

Aus der Medizinischen Klinik für Infektiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Chlamydophila pneumoniae – induzierte Aktivierung humaner
Endothelzellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andrea C. Klucken

aus Duisburg

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. M. Krüll
2. Prof. Dr. med. R.R. Schumann
3. Priv.-Doz. Dr. J. Rupp

Datum der Promotion: 10. November 2008

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	6
1.1. Überblick	6
1.2. Arteriosklerose	7
1.2.1. Ätiologie	7
1.2.2. Morphologische Veränderungen	8
1.2.3. Pathogenese	9
1.2.3.1. Funktion der Endothelzellen bei der Entwicklung der Arteriosklerose	10
1.2.3.3.1. Selektine	11
1.2.3.3.2. Immunglobulin-Gensuperfamilie	12
1.2.3.3.3. Integrine	13
1.2.3.2. Physiologie der Leukozyten-Endothel-Interaktionen	15
1.2.3.2.1 Margination	15
1.2.3.2.2. Rollen	16
1.2.3.2.3. Adäsion	17
1.2.3.2.4. Transmigration	18
1.2.3.3. Funktion der Adhäsionsmoleküle im Rahmen arteriosklerotischer Prozesse	18
1.2.3.4. Chemokine und Arteriosklerose	19
1.3. Chlamydien	20
1.3.1. Terminologie	20
1.3.2. Entwicklung	21
1.3.2.1. Entwicklungszyklus	22
1.3.2.2. Kinetik der Anheftung und Aufnahme	23
1.3.2.3. Intrazelluläre Entwicklung	24
1.3.2.4. Einleitung der Replikation	25
1.3.2.5. Freisetzung	26
1.3.2.6. Entwicklung persistierender Erregerformen	26
1.3.3. Virulenzfaktoren von Chlamydien	28
1.3.3.1. Hitzeschock Proteine	28
1.3.3.2. Typ-III-Sekretions-Apparat	28
1.3.3.3. Chlamydiales Lipopolysaccharid, cLPS	29
1.3.4. <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	30
1.3.4.1. Epidemiologie	31
1.3.4.2. Pulmonale Infektionen	31
1.3.4.3. Diagnostik	33
1.3.4.4. Assoziation zur Pathogenese der Arteriosklerose	33
1.3.4.4.1. Seroepidemiologische Studien	33
1.3.4.4.2. Immunhistochemischer und molekularbiologischer Nachweis von <i>C. pneumoniae</i> in arteriosklerotisch veränderten Gefäßarealen	34
1.3.4.4.3. Isolation von lebenden <i>C. pneumoniae</i>	36
1.3.4.4.4. Tierexperimentelle Ansätze/Infektionsstudien	36
1.3.4.4.5. Interventionsstudien	37
1.4. Problemstellung	38
2. METHODEN	38
2.1. Zellen/Zellkultur	38
2.1.1. Humane Endothelzellen	38
2.1.1.1. Isolation humaner Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC)	38
2.1.1.2. Splitten von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC)	39
2.1.1.3. Charakterisierung	39

2.2.2. Humane Leukozyten / Leukozytenzelllinien	40
2.2.2.1. Humane polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)	40
2.2.2.1.1. Isolation von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten	40
2.2.2.1.2. Charakterisierung	41
2.2.2.2. Humane Monozyten	41
2.2.2.2.1. Isolierung humaner Monozyten	41
2.2.2.2.2. Charakterisierung der humanen Monozyten	42
2.2.2.3. Kultur der Monozytenzelllinie Mono Mac 6 (MM6)	42
2.3. Infektionsassay	43
2.3.1. Chlamydienstamm	43
2.3.2. Infektion der HUVEC	43
2.3.3. Bestimmung der Infektiosität	43
2.4. Immunzytochemie	44
2.4.1. Cell- Surface- ELISA	45
2.4.2. Zytokin - ELISA aus den Zellüberständen	45
2.4.2.1. Interleukin-8-ELISA	46
2.4.2.2. MCP-1-, RANTES- und von-Willebrandt-Faktor-ELISA	46
2.4.3. Immunfluoreszenzmikroskopie	47
2.5. Funktionelle Versuche	47
2.5.1. Adhäsionsassay unter statischen Bedingungen	47
2.5.1.1. Markierung mit BCECF-AM	48
2.5.1.2. Versuchsaufbau	48
2.5.2. Adhäsionsversuch unter dynamischen Bedingungen	48
2.5.2.1. Aufbau	49
2.5.2.2. Physikalische Grundlagen	50
2.5.2.3. Messung	51
2.5.2.4. Vorbehandlung der Zellen	51
2.5.2.5. "Rollen" unter dynamischen Bedingungen	52
2.5.2.6. Adhäsion unter dynamischen Bedingungen	52
2.5.3. Transmigrationsassay	52
2.6. Molekularbiologische Assays	53
2.6.1. NF- κ B-Reporter-Gen-Assay (Prinzip)	53
2.6.1.1. Transiente Transfektion humaner Endothelzellen	54
2.6.1.2. Messung der NF- κ B-Aktivierung durch Luziferase-Aktivität	55
2.6.2. Untersuchung der DNA-Protein-Wechselwirkung mittels Gel-Retentionsanalyse („EMSA“)	55
2.6.2.1. Gewinnung von Zellkernproteinen	56
2.6.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration – Bradford-Test	56
2.6.2.3. Radioaktives Markieren von Oligonukleotiden: End-Labeling	57
2.6.2.4. Gel-Retentionsanalyse	57
2.6.3. Northern Blot	57
2.6.3.1. RNA-Isolierung	58
2.6.3.2. Random-Priming von DNA-Sonden	58
2.6.3.3. RNA-Transfer auf Nylon-Membranen	58
2.6.3.4. Hybridisierung der Filter	59
2.6.3.5. RNA Quantifizierung	59
2.7. Statistische Auswertung	60

3. ERGEBNISSE	62
3.1. <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> infiziert humane umbilikalvenöse Endothelzellen und humane aortale Endothelzellen	62
3.2. <i>C. pneumoniae</i>- induzierte Leukozyten- Endothelzell-Interaktionen	63
3.2.1. Monozyten- “Rolling” über infizierte Endothelzellen	63
3.2.2. <i>C. pneumoniae</i> induziert leukozytäre Adhäsion an endothelialen Monolayern	65
3.2.2.1. Modifikation der <i>C. pneumoniae</i> -induzierten Adhäsion durch monoklonale Antikörper gegen endotheliale Adhäsionsmoleküle	66
3.2.2.2. Modifikation der <i>C. pneumoniae</i> -induzierten Adhäsion durch monoklonale Antikörper gegen leukozytäre Adhäsionsmoleküle	68
3.2.3. Transmigration von Leukozyten durch <i>C. pneumoniae</i> -infizierte endotheliale Monolayer	70
3.3. <i>C. pneumoniae</i>-induzierte Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen	73
3.3.1. Cell-Surface-ELISA	73
3.3.2. Immunfluoreszenz	75
3.4. Expression endothelialer Chemokine	76
3.5. Molekularbiologische Untersuchung an <i>C. pneumoniae</i>-infizierten Endothelzellen	78
3.5.1. Die Rolle von NF- κ B in <i>C. pneumoniae</i> -mediierter Endothelzell-Aktivierung	78
3.5.2. Northern Blot – Analyse	81
4. DISKUSSION	83
4.1. Infektion humaner Endothelzellen mit <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	83
4.2. Ausbildung eines proatherogenen Phänotyps in den <i>C. pneumoniae</i>-infizierten Endothelzellen	84
4.2.1. Bedeutung endothelialer und leukozytärer Adhäsionsmoleküle	85
4.2.2. <i>C. pneumoniae</i> -induzierte Signaltransduktionsmechanismen in Endothelzellen	87
4.3. <i>C. pneumoniae</i> und Arteriosklerose	88
5. ZUSAMMENFASSUNG	92
6. REFERENZVERZEICHNIS	94
7. ANHANG	111
7.1. Verwendete Materialien	111
7.1.1. Verwendete Reagenzien	111
7.1.2. Verwendete Zellkulturmaterialien	113
7.1.3. Verwendete Puffer und Medien	114
7.1.3.1. Herstellung der Leukozyten-Medien	116
7.1.4. Verwendete monoklonale Antikörper (mAk)	118
7.1.4.1. Monoklonale Antikörper gegen Antigene humaner Endothelzellen	118
7.1.4.2. Monoklonale Antikörper gegen Antigene humaner Leukozyten	118
7.1.5. Plasmide	119
7.1.6. PCR-Primerpaare	119
7.1.7. DNA-Sonden und Oligonukleotide	120
7.1.8. Zusammensetzung der Gele	120

7.2. Abkürzungsverzeichnis	121
8. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	123
8.1. Originalarbeiten	123
8.2. Veröffentlichte Vorträge	123
8.3. Abstracts	123
8.4. Buchbeiträge	124
9. ERKLÄRUNG	125
10. DANKSAGUNG	126

1. Einleitung

1.1. Überblick

Die Arteriosklerose (syn. „Atherosklerose“, „Arterienverkalkung“) als pathohistologisches Korrelat für das Auftreten von koronarer Herzerkrankung, akutem Myokardinfarkt (AMI), Schlaganfall, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und Aneurysma-Bildung ist heute in den sog. zivilisierten Ländern die häufigste Todesursache ⁽¹⁾. Die Weltgesundheitsorganisation, WHO, definiert die Arteriosklerose als komplexe Veränderungen der Gefäßintima mittlerer und großer Arterien, einhergehend mit einer lokalen Anhäufung von Lipiden, Blut und Blutbestandteilen sowie der Bildung eines fibrinösen Gewebes mit Kalkablagerungen. Verschiedene beeinflussbare und nicht beeinflussbare Risikofaktoren (s.u.) werden in Zusammenhang mit dem vermehrten Auftreten atheromatöser Plaques gebracht, das Vorliegen eines oder mehrerer dieser Risikofaktoren ist hierfür jedoch keine notwendige Voraussetzung.

Die Pathogenese der Arteriosklerose ist bis heute weder vollständig noch eindeutig geklärt. Ging man lange Zeit davon aus, dass vor allem Störungen im Lipidstoffwechsel (erhöhtes Plasma-Cholesterin, vor allem „Low-density lipoprotein“/LDL-Cholesterin) maßgeblich für die Entwicklung atherosklerotischer Prozesse verantwortlich sind, so ist mittlerweile unbestritten, dass bei der Entstehung der atheromatösen Plaques eine Vielzahl weiterer, zum Teil hochspezifischer zellulärer und molekularer Mechanismen ablaufen, welche die Arteriosklerose als eine (chronisch) entzündliche Erkrankung, ausgehend von der Intima und dem Gefäßendothel definieren („response-to-injury“ Theorie) ^(2;3).

Verschiedene Studien der letzten Zeit weisen darauf hin, dass eine rezidivierende oder chronische/persistierende Infektion mit verschiedenen Keimen, vor allem jedoch mit *Chlamydomphila pneumoniae* eine Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose und der Arteriothrombose spielen kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Interaktion von *C. pneumoniae* und humanen Endothelzellen auf zellulärer und subzellulärer Ebene zu untersuchen, und mögliche Chlamydien-assoziierte Mechanismen der Zielzellaktivierung im Sinne eines proatherogenen Phänotyps zu erarbeiten. Die Ergebnisse sollen den Weg für weiterführende Studien im Rahmen der Infektionsstese bahnen.

1.2. Arteriosklerose

Bei der Arteriosklerose handelt es sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung der Intima arterieller Gefäße. Die pathophysiologischen Abläufe sind vergleichbar mit denen anderer chronisch entzündlicher Prozesse. Die Begriffe „Atherosklerose“ und „Arteriosklerose“ werden synonym gebraucht.

Arteriosklerotische Veränderungen der Gefäßwände lassen sich bereits bei Kindern und Jugendlichen nachweisen. Sie entwickeln sich mit unterschiedlicher Dynamik (rapid progredient, in Schüben oder chronisch), im Allgemeinen jedoch progredient über Jahrzehnte hinweg. Die klinische Manifestation der Arteriosklerose in Form der koronaren Herzkrankheit (KHK), dem ischämischen Hirninfarkt, der Aneurysma-Bildung und der peripheren Verschlusskrankheit ereilt vor allem Menschen im mittleren bis höheren Lebensalter.

1.2.1. Ätiologie

Verschiedene Faktoren scheinen zur Entstehung und Progression der Arteriosklerose beizutragen. Diese Faktoren interagieren auf unterschiedliche Weise. Sie können unterteilt werden in Faktoren mit einer endogenen, genetischen-bedingten Komponente und Faktoren, die durch äußere Einflüsse bedingt sind:

Endogene Faktoren:	Referenz:
Erhöhte LDL/VLDL Konzentrationen	Assmann G. et al, Arterioscl.Thromb.Vasc. Biol., 1999 ⁽⁴⁾
Erniedrigte HDL-Konzentrationen	Gordon D et al, 1989,N Engl J Med ⁽⁵⁾
Erhöhtes Lipoprotein (a)	Kronenberg F et al, 1999, Circ ⁽⁶⁾
Arterielle Hypertonie	Assmann et al, 1999 ⁽⁷⁾
Erhöhte Homocystein-Konzentration	Gerhard GT, 1999, Curr Opin Lipidol ⁽⁸⁾
Familiäre Disposition	Goldbourt U et al, 1988 Arteriosclerosis ⁽⁹⁾
Diabetes und Fettsucht	Assmann et al, 1999 ⁽⁷⁾
Hohe Konzentration an Gerinnungsfaktoren	Assmann et al, 1999 ⁽⁷⁾
Depression	Glassman AH et al, 1998, Psych ⁽¹⁰⁾
Männliches Geschlecht	Nathan L et al, 1997, Ann Rev pharm tox ⁽¹¹⁾
Systemische Inflammation	Kugiyama K et al, 1999, Circ ⁽¹²⁾

Erworbene Faktoren	Referenzen
Fetteiche Ernährung	Assmann et al, 1999 (⁷)
Rauchen	Petro R et al Lancet 1992
Inaktivität	Assmann et al, 1999 (⁷)
Infektiöse Agentien	Campbell LA , Trends Microbiol 2000 (¹³); Fong IW, J Clin Microbiol 1997 (¹⁴); Laitinen K, Infect Immun, 1997 (¹⁵)

Tab. 1: Modifiziert nach Aldons J.Lusis, Nature, Vol 407, 2000 (¹⁶)

Die traditionellen Risikofaktoren wie genetische Veranlagung, Rauchen, arterielle Hypertension und erhöhte Cholesterolverwerte können nur in ca. 50% der Fälle mit dem vermehrten Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden (^{17;18}). Daher sind weiterführende Untersuchungen im Hinblick auf andere unabhängige Risikofaktoren nötig.

1.2.2. Morphologische Veränderungen

Histomorphologisch ist die Arteriosklerose durch eine Akkumulation von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Kalziumablagerungen, fibrinösem Gewebe, Cholesterol-gesättigten Makrophagen, Lymphozyten, Thrombozyten und Zelldetritus in den Gefäßwänden mittlerer und großer, elastischer und muskulöser Arterien gekennzeichnet.

Lichtmikroskopisch lässt sich das Ausmaß der atherosklerotischen Veränderungen in verschiedene Stadien einteilen (nach Sary HC, (¹⁹⁻²¹):

Typ-I-Läsion: Die früheste, lichtmikroskopisch erfaßbare Veränderung ist die initiale Läsion oder Typ-I-Läsion nach Sary. Sie geht mit einer Akkumulation von Makrophagen im subendothelialen Raum einher.

Typ-II-Läsion: In der Typ-II-Läsion, den "fatty streaks", lässt sich die Ausbildung von so genannten Schaumzellbeeten aus Cholesterol-gesättigten Makrophagen nachweisen.

Typ-III-Läsion: Eine zusätzliche Anreicherung von Lipiden kennzeichnet das Präatherom oder die Typ-III-Läsion.

Typ-IV-Läsion: Das Konfluieren des Lipidpools zu einem lipidreichen Kern ist das Kriterium für die Typ-IV-Läsion, dem Atherom. Sie gehört schon zu den fortgeschrittenen Läsionen.

Typ-V-Läsion: Das Fibroatherom. Hier bildet sich über dem Atheromkern eine fibröse Kappe. Das Fibroatherom ist die Ausgangssituation für eine thrombohämorrhagische Komplikation, der Typ-VI-Läsion.

Typ-VI-Läsion: Diese entsteht in der Regel durch einen Einriss der fibrösen Kapsel. Die häufigste Konsequenz einer solchen “plaque disruption” ist der thrombotische Verschluss einer Arterie. Ebenso kann eine Einblutung in eine Läsion und/oder ein Vasospasmus zu einer plötzlichen Behinderung des Blutflusses und damit zu einem akuten Koronarsyndrom (nicht nur in den Koronararterien) führen ⁽²²⁾.

Weiterhin wird eine kalzifizierte Läsion (Typ-VII-Läsion) von einer fibrotischen Läsion (Typ-VIII-Läsion) unterschieden, wobei das jeweilige Adjektiv den vorherrschenden Typ beschreibt.

1.2.3. Pathogenese

Am Anfang des Prozesses steht die Läsion bzw. Denudation des Endothels, die im Sinne der “response-to-injury-Theory” (Ross R ^(23;24)) als Auslöser für die nachfolgende Entzündungsreaktion an der Gefäßwand angesehen wird. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Permeabilität und Aktivierung des Endothels. Die Folge ist eine vermehrte Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten - speziell Monozyten und T-Lymphozyten - sowie von Lipiden in den subendothelialen Raum.

Atherosklerotische Veränderungen lassen sich vor allem proximal und distal der Aufzweigungen sowie der (großen) Kurvaturen des arteriellen System nachweisen, also in Bereichen mit vermindertem Fluss, Verwirbelung, Stagnation und Rezirkulation des Blutes ⁽²⁵⁾. Durch die Aufhebung der laminaren Strömung ergibt sich in diesen Bereichen ein vermehrter Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Diese Leukozyten-Endothelinteraktion wird durch die lokale Bildung von Entzündungsmediatoren sowie die Aktivierung der Endothelzellen im Bereich des entzündeten Areal unterstützt. Dies führt zu einer verstärkten Leukozytenrekrutierung und -anbindung an das Endothel (“Tethering”, d.h. Anbindung ohne Aktivierung). Nachfolgend beobachtet man eine kontinuierliche teils parakrine Aktivierung der beteiligten Zellen mittels Zelltyp-spezifischer Zytokine, Chemokine oder Chemoattraktanten. In der letzten Phase dieser Kaskade transmigrieren dann adhärente Leukozyten durch die interendothelialen Spalten in die subendotheliale Matrix und bilden hier damit den Boden einer atherosklerotischen Läsion.

Die möglichen Ursachen einer primären Endothelläsion sind bis jetzt nicht eindeutig geklärt. Diskutiert werden unter anderem eine Anhäufung von oxidativ oder enzymatisch modifiziertem LDL, welches sich aus der Blutstrombahn in den subendothelialen Raum einlagert ⁽²⁶⁻²⁸⁾. Weiterhin werden als Auslöser Infektionen mit verschiedenen Mikroorganismen postuliert ⁽²⁹⁾.

Im Rahmen der Pathogenese der Arteriosklerose werden durch die Freisetzung chemotaktisch wirksamer Mediatoren aus den Endothelzellen Leukozyten, vor allem Monozyten und Memory-T-Lymphozyten (³⁰) rekrutiert. Makrophagen spielen eine Schlüsselrolle in allen Phasen der Atherogenese (^{23;31}). Sie „agieren“ als „Scavenger-Zelle“ um potentiell toxische/schädigende Substanzen zu entfernen, als Antigen-präsentierende Zellen um rekrutierte T-Lymphozyten zu aktivieren, und steuern über die Freisetzung verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren (GM-CSF, IL-8, MCP-1, RANTES u.v.m.) aktiv die Entzündungsreaktion. Die Anwesenheit einer Vielzahl immunkompetenter Zellen (T-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Mastzellen), sowie hohe Spiegel von Immunglobulinen und Komplementfaktoren und eine vermehrte Expression von Major Histocompatibility Complex Class II (MHC ClassII) auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen zeigt, dass bei der Artherogenese komplexe inflammatorische und immunologische Mechanismen aktiviert werden (^{2;32;33}).

1.2.3.1. Funktion der Endothelzellen bei der Entwicklung der Arteriosklerose

Von zentraler Bedeutung in der „response-to-injury-Theorie“ ist die These, dass durch eine Verletzung, bzw. eine Dysfunktion des Endothels ein proinflammatorischer Phänotyp der innersten Gefäßschicht initiiert wird. Dies führt unter bestimmten Umständen über die Interaktion verschiedener Entzündungszellen zu einem chronischen progredientem Verlauf mit Ausbildung atheromatöser Veränderungen.

Endothelzellen spielen bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase eine zentrale Rolle, Störungen dieser Abläufe und Funktionen führen zur Ausbildung eines proatherogenen Phänotyps in den Blutgefäßen.

(1) Barrierefunktion:

Der endotheliale Monolayer bildet eine mechanische Barriere zwischen dem Blut und der extravaskulären Matrix. Interendotheliale „tight junctions“ ermöglichen im Sinne einer permeablen Barriere einen Übertritt korpuskulärer und nichtkorpuskulärer Bestandteile in die subendotheliale Matrix. Zudem sind Endothelzellen maßgeblich an der Regulation von Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt. Studien haben gezeigt, dass die Entfernung des endothelialen Monolayers zu einer massiven Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen („smooth muscle cells“, SMC) führt, dieser Effekt ist nach Regeneration der Endothelzellen wieder regredient (²⁵).

(2) Immunologische Funktion:

Endothelzellen haben das Potential, über eine Vielzahl sezernierter Mediatoren (Cytokine, Wachstumsfaktoren, etc.) sowie membranständiger endothelialer Adhäsionsmoleküle (s.u.) die Interaktionen mit Leukozyten im Rahmen inflammatorischer Prozesse zu steuern. Die Einwanderung von Leukozyten (Adhäsion und transendotheliale Migration) in proatherogen veränderte Gefäßareale wird somit maßgeblich über aktivierte endotheliale Monolayer reguliert (³⁴⁻³⁶).

(3) Vasokonstriktorische Eigenschaften:

Endothelzellen sind in der Lage, sowohl vasokonstriktorische (Endothelin, Thromboxan A₂, Prostaglandin H₂, Prostazyklin sowie Angiotensin Converting Enzyme) als auch vasodilatatorische Substanzen (NO, PGI₂) zu synthetisieren, somit hat der endotheliale Monolayer einen großen Einfluß auf den vorhandenen Gefäßtonus. Umgekehrt werden seine Morphologie und Funktion durch die Scherkräfte des Blutflusses beeinflusst (³⁷).

Die Einteilung der Adhäsionsmoleküle erfolgte anhand 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.

Die Nomenklatur ist nach wie vor uneinheitlich. Die Einteilung in das "cluster of differentiation" erfolgt nach den Vorgaben des "6th International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation", Kobe, Japan vom 10.-14.11.1996.

1.2.3.3.1. Selektine

Selektine steuern die initiale Interaktion von Leukozyten (insbesondere Granulozyten) mit dem Endothel. Aufgrund ihrer typischen Struktur zählt man sie zur Genfamilie der "LECAM's" (lectin cell adhesion molecules). Zur Zeit sind drei Selektine bekannt, L-Selektin (LECAM-1), E-Selektin und P-Selektin. Alle besitzen eine aminoternale Ca²⁺-abhängige c-Typ Lektin Domäne, die spezifisch an Kohlenhydrate bindet, eine EGF- (epithelial growth factor) ähnliche Domäne zur optimalen spezifischen Bindung an Zielzellen, sowie eine variable Anzahl von kurzen Konsensussequenzen im extrazellulären Abschnitt der Selektine.

Das E-Selektin (Synonym: ELAM-1, endothelial leukocyte adhesion molecule-1, CD62E, (³⁸)) findet man ausschließlich auf aktivierten Endothelzellen. Nach Stimulation der Zellen kommt es

über die aktivierte Protein - `de novo´ - Synthese zu einem Anstieg von E-Selektin mit einer maximalen Expression nach ca. 4 Stunden. Bedingt durch eine Reduktion der Transkriptionsrate, eine sehr kurze Halbwertszeit der mRNA (³⁹), eine Internalisierung mit nachfolgender Degradation (⁴⁰) bzw. einer proteolytischen Abspaltung (⁴¹) nimmt im Laufe der Zeit die Oberflächenexpression (auch in weiterer Gegenwart der Zytokine) wieder ab und geht nach ca. 10-12 Stunden auf Basalwerte zurück.

Gemeinsam mit P- und L-Selektin steuert E-Selektin das Rollen und die Adhäsion unstimulierter Leukozyten (PMN, Monozyten, T-Memory Zellen (und Tumorzellen)) an aktivierten Endothelzellen (^{42,43}). Über die Bindung an das E-Selektin kommt es zu einer Aktivierung der Leukozyten, so daß diese auf die nachfolgende Transmigration vorbereitet werden (⁴⁴).

1.2.3.3.2. Immunglobulin-Gensuperfamilie

Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 werden aufgrund ihrer Sequenzhomologien zu den Immunglobulinen in die Ig-Supergenfamilie eingeordnet. Charakteristisch für die Mitglieder dieser Genfamilie sind sogenannte Immunglobulin (Ig)-Domänen von 70-120 Aminosäuren Länge und einer typischen, zuerst bei Immunglobulinen beschriebenen, räumlichen Struktur.

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, CD54) ist ein 90-120 kDa großes einkettiges Glykoprotein. Es läßt sich auf einer Vielzahl von Zellen nachweisen (Endothel-/Epithelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Astrozyten, dendritischen Zellen, Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, Thymozyten). Man beobachtet i. d. R. eine geringe konstitutive Expression sowie eine deutliche Induzierbarkeit (`de novo´ Synthese) nach Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren. Die maximale Expression sieht man - in Abhängigkeit vom Zelltyp, und Stimulus - ca. 12-24 Stunden nach Stimulation. An der Oberfläche bleibt es *in vitro* nach TNF α -Stimulation bis zu 72 Stunden und länger nachweisbar (⁴⁵). ICAM-1 kommt auf Endothelzellen eine entscheidende Rolle bei der festen Adhäsion ("firm adhesion") der aktivierten Leukozyten zu. Die wichtigsten Liganden sind die β 2-Integrine LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) und mit geringerer Affinität gp150,95 (CD11c/CD18).

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1, CD106), ist ein 110 kDa großes Glykoprotein, das von aktivierten Endothelzellen (⁴⁵), von dendritischen Follikelzellen und Epithelzellen exprimiert wird. VCAM-1 wird von den Endothelzellen nicht konstitutiv exprimiert. Nach Stimulation mit verschiedenen Mediatoren (TNF α , IL-1 β , LPS) beobachtet man eine zeitabhängige Hochregulation mit einer maximalen Expression nach ca. 12-24 Stunden (abhängig

vom Stimulus). Ähnlich wie ICAM-1 läßt es sich auch nach über 72 Stunden noch auf den Zellen nachweisen. Die beiden zur Zeit bekannten Liganden für VCAM-1 sind das β_1 -Integrin α_4/β_1 , VLA-4 (very late antigen 4, CD49d/CD29, Elices MJ, Cell 1990), sowie α_4/β_7 , (⁴⁶). VCAM-1 spielt eine wichtige Rolle bei der festen Adhäsion von Monozyten, Lymphozyten und NK-Zellen.

1.2.3.3.3. Integrine

Integrine bilden die größte Gruppe der Adhäsionsmoleküle und werden von Zellen fast aller Gewebetypen exprimiert. Sie vermitteln einen bedeutenden Teil der Zell-Zell-, sowie Zell-Matrix-Interaktionen (^{47;48}).

Integrine sind Rezeptormoleküle, die sich aus einer nicht kovalent verbundener transmembranösen α - und β -Kette (Untereinheit) aufbauen. Diese Ketten sind über verschiedene Bindeproteine (α -Aktinin, Talin, etc.) mit dem Zytoskelett assoziiert (^{49;50}).

Die Integrine sind entweder konstitutiv auf der Zelloberfläche vorhanden und werden nach Stimulation aktiviert, oder können, in intrazytoplasmatischen Vesikeln (als Heterodimere) gespeichert, nach Stimulation der Zelle sofort an die Oberfläche gebracht werden.

Die Gruppe der **b₁-Integrine** bezeichnet man auch als die "very late activation" Antigene (VLA₁₋₇). Alle besitzen zusätzlich zu der α -Kette (α_1 - α_7 , CD49a-g, α_x , α_y) die 130 kDa große β_1 -Kette (CD29, (⁵¹)). Man findet β_1 -Integrine mit unterschiedlicher Verteilung der einzelnen Subtypen auf einer Vielzahl von Zellen. Ihnen kommt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen zu. Eine zentrale Position bei der Leukozyten-Endothel-Interaktion (vor allem bei Lymphozytenmigration und -homing) nimmt das ausschließlich auf Leukozyten (Ausnahme: PMN !!) vorhandene Integrin $\alpha_4\beta_1$ (VLA₄, CD49d/CD29) ein (⁵²). VLA₄ vermittelt das Rollen und die Adhäsion der Leukozyten (vor allem Monozyten und (T-) Lymphozyten) an Zytokin-aktivierten Endothelzellen und hat in diesem Rahmen eine Selektin-ähnliche Funktion (⁵³). Wichtige Rezeptoren für VLA₄ sind VCAM-1 und MAdCAM-1 der Endothelzellen (⁵⁴). Weitere Liganden sind Fibronectin, Thrombospondin, Invasin (auf Bakterien), sowie mehr als 50 verschiedene extrazelluläre Matrixproteine (⁵²).

Zur Gruppe der **b₂-Integrine** gehören drei Subtypen, LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18), Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) und gp150,95 ($\alpha_X\beta_2$, CD11c/CD18) (⁵⁵). Sie kommen ausschließlich auf Leukozyten vor, mit einer unterschiedlichen Verteilung auf den einzelnen Subtypen und vermitteln den Zellkontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen (Adhäsion, Transmigration, Mig-

ration, Signalübertragung). Nach Stimulation der Leukozyten mit verschiedenen proinflammatorischen Mediatoren kommt es entweder zu einer verstärkten Oberflächenexpression der Integri-ne aus intrazellulären Vesikeln (CD11b, CD11c) und/oder zu einer qualitativen Veränderung der konstitutiv exprimierten Rezeptoren (CD11a, CD11b) (^{55;56}). Die Phosphorylierung des intrazellulären Abschnitts resultiert in einer Veränderung des Verteilungsmusters (“Clusterbildung”) sowie zu einer Zunahme der Affinität für die Liganden (⁵⁷⁻⁵⁹).

LFA-1 wird von fast allen Leukozyten konstitutiv exprimiert. Intrazelluläre Speicher sind nicht bekannt (⁵⁵). Liganden für LFA-1 sind ICAM-1, -2 und -3 (^{60;61}). LFA-1 vermittelt die homotypische Aggregation der Leukozyten untereinander, die Adhäsion von Leukozyten und Endothelzellen ist ein kostimulatorisches Signal für verschiedene weitere Leukozytenfunktionen (⁶²).

Mac-1 (Synonyme: $\alpha_M\beta_2$, C3bi-Rezeptor) wird von verschiedenen Leukozyten (PMN, Monozyten, Lymphozyten, NK-Zellen) sowohl konstitutiv exprimiert, als auch intrazellulär in Granulae gespeichert (⁶³). Durch proinflammatorisch wirkende Substanzen werden diese an die Oberfläche gebracht, so daß es innerhalb von 5-10 Minuten zu einer 5-10fachen Oberflächenexpression von Mac-1 kommt (⁶⁴). Es gibt für Mac-1 verschiedene Liganden: ICAM-1, -2, Fibrinogen, C3bi, Faktor X, Fc-Rezeptor II/III, uPAR, CD14, Heparin, CD23 und LPS/LBP (Lipopolysaccharid-LPS binding protein). Mac-1 steuert maßgeblich die Interaktion von Leukozyten (Monozyten, PMN) und (aktivierten) Endothelzellen. Über diesen Rezeptor werden jedoch nicht nur die eigentliche Adhäsion und Transmigration vermittelt, sondern auch das “spreading” der PMN, d. h. das Abflachen und Ausbreiten der adhärierenden Zellen, die Migration entlang eines chemotaktischen Gradienten, die Ausschüttung verschiedener proteolytischer Enzyme (Elastase, Myeloperoxidase, etc.) sowie der “respiratory burst”, d. h. die Freisetzung von reaktiv-oxidativen Sauerstoffmetaboliten (^{55;65}).

Das **Glykoprotein gp150,95** wird von verschiedenen Leukozyten, hauptsächlich jedoch von Gewebsmakrophagen, Monozyten und PMN sowohl konstitutiv exprimiert, als auch intrazellulär in Granulae gespeichert (^{52;63;64}). Für gp150,95 sind ebenfalls verschiedene Liganden beschrieben: ICAM-1, C3bi, Fibrinogen, LPS/LBP, CD23 sowie einige bis jetzt noch nicht näher charakterisierte Rezeptoren auf IL1 β -stimulierten Endothelzellen (^{55;65}).

1.2.3.2. Physiologie der Leukozyten-Endothel-Interaktionen

In den folgenden Abschnitten werden die unterschiedlichen Schritte der Leukozyten-Endothel-Interaktion vorgestellt. In den letzten Jahren hat sich ein Modell etabliert, das die Leukozyten-Endothel-Interaktionen als eine Kaskade von Ereignissen - ähnlich der Gerinnungskaskade - beschreibt (⁶⁶⁻⁶⁸). Der zeitliche Ablauf und die Spezifität der zellulären Immunreaktion ist in diesem Zusammenhang ein aktiver Prozeß, der sich aus verschiedenen Sequenzen zusammensetzt, gesteuert durch lokal gebildete Entzündungsmediatoren sowie durch von den beteiligten Zellen zu unterschiedlichen Zeiten exprimierte Adhäsionsmoleküle. Im Mittelpunkt stehen die im Rahmen akuter inflammatorischer Reaktionen dominierenden Interaktionen von PMN und Endothelzellen. Erste Schritte sind hierbei die lokale Bildung von Entzündungsmediatoren sowie die Aktivierung der Endothelzellen im Bereich des entzündeten Areals. Dies führt zu einer verstärkten Leukozytenrekrutierung und -anbindung an das Endothel ("Tethering", d.h. Anbindung ohne Aktivierung). Im Folgenden kommt es dann zu einer kontinuierlichen (gegenseitigen) Aktivierung der beteiligten Zellen über für diese spezifisch (IL-4 für VCAM-1, MCP-1 für Monozyten) oder unspezifisch (TNF α oder IL-1 β für E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1, PAF, IL-8, GM-CSF, MIP-1 α) wirkenden Zytokine, Chemokine oder Chemoattraktanten. In der letzten Phase dieser Kaskade transmigrieren dann adhärenente Leukozyten durch die interendotheliale Spalten in die subendotheliale Matrix.

