung (Transblot, München). Mit der zugehörigen Plastikhalterung kann der Zusammenbau in die Kammer eingesetzt werden. Geblottet wurde in eiskaltem Blottingpuffer bei 100 Volt, 4 °C und maximal einstellbarer Stromstärke (Ampere) für 1 Stunde. Die Angaben des Herstellers wurden beachtet.

Um den Blot auf die Membran zu beurteilen, wurden die Proteine reversibel mit Ponceau-S gefärbt. Anschließend wurde mit Aqua bidest gewaschen, bis Ponceau-S vollständig entfernt war.

2.6.5 Antikörperexposition

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran in 10 ml eines mit gleichem Anteil PBS verdünnten Odyssey-Licor-Blockpuffer (Licor, Lincoln, NE, USA), für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zu Exposition wurde die Membran und der primäre Antikörper gegen das Zielprotein, verdünnt nach den Vorgaben des Herstellers mit einer Mischung aus Blockpuffer mit 0,1% Tween, für eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert.

Es wurde dreimal jeweils über fünf Minuten mit PBS mit 0,1% Tween gewaschen. Es folgte die Inkubation im Dunkeln mit dem sekundären Antikörper gegen IgG der Spezies des primären Antikörpers. Der verwendete sekundäre Antikörper musste für die Detektion mittels dem Verfahren von Odyssey Licor Bioscience an IRDye 800 oder an Cy5.5 gekoppelt sein. Vorversuche hatten die optimale Verdünnung des sekundären Antikörpers mit 1:2000 in einer Mischung aus gleichen Teilen Blockpuffer und PBS mit 0,1% Tween ermittelt. Nach Exposition mit dem sekundären Antikörper wurde dreimal für jeweils 5 Minuten in PBS mit 0,1% Tween gewaschen und ein viertes Mal für 5 Minuten in PBS ohne Tween, um mögliche störende Reste an Tween zu eliminieren.

2.6.6 Antikörperdetektion

Der an den primären Antikörper gebundene an IRDye800- oder Cy.5.5-gekoppelte sekundäre Antikörper wurde mit dem Scanner des Odyssey infrared imaging system (Licor Bioscience) detektiert. Das eingescannte Bild wurde mit der zugehörigen Software nach Herstellervorgaben bearbeitet.

2.7 Transfektion

Überexpressionsexperimente in HUVEC und Überexpressions- und Inhibitionsexperimente in HEK293

2.7.1 NF- κ B-Reportergen-Assay

Mit Hilfe des NF- κ B-Reportergen-Assays können Fragestellungen zur NF- κ B-abhängigen Genexpression untersucht werden. Das transfizierte Reportergen kodiert für ein Protein, z. B. Luziferase, welches leicht nachweisbar und quantifizierbar ist und sich gut von endogenen Proteinen unterscheidet. Die erhaltene Menge an Luziferase bzw. -aktivität reflektiert die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B und im weiteren Sinne für vorgeschaltete Signaltransduktionseignisse.

Das Prinzip des NF- κ B-Reportergen-Assays beruht darauf, dass sich aktiviertes NF- κ B an die NF- κ B-Bindungsstellen eines transfizierten Plasmids anlagert und so die Transkription des ebenfalls im Plasmid enthaltenen Luziferase-Gens induziert. Die exprimierte Luziferase kann nach Zugabe des Substrats über die Emission von Photonen im Luminometer quantifiziert werden. Die Luziferase (Leuchtkäfer-Luziferase von *Photinus pyralis*) katalysiert die Oxidation von Luziferin mit Sauerstoff in Anwesenheit von ATP-Mg²⁺ als Cosubstrate zu Oxyluziferin und AMP, Pyrophosphat und Kohlendioxid. Aus einem Übergangszustand gelangt dabei Oxyluziferin in einen elektronisch angeregten Zustand, der nach kurzer Zeit in seinen Grundzustand zurückfällt, dabei wird Licht emittiert.

Das NF- κ B-Luziferase-Reportergen enthielt sechs NF- κ B-DNA-Bindungsstellen, welche in einem pGL3Basis-Vektor (Promega, Mannheim) eingebunden waren. Auf die sechs NF- κ B-DNA-Bindungsstellen folgte ein minimaler β -Globin-Promotor, welcher eine TATA Box enthielt, daran schloss sich das Luziferase-Gen an (pGL3.BG.6kB) (Groskreutz et al. 1995).

Die Negativkontrolle erfolgte durch transiente Transfektion eines Plasmids mit sechs mutierten NF- κ B-DNA-Bindungsstellen im gleichen Vektor (pGL3.BG.6kB.mut) (Krull et al. 1999). In diesem Fall konnte NF- κ B nicht binden wodurch die des Reportergens Luziferase unterblieb und es zu keiner messbaren Luziferaseaktivität kam.

Die Lichtemission wurde im Luminometer (single tube luminometer, Lumat LB 9501, Berthold, Bad Wildbad) als korrelierendes Maß für die NF- κ B Aktivierung in den transfizierten Zellen ermittelt.

Die relativen Lumineszenzwerte wurden gegen den totalen Proteingehalt der Probenansätze abgeglichen. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford.

2.7.2 Transfektion von HUVEC

Die Transfektion von HUVEC wurde mittels SuperFect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden) durchgeführt, einem polykationischen Transfektionsreagenz. Der enthaltende Dendrimer bildet mit der zu transfizierenden DNA dichtgepackte positiv geladene Komplexe. Die eukaryontischen Zellen besitzen an der Oberfläche negativ geladene Rezeptoren. Dadurch wird die Anlagerung der eine positive Nettoladung besitzenden

SuperFect-DNA-Komplexe ermöglicht. Die Aufnahme dieser Komplexe in die Zelle erfolgt über Endozytose. Innerhalb des Zytoplasmas hemmen die SuperFect-Komplexe durch pH-Verschiebung lysosomale Nukleasen des lysosomalen Kompartiments, die ihr Optimum im sauren Milieu haben. So bleiben die DNA-Moleküle unbeschadet und können intakt in den Zellkern gelangen (Transfektion). Die Transfektion erfolgt transient, d. h. die transfizierte DNA dringt in hohen Mengen in den Zellkern ein, wird aber nicht in das Chromosom der Zelle integriert. Trotzdem bewirkt die Transfektion eine ausreichende Expression der kodierten Proteine.

Der Reportergen-Assay wurde auf 6-Lochplatten in doppelten Ansätzen durchgeführt. Pro Lochplatte wurde ein Gemisch von 2 µg DNA in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4 bei Raumtemperatur, 1 mM EDTA), 150 µl Medium ohne FCS und 15 µl SuperFect-Transfektionsreagenz 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Komplexbildung wurden die primären Endothelzellen zuerst mit PBS gewaschen, dann mit 2 ml Medium mit 10% FCS überschichtet, abschließend wurde der Transfektionsansatz zugesetzt. Während der zweistündigen Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank erfolgte die Transfektion. Anschließend wurden die transfizierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben und war bereits in unserem Labor gut etabliert u.a. von Krüll (Krüll et al. 1999).

Der Erfolg der Transfektion der HUVEC wurde über einen β-Galaktosidase-Enzymtest kontrolliert. Zu diesem Zweck wurden die umbilicalen venösen Endothelzellen mit einem pSV-Beta-Galaktosidase-Kontroll-Vektor (Promega, Mannheim) transfiziert. Transfizierte Zellen können im Gegensatz zu nicht transfizierten Zellen β-Galaktosidase exprimieren. Wenn die Zellen anschließend mit Glutaraldehyd fixiert wurden und X-Gal (BCIG, 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-beta-D-galactopyranosid) hinzugesetzt wurde, erschienen die transfizierten Zellen blau. Unter einem Phasenkontrast-Mikroskop erfolgte die lichtmikroskopische Auswertung. Aus dem Verhältnis der gefärbten zu den ungefärbten Zellen in den wells der 6-Lochplatten konnte die Transfektionsrate des pSV-Beta-Galaktosidase-Kontroll-Vektors abgeschätzt werden. Weil in allen 6-Lochplatten die Anzahl der blaugefärbten HUVEC fast gleich war, wurde bei Wiederholungen eine konstante Transfektionsrate vorausgesetzt.

2.7.3 Transfektion von HEK293

Der Einfluss der NF- κ B-Aktivierung durch MAPK und Rho-Proteine auf die Zytokinfreisetzung wurde weiter untersucht. HUVEC konnten nicht mit akzeptabler Effizienz mit mehreren Plasmiden transfiziert werden. Für weitere Studien der *groEL*-1-vermittelten Signaltransduktion durch MAPK und Rho-Proteine wurde deshalb auf HEK293-Zellen zurückgegriffen (Abbildung 2). Die gezielte Überexpression von Proteinen im Modell der HEK293-Zellen ist eine Möglichkeit der biomedizinischen Forschung, die Funktion des überexprimierten Proteins zu untersuchen. Die HEK293-Zellen können sehr gut mit Plasmid-DNA transfiziert werden und kommen aus diesem Grund sehr häufig für Überexpressionsexperimente zum Einsatz. Chlamydien sind in der Lage diese Zellen zu invadieren (Opitz et al. 2005). Chlamydiales Hsp60 / *groEL*-1 nutzt TLR2 (Toll-like Receptor 2) und TLR4 (Toll-like Receptor 4) zur Aktivierung von Signalwegen (Vabulas et al. 2001). HEK293 exprimieren weder TLR2 noch TLR4 oder andere Toll-like Rezeptoren (TLRs) (Kirschning et al. 1998; Mempel et al. 2003).

HEK293 wurden transient transfiziert. Die Transfektion von HEK293 wurde mittels CalPhos Mammalian Transfection Kit (Clontech Laboratories, Mountain View, USA) durchgeführt. Das enthaltende Calciumphosphat bildet mit der DNA Präzipitate. Die Aufnahme dieser in die Zelle erfolgt über Endozytose.

HEK293 wurden in 24-Lochplatten ausgesät. Für die Transfektion wurden subkonfluente Zellrasen (~70%) verwendet. In Eppendorfgläsern wurden nacheinander Calciumphosphat, die jeweiligen DNA, steriles Wasser und ein gleicher Teil an 2 x HEPES gepufferter Salzlösung aus dem Kit pipettiert, auf dem Vortex-Mixer gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert unter Beachtung der Herstellerangaben. Nach erneuter Mischung wurden die Transfektionsansätze vorsichtig zu den Zellen in die Wells gegeben, die Lochplatte vorsichtig geschwenkt und für 4 Stunden bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Das calciumphosphathaltige Medium wurde vorsichtig abgesaugt, und die Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen. Damit die transiente Genexpression stattfindet konnte, wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium für 24 Stunden post transfectionem im Brutschrank inkubiert. Dann fanden die Stimulationsversuche statt.

Transfiziert wurden die HEK293 mit einem NF- κ B-Luziferase-Reportergen, wie es beim NF- κ B-Luziferase-Reportergen-Assay beschrieben wurde. Kotransfiziert wurde ein RSV- β -Galaktosidase-Plasmid (Rous sarcoma virus β -galactosidase) (Opitz et al. 2001) für ein β -Gal-Reportergen-Assay (Roche, Mannheim).

Für die Stimulationsversuche wurden die HEK293 außerdem entweder mit TLR2 (pFlag-CMV1 TLR2 wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. C. Kirschning, München; Kirschning et al. 1998) oder TLR4, MD2, CD14 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. C. Kirschning, München) und mit den Vektoren/dominant-negativen Mutanten dnRhoA, dnCdc42, dnRac1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dres. M. Muzio und A. Ridley; Schmeck et al. 2006), dnp38 α , dnp38 β 2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. J. Han, Scripps Research Institute, La Jolla, USA; N'Guessan et al. 2006) respektive einem leeren Expressionsvektor kotransfiziert. Als Leervektor wurde pFlag-CMV1 gewählt.

Nach Ende Stimulationszeit wurden die Zellen vor ihrer Lyse einmal mit PBS/-gewaschen. Die Lyse der Zellen mit einem speziellen Lysepuffer (Cell Culture Lysis Reagent, Promega, Madison, USA), die Luziferase-Bestimmung mit dem Luciferase Assay System (Promega, Mannheim) und die β -Galaktosidase-Bestimmung mit dem Beta-Gal Reporter Gene Assay (Roche, Mannheim) erfolgten nach Herstellerangaben. Die erhaltenen Werte für die Chemilumineszenz quantifizieren die enzymatische Aktivität. Zur Normierung der Transfektionseffizienz wurden die erhaltenen Luziferase-Werte durch die β -Galaktosidase-Werte dividiert und als relative Luziferase-Aktivitäten angegeben.

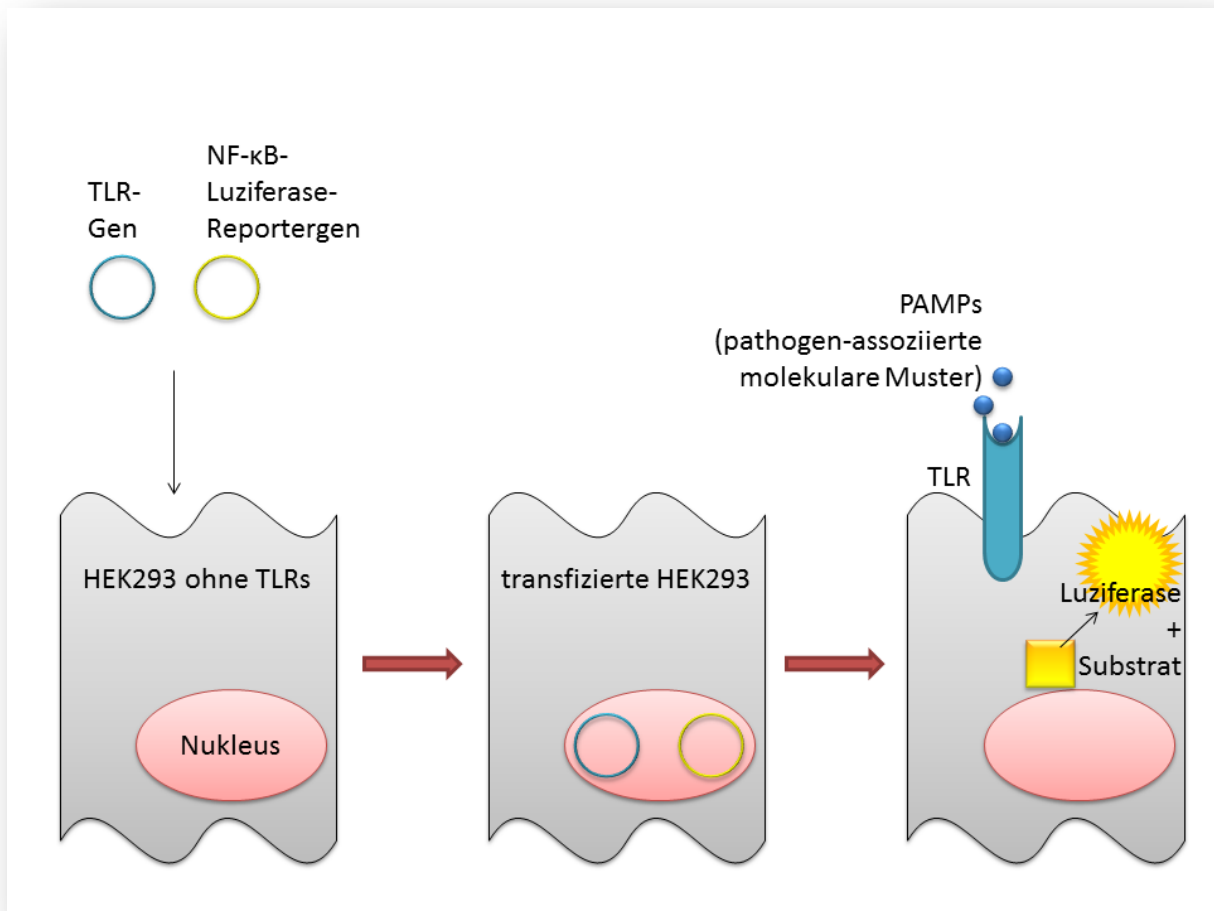


Abbildung 2 Transfektion von HEK293

2.8 Auswertung und Software

Statistische Auswertung und Software

Als Software für die Abbildungen, die Berechnungen und die Auswertung wurde Prism 3-5 (GraphPad Software, San Diego, USA), Microsoft Office 2000-2010 (Microsoft, Redmond, USA) und Adobe Photoshop 5.0-CS5 (Adobe, San Jose, USA) verwendet.

Die Säulendiagramme im Ergebnisteil zeigen Mittelwerte mit Standardfehler vom Mittelwert (standard error of the mean) als Standardabweichung der Schätzfunktion.

3 Ergebnisse

3.1 *groEL*-1-stimulierte HUVEC produzieren Interleukin 8

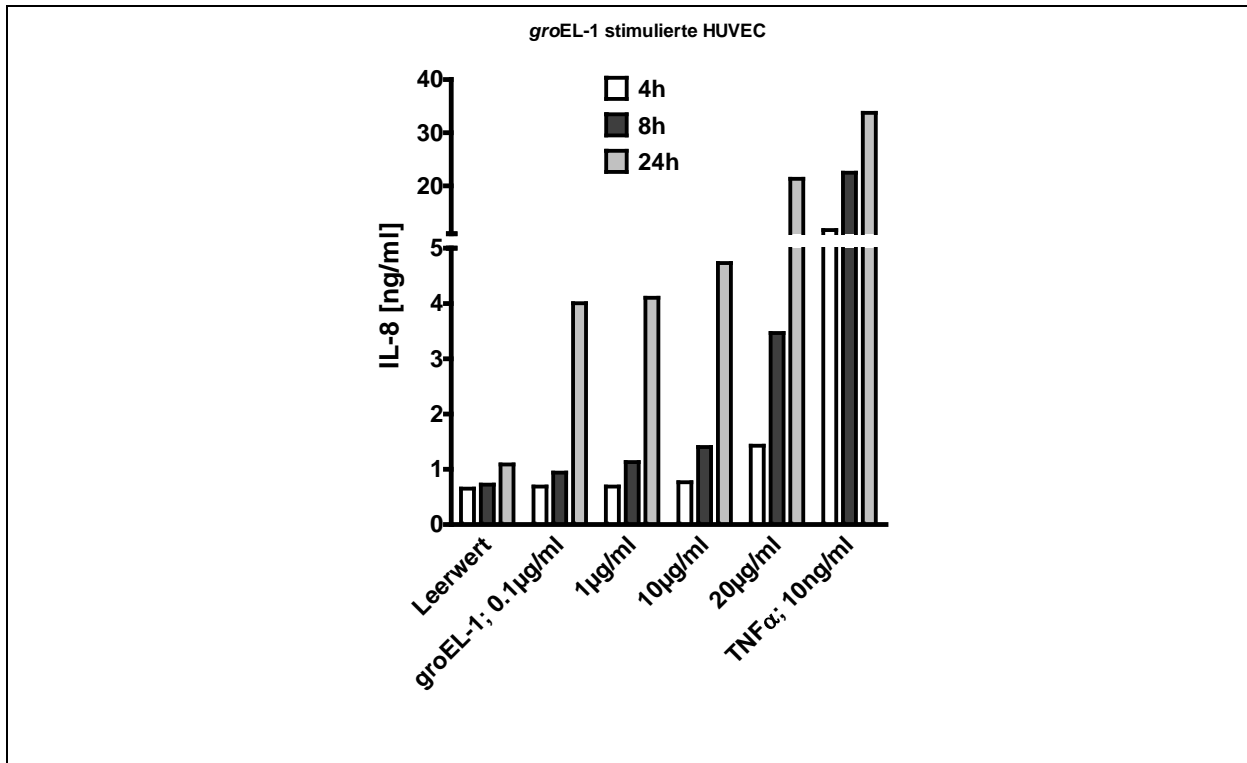


Abbildung 3 Zeit- und Dosisabhängige Expression von IL-8

Abbildung 3 zeigt wie chlamydiales Hitzeschockprotein 60 respektive *groEL*-1 in HUVEC eine zeit- und dosisabhängige Expression von IL-8 induziert. Gezeigt sind die Daten eines IL-8 ELISA der nach den angegebenen Zeitintervallen gewonnenen Überstände. Die Konzentration des freigesetzten Zytokins IL-8 steigt mit der Zeit an. Die Stimulation der HUVEC erfolgte mit 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml *groEL*-1. Nach 4, 8 und 24 Stunden wurde die Vitalität der HUVEC mikroskopisch geprüft und die Überstände gewonnen. Die Expression ist vergleichbar einer Stimulation mit lebenden *C. pneumoniae* (Daten nicht gezeigt). Als Positivkontrolle dient, wie bereits in vorangegangenen Arbeiten (Krüll et al. 2004) erprobt, TNF-α (10 ng/ml) (R & D Systems, Wiesbaden).

3.2 aktivierte Signalwege

3.2.1 NF- κ B-Reportergen-Assay in HUVEC

Nachfolgende Abbildung 4 demonstriert die Analyse mittels NF- κ B-Luziferase-Reportergen-Assay.

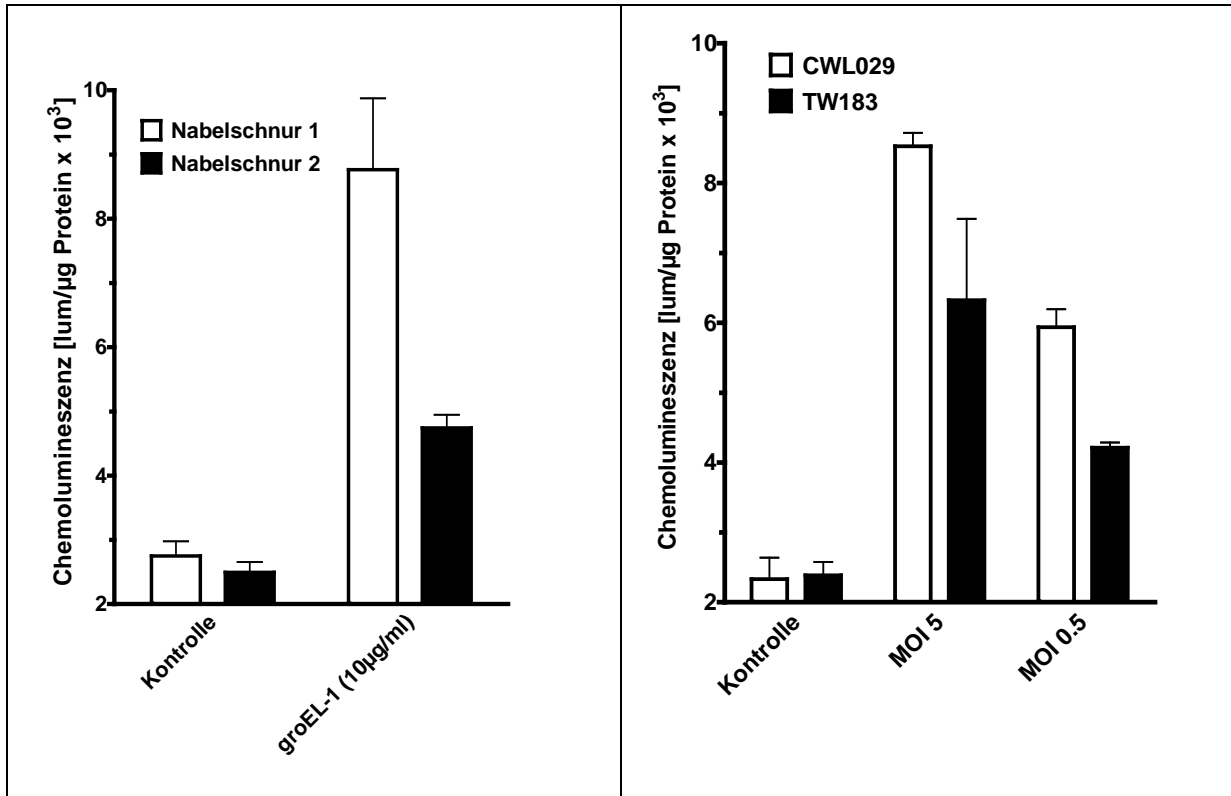


Abbildung 4 Aktivierung von NF- κ B in HUVEC analysiert mittels NF- κ B-Luziferase-Reportergen-Assay

Links ist die Stimulation der HUVEC mit *groEL-1* gezeigt. Rechts ist die Stimulation der HUVEC mit *C. pneumoniae* Stamm CWL029 bzw. TW183 (MOI 0,05–5) gezeigt. Sowohl die Stimulation mit *groEL-1* (links) als auch mit den beiden *C. pneumoniae* Stämmen (rechts) führt zu einer Aktivierung von NF- κ B in HUVEC, die mittels des NF- κ B-Luziferase-Reportergen-Assay als Chemolumineszenz gemessen werden kann. Die aus den Nabelschnüren isolierten HUVEC wurden standardmäßig immer gepoolt um interindividuelle Unterschiede zu verringern. Die Notwendigkeit zu dieser Vorgehensweise ist exemplarisch im Experiment mit Verwendung von HUVEC, welche jeweils aus einem anderen Individuum präpariert wurden, gezeigt.

Die Abbildung 5 zeigt die Aktivierung der MAP-Kinasen durch *groEL-1* mittels Westernblot.