1.2.3.2.1 Margination

Da Leukozyten keine Zilien haben, können sie als Reaktion auf eine Zytokin-Stimulation auch nicht aktiv (z.B. schwimmend) aus dem laminaren Blutstrom heraus an die Wand der Blutgefäße gelangen. Erste Kontakte mit dem Endothel sind somit eher zufällig, möglicherweise verstärkt durch lokale Strömungsveränderungen. Man hat beobachtet, dass in den kleinen postkapillären Venolen mit einem Durchmesser, der nur wenig größer als der Leukozytendurchmesser ist, Erythrozyten dazu tendieren, die größeren und schwereren Leukozyten an die Wand der Venolen zu drücken (⁶⁹). In größeren Blutgefäßen führen Aggregate von Erythrozyten, die in den zentralen Blutstrom hinein ragen, zu einer Verlagerung der Leukozyten an den Rand des Gefäßes (Margination) (⁷⁰). Diese Margination wiederum ermöglicht häufigere Leukozyten-Endothel-Kontakte und ist der erste Schritt einer koordinierten Interaktion, beginnend mit dem Rollen der Leukozyten auf der Oberfläche entzündlich veränderter Endothelzellen.

Eine entscheidende Rolle spielen hier auch die lokalen Strömungsverhältnisse. Turbulente Strömungen sowie Schubspannungen von $1-5 \text{ dyn/cm}^2$ begünstigen diese Interaktionen maximal ⁽⁶⁹⁾.

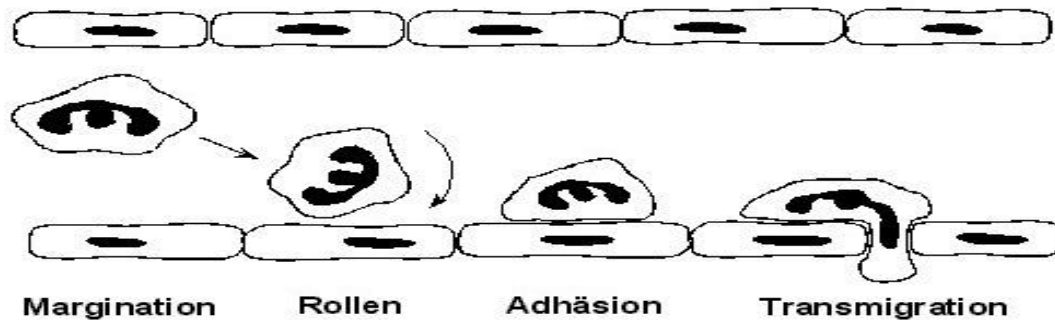


Abb. 1: Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

1.2.3.2.2. Rollen

Der erste sichtbare Schritt der Leukozyten-Endothel-Interaktionen ist das "Rollen" der Leukozyten entlang der Oberfläche inflammatorisch veränderter Endothelzellen postkapillärer Venolen und Venen. Intensität, Geschwindigkeit und Ausmaß werden durch die Adhäsionskräfte zwischen den beteiligten Zellen sowie die vorhandenen Schubspannungen ("shear stress") des Blutstroms bestimmt. Die Rollgeschwindigkeit liegt mit einem Mittel von $20-60 \mu\text{m/sec}$ jedoch immer deutlich unter der normalen Strömungsgeschwindigkeit des Blutes ($1-3 \text{ mm/sec}$ in $30 \mu\text{m}$ dicken Venolen, ⁽⁷¹⁾). Man beobachtet das Phänomen rollender Zellen fast ausschließlich auf entzündlich verändertem venösem Endothel. Es kommt im Verlauf der Entzündung zu einer Zunahme der Anzahl rollender Leukozyten sowie zu einer Abnahme der "Rollgeschwindigkeit" ("velocity"). Studien von Ley und Gaehtgens haben gezeigt, dass die unterschiedlichen hämodynamischen Verhältnisse in Arterien und Venen hierbei nur eine untergeordnete Rolle spielen ⁽⁷¹⁾. Entscheidend ist die Tatsache, dass die das Rollen vermittelnden endotheliale Liganden (Glykopeptide aus der Gruppe der Selektine, s.u.) vorzugsweise auf venösem Endothel exprimiert werden, nicht jedoch auf arteriellem ⁽⁷²⁾.

Vermittelt wird der Prozeß des Rollens überwiegend durch die Selektine. Zahlreiche Gruppen konnten zeigen, dass dem leukozytären L-Selektin hierbei eine zentrale Funktion zukommt ⁽⁶⁷⁾.

L-Selektin wird vorwiegend auf den Spitzen der Mikrovilli exprimiert und präsentiert dort den Liganden (SLe^x) für die potentiellen Rezeptoren (E- und P-Selektin, ⁽⁷³⁾, ⁽⁷⁴⁾). Diese "exponierte" Lage erleichtert daher die kurzfristigen Zell-Zellkontakte.

Liganden auf endothelialer Seite sind in der frühen Phase der Entzündung P-Selektin, im weiteren Verlauf das verzögert exprimierte E-Selektin. Verschiedene Studien konnten zeigen, daß sich mit monoklonalen Antikörpern gegen beiden Selektine das Rollen in unterschiedlichem Ausmaß blockieren ließ ^(75;76).

Durch das Rollen werden die Zellen abgebremst und zum Ort des Geschehens hingeführt. Die Zell-Zellkontakte über die Selektine führen zu einer Aktivierung aller beteiligter Zellarten, so kommt es u.a. zu einer verstärkten Expression der leukozytären β_2 -Integrine ^(44;77). Das Selektin-induzierte Rollen scheint somit unter physiologischen Strömungsverhältnissen eine wichtige Voraussetzung für die Integrin-gesteuerte feste Adhäsion zu sein (langsames Rollen an E-Selektin erhöht die Wahrscheinlichkeit weiter, dass sich ausreichend feste Bindungen ausbilden) ^(67;76).

1.2.3.2.3. Adhäsion

In der zweiten Phase der Leukozyten-Endothel-Interaktion, der festen Adhäsion („firm adhesion“), kommt es zum einen zu einer Aktivierung der Leukozyten-Integrine und zum anderen zu einer de novo Synthese endothelialer Adhäsionsmoleküle. Die Adhäsion wird auf leukozytärer Seite vor allem durch Liganden aus der Gruppe der β_2 -Integrine vermittelt, auf Seite der Endothelzellen durch Moleküle aus der Familie der IgG-Gen-Superfamilie. In vivo Studien verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, dass monoklonale Antikörper gegen CD18 (und damit gegen alle drei Heterodimere) die Adhäsion von Leukozyten in postkapillären Venolen fast komplett inhibierten ⁽⁷⁸⁾. Die Rollgeschwindigkeit und die Anzahl der rollenden Zellen blieben trotz Vorbehandlung mit anti-CD18 unverändert. Die reduzierte Adhäsion ließ sich also nicht durch eine vermindertes Rollen der Leukozyten erklären ⁽⁶⁷⁾. Besonders deutlich wurde die Bedeutung der β_2 -Integrine seit der Entdeckung des „leukocyte adhesion deficiency syndroms“ (LAD(S) Typ I), einer Erkrankung, bei der bedingt durch eine heterogene Mutation in dem Gen für die β_2 -Kette ein Mangel an funktionell aktiven β_2 -Integrinen vorliegt ⁽⁷⁹⁾ Neutrophile und ein Teil der Monozyten sind nicht in der Lage, aus den Blutgefäßen zu emigrieren. Allerdings beobachtete man, dass die normale Zell-vermittelte Immunität erhalten blieb und dass Lymphozyten, Eosinophile, NK- und Plasmazellen mehr oder weniger unverändert adhärten und transmigrierten ^(49;78). Es gibt offenbar alternative Wege. Verschiedene Studien zeigten, daß das

β_1 -Integrin VLA₄ und der endotheliale Ligand VCAM-1 mögliche Kandidaten für CD11/CD18 unabhängige Interaktionen sind (⁸⁰). Auch das erst seit kurzer Zeit näher charakterisierte Lymphozyten-Homing über das Integrin $\alpha_4\beta_7$ und MAdCAM-1 auf den HEV ist ein weiterer Weg der β_2 -Integrin-unabhängigen Leukozyten-Endothel-Interaktion.

1.2.3.2.4. Transmigration

Nach einer gewissen Zeit der festen Adhäsion können die Leukozyten dann in der dritten Phase der Leukozyten-Endothel-Interaktion die postkapillären Venolen verlassen (Emigration, Diapedese). Dieser komplexe Vorgang hängt a) von der Aktivierung und Expression endothelialer und leukozytärer Adhäsionsmoleküle, b) von der Ausbildung eines chemotaktisch wirksamen transmuralen Gradienten verschiedener Zytokine und Chemokine, c) von der Reorganisation des Zytoskeletts aller beteiligter Zellarten sowie d) von Veränderung in der Fluidität der Zellmembran ab. Adhärierende Leukozyten flachen ab ("flattening") und breiten sich auf der Oberfläche der Endothelzellen aus ("spreading"). Sie bilden hierbei Pseudopodien-ähnliche Strukturen aus, mit denen sie sich zwischen benachbarten Endothelzellen hindurch in den subendothelialen Raum ziehen (⁸¹). Gleichzeitig kommt es in diesem Bereich zu einer Retraktion des endothelialen Monolayers. Die leukozytären β_2 -Integrine CD11/CD18 spielen hierbei eine zentrale Rolle. Auf endothelialer Seite sind endotheliales E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 an der Transmigration in unterschiedlicher Weise beteiligt (^{44;49}).

1.2.3.3. Funktion der Adhäsionsmoleküle im Rahmen arteriosklerotischer Prozesse

Adhäsionsmoleküle steuern im Rahmen inflammatorischer Prozesse die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Sie werden in diesem Zusammenhang entweder ständig exprimiert, oder als Antwort auf einen spezifischen Reiz, abhängig von der auslösenden Noxe, der Dauer der Entzündungsreaktion sowie der Organlokalisierung, innerhalb kurzer Zeit aus intrazellulären Kompartimenten (Vesikeln) an die Zelloberfläche gebracht.

Verschiedene Studien konnten die zentrale Funktion der Adhäsionsmoleküle im Rahmen der inflammatorischen Reaktion und der zellulären Interaktionen bei der Entwicklung der „fatty streaks“ und der fibrösen Plaques der Blutgefäße zeigen.

1. Adhäsionsmoleküle (PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1/2) vermehrt auf arteriellen Endothelzellen im Bereich arteriosklerotischer Veränderungen exprimiert sind (^{35;82;83}).

2. Studien mit Mäusen, die kein P- und E-Selektin oder ICAM besitzen, nur eine verminderte bzw. keine Arteriosklerose entwickeln (^{84;85}).
3. In vivo –Versuche mit monoklonalen Antikörpern gegen VLA-4 (ein Integrin, welches auf Monozyten die Adhäsion an VCAM-1 auf Endothelzellen mediiert) die Rolle der Endothel-Leukozyten-Interaktionen in der Pathogenese der Arteriosklerose unterstreicht: Die Ausbildung von sog. "fatty streaks" und die Leukozyten-Transmigration ist in C57BL/6J - Mäusen vermindert (⁸⁶).

1.2.3.4. Chemokine und Arteriosklerose

Neben der vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Leukozyten ist die Bildung eines chemotaktischen Gradienten im Bereich der Gefäßwand notwendig, um die Leukozyten an den „Ort des Geschehens zu leiten“ (^{68;87}).

Verschiedene Chemokine spielen in diesem Zusammenhang vor allem in der Frühphase der Arteriosklerose eine entscheidende Rolle.

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) wird in der ersten Phase der Plaque-Bildung im luminalen Endothel produziert (⁸⁸) und dient unter anderem der Rekrutierung von Monozyten zum Ort einer Entzündung. Mäuse, denen der Rezeptor für MCP-1 fehlt und die kein Cholesterin-transportierendes Apolipoprotein E synthetisieren können (ApoE -/- Mäuse, welche eine schwere Arteriosklerose entwickeln), haben in ihren Gefäßen kaum atherosklerotische Veränderungen. Plasmalipidspiegel oder die Lipoprotein-Konzentration sind bei diesen Tieren interessanterweise nicht verändert (⁸⁹).

Auch **RANTES** (**R**egulated on **A**ctivation **N**ormal **T**-cell **E**xpressed and **S**ecreted) wird vermehrt von T-Zellen der arteriosklerotischen Läsionen (⁹⁰), sowie von Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen bei Transplantat-assoziiierter Arteriosklerose exprimiert (⁹¹). RANTES selbst wirkt chemotaktisch auf Monozyten, NK-Lymphozyten, basophile und eosinophile Leukozyten und dendritische Zellen.

Nur wenig Aufmerksamkeit galt bisher den CXC-Chemokinen aufgrund ihrer Spezifität bezüglich der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. Studien haben allerdings gezeigt, dass IL-8 sehr wohl auch einen chemotaktischen Effekt auf T-Zellen hat (⁹²), sowie als angiogenetischer Faktor (⁹³) eine Proliferation und Migration von vaskulären SMCs auslösen kann (⁹⁴).

1.3. Chlamydien

Chlamydien sind gram-negative, obligat intrazelluläre, kokkoide Eubakterien.

Sie gehören weltweit zu den häufigsten Krankheitserregern des Menschen und kommen ubiquitär vor. Sie verursachen eine noch nicht absehbare Anzahl von Erkrankungen bei Mensch und Tier, wobei die Infektionen häufig inapparent verlaufen und schwierig zu diagnostizieren sind.

1.3.1. Terminologie

Die Bezeichnung *Chlamydophila* ist der griechischen Sprache entnommen und bedeutet soviel wie "Umhüllung". Dies gibt bereits einen Hinweis auf die außergewöhnliche Lebensweise der Chlamydien.

Ursprünglich wurde angenommen, Chlamydien seien Protozoen oder Viren. Dann gelang jedoch der Nachweis typischer Merkmale bakterieller Lebewesen (sie besitzen RNA und DNA, produzieren selbst Nukleinsäuren, Proteine und Lipide). Aufgrund ihres einzigartigen Entwicklungszyklus sind sie in die Ordnung der *Chlamydiales* eingeteilt worden und bilden damit einen eigenständigen (monophyletischen) Zweig innerhalb der Eubakterien.

Diese Ordnung hat eine Familie: *Chlamydiaceae*. In dieser Familie gab es eine Gattung: *Chlamydia* ⁽⁹⁵⁾, die gemäß neuer Klassifizierung in *Chlamydia* und *Chlamydophila* (*Chlamydia pneumoniae* entspricht *Chlamydophila pneumoniae*) unterteilt werden ⁽⁹⁶⁾.

Die Gattung *Chlamydia* umfasst drei humanpathogene Spezies, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydophila pneumoniae* (ehemals TWAR) und eine tierpathogenen Spezies, *Chlamydia pecorum*. *C. pneumoniae* wurde erst 1989 von Grayston der Gattung *Chlamydia* zugeordnet ⁽⁹⁷⁾.

Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern sowie Sequenzierung des Gens für das Major Outer-membrane Protein (MOMP) der Zellmembran haben gezeigt, dass mehr als 20 verschiedene Serovare von *C. trachomatis* existieren. Serovare A, B, Ba und C sind mit der Entwicklung des Trachoms assoziiert, die Serovare D bis K mit sexuell übertragenen bzw. perinatal erworbenen Erkrankungen und die Serovare L1 bis 3 mit dem Lymphogranuloma venereum (LGV) und der hämorrhagischen Proktokolitis ⁽⁹⁷⁾. Das *C. trachomatis* wurde erstmals 1907 von Ludwig Halberstedter und Stanislaus von Prowazek beschrieben (Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom, 1907). Sie fanden "Einschlusskörperchen" in der Konjunktiven von Orang-Utans, die mit infektiösem Material von humanen Trachomata infiziert worden waren. Im Verlauf wurden weitere ähnliche Einschlusskörperchen in Konjunktiven von Patien-

ten mit Trachom, bei Kindern mit nicht-gonorrhöischen Konjunktividen, in den Zervix-Zellen ihrer Mütter und in Urethralzellen von Männern mit nichtgonorrhöischer Urethritis gefunden. Die Serovare A, B, Ba und C verursachen das Trachom, eine Erkrankung des Epithels der Bindehaut (weltweit eine Hauptursachen der Erblindung). Serovare D bis K sind mit dem Auftreten genitaler Infektionen (Urethritis, Prostatitis, Epididymitis, bzw. Zervizitis, Endometritis, Salpingitis, Peritonitis) assoziiert.

Eine Infektion durch die Serovare L₁-L₃ verursacht das Lymphogranuloma venerum, einhergehend mit einer systemischen Infektion mit Fieber, Myalgien und meningealen Irritationen

Chlamydia psittaci ist der Erreger einer seltenen atypischen Pneumonie, der Psittakose (Ornithose). Diese wird aerogen über die Inhalation Erreger-kontaminierten Staubes von Vögeln auf den Menschen übertragen wird. Damit ist diese Erkrankung eine typische Zoonose.⁽⁶⁾

Chlamydia pecorum löst bei Säugetieren (Rindern, Schafe, Schweinen) multiple Infektionen aus (Pneumonien, Enzephalitiden, Konjunktividen und Arthritiden), ist jedoch nicht humanpathogen⁽⁹⁸⁾.

Chlamydophila pneumoniae (TWAR) ist eine erst kürzlich entdeckte eigene Spezies. Der Erreger wurde erstmals 1965 aus der Konjunktiva eines taiwanesischen Kindes isoliert. Dieses Isolat erhielt den Namen TW-183. 1983 wurde in Seattle (USA) ein weiteres Isolat dieser Art aus dem Rachen eines an Pharyngitis erkrankten Studenten gewonnen. Dieses Isolat erhielt die Bezeichnung AR-39⁽⁹⁹⁾. TWAR ist die Synthese TW-183 und AR-39 und wurde lange Zeit als Synonym für *C. pneumoniae* verwendet (beide Isolate sind genetisch 100% homolog).

1.3.2. Entwicklung

Chlamydien haben eine Strategie „entwickelt“, die den Eintritt in die Wirts-Zellen, ein Leben und Vermehren in den Zellen, sowie ein Überleben während des Transits von einem zum nächsten Wirt in extrazellulärer Umgebung ermöglicht. Dies gelingt vor allem durch Ausbildung zweier morphologisch und funktionell unterschiedlicher Erregerformen:

Das **Elementarkörperchen** (elementary body, EB ca. 0,3µm) ist die infektiöse aber metabolisch inaktive Form. EB teilen sich nicht, sondern sind für das (vorübergehende) extrazelluläre Überleben mit einer rigiden Zellwand ausgestattet. Die Rigidität beruht auf einer extensiven Disulfid-Quervernetzung der „major outer membrane Proteine“ (MOMP, codiert durch *ompA*)

mit je zwei zysteinreichen Proteinen, einem 60 kDa Hüllprotein und einem 12 kDa Außenmembranprotein. Diese bilden den „chlamydial outer membrane complex“ (COMP) ^(100;101).

Das **Retikularkörperchen** (reticular body, RB, ca. 0,9µm) unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht vom Elementarkörperchen. ⁽¹⁰²⁾. Es ist nicht infektiös, metabolisch aktiv und aufgrund seiner erhöhten Labilität extrazellulär nicht überlebensfähig ⁽¹⁰³⁾.

Das RB besitzt bedingt durch eine wesentlich geringere Quervernetzung der MOMP durch Disulfid-Brücken eine osmotisch und mechanisch fragile Zellwand ⁽¹⁰⁴⁾. Dadurch sind Nährstofftransport, sowie Vitamin- und Cofaktoraustausch möglich innerhalb der infizierten Zielzelle möglich.

1.3.2.1. Entwicklungszyklus

Der chlamydiale Entwicklungszyklus beginnt mit der Anlagerung eines EB an die Zielzelle. Aufgenommen wird das EB mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose. Das metabolisch inerte EB unterläuft morphologische Veränderungen und organisiert sich zum größeren RB („Dekondensation“). Die entstehenden RB sind metabolisch aktiv und vermehren sich durch binäre Teilung innerhalb des expandierenden Endosoms. Diese mikroskopisch darstellbare Struktur bezeichnet man als Einschlusskörperchen („inclusion body“).

Nach einer Phase der Teilung und des Wachstums reorganisieren sich die RB in die kondensierte Form der EB zurück. Diese Reorganisation verläuft nicht reziprok zu dem Shift von EB zu RB. Sondern es entstehen mehrere EB aus einem EB. Die Reorganisation ist assoziiert mit einer Kompartimentalisierung der RB-Membran, die DNA kondensiert an mehreren Stellen. ^(105;106).

Der Entwicklungszyklus ist mit der Lyse der Wirtszelle und dem Freisetzen der EB aus dem Einschlusskörperchen abgeschlossen. Unklar ist, ob es sich hierbei um eine passive Lyse oder um eine aktive Exozytose über einen bisher noch nicht geklärten Mechanismus handelt.

Die Dauer eines kompletten Entwicklungszyklus (in Zellkulturmodellen) beträgt je nach Wirtszelle und Umgebungsfaktoren etwa 48-72 Stunden. ⁽¹⁰⁷⁾.

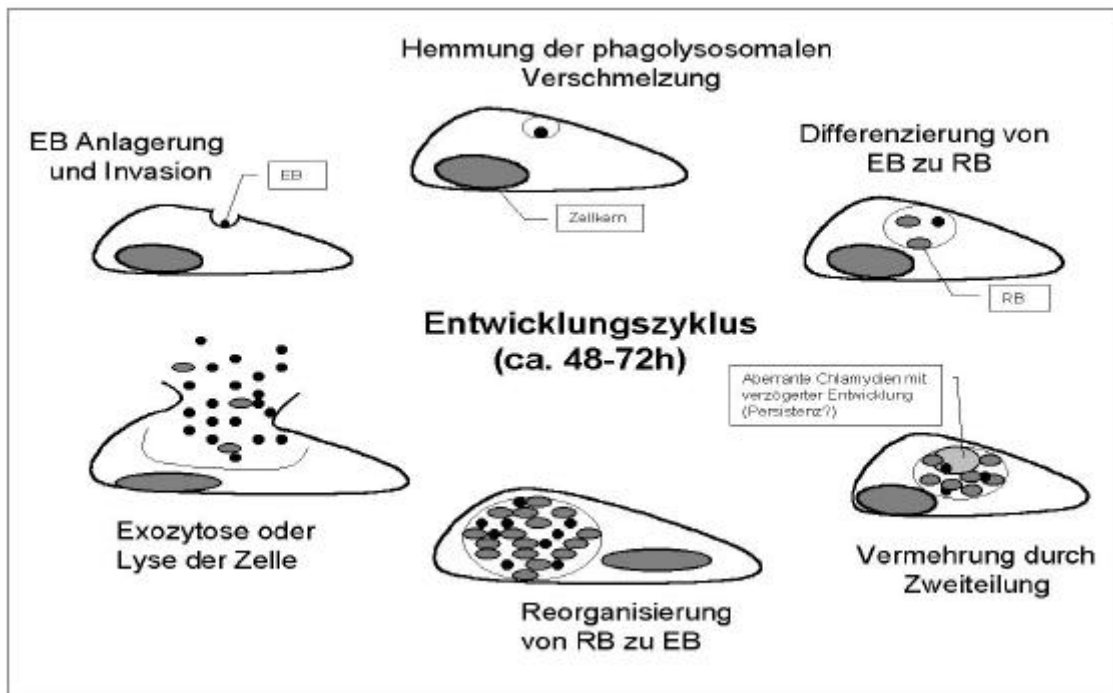


Abb.2: Entwicklungszyklus

Als obligat intrazelluläre Pathogene haben Chlamydien einzigartige Eigenschaften für das intrazelluläre Überleben entwickelt. Sie müssen die Wirtszellen invadieren, intrazelluläre Abwehrmechanismen umgehen und vor Ort eine Nische für Wachstum und Vermehrung rekrutieren.

Die genaue Kenntnis des chlamydialen Entwicklungszyklus ist unabdingbar um potentielle Mechanismen der Zielzellmanipulation und -aktivierung zu untersuchen.

1.3.2.2. Kinetik der Anheftung und Aufnahme

Der Invasion der Wirtszellen durch Chlamydien läuft in zwei Schritten ab: Adhäsion und Aufnahme.

Am Modell der *C. psittaci*-Infektion von L-Zellen (Enteroglucagon-bildende APUD-Zellen der Darmschleimhaut) konnte gezeigt werden, dass 1) bei niedrigen Infektionsraten von 10-50 EB pro L-Zelle der Anheftung schnell eine intrazelluläre Aufnahme folgt, so dass nach 60 Minuten nahezu alle Chlamydien aufgenommen sind; und 2) bei hohen Infektionsraten (500-5000 EB/Zielzelle) die Infektionsrate zwar zunimmt, die Adhäsion von Chlamydien jedoch endet, bevor alle Chlamydien gebunden haben und die Aufnahme endet, bevor alle Chlamydien in der Zelle sind.

Die Adhäsion an die Wirtszellen ist der erste Schritt des Infektionszyklus. Die Strukturen, die auf der Zielzelle einerseits und dem Bakterium andererseits der Anheftung dienen, sind bisher noch nicht genau identifiziert, es scheint aber je nach Gattung unterschiedliche Moleküle zu geben, die eine Adhäsion und Internalisierung mediiieren. In verschiedenen Studien wurde mittels verschiedener Techniken der Modifikationen der Bakterienoberflächen (Enzym-Behandlungen (Proteasen, Trypsine usw.), Detergentien, UV-Strahlen, Hitze-Inaktivierung, Vorbehandlungen mit Dextranen, Heparin oder monoklonalen Antikörpern gegen MOMP (Major Outer Membrane Protein, Glykoprotein)) versucht, Oberflächenmoleküle zu identifizieren, die für die Adhäsion der Bakterien auf der Oberfläche der Zielzellen verantwortlich sind. Vor allem den Proteinen des „Major outer membrane“ (MOMP) Komplexes scheint hier eine entscheidende Rolle zuzukommen. MOMP ist das dominierende Protein auf der Oberfläche der infektiösen RBs. Spaltung des MOMP durch Trypsin oder N-Glycanasen führte zu einer verminderten Adhäsion und Internalisierung der Bakterien (¹⁰⁸).

Auf der Oberfläche der Zielzellen werden Glykosaminoglykane (GAGs) als Rezeptoren für die Anheftung der Chlamydien diskutiert. Die GAGs bestehen aus der Polysaccharidkette von Proteoglykanen und kommen ubiquitär auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen vor. Sie dienen einer Vielzahl von Bakterien, Protozoen und Viren als Rezeptoren. Vor allem das Heparansulfat als häufigstes GAG eukaryotischer Zellen scheint bei der Adhäsion von Chlamydien eine zentrale Rolle zu spielen, Studien von Wuppermann et al. konnten zeigen, dass eine Vorbehandlung der EB mit Heparin und Heparansulfat die Infektion der Zielzellen mit *C. pneumoniae* deutlich verminderte (¹⁰⁹). Einzigartig unter den Chlamydiengattungen scheinen die Mechanismen der Adhäsion und Invasion von *C. pneumoniae* zu sein. Die EB von *C. pneumoniae* haben eine birnenförmige Morphologie (¹¹⁰). Die Bindung an die Zielzelle erfolgt vornehmlich mit dem spitzen Ende voran. Anschließend erfolgt die Aufnahme über „Mikrovillus-ähnliche“ Vorstülpungen der Zielzellmembran (¹¹¹). Zwei Stunden nach Eintritt in die Zelle ist die Inklusion im perinukleären Raum nahe dem Golgi-Apparat zu finden (¹¹²).

1.3.2.3. Intrazelluläre Entwicklung

Nachdem die Chlamydien die Wirtszelle infiziert haben, müssen sie sich gegen die Abwehrmechanismen des Wirts behaupten. Ein zentraler Abwehrmechanismus von Wirtszellen ist die Fusion wirtszell-eigener Lysosomen mit Erregerhaltigen Phagosomen. Die phagozytierten chlamydialen EB sind über bisher noch ungeklärte Mechanismen in der Lage, diese Fusion zu ver-

hindern. Typische Marker der verschiedenen Phagosom-Stadien (Lysosom: Saure Phosphatase, Cathepsin D, lysosomale Glykoproteine 1 und 2, und die vakuoläre H^+ -ATPase, sowie „fluid-phase“-Marker, „early endosom“: Transferrin und Transferrin-Rezeptor, „late endosom“: Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren) fehlen vollständig (¹¹³⁻¹¹⁵). Auch die ausbleibende Fusion mit Ferritin-markierten Lysosomen (¹¹⁶) weist auf einen nicht-lysosomalen Charakter des Phagosoms hin.

Favorisiert wird in diesem Zusammenhang das Modell einer intrazellulären „Mimikry“: Das chlamydiale Phagosom (lokalisiert in der Nähe des Golgi-Apparates) verschmilzt mit exozytotischen Vesikeln des Golgi-Apparates. Auf diesem Wege wird Sphingomyelin auf der Oberfläche des Phagosoms exprimiert. Damit erscheint dieses als ein aberrantes Vesikel des Golgi-Apparates, welches als körpereigen erkannt nicht mit den Lysosomen fusioniert. Dieser frühe Vorgang nach Aufnahme der Chlamydien in die Zelle hat zwei „Vorteile“ für die Chlamydien: zum einen entgehen sie mittels dieser Mimikry der Fusion mit den Lysosomen, zum anderen erhalten sie Material und Nährstoffe für die wachsende Vakuole und den eigenen Stoffwechsel (^{117;118}).

1.3.2.4. Einleitung der Replikation

Nach der phagozytotischen Aufnahme in die Wirtszelle beginnt die Organisation/Dekondensation der EB in RB. Die Mechanismen, die diesen Prozess induzieren und perpetuieren sind bis jetzt noch weitestgehend unbekannt.

Zu Beginn dekondensiert die DNA, Transkription und Translation werden möglich, die Proteinbiosynthese beginnt ca. 1 Stunde nach Aufnahme. In der gleichen Phase erfolgt die Reduktion der Quervernetzungen der MOMP's. Die Ausbildung monomerer Formen (¹¹⁹) erhöht die Fluidität und Porenaktivität der Bakterienwand und ein Transfer von Nährstoffen und Energieträgern (ATP) vom Wirt zum Bakterium wird möglich. Chlamydien haben ihre eigenen Energieproduzierenden Systeme verloren und sind somit nicht zur de novo Synthese von Nukleotiden in der Lage. Sie benötigen daher das Adenosintriphosphat der Wirtszellen (^{120;121}) (Energieparasitismus). Außerdem erhalten sie Aminosäuren, Lipide, Vitamine und Co-Faktoren von ihrer Wirtszelle (^{112;122;123}).

Die Aufnahme in die Vakuole erfolgt über eine Fusion mit wirtseigenen exozytotischen Vesikeln und über einen direkten transmembranösen Transport mittels Poren oder Transportsysteme in der Vakuolenmembran. Die wird erleichtert durch die Tatsache, dass Chlamydien bald nach Infektion an die Vakuolenmembran assoziiert vorliegen (siehe auch Kap 1.3.4.2. Typ-III-

Sekretionsapparat). Ein Verlust dieses Membrankontaktes, z. B. bedingt durch eine Nährstoffdeprivation, ist im Verlauf ein möglicher Auslöser der Reorganisation von EBs in RBs (¹¹²).

Die Reorganisation ist gekennzeichnet durch Produktion von speziellen Proteinen, Verbrauch von Cystein, Reduktion der Größe, Kondensierung der DNA, Quervernetzung der MOMP's und Verdichtung der Zellwand. Die eigentliche Vermehrung erfolgt durch dichotome Teilung der Retikulärkörperchen und erfolgt typischerweise nach ca. 10 bis 12 stattgehabten Teilungszyklen.

1.3.2.5. Freisetzung

Nach ca. 48 bis 72 Stunden ist der Entwicklungszyklus in der Zelle beendet, die Freisetzung der RBs erfolgt durch eine Lyse der Wirtszelle.

Während der Lyse werden Zellorganellen zerstört und es kommt zur Ruptur der Plasmamembran, wodurch die Bakterien frei zur nächsten Zelle diffundieren können. Kurz vor der Freisetzung werden lysosomale Enzyme freigesetzt, die als lytische Agenzien dienen (¹²⁴).

1.3.2.6. Entwicklung persistierender Erregerformen

Chlamydien sind unter bestimmten Umständen in der Lage, in den Zielzellen zu persistieren. Unter „Persistenz“ versteht man das Vorhandensein lebender, (elektronenmikroskopisch) aber nicht vermehrender Chlamydien, die sich allerdings nicht vermehren. Diese „Persister“ haben einen deutlich reduzierten Metabolismus (¹²⁵). Dieser Zustand scheint reversibel zu sein. Ein „Gen“ oder sonstiger „Persistenz-Marker“ hierfür ist bisher noch nicht identifiziert worden, allerdings korreliert die Anzahl der *tyrP*-Loci (Tyrosin-Permease) mit der Fähigkeit, einen persistierenden Status einzunehmen (¹²⁶).

Die Voraussetzungen für den Übergang in einen persistierenden Lebenszyklus sind unklar, in der Zellkultur lässt sich dies jedoch mittels verschiedener Techniken (s.u.) erreichen. Es kommt zu einer verzögerten Reifung der RB und Hemmung der Differenzierung in die infektiösen EB. Folge davon ist die Ausbildung dysmorpher Chlamydien. Die Präsenz persistierender intrazellulärer Chlamydien wurde erstmals von Moulder et al beschrieben. Dieser konnte in Fibroblasten von Mäusen, die eine *C. pneumonia*-Infektion überlebt hatten, morphologisch veränderte Chlamydien nachweisen. Diese Form der Chlamydien wurde als „cryptic body“ beschrieben (¹²⁷).

Die Persistenz lässt sich (in vitro) mittels verschiedener Techniken erreichen:

1. „Stimulation“ der infizierten Zielzellen mittels verschiedener Antibiotika (^{128;129}): Mittlerweile wurde in verschiedenen Studien die Wirkung von antimikrobiellen Agenzien auf die Entwicklung chlamydialer „Persister“ untersucht. Vorinkubation von *C. psittaci*- und *C. trachomatis*-infizierten Zellkulturen mit Penicillin hatten keinen Effekt auf die initiale Differenzierung von EBs zu RBs, verhinderten aber die binäre Teilung. Nachfolgend entwickelten sich vergrößerte, morphologisch abnorme Chlamydien, die keine Reorganisation in EBs durchliefen (^{129;130}). Ähnliche Effekte lassen sich auch mittels Rifampicin oder diverser Makrolid-Antibiotika erreichen (¹³¹).

2. Wirtsspezifische Mediatoren (¹³²): Persistenz kann ebenso durch die Wirtszellantwort erreicht werden. So ist ein in vitro Modell entwickelt worden, das folgende Charakteristika besitzt: (1) Unter dem Einfluss von Interferon-gamma (IFN γ) entwickeln sich anstelle von EB aberrante Formen aus RB; (2) Bestimmte strukturelle Komponenten auf chlamydialer Oberfläche werden vermindert exprimiert, wie z.B. MOMP und Lipopolysaccharid (LPS), während stressinduzierte Proteine wie z.B. „chlamydial heat shock protein-60“ (chsp-60) in erhöhten Konzentrationen nachweisbar werden; (3) Nachdem der inhibierende Effekt des IFN γ entfernt wurde, entwickelten sich wieder normale infektiöse EB (¹³³). Während hohe Konzentrationen von IFN γ das chlamydiale Wachstum komplett hemmen, induzieren niedrige Konzentrationen die Entwicklung morphologisch aberranter, intrazellulärer Formen (¹³⁴). Diese Formen entsprechen den persistierenden Formen der Chlamydien (¹³²) und besitzen morphologische Eigenschaften ähnlich denen der Penicillin-induzierten Formen.

3. Auch eine Depletion essentieller Nährstoffe (Glucose oder Eisen) in den Zielzellen führt unter in vitro Bedingungen zu Entwicklung persistierender Chlamydienformen in den Zielzellen (^{106;135}).

Die Entwicklung persistierender Lebensformen der Chlamydien wird mittlerweile mit dem Auftreten chronischer Infektionen in Zusammenhang gebracht (^{107;136}). Erste in vitro Studien zeigen, dass vor allem die Infektion von glatten Muskelzellen und Endothelzellen mit *C. pneumoniae* in hohem Maß zur Ausbildung persistierender Erscheinungsformen führt (¹³⁷).

1.3.3. Virulenzfaktoren von Chlamydien

1.3.3.1. Hitzeschock Proteine

Chlamydien exprimieren verschiedene Antigene auf ihrer Oberfläche. Eines davon ist das 60kD große Hitzeschockprotein „chlamydial heat shock protein 60“, chsp-60 (GroEL-1). Hitzeschockproteine sind hoch konservierte Proteine aus der Gruppe der Chaperone⁽⁹⁷⁾. Vor allem der Expression des chsp-60 von *C. pneumoniae* wird eine Bedeutung in der Pathogenese der Arteriosklerose zugeschrieben. Das chlamydiale und das humane Hitzeschockprotein besitzen ein hohes Maß an Homologie. Chsp-60 konnte zusammen mit dem humanen hsp60 (produziert von aktivierten sowie apoptotischen Zellen produziert) in Atheromen nachgewiesen werden und induziert hier verschiedene inflammatorische Reaktionen in Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen und glatten Muskelzellen (u. a. Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen; ⁽¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾). Chsp60 wird in hohem Maße vor allem von den persistierenden chlamydialen Formen exprimiert ⁽¹³²⁾ und scheint ein Schlüsselantigen chronischer Chlamydien-assoziiierter Erkrankungen zu sein ⁽¹⁰⁷⁾.

1.3.3.2. Typ-III-Sekretions-Apparat

Verschiedene Bakterien haben ein spezialisiertes Protein-Sekretionssystem entwickelt, das es ihnen ermöglicht, gezielt Proteinen in das Zytosol eukaryonter Wirtszellen zu sezernieren bzw. injizieren. Über diesen Mechanismus sind die Bakterien in der Lage, den Eintritt in die Zielzellen zu erleichtern, sowie in Signaltransduktionswege der eukaryonten Zellen einzugreifen und so Abwehrmechanismen zu umgehen ^(141;141). Mittlerweile sind vier verschiedene Sekretionsmechanismen identifiziert (Typ I-IV), am gründlichsten untersucht ist das Typ-III-Sekretionssystem. Der Apparat besteht aus mehr als 20 Proteinkomponenten und gehört damit zu den komplexesten Protein-Sekretionssystemen, die bei Bakterien bekannt sind. Die strukturellen Gene des Apparates sind hoch konserviert, aber die Substrate, die in die eukaryote Zelle sezerniert/injiziert werden sind spezifisch für das jeweilige Bakterium. Der Apparat bildet eine Protein-Struktur auf der Oberfläche der Bakterien aus, die als Transportmöglichkeit für die Translokation von Proteinen genutzt wird.

Solche „piliähnlichen“ Protrusionen konnten an EB und RB von *C. psittaci* schon 1981 von Matsumoto et al. elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden ⁽¹⁴²⁾. Ähnliche Daten gibt es

auch für *C. pneumoniae* (^{143;144}) konnten zeigen, dass Chlamydien Gene für einen Typ-III-Sekretions-Apparat besitzen. Baviol und Hsia 1998 (¹⁴⁵) bestätigten, dass die von Matsumoto beschriebenen Strukturen auf der Oberfläche von Chlamydien tatsächlich einem Typ-III-Sekretions-Apparat entsprechen. Unterstützt wurden dies Beobachtungen durch die Sequenzierung des *C. pneumoniae* – Genoms, hier ließen sich Sequenzen mit deutliche Homologien zu Typ III-spezifischen Proteinen der Shigellen (Yop-Proteinen) nachweisen (^{146;147}).

Das erste identifizierte von Chlamydien sezernierte Protein ist der „chlamydial protease/proteasome-like activity factor“, CPAF, eine Protease, die mit der Spaltung von Keratin 8 (der Hauptkomponente der Filamente des epithelialen Zytoskeletts) und einem damit verbundenen Rearrangement des Wirtszellzytoskeletts zusammengebracht wird. Zudem konnte gezeigt werden, das CPAF wirtszellspezifische Transkriptionsfaktoren spaltet, die essentiell für die Präsentation von MHC-Molekülen sind (RFX5; (^{148;149})). Mögliche weitere chlamydiale Proteine, die über diesen Mechanismus in die Wirtszelle eingeschleust werden, sind zum einen sog. „inclusion proteins“ (¹⁵⁰), die den intrazellulären vesikulären Transport zugunsten des Wachstums der Einschlußkörperchen-Membran beeinflussen (^{113;118;151}) und zum anderen Faktoren, die die Apoptose der Chlamydien-infizierten Zellen verhindern (¹⁵²).

1.3.3.3. Chlamydiales Lipopolysaccharid, cLPS

Die Mitglieder der Familie Chlamydiaceae besitzen als gram-negative Bakterien in ihrer äußeren Membran ein Lipopolysaccharid (LPS). Dieses zeichnet sich durch ein auf der Oberfläche exprimiertes, genus-spezifisches und gut charakterisiertes Epitop aus (^{153;154}).

Das cLPS unterscheidet sich von dem LPS anderer gram-negativer Bakterien vor allem durch eine niedrigere biologische Aktivität (¹⁵⁵). Die Verteilung/Dichte des LPS auf der Oberfläche von EB und RB ist unterschiedlich. Studien haben gezeigt, dass es mit einer höheren Prävalenz auf RB nachweisbar ist. Außerdem werden unterschiedliche LPS-Formen auf EB und RB beschrieben (¹⁵⁶). Peterson et al. konnten einen Antikörper isolieren, der die spezifische Aktivität des cLPS neutralisiert (¹⁵⁷). Es gibt bisher nur wenige Informationen über die Funktion des cLPS als Virulenzfaktor, bekannt ist, dass das chlamydiale LPS eine Umwandlung von Makrophagen in Schaumzellen induzieren kann (¹⁵⁸).

1.3.4. *Chlamydophila pneumoniae*

Chlamydophila pneumoniae (TWAR) ist die vierte Spezies der Gattung Chlamydiaceae. Im Gegensatz zu den seit 60 Jahren bekannten humanpathogenen Spezies *C. trachomatis*, *C. pecorum* und *C. psittaci* wurde *C. pneumoniae* erst später als eigene Spezies definiert (¹⁵⁹). *C. pneumoniae* wurde erstmals 1965 im Rahmen einer Trachom-Impf-Studie aus dem Auge eines Kindes in Taiwan isoliert, der Stamm als TW-183 bezeichnet. 1983 erfolgte der erstmalige Nachweis eines respiratorischen Isolates (AR39) (⁹⁹). Beide Stämme waren zu 100% homolog, 1989 wurde daher das Synonym TWAR eingeführt, im gleichen Jahr *C. pneumoniae* als eigene Chlamydienspezies neu definiert (⁹⁹). Trotz deutlicher Verbesserungen der Diagnostik und Anzuchtmethoden konnten weltweit bis heute nur etwa 50 kontinuierlich lebensfähige Stämme isoliert werden.

Die DNA-Homologie zwischen *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* ist kleiner als 5%, die zwischen *C. pneumoniae* und *C. psittaci* kleiner als 10%. Die Einschlusskörperchen von *C. pneumoniae* sind typischerweise birnenförmig (¹⁵⁹), siehe Abb. 3) mit einem periplasmatischen Raum (¹¹⁰).

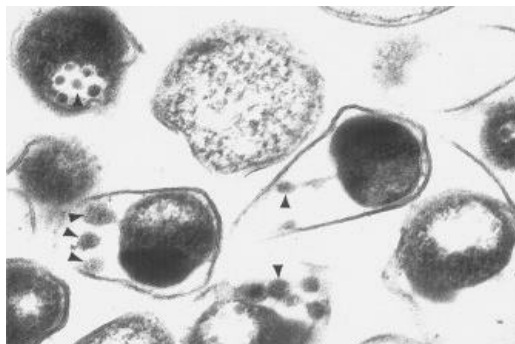


Abb. 3:

Ultrastrukturelle Charakteristika von *C. pneumoniae* EB. Sie sind pleomorph, aber typischerweise birnenförmig.

J. Thomas Grayston

The Journal of Infectious Diseases 2000 (¹⁵⁹)

Einzigartig unter den Chlamydienspezies ist die hohe Homologie zwischen den einzelnen Isolat/Stämmen von *C. pneumoniae*. Unterschiede in der Virulenz oder der Wirtszellspezifität wurden bisher nicht beschrieben. Die Genomsequenzen der *C. pneumoniae*-Stämme AR-39, CWL-029 und J183 besitzen ein hohes Maß an Genkonservierung und genomischer Kolinearität. Auffallend sind allerdings Unterschiede im Genom respiratorischer und kardiovaskulärer Isolate, die pathogenetische Relevanz ist jedoch noch offen (¹²⁶).

1.3.4.1. Epidemiologie

C. pneumoniae kommt weltweit ubiquitär vor, lediglich die Prävalenz zwischen verschiedenen Regionen variiert (¹⁶⁰). Die epidemiologischen Daten basieren vor allem auf der *C. pneumoniae*-Diagnostik mittels MIF-Test (indirekter Micro-Immunofluorescence-Test), der das gesamte EB als Antigen erkennt. Studien zeigen eine Seroprävalenz von etwa 60% unter der erwachsenen Bevölkerung (¹⁶¹), wobei mit zunehmendem Alter der Anteil seropositiver Personen von 50% bei 20 – 30 jährigen Personen auf nahezu 80% bei älteren Menschen ansteigt. Bis zum 15. Lebensjahr gibt es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bezgl. der Seroprävalenz, im weiteren Verlauf beobachtet man eine Gewichtung zu Lasten des männlichen Geschlechts. Diese Unterschiede sind weltweit zu beobachten, es gibt bis heute keine Erklärung für dieses Phänomen.

1.3.4.2. Pulmonale Infektionen

Die Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt via Aerosol oder durch Speichelkontakt. *C. pneumoniae* kann in Aerosolen bei Raumtemperatur überleben, obwohl die Infektiosität innerhalb kürzester Zeit deutlich abnimmt (¹⁶²). Die Inkubationszeit beträgt sieben bis einundzwanzig Tage. Da die Infektion im menschlichen Körper meist nur eine zeitlich limitierte Antikörperantwort induziert, sind Reinfektionen häufig. Persistierende Infektionen werden diskutiert (s.o.). Das klinische Spektrum von *C. pneumoniae*-Infektionen umfasst vor allem (akute) Erkrankungen der oberen (akute Pharyngitiden, Sinusitiden, Bronchitiden), und der tiefen Atemwege (Pneumonien, „atypisch“, mit lymphozytärer Alveolitis). Klinisch relevant (und dann auch diagnostiziert) werden vor allem Bronchitiden und Pneumonien, wobei die Prävalenz chlamydialer Pneumonien unklar ist. Seroepidemiologische Studien zeigen, dass asymptomatische Infektionsverläufe dominieren. *C. pneumoniae* ist weltweit für ca. 5% der Bronchitiden und Sinusitiden und 5-10% der ambulant erworbenen Pneumonien (community acquired pneumonia – CAP) verantwortlich. Anscheinend folgen wenigen Jahren mit höheren Raten an durch *C.pneumoniae* verursachten CAP ca. 5 Jahre mit niedrigeren Inzidenzen (⁹⁷). Eine Studie der deutschen “community acquired pneumonia-network, CAPNETZ” Gruppe, welche mehr als 4000 CAP-Patienten einschliesst, zeigte, dass zwischen 20001 und 2004 mittels standardisirten Diagnostikverfahren (MIF-Test, PCR aus der BAL - bronchoalveolären Lavage) *C. pneumoniae*

in ca. 1% der Fälle einer CAP verantwortlich war. (siehe auch den Buchartikel „Clinical manifestation Community acquired Pneumoniae“, Suttorp N et al 2007 von Krüll-Suttorp (¹⁶³)).

Seltene Fälle von Endokarditiden, Myokarditiden, Meningoradikulitis, Erythema nodosum oder reaktiven Arthritiden durch *C. pneumoniae* sind dokumentiert. Es gibt keinen spezifischen Symptomenkomplex für eine Erkrankung mit *C. pneumoniae*. Häufig beginnt die Krankheitsphase subakut im Sinne einer Pharyngitis. Heiserkeit und Husten sind typisch, (hohes) Fieber eher selten. Nach Abklingen dieser Symptome kann eine Bronchitis oder eine Pneumonie klinisch manifest werden. Die Verläufe sind zumeist leicht, aber auch unter optimaler Antibiotikatherapie erfolgt die vollständige Genesung nur protrahiert. Husten und Krankheitsgefühl können über Wochen persistieren. Bei älteren Menschen beobachtet man häufig schwerere Verläufe.

Chronische Infektionen mit *C. pneumoniae* sind beschrieben. Die Entwicklung chronisch-persistierender Chlamydieninfektionen lässt sich vor dem Hintergrund des Entwicklungszyklus am ehesten dadurch erklären, dass metabolisch inaktive EB gegenüber Antibiotika resistent sind und im Körper unbestimmte Zeit existieren können, bevor sie eine Zelle infizieren. Ebenso können aus den RB „cryptic bodies“ oder “Persister” entstehen, die zu späteren Zeitpunkten Reinfektionen verursachen können (¹⁰⁷). *C. pneumoniae* wird mit dem Auftreten verschiedener (chronischer) Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Hierbei scheinen vor allem persistierenden Infektionen eine entscheidende Rolle zu spielen. Verschiedenen Studien diskutierten eine Assoziation zwischen rezidivierenden bzw. chronisch-persistierenden *C. pneumoniae*-Infektionen und dem vermehrten Auftreten von Asthma bronchiale sowie einer chronisch-obstruktiven Bronchitis (COPD, zur Übersicht siehe Hahn DL, Ann Allergy Asthma Immunol, 1999 (¹⁶⁴)). Eine akute Infektion soll bei entsprechender Prädisposition Asthma bronchiale auslösen können (¹⁶⁵), bzw. zu einer Exazerbation beitragen (¹⁶⁶). Eine persistierende Infektion soll bei einigen Personen zu chronischen asthmatischen Symptomen führen (¹⁶⁷). Weiterhin wird vermutet, dass die chronische Infektion mit *C. pneumoniae* die Nikotin-assoziierte Inflammation in den Bronchien von Rauchern bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) verstärken und zur Entwicklung eines irreversiblen Umbaus der Atemwege beitragen kann (^{168;169}).

Verschiedene Studien postulieren weiterhin einen möglichen Zusammenhang zwischen Infektionen mit *C. pneumoniae* und dem vermehrten Auftreten von Multipler Sklerose, M. Alzheimer, Diabetes mellitus und pulmonaler Neoplasie (¹⁷⁰⁻¹⁷³), die Daten sind diesbezüglich allerdings spärlich und inhomogen.

1.3.4.3. Diagnostik

Die Referenzmethode zum Nachweis einer Chlamydieninfektion ist der MIF-Test, der 1970 für *C. trachomatis* (¹⁷⁴) entwickelt wurde. Er ist ein spezifischer und sensitiver Test. Der Test mit TWAR-Antigen ist spezifisch für *C. pneumoniae*. Er kann zwischen IgG und IgM unterscheiden. Der molekularbiologische Nachweis mittels PCR ist speziesspezifisch und hoch sensitiv. Allerdings steht eine umfassende Validierung noch aus, aktuell gibt es keine kommerziellen Tests, so dass er momentan nur in Speziallaboratorien etabliert ist. Der kulturelle Nachweis ist zwar diagnostischer Goldstandard, da jedoch die Kultur von *C.pneumoniae* schwierig ist, bleibt auch er wenigen Speziallabors vorbehalten.

1.3.4.4. Assoziation zur Pathogenese der Arteriosklerose

Verschiedene Arbeiten der letzten Jahre diskutieren einen Zusammenhang zwischen rezidivierenden bzw. chronisch-persistierenden *C. pneumoniae*-Infektionen und dem vermehrten Auftreten von Arteriosklerose und kardiovaskulärer Erkrankungen (KHK, Apoplex, Aneurysma-Bildung). Statistisch lässt sich die abgelaufene oder chronische *C. pneumoniae*-Infektion als unabhängiger Risikofaktor hierfür errechnen (¹⁷⁵). Hintergrund für diese Hypothese sind seroepidemiologische Studien, der Nachweis von *C. pneumoniae* in arteriosklerotisch veränderten Gefäßarealen mittels verschiedener Techniken (s.u.), tierexperimentellen Untersuchungen sowie ersten Interventionsstudien mit Chlamydien-spezifischen Antibiotika an Patienten mit symptomatischer KHK.

1.3.4.4.1. Seroepidemiologische Studien

1988 stellte die Arbeitsgruppe von Saikku erstmalig eine Studie vor, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines akuten Myokardinfarkts (AMI) sowie erhöhten Serumkonzentrationen von *C. pneumoniae*-spezifischen IgG- oder IgA-Antikörpern bzw. zirkulierenden Chlamydien-LPS Immunkomplexen aufzeigte. Während sich bei Patienten mit AMI und koronarer Herzerkrankung (KHK) in 68% bzw. 50% aller Fälle deutlich erhöhte Antikörpertiter gegen *C. pneumoniae* nachweisen ließen, gelang dies nur bei 17% der Kontrollgruppe. Ähnliche Ergebnisse wurden im Verlauf von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt. (¹⁷⁵⁻¹⁸⁰). Einige Autoren berichten von einer Assoziation zwischen einer akuten *C. pneumoniae* Infektion und dem akuten Myokardinfarkt.

Sie machen eine Reinfektion mit *C. pneumoniae* für das Auftreten des myokardialen Ereignis verantwortlich (^{180;181}). 1996 zeigten Wimmer et al, das erhöhte serologische Marker auch mit dem Auftreten zerebrovaskulärer Erkrankungen korrelierten (¹⁸²).

Studie	Fälle / Kontrollen	IgG	IgA	Immunkomplexe
Saikku P (1988)	70 / 41	49% / 15%	41% / 10%	
Leinonen M (1990)	44 / 44			56% / 10% (AMI / CO)
Saikku P (1992)	103 / 103	2,2 (OD)	2,6 (OD)	2,9 (OD)
Linanmaki E (1993)	46 / 46	43%		41% / 15% (KHK / CO)
Melnick SL (1993)	326	73% / 63%		
Blasi F (1997)	61 / 61	57% / 30% (MI)		
Mazzoli (1998)	29 / 74	82% / 34% (MI)	71% / 14,9%	

Anmerkung: AMI: Akuter Myokardinfarkt; CO: Kontrolle; OD: Odds ratio; MI: Myokardinfarkt

Tab.2: Seroepidemiologische Studien

Auch in Deutschland ließen sich vergleichbare Ergebnisse erzielen. Maass et al. zeigten, dass die anti-*C. pneumoniae* IgG-Seroprävalenz und -konzentration bei Patienten mit klinisch relevanter koronarer Herzerkrankung deutlich höher war, als bei gefäßgesunden Patienten (¹⁷⁵). Anhand der serologischen Daten zum Nachweis einer abgelaufenen Infektion ergab sich eine Odds Ratio von 2,4, also ein 2,4-fach erhöhtes Risiko für das Auftreten kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit einem deutlicher erhöhten *C. pneumoniae*-Antikörpertiter. Die Theorie wurde zusätzlich gestützt durch eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten zirkulierender Chlamydien-LPS Immunkomplexe und der chronischen nicht-symptomatischen KHK (¹⁷⁷).

1.3.4.4.2. Immunhistochemischer und molekularbiologischer Nachweis von *C. pneumoniae* in arteriosklerotisch veränderten Gefäßarealen

Die Sicherung der These einer möglichen Beteiligung von *C. pneumoniae* an der Pathogenese arteriosklerotisch veränderter Gefäßwände setzt den (lokalen) Nachweis des Erregers oder spezifischer Erregerbestandteile voraus. Dies gelang mittels immunhistochemischer Techniken (Nachweis von Chlamydienantigen), der DNA-Amplifikation via Polymerasekettenreaktion, PCR und der Isolation von *C. pneumoniae* (s.u.). Hier ergibt sich - in Abhängigkeit der untersuchten Gefäßareale und der eingesetzten Nachweistechiken - ein inhomogenes Feld an Studienergebnissen (siehe Tabelle 3, (¹⁸³⁻¹⁹⁰)).

Autoren	Publikationsdatum	Gefäße	Methoden	Anteil der positiven Proben
Shor et al.	1992	Koronarien	EM, ICC	5/7
Kuo et al.	1993	Koronarien	EM, ICC, PCR	20/36
Kuo et al.	1993	Aorta	ICC	7/21
Weiss et al.	1994	Koronarien	PCR	1/36
Campbell et al.	1995	Koronarien	EM, ICC, PCR	20/38
Davidson et al.	1995	Koronarien	ICC, PCR	23/60
Kuo et al.	1995	Koronarien	ICC, PCR	1/22 (15–24 Jahre) 7/29 (25–34 Jahre)
Grayston et al.	1995	Karotis	ICC, PCR	37/61
Ong et al. ⁽¹⁹¹⁾	1996	Aorta, A.iliaca und andere	PCR, IMF	19/43
Ong et al.	1996	Verschiedene	PCR, EM, ICC	36/67
Muhlestein et al.	1996	Koronarien	IMF	66/90
Weiss et al.	1996	Koronarien	PCR, Kultur, EM	1/58
Ramirez JA,	1996	Koronarien	Kultur, ICC, PCR, EM, ISH	7/12
Blasi et al.	1996	Aorta	PCR	26/51
Juvonen et al. ⁽¹⁹²⁾	1997	Aorta	ICC, PCR, EM, Kultur	12/12
Jackson et al. ⁽¹⁹³⁾	1997	Karotis	Kultur	1/1
Jackson et al. ⁽¹⁹⁴⁾	1997	Coronary	ICC, PCR	13/34
Gloria-Breceda et al.	1997	Aorta	IMF	2/16
Kuo et al.	1997	A.femoralis, A.poplitea	ICC, PCR	11/23
Chiu et al.	1997	Karotis	ICC	54/76
Maass et al.	1998	Koronarien	PCR, Kultur	21/70
Taylor-Robinson et al. ⁽¹⁹⁵⁾	1998	Aorta, A.pulmonalis	PCR	13/91
Shor et al.	1998	Verschiedene	ICC, PCR, EM	17/24
Paterson et al. ⁽¹⁹⁶⁾	1998	Karotis, Koronarien	PCR	0/49
Daus et al. ⁽¹⁹⁷⁾	1998	Koronarien	PCR	0/29
Maass et al.	1998	Karotis, Koronarien	PCR	51/238
Wong et al.	1999	Koronarien	PCR	11/33
Bauriedel et al. ⁽¹⁹⁸⁾	1999	Koronarien	ICC, EM	32/51
Vink et al	2000	Verschiedene	ICC	24/24, (n=738)
Rassu et al	2000	Verschiedene	PCR, ICC	18/18

Anmerkung: EM, Elektronenmikroskop; ICC, Immunocytochemie; PCR, Polymerase Chain Reaction; IMF, Immunofluoreszenz; EIA, Enzyme Immunoassay; ISH, in situ Hybridisierung.

Tabelle 3: Nachweis von *C.pneumoniae* in atherosklerotisch veränderten Gefäßen

C. pneumoniae ließ sich nicht nur in arteriosklerotisch veränderten Koronararterien nachweisen, sondern auch in der Aorta bzw. in aortalen Aneurysmen, den Iliakalarterien und den Femoralarterien (^{180;191;199;200}). Vink et al. konnten *C. pneumoniae* vor allem in der abdominalen Aorta, in den Koronarien und in den Iliakalgefäßen nachweisen, also an Lokalisationen, von denen die Beziehung zu einer klinisch relevanten Arteriosklerose bekannt ist. Weiterhin zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen der Verteilung von *C. pneumoniae* im Gefäßbett und dem Auftreten der arteriosklerotischer Veränderungen (aus 33 verschiedenen Lokalisationen des arteriellen Gefäßbaumes). Rassa et al. verglichen zur Beurteilung der Spezifität von *C. pneumoniae* bei der Arteriosklerose den Nachweis von *C. pneumoniae* mit *Helicobacter pylori* (HP) und Cytomegalivirus (CMV) aus der A. basilaris, den Koronararterien, der Aorta thoracica, der Aorta abdominalis und den Arteriae renalis, und fanden bei allen Personen, die atherosklerotisch veränderte Gefäße aufwiesen *C. pneumoniae*, während HP in nur 22,2% und CMV in 16,6% nachweisbar waren. In der Kontrollgruppe konnte *C. pneumoniae* nicht nachgewiesen werden (¹⁹⁹). Gleiche Ergebnisse wurden mit einer immunhistochemischen Färbung erreicht. Ebenso gelang es, Elementarkörperchen in arteriosklerotischen Gefäßen elektronenmikroskopisch darzustellen (^{185;201}).

1.3.4.4.3. Isolation von lebenden *C. pneumoniae*

Ein wichtiges Glied in der Kausalkette einer Erkrankung ist der Nachweis lebendiger, replikationsfähiger Chlamydien aus arteriosklerotisch veränderten Gefäßen. Dies gelang unabhängig voneinander verschiedenen Arbeitsgruppen: Zum Beispiel konnte *C. pneumoniae* in 16% in atherosklerotischen Läsionen von Koronararterien bzw. Bypass-Proben lebend isoliert werden, wobei Proben ohne atherosklerotische Veränderungen negativ blieben (in 30% Nachweis von *C. pneumoniae* mittels PCR (^{193;202-204})).

1.3.4.4.4. Tierexperimentelle Ansätze/Infektionsstudien

Tierexperimentellen Studien zur Klärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Infektionen mit *C. pneumoniae* und dem Auftreten arteriosklerotischer Veränderungen erbrachten kontroverse Ergebnisse. Einige Autoren konnten in verschiedener tierexperimentellen Modellen zeigen, dass wiederholte nasale oder intratracheale Infektionen mit *C. pneumoniae* die Entwicklung und den Progress atherosklerotische Veränderungen in arteriellen Gefäßen induzierte (^{13;14;205}). Dieser Effekt wurde besonders deutlich bei gleichzeitiger Applikation einer hypercholesterischen Diät. Auch ApoE-defiziente Mäuse, welche intranasal mit *C. pneumoniae*

cholesterischen Diät. Auch ApoE-defiziente Mäuse, welche intranasal mit *C. pneumoniae* infiziert wurden, zeigten ein um das 2,4-fach Risiko für das Auftreten atherosklerotischen Läsionen. (²⁰⁶⁻²¹⁰). Andere Arbeitsgruppen wiederum konnten keine Zusammenhang zwischen einer *C. pneumoniae* Infektion und der Entwicklung oder Akzeleration der Arteriosklerose erkennen (^{211;212}).

1.3.4.4.5. Interventionsstudien

Mit der ungewöhnlichen, aber attraktiven Vorstellung, dass ein Pathogen maßgeblich bei der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt sein könnte, ergaben sich unverhofft auch potentiell neue Therapieoptionen. Im Tiermodell konnten die proatherogenen Effekte einer Infektion mit *C. pneumoniae* durch eine Therapie mit Antibiotika (Makrolide) verhindert werden. Weiterhin konnten in diesen Modellen gezeigt werden, dass durch eine antibiotische (Vor-) Behandlung das Ausmaß atherosklerotischer Veränderungen bei Tieren, die wiederholt mit *C. pneumoniae* infiziert wurden, reduziert werden konnte (^{206;213}).

Interventionsstudien im „humanen System“ wurden anfänglich mit kleinen Teilnehmerzahlen an Patienten mit koronarer Herzerkrankung durchgeführt. Diese erhielten im Anschluss an ein schweres myokardischämisches Ereignis für mehrere Monate Azithromycin oder Roxithromycin. Die Ergebnisse deuteten an, dass es bei diesen Patienten im Vergleich zu einer Placebogruppe signifikant weniger häufig zum erneuten Auftreten schwerer kardialer Ereignisse kam. Größere Studien (ACES, WIZARD, PROVE IT) haben diese Befunde jedoch nicht bestätigt. So konnte z. B. in der WIZARD-Studie (eingeschlossen wurden 7000 kardiovaskulär stabile Patienten nach abgelaufenem Myokardinfarkt) gezeigt werden, dass innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 1-4 Jahren die Rate schwerer kardialer Komplikationen nach einer 3monatigen Antibiotikatherapie mit Azithromycin im Vergleich zur Kontrollgruppe nur um ca. 7% reduziert war (²¹⁴). Die Ergebnisse zweier weiterer Studien mit jeweils über 4000 Patienten (PROVE IT, ACES) konnten keinen Benefit einer Antibiotikaphylaxe nach einem Myokardinfarkt nachweisen (²¹⁵).

1.4. Problemstellung

Arteriosklerose ist eine inflammatorische Erkrankung (²). Verschiedene Risikofaktoren werden in Zusammenhang mit dem vermehrten Auftreten atheromatöser Plaques gebracht, das Vorliegen eines oder mehrerer dieser Risikofaktoren ist jedoch keine notwendige Voraussetzung. Die Rolle von *C. pneumoniae* in der Pathogenese der Arteriosklerose ist noch unklar. Verschiedene Arbeiten der letzten Jahre diskutieren einen Zusammenhang zwischen rezidivierenden bzw. chronisch-persistierenden *C. pneumoniae*-Infektionen und dem vermehrten Auftreten von Arteriosklerose und kardiovaskulärer Erkrankungen (KHK, Apoplex, Aneurysma-Bildung).

In dieser Arbeit sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Kann *Chlamydomphila pneumoniae* humane Endothelzellen, als die zentralen Schlüsselzellen im Rahmen arteriosklerotischer Prozesse, infizieren?
2. Führt die mögliche Infektion zur Ausbildung eines proinflammatorischen und proarteriogenen Phänotyps in den Endothelzellen mit nachfolgender möglicher Interaktion von Leukozyten und infizierten Endothelzellen?
3. Welche molekularen Mechanismen spielen bei der *C. pneumoniae*-induzierten Interaktion zwischen infizierten Endothelzellen und Leukozyten eine Rolle? Welchen Beitrag leisten insbesondere einzelne endotheliale und leukozytäre Adhäsionsmoleküle?

Es werden also die Interaktion von *C.pneumoniae* und humanen Endothelzellen als mögliche Zielzellen von Chlamydien in der Initiierung der Pathogenese der Arteriosklerose auf subzellulärer Ebene untersucht. Die Ergebnisse sollen den Weg für weiterführende Studien im Rahmen der Infektionstheorie bahnen.

2. Methoden

2.1. Zellen/Zellkultur

Im folgenden werden die verschiedenen im Rahmen dieser Studie verwendeten Zellarten (humane umbilikalvenöse Endothelzellen, humane polymorphkernige neutrophile Granulozyten, humane Monozyten, humane Monozytenzelllinie -MM6-, humane Larynxkarzinom-Zelllinie: HEp-2-Zellen) vorgestellt. Schwerpunkte werden vor allem auf die Techniken der Isolation und der Kultivierung der Zellen gesetzt.

2.1.1. Humane Endothelzellen

Wie bereits erwähnt, stehen Endothelzellen an zentraler Stelle in Rahmen systemischer inflammatorischer Prozesse, sie bilden zudem eine wichtige Barriere für invadierende Pathogene.

2.1.1.1. Isolation humaner Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC)

Die Isolation der humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) erfolgte nach einer modifizierten Form des von Jaffe et al. 1973 veröffentlichten Protokolls (²¹⁶).

Die Nabelschnüre wurden von der Abteilung für Geburtshilfe des Zentrums für Gynäkologie und Geburtshilfe der Justus-Liebig Universität (Leiter: Prof. Dr. W. Künzel) gesammelt, und bis zur weiteren Verwendung in sterilem Puffer aufbewahrt (Hanks-HEPES mit Calcium und Magnesium, H/H +/-).