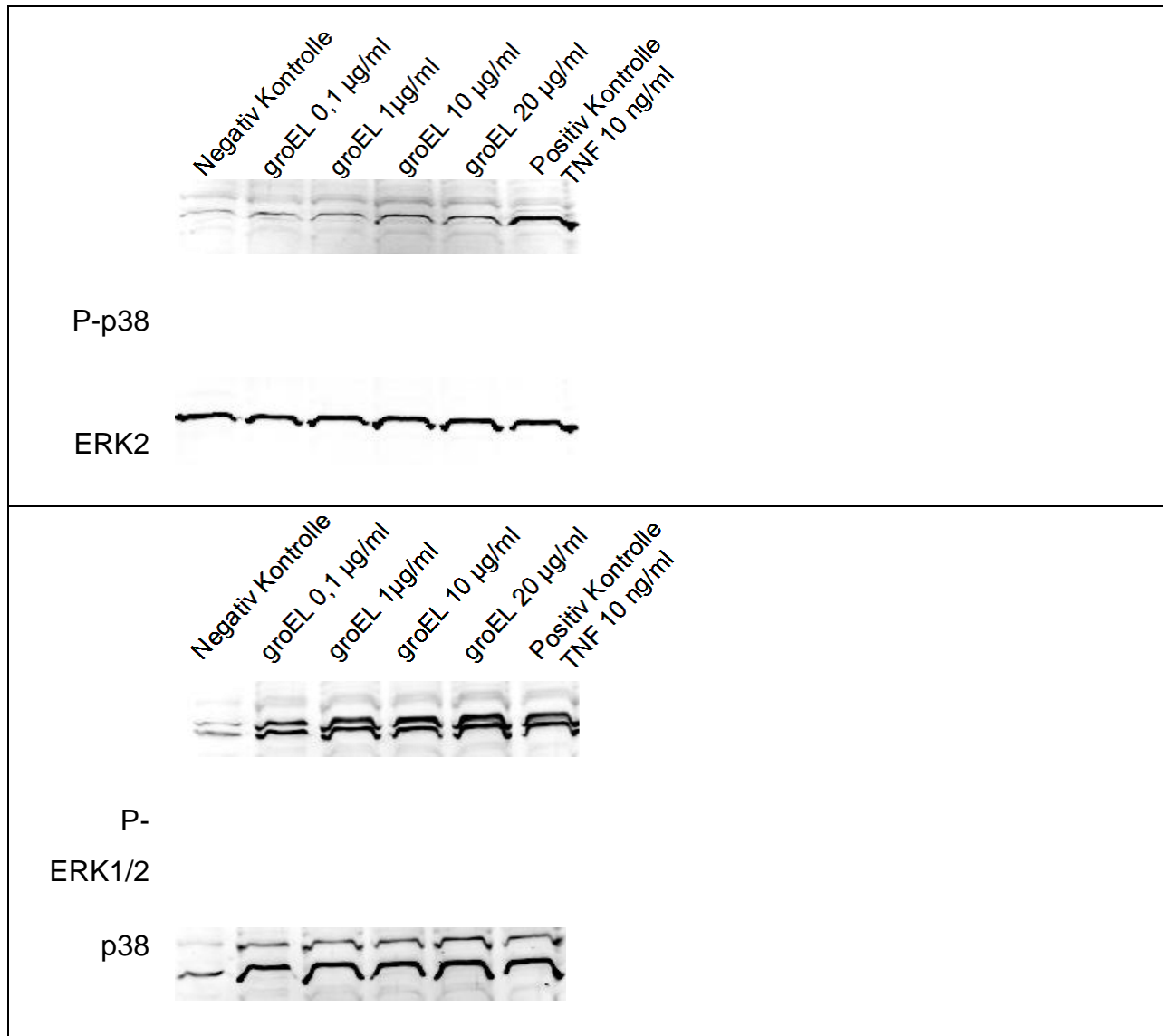


Abbildung 5 Westernblot zur dosisabhängigen Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2

Die Abbildung zeigt im Westernblot, dass die Stimulation von HUVEC mit *groEL*-1 eine Aktivierung der MAP-Kinasen bewirkt. Eine gleiche Beladung der Gelkammern war sichergestellt und jeweils mittels Beladungskontrolle belegt. Im oberen Teil der Abbildung wird die dosisabhängige Aktivierung / Phosphorylierung von p38 dokumentiert. Die gleichmäßige Beladung wird durch ERK2, unmittelbar darunter dargestellt, gezeigt. Im unteren Teil wird der Nachweis der dosisabhängigen Aktivierung / Phosphorylierung von ERK1/2 abgebildet. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung dient in diesem Fall p38, ebenfalls unmittelbar darunter dargestellt. Die Experimente belegen, dass nach Stimulation der HUVEC mit *groEL*-1 eine deutliche Phosphorylierung der MAPK induziert wird. Das trifft sowohl für p38 als auch für ERK1/2 zu. Als Positivkontrolle dient die Stimulation der Zellen mit TNF- α , der nachweislich die MAPK aktiviert (Roux und Blenis 2004). Vorversuche hatten eine zeit-

und dosisabhängige Phosphorylierung der MAPK nach Inkubation mit *C. pneumoniae* gezeigt (Krüll et al. 2004; Krüll et al. 2006).

Nicht phosphorylierte p38 MAPK, die ebenfalls gefunden werden, bestätigen, dass die Phosphorylierung nicht von einer Veränderung der gesamten p38 / ERK2 Expression begleitet werden.

3.2.2 Abhängigkeit der IL-8 Sekretion von der Aktivierung der MAPK und der Rho-Proteine

Nach der Stimulation mit *groEL-1* kommt es zu einer von der Aktivierung der MAPK abhängigen IL-8 Expression.

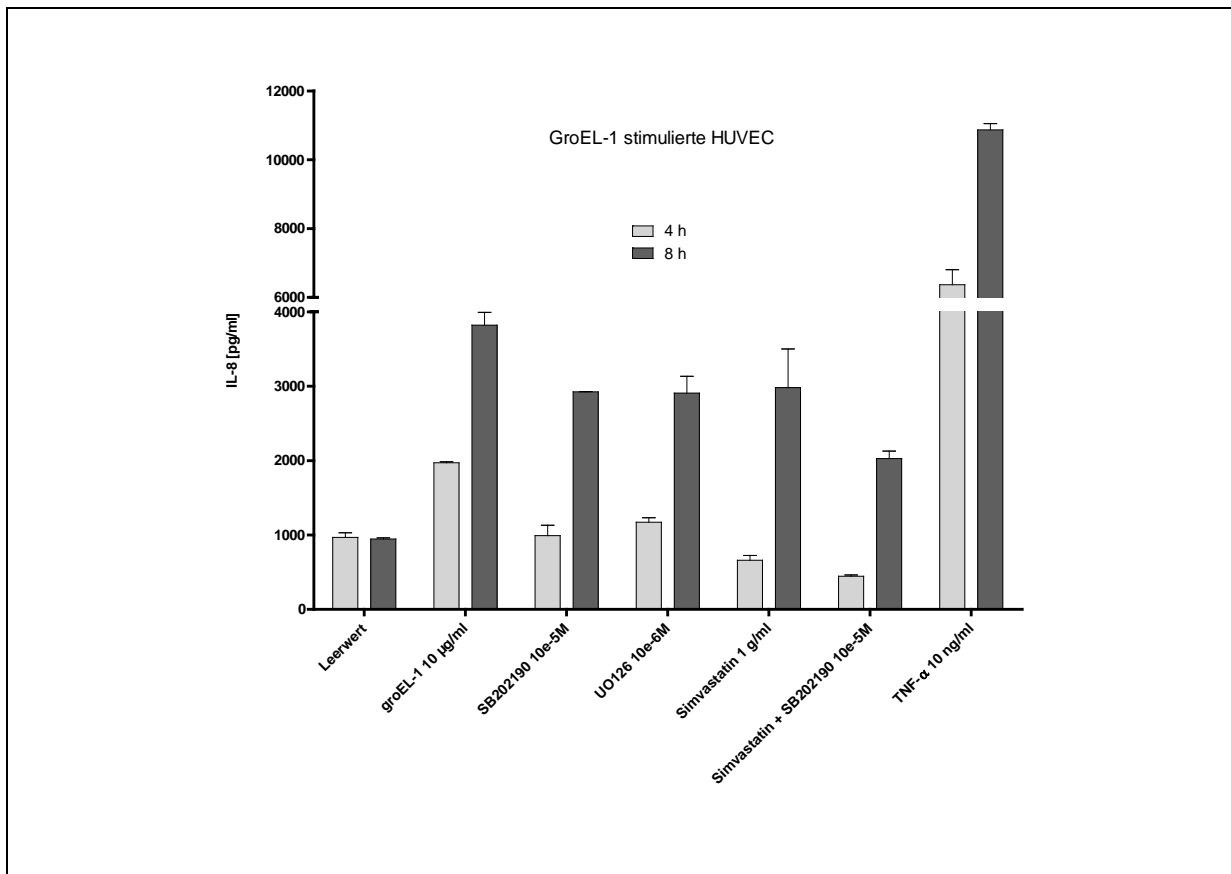


Abbildung 6 Einfluss von Inhibitoren der MAPK und Simvastatin auf die IL-8-Expression in *groEL-1* stimulierten HUVEC

Die Abbildung 6 zeigt den Einfluss von Inhibitoren der MAPK und Simvastatin auf die IL-8-Expression. Um die Beteiligung unterschiedlicher Signalwege auf die Sekretion des Zytokins IL-8 mittels ELISA-Technik zu untersuchen, wurden Inhibitoren der MAPK und Simvastatin eingesetzt. Die Vorinkubation der Zellen mit den Inhibitoren der MAPK erfolgte für 30 Minuten. Im Versuchsansatz mit Simvastatin wurden die Zellen über Nacht mit Simvastatin vorinkubiert. Gezeigt wird die Freisetzung von IL-8 aus HUVEC

nach Stimulation mit *groEL*-1 (10 µg/ml) nach einem Zeitintervall von 4 respektive 8 Stunden. Die Inhibition der p38 MAP-Kinase durch den chemischen Inhibitor SB202190 (Calbiochem, San Diego, USA) und ERK durch den chemischen Inhibitor UO126 (Calbiochem, San Diego, USA) reduziert die *groEL*-1-induzierte Zytokinfreisetzung. Simvastatin inhibiert die Rho-Kinase und damit die Aktivierung der Proteine der Rho-Familie, kleine GTP-bindende Proteine. Infolgedessen reduziert Simvastatin die gemessene *groEL*-1-induzierte Freisetzung von IL-8. Die Kombination der Hemmung von p38 durch SB202190 mit der Inhibition der Rho-Kinase durch Simvastatin wirkt verstärkend auf die Reduktion der durch *groEL*-1-induzierten IL-8-Freisetzung. Als Positivkontrolle für die Induktion der MAPK dient TNF-α (10 ng/ml), welcher bekanntermaßen die MAPK aktiviert (Roux und Blenis 2004).

Vergleichend wurde der Einfluss von Inhibitoren der MAPK und von Simvastatin auf die TNF-α-induzierte IL-8-Freisetzung in HUVEC untersucht.

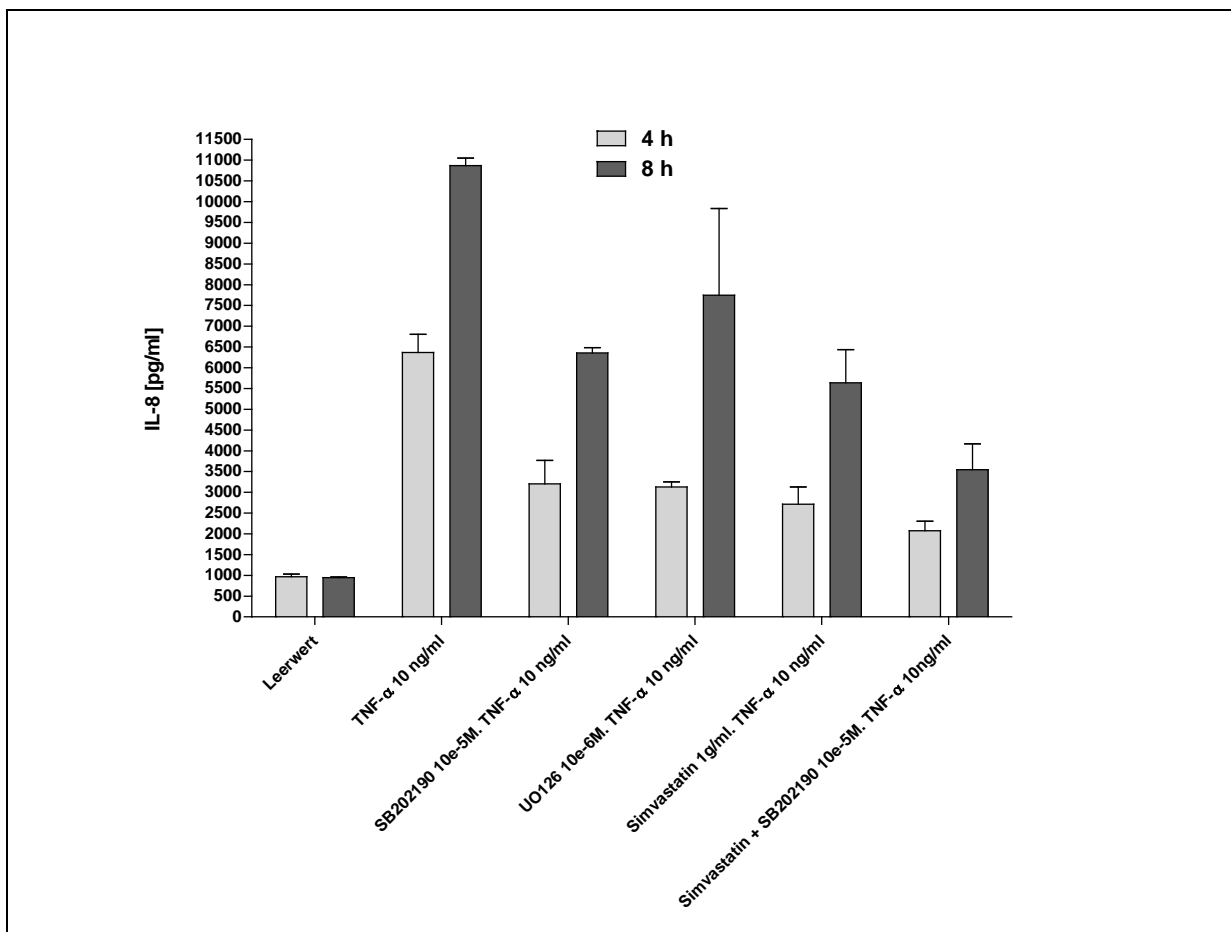


Abbildung 7 Einfluss von Inhibitoren der MAPK und Simvastatin auf die IL-8-Expression in TNF-α stimulierten HUVEC

In Abbildung 7 ist die Freisetzung von IL-8 aus HUVEC nach Stimulation mit TNF- α (10 ng/ml) nach einem Zeitintervall von 4 respektive 8 Stunden gezeigt. Die Inhibition der p38 MAP-Kinase durch den chemischen Inhibitor SB202190 (Calbiochem, San Diego, USA) und ERK durch den chemischen Inhibitor UO126 (Calbiochem, San Diego, USA) reduziert die TNF- α -induzierte IL-8-Freisetzung. Simvastatin inhibiert die Rho-Kinase und damit die Aktivierung der Proteine der Rho-Familie. Infolgedessen reduziert Simvastatin die gemessene TNF- α -induzierte Freisetzung von IL-8. Die Reduktion der TNF- α -induzierten IL-8-Freisetzung wird durch die Kombination von SB202190 zur Hemmung von p38 und Simvastatin zur Inhibition der Rho-Kinase verstärkt.

Im Folgenden wurde der Einfluss der MAPK und Rho-Proteine auf die IL-8-Freisetzung aus HUVEC vergleichend nach Stimulation mit *groEL*-1 respektive mit *C. pneumoniae* untersucht.

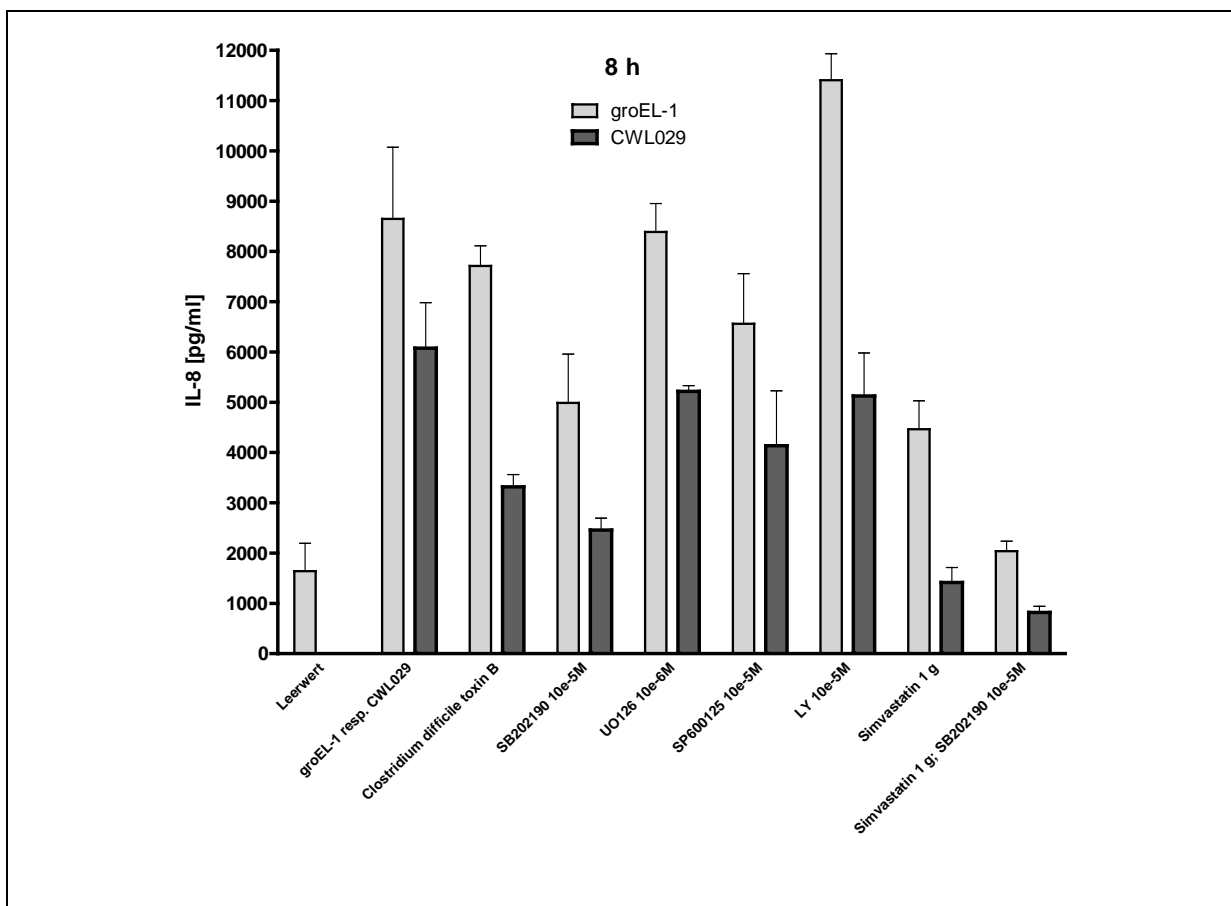


Abbildung 8 Einfluss von *Clostridium difficile* toxin B, Simvastatin und MAPK Inhibitoren auf die IL-8-Expression

Die Abbildung 8 zeigt die Freisetzung von IL-8 aus HUVEC nach Stimulation mit *groEL*-1 (10 μ g/ml) respektive mit *C. pneumoniae* Stamm CWL029 nach einem Zeitintervall von 8 Stunden. Eine Reduktion der IL-8-Freisetzung durch Inhibitoren der MAPK und

der Rho-Proteine tritt sowohl in mit *groEL*-1 als auch in mit *C. pneumoniae* stimulierten HUVEC auf. Die Inhibition der MAP-Kinase p38 durch die chemischen Inhibitoren SB202190 und UO126 reduziert die induzierte Zytokinfreisetzung ebenso wie die Inhibition von JNK (c-Jun N-terminal kinase) durch den Inhibitor SP600125. Die Inhibition der Proteine der Rho-Familie durch Simvastatin reduziert die induzierte Freisetzung von IL-8. Die Inaktivierung der Rho-Proteine RhoA/Rac1/Cdc42 durch Glykosylierung mittels *Clostridium difficile* toxin B-10463 (TcdB-10463) (Hippenstiel et al. 2002) bewirkt eine prozentual stärkere Reduktion der Freisetzung von IL-8 nach Stimulation mit CWL029 als mit *groEL*-1. Die Kombination von SB202190 mit Simvastatin verstärkt die Reduktion der IL-8-Freisetzung. Die Präinkubation mit 10 μ M PI3K Inhibitor (phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor) LY294002 (Promega) konnte keine vergleichbare Reduktion der IL-8-Freisetzung zeigen.

Im Weiteren wurde der Einfluss der MAPK und Rho-Proteine auf die IL-8-Freisetzung aus HUVEC vergleichend nach Stimulation mit *groEL*-1 respektive mit TNF- α untersucht.

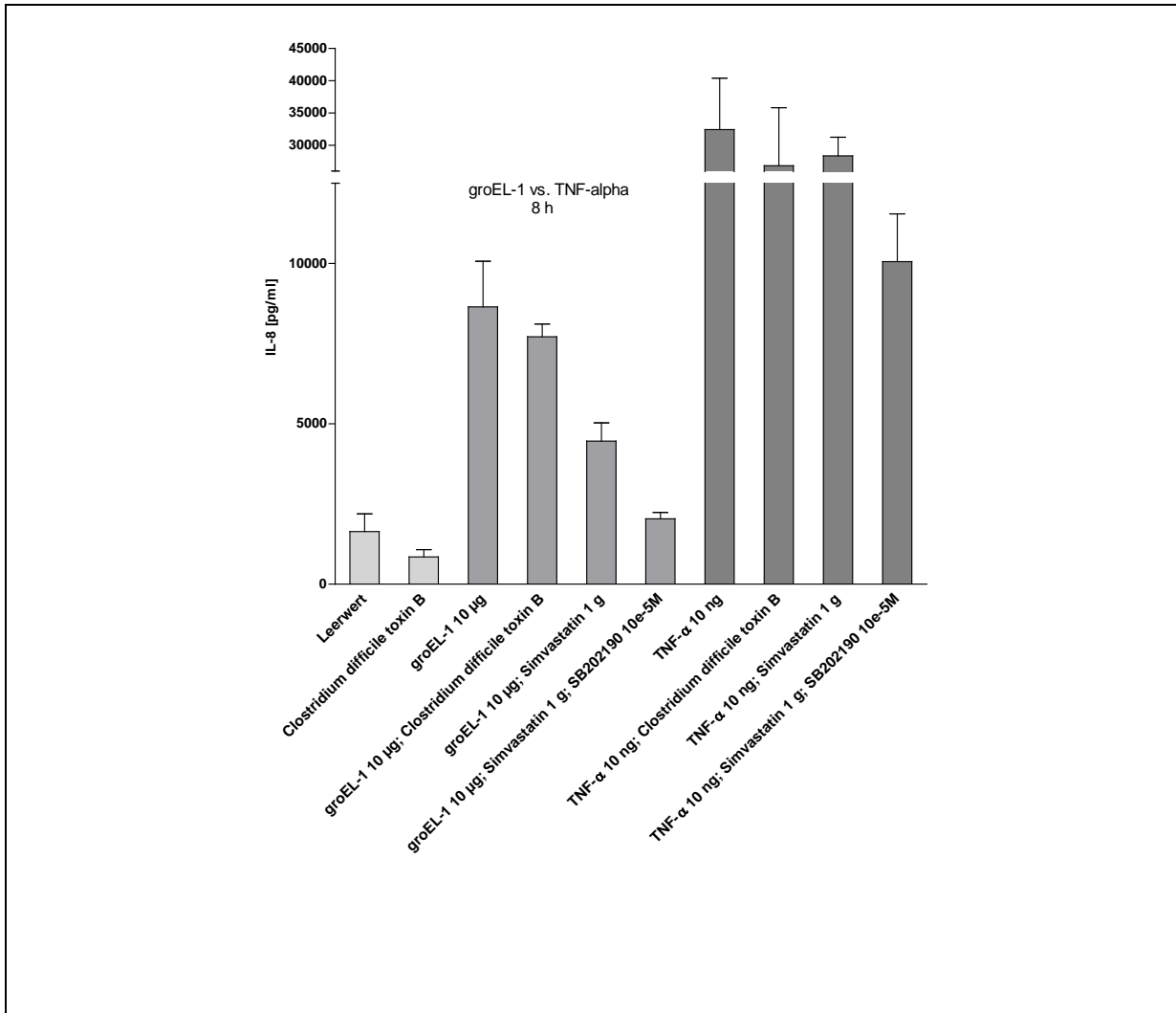


Abbildung 9 Einfluss von Clostridium difficile toxin B, Simvastatin und MAPK Inhibitor SB202190 auf die IL-8-Expression

Die Abbildung 9 zeigt die Freisetzung von IL-8 aus HUVEC nach Stimulation mit *groEL*-1 (10 µg/ml) respektive mit TNF-α (10 ng/ml) nach einem Zeitintervall von 8 Stunden. Eine Reduktion der IL-8-Freisetzung durch Inhibitoren der MAPK und der Rho-Proteine tritt in mit *groEL*-1 stimulierten HUVEC prozentual stärker auf. In durch TNF-α stimulierten HUVEC tritt eine deutliche Reduktion erst durch Kombination von Inhibition der MAP-Kinase p38 durch den chemischen Inhibitor SB202190 mit der Inhibition der Rho-Kinase durch Simvastatin auf. Die durch Simvastatin prozentual stärkere Reduktion der IL-8-Freisetzung im Vergleich zur Inaktivierung der Rho-Proteine RhoA/Rac1/Cdc42 durch Glykosylierung mittels Clostridium difficile toxin B-10463 (TcdB-10463) (Hippenstiel et al. 2002) zeigt sich nur in mit *groEL*-1 stimulierten HUVEC.

Die Bedeutung von TLR2 und TLR 4 für die *groEL*-1-induzierte NF-κB-Aktivierung wurde in Überexpressionsexperimenten mit HEK293-Zellen untersucht.