Die sterile Isolierung der Endothelzellen aus der Nabelschnurvene erfolgte unter der Laminar Air Flow (LaminAir[®] H2448, Heraeus). Nach Identifizierung der Vene und der beiden Arterien wurde die Vene mit einer Braunüle[®] (18G, Braun Melsungen) kanüliert, mit sterilem Puffer ausgespült und anschließend für 20 Minuten mit 0,025 % Kollagenase Typ II gefüllt. Durch vorsichtiges Massieren der Nabelschnur und Spülen mit Medium 199 ließ sich ein Großteil der Endothelzellen von der Basalmembran ablösen und aus der Vene ausspülen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und das Pellet im Anschluß in MCDB 131 resuspendiert. Die primäre Kultivierung bei 37°C und 5 % CO₂ (Begasungsbrutschrank BB 6220, Heraeus) erfolgte in HUVEC-Medium (MCDB 131, 10 % FCS), und zwar je nach geplanter Verwendung in T80 (Aufzucht), auf 6-Well-Platten (Molekularbiologische Versuche), auf 24-Well-Platten (Adhäsionsversuche), 96-Well-Platten (Cell-Surface-ELISA, Antikörperversuche), TC ChamberSlides[™] (Im-

munzytologie) oder Thermanox[®]-Plättchen (Flow-Versuche). Um die Adhärenz und das Anwachsen der Endothelzellen zu verbessern, waren alle Kulturgefäße 60 Minuten mit Gelatine (0,5 mg/ml) vorbehandelt worden. Die Versuche erfolgten an/mit konfluenten Monolayern etwa 4-5 Tage nach der Isolation. Wichtig für die Versuche mit *Chlamydomyxa pneumoniae* war, ein Medium mit einem Antibiotikum zu verwenden, welches die Bakterien nicht in ihrer Infektiosität und im Wachstum stört. Daher befand sich in dem Kulturmedium der HUVEC Gentamycin in einer Konzentration von 50µg/ml (Gibco BRL).

2.1.1.2. Splitten von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC)

Nach Gelatinieren der entsprechenden Kulturgefäße wurden konfluente Endothelzellmonolayer in T80 mit Hanks-HEPES ohne Calcium und Magnesium (H/H -/-) gewaschen, mit 0,5 % Trypsin-EDTA abgelöst und auf die Platten verteilt (1 ml bzw. 200 µl Zellsuspension pro Well bei 24- respektive 96-Well-Platten). Die Zellen waren nach weiteren 4-5 Tagen erneut konfluent und konnten im Versuch eingesetzt werden.

2.1.1.3. Charakterisierung

Die Charakterisierung der HUVEC erfolgte nach morphologischen und immunzytologischen Kriterien (Jaffe 1982 ⁽²¹⁷⁾, 1984 ⁽²¹⁸⁾).

Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen (200x, Olympus IMT-2, Olympus, Hamburg) zeigten, daß die humanen Endothelzellen nach ca. 4-5 Tagen konfluent wurden und "Kopfsteinpflaster-artige" Monolayer bildeten. Diese Monolayer blieben ca. 2-3 Tage lang stabil. Verlängerte man die Kulturdauer über diese Zeit hinaus, so bildeten sich zunehmend "kapillarähnliche" Strukturen. Diese Strukturen verschwanden, wenn man die Zellen mit Trypsin-EDTA ablöste und in neue Kulturgefäße auspflanzte (s.o., "Splitten").

Die *immunfluoreszenzmikroskopischen* Untersuchungen (zur Methode, siehe Abschnitt 2.2.1.5.) an konfluenten Monolayern frisch isolierter HUVEC zeigten, daß die isolierten Zellen CD31-, vWF-, E-Selektin-, VCAM-1- und Vimentin-positiv, sowie Zytokeratin-negativ waren. Als weiteres Charakterisierungsmerkmal diente die für Endothelzellen typische Aufnahme von Di-azetyl-LDL ⁽²¹⁹⁾.

Erkanntes Antigen	Klon / Isotyp	Fixierung / Permeabilisierung	Verdünnung
VWF	4F9, IgG1	Azeton-Methanol / ja	1:100
Vimentin	V-9, IgG1	Azeton-Methanol / ja	1:100
Zytokeratin	CK-4, IgG1	Azeton-Methanol / ja	1:100
CD31	HEC-7, IgG2a	PFA / nein	1:250
CD62E, E-Selektin	BBIG-E4, IgG1	PFA / ja	1:250
CD106, VCAM-1	BBIG-V1, IgG1	PFA / ja	1:50

Tabelle 4: Monoklonale Antikörper zur Charakterisierung humaner Endothelzellen

2.2.2. Humane Leukozyten / Leukozytenzelllinien

Um die Interaktion von infizierten Endothelzellen mit Leukozyten zu studieren, wurden polymorphkernige neutrophile Granulozyten („polymorphonuclear neutrophils“, PMN) aus dem Blut freiwilliger Spender und Monozyten aus „buffy coats“ gewonnen („buffy coat“ = Fraktion aus der Leukozyten und Thrombozyten, gewonnen im Rahmen der Aufarbeitung von Spenderblut).

2.2.2.1. Humane polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)

Humane polymorphkernige Granulozyten wurden für jeden Versuch frisch isoliert.

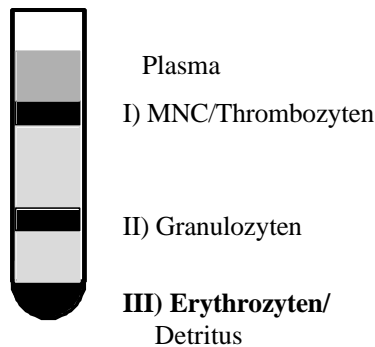
2.2.2.1.1. Isolation von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten

Die Isolation humaner PMN aus dem Blut junger gesunder freiwilliger Blutspender erfolgte über einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten nach dem folgenden Protokoll (Seeger 1996⁽²²⁰⁾):

Gradientenlösungen I + II wurden vor jeder PMN-Isolierung frisch angesetzt (4 °C):

- 4 ml der Gradientenlösung I (59 %) wurden mit 4 ml der Lösung II (70 %) unterschichtet, so dass sich eine scharfe Grenzschicht bildete.
- Aufsichten des heparinisierten Vollblut (4 ml, 10 IE Heparin/ml Blut).

- Zentrifugation des Gradient (20 min, 350 x g, RT), im Anschluß bietet sich folgendes Bild:



- Absaugen von Plasma, Bande I und Gradientenrest, um eine Kontamination mit mononukleären Zellen zu verhindern,
 - Aufnahme der Bande II in H/H +/-, Zentrifugation (5min 200 x g)
 - hypotone Lyse der Erythrozyten im resuspendierten Zellpellet (a. bidest., 20 sec)
- zweimaliges Waschen / Zentrifugieren der Zellen in H/H +/- (5 min 200 x g)
 - Aufnahme der resuspendierten Zellen in RPMI / 10 % FCS (60 min, 37°C, 5 % CO₂), ⇒ “Ruhephase”
 - zweimaliges Waschen in H/H +/+, auszählen (Neubauer-Kammer), resuspendieren in M199 o. MCDB131 (1 x 10⁶ PMN/ml)

Nach der Isolation erhielt man eine >95 % reine PMN-Suspension mit einer Vitalität > 97 % (Vitalitätsprüfung mit Propidiumjodid, Durchflußzytometrie).

2.2.2.1.2. Charakterisierung

Die Charakterisierung erfolgte nach morphologischen Kriterien (Größe ca. 8-12 µm, segmentierter Kern) und durchflußzytometrisch über den Nachweis des neutrophilen-spezifischen Antigens CD16b (gp48, Fc-gRIIIB).

2.2.2.2. Humane Monozyten

Humane Monozyten wurden für jeden Versuch frisch isoliert.

2.2.2.2.1. Isolierung humaner Monozyten

Die humanen Monozyten wurden aus “buffy coats” für jeden Versuch frisch isoliert.

Dazu wurden die buffy coats mit PBS (-/-) verdünnt und auf Ficoll Hypaque-Gradienten (Sigma) vorsichtig aufgeschichtet. Es folgte eine Zentrifugation mit 800g bei 24°C für 30 Minuten.

Die so entstandene weiße Bande bestehend aus mononukleären Zellen wurde aufgenommen, und in PBS mit 0,1% BSA aufgenommen. Wiederum wurde mit 300g für 10 Minuten abzentrifugiert. Dem folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS (-/-) + BSA. Vor dem letzten Waschschrte wurden die Zellen vereinigt. Die Zellsuspension wurde im Durchflußzytometer auf Reinheit geprüft, und in der Neugebauerkammer quantifiziert. Der Isolierung per Ficollgradient folgte eine weitere Separierung der Monozyten mittels Counter-flow-Elutriation (Sanderson, 1977⁽²²¹⁾). Hierbei werden die mononukleären Zellen in eine Kammer in einer Zentrifuge eingebracht. Entsprechend ihres Dichtegradienten und ihrer Größe werden sie durch die Zentrifugalkraft in der Kammer separiert, und mittels eines durch eine Pumpe regulierten Flusses entsprechend dieser Separierung fraktioniert aus der Kammer gespült. Man erhält somit einzelne Fraktionen mononukleärer Zellen, die durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit getestet werden. Für die Versuche dieser Studie wurden nur Zellfraktionen eingesetzt, deren Reinheit >92-94 % monozytärer Zellen betrug. Die gewonnenen Zellen wurden in RPMI-1640-Nährungslösung bis zur Verwendung im Versuchsansatz bei 37°C im CO₂-Inkubator aufbewahrt.

2.2.2.2. Charakterisierung der humanen Monozyten

Die Charakterisierung erfolgte durchflusszytometrisch über den Nachweis des monozytenspezifischen CD14 – Antikörpers auf der Oberfläche.

2.2.2.3. Kultur der Monozytenzelllinie Mono Mac 6 (MM6)

Die humane monozytäre Suspensionszelllinie Mono Mac 6 (MM6) wurde 1985 aus dem Blut eines männlichen Patienten mit monoblastischer Leukämie isoliert. Mono Mac 6 exprimieren phänotypische und funktionelle Merkmale reifer Monozyten⁽²²²⁾. MM6 wurden in Kulturflaschen (T80) kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich durch Resuspendieren gerntet und anschließend bei 4 °C, 400×g für 7 Minuten zentrifugiert. Als Standardkulturmedium diente RPMI 1640 (500 ml, Seromed Biochrom KG Berlin) mit verschiedenen Zusätzen (siehe Kap. 6, „Anhang“). Die Inkubation erfolgte im Begasungsbrutschrank BB 6220, Heraeus.

2.3. Infektionsassay

2.3.1. Chlamydienstamm

Wir arbeiteten mit dem *Chlamydomphila pneumoniae* Stamm GiD. Dieser Stamm wurde von C. A. Jantos (²²³) aus einem Patienten mit Bronchitis isoliert. Die Identifizierung und Charakterisierung erfolgte anhand folgender Kriterien: 1.) Die Erreger bildeten in der Zellkultur typische "inclusion forming units" (IFU), die sich mit einem spezies-spezifischen Antikörper färben ließen (Pathfinder, Kat.-Nr. 532; Kallestad); 2.) Sequenzanalyse des kompletten "omp1"-Gens. Den Stamm stellte Dr. Christian Jantos, Mikrobiologisches Institut der Justus-Liebig-Universität, Gießen, zur Verfügung. Er befand sich in der 24. Passage, und besaß eine Infektiosität von $6,5 \times 10^4$ IFU/ml in Cycloheximid-behandelten HEp-2-Zellen (epitheliale Larynxkarzinom-Zelllinie, Standard-Kulturzelle für *C.pneumoniae*, (ECACC Nr.: 86030501; ATCC Nr.: CCL-23), bzw. von $2,6 \times 10^3$ IFU/ml in HUVEC.

2.3.2. Infektion der HUVEC

Der Chlamydienstock wurde bei -80°C aufbewahrt. Um die angegebenen Konzentrationen zu erreichen, wurde die Stocklösung der Chlamydien jeweils 1:10 mit Medium verdünnt. Wichtig war dabei, ein antibiotikafreies Medium zu verwenden.

Zur Infektion erfolgte eine Überschichtung der HUVEC mit der jeweiligen Chlamydien suspension, anschließend wurden die Chlamydien-EB bei $800 \times g$ für eine Stunde bei 37°C auf die zellulären Monolayer „aufzentrifugiert“ (Rotor 2708, Heraeus). Dieser Vorgang dient einer vermehrten Kontakteherstellung zwischen Bakterien und Zielzellen. Nach einer weiteren Stunde der Inkubation (zur Infektion der Zielzellen) wurde der Überstand durch frisches Zellkultur-Medium ersetzt.

2.3.3. Bestimmung der Infektiosität

Die Infektiosität von *Chlamydomphila pneumoniae* wird üblicherweise in IFU/ml \cong „Inclusion Forming Unit“ pro ml in Hep2-Zellen angegeben. wobei ein „IFU“ einem lichtmikroskopisch darstellbaren Einschlusskörperchen entspricht. Bestimmt wurde die Zahl der IFU durch Auszählen der mittels eines FITC-konjugierten (FITC = Fluorescein-5-isothiocyanate) *C. pneumoniae*

genusspezifischen Antikörpers angefärbten Einschlusskörperchen (Chlamydia culture confirmation system; Sanofi Diagnostics Pasteur, Freiburg).

Dazu wurden die infizierten Zellen mit Methanol für 10 min bei -20°C fixiert und nachfolgend mit PBS (-/-) gewaschen. Dann erfolgte die Färbung mit dem FITC-markierten Antikörper (Clone: RR402, IMAGENTM, Dako) gemäß den Angaben des Herstellers für ca. 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei einer Luftfeuchtigkeit von 100% bei 37°C und 5% CO_2 . Dann konnten die angefärbten Einschlusskörperchen unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden (Olympus IMT-2, GmbH Hamburg, 483nm).

2.4. Immunzytochemie

In diesem Abschnitt werden die verschiedenen Methoden dargestellt, die mittels Antikörper-Nachweis Adhäsionsmoleküle und Zytokine nachweisen.

Bei allen eingesetzten primären Antikörpern handelte es sich um monoklonale Maus-anti-human Antikörper. Die verwendeten optimalen Konzentrationen wurden in entsprechenden Kontrollversuchen austitriert. Eine unspezifische Bindung der Antikörper an Oberflächenstrukturen der Endothelzellen und Leukozyten ließ sich durch das Absättigen der Fc-Rezeptoren mit humanem Immunglobulin (5 mg/ml Venimmun[®], Behringwerke, Marburg) verhindert. Dieses Absättigen erfolgte sowohl in den Flow-, Adhäsions-, Transmigrations- und FACS-Versuchen, als auch im Cell-Surface-ELISA. Die kurzzeitige Vorinkubation der Zellen mit Venimmun[®] hatte keine unspezifisch aktivierende oder blockierende Wirkung in den verschiedenen Assays.

Alle in den Flow- und Adhäsionsversuchen eingesetzten monoklonalen Antikörper lagen in lyophilisierter Form vor und wurden ohne Konservierungsstoffe (z.B. Natriumazid) in PBS -/- mit 0,1% BSA rekonstituiert. Für die einzelnen Versuche wurden die Endothelzellen für 30 Min. mit jeweils 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ funktionell blockierenden Antikörpern vorinkubiert, die Leukozyten für 20 Min. mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die inhibitorische Funktion der Antikörper wurde in entsprechenden Vorversuchen mit Positivkontrollen (Vorinkubation der HUVEC oder PMN mit $\text{IL}1\beta$ oder PMA für unterschiedliche Zeiten) überprüft. Ein Antikörper gegen HLA-ABC Klasse I (B9.12.1, Dianova, Hamburg) sowie ein unspezifischer IgG1/2 (Dako, Glostrup, Dänemark) dienten in allen Experimenten als Kontrolle.

2.4.1. Cell- Surface- ELISA

Die im Cell-Surface-ELISA eingesetzten monoklonalen Antikörper lagen in lyophilisierter Form vor und wurden in PBS +/- mit 0,1% BSA und 0,01% Natriumazid rekonstituiert.

Nach Stimulation mit verschiedenen proinflammatorischen Substanzen (LPS, IL1b, TNFa, etc.) exprimieren Endothelzellen u. a. verschiedene Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche. Zum qualitativen Nachweis dieser Oberflächenmarker wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Foreman et al. (²²⁴) ein direkter Cell-Surface-ELISA entwickelt.

Zuerst wurden die stimulierten Mikrotiterplatten mit PFA (1 %, 15 min, RT, lichtgeschützt) fixiert. Dann erfolgte eine Blockierung der Fc-Rezeptoren mit humanem IgG (Venimmun[®], 5 mg/ml) für zwei Minuten. Nun konnte eine spezifische Bindung der unten angegebenen primären Antikörper (Tabelle 5) über 30 Minuten bei Raumtemperatur vorgenommen werden. Unter nachfolgender Zugabe von HRP-konjugiertem Schaf-anti-Maus-Antikörper (30 Minuten bei Raumtemperatur) wurde der primäre Antikörper nach Zugabe der Substratlösung (1mg/ml OPD aktiviert mit H₂O₂, 30 %, 3 min) und Abstoppen der Enzymreaktion mit 1 M H₂SO₄ sichtbar gemacht. Die Messung der Extinktion erfolgte im Plattenphotometer bei 492 nm (SLT-Reader400, SLT, Crailsheim).

Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt und die Mikrotiterplatte dreimal mit je 200 µl PBS gewaschen.

Erkanntes Antigen	Klon / Isotyp	Konzentration	Verdünnung
ICAM-1 (CD54)	BBIG-II, IgG1	1 mg/ml	1:1000
E-Selektin (CD62E)	BBIG-E4, IgG1	1 mg/ml	1:250
VCAM-1 (CD106)	BBIG-V1, IgG1	1 mg/ml	1:50

Tabelle 5: Monoklonale Antikörper für den Cell-Surface-ELISA

2.4.2. Zytokin - ELISA aus den Zellüberständen

Nach Aktivierung von Endothelzellen werden verschiedene Zytokine freigesetzt, welche die Interaktionen zwischen Endothelzellen und Leukozyten im Rahmen einer Entzündungsreaktion medieren.

2.4.2.1. Interleukin-8-ELISA

Zur Bestimmung der IL-8-Konzentration im Zellüberstand von HUVEC wurde ein indirekter “Sandwich”-ELISA entwickelt. Nach Titration der optimalen Antikörper- und Substratkonzentrationen wurde folgendes Protokoll eingesetzt:

Die 24-Well-Platten mit konfluenten HUVEC wurden mit MCDB 131 gewaschen und mit 500 µl Versuchsmedium (MCDB 131 ohne Zusätze) pro Well überschichtet. Dann wurden die Endothelzellen mit *Chlamydomonas pneumoniae* infiziert (Protokoll s. unten) und für 1h bis 3 Tage im Brutschrank aufbewahrt. Anschließend wurde die IL-8-Konzentration im Zellüberstand mittels folgender ELISA-Methode gemessen:

Als erstes wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Maxi-Sorb[®]) mit dem monoklonalen, neutralisierenden Maus-anti-hIL-8-Antikörper (MAB208, R&D Systems, 4 µg/ml, 100 µl/Well) präpariert, nach 16 Stunden wurde die Platte ausgeschlagen und dreimalig mit Waschpuffer (PBS) gespült. Danach wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Casein-Puffer blockiert. Nach zwei Stunden Inkubation wurden die Platten dreimalig gewaschen. Dann konnten die Proben (100 µl, 1:10 mit Versuchsmedium verdünnt) und die hIL-8-Standards (Rekombinantes humanes IL-8, R&D Systems) in Duplikaten (0 ng/ml bis 5 ng/ml in sieben Verdünnungsschritten von je 1:2) pipettiert werden. Nach zwei Stunden erfolgte wiederum dreimaliges Waschen. Nachfolgend wurde der Detektionsantikörper (20 ng/ml, 100µl/Well) aufpipetiert, ein polyklonaler, biotinylierter Ziege anti-hIL-8-Antikörper (BAF208, R&D Systems). Wiederum erfolgte nach zwei Stunden ein dreimaliges Waschen. Nach einer 20-minütigen Inkubation mit Meerrettichperoxidase-konjugierten Avidin/Biotin-Komplex (Verdünnung 1:20000) folgt erneut ein dreimaliger Waschschrift. Dann wurde das Entwickler-Substrat zugegeben (Tetramethylbenzidin TMB, Sigma, 100 µl/Well), und lichtgeschützt 20 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,5 M Schwefelsäure (50 µl/Well) abgestoppt. Innerhalb von 30 Minuten erfolgte die Messung der optischen Dichte am Photometer (450 nm). Die Berechnung der IL-8-Konzentration gelang über die Erstellung einer sigmoiden Standardkurve.

2.4.2.2. MCP-1-, RANTES- und von-Willebrandt-Faktor-ELISA

Die ELISA für die Zytokine MCP-1, RANTES und von-Willebrandt-Faktor wurden nach den Versuchsvorschriften der Hersteller pipettiert (R&D Systems, MCP-1: DCP00; RANTES: DRN00)

2.4.3. Immunfluoreszenzmikroskopie

Der Nachweis auf infizierten HUVEC exprimierten Adhäsionsmoleküle wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie geführt. Hierfür wurden die HUVEC auf gelatinisierte TC-ChamberSlides™ (Glasobjektträger, 8 Kammern, Nalgene / Nunc) gepflanzt, mit PBS (-/-) gewaschen, und mit a) Azeton/Methanol (1:1, 4°C, 15 min) oder b) Paraformaldehyd (PFA, 4%, RT, 5min) fixiert. Dann erfolgte eine Permeabilisierung der PFA-fixierten Zellen mit 0,1 % Triton X100 (4°C, 10 min) Hiernach wurden die Fc-Rezeptoren mit humanem IgG (Venimmun®, 5 mg/ml, 2 min) blockiert. Dann erfolgte eine spezifische Markierung der verschiedenen Adhäsionsmoleküle mit den unten angegebenen primären Antikörper (Tab. 2.2, 30 min RT). Jetzt konnten die Antikörper mit einem FITC-markierten Schaf-anti-Maus-Antikörper (Amersham, 1:100 in PBS verdünnt) markiert werden und im Anschluß konnten immunfluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen (Exzitation: 489 nm, 40x) angefertigt werden.

Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils drei mal mit PBS -/- gewaschen.

2.5. Funktionelle Versuche

2.5.1. Adhäsionsassay unter statischen Bedingungen

In den Adhäsionsversuchen unter statischen Bedingungen wurden die Leukozyten auf infizierte/nicht-infizierte Endothelzellmonolayer (in 24/96 Well-Platten) gegeben und inkubierten mit diesen für eine bestimmte Zeit. Nachfolgend wurden die nicht adhärenen Zellen gewaschen und die adhärenen Zellen gezählt. Zur Quantifizierung der adhärenen Leukozyten eignen sich verschiedene Methoden: 1) Die adhärenen Zellen werden im Anschluss an einen Versuch mikroskopisch ausgezählt, 2) Die Zellen werden im Vorfeld des Versuchs mit einem Marker versehen, den man dann zur Quantifizierung verwendet. Hierzu werden die nach dem Waschen verbleibenden Zellen lysiert. Die Menge an vorhandenem Marker im Überstand entspricht dann der Menge an adhärenen Zellen. Berechnet wird die Adhärenz dann nach folgender Formel:

$$\text{AdhŠsion}[\%] \approx \frac{\text{gemessene Markerkonz entration} \times 100}{\text{eingesetzt e Markerkonz entration}}$$

Vorversuche zeigten, dass beide Methoden vergleichbare Ergebnisse lieferten. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sind mit Hilfe der zweiten Methode ermittelt worden, da diese Methode ein objektiveres und effizienteres Erfassen großer Datenmengen ermöglicht.

Im Gegensatz dazu wurden die Leukozyten in den Adhäsionsversuchen unter laminären Flußbedingungen ausgezählt.

2.5.1.1. Markierung mit BCECF-AM

In der Erholungsphase nach der Isolation wurden die Leukozyten mit 1 μM 2'7'-Bis-(carboxyethyl)-5(6)-Carboxy-fluoreszein-Azetoxymethylester (BCECF-AM) inkubiert (15 min, 37°C, 5 % CO_2), im Anschluß zweimal mit H/H +/- gewaschen und schließlich in Versuchspuffer (H/H +/+, 1 x 10⁶ Leukozyten/ml) resuspendiert. Der Azetoxymethylester, der dem Fluoreszeinmolekül eine hohe Zellpermeabilität verleiht, wird durch intrazelluläre Esterasen abgespalten und das Fluoreszein verbleibt in der Zelle. Vorarbeiten haben gezeigt, daß die leukozytäre Funktion (oxidative burst, Adhäsion) nicht durch BCECF beeinträchtigt wird (Daten nicht gezeigt).

2.5.1.2. Versuchsaufbau

Endothelzellen (24 / 96 Well-Platte) wurden vor dem Versuch gewaschen (H/H +/+), je nach Versuchsaufbau mit verschiedenen Substanzen (verschiedene Stimuli, Inhibitoren, mAk, etc.) vorinkubiert, und anschließend erneut gewaschen (Ausnahme: Vorinkubation mit monoklonalen Antikörpern, die während der gesamten Versuchsdauer auf den Endothelzellen blieben). Die Leukozyten wurden nach der Erholungsphase / Markierung zweimal gewaschen, in der entsprechenden Verdünnung zu den Endothelzellen gegeben (5 x 10⁶ Leukozyten/ Well bei 24 Well-Platten, 1 x 10⁶ Leukozyten/ Well bei 96 Well) und für 30 min inkubiert. Durch zweimaliges vorsichtiges Waschen der einzelnen Wells mit H/H +/+ wurden die nicht-adhären PMN entfernt. Anschließend verblieben 100 μl H/H +/+ pro Well. Die Messung der Fluoreszenz im Überstand erfolgte in einem Fluorometer (Fluoromax / Mikromax, Instruments S.A., München).

2.5.2. Adhäsionsversuch unter dynamischen Bedingungen

Die Darstellung und Charakterisierung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen unter dynamischen Bedingungen erfolgte mittels einer eigens hierfür konzipierten Flusskammer.

2.5.2.1. Aufbau

Der Aufbau der Flusskammer orientierte sich an dem von Hochmuth et al. 1973 entwickelten und von Doroszewski et al. 1977, Forrester und Lackie 1984 sowie Lawrence et al. 1987 weiterentwickelten Modell (²²⁵⁻²²⁸). Die Konstruktionspläne hierfür wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. P. Gaegtens (Institut für Physiologie, FU Berlin) zur Verfügung gestellt.

Die Kammer setzte sich aus drei verschiedenen Teilen zusammen:

1. Boden / Unterseite, gebildet durch einen Glasobjektträger (Plano/Planet GmbH, Wetzlar),
2. Dach / Oberseite, ein mikroskopierbaren Plexiglasblock, mit an den Enden eingegossenen Luer-Lock[®] Adaptern (World Precision Instruments, Berlin), über die der Zu- und Ablauf der Granulozyten erfolgte.
3. Fassung aus nichtrostendem Edelstahl, die die Ober- und Unterseite mit konstantem Druck zusammenpresst

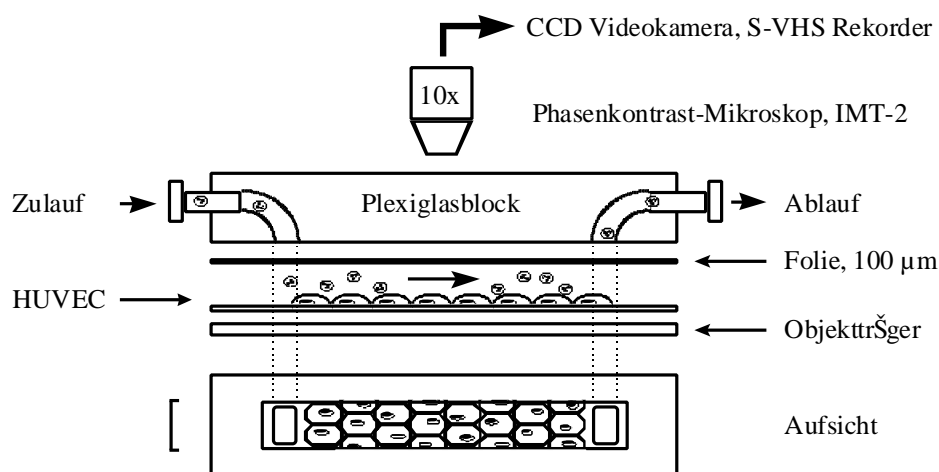


Abb. 4: Schema der Flusskammer (nicht maßstabsgetreu)

Auf den Glasobjektträger wurde ein mit Endothelzellen bepflanzt Thermanox[®]-Plättchen gelegt, hierüber kam als Dach der Kammer der Plexiglasblock mit dem Zu- und Ablauf für die Leukozyten. Getrennt wurden die beiden planen Ebenen durch eine 100 µm dicke Folie mit einem parallel ausgeschnittenem Kanal (Breite: 8 mm). Nach Einbau in die Kammer wurden die HUVEC für ca. 5 min. mit MCDB131 (37°C) überspült, um tote Zellen und Zelldetritus aus der Kammer auszuwaschen. Die Leukozyten ließen sich mittels einer Spritzenpumpe (sp100i, WPI,

Sarasota, Florida) über ein Schlauchsystem mit einer konstante Flussrate in die Kammer perfundieren:

Im Anschluss an die Stimulation wurden die Kammer für 1-2 min gespült und die Leukozyten mit einer laminaren Strömung von $1,0 \text{ dyne/cm}^2$ perfundiert.

Die Untersuchungen wurden unter einem inversen Phasenkontrastmikroskop durchgeführt (10x, Olympus IMT2, Olympus Hamburg) und mit einem angeschlossenen CCD-Videosystem (Kamera: KP-C551, Hitachi, Rodgau, VCR: JVC HR-S7000 S-VHS, JVC, Friedberg) über den kompletten Zeitraum der Leukozyten-Perfusion aufgezeichnet.

2.5.2.2. Physikalische Grundlagen

Die in der Kammer herrschende Schubspannungen ("shear stress") ließ sich nach der "momentum balance" für Newton'sche Flüssigkeiten berechnen (Busse 1997):

$$\tau = \frac{3\mu Q}{2a^2 b}$$

t	=	Schubspannung
μ	=	Viskosität
Q	=	Flußrate
$2a$	=	Höhe des Kanals (100 μm)
b	=	Breite des Kanals (8 mm)

Die für diese Berechnung nötigen Viskositäten der durch die Kammer perfundierten Flüssigkeiten sind in Tabelle 2.3 angegeben. Tabelle 2.4 gibt einen Überblick über die in verschiedenen Blutgefäßen herrschenden physiologischen Schubspannungen.

Flüssigkeit	Viskosität [mPa x s], 37 °C
Wasser	0,00700
MCDB131 ohne FCS	0,00713
MCDB131 mit FCS (10%)	0,00733
H/H +/-	0,00720

Tabelle 6: Viskositäten der verwendeten Flüssigkeiten / Trägermedien

Blutgefäß	Durchmesser [μm]	Schubspannung [dyn/cm^2]
Arterie	2000	2-20 (100)
Arteriole	60	1-10
Kapillare	4	1-2
Venole	10	0,5-2
Vene	500	2-4

Tabelle 7: physiologische Schubspannungen

2.5.2.3. Messung

Mit Hilfe der Flusskammer war es möglich, unter dynamischen Bedingungen alle drei Phasen der Leukozyten-Endothel-Interaktionen (Rollen, Adhäsion und Transmigration) darzustellen und auszuwerten. Kontrollexperimente haben gezeigt, dass die Adhäsionsdaten, die im Well-Platten Assay ermittelt wurden, mit den denen aus der Flusskammer weitgehend korrelierten, die Unterschiede waren nur quantitativer Art, nicht qualitativ. Allerdings ließ sich nur in der Flusskammer das Rollen der Leukozyten darstellen und messen. Hierzu wurde der komplette Zeitraum einer Messung videomikroskopisch aufgezeichnet (ca. 10 min / Versuch).

2.5.2.4. Vorbehandlung der Zellen

Auf Thermanox-Plättchen[®] gepflanzte HUVEC wurden mit *Chlamydomyces pneumoniae* in einer Konzentration von $6,5 \times 10^4$ IFU/ml für 4 / 24h infiziert, mit MCDB131 gespült und mit monoklonalen Antikörpern gegen E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 in einer Konzentration von $50\mu\text{g}/\text{ml}$ für eine Stunde inkubiert, in die Flußkammer eingebaut und dann mit 1×10^6 Leukozyten/ml (Monozyten oder PMN) superperfundiert. Alternativ sind die Leukozyten mit monoklonalen Antikörpern gegen b_1 oder b_2 Integrinen für 10 min mit einer Konzentration von $10\mu\text{g}/\text{ml}$ vorbehandelt und nachfolgend dem infizierten Endothelzellmonolayer in der Flußkammer zugeführt worden.

2.5.2.5. “Rollen” unter dynamischen Bedingungen

Rollende Leukozyten wurden über einen Zeitraum von drei Minuten ausgezählt. Hierzu wurde das Band zurückgespult und mittels “slow motion” bei 6-9 fach langsamerer Geschwindigkeit betrachtet. Alle Zellen, die wiederholt in reversiblen Kontakt mit dem Endothel traten ohne wirklich zu adhären (s.u.) wurden als rollende Zellen gewertet.

2.5.2.6. Adhäsion unter dynamischen Bedingungen

Am Ende des Versuch, nach Perfusion aller Leukozyten (nach ca. 10 min), wurden vier weitere Einstellung (“high power fields”) aus dem mittleren Drittel der Kammer zufällig ausgewählt und als Videobild aufgenommen. Eine Zelle galt als adhären, wenn sie länger als 30 Sek. an einer Stelle auf dem Monolayer hängen blieb. Das Band wurde zurückgespult und bei 6-9 fach langsamerer Geschwindigkeit alle adhären Zellen ausgezählt, ebenso alle adhären Zellen der vier zusätzlichen Bilder.

2.5.3. Transmigrationsassay

Für die Transmigrationsversuche wurden Transwell-Systeme (Transwell®, Corning Costar) verwendet, in dem beide Kammern durch eine permeable Membran getrennt sind. In der Membran befinden sich 8 µm große Poren.

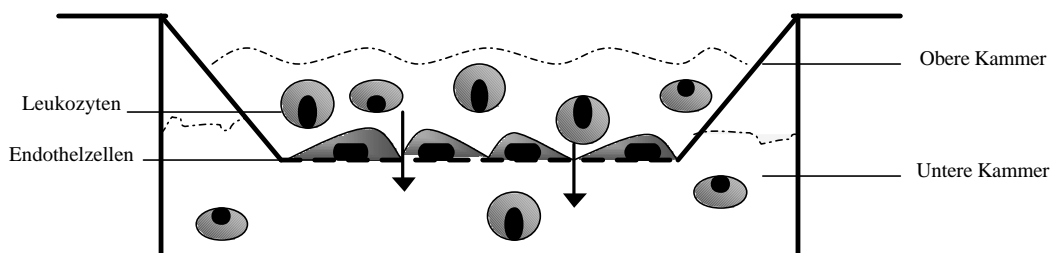


Abb. 5: Transwell-System (nicht maßstabsgetreu)

Die Endothelzellen wurden auf der Transwell-Membran nach o.g. Schema gezüchtet und nachfolgend für verschiedene Zeiten und mit verschiedenen Konzentrationen von *Chlamydomphila pneumoniae* infiziert.