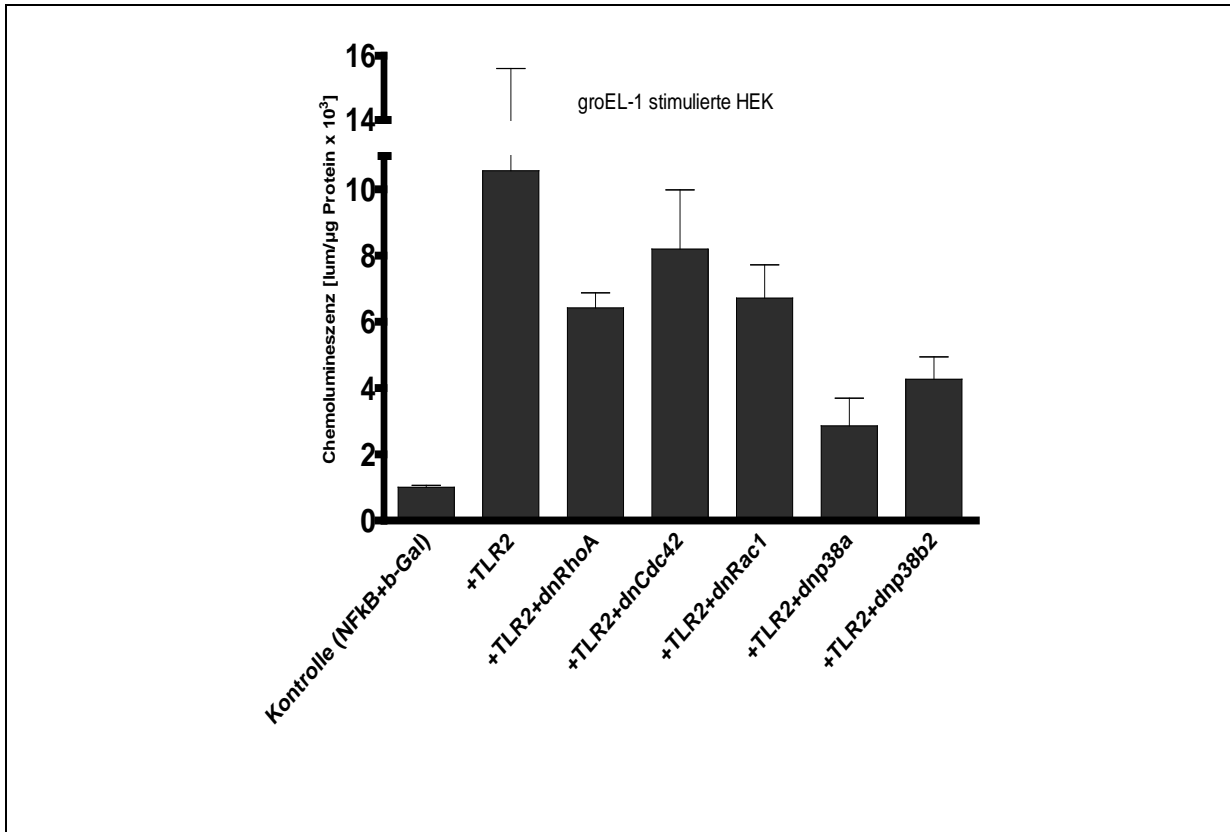


Abbildung 10 NF-κB-Luziferase-Reportergen-Assay nach *groEL-1* Stimulation von mit TLR2 und dominant negativen Plasmiden transfizierten HEK293

Alle HEK293 wurden mit einem NF-κB-Luziferase-Reportergen und β-Gal-Reportergen transfiziert. Die Abbildung 10 zeigt die NF-κB-Aktivierung nach Stimulation mit *groEL-1* in HEK293, welche zuvor zusätzlich mit TLR2 und jeweils dominant negativen Mutanten der Plasmide dnRhoA, dnCdc42, dnRac1, dnp38α, dnp38β2 transfiziert wurden. Ohne Transfektion von TLR2 kommt es keiner Aktivierung von NF-κB. Die Transfektion von dominant negativen Mutanten der Rho-Proteine dnRhoA oder dnRac1 führt zu einer Reduktion der NF-κB-Aktivierung um fast 50% und im Falle von dnCdc42 um fast 25%. Durch die Transfektion der dominant negativen Mutanten der MAP-Kinase p38 wird die NF-κB-Aktivierung prozentual noch stärker reduziert. Bei Transfektion von dnp38α wird fast nur ein Viertel und bei Transfektion von dnp38β2 fast nur ein Drittel so viel NF-κB aktiviert. Die *groEL-1*-induzierte Expression des NF-κB-abhängigen Reportergens wurde blockiert durch die dominant negativen Isoformen alpha und beta2 der p38 MAPK und der o.g. Rho-Proteine. Dieser Versuch demonstriert, dass *groEL-1* sowohl auf einem p38-abhängigen Weg als auch über die o.g. Rho-Proteine die von NF-κB abhängige Gentranskription aktiviert.

Zum Ausschluss von unspezifischen Effekten wurde exemplarisch die NF- κ B-Aktivierung/Translokation durch *C. pneumoniae* in HEK293 nach Transfektion mit TLR2 und dem dominant negativen Plasmid dnCdc42 oder einem Leervektor in verschiedenen Konzentrationen untersucht.

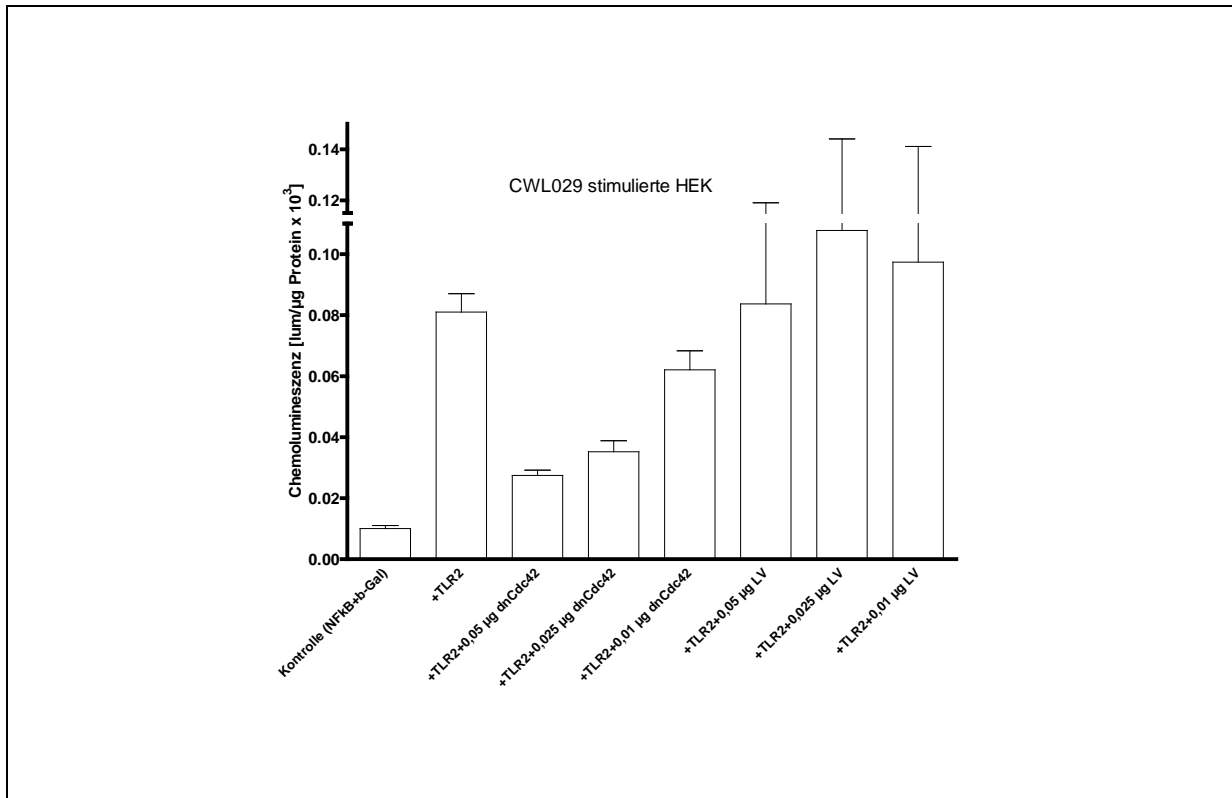


Abbildung 11 NF- κ B-Luziferase-Reportergen-Assay nach Stimulation mit *C. pneumoniae* von zuvor mit TLR2 und dominant negativen Plasmiden transfizierten HEK293

Wie in Abbildung 11 gezeigt, fand sich dosisabhängig eine reduzierte NF- κ B-Aktivierung in durch *C. pneumoniae* stimulierten HEK293 nur in den Zellen, die zuvor mit dnCdc42 transfiziert wurden. In den Zellen, die zuvor stattdessen mit einem pFlag-CMV1 (Leervektor) transfiziert wurden, fand sich keine Reduktion.

Es war von Interesse, ob sich nach Stimulation mit vitalen oder UV-inaktivierten *C. pneumoniae* Unterschiede hinsichtlich der NF- κ B- Aktivierung/Translokation zeigen (Abbildung 12).

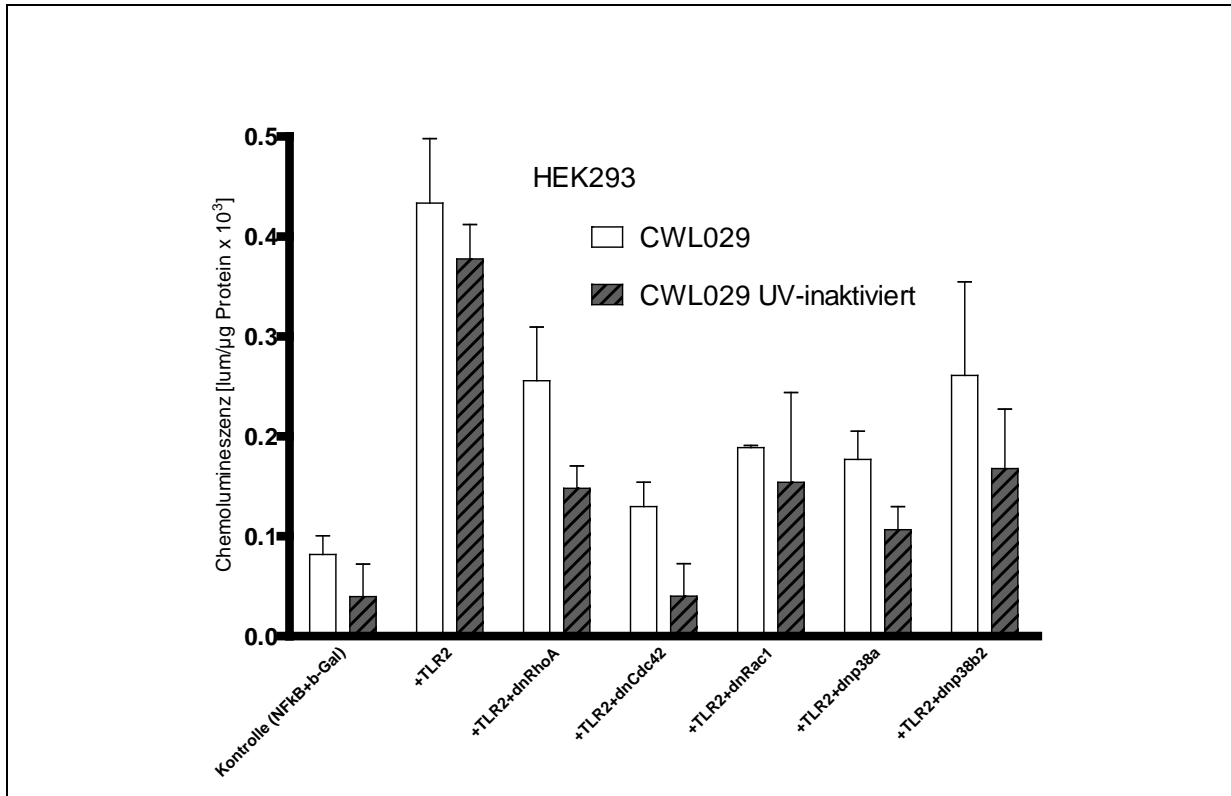


Abbildung 12 NF- κ B-Luziferase-Reportergen-Assay nach Stimulation mit vitalen/UV-inaktivierten *C. pneumoniae* von zuvor mit TLR2 und dominant negativen Plasmiden transfizierten HEK293

Ohne Transfektion von TLR2 kommt es keiner Aktivierung von NF- κ B. Die Transfektion von dominant negativen Mutanten der Rho-Proteine respektive der dominant negativen Mutanten der MAP-Kinase p38 reduziert sowohl die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit vitalen als auch mit UV-inaktivierten *C. pneumoniae*. Die relative prozentuale Reduktion ist vergleichbar. Die Transfektion von dnRhoA führt zu einer fast 50%igen Reduktion. Die Transfektion von dnRac1 bzw. dnCdc42 reduziert die Aktivierung von NF- κ B fast auf ein Drittel bis Leerwertniveau. Die NF- κ B-Aktivierung ist in mit den dominant negativen Isoformen der p38 MAPK, dnp38 α und dnp38 β 2, transfizierten Zellen fast um 50% reduziert. Sowohl vitale als auch UV-inaktivierte *C. pneumoniae* aktivieren auf einem p38-abhängigen Weg und auch über die o.g. Rho-Proteine die von NF- κ B abhängige Gentranskription.

Es wurde untersucht welche Bedeutung TLR4 für die Vermittlung der NF- κ B-Aktivierung durch *groEL*-1 in HEK293 hat.

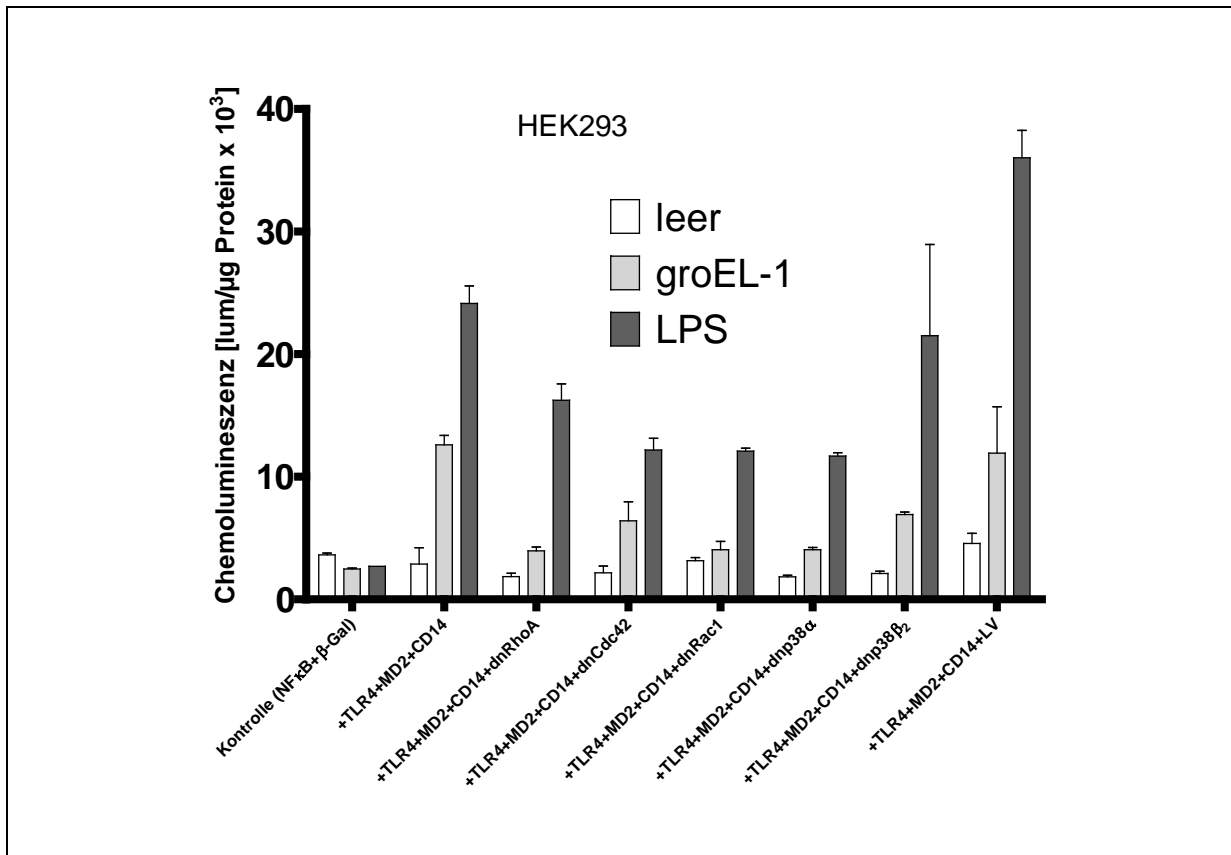


Abbildung 13 NF- κ B-Luziferase-Reportergen-Assay nach Stimulation von HEK293 mit *groEL*-1 oder LPS, welche zuvor zusätzlich mit TLR4, MD2, CD14 sowie mit dominant negativen Plasmiden dnRhoA, dnCdc42, dnRac1, dnp38 α , dnp38 β 2 oder dem Leervektor transfiziert wurden.

Die HEK293 wurden mit einem NF- κ B-Luziferase-Reportergen und β -Gal-Reportergen transfiziert. Abbildung 13 zeigt die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit *groEL*-1 oder LPS in HEK293, welche zuvor zusätzlich mit TLR4, MD2, CD14 sowie ggf. mit dominant negativen Plasmiden dnRhoA, dnCdc42, dnRac1, dnp38 α , dnp38 β 2 oder pFlag-CMV1 als Leervektor transfiziert wurden. Die Stimulation mit LPS (Lipopolysacharid), einem wichtigen Virulenzfaktor und Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, wurde als Kontrolle genutzt. Ohne Transfektion von TLR4, MD2, CD14 kommt es weder nach Stimulation mit *groEL*-1 noch mit LPS zur Aktivierung von NF- κ B. Werden die HEK293 zusätzlich mit dominant negativen Plasmiden dnRhoA, dnCdc42, dnRac1 transfiziert, reduziert sich die Aktivierung von NF- κ B um bis zu 50% sowohl bei Stimulation mit *groEL*-1 als auch mit LPS. Wird mit dnp38 α transfiziert, reduziert sich die NF- κ B-Aktivierung ebenfalls um fast 50% sowohl bei Stimulation mit *groEL*-1 als auch mit LPS. Wohingegen die Reduktion der NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit *groEL*-1 oder LPS in Zellen, die mit dnp38 β 2 transfiziert wurden, prozentual deutlich geringer ausfällt.

In den Zellen, welche mit dem Leervektor transfiziert wurden, findet sich keine Reduktion.

Es wurde untersucht, welche Bedeutung TLR4 und seine Cofaktoren MD2 und CD14 für die Vermittlung der NF- κ B-Aktivierung durch *groEL*-1 in HEK293 haben.

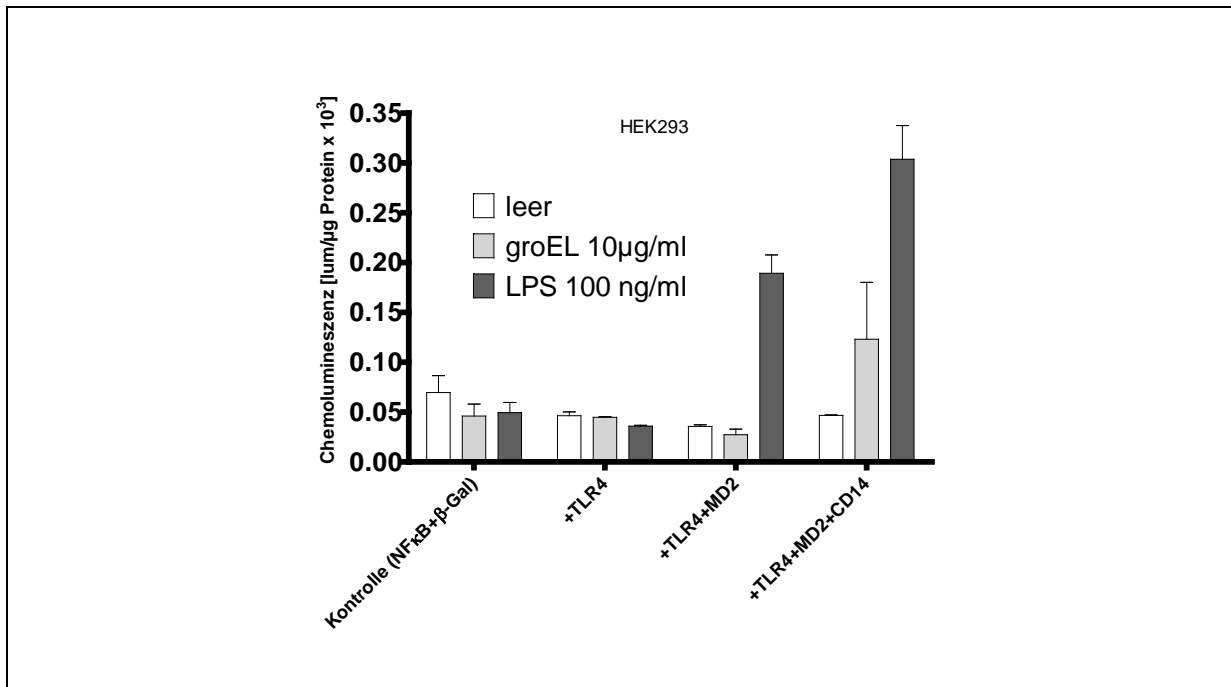


Abbildung 14 Bedeutung von TLR4 und seinen Cofaktoren MD2 und CD14 für die Vermittlung der NF- κ B-Aktivierung durch *groEL*-1 in HEK293

Die HEK293 wurden mit einem NF- κ B-Luziferase-Reporter gen und β -Gal-Reporter gen transfiziert. Abbildung 14 zeigt die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit *groEL*-1 oder LPS in HEK293. Die Zellen wurden zuvor entweder zusätzlich mit TLR4 allein, oder in Kombination mit MD2 oder mit beiden Cofaktoren (MD2 und CD14) transfiziert. Sofern nur mit TLR4 transfiziert wurde, kann sowohl nach Stimulation mit *groEL*-1 als auch mit LPS keine erhöhte Aktivierung von NF- κ B über dem Niveau der Kontrolle gemessen werden. Wurde zusätzlich zu TLR4 auch sein Cofaktor MD2 transfiziert, erhöht sich die gemessene Aktivierung von NF- κ B nach Stimulation mit LPS. Nach Stimulation mit *groEL*-1 tritt keine Aktivierung auf. Erfolgt die Transfektion mit TLR4 und beiden Cofaktoren tritt sowohl nach Stimulation mit *groEL*-1 als auch mit LPS eine deutliche NF- κ B-Aktivierung auf. Über MD2 und von CD14 ist eine Bindungsfähigkeit von LPS bekannt. Es wird angenommen, dass LPS an TLR4 in Anwesenheit von MD2 und CD14 als ein Tetramer-Komplex bindet (Silverman und Maniatis 2001). Im Falle von *groEL*-1 ist die gemeinsame Anwesenheit von TLR4, MD2 und CD14 zur Aktivierung erforderlich.

4 Diskussion

4.1 Bedeutung von *groEL-1* bei der Zielzellaktivierung

Die Bedeutung verschiedener chlamydialer Virulenzfaktoren für die Zielzellaktivierung und die durch die Infektion ausgelösten Signalkaskaden ist noch ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Nach der initialen Adhäsion an Heparansulfat-ähnliche Glykosaminoglykane (Wuppermann et al. 2001) folgt die Aufnahme der Chlamydien in die Wirtszelle. Mehrere Studien konnten demonstrieren, dass die durch Chlamydien vermittelte Zielzellaktivierung durch TLR2 und TLR4 und, intrazellulär, von nukleotidbindenden Oligomerisationsdomänen (NOD, nucleotide-binding oligomerization domain) vermittelt wird (Vabulas et al. 2001; Kol et al. 1999; Opitz et al. 2005).

In Untersuchungen zum Einfluss von potentiellen chlamydialen Virulenzfaktoren für die initiale Zielzellaktivierung wurden Chlamydien entweder mit ultraviolettem Licht inaktiviert (UV-Licht 254nm, 45 Minuten, UVC 500 UV Crosslinker-Lichtgerät, Hoefer, Holliston, USA) oder hitzeinaktiviert (95 °C, 30 Minuten, Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg). Hitzeinaktivierte Bakterien wurden zwar noch in sehr geringem Umfang von HUVEC internalisiert, aber konnten keine echte Infektion hervorrufen d.h. 72 Stunden post infectionem ließen sich im Gegensatz zur Infektion mit vitalen Chlamydien nach Anfärbung mit spezifischen Antikörpern keine Einschlüsse mittels Analyse durch konfokale Laserrastermikroskopie (Pascal 5 confocal laser-scanning microscope, CLSM, Zeiss, Jena) nachweisen (Krüll et al. 2004). UV-inaktivierte Chlamydien konnten in Bronchialepithelzellen (BEAS-2B, ATCC CRL-9609) weiterhin die Freisetzung von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierendem Faktor (GM-CSF) induzieren, während durch Hitze abgetötete Bakterien dies nicht vermochten (Krüll et al. 2006). Dies legt nahe, dass hitzeempfindliche Membranbestandteile der Chlamydien oder Hitzeschockproteine wie *chSP60* / *groEL-1* oder andere noch unentdeckte Virulenzfaktoren mögliche Kandidaten für die Zielzellaktivierung sind. Gleichzeitig lässt dies an chlamydialem Lipopolysaccharid (cLPS) und andere Strukturen mit großer Hitzeresistenz als Vermittler der Zielzellaktivierung zweifeln. Gegen cLPS als Initiator der Zielzellaktivierung durch *C. pneumoniae* spricht außerdem, dass Präinkubation von Chlamydien (TW183) mit Polymyxin B zur Inaktivierung des chlamydialen LPS keinen Effekt auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen und die Expression von GM-CSF durch Bronchialepithel hatte (Krüll et al. 2006).