Nach den Inkubationszeiten wurden BCECF-markierte Leukozyten (Färbeprozedur s.o.) in die obere Kammer eingebracht und eine Stunde bei 37° mit den Endothelzellen inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit 0,1% Triton X-100 lysiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in einem Fluorometer (s.o.).

Erkanntes Antigen	Klon / Isotyp	Konzentration	Inkubationszeit
E-Selektin (CD62E)	BBIG-E4, IgG1	50µg/ml	60 min
VCAM-1 (CD106)	BBIG-V1, IgG1	50µg/ml	60 min
CD11b/CD18	44/7E4	10µg/ml	10 min
CD49d	HP2/1	10µg/ml	10 min

Tabelle 8: Blockierende Monoklonale Antikörper für Rolling, Adhäsion und Transmigration

2.6. Molekularbiologische Assays

2.6.1. NF-κB-Reportergen-Assay (Prinzip)

Ein Plasmid, welches 3 x 2 hintereinandergeschaltete NF-κB Bindungsstellen (gekoppelt an ein HIV-Enhancer-Gen) enthielt, wurde transient in Endothelzellen transfiziert. Durch einen Stimulus aktiviertes NF-κB konnte sich an die NF-κB-Bindungsstellen des transfizierten Plasmids anlagern und so die Transkription des Luziferasegens induzieren. Über die Quantifizierung der Emission von Licht im Luminometer (Lumat LB 9501, Berthold, Bad Wildbad) wurde die NF-κB Aktivierung in transfizierten Endothelzellen (stimuliert versus unstimuliert) ermittelt.

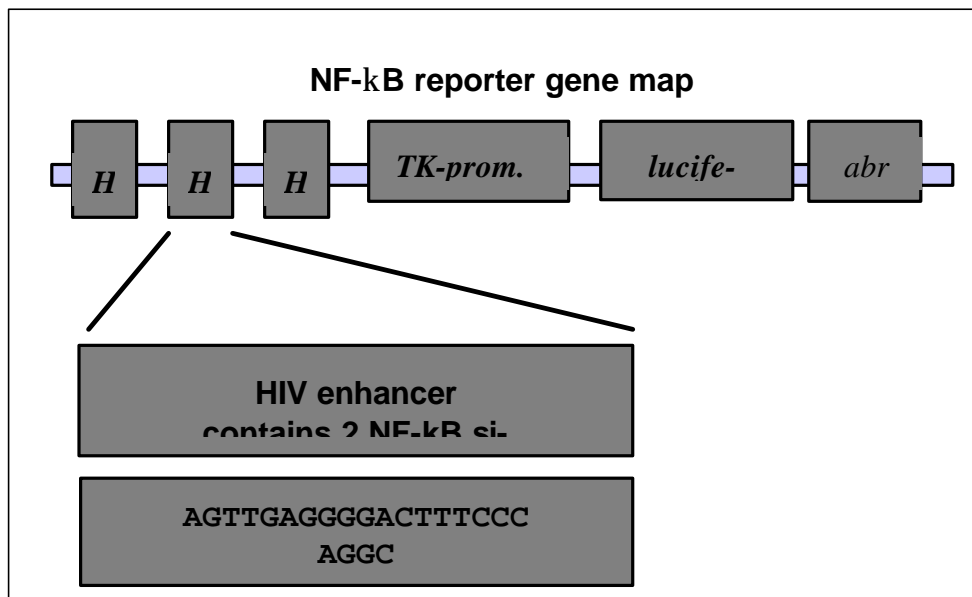


Abb. 6: NF- κ B Reporter Gen

2.6.1.1. Transiente Transfektion humaner Endothelzellen

SuperFect (Qiagen) ist ein polykationisches Transfektionsreagenz definierter Form und Größe. Die positive Nettoladung der SuperFect-DNA-Komplexe ermöglicht die Anlagerung an die negativ geladene Oberfläche eukaryontischer Zellen. Über Endozytose gelangen die Komplexe ins Zellinnere. Im lysosomalen Kompartiment der Zelle verhindert SuperFect durch Inhibition der lysosomalen Nukleasen einen pH Anstieg und ermöglicht so den unversehrten Transport der transfizierten DNA in den Zellkern. Wenn Zellen transient transfiziert werden, gelangt die transfizierte DNA in hohen Mengen in den Zellkern und führt zu einer starken Expression des gewünschten Proteins (hier: Luziferase), integriert jedoch nicht ins Chromosom.

Der Reporter-gen-Assay wurde auf 6-well Platten in Triplicats durchgeführt. Pro Ansatz (eine 6-well) wurden 2 μ g DNA in TE-Puffer, 150 μ l Medium (MCDB 131 ohne Zusätze) und 15 μ l SuperFect-Transfektionsreagenz zusammengegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Komplexbildung wurden die primären Endothelzellen mit PBS gewaschen, mit 2 ml Medium (MCDB 131 mit 10% FCS) überschichtet und anschließend der Transfektionsansatz zugegeben. Die Transfektion erfolgte für zwei Stunden bei 37°C im CO₂ Inkubator (5%), danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

Neben dem NF- κ B-Reporter-Plasmid mit den drei aufeinander folgenden NF- κ B Konsensus-Bindungsstellen (*pGL3.BG.6κB*) wurde als Negativkontrolle ein mutiertes NF- κ B-Reporter-Plasmid (*pGL3.BG.6κB-mut*) ebenfalls transient transfiziert. Aktiviertes NF- κ B konnte nicht an die mutierten Konsensusabschnitte binden, somit nicht die Expression des Reportergens Luziferase induzieren und führte daher zu keiner messbaren Luziferaseaktivität.

Die Kontrolle der Transfektion erfolgte über einen β -Galaktosidase Test. Hierfür wurden die Endothelzellen mit dem *pSV-Beta-Galaktosidase-Kontroll-Vektor* (Promega) transfiziert. Erfolgreich transfizierte Zellen können β -Galaktosidase exprimieren und erscheinen nach der Fixierung mit Glutaraldehyd und der Zugabe von X-Gal Lösung blau. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch im Phasenkontrast-Mikroskop. Alle transfizierten 6-wells zeigten eine fast gleiche Anzahl blau gefärbter Endothelzellen, so dass bei Wiederholung eine konstante Transfektionsrate vorausgesetzt wurde.

2.6.1.2. Messung der NF- κ B-Aktivierung durch Luziferase-Aktivität

In Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} und Sauerstoff katalysiert das Enzym Luziferase eine Biolumineszenz-Reaktion, bei der Photonen emittiert werden. Diese Lichtsignale können in einem Luminometer detektiert und quantifiziert werden.

Die Analyse der Reportergenaktivität erfolgte mindestens 6 Stunden nach Stimulation (d.h. 8h nach Transfektion). Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 400 μ l Reporter Lysepuffer 1x (Promega) /pro well abgelöst. Die Zellfragmente wurden durch Zentrifugieren (2 min, 13000 rpm, 4°C) pelletiert und die Luziferase-Aktivität aus dem gewonnen Überstand im Luminometer bestimmt. Dabei wurden die relativen Lumineszenzwerte gegen den totalen Proteingehalt der Probenansätze abgeglichen.

2.6.2. Untersuchung der DNA-Protein-Wechselwirkung mittels Gel-Retentionsanalyse („EMSA“)

Da die Etablierung eines Reportergensystems sehr zeitaufwendig ist, die Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren nach Chlamydien-Stimulation trotzdem untersucht werden sollte, wurde auf die klassische Methode der Gel-Retentionsanalyse zurückgegriffen („electromobility shift assay“, EMSA).

Mittels Gel-Retentionsanalyse kann die Interaktion zwischen DNA-bindenden Proteinen (Transkriptionsfaktoren) und DNA-Molekülen analysiert werden. Das Prinzip der Retentions-

analyse beruht auf einem Vergleich der Laufgeschwindigkeiten eines proteinfreien DNA-Fragmentes mit der eines mit dem Protein komplexierten DNA Fragmentes in einem nicht denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel. Die Komplexierung mit einem Protein verlangsamt die Laufgeschwindigkeit, da der gebildete DNA/Protein-Komplex langsamer migriert als das proteinfreie DNA Fragment. Unter Verwendung radioaktiv markierter (NF- κ B) Oligonukleotide (siehe 2.4) konnte das Bandenmuster der DNA/Protein-Komplexe und freier DNA durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

2.6.2.1. Gewinnung von Zellkernproteinen

Die Endothelzell-Monolayer (ca. 5×10^6 Zellen) wurden mit eiskaltem PBS (-/-) gewaschen und auf Eis in 200 μ l EMSA Puffer A abgelöst. Nach maximal zehnmütiger Inkubationszeit wurden die Proben für 2 min bei 13000 rpm pelletiert, der Überstand mit den cytosolischen Proteinen verworfen und das Pellet, bestehend aus den Zellkernen, in 15 μ l Puffer B homogenisiert. Die Proben werden für mindestens 15 Minuten auf Eis gelagert und dann für zehn Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand, welcher die Kernproteine enthält, wird anschließend in 65 μ l Puffer C aufgenommen und kann so bei -20°C gelagert werden.

2.6.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration – Bradford-Test

Der Bio-Rad Protein-Assay (Bio-Rad), basierend auf der Methode nach Bradford (²²⁹) wurde zur Konzentrationsbestimmung der Proteine eingesetzt. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue*[®] verlagert sich nach Proteinbindung von 465 auf 595 nm. Die Messung erfolgte bei 495 nm in einem Spektralphotometer. Über eine Standardkurve konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

Zur Erstellung der Standardreihe wurden 1-8 μ g Protein (1-8 μ l BSA-Stocklösung; 1mg/ml) in Doppelwerten pipettiert. Ebenso werden 1, 5, 10 μ l der zu bestimmenden Proteinlösung vorgelegt und nachfolgend mit 200 μ l Bradford-Lösung versetzen (Coomassie-Reagenz mit Bideest verdünnt). Mindestens für fünf Minuten, aber nicht mehr als 1 Stunde sollen nun die Proben bei Raumtemperatur inkubieren und wurden danach bei einer Absorption von 595 nm im Plattenphotometer messen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte im Vergleich mit der Standardkurve

2.6.2.3. Radioaktives Markieren von Oligonukleotiden: End-Labeling (Phosphat-Austausch-Reaktion)

Mit dieser Methode werden nur die Enden der Oligonukleotide radioaktiv markiert. In Gegenwart von überschüssigem ADP wird ein 5'-Phosphat-Rest der DNA auf ein ADP übertragen und die entstandene 5'-Hydroxy-Gruppe phosphoryliert. Die 5'-Phosphat-Enden der vorliegenden Oligonukleotide wurden also durch die Übertragung des γ -Phosphat-Restes aus γ - ^{32}P -ATP (6000 CI/mmol) markiert. Dazu wurden 2 μl Oligonukleotid (3,5 pmol), 1 μl 10x Kinase-Puffer, 4 μl H_2O , 2 μl γ - ^{32}P -ATP und 1 μl T4-Kinase (10 U/ μl) zusammengegeben, für 30 in bei 37°C inkubiert und nach der Reaktion mit 1 μl 0,5 M EDTA abgestoppt. Nichteingebaute Nukleotide wurden durch Zentrifugation (750 x g, 2 min) über Sephadex G25-Säulen (Amersham-Pharmacia) abgetrennt.

2.6.2.4. Gel-Retentionsanalyse

Mittels Bradford-Test erfolgte zunächst die Bestimmung der Proteinkonzentration in der Probe. 5 μg des Kernproteinextraktes pro Probe wurden mit 5x „binding buffer“ (siehe Kap. 6, Anhang) versetzt und mit der entsprechenden Menge H_2O auf ein Volumen von 24 μl aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurden zu den Proteinproben 1 μl markiertes Oligonukleotid für 30 Minuten bei 0°C (auf Eis) zugegeben. Die Proben wurden dann in einem 6 %-igen Polyacrylamid-Gel mit 0,25 x TBE als Laufpuffer aufgetrennt (190V, 2h), das Gel anschließend getrocknet und bei -80°C über Nacht auf einem Röntgenfilm exponiert.

In Kompetitions-Experimenten wurde zehn Minuten vor Inkubation mit dem markierten Oligonukleotid unmarkiertes Oligonukleotid in 100-fachem Überschuß zugegeben. Damit wurden die entsprechenden Bindungsstellen der Kernproteine bereits abgesättigt und die geshiftete Bande war im Autoradiogramm nicht mehr zu erkennen.

2.6.3. Northern Blot

Die zu untersuchende RNA wird unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe der Blotting-Technik auf eine geeignete Trägermembran (Nitrocellulose) übertragen. Nach Hybridisierung der Trägermembran mit $^{32}\alpha$ -dCTP markierten zur gesuchten RNA komplementären DNA-Sonden, kann die RNA durch Autoradio-

graphie auf der Trägermembran sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens läßt sich nicht nur die Größe der gesuchten RNA, sondern auch ihre Menge bestimmen.

2.6.3.1. RNA-Isolierung

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurde der RNeasy Total RNA Isolationskit (Qiagen) verwendet und entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die stimulierten Endothelzellen lysiert, die DNA durch Scherung zerkleinert (Qiashreder, Qiagen) und die RNA nach dem oben erwähnten Protokoll isoliert. Die weitere Aufreinigung zur mRNA konnte über Oligo dT Magnetbeads (Promega) nach Angaben des Herstellers erreicht werden. Die Konzentration der RNA-Proben wurde bei 260 nm bestimmt.

2.6.3.2. Random-Priming von DNA-Sonden

Das Verfahren bezieht sich auf die Methode von Feinberg und Vogelstein von 1983 (²³⁰) und beruht auf der Verwendung einer chemisch synthetisierten Mischung aller statistisch denkbaren Hexanukleotide. Nach statistischen Berechnungen befindet sich auf einem DNA-Strang alle 100 bp eine Sequenz, die komplementär zu einem der vorhandenen Hexanukleotidprimern ist. Dieser Primer hybridisiert dann an die DNA und dient in einer nachgeschalteten Enzymreaktion der Klenow-Polymerase als Startstelle. Radioaktives $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP im Reaktionsansatz wird in den neusynthetisierten Strang eingebaut und dieser somit markiert.

Zur Durchführung dieser Reaktion wurde der Rediprime-Labeling Kit (Amersham-Pharmacia) verwendet. Dieses System erlaubt effizientes Markieren der DNA durch den Einsatz von Nonamer-Primern. 25 ng DNA wurden mit 4 μl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol) 15 min bei 37°C markiert. Die markierte DNA wurde dann von nicht eingebauten Nukleotiden durch Zentrifugation (750 x g, 2 min) über Sephadex G 50-Säulen (Amersham-Pharmacia) abgetrennt. Für die Hybridisierung wurden ca. 1×10^6 cpm eingesetzt.

2.6.3.3. RNA-Transfer auf Nylon-Membranen

- **Probenvorbereitung:**

Je 10 μg RNA wurden mit demselben Volumen Gelladepuffer (ca. 20 μl) 10 min bei 60°C denaturiert und anschließend auf Eis mit je 2 μl Ethidiumbromid und 2 μl Orange G versetzt. Danach werden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt.

- **RNA-Gelelektrophorese:**

Die Auftrennung erfolgt über ein 1%-igen denaturierenden Agarose-Gel (1,5h, 90mA, 1x MOPS-dilute).

- **Blotting und UV-Crosslinking:**

Von uns wurde das Nassblotting-Verfahren gewählt. Bei dieser Technik wurde das Gel auf eine Papierfilterschicht gelegt, die in eine Transferlösung (20xSSC) eintauchte. Über dem Gel lag der Transfer-Filter, auf diesem wiederum eine dicke Lage von Saugpapieren. Über die wirkenden Kapillarkräfte wurde der Transferpuffer durch das Gel hindurch gesaugt. Dabei wurden die Nukleinsäure-Moleküle aus dem Gel herausgelaugt und blieben an der Nitrocellulose-Membran hängen.

Die Bindung von Makromolekülen an Nitrocellulose-Filter erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken. RNA kann durch vorsichtige Bestrahlung auf dem Filter immobilisiert werden. Der Vorgang erfolgte bei einer Energie von 1200J im UV Crosslinker für ca. 0,5 Minuten. Nukleinsäuren werden hierbei durch Reaktion zwischen den durch UV-Licht aktivierten Uracil-Resten und den primären Amin-Gruppen der Nylon-Matrix kovalent an den Nylon-Filter gebunden.

2.6.3.4. Hybridisierung der Filter

Der Blotting Filter wurde für ca. vier Stunden bei 42°C zur Absättigung der Membran und Verhinderung unspezifischer Bindungen zwischen markierter Sonde und Filter vorhybridisiert. Danach wurde die frisch denaturierte Sonde (5 min bei 100°C) zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei fünf Umdrehungen pro Minute inkubiert. Eine Folge von Waschschrinen beendete die Hybridisierung. Wenn der Filter nahezu frei von unspezifisch gebundener Sonde war, konnte er in Folie eingeschweißt und auf einem Röntgenfilm bei -80°C exponiert werden.

2.6.3.5. RNA Quantifizierung

Die Detektion der auf dem Membranfilter gebundenen radioaktiven Signale erfolgte über photosensitive Filme (Hyperfilm, Kodak). Der eingeschweißt RNA-Filter konnte je nach Stärke der Signale für sechs bis 24 Stunden bei -80 °C exponiert werden. Anschließend wurden die Northern Blots entwickelt und ausgewertet.

2.7. Statistische Auswertung

Abhängig von der Anzahl der verschiedenen Gruppen an Infektionsdosen und der verschiedenen Zeitpunkte wurden die im Ergebnisteil abgebildeten Daten der Abb. 9 (Leukozytäre Adhäsion), Abb 15 a,c,e (Expression von Adhäsionsmolekülen) und Abb. 16 (Chemokin-Expression) durch eine zweifaktorielle ANOVA (Varianzanalyse) analysiert. Die Daten der Abb. 8 (Rolling der Leukozyten), Abb. 14 (Transmigration der Leukozyten), der jeweiligen Abbildungen der Reduktion von Adhäsion und Transmigration durch blockierende Antikörper: Abb 10,11,12,13, sowie der Abb. 15 b,d,f (Expression von Adhäsionsmoleküle), Abb. 20 a-c (Northernblot-Analyse) und Abb. 19 (NF- κ B-Reporterassay) wurden durch eine einfaktorielle ANOVA analysiert. Werte mit einem $p < 0,05$ werden als signifikant eingestuft (Dunn OJ, and Clark VA Applied statistics: Analysis of Variance and Regression, John Wiley & Sons. New York)

3. Ergebnisse

3.1. *Chlamydophila pneumoniae* infiziert humane umbilikalvenöse Endothelzellen und humane aortale Endothelzellen

Als Erstes galt es herauszufinden, ob der *C. pneumoniae* Stamm GiD⁽²²³⁾ in der Lage war, Endothelzellen zu infizieren und darüber hinaus auch zu aktivieren. Die Versuche wurden mit humanen umbilikalvenösen (HUVEC) und aortalen (HAEC) Endothelzellen ausgeführt.

In einem Infektionsassay konnte die Infektion und die Replikation von *Chlamydophila pneumoniae* mit Ausbildung von Einschlusskörperchen (IFU) in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurden diese Versuche zur Bestimmung der Infektiösität (dokumentiert in „IFU/ml“) eingesetzt. Der *C. pneumoniae* Stamm GiD hatte einen durchschnittlichen Infektionstiter von $2,6 \times 10^3$ IFU/ml in humanen umbilikalvenösen und aortalen Endothelzellen sowie $6,5 \times 10^4$ IFU/ml in Cycloheximid-behandelten HEp-2-Zellen (Daten nicht gezeigt).

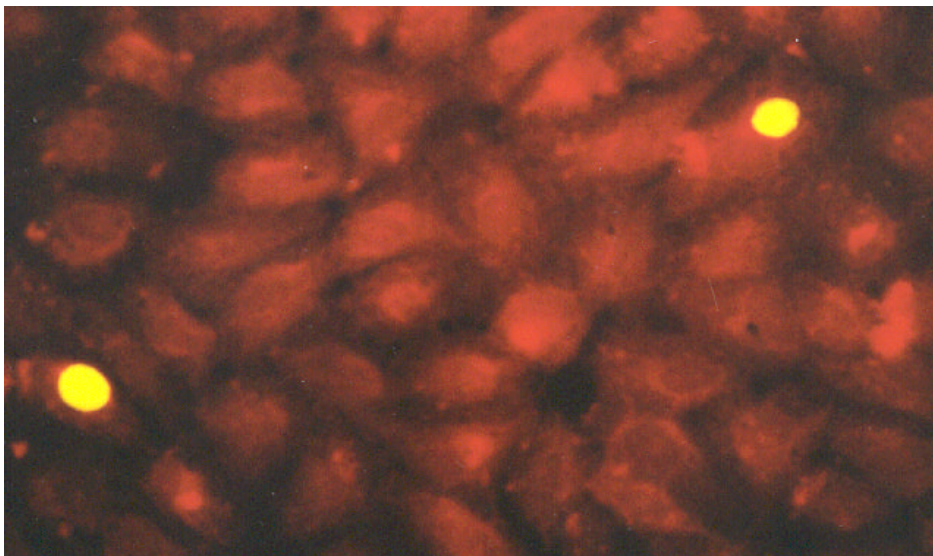


Abb. 7: Infektion von humanen Endothelzellen, HUVEC, mit Stamm GiD (x400)

Die Einschlusskörperchen wurden immunfluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung eines Chlamydien-spezifischen, FITC-markierten Antikörpers (Clone: RR402, IMAGENTM, Dako) visualisiert.

3.2. *C. pneumoniae*- induzierte Leukozyten- Endothelzell-Interaktionen

Um die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen nach Infektion der Endothelzellen mit *C. pneumoniae* zu untersuchen, wurden auf Thermanox-Plättchen[®] gepflanzte HUVEC mit den angegebenen Konzentrationen von Stamm GiD infiziert und dann in den nachfolgend beschriebenen verschiedenen Versuchsansätzen mit Leukozyten in Kontakt gebracht.

3.2.1. Monozyten- "Rolling" über infizierte Endothelzellen

Der erste Schritt der Leukozyten-Endothel-Interaktionen ist das "Rolling" der Leukozyten entlang der Oberfläche inflammatorisch veränderter Endothelzellen. Die Rollgeschwindigkeit liegt mit einem Mittel von 20-60 $\mu\text{m}/\text{sec}$ immer deutlich unter der normalen Strömungsgeschwindigkeit des Blutes (1-3 mm/sec in 30 μm dicken Venolen, (⁷¹)). Endothelzellen, die konfluent auf Thermanox-Plättchen[®] gepflanzt waren, wurden mit *C.pneumoniae* in einer Konzentration von $6,5 \times 10^4$ IFU/ml infiziert, nach vier Stunden bzw. 24 Stunden in die Flußkammer eingesetzt, für ca. fünf Minuten mit MCDB131 gespült und im Anschluß mit 3×10^5 Monozyten/ml mit laminarer Strömung ($1 \text{ dyn}/\text{cm}^2$) superperfundiert. Die rollenden Monozyten wurden über eine Beobachtungsperiode von drei Minuten gezählt.

Es konnte gezeigt werden, dass das „Rolling“ der Monozyten über infizierte Monolayer nach vier und 24 Stunden im Vergleich zu nichtinfizierte Endothel deutlich erhöht war (Abb. 8). Die Zellen rollten ruckartig und mit größeren Sprüngen bei einer Geschwindigkeit („velocity“) von ca. 30-40 $\mu\text{m}/\text{sec}$. Längere Inkubationszeiten erhöhten nicht mehr die Anzahl rollender Zellen, man beobachtete jedoch eine deutliche Zunahme der - nach einer kurzen Phase des Rollens - fest adhärierenden Leukozyten (s.u., Abb.8 und 9).

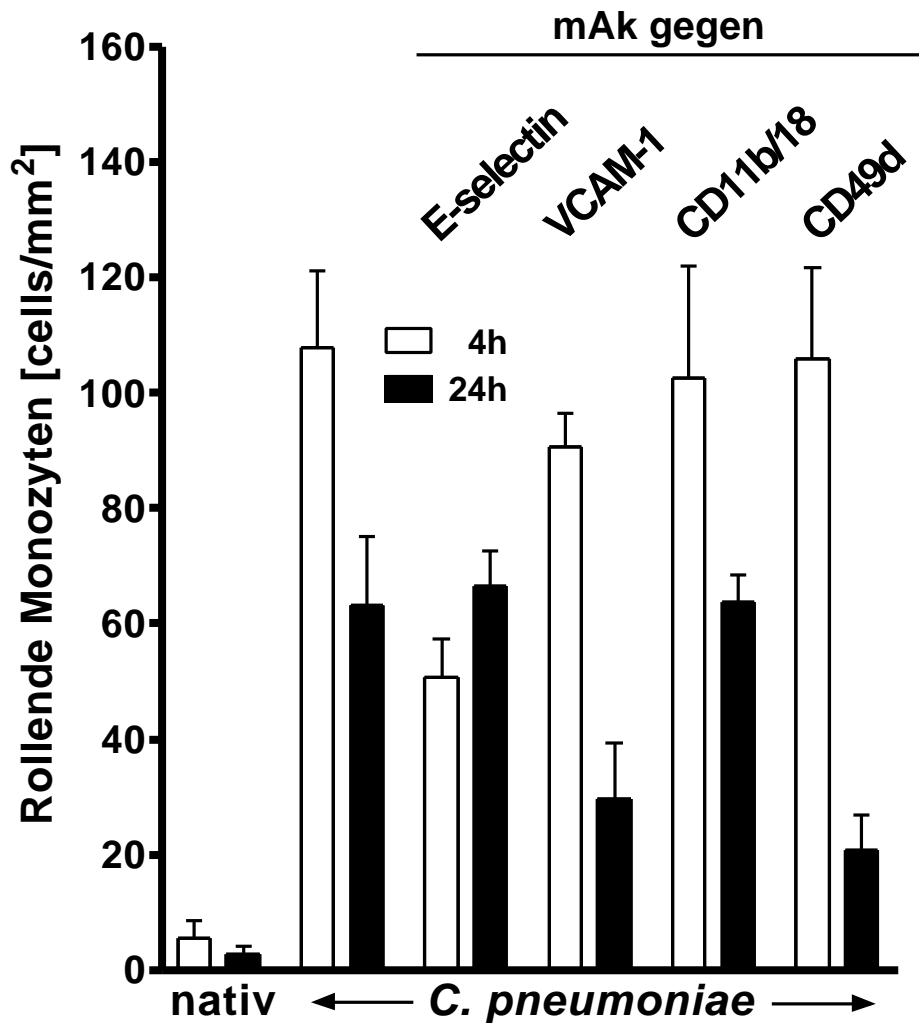


Abb. 8: Monozyten-„Rolling“ über infizierte humane Endothelzellen
Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus 5 separaten Experimenten.

Das *C.pneumoniae*-vermittelte Rollen konnte nach vier Stunden mittels Vorinkubation der HUVEC mit einem monoklonalen Antikörper (mAk) gegen endotheliales E-Selektin reduziert werden (um 56%), Vorinkubation der HUVEC mit einem anti-E-Selektin-Ak nach 24 Stunden post infectionem (p.i.) blieb ohne Effekt.

Vorinkubation der Monozyten mit einem Antikörper gegen CD11b/CD18 oder CD49 oder Vorinkubation der Endothelzellen mit einem Antikörper gegen endotheliales VCAM-1 hatten vier Stunden post infectionem keinen Effekt auf das Rollen der Monozyten auf der Oberfläche der infizierten HUVEC. 24 Stunden post infectionem allerdings reduzierte die Vorinkubation der Endothelzellen mit anti-VCAM-1, und die der Monozyten mit anti-CD49 das Rollen der Monozyten um 55%, bzw. um 70%. Der Einsatz von Anti-CD11b/CD18 Antikörpern blieb auch 24 Stunden nach Infektion ohne Effekt auf das Rollen der Monozyten.

3.2.2. *C.pneumoniae* induziert leukozytäre Adhäsion an endothelialen Monolayern

In der zweiten Phase der Leukozyten-Endothel-Interaktion kommt es einerseits zu einer Aktivierung der Leukozyten-Integrine und andererseits zu einer „de novo“ Synthese endothelialer Adhäsionsmoleküle durch die Bindung von Chemokinen/Zytokinen aus dem umliegenden Gewebe, aus infiltrierten/infiltrierenden Leukozyten und aus den Endothelzellen selbst.

Unter dynamischen Bedingungen (Flusskammerexperimente) konnte eine zeit- und dosisabhängige vermehrte Adhäsion von Leukozyten an infizierten humanen Endothelzellen gezeigt werden mit einem maximalen Effekt bei einer Konzentration von $6,5 \times 10^4$ IFU (Abb. 9). Erste adhärende Monozyten konnten zwei Stunden p.i. dokumentiert werden. Die Adhäsion erreichte nach vier (PMN- polymorphonuclear neutrophils) bzw. 12 Stunden (Monozyten) p.i. ihr Maximum, und blieb bis zu einem Zeitpunkt von 72 Stunden nach Infektion erhöht.

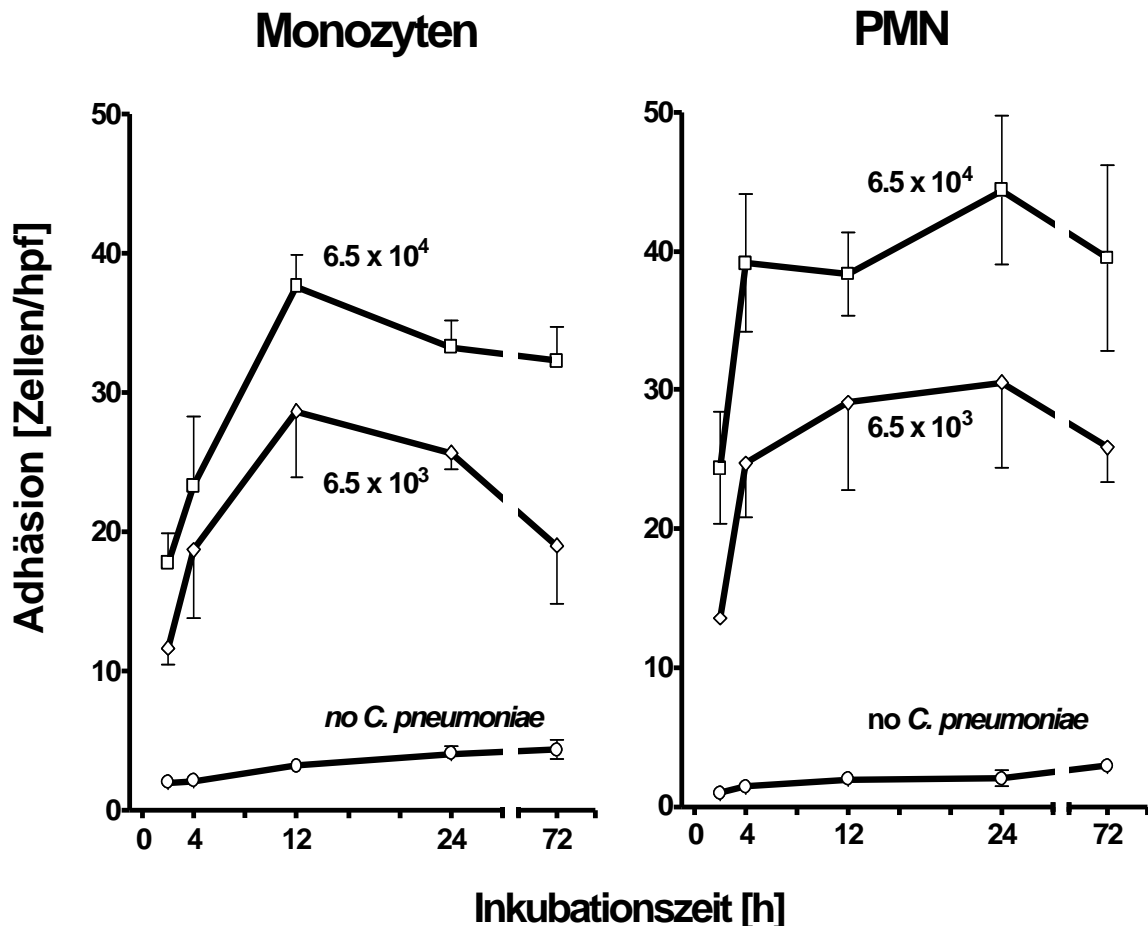


Abb. 9: Adhäsion von Leukozyten (Monozyten und PMN) an infizierten humanen Endothelzellen (Flusskammer).

Die Adhäsion von Leukozyten wurde nach einer einer fünfminütigen Perfusion der Leukozyten über die infizierten Monolayer durch randomisierte Analyse von zehn mikroskopischen Einstel-

lungen/Bildern („high power fields“, hpf) ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte der absoluten Anzahl adhärenter Leukozyten/hpf dargestellt. Vorversuche (Screening-Experimente) zur Bestimmung der adhärenrenden Zellen im statischen System (siehe Abschnitt 2. Methoden) lieferten äquivalente Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.1. Modifikation der *C. pneumoniae*-induzierten Adhäsion durch monoklonale Antikörper gegen endotheliale Adhäsionsmoleküle

Auf Thermanox-Plättchen[®] gepflanzte HUVEC wurden mit *C. pneumoniae* in einer Konzentration von $6,5 \times 10^4$ IFU/ml infiziert und für vier bzw. 24 Stunden inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen mit MCDB131 gespült und mit monoklonalen Antikörpern gegen E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 in einer Konzentration von je 50 $\mu\text{g/ml}$ für eine Stunde inkubiert, in die Flußkammer montiert und nachfolgend mit 3×10^5 bzw. 1×10^6 Leukozyten/ml (Monozyten oder PMN) superperfundiert.

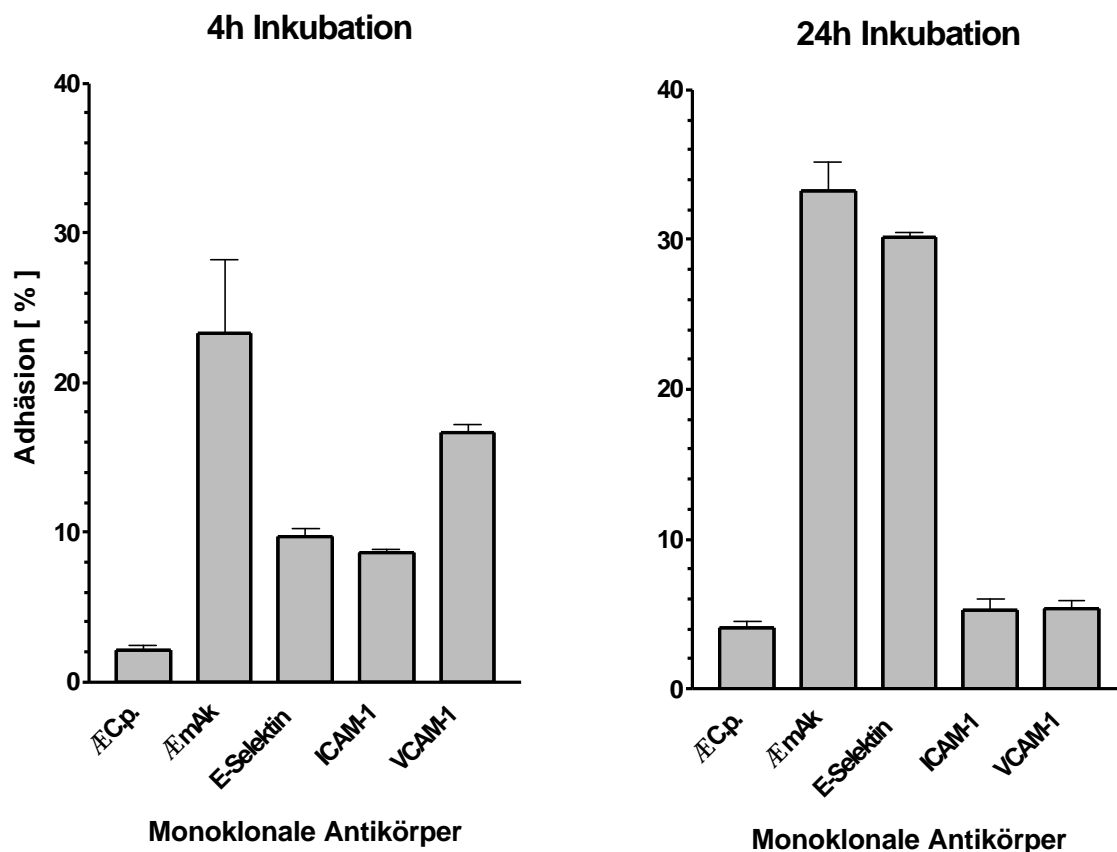


Abb. 10: Effekte monoklonaler Antikörper gegen endotheliale Adhäsionsmoleküle auf die *C.pneumoniae*-induzierte Monozytenadhäsion

Vorinkubation der *C. pneumoniae*-infizierten HUVEC mit mit o.g. Antikörpern reduzierte die Adhäsion von Monozyten vier Stunden p.i. um 58,3% (anti-E-Selektin) bzw. 63,2% (anti-ICAM-1). Eine Reduktion der Adhäsion durch einen monoklonalen Antikörper gegen VCAM-1 war zu diesem Zeitpunkt nur geringfügig nachweisbar (Reduktion um 28,5%).

24 Stunden p.i. konnte durch die Vorinkubation der HUVEC mit einem anti-VCAM-1 mAk eine Reduktion der adhärierenden Monozyten um 83,8% erzielt werden, der monoklonale Antikörper gegen das E-Selektin blieb zu diesem Zeitpunkt wirkungslos (Reduktion um 9,3%, n.s.). Vergleichende Untersuchungen mit PMN zeigten, dass nach 4 Stunden eine VCAM-1 vermittelte Adhäsion nur eine untergeordnete Rolle spielte (Reduktion nach 4 Stunden um 3,3%). Jedoch liess sich die PMN-Adhäsion mittels Antikörper gegen E-Selektin um 45,5% und mittels Antikörper gegen ICAM-1 um 42,8% reduzieren. Anders (aber entsprechend der monozytären Adhäsion) stellt sich die Reduktion der Adhäsion der PMN nach 24 Stunden dar: Hier Können Antikörper gegen VCAM-1 eine Reduktion um 24,2% erreichen, während anti-E-Selektin mit einer Reduktion von 5,3% weitestgehend ineffektiv blieben. Für weitere Details sei an dieser Stelle auf Tabelle 9 verwiesen.

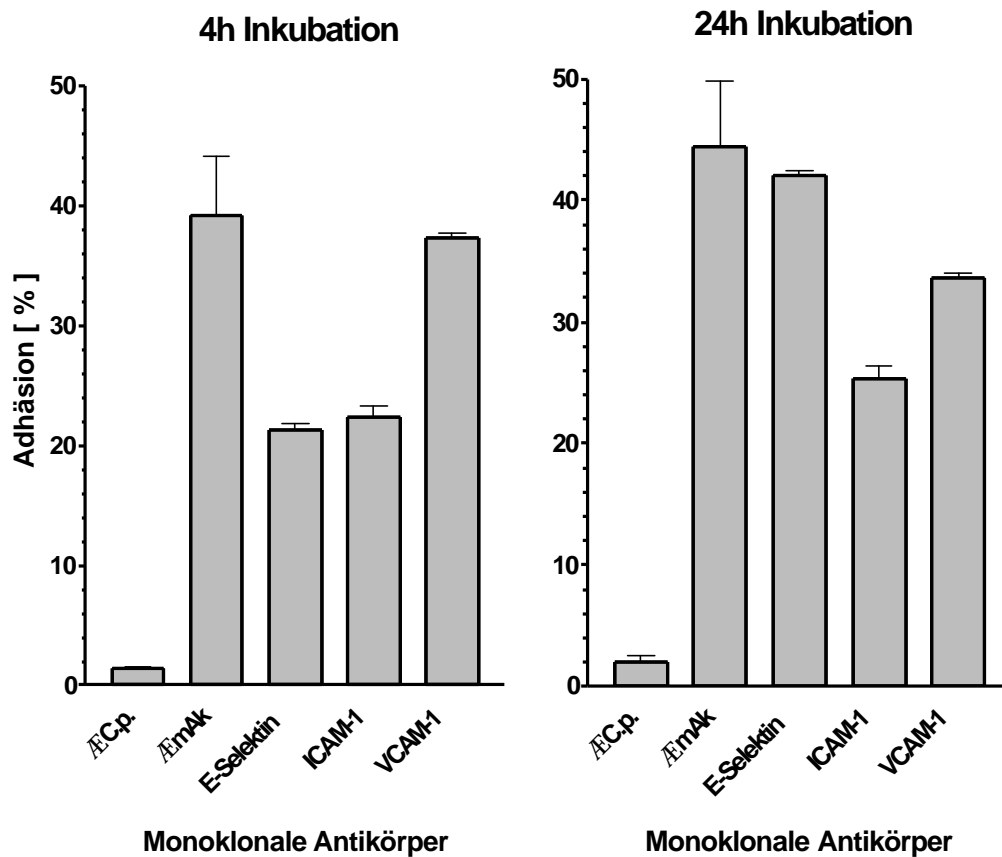


Abb. 11: Effekte monoklonaler Antikörper gegen endotheliale Adhäsionsmoleküle auf die *C.pneumoniae*-induzierte PMN-Adhäsion

3.2.2.2. Modifikation der *C. pneumoniae*-induzierten Adhäsion durch monoklonale Antikörper gegen leukozytäre Adhäsionsmoleküle

In weiterführenden Versuchen wurden jetzt die Leukozyten mit monoklonalen Antikörpern gegen β_1 - oder β_2 -Integrine vorbehandelt (10 min., je 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und nachfolgend über die *C. pneumoniae*-infizierten Endothelzellen perfundiert.

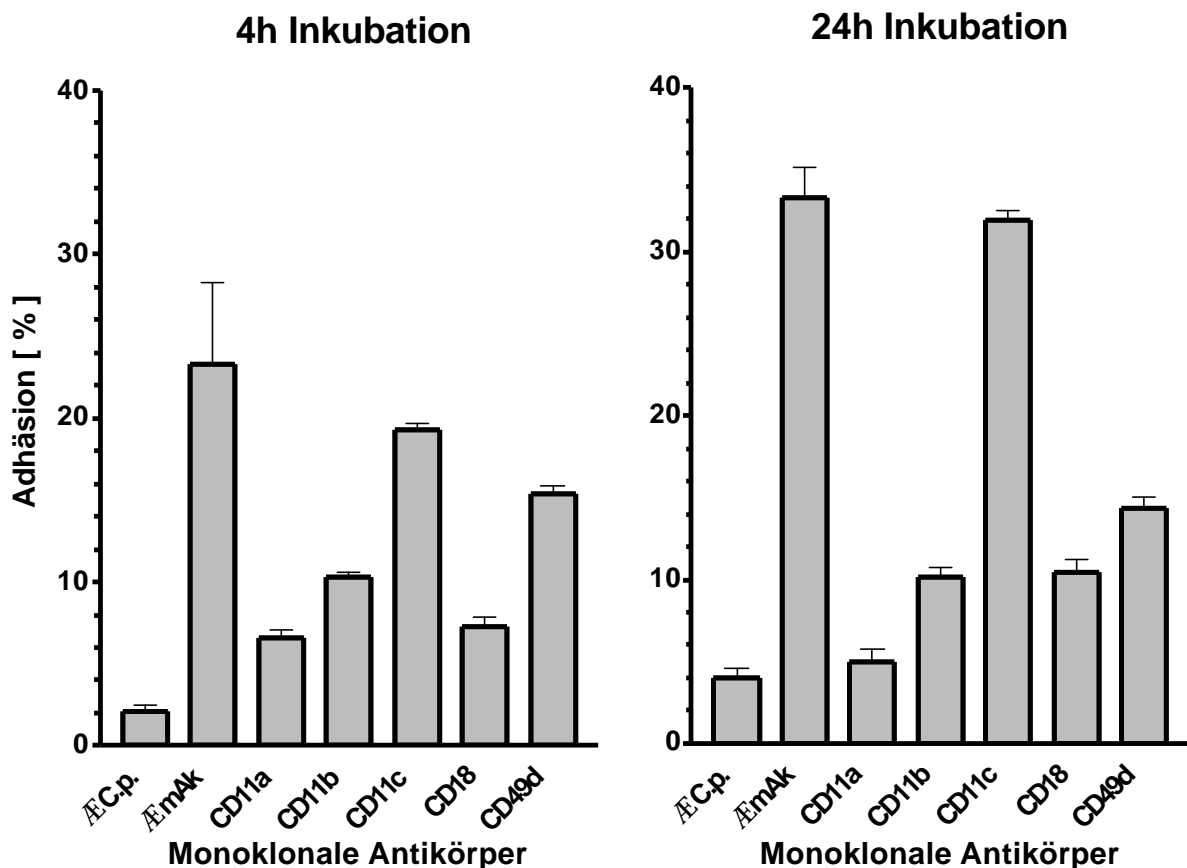


Abb. 12: Effekte monoklonaler Antikörper gegen leukozytäre Oberflächenmoleküle auf die Adhäsion von Monozyten an *C. pneumoniae*-infizierten HUVEC

Antikörper gegen die monozytäre β_2 -Integrine CD11a, CD11b, und CD18 reduzierten die *C. pneumoniae*-vermittelte Adhäsion von Monozyten und PMN vier und 24 Stunden p.i. in deutlichem Ausmaß bis zu 90%. (Tabelle 9).

Das β_1 -Intergrin CD29/49d scheint zumindest bei der Adhäsion der Leukozyten an den 24-Stunden infizierten Endothelzellen involviert zu sein. Dieser Effekt ließ sich vor allem bei den Monozyten, in einem geringeren Maße aber auch bei den PMN beobachten. Die Adhäsion der Monozyten ließ sich durch einen Antikörper gegen CD49d um 56,8% reduzieren, die der PMN um 40%. (Abb. 11, Abb. 13 und Tabelle 9).

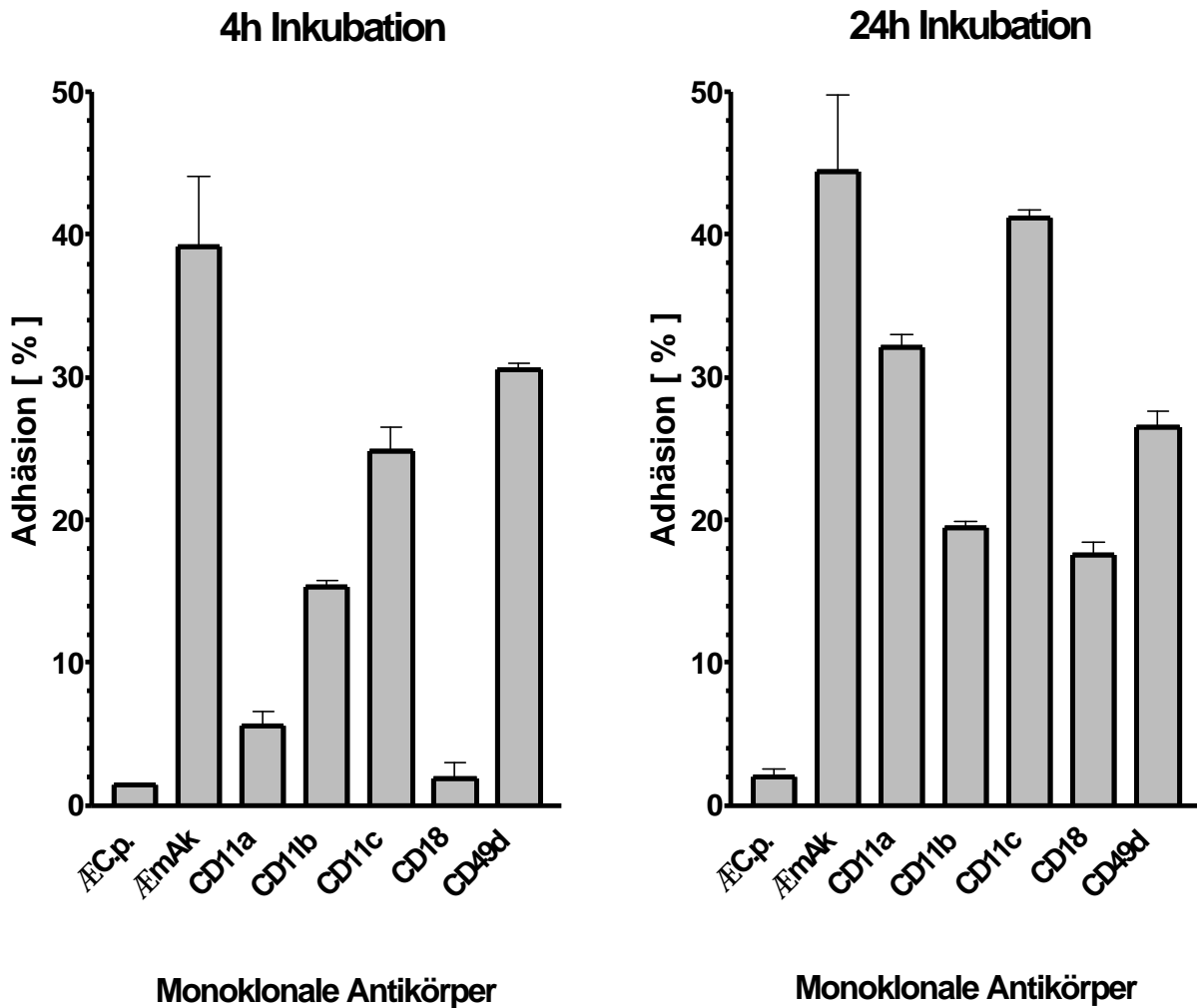


Abb. 13: Effekte monoklonaler Antikörper gegen leukozytäre Oberflächenmoleküle auf die Adhäsion von PMN an *C. pneumoniae*-infizierten HUVEC

Prozentuale Reduktion der Adhäsion				
	PMN		Monozyten	
	4h	24h	4h	24h
mAk	Inkubation	Inkubation	Inkubation	Inkubation
Kontrolle*	4,0 ± 2,0	3,0 ± 1,7	3,2 ± 1,2	2,4 ± 1,1
CD 11a	85.7 ± 4.1	27.6 ± 3.4	71.5 ± 3.8	85.1 ± 4.1
CD 11b	60.9 ± 1.8	56.3 ± 1.9	55.9 ± 2.2	69.6 ± 3.3
CD 11c	36.5 ± 7.2	7.3 ± 2.2	17.8 ± 3.5	3.5 ± 0.8
CD 18	95.5 ± 5.6	60.6 ± 3.6	68.8 ± 4.1	68.7 ± 4.2
CD 49	22.1 ± 2.3	40.2 ± 4.3	34.1 ± 3.4	56.8 ± 3.3
E-Selektin	45.5 ± 2.2	5.3 ± 1.5	58.3 ± 3.6	9.3 ± 1.7
ICAM-1	42.8 ± 4.2	43.6 ± 3.5	63.2 ± 1.9	84.2 ± 3.9
VCAM-1	3.3 ± 0.9	24.2 ± 1.4	28.5 ± 3.4	83.8 ± 2.5

* unspezifische IgG-Isotyp Kontrolle

Tab. 9: Effekte monoklonaler Antikörper gegen endotheliale und leukozytäre Adhäsionsmoleküle auf die *C. pneumoniae*-induzierte Leukozyten-Adhäsion.

Die Daten geben die prozentuale Reduktion von adhärenenten Leukozyten/mm² ± SEM (n=5).

3.2.3. Transmigration von Leukozyten durch *C. pneumoniae*-infizierte endotheliale Monolayer

Nach einer gewissen Zeit der festen Adhäsion können die Leukozyten dann in der dritten Phase der Leukozyten-Endothel-Interaktion die postkapillären Venolen verlassen (Emigration, Diapedese). Die leukozytären β_2 -Integrine CD11(a/b)/CD18 spielen hierbei eine zentrale Rolle. Auf endothelialer Seite sind endotheliales E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 an der Transmigration in unterschiedlicher Weise beteiligt (Luscinskas 1991, Hakkert 1991).

In den folgenden Versuchen zeigte sich, dass die Adhäsion von Monozyten an *C.pneumoniae*-infizierten endothelialen Monolayern (*C. pneumoniae*-dosisabhängig) gefolgt war von einer vermehrten transendothelialen Migration, den stärksten Effekt beobachtete man bei einer Infektionsdosis von $6,5 \times 10^4$ IFU/ml. In weiterführenden Versuchen konnte unter Verwendung ver-

schiedener inhibitorischer monoklonaler Antikörper gegen leukozytäre oder endotheliale Adhäsionsmoleküle die Bedeutung der verschiedenen Adhäsionsmoleküle für die *C. pneumoniae* – induzierte transendotheliale Monozytenmigration erarbeitet werden, eine detaillierte Aufstellung findet sich in Tabelle 10.

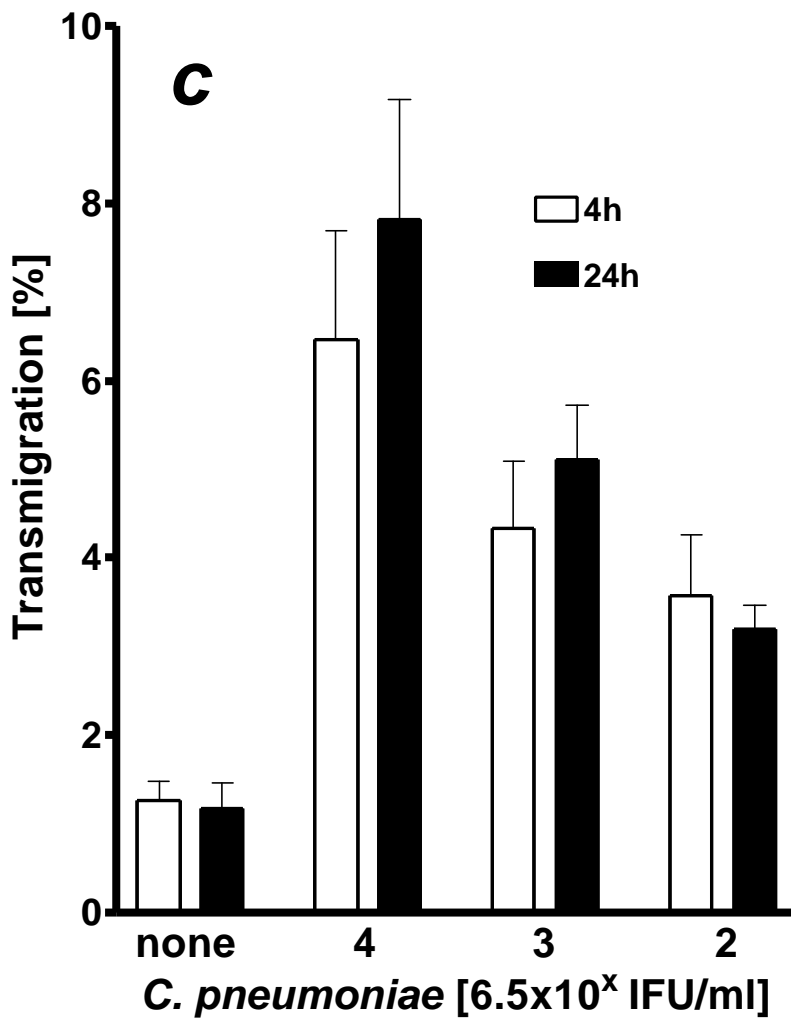


Abb. 14: Transendotheliale Migration von Monozyten *C.pneumoniae*-infizierten HUVEC

Infektionsdosis-abhängige Transmigration über Endothel nach Infektion mit $6,5 \times 10^2$ – $6,5 \times 10^4$ IFU/ml nach vier und 24 Stunden.

Reduktion der Transmigration		
	4h	24h
mAk	Inkubation	Inkubation
Kontrolle*	1,3 ± 0,7	0,7 ± 0,2
CD 11a	62,3 ± 5,2	70,4 ± 3,7
CD 11b + CD18	88,4 ± 5,3	90,5 ± 4,3
CD 18	80,1 ± 4,4	85,2 ± 5,2
E-Selektin	12,2 ± 1,2	0,3 ± 0,1
ICAM-1	55,3 ± 4,2	47,5 ± 3,3
VCAM-1	1,3 ± 0,5	2,1 ± 0,7

* unspezifische IgG-Isotyp Kontrolle

Tab. 10: Modifikation der *C.pneumoniae* – induzierten Transmigration von Monozyten über den endothelialen Monolayer durch monoklonale Antikörper gegen verschiedene Adhäsionsmoleküle

Auf Polycarbonat gewachsene HUVEC wurden mit $6,5 \times 10^4$ IFU/ml *C. pneumoniae* infiziert. Nach einem Waschschrift inkubierten die Endothelzellen mit 50µg/ml mAk gegen E-Selektin, ICAM-1 oder VCAM-1 für eine Stunde, die präparierten Monozyten mit 10µg/ml mAk gegen CD11a/b und/oder CD18 für 10 Minuten. Anschließend wurden 5×10^5 Monozyten in die obere Kammer gegeben, die Bestimmung der transmigrierten Monozyten erfolgte dann weiter zwei Stunden später. Die Daten zeigen die prozentuale Hemmung der monozytären Transmigration ± SEM. (n = 5)

3.3. *C. pneumoniae*-induzierte Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen

3.3.1. Cell-Surface-ELISA

Um die *C. pneumoniae*-induzierte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion weiter zu untersuchen wurde ein Cell-Surface-ELISA zur Bestimmung der Adhäsionsmolekül-Expression auf der Oberfläche der Endothelzellen genutzt. Nach Infektion der Endothelzellen kam es einer dosis- und zeitabhängig vermehrten Expression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen (HUVEC und HAEC) (s. Abb. 12). Maximale Effekte konnten mit einer Infektionsdosis von $6,5 \times 10^4$ IFU/ml erzielt werden.

Die E-Selektin-Expression auf *C. pneumoniae*-infizierten Zellen stieg bereits zwei Stunden post infectionem an, erreichte nach vier Stunden ihr Maximum und fiel nach 18–24 Stunden auf die Ausgangswerte zurück. Der Effekt war hochspezifisch, sogar die niedrigste getestete Infektionsdosis von $6,5 \times 10^1$ IFU/ml führte zu einem signifikanten Anstieg des E-Selektin auf der Oberfläche der infizierten HUVEC (Fig. 12a).

Die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf infizierten Endothelzellen stieg vier bis acht Stunden post infectionem an, erreichte ein Maximum nach 12 bis 24 Stunden und blieb bis über 72 Stunden erhöht exprimiert (Fig. 12c und e). Im Unterschied zu den HUVEC war die totale Proteinexpression von ICAM-1 und VCAM-1 auf den HAEC geringer ausgeprägt, die Kinetik der Expression jedoch vergleichbar zu den HUVEC (Abb. 12).

Endotheliale Adhäsionsmoleküle werden dosis- und zeitabhängig nach einer Infektion mit *C. pneumoniae* in HUVEC (—) und HAEC (-----) hochreguliert. Selbst die niedrigste Konzentration von *C. pneumoniae* ($6,5 \times 10^1$ IFU/ml) konnte eine signifikant erhöhte Expression von E-Selektin erzielen (**b**). Die Dosis-abhängige Expression von ICAM-1 und VCAM-1 wird zu einer Zeit von 12 Stunden post infectionem dargestellt (**d** und **f**). Offene Symbole (**a**, **c** und **e**) oder Balken (**b**, **d** und **f**) zeigen unstimulierte Endothelzellen.

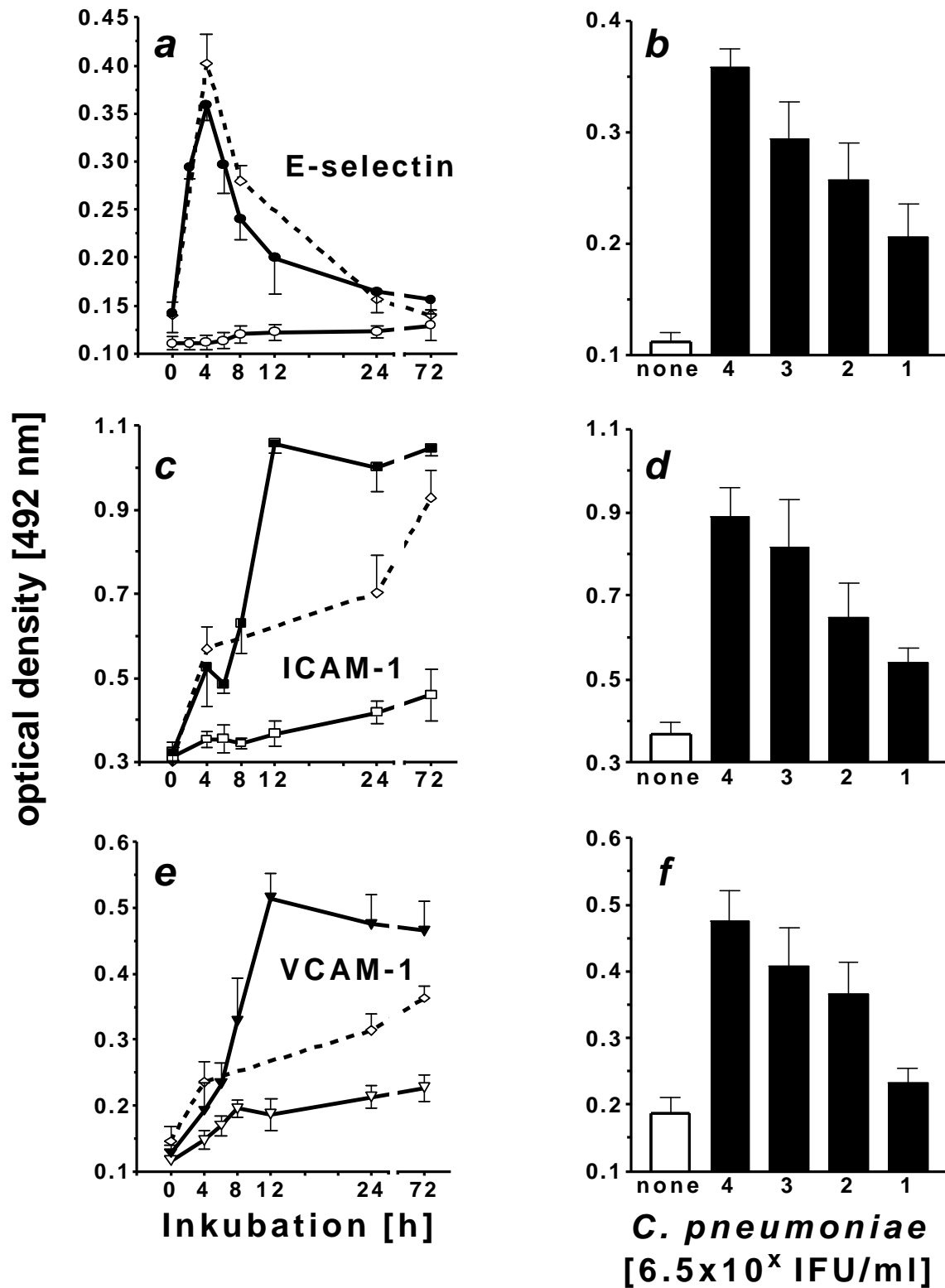
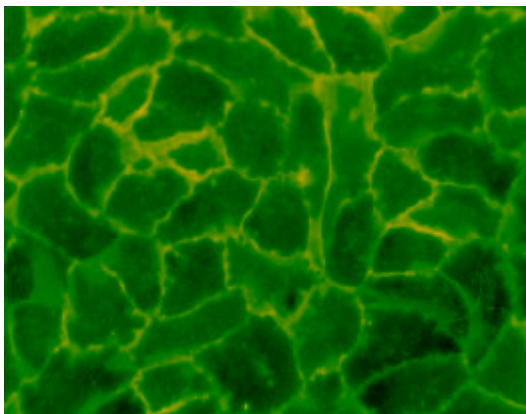


Abb. 15: Endotheliale Adhäsionsmoleküle, quantifiziert über einen Cell-Surface-ELISA

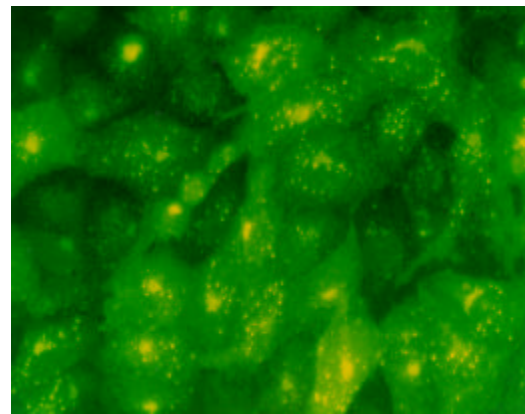
Die Daten geben die Mittelwerte \pm SEM von 5 separaten Experimenten wieder.

3.3.2. Immunfluoreszenz

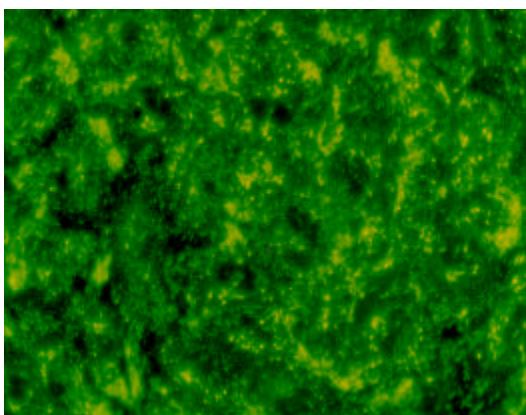
Zur Verifizierung der Expression und zur Veranschaulichung der Verteilung der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 wurden die HUVEC auf gelatinisierte TC-ChamberSlides™ gepflanzt. Nach Infektion mit *C. pneumoniae* erfolgte eine Permeabilisierung der PFA-fixierten Zellen und eine Blockade Fc-Rezeptoren. Dann erfolgte eine spezifische Markierung der verschiedenen Adhäsionsmoleküle. Nachfolgend konnten die Antikörper mit einem FITC-markierten Schaf-anti-Maus-Antikörper markiert werden und im Anschluß konnten immunfluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen (Exzitation: 489 nm, 40x) angefertigt werden.



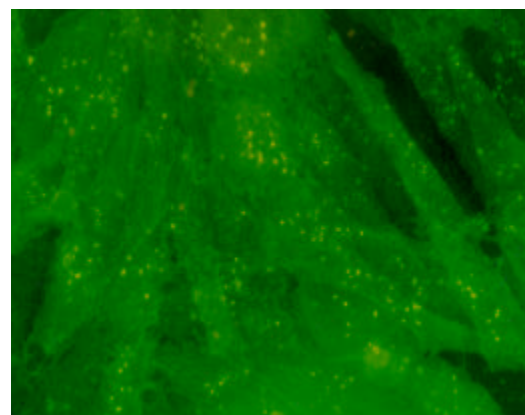
Kontrolle



E-Selektin



ICAM-1



VCAM-1

Abb. 16: Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle nach Infektion mit *C. pneumoniae* über vier (E-Selectin) bzw. 48 Stunden (ICAM-1, VCAM-1)

Zu sehen ist eine deutliche Expression der Adhäsionsmoleküle entsprechend ihrer charakteristischen Verteilung.

3.4. Expression endothelialer Chemokine

Die Extravasation von Leukozyten aus dem vaskulären System spielt eine zentrale Rolle im Rahmen proinflammatorischer Mechanismen. Neben der vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Leukozyten ist die Bildung eines chemotaktischen Gradienten notwendig, um die Leukozyten aus dem endoluminalen Bereich in das subendotheliale Gewebe zu leiten.

Hier zeigen verschiedenen Chemokine unterschiedliche Wirkungsprofile auf die einzelnen Leukozytenpopulationen. Während die CC-Familie (Rantes, MCP-1) vorwiegend auf Monozyten und Lymphozyten wirkt, werden von den CXC-Chemokinen (IL-8) eher die Infiltration Neutrophiler Granulozyten und T-Zellen vermittelt. Außerdem scheinen besonders diese Chemokine in der Pathogenese der Arteriosklerose eine wichtige Rolle zu spielen (s. Einleitung; 1.2.3.4. Chemokine und Arteriosklerose).

Die Infektion der HUVEC mit *C. pneumoniae*, Stamm GiD führte zu einer zeit- und dosisabhängigen Zunahme von RANTES, MCP-1 und IL8 im Überstand der infizierten Endothelzellen. Erste Effekte wurden bereits 8-12 Stunden post infectionem nachweisbar. Auch 72 Stunden p.i. ließ sich im Überstand der infizierten HUVEC noch RANTES, MCP-1 und IL8 detektieren. Da das Zellkulturmedium in Intervallen ausgetauscht wurden konnte ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auf eine reine Akkumulation der Chemokine zurückzuführen war.