In letzter Zeit gibt es mehrere Studien, die Hinweise dafür liefern, dass das Hitzeschockprotein 60 von Chlamydien als ein möglicher Mediator der Zielzellaktivierung fungiert. Durch die Verwendung von gereinigtem rekombinantem cHSP60 / *groEL*-1 von *C. pneumoniae* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zu einer dosisabhängigen Expression des Zytokins Interleukin 8 kommt. *groEL*-1 war dabei vergleichbar effektiv wie vitale oder UV-inaktivierte Chlamydien. Die Tatsache, dass die Gegenwart von monoklonalen Antikörpern (DAKO, Glostrup, Denmark) gegen Proteine des äußeren Membrankomplexes wie OmpA (outer membrane protein-A) die *C. pneumoniae*-vermittelte Freisetzung von GM-CSF aus Bronchialepithelzellen reduziert und cHSP60 / *groEL*-1 diese steigert, wurde so interpretiert, dass *groEL*-1 auf der Oberfläche der Elementarkörperchen unter Umständen teilweise durch die gegen OmpA gerichteten Antikörper verdeckt wird (Krüll et al. 2006). Denkbar ist, dass dies die Zielzellaktivierung durch das chlamydiale Hitzeschockprotein 60 behindert.

Die Versuche können nur Anhalt geben, da auf Grund begrenzter Ressourcen vor allem an *groEL*-1 nicht genügend viele Wiederholungen möglich waren um darüber hinausgehende definitive Aussagen zu treffen; grundsätzlich sind außerdem Dreifachwerte empfehlenswert, jedoch waren in der Regel bei begrenzten Ressourcen vor allem an *groEL*-1 nur Doppelwerte möglich. Die statistische Sicherheit ist deshalb reduziert.

4.2 Bedeutung von TLR2 und TLR4 in der *groEL*-1-vermittelten Zielzellaktivierung

Es konnte eine Abhängigkeit der NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation der HEK293 durch *groEL*-1 von der Anwesenheit, des zuvor transfizierten TLR2 und von TLR4 gezeigt werden. Im Falle von TLR4 kam es nur dann zu einer NF- κ B-Aktivierung, sofern zuvor sowohl MD2 als auch CD14 kotransfiziert wurden. Im Unterschied dazu fand nach Stimulation mit LPS die NF- κ B-Aktivierung bereits statt, wenn TLR4 mit MD2 allein kotransfiziert wurde, jedoch war die NF- κ B-Aktivierung bei Kotransfektion von MD2 und CD14 stärker.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege in durch *groEL-1* stimulierten HUVEC konnte gezeigt werden d.h. die MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK werden phosphoryliert und es findet eine Aktivierung/Translokation von NF- κ B statt. Durch Inhibition der MAP-Kinasen oder der Rho-Proteine wird diese reduziert. Die NF- κ B-Aktivierung könnte eine Schnittstelle zwischen den Signaltransduktionswegen der MAP-Kinasen und den Rho-Proteinen darstellen. Im Verlauf von Stunden kommt es zur vermehrten Expression von Interleukin-8, einem neutrophilen aktivierenden und chemotaktisch wirkenden Zytokin.

Die Stimulation mit *groEL-1* induziert eine starke Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege in Endothelzellen. Das Hitzeschockprotein *groEL-1* löst eine Kaskade von Prozessen aus, infolge derer Inflammation und Atherosklerose ausgelöst oder unterhalten oder unterstützt werden. Es spielt eine zentrale Rolle bei der Zielzellaktivierung und kommt als chlamydialer Virulenzfaktor in Betracht.

Diese Informationen helfen unser Verständnis von der Zielzellaktivierung und damit verbunden der Pathogenese einer durch die Infektion mit *C. pneumoniae* vermittelten Entzündung zu erweitern. Letztmöglich lassen sich daraus eventuell innovative Therapiestrategien etablieren.

5 Literaturverzeichnis

- Al-Younes, H. (2001). Characterization of vacuoles containing *Chlamydia pneumoniae* (synonym *Chlamydophila pneumoniae*) in human epithelial cells and the role of iron in the pathogen development. Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin: 150.
- Amann, R., N. Springer, et al. (1997). "Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to *Chlamydia* spp." *Appl Environ Microbiol* **63**(1): 115-121.
- Bartels, C., M. Maass, et al. (1999). "Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not cytomegalovirus in occluded saphenous vein coronary artery bypass grafts." *Circulation* **99**(7): 879-882.
- Beatty, W. L., G. I. Byrne, et al. (1993). "Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9): 3998-4002.
- Beatty, W. L., R. P. Morrison, et al. (1994). "Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis." *Microbiol Rev* **58**(4): 686-699.
- Böcker, W., H. Denk, et al. (2004). *Repetitorium Pathologie*. München, Germany, Elsevier;Urban & Fischer Verlag, München.
- Boutros, T., E. Chevet, et al. (2008). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer." *Pharmacol Rev* **60**(3): 261-310.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Byrne, G. I. and D. M. Ojcius (2004). "Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen." *Nat Rev Microbiol* **2**(10): 802-808.
- Campbell, L. A., E. R. O'Brien, et al. (1995). "Detection of *Chlamydia pneumoniae* TWAR in human coronary atherectomy tissues." *J Infect Dis* **172**(2): 585-588.
- Chen, L. F. and W. C. Greene (2004). "Shaping the nuclear action of NF- κ B." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(5): 392-401.
- Chi, E. Y., C. C. Kuo, et al. (1987). "Unique ultrastructure in the elementary body of *Chlamydia* sp. strain TWAR." *J Bacteriol* **169**(8): 3757-3763.

- Collingro, A. and M. Horn (2005). Chlamydien als Symbionten frei lebender Amöben. BIOspektrum. **11**: 393-394.
- Cox, R. L., C. C. Kuo, et al. (1988). "Deoxyribonucleic acid relatedness of Chlamydia sp. strain TWAR to Chlamydia trachomatis and Chlamydia psittaci." Int J Syst Bacteriol **38**: 265–268.
- Cybulsky, M. I. and M. A. Gimbrone, Jr. (1991). "Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis." Science **251**(4995): 788-791.
- Eaton, M. D., M. D. Beck, et al. (1941). "A Virus from Cases of Atypical Pneumonia : Relation to the Viruses of Meningopneumonitis and Psittacosis." J Exp Med **73**(5): 641-654.
- Everett, K. D. and A. A. Andersen (1999). "Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 2**: 803-813.
- Everett, K. D., R. M. Bush, et al. (1999). "Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 2**: 415-440.
- Fan, P., F. Dong, et al. (2002). "Chlamydia pneumoniae secretion of a protease-like activity factor for degrading host cell transcription factors required for [correction of factors is required for] major histocompatibility complex antigen expression." Infect Immun **70**(1): 345-349.
- Fritsche, T. R., M. Horn, et al. (2000). "Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of Acanthamoeba spp." Appl Environ Microbiol **66**(6): 2613-2619.
- Gabler-Sandberger, E. (2000). Blickpunkt Chlamydien. Stuttgart, Aesopus Verlag.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Grayston, J. T. and L. A. Campbell (1999). "The role of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis." Clin Infect Dis **28**(5): 993-994.
- Grayston, J. T., L. A. Campbell, et al. (1990). "A new respiratory tract pathogen: Chlamydia pneumoniae strain TWAR." J Infect Dis **161**(4): 618-625.

- Grayston, J. T., C. C. Kuo, et al. (1989). "Chlamydia pneumoniae sp. nov. for Chlamydia sp. strain TWAR." Int J Syst Bacteriol **39**: 88-90.
- Grayston, J. T., C. C. Kuo, et al. (1986). "A new Chlamydia psittaci strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections." N Engl J Med **315**(3): 161-168.
- Greub, G. (2010). "International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of the Chlamydiae: minutes of the closed meeting, 21 June 2010, Hof bei Salzburg, Austria." Int J Syst Evol Microbiol **60**(Pt 11): 2694.
- Greub, G. (2010). "International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of the Chlamydiae: minutes of the inaugural closed meeting, 21 March 2009, Little Rock, AR, USA." Int J Syst Evol Microbiol **60**(Pt 11): 2691-2693.
- Groskreutz, D. J., B. A. Sherf, et al. (1995). "Increased Expression and Convenience with the new pGL3 Luciferase Reporter Vectors." Promega Notes Magazine **50**: 2-6.
- Hale, K. K., D. Trollinger, et al. (1999). "Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages." J Immunol **162**(7): 4246-4252.
- Heuer, D. (2004). CPAF und Transferrin/ Transferrin Rezeptor als Modellproteine für die Interaktion der Chlamydien mit der Wirtszelle. Marburg, Germany, Philipps-Universität Marburg: 107.
- Hippenstiel, S., B. Schmeck, et al. (2002). "Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(4): L830-838.
- Hippenstiel, S., S. Soeth, et al. (2000). "Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells." Blood **95**(10): 3044-3051.
- Horn, M. (2010). Phylum XXIV. Chlamydiae Garrity and Holt 2001. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume four, The bacteroidetes, spirochaetes, tenericutes (mollicutes), acidobacteria, fibrobacteres, fusobacteria, dictyoglomi, gemmatimonadetes, lentisphaerae, verrucomicrobia, chlamydiae, and planctomycetes. New York, Springer.
- Horn, M., A. Collingro, et al. (2004). "Illuminating the evolutionary history of chlamydiae." Science **304**(5671): 728-730.

- Horn, M., M. Wagner, et al. (2000). "Neochlamydia hartmannellae gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba Hartmannella vermiformis." Microbiology **146 (Pt 5)**: 1231-1239.
- Huang, Q. and R. M. Pope (2010). "Toll-like receptor signaling: a potential link among rheumatoid arthritis, systemic lupus, and atherosclerosis." J Leukoc Biol **88(2)**: 253-262.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2010). "Regulation of adaptive immunity by the innate immune system." Science **327(5963)**: 291-295.
- Jaffe, E. A. (1984). Culture and Identification of large vessel endothelial cells. In: Biology of endothelial cells. Boston Hingham, MA, U.S.A., Martinus Nijhoff Publishers ; Distributors for the United States and Canada, Kluwer Boston.
- Jaffe, E. A., R. L. Nachman, et al. (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." J Clin Invest **52(11)**: 2745-2756.
- Jantos, C. A., C. Krombach, et al. (2000). "Antibody response to the 60-kDa heat-shock protein of Chlamydia pneumoniae in patients with coronary artery disease." J Infect Dis **181(5)**: 1700-1705.
- Kahane, S., K. D. Everett, et al. (1999). "Simkania negevensis strain ZT: growth, antigenic and genome characteristics." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 2**: 815-820.
- Kahane, S., R. Gonen, et al. (1993). "Description and partial characterization of a new Chlamydia-like microorganism." FEMS Microbiol Lett **109(2-3)**: 329-333.
- Kahane, S., D. Greenberg, et al. (1998). "High prevalence of "Simkania Z," a novel Chlamydia-like bacterium, in infants with acute bronchiolitis." J Infect Dis **177(5)**: 1425-1429.
- Kirschning, C. J., H. Wesche, et al. (1998). "Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide." J Exp Med **188(11)**: 2091-2097.
- Klucken, A. C. (2008). Chlamydophila pneumoniae – induzierte Aktivierung humaner Endothelzellen. Berlin, Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin: 126.
- Koehler, L., E. Nettelbreker, et al. (1997). "Ultrastructural and molecular analyses of the persistence of Chlamydia trachomatis (serovar K) in human monocytes." Microb Pathog **22(3)**: 133-142.