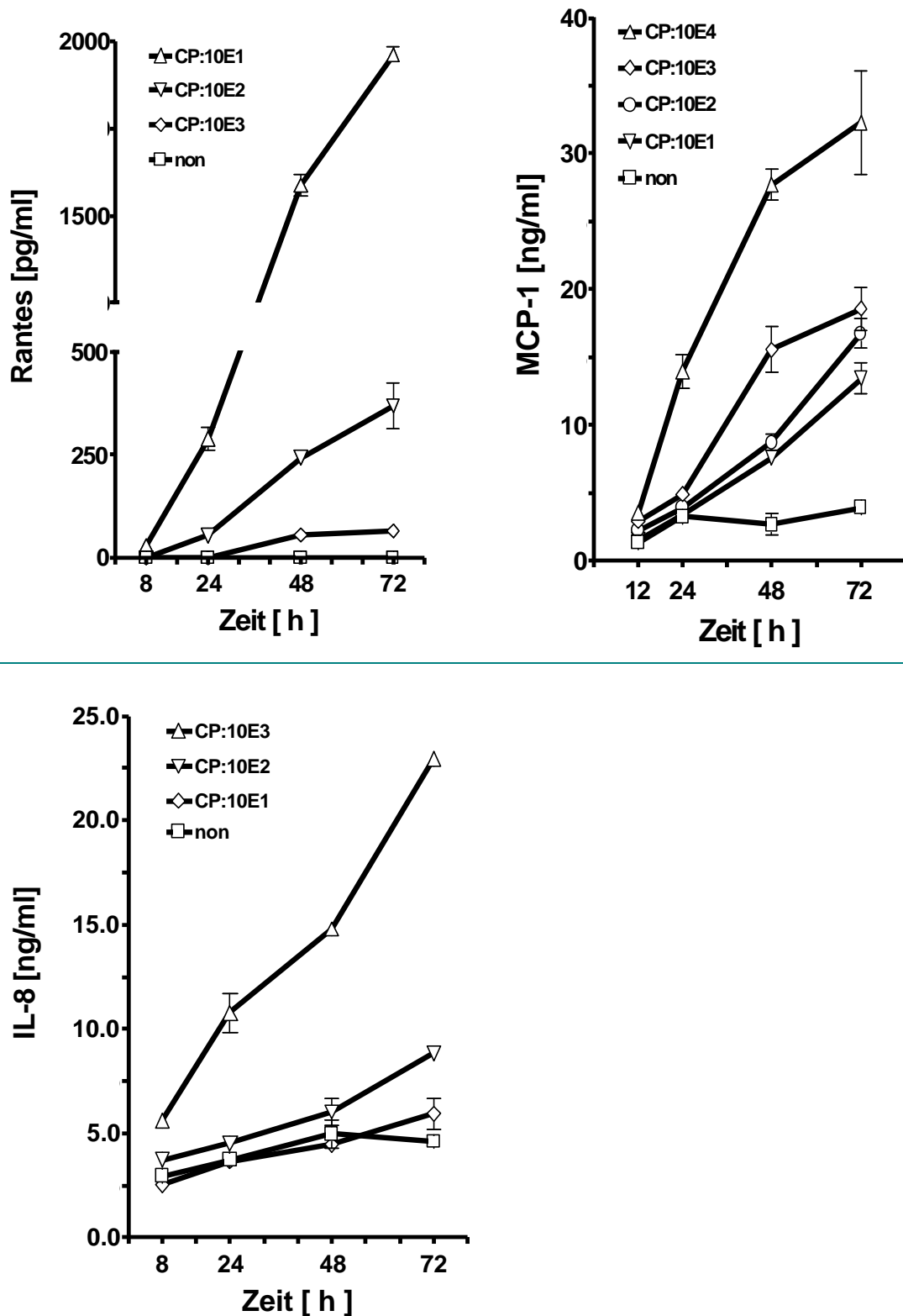


Abb. 16: RANTES- / MCP-1- und IL-8- Produktion *C. pneumoniae* -infizierter HUVEC.

Die Konzentrationsangaben von 10EX entsprechen jeweils: $6,5 \times 10^x$ IFU/ml

Die Daten geben die Mittelwerte \pm SEM von 3 separaten Experimenten wieder.

3.5. Molekularbiologische Untersuchung an *C. pneumoniae*-infizierten Endothelzellen

NF- κ B spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der transkriptionalen Aktivität der Gene von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1. Mehrere NF- κ B-Bindungsstellen sind in den Promotorregionen der Gene der drei Adhäsionsmoleküle nachgewiesen worden.

3.5.1. Die Rolle von NF- κ B in *C. pneumoniae*-mediierter Endothelzell-Aktivierung

Die Aktivierung von NF- κ B in *C. pneumoniae*-infizierten Endothelzellen konnte mittels eines **Electro-Mobility-Shift-Assays (EMSA)** durch die vermehrte Bindungskapazität von NF- κ B an die korrespondierenden Konsensus-Oligonukleotide gezeigt werden. Hierzu wurden die Endothelzellen für verschieden lange Zeiten (15, 30, 60, 120 Minuten) mit $6,5 \times 10^4$ IFU/ml *C. pneumoniae* infiziert. Nach o.g. Zeitpunkten erfolgte eine Lyse der Zellen und die Extraktion der nukleären Proteine.

kontrolle		C. pneumoniae				IL1b	
0	60	15	30	60	120	60	min

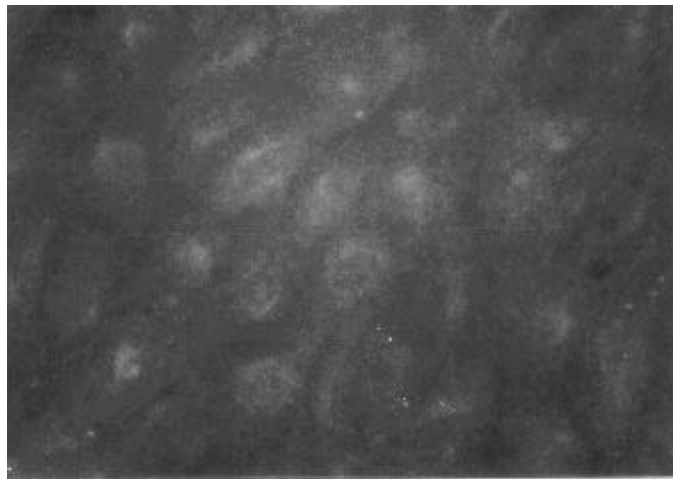


Abb. 17: Transnukleärer Shift von NF- κ B in *C. pneumoniae* stimulierten HUVEC (EMSA). Gezeigt wird ein repräsentatives Gel von drei unabhängigen Versuchen

Bereits 15 min nach Inkubation der Endothelzellen mit Stamm GiD ließ sich eine vermehrte Bindung von NF- κ B an den entsprechenden Oligonukleotiden nachweisen. Einen maximalen Effekt beobachtete man nach 30 Minuten. Nach einer Infektionszeit von 120 Minuten reduzierte sich die Bindung von NF- κ B wieder deutlich.

Diese Ergebnisse wurden anhand von **Immunfluoreszenzuntersuchungen** verifiziert. Diese zeigten ebenso eine vermehrte Translokation von NF- κ B in den Zellkern innerhalb von 15-30 Minuten nach einer Stimulation der Endothelzellen mit $6,5 \times 10^4$ IFU/ml *C. pneumoniae*. Maximale Effekte konnten wiederum nach 30 Minuten gezeigt werden.

I



II

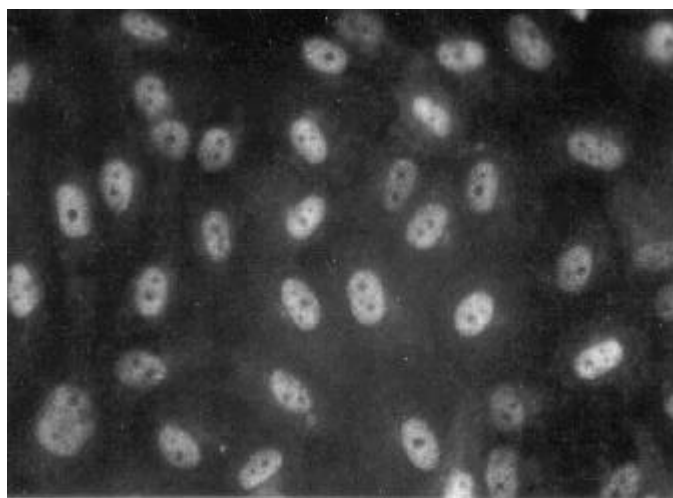


Abb. 18: *C. pneumoniae*-induzierte NF- κ B-Translokation in HUVEC.

Bild I zeigt unstimulierte Kontrollendothelzellen, Bild II die nukleäre Translokation von NF- κ B 30 Minuten nach *C. pneumoniae* Infektion (Vergrößerung: X 600). Gezeigt sind repräsentative Bilder von drei unabhängigen Versuchen.

Die *C. pneumoniae*-induzierte NF- κ B-Aktivierung wurde dann in weiterführenden Experimenten semiquantitativ mittels eines Reporter-gen-Assays (vermehrter NF- κ B-abhängiger Transkription eines Luziferase-Gens in stimulierten Endothelzellen) gezeigt.

Die Infektion der HUVEC mit *C. pneumoniae*, Stamm GiD, induzierte zeit- und dosisabhängig eine vermehrte NF- κ B-Aktivität (gezeigt als Chemolumineszenz/ μ g Protein) in den transfizierten HUVEC. Ein maximaler Effekt konnte nach vier Stunden erreicht werden, nach ca. 24 Stunden wurden in etwa die Ausgangswerte erreicht.

C. pneumoniae infizierte Endothelzellen, die zuvor mit einem Kontroll-Plasmid transient transfiziert worden waren (mutierte NF- κ B-Luziferase, pGL3.BG.6 κ B.mut), zeigten keine messbare Luziferase-Aktivität.

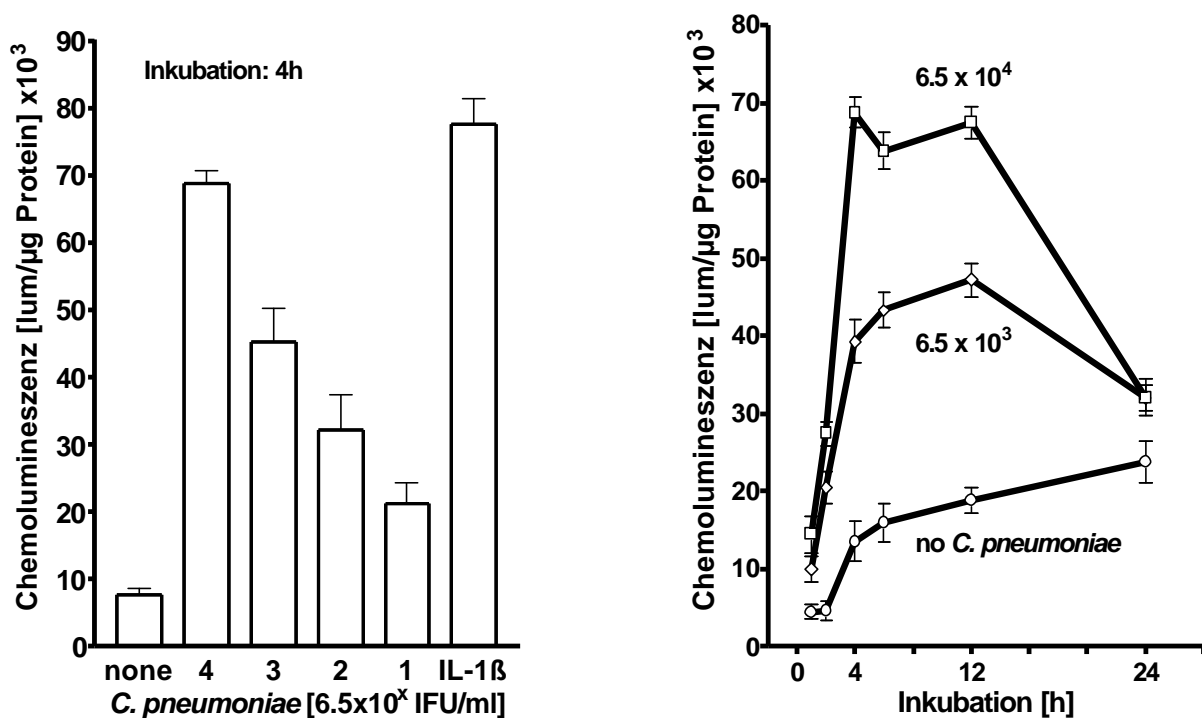


Abb. 19: Vermehrte NF- κ B-Aktivierung nach *C. pneumoniae* Infektion – Reporter-gen-Assay.

Hierfür wurden die Endothelzellen für zwei Stunden mit 2 µg eines NF-κB-Luziferase-Plasmids (pGL3.BG.6κB) transient transfiziert, dann mit *C. pneumoniae* infiziert/stimuliert und nach vier Stunden lysiert.

Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM von 3 separaten Experimenten.

3.5.2. Northern Blot – Analyse

Voraussetzung für eine vermehrt Synthese der verschiedenen proinflammatorischen Marker (Chemokine, endotheliale Adhäsionsmoleküle) ist eine vermehrt Expression der entsprechenden mRNA. Die Verifizierung der vermehrten mRNA-Expression für E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 erfolgte mittels Northern Blot.

Die Menge an E-Selektin-mRNA erreichte ihr Maximum zwei Stunden nach Infektion der Endothelzellen mit *C. pneumoniae*, ging nach vier Stunden nahezu auf den Ausgangswert zurück und konnte nach acht Stunden nicht mehr nachgewiesen werden. Auch die mRNA für ICAM-1 und VCAM-1 erreichte nach zwei Stunden ihr Maximum, blieben allerdings auch vier Stunden nach Infektion der Endothelzellen deutlich erhöht um erst nach acht Stunden wieder auf entsprechende Ausgangswerte zurückzugehen. Überraschenderweise konnte man 24 p.i. einen erneuter Anstieg der ICAM-1 und VCAM-1 mRNA nachweisen.

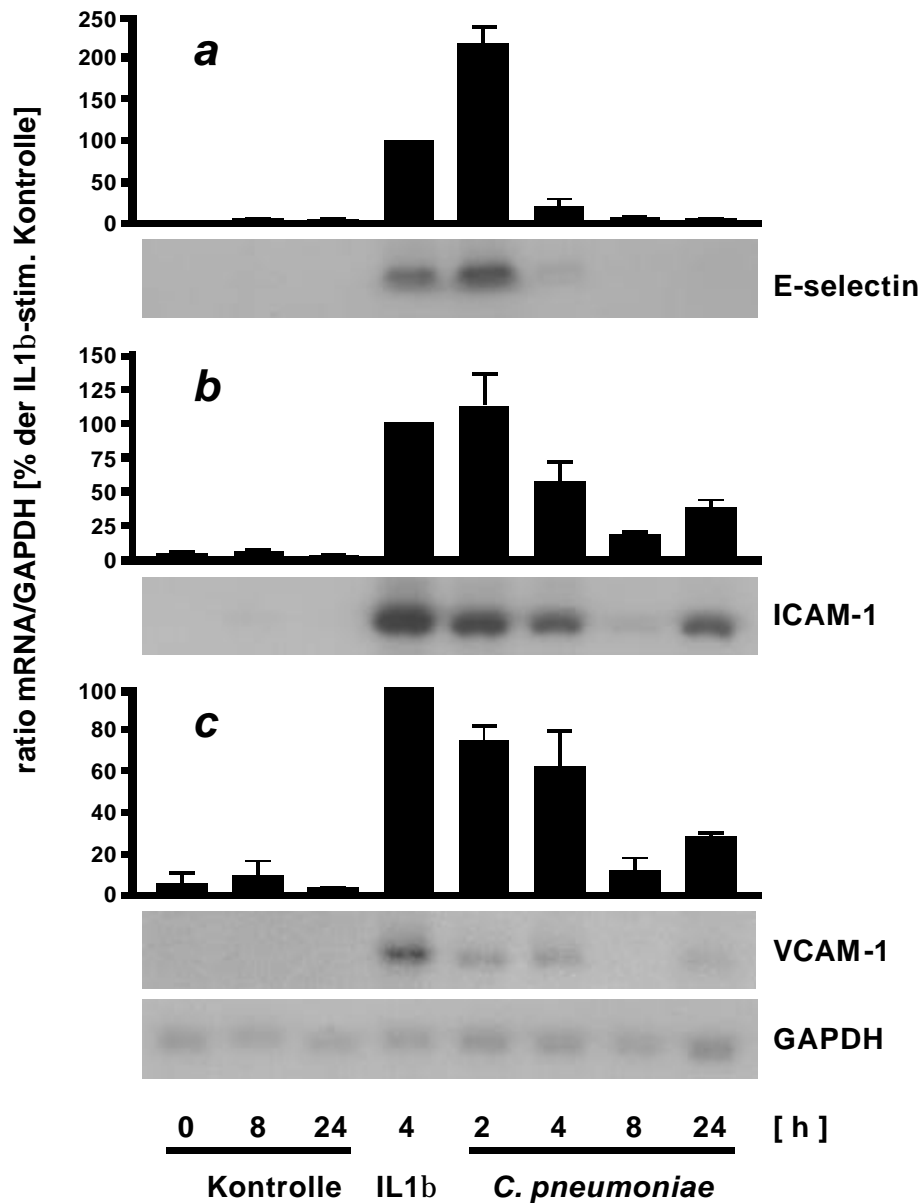


Abb. 20: Northern Blot Analyse von *C.pneumoniae* infizierten HUVEC ($6,5 \times 10^4$ IFU/ ml). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Platten gewaschen und die gesamten RNA extrahiert. Die Banden von drei unabhängigen Blots wurden mittels Phosphorimaging quantifiziert und anhand der GAPDH-Expression korrigiert. Die gezeigten Balkendiagramme sind der jeweilige prozentuale Anteil der *C.pneumoniae*-induzierten mRNA von der IL-1 β - induzierten mRNA (Kontrolle) nach vier Stunden.

4. Diskussion

4.1. Infektion humaner Endothelzellen mit *Chlamydomphila pneumoniae*

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *Chlamydomphila pneumoniae*, Stamm GiD, in der Lage ist, sowohl venöse, als auch arterielle Endothelzellen zu infizieren. Diese Infektion führt nachfolgend zur Ausbildung eines proinflammatorischen und proatherogenen Phänotyps in den Endothelzellen mit einer vermehrten Hochregulation endothelialer Adhäsionsmoleküle (E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1), einer gesteigerten Expression und Freisetzung leukozyten-rekrutierender Zytokine und Chemokine (RANTES, MCP-1, IL-8) und nachfolgend zu einer vermehrten Interaktion von Leukozyten (Monozyten, PMN) mit den infizierten Endothelzellen. Weiterhin konnten erste *C. pneumoniae*-induzierte Signaltransduktionsmechanismen in den Endothelzellen identifiziert werden.

Verschiedene Studien der letzten Zeit postulieren einen ätiologischen Zusammenhang zwischen einer chronischen bzw. rezidivierenden Chlamydien-Infektion und dem vermehrten Auftreten von Arteriosklerose und koronarer Herzkrankheit (KHK).

Gestützt wird die Hypothese durch

- verschiedene seroepidemiologische Studien (^{175;180;181}) über einen Zusammenhang zwischen hochpositiven *C. pneumoniae*-Antikörpertitern und dem Auftreten von KHK sowie
- dem Nachweis von *C. pneumoniae* in atheromatösen Plaques mittels verschiedener Techniken (Immunhistochemie, Elektronenmikroskopie, PCR, Anzucht von *C. pneumoniae* aus atheromatösen Plaques(^{189;199;200}).
- Infektionsmodelle in Tieren: In verschiedenen Tiermodellen („New Zealand White rabbits“, LDL-Rezeptor Knockout- und ApoE^{-/-} Mäuse) konnte gezeigt werden, dass es nach intranasaler Applikation von *C. pneumoniae*, nicht jedoch *C. trachomatis* zu einer vermehrten Bildung atheromatöser Plaques kam. Diese proatherogenen Effekte der Chlamydien ließen sich mittels Therapie mit Azithromycin verhindern (^{231;232}).

Vor dem Hintergrund der „response to injury“-Theorie von Ross R 1999 (²) bietet das Modell einer rezidivierenden/repetitiven oder persistierenden *C. pneumoniae*-Infektion als Promotor vaskulärer Läsionen eine interessante pathophysiologische Grundlage.

Bis zur Initiierung dieser Studie konnte in verschiedenen In-vitro-Studien gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* sehr wohl in der Lage ist, einer Reihe von Zielzellen zu infizieren. Kaukoranta Tolvanen et al. waren 1994 die erste Arbeitsgruppe, die eine produktive Infektion einer humanen Endothelzelllinie mit *C. pneumoniae* zeigen konnten (²³³). Unklar blieben zu diesem Zeit-

punkt noch die Mechanismen der Infektion sowie mögliche pathophysiologische Konsequenzen einer Infektion. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* mit einer hohen Affinität sowohl humane umbilikalvenöse (HUVEC), als auch arterielle Endothelzellen (HAEC) infizierte (s.a. Krüll et al. 1999⁽²³⁴⁾). Es handelte sich hierbei um eine produktive Infektion mit metabolisch aktiven Erregern, die Infektion war über mehrere Generationen von Endothelzellen übertragbar, auch nach mehreren Wachstumspassagen in Endothelzellen konnten hieraus infektiöse Elementarkörperchen isoliert werden. Weiterführende Studien zeigten zudem, dass die eingesetzten Endothelzellen hoch suszeptibel gegenüber einer Interaktion mit *C. pneumoniae* waren, bereits geringste ausgetestete Infektionsdosierungen initiierten eine profunde und prolongierte Aktivierung der Endothelzellen (s.u., Krüll et al 1999⁽²³⁴⁾, 2004⁽²³⁵⁾). In vergleichenden Studien mit humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVEC) und humanen arteriellen Endothelzellen (HAEC) aus der Aorta konnten keine substantiellen Unterschiede im Infektions- bzw. Aktivierungsmuster zwischen venösen und arteriellen Endothelzellen erhoben werden. Eine intrazelluläre Infektion mit *C. pneumoniae*, Stamm GiD, induzierte in beiden Endothelzellarten einen proinflammatorischen Phänotyp mit einer deutlich vermehrten Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1. Diese Beobachtung stützte auch die These, dass es sich bei den, aufgrund der besseren Verfügbarkeit im weiteren Verlauf der Arbeit vorwiegend eingesetzten HUVEC um eine adäquates Modellsystem zur weiteren Prüfung der *C. pneumoniae*-induzierten Endothelzellaktivierung handelt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass *C. pneumoniae*, Stamm GiD, in der Lage ist, humane Endothelzellen zu infizieren. Hierbei handelt es sich um einen grundlegenden Mechanismus, der zur nachfolgenden Aktivierung eines proinflammatorischen und proatherogenen Phänotyps in den Endothelzellen führt. Damit ist wichtige Voraussetzung für eine vermehrte Interaktion von Leukozyten und infizierten Endothelzellen gegeben.

4.2. Ausbildung eines proatherogenen Phänotyps in den *C. pneumoniae*-infizierten Endothelzellen

Endothelzellen bilden die innere Oberfläche der Blutgefäße und sind damit bei nahezu allen lokalen oder systemischen inflammatorischen Veränderungen involviert. Eine endotheliale Dysfunktion spielt die Schlüsselrolle in der Pathogenese vieler arteriosklerotische bedingter kardiovaskulärer Erkrankungen („response to injury“ Theorie, ⁽²⁾). Weitere Mechanismen sind (chronisch) entzündliche Veränderungen der vaskulären Intima sowie eine Proliferation der intimalen glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Pathologisch veränderten Eigenschaften des

endothelialen Monolayers sind eine erhöhte Adhäsivität, eine vermehrte Permeabilität, sowie ein Vielzahl weiterer Aktivierungs- und Regenerationsprozesse. Dadurch können sich in den veränderten Arealen vermehrt Leukozyten und Plättchen anlagern und den Entzündungsprozess perpetuieren. Gleichzeitig werden eine Vielzahl weiterer vasoaktiver Substanzen, Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren ausgeschüttet. Bei fortbestehender Triggerung entwickelt sich im Verlauf eine chronische Läsion.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Infektion von humanen umbilikalvenösen und arteriellen Endothelzellen zu einer vermehrten Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 führte, und dass dieser Effekt gefolgt war von einer vermehrten Interaktion (Rollen, Adhäsion und Transmigration) von Monozyten und PMN mit den infizierten Endothelzellen. Unter Verwendung blockierender monoklonaler Antikörper konnte hierbei die Bedeutung einzelner endothelialer und leukozytärer Antikörper weiter erarbeitet werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Endothelzellen nach Infektion mit *C. pneumoniae* prolongiert und und protrahiert die leukozytenchemotaktisch hochaktiven Mediatoren RANTES, MCP-1 und IL-8 sezernierten.

4.2.1. Bedeutung endothelialer und leukozytärer Adhäsionsmoleküle

Das Rollen sowohl der PMN, als auch der Monozyten auf der Oberfläche der infizierten Endothelzellen war 4h p.i. vor allem durch die vermehrte Expression endothelialen E-Selektins geprägt. Die „Partner“ zum E-Selektin auf Seiten der Leukozyten sind das sialylierte LewisX (SLe^x) und das „E-selectin ligand-1“, ESL-1. Beide Moleküle werden vorwiegend auf den Spitzen der Mikrovilli exprimiert und präsentiert dort den Liganden für die potentiellen Rezeptoren (^{67;73}). Zum Zeitpunkt der Arbeit waren entsprechende „Tools“ (inhibierende Antikörper, abradierende Enzyme) zur Modifikation des SLe^x oder ESL-1 nicht verfügbar, so dass die Experimente mit modifizierten Leukozyten noch ausstehen.

24 Stunden p.i. war die absolute Menge der rollenden Leukozyten niedriger, der Effekt wurde jetzt vor allem durch das endotheliale VCAM-1 vermittelt, E-Selektin spielte zu diesem Zeitpunkt keine Rolle mehr. „Gegenspieler“ war in erster Linie das leukozytäre $\alpha 4\beta 1$ Integrin CD49d. Ging man lange Zeit davon aus, dass die $\beta 1$ -Integrine vor allem auf monozytären Zellen (Monozyten, Lymphozyten) exprimiert wurde und hier verantwortlich war für die Interaktion dieser Leukozytensubtypen im Rahmen lymphozytär geprägter chronisch-inflammatorischer Prozesse (u.a. „Lymphozyten-homing“ in den Lymphgefäßen), so konnten Kubes et al. 1994 erstmalig zeigen, dass die $\alpha 4\beta 1$ -Integrine auch in der Interaktion von PMN mit dem VCAM-1 auf

(chronisch) inflammatorisch veränderten Endothelzellen involviert waren ⁽⁷¹⁾. Unsere Studien mit inhibierenden monoklonalen Antikörpern gegen CD49d und VCAM-1 bestätigten die Bedeutung der Interaktion von Monozyten und *C. pneumoniae*-infizierten Endothelzellen für das Rollen und darüber hinaus auch die nachfolgende feste Adhäsion.

Das Rollen der Leukozyten auf der Oberfläche der *C. pneumoniae*-infizierten Endothelzellen war gefolgt von einer deutlichen Zunahme der feste adhärierenden Monozyten und PMN. Weiterführende Studien mit blockierenden monoklonalen Antikörpern zeigten, dass die feste Adhäsion der beiden Leukozytensubtypen vor allem geprägt war, durch eine Interaktion der leukozytären β 2-Integrine CD11a/CD18 (LFA-1) und CD11b/CD18 (Mac-1) und dem vermehrt exprimierten endothelialen ICAM-1. Das dritte Mitglied aus der Gruppe der β 2-Integrine, CD11c/CD18 (gp150/95) spielte in unserem System offenbar keine Rolle. Eine zusätzliche Komponente in der festen Adhäsion vor allem der Monozyten, in einem geringeren Maße allerdings der Granulozyten war eine Interaktion über das leukozytäre β 1-Integrin CD49d und dem vor allem 24 Stunden p.i. deutlich vermehrt exprimierten endothelialen VCAM-1.

Das leukozytäre CD11a/CD18 (LFA-1) wird konstitutiv auf der Oberfläche der Leukozyten exprimiert. Nach Stimulation der Leukozyten (z. B. im Rahmen des „Tetherings“ und des Rollens auf der Oberfläche Selektin-exprimierender Endothelzellen) kommt es durch eine Änderung in der Konformation des Moleküls zu der vermehrten Präsentation aktiver Zentren, über die dann die Interaktion mit dem (endothelialen) ICAM-1 reguliert wird ^(49;66;236). Eine vergleichbarer Mechanismus ist für die CD49d-vermittelte Adäsion an VCAM-1 bekannt ⁽⁵²⁾. CD11b/CD (Mac-1) wird in intrazellulären Vesikeln gespeichert und nach Stimulation in Folge der gesteigerten Vesikeldegranulation vermehrt auf der Oberfläche der Leukozyten exprimiert ⁽⁶⁴⁾. Da in unserem Modell die Leukozyten nicht direkt in Kontakt mit *C. pneumoniae* oder mit chlamydialen Virulenzfaktoren kommen, erfolgt die Stimulation der Leukozyten, und damit die vermehrte Aktivierung und Expression der leukozytären Integrine, über den Kontakt mit den auf den infizierten Endothelzellen vermehrt exprimierten Adhäsionsmolekülen.

Die *C. pneumoniae*-induzierte Leukozyten-Adhäsion war gefolgt von einer nachfolgenden vermehrten transendothelialen Migration durch den endothelialen Monolayer. Unter Verwendung der blockierenden monoklonalen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die Transmigration sowohl der Monozyten, als auch der PMN (Daten nicht gezeigt) vor allem durch eine Interaktion der leukozytären β 2-Integrine CD11a/CD18 (LFA-1) und CD11b/CD18 (Mac-1) mit dem endothelialen ICAM-1 vermittelt wurde, weder das E-Selektin, noch das VCAM-1 spielten hierbei eine relevante Rolle. Verschiedene vorangegangene Studien konnten zeigen, dass die Expression leukozytärer und endothelialer Adhäsionsmolekülen alleine nicht ausreichend ist,

auch eine transendotheliale Migration der adhärenierenden Leukozyten zu vermitteln, sondern dass es hierfür eines zusätzlichen transendothelialen Gradienten chemotaktisch aktiver Substanzen (Chemokine, Zytokine) bedarf. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang auch eine gerichtete Expression entsprechender Chemoattraktanten in der basolateralen endothelialen Zellwand^(237;238).

Die Infektion der Endothelzellen mit *C. pneumoniae*, Stamm GiD, induzierte eine deutlich vermehrt Freisetzung chemoattraktiver Mediatoren (RANTES, MCP-1, IL-8) in den Überstand der stimulierten Endothelzellen, ein Modell zum Nachweis der gerichteten Sekretion befand sich zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit allerdings noch im Aufbau. Erste Vorversuche aus einem „Transwell-Modell“ mit auf Filtern angezüchteten Endothelzellen bestätigen allerdings, dass die Endothelzellen IL-8 vor allem in das basale Kompartiment des Systems sezernierten, und dass es somit sehr zur Etablierung eines transendothelialen Gradienten kommt. Weiterführende immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis einer möglichen membranösen Expression der Chemokine in der Zellwand infizierter Endothelzellen sind geplant.

4.2.2. *C. pneumoniae*-induzierte Signaltransduktionsmechanismen in Endothelzellen

Die Inkubation der HUVEC mit *C. pneumoniae* induzierte verschiedene Signalübertragungskaskaden in den Endothelzellen. Bereits 15 Minuten nach Zugabe ließ sich in den vorinkubierten HUVEC mittels verschiedener Techniken (Immunfluoreszenz, EMSA) eine vermehrte Translokation von NF- κ B aus dem Zytosol in den Zellkern nachweisen, im weiteren zeitlichen Verlauf (ca. 60min nach Kontakt) auch eine deutlicher Zunahme NF- κ B-medierte Signale (Reporter-Gen-Assay). Nachfolgend konnte eine prolongierte und protrahierte Transkription und Translation der mRNA für die Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nachgewiesen werden, die mRNA für ICAM-1 und VCAM-1 erreichte nach zwei Stunden ein erstes Maximum, blieb auch vier Stunden nach Infektion der Endothelzellen deutlich erhöht um erst nach acht Stunden wieder auf entsprechende Ausgangswerte zurückzugehen. Überraschenderweise konnte man 24 p.i. einen erneuter Anstieg der ICAM-1 und VCAM-1 mRNA nachweisen.

Die Ergebnisse zeigen, dass *C. pneumoniae* in der Lage ist, bereits in der frühen Phase der Anlagerung („attachment“) Mechanismen der Zielzellaktivierung zu initiieren. Unklar ist, ob zu diesem Zeitpunkt bereits eine Aufnahme der infektiösen EB in die Zellen stattgefunden hat, ob es es sich hierbei tatsächlich nur um mehr oder weniger unspezifische Reaktionen auf die Chlamydien oder einzelne mögliche chlamydiale Virulenzfaktoren (cLPS, chsp-60) handelt. Erste konfokalmikroskopische Studien der eigenen Arbeitsgruppe bestätigen allerdings, dass

bereits innerhalb weniger Minuten nach Zugabe der EB zu den Zielzellen (Hep-2 Zellen) erste phagozytierte EB intrazellulär nachweisbar sind (persönliche Kommunikation M. Krüll).

Die Suche nach möglichen chlamydialen Virulenzfaktoren oder potentiellen Rezeptoren auf Seiten der Zielzellen gestaltete sich zum Zeitpunkt der Fertigstellung des experimentellen Teils der Arbeit schwierig, da Chlamydien aufgrund ihres einzigartigen Wachstumszyklus weder gentechnisch modifizierbar, noch ohne weiteres in großen Mengen anzüchtbar sind, um dann gezielt daraus bestimmte Proteine oder weitere Oberflächenstrukturen zu isolieren. Und obwohl das Genom von *C. pneumoniae* seit 1999 vollständig sequenziert ist (1.23 x 10⁶ nt kodieren ca. 1052 Proteine, ⁽⁹⁷⁾) sind Mechanismen der Infektion und der Wirtszellaktivierung auch bis heute noch in vielen Bereichen offen.

Erste orientierende Studien im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass eine „unspezifische“ Triggerrung durch bakterielles LPS nicht ursächlich zu sein scheint. Kontroll-Versuche zeigte, dass Polymyxin B vorbehandelte Chlamydien (zur Inaktivierung des chlamydialen LPS) trotzdem in der Lage waren, Endothelzellen zu stimulieren. Hitze-inaktivierte Chlamydien (30 min bei 90°C), die auch nicht in die Zellen phagozytiert werden, induzierten keine Adhäsionsmolekülexpression mehr auf den Endothelzellen. Offenbar ist also die intrazelluläre Infektion mit lebenden Chlamydien nötig um eine protrahierte und prolongierte Zielzellaktivierung zu induzieren, chlamydiales LPS alleine reicht hierfür nicht aus. Ein Studie von Ingalls et al. zeigte, dass chlamydiales LPS zudem eine eher schwächere immunogene und proinflammatorische Wirkung hat, als z. B. LPS von Salmonellen ⁽¹⁵⁵⁾.

Zusammenfassend kann man sagen, dass *C. pneumoniae*, Stamm GiD, in der Lage ist, in Endothelzellen innerhalb kurzer Zeit nach Kontakt mit den Zielzellen eine Reihe von Signaltransduktionswegen zu aktivieren, die im Verlauf zu einer protrahierten und prolongierten Aktivierung von Endothelzellen, mit vermehrter Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, Freisetzung chemoattraktiver Mediatoren und nachfolgender Interaktion von Leukozyten und aktivierten Endothelzellen führten. Dies sind zentrale Mechanismen in der Entwicklung arteriosklerotischer Veränderungen in der Gefäßwand.

4.3. *C. pneumoniae* und Arteriosklerose

Verschiedene Studien postulieren einen ätiologischen Zusammenhang zwischen einer chronischen bzw. rezidivierenden Chlamydien-Infektion und dem vermehrten Auftreten von Arteriosklerose und koronarer Herzkrankheit (KHK). Maass et al konnten eine stattgehabte oder chronische *C. pneumoniae*-Infektion als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung der Koronar-

sklerose errechnen, anhand der serologischen Daten zum Nachweis einer abgelaufenen Infektion ergab sich eine Odds Ratio von 2,4, also ein 2,4-fach erhöhtes Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Komplikationen (Maass M, J Infect, 1997).

Vor dem Hintergrund der Henle-Koch-Postulate kann die Arteriosklerose mit ihren klinischen Verläufen durchaus als Infektionserkrankung interpretiert werden. Die Henle-Koch-Postulate bezeichnen die Ursache-Wirkungs-Beziehung zwischen einem Erreger und dem entsprechenden Wirt, die mit Hilfe dieser Postulate experimentell überprüft und abgegrenzt werden kann (Koch, R. 10. Internationaler Medizinischer Kongress, 1890 Berlin).

Das erste Postulat betrifft den regelmäßigen Nachweis des Erregers in den Produkten der betreffenden Krankheit. *C. pneumoniae* konnte mittels verschiedener Techniken (Immunhistochemie, Elektronenmikroskopie, PCR) in atheromatösen Plaques (^{185;201}) dargestellt werden. Das zweite Postulat behandelt die Reinzüchtung des Erregers außerhalb des erkrankten Organismus. Verschiedenen Autoren ist es gelungen, *C. pneumoniae* aus arteriosklerotischen Plaques zu isolieren und wieder in eine produktiv-infektiöse Reinkultur zu bringen (^{193;202;203}). Das dritte Postulat bestimmt den Nachweis der pathogenen Eigenschaften des reingezüchteten Erregers. In verschiedenen Tiermodellen („New Zealand White rabbits“, LDL-Rezeptor Knockout- und ApoE^{-/-} Mäuse) konnte gezeigt werden, dass es nach intranasaler Applikation von *C. pneumoniae*, nicht jedoch *C. trachomatis* zu einer vermehrten Bildung atheromatöser Plaques kam (^{15;207;208;210}). Ein heute ergänztes viertes formuliertes Postulat rechnet auch noch den Nachweis immunologischer Erreger-Wirt-Beziehungen dazu. Nicht zuletzt die Ergebnisse dieser Arbeit leisten in diesem letzten Punkt einen wichtigen Beitrag zur Infektionshypothese arteriosklerotischer Veränderungen. Neben den in dieser Studie identifizierten *C. pneumoniae*-induzierten Pathomechanismen in infizierten Endothelzellen induzieren des weiteren eine gesteigerte Aufnahme von Lipiden und Lipoproteinen in die Makrophagen sowie die Differenzierung zu Schaumzellen. Auch eine *C. pneumoniae*-vermittelte Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen konnte nachgewiesen werden (^{137;239}). Mittlerweile sind zwar eine Reihe weiterer Pathogene als mögliche Auslöser atherosklerotischer Prozesse diskutiert worden (HSV, CMV, verschiedene Parodontalkeime (^{240;241})). Für keinen dieser Erreger konnte jedoch eine so „lückenlose Kausalkette“ reproduziert werden wie für *C. pneumoniae*, der auch bislang als einziger Keim tatsächlich aus atherosklerotischen Plaques isoliert werden konnte.

Noch ist unklar, auf welchem Weg die Chlamydien aus der Lunge, als dem primären Ort der Infektion, in die atherosklerotische Plaques gelangen. Diskutiert wird zum einen die Möglichkeit kurzer bakteriämischer Phasen im direkten Verlauf einer schweren akuten Chlamydien-Infektion, zum anderen das Modell einer Monozyten/Makrophagen- (Lymphozyten ?) Infektion

im Bereich des (oberen) Respirationstraktes sowie einer nachfolgenden systemischen Streuung/Verteilung der Chlamydien mit den rezirkulierende infizierten Leukozyten als Vektoren⁽²⁴²⁾. Erste Tierversuche bestätigten, dass sich nach intranasaler/-trachealer Applikation *C. pneumoniae* in Makrophagen verschiedener Kompartimente (Peritoneum, Milz, Blut) nachweisen ließen^(188;243).

Mit der Vorstellung, ein Pathogen könne maßgeblich bei der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt sein, ergeben sich potentiell neue Therapieoptionen. Im Tiermodell konnten die proatherogenen Effekte einer Infektion mit *C. pneumoniae* durch eine Therapie mit Antibiotika (Makrolide) verhindert werden^(206;213).

Interventionsstudien im „humanen System“ wurden anfänglich mit kleinen Teilnehmerzahlen an KHK-Patienten durchgeführt. Die Ergebnisse deuteten an, dass es bei diesen Patienten - im Vergleich zu einer Placebogruppe - signifikant weniger häufig zum Auftreten erneuter, schwerer kardialer Ereignisse kam. Größere Studien (AZACS, WIZARD, PROVE IT) haben diese Befunde jedoch nicht bestätigt. Die Ergebnisse zweier weiterer Studien mit jeweils über 4000 Patienten (PROVE IT, ACES) konnten keinen Benefit einer Antibiotikaprophylaxe nach einem Myokardinfarkt nachweisen⁽²¹⁵⁾. Die anfängliche Euphorie, die Arteriosklerose und ihre Folgeerscheinungen mittels Antibiotika innerhalb kürzester Zeit zu kurieren, erhielt einen deutlichen Dämpfer.

Des Rätsels Lösung deutete sich in Form einer Studie an, die Anfang 2001 von der Arbeitsgruppe um M. Maass veröffentlicht wurde. In dieser Arbeit konnten die Autoren zeigen, dass sich *C. pneumoniae* uneingeschränkt in Monozyten von „Patienten“ vermehrte, die mit verschiedenen Chlamydien-spezifischen Antibiotika therapiert worden waren. Mittlerweile mehren sich die Hinweise darauf, dass *Chlamydomphila pneumoniae* sowohl in Monozyten als auch in anderen Zielzellen (Endothelzellen, Epithelzellen) ein Art Persister-Status annehmen kann und nicht mehr auf Makrolide als Antibiotika reagiert^(131;244). In Gegenwart der Antibiotika gehen die Chlamydien dann in eine Stoffwechsel-inaktive Form über und sind somit in der Lage, über einen längeren Zeitraum (Monate-Jahre?) hinweg in der Wirtszelle zu persistieren. Nach Absetzen des Antibiotikums und/oder getriggert durch weitere, bisher unbekannte Mechanismen, nehmen die Chlamydien nach einiger Zeit wieder ihre Stoffwechselaktivität auf und fangen wieder an, sich zu vermehren. Die initialen Interventionsstudien waren daher möglicherweise falsch angelegt. Die Absicherung der Chlamydien-Arteriosklerose-Hypothese auf Ebene der Interventionsstudien ist also nach wie vor offen. Erst wenn es gelingt, mittels neuer Antiinfektiva eine Chlamydienbesiedlung vollständig zu eradizieren, oder gar mittels Vakzinierungsstudien

die Infektionsrate signifikant zu senken, wird es möglich werden, die tatsächliche Bedeutung der Infektionshypothese zu klären.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass *C.pneumoniae* -ganz im Sinne der Henle-Koch-Postulaten- das Potential hat, Pathomechanismen der Atherogenese zu initiieren oder zu perpetuieren. Der Organismus kann gemeinsam mit oder unabhängig von anderen Risikofaktoren agieren. Der definitive Beweis der kausalen Rolle von *C.pneumoniae* in der Arteriosklerose wird letztendlich nur von großen prospektiven Eradikations-Studien (und eventuell von Vaccinierungsstudien) erfolgen.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob der *Chlamydomphila pneumoniae* Stamm GiD in der Lage ist, humane Endothelzellen zu infizieren. Weiterhin sollte geprüft werden, ob die intrazelluläre Infektion in den Endothelzellen im Sinne der „response-to-injury“ Theorie zu der Entwicklung eines proinflammatorischen, proatherogenen Phänotyps mit einer vermehrten

Interaktion von Leukozyten und infizierten Endothelzellen führt. Ziel war es außerdem, erste Mechanismen der Endothelzellaktivierung und der intrazellulären Signaltransduktion zu identifizieren.

Zum Einsatz kam der von C. Jantos, Bad Oeyenhausen, aus dem Trachealsekret eines Patienten mit Bronchitis isolierte *Chlamydomphila pneumoniae* Stamm GiD. Die Untersuchungen wurden an humanen umbilikalvenösen (HUVEC) und humanen aortalen Endothelzellen (HAEC) durchgeführt. Die Interaktion (Rollen, Adhäsion, Transmigration) von frisch isolierten humanen Monozyten und neutrophilen Granulozyten (PMN) mit den infizierten Endothelzellen wurden unter dynamischen Bedingungen quantifiziert.

C. pneumoniae, Stamm GiD, infizierte hocheffizient sowohl die HUVEC, als auch die HAEC. Die Infektion induzierte das Rollen, die nachfolgende feste Adhäsion der Leukozyten an der Oberfläche der infizierten Endothelzellen sowie eine transendotheliale Migration von adhären- den Leukozyten in das subendotheliale Kompartiment. Diese Effekte ließen sich mittels monoklonaler Antikörper gegen leukozytäre Integrine, sowie gegen endotheliales E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 in unterschiedlichem Maße reduzieren.

Mittels Cell-Surface-ELISA ließ sich die erhöhte Expression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf *C. pneumoniae*-infizierten HUVEC und HAEC nachweisen. Maximale Effekte beobachtete man 4 (E-Selektin), bzw. 12-24 Stunden (ICAM-1, VCAM-1) post infectionem. Zudem konnte eine verstärkte Freisetzung chemoattraktanter Mediatoren (RANTES, MCP-1 und IL-8) aus den infizierten Endothelzellen gezeigt werden.

C. pneumoniae, Stamm GiD, aktivieren in den humanen Endothelzellen bereits in der frühen Phase der Anlagerung („attachment“), 15 Minuten nach Zugabe zu den HUVEC, eine vermehrte Translokation von NF- κ B aus dem Zytosol in den Zellkern. Im Verlauf konnte dann eine pro-

longierte und protrahierte Transkription und Translation der mRNA für die proinflammatorischen Marker E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nachgewiesen werden. Die Aktivierung dieses proinflammatorischen Phänotyps in den Endothelzellen setzte eine intrazelluläre Infektion mit lebenden Chlamydien voraus, hitzinaktivierte Erreger blieben ohne Effekt. Studien mit Polymyxin B zeigten, dass das chlamydiale LPS bei der Zielzellaktivierung nur eine untergeordnete Rolle spielte.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass *C. pneumoniae*, Stamm GiD, in der Lage ist, humane Endothelzellen zu infizieren. Hierbei werden in den Endothelzellen innerhalb kurzer Zeit nach Kontakt eine Reihe von Signaltransduktionsmechanismen aktiviert, die im Verlauf zu einer protrahierten und prolongierten Aktivierung von Endothelzellen, mit vermehrter Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, Freisetzung chemoattraktiver Mediatoren und nachfolgender Interaktion von Leukozyten und aktivierten Endothelzellen führen. Hierbei handelt es sich um grundlegende proinflammatorischen und proatherogenen Mechanismen wie sie auch im Rahmen arteriosklerotischer Gefäß(wand)veränderungen beobachtet werden. *Chlamydia pneumoniae* hat somit das Potential, zentrale Pathomechanismen der Atherogenese zu initiieren oder zu perpetuieren.

6. Referenzverzeichnis

1. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;349:1269-1276.
2. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
3. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-874.
4. Erren M, Reinecke H, Junker R et al. Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2355-2363.
5. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med*. 1989;321:1311-1316.
6. Kronenberg F, Kronenberg MF, Kiechl S et al. Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation*. 1999;100:1154-1160.
7. Assmann G, Carmena R, Cullen P et al. Coronary heart disease: reducing the risk: a worldwide view. International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease. *Circulation*. 1999;100:1930-1938.
8. Gerhard GT, Duell PB. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1999;10:417-428.
9. Goldbourt U, Neufeld HN. Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1986;6:357-377.
10. Glassman AH, Shapiro PA. Depression and the course of coronary artery disease. *Am J Psychiatry*. 1998;155:4-11.
11. Nathan L, Chaudhuri G. Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:477-515.
12. Kugiyama K, Doi H, Takazoe K et al. Remnant lipoprotein levels in fasting serum predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1999;99:2858-2860.
13. Campbell LA, Rosenfeld M, Kuo CC. The role of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis--recent evidence from animal models. *Trends Microbiol*. 2000;8:255-257.
14. Fong IW, Chiu B, Viira E et al. De Novo induction of atherosclerosis by *Chlamydia pneumoniae* in a rabbit model. *Infect Immun*. 1999;67:6048-6055.
15. Laitinen K, Laurila A, Pyhala L et al. *Chlamydia pneumoniae* infection induces inflammatory changes in the aortas of rabbits. *Infect Immun*. 1997;65:4832-4835.
16. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241.

17. Nicoletti A, Caligiuri G, Paulsson G et al. Functionality of specific immunity in atherosclerosis. *Am Heart J*. 1999;138:S438-S443.
18. Oliver MF. Prevention of coronary heart disease--propaganda, promises, problems, and prospects. *Circulation*. 1986;73:1-9.
19. Stary HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992;421:277-290.
20. Stary HC, Chandler AB, Glagov S et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:840-856.
21. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1512-1531.
22. Chesebro JH, Fuster V. Thrombosis in unstable angina. *N Engl J Med*. 1992;327:192-194.
23. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med*. 1986;314:488-500.
24. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.
25. Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol*. 1999;155:1-5.
26. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. 1991;88:1785-1792.
27. Kita T, Kume N, Minami M et al. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;947:199-205.
28. Bhakdi S, Dorweiler B, Kirchmann R et al. On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J Exp Med*. 1995;182:1959-1971.
29. Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet*. 1997;350:430-436.
30. Stemme S, Holm J, Hansson GK. T lymphocytes in human atherosclerotic plaques are memory cells expressing CD45RO and the integrin VLA-1. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:206-211.
31. Gown AM, Tsukada T, Ross R. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1986;125:191-207.

32. Bobryshev YV, Lord RS. Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions. *Cardiovasc Res.* 1998;37:799-810.
33. Xu QB, Oberhuber G, Gruschwitz M et al. Immunology of atherosclerosis: cellular composition and major histocompatibility complex class II antigen expression in aortic intima, fatty streaks, and atherosclerotic plaques in young and aged human specimens. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990;56:344-359.
34. Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2003;10:63-71.
35. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 1991;251:788-791.
36. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS et al. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:842-851.
37. Gimbrone MA, Jr., Nagel T, Topper JN. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest.* 1997;99:1809-1813.
38. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr. et al. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science.* 1989;243:1160-1165.
39. Ghersa P, Hooft vH, Whelan J et al. Labile proteins play a dual role in the control of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) gene regulation. *J Biol Chem.* 1992;267:19226-19232.
40. von Asmuth EJ, Smeets EF, Ginsel LA et al. Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells. *Eur J Immunol.* 1992;22:2519-2526.
41. Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today.* 1993;14:506-512.
42. Abbassi O, Kishimoto TK, McIntire LV et al. E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J Clin Invest.* 1993;92:2719-2730.
43. Lawrence MB, Springer TA. Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol.* 1993;151:6338-6346.
44. Hakkert BC, Kuijpers TW, Leeuwenberg JF et al. Neutrophil and monocyte adherence to and migration across monolayers of cytokine-activated endothelial cells: the contribution of CD18, ELAM-1, and VLA-4. *Blood.* 1991;78:2721-2726.
45. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:767-804.
46. Chan BM, Elices MJ, Murphy E et al. Adhesion to vascular cell adhesion molecule 1 and fibronectin. Comparison of alpha 4 beta 1 (VLA-4) and alpha 4 beta 7 on the human B cell line JY. *J Biol Chem.* 1992;267:8366-8370.

47. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69:11-25.
48. Hynes RO, Lander AD. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell*. 1992;68:303-322.
49. Lusinskas FW, Lawler J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J*. 1994;8:929-938.
50. Miyamoto S, Akiyama SK, Yamada KM. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science*. 1995;267:883-885.
51. Hemler ME, Elices MJ, Parker C et al. Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol Rev*. 1990;114:45-65.
52. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994;84:2068-2101.
53. Alon R, Kassner PD, Carr MW et al. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol*. 1995;128:1243-1253.
54. Altevogt P, Hubbe M, Ruppert M et al. The alpha 4 integrin chain is a ligand for alpha 4 beta 7 and alpha 4 beta 1. *J Exp Med*. 1995;182:345-355.
55. Stewart M, Thiel M, Hogg N. Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7:690-696.
56. Lee JO, Rieu P, Arnaut MA et al. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*. 1995;80:631-638.
57. Peter K, O'Toole TE. Modulation of cell adhesion by changes in alpha L beta 2 (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction. *J Exp Med*. 1995;181:315-326.
58. Stewart M, Hogg N. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J Cell Biochem*. 1996;61:554-561.
59. Loftus JC, Liddington RC. Cell adhesion in vascular biology. New insights into integrin-ligand interaction. *J Clin Invest*. 1997;99:2302-2306.
60. Stanley P, Bates PA, Harvey J et al. Integrin LFA-1 alpha subunit contains an ICAM-1 binding site in domains V and VI. *EMBO J*. 1994;13:1790-1798.
61. Landis RC, McDowall A, Holness CL et al. Involvement of the "I" domain of LFA-1 in selective binding to ligands ICAM-1 and ICAM-3. *J Cell Biol*. 1994;126:529-537.
62. Petty HR, Todd RF, III. Integrins as promiscuous signal transduction devices. *Immunol Today*. 1996;17:209-212.
63. Borregaard N. Development of neutrophil granule diversity. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;832:62-68.
64. Carlos TM, Harlan JM. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol Rev*. 1990;114:5-28.

65. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994;84:2068-2101.
66. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*. 1991;67:1033-1036.
67. von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM et al. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:7538-7542.
68. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301-314.
69. Schmid-Schonbein GW, Shih YY, Chien S. Morphometry of human leukocytes. *Blood*. 1980;56:866-875.
70. Goldsmith HL, Spain S. Margination of leukocytes in blood flow through small tubes. *Microvasc Res*. 1984;27:204-222.
71. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*. 1994;55:662-675.
72. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL et al. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest*. 1989;84:92-99.
73. Picker LJ, Warnock RA, Burns AR et al. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell*. 1991;66:921-933.
74. von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD et al. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell*. 1995;82:989-999.
75. Lawrence MB, Berg EL, Butcher EC et al. Rolling of lymphocytes and neutrophils on peripheral node addressin and subsequent arrest on ICAM-1 in shear flow. *Eur J Immunol*. 1995;25:1025-1031.
76. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*. 1991;65:859-873.
77. Kuijpers TW, Hakkert BC, Hoogerwerf M et al. Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and platelet-activating factor in neutrophil adherence to IL-1-prestimulated endothelial cells. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-mediated CD18 activation. *J Immunol*. 1991;147:1369-1376.
78. Smith JB, Kunjummen RD, Kishimoto TK et al. Expression and regulation of L-selectin on eosinophils from human adults and neonates. *Pediatr Res*. 1992;32:465-471.
79. Harlan JM. Leukocyte adhesion deficiency syndrome: insights into the molecular basis of leukocyte emigration. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993;67:S16-S24.

80. Schwartz BR, Wayner EA, Carlos TM et al. Identification of surface proteins mediating adherence of CD11/CD18-deficient lymphoblastoid cells to cultured human endothelium. *J Clin Invest.* 1990;85:2019-2022.
81. Hogg N, Landis RC. Adhesion molecules in cell interactions. *Curr Opin Immunol.* 1993;5:383-390.
82. Poston RN, Haskard DO, Coucher JR et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* 1992;140:665-673.
83. van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ et al. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1992;141:1427-1433.
84. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA et al. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998;102:145-152.
85. Collins RG, Velji R, Guevara NV et al. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191:189-194.
86. Shih PT, Brennan ML, Vora DK et al. Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ Res.* 1999;84:345-351.
87. Proost P, Wuyts A, van Damme J. The role of chemokines in inflammation. *Int J Clin Lab Res.* 1996;26:211-223.
88. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D et al. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest.* 1991;88:1121-1127.
89. Boring L, Gosling J, Cleary M et al. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:894-897.
90. Wilcox JN, Nelken NA, Coughlin SR et al. Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques. *J Atheroscler Thromb.* 1994;1 Suppl 1:S10-S13.
91. Pattison JM, Nelson PJ, Huie P et al. RANTES chemokine expression in transplant-associated accelerated atherosclerosis. *J Heart Lung Transplant.* 1996;15:1194-1199.
92. Xu L, Kelvin DJ, Ye GQ et al. Modulation of IL-8 receptor expression on purified human T lymphocytes is associated with changed chemotactic responses to IL-8. *J Leukoc Biol.* 1995;57:335-342.
93. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.* 1992;258:1798-1801.
94. Yue TL, Wang X, Sung CP et al. Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994;75:1-7.
95. Moulder JW. The relation of basic biology to pathogenic potential in the genus Chlamydia. *Infection.* 1982;10 Suppl 1:S10-S18.

96. Everett KD, Bush RM, Andersen AA. 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.* 1999;49 Pt 2:415-440.
97. Stephens RS. Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. **American Society for Microbiology**, 1999.
98. Fukushi H, Hirai K. Chlamydia pecorum--the fourth species of genus Chlamydia. *Microbiol Immunol.* 1993;37:516-522.
99. Grayston JT, Kuo CC, Wang SP et al. A new Chlamydia psittaci strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N Engl J Med.* 1986;315:161-168.
100. Everett KD, Andersen AA, Plaunt M et al. Cloning and sequence analysis of the major outer membrane protein gene of Chlamydia psittaci 6BC. *Infect Immun.* 1991;59:2853-2855.
101. Hatch TP, Allan I, Pearce JH. Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of Chlamydia spp. *J Bacteriol.* 1984;157:13-20.
102. Ward ME, Murray A. Control mechanisms governing the infectivity of Chlamydia trachomatis for HeLa cells: mechanisms of endocytosis. *J Gen Microbiol.* 1984;130:1765-1780.
103. Tamura A, Matsumoto A, Higashi N. Purification and chemical composition of reticulate bodies of the meningopneumonitis organisms. *J Bacteriol.* 1967;93:2003-2008.
104. Hackstadt T, Todd WJ, Caldwell HD. Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae? *J Bacteriol.* 1985;161:25-31.
105. Conlan JW, Clarke IN, Ward ME. Epitope mapping with solid-phase peptides: identification of type-, subspecies-, species- and genus-reactive antibody binding domains on the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. *Mol Microbiol.* 1988;2:673-679.
106. Coles AM, Reynolds DJ, Harper A et al. Low-nutrient induction of abnormal chlamydial development: a novel component of chlamydial pathogenesis? *FEMS Microbiol Lett.* 1993;106:193-200.
107. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev.* 1994;58:686-699.
108. Swanson AF, Kuo CC. Binding of the glycan of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis to HeLa cells. *Infect Immun.* 1994;62:24-28.
109. Wuppermann FN, Hegemann JH, Jantos CA. Heparan sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for Chlamydia pneumoniae. *Journal of Infectious Diseases.* 2001;184:181-187.

110. Chi EY, Kuo CC, Grayston JT. Unique ultrastructure in the elementary body of *Chlamydia* sp. strain TWAR. *J Bacteriol.* 1987;169:3757-3763.
111. Kuo CC, Chi EY. Ultrastructural study of *Chlamydia trachomatis* surface antigens by immunogold staining with monoclonal antibodies. *Infect Immun.* 1987;55:1324-1328.
112. Hackstadt T, Fischer ER, Scidmore MA et al. Origins and functions of the chlamydial inclusion. *Trends Microbiol.* 1997;5:288-293.
113. Heinzen RA, Scidmore MA, Rockey DD et al. Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 1996;64:796-809.
114. van Ooij C, Apodaca G, Engel J. Characterization of the *Chlamydia trachomatis* vacuole and its interaction with the host endocytic pathway in HeLa cells. *Infect Immun.* 1997;65:758-766.
115. Wissel H, Schulz C, Rudiger M et al. *Chlamydia pneumoniae* affect surfactant trafficking and secretion due to changes of type II cell cytoskeleton. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29:303-313.
116. Wyrick PB, Brownridge EA. Growth of *Chlamydia psittaci* in macrophages. *Infect Immun.* 1978;19:1054-1060.
117. Wolf K, Hackstadt T. Sphingomyelin trafficking in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. *Cell Microbiol.* 2001;3:145-152.
118. Hackstadt T, Scidmore MA, Rockey DD. Lipid metabolism in *Chlamydia trachomatis*-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:4877-4881.
119. Hatch TP, Miceli M, Sublett JE. Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during the developmental cycle of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol.* 1986;165:379-385.
120. Hatch TP, Al Hossainy E, Silverman JA. Adenine nucleotide and lysine transport in *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol.* 1982;150:662-670.
121. McClarty G. Chlamydiae and the biochemistry of intracellular parasitism. *Trends Microbiol.* 1994;2:157-164.
122. Hatch TP. Utilization of L-cell nucleoside triphosphates by *Chlamydia psittaci* for ribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol.* 1975;122:393-400.
123. Kuo CC, Grayston JT. Amino acid requirements for growth of *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures: growth enhancement by lysine or methionine depletion. *J Clin Microbiol.* 1990;28:1098-1100.
124. Todd WJ, Doughri AM, Storz J. Ultrastructural changes in host cellular organelles in the course of the chlamydial developmental cycle. *Zentralbl Bakteriol [Orig A]*. 1976;236:359-373.

125. Moulder JW. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev.* 1991;55:143-190.
126. Gieffers J, Durling L, Ouellette SP et al. Genotypic differences in the Chlamydia pneumoniae tyrP locus related to vascular tropism and pathogenicity. *J Infect Dis.* 2003;188:1085-1093.
127. Moulder JW, Levy NJ, Schulman LP. Persistent infection of mouse fibroblasts (L cells) with Chlamydia psittaci: evidence for a cryptic chlamydial form. *Infect Immun.* 1980;30:874-883.
128. Cevenini R, Donati M, Brocchi E et al. Partial characterization of an 89-kDa highly immunoreactive protein from Chlamydia psittaci A/22 causing ovine abortion. *FEMS Microbiol Lett.* 1991;65:111-115.
129. Matsumoto A, Manire GP. Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of Chlamydia psittaci. *J Bacteriol.* 1970;101:278-285.
130. Clark RB, Schatzki PF, Dalton HP. Ultrastructural effect of penicillin and cycloheximide on Chlamydia trachomatis strain HAR-13. *Med Microbiol Immunol.* 1982;171:151-159.
131. Gieffers J, Fullgraf H, Jahn J et al. Chlamydia pneumoniae infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation.* 2001;103:351-356.
132. Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP. Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent Chlamydia trachomatis infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:3998-4002.
133. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev.* 1994;58:686-699.
134. Shemer Y, Sarov I. Inhibition of growth of Chlamydia trachomatis by human gamma interferon. *Infect Immun.* 1985;48:592-596.
135. Al Younes HM, Rudel T, Brinkmann V et al. Low iron availability modulates the course of Chlamydia pneumoniae infection. *Cell Microbiol.* 2001;3:427-437.
136. Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP. Repeated and persistent infection with Chlamydia and the development of chronic inflammation and disease. *Trends Microbiol.* 1994;2:94-98.
137. Maass M, Gieffers J, Solbach W. Atherogenetically relevant cells support continuous growth of Chlamydia pneumoniae. *Herz.* 2000;25:68-72.
138. Kol A, Lichtman AH, Finberg RW et al. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol.* 2000;164:13-17.
139. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH et al. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest.* 1999;103:571-577.

140. Mayr M, Metzler B, Kiechl S et al. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae*: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation*. 1999;99:1560-1566.
141. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62:379-433.
142. Matsumoto A. Isolation and electron microscopic observations of intracytoplasmic inclusions containing *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol*. 1981;145:605-612.
143. Miyashita N, Kanamoto Y, Matsumoto A. The morphology of *Chlamydia pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 1993;38:418-425.
144. Hsia RC, Pannekoek Y, Ingerowski E et al. Type III secretion genes identify a putative virulence locus of *Chlamydia*. *Mol Microbiol*. 1997;25:351-359.
145. Bavoil PM, Hsia RC. Type III secretion in *Chlamydia*: a case of déjà vu? *Mol Microbiol*. 1998;28:860-862.
146. Kalman S, Mitchell W, Marathe R et al. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet*. 1999;21:385-389.
147. Read TD, Brunham RC, Shen C et al. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:1397-1406.
148. Dong F, Sharma J, Xiao Y et al. Intramolecular dimerization is required for the chlamydia-secreted protease CPAF to degrade host transcriptional factors. *Infect Immun*. 2004;72:3869-3875.
149. Zhong G, Fan P, Ji H et al. Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J Exp Med*. 2001;193:935-942.
150. Bannantine JP, Rockey DD, Hackstadt T. Tandem genes of *Chlamydia psittaci* that encode proteins localized to the inclusion membrane. *Mol Microbiol*. 1998;28:1017-1026.
151. Hatch GM, McClarty G. Phospholipid composition of purified *Chlamydia trachomatis* mimics that of the eucaryotic host cell. *Infect Immun*. 1998;66:3727-3735.
152. Fan T, Lu H, Hu H et al. Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med*. 1998;187:487-496.
153. Brade H. Chlamydial lipopolysaccharide. In: Opal SM, Vogel SN, Morrison DC, editors. *Endotoxin in Health and Disease*. 1999: 229-242.
154. Brade H, Brade L, Nano FE. Chemical and serological investigations on the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:2508-2512.

155. Ingalls RR, Rice PA, Qureshi N et al. The inflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* infection is endotoxin mediated. *Infect Immun.* 1995;63:3125-3130.
156. Birkelund S, Lundemose AG, Christiansen G. Chemical cross-linking of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 1988;56:654-659.
157. Peterson EM, de la Maza LM, Brade L et al. Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun.* 1998;66:3848-3855.
158. Kalayoglu MV, Byrne GI. Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis.* 1998;177:725-729.
159. Grayston JT. Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *J Infect Dis.* 2000;181 Suppl 3:S402-S410.
160. Forsey T, Darougar S, Treharne JD. Prevalence in human beings of antibodies to *Chlamydia IOL-207*, an atypical strain of chlamydia. *J Infect.* 1986;12:145-152.
161. Dalhoff K, Maass M. *Chlamydia pneumoniae* pneumonia in hospitalized patients. Clinical characteristics and diagnostic value of polymerase chain reaction detection in BAL. *Chest.* 1996;110:351-356.
162. Theunissen HJ, Lemmens-den Toom NA, Burggraaf A et al. Influence of temperature and relative humidity on the survival of *Chlamydia pneumoniae* in aerosols. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:2589-2593.
163. Suttorp N, Krüll M. Clinical manifestation Community acquired Pneumoniae. 2007.
164. Hahn DL. *Chlamydia pneumoniae*, asthma, and COPD: what is the evidence? *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1999;83:271-88, 291.
165. Hahn DL, McDonald R. Can acute *Chlamydia pneumoniae* respiratory tract infection initiate chronic asthma? *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1998;81:339-344.
166. Allegra L, Blasi F, Centanni S et al. Acute exacerbations of asthma in adults: role of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Eur Respir J.* 1994;7:2165-2168.
167. Hahn DL. Infectious asthma: a reemerging clinical entity? *J Fam Pract.* 1995;41:153-157.
168. Von Hertzen L, Alakarppa H, Koskinen R et al. *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Epidemiol Infect.* 1997;118:155-164.
169. Wu L, Skinner SJ, Lambie N et al. Immunohistochemical staining for *Chlamydia pneumoniae* is increased in lung tissue from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:1148-1151.
170. Steiner I, Nisipianu P, Wirguin I. Infection and the etiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2001;1:271-276.

171. Yucesan C, Sriram S. Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system. *Curr Opin Neurol.* 2001;14:355-359.
172. Koyi H, Branden E, Gnarpe J et al. Chlamydia pneumoniae may be associated with lung cancer. Preliminary report on a seroepidemiological study. *APMIS.* 1999;107:828-832.
173. Laurila AL, Anttila T, Laara E et al. Serological evidence of an association between Chlamydia pneumoniae infection and lung cancer. *Int J Cancer.* 1997;74:31-34.
174. Wang SP, Grayston JT. Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. *Am J Ophthalmol.* 1970;70:367-374.
175. Maass M, Gieffers J. Cardiovascular disease risk from prior Chlamydia pneumoniae infection can be related to certain antigens recognized in the immunoblot profile. *J Infect.* 1997;35:171-176.
176. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L et al. Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Intern Med.* 1992;116:273-278.
177. Linnanmaki E, Leinonen M, Mattila K et al. Chlamydia pneumoniae-specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease. *Circulation.* 1993;87:1130-1134.
178. Kuo CC, Gown AM, Benditt EP et al. Detection of Chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1501-1504.
179. Melnick SL, Shahar E, Folsom AR et al. Past infection by Chlamydia pneumoniae