- Kol, A., T. Bourcier, et al. (1999). "Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages." J Clin Invest **103**(4): 571-577.
- Kol, A., G. K. Sukhova, et al. (1998). "Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression." Circulation **98**(4): 300-307.
- Krüll, M. (2000). Escherichia coli Hämolysin und Staphylococcus aureus alpha-Toxin fördern Rollen und Adhäsion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen durch Induktion von Adhäsionsmolekülen. Berlin, Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin: 34-40.
- Krull, M., P. Bockstaller, et al. (2006). "Mechanisms of Chlamydia pneumoniae-mediated GM-CSF release in human bronchial epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **34**(3): 375-382.
- Krull, M., A. C. Klucken, et al. (1999). "Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with Chlamydia pneumoniae." J Immunol **162**(8): 4834-4841.
- Krull, M., J. Kramp, et al. (2004). "Differences in cell activation by Chlamydia pneumoniae and Chlamydia trachomatis infection in human endothelial cells." Infect Immun **72**(11): 6615-6621.
- Krull, M., M. Maass, et al. (2005). "Chlamydia pneumoniae. Mechanisms of target cell infection and activation." Thromb Haemost **94**(2): 319-326.
- Kuo, C.-C. and R. S. Stephens (2010). Family I. Chlamydiaceae. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume four, The bacteroidetes, spirochaetes, tenericutes (mollicutes), acidobacteria, fibrobacteres, fusobacteria, dictyoglomi, gemmatimonadetes, lentisphaerae, verrucomicrobia, chlamydiae, and planctomycetes. New York, Springer.
- Kuo, C. C., H. H. Chen, et al. (1986). "Identification of a new group of Chlamydia psittaci strains called TWAR." J Clin Microbiol **24**(6): 1034-1037.
- Kuo, C. C., J. T. Grayston, et al. (1995). "Chlamydia pneumoniae (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old)." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 6911-6914.
- Kuo, C. C., L. A. Jackson, et al. (1995). "Chlamydia pneumoniae (TWAR)." Clin Microbiol Rev **8**(4): 451-461.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- LaVerda, D., M. V. Kalayoglu, et al. (1999). "Chlamydial heat shock proteins and disease pathology: new paradigms for old problems?" Infect Dis Obstet Gynecol **7**(1-2): 64-71.
- Lindquist, S. and E. A. Craig (1988). "The heat-shock proteins." Annu Rev Genet **22**: 631-677.
- Maass, M., C. Bartels, et al. (1998). "Endovascular presence of viable *Chlamydia pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease." J Am Coll Cardiol **31**(4): 827-832.
- Maass, M., A. Essig, et al. (1993). "Growth in serum-free medium improves isolation of *Chlamydia pneumoniae*." J Clin Microbiol **31**(11): 3050-3052.
- Maass, M. and J. Gieffers (1996). "Prominent serological response to *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular disease." Immunol Infect Dis **6**: 65-70.
- Mawhorter, S. D. and M. A. Lauer (2001). "Is atherosclerosis an infectious disease?" Cleve Clin J Med **68**(5): 449-458.
- Mempel, M., V. Voelcker, et al. (2003). "Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor κ B controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent." J Invest Dermatol **121**(6): 1389-1396.
- Mielke, M. (2004). Pneumotrope Chlamydien: *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pneumoniae*. In: Infektionskrankheiten: verstehen, erkennen, behandeln. Stuttgart; New York, Georg Thieme Verlag
- Moore, A. E., L. Sabachewsky, et al. (1955). "Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells." Cancer Res **15**(9): 598-602.
- Mordhorst, C. H., S. P. Wang, et al. (1990). *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, infections in Denmark 1975-1987. In: Chlamydial infections : proceedings of the Seventh International Symposium on Human Chlamydial Infections, Harrison Hot Springs, British Columbia, Canada, 24-29 June 1990. Cambridge ; New York, Cambridge University Press.
- Moulder, J. W. (1991). "Interaction of chlamydiae and host cells in vitro." Microbiol Rev **55**(1): 143-190.

- Muhlestein, J. B., E. H. Hammond, et al. (1996). "Increased incidence of Chlamydia species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease." J Am Coll Cardiol **27**(7): 1555-1561.
- Murthy, A. K., M. N. Guentzel, et al. (2009). "Chlamydial protease-like activity factor--insights into immunity and vaccine development." J Reprod Immunol **83**(1-2): 179-184.
- N'Guessan, P. D., S. Hippenstiel, et al. (2006). "Streptococcus pneumoniae induced p38 MAPK- and NF- κ B-dependent COX-2 expression in human lung epithelium." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(6): L1131-1138.
- O'Brien, K. D., T. O. McDonald, et al. (1996). "Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content." Circulation **93**(4): 672-682.
- Opitz, B., S. Forster, et al. (2005). "Nod1-mediated endothelial cell activation by Chlamydia pneumoniae." Circ Res **96**(3): 319-326.
- Opitz, B., N. W. Schroder, et al. (2001). "Toll-like receptor-2 mediates Treponema glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF- κ B translocation." J Biol Chem **276**(25): 22041-22047.
- Palm, N. W. and R. Medzhitov (2009). "Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity." Immunol Rev **227**(1): 221-233.
- Pollmann, M. (2005). Einfluss eines probiotischen Enterococcus faecium auf die natürliche Infektionsrate von Chlamydien beim Schwein. Berlin, Freie Universität Berlin: 90.
- Pramanik, R., X. Qi, et al. (2003). "p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun. The determinant roles of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity." J Biol Chem **278**(7): 4831-4839.
- Ripa, K. T. and P. A. Mardh (1977). "Cultivation of Chlamydia trachomatis in cycloheximide-treated McCoy cells." J Clin Microbiol **6**(4): 328-331.
- RKI. (2010). "Chlamydiosen: Erkrankungen durch Chlamydia psittaci, Chlamydia pneumoniae und Simkania negevensis." Epidemiologisches Bulletin 9/2010. from www.rki.de.
- Ross, R. (1986). "The pathogenesis of atherosclerosis--an update." N Engl J Med **314**(8): 488-500.

- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." Nature **362**(6423): 801-809.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.
- Rosseau, S., H. Schütte, et al. (2004). Infektionen des Respirationstraktes. In: Infektionskrankheiten : verstehen, erkennen, behandeln. Stuttgart; New York, Georg Thieme Verlag.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 320-344.
- Rühle, H.-J. (2011). "Robert Koch-Institut lenkt Aufmerksamkeit auf Chlamydien." Chlamydia news 80/2011. from www.medac.de.
- Rurangirwa, F. R., P. M. Dilbeck, et al. (1999). "Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of Waddliaceae fam. nov., Waddlia chondrophila gen. nov., sp. nov." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 2**: 577-581.
- Saikku, P. (1995). Chronic Chlamydia pneumoniae infections. In: Chlamydia pneumoniae infection. Berlin ; New York, Springer.
- Saikku, P. (2000). Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis. In: Chlamydia Pneumoniae and Chronic Diseases: Proceedings of the State-Of-The-Art Workshop, Held at the Robert Koch-Institut Berlin, on 19 and 20 March 1999. Berlin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Saikku, P., M. Leinonen, et al. (1988). "Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction." Lancet **2**(8618): 983-986.
- Saikku, P., M. Leinonen, et al. (1992). "Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study." Ann Intern Med **116**(4): 273-278.
- Saikku, P., S. P. Wang, et al. (1985). "An epidemic of mild pneumonia due to an unusual strain of Chlamydia psittaci." J Infect Dis **151**(5): 832-839.
- Schachter, J. and H. D. Caldwell (1980). "Chlamydiae." Annu Rev Microbiol **34**: 285-309.

- Schachter, J., R. S. Stephens, et al. (2001). "Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet." Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 1): 249; author reply 251-243.
- Schautteet, K. and D. Vanrompay (2011). "Chlamydiaceae infections in pig." Vet Res **42**(1): 29.
- Schmeck, B., S. Huber, et al. (2006). "Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF- κ B-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(4): L730-L737.
- Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences." Cell **46**(5): 705-716.
- Shor, A., C. C. Kuo, et al. (1992). "Detection of Chlamydia pneumoniae in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques." S Afr Med J **82**(3): 158-161.
- Silverman, N. and T. Maniatis (2001). "NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity." Genes Dev **15**(18): 2321-2342.
- Stephens, R. S., G. Myers, et al. (2009). "Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved." FEMS Immunol Med Microbiol **55**(2): 115-119.
- Stratton, C. W. (2000). Association of Chlamydia pneumoniae with Chronic Human Diseases. Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter, Elsevier Science Inc., New York. **18**: 49-56.
- Szcepek, A. J. (2004). Die Geheimnisse der Chlamydiales. BIOspektrum Sonderausgabe; Spezial-Heft: Proteomics in Molekularer Medizin - Neue Trends & Technologien. **10**: 520-521.
- Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, et al. (2001). "Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells." J Biol Chem **276**(33): 31332-31339.
- Wang, S. P. and J. T. Grayston (1990). Population prevalence antibody to Chlamydia pneumoniae, strain TWAR. In: Chlamydial infections : proceedings of the Seventh International Symposium on Human Chlamydial Infections, Harrison Hot Springs, British Columbia, Canada, 24-29 June 1990. Cambridge ; New York, Cambridge University Press.
- Watson, C. and N. J. Alp (2008). "Role of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis." Clin Sci (Lond) **114**(8): 509-531.

- Wuppermann, F. N., J. H. Hegemann, et al. (2001). "Heparan sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*." J Infect Dis **184**(2): 181-187.
- Zhong, G., P. Fan, et al. (2001). "Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors." J Exp Med **193**(8): 935-942.

6 Anhang

6.1 Publikationsverzeichnis

Ausgewählte Publikationen und Kongressbeiträge

Zielzellaktivierung durch chlamydiales Hitzeschockprotein *groEL*-1

Christian Scheiber, Frederik N. Wuppermann, Johannes H. Hegemann, Norbert Suttorp, Matthias Krüll

2. Deutscher Chlamydienworkshop, Berlin, März 2004.

Signal transduction pathways activated in endothelial cells following stimulation with the 60-kDa heat-shock protein of *Chlamydomonas pneumoniae groEL*-1

Christian Scheiber, Frederik N. Wuppermann, Johannes H. Hegemann, Norbert Suttorp and Matthias Krüll

5th Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Budapest, Sept 1-4 2004.

Abstract published in "Proceedings of the 5th Meeting of the European Society for Chlamydia Research", Budapest, September 2004.

***Chlamydomonas pneumoniae* heat shock protein-60 mediated target cell activation**

Krüll, M., F. N. Wuppermann, C. Scheiber, J. Kramp, J. Seybold, J. Mühling, M. Maass, J. H. Hegemann, N. Suttorp, and S. Hippenstiel

Infect. Immun. In reply. 2006.

Cochlear Implant beim Noonan-Syndrom

Christian Scheiber, Anke Hirschfelder, Stephan Gräbel, Heidi Olze

79. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V. 30.04. bis 04.05.2008, Bonn.

Untersuchung der Lebensqualität und des Sprachverstehens erwachsener CI-Träger nach ein- und beidseitiger CI-Versorgung

Heidi Olze, Stefan Graebel, Christian Scheiber, Anke Hirschfelder

79. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V. 30.04. bis 04.05.2008, Bonn.

Vergleich der präoperativen elektrisch evozierten Amplitude Modulation Following Response mit der intraoperativen Neural Response Telemetry bei

Patienten mit bilateraler Cochlear Implant-Versorgung

Anke Hirschfelder, Stefan Gräbel, Christian Scheiber, Heidi Olze

79. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V. 30.04. bis 04.05.2008, Bonn.

Bilateral cochlear implantation in children with Noonan syndrome

Scheiber C, Hirschfelder A, Gräbel S, Peters H, Olze H

Int J Pediatr Otorhinolaryngol., Volume 73, Issue 6, Pages 889-894, 2009 Jun; Epub 2009 Mar 19.

Etablierung eines objektiven, nichtinvasiven Hörnervenfunktionstests vor Cochlear Implant-Operation – Vergleich mit subjektivem Test und Neural Response Telemetry

Anke Hirschfelder, Stefan Gräbel, Christian Scheiber, Heidi Olze

80. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V. 20.05. - 24.05.2009, Rostock.

Titelthema: 'Kommunikation bei Mehrfachbehinderung'

Bilaterale Cochlea-Implantat-Versorgung bei Noonan-Syndrom

Christian Scheiber, Priv.-Doz. Dr. Heidi Olze

Schnecke – Leben mit CI & Hörgerät, Nr. 64 – Mai 2009 – 19. Jahrgang.

Evaluation of a novel, noninvasive, objective test of auditory nerve function in cochlear implant candidates.

Gräbel S, Hirschfelder A, Scheiber C, Olze H.

Otol Neurotol., Volume 30, Issue 6, Pages 716-724, 2009 Sep.

Evaluation of a novel, noninvasive, objective test of auditory nerve function in paediatric cochlear implant candidates.

Hirschfelder A, Gräbel S, Scheiber CH, Olze H.

Cochlear Implants Int., Volume 11, Suppl 1, Pages 421-425, 2010 Jun.

Endonasale Evaluierung der Verfügbarkeit und der Praktikabilität des Laser-Endoskops

Christian Scheiber, Martin Khan, Bartosz Kosmecki, Erwin Keeve, Heidi Olze

82. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V. 01.06. - 05.06.2011, Freiburg.

Nasale Provokationen mit ASS bei Patienten mit einer Samter Trias:

Untersuchung der individuellen ASS-Provokationsschwelle

Christian Scheiber, Ulrike Förster, Heidi Olze

84th Annual Meeting of the German Society of Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery. 08.05. - 12.05.2013, Nürnberg.

Akzelerierte Expression der Samter- Trias im Kindes- und Jugendalter

U. Förster-Ruhrmann, C. Scheiber, S. Lau, D. Schäfer, H. Kirsche, A.J. Szczepek, H. Olze

Allergologie, Jahrgang 37, Nr. 1/2014, S. 4–10, 2014.

6.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. N. Suttorp.

In höchstem Maße bin ich Herrn Privatdozent Dr. med. M. Krüll dankbar.

Ich bin allen Vorgesetzten, Mitarbeitern und Mitstreitern im Labor der Klinik sehr dankbar.

6.3 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

6.4 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Christian Scheiber, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Bedeutung des Hitzeschockproteins cHsp60, *groEL-1* von *Chlamydomophila pneumoniae* für die Aktivierung humaner Endothelzellen selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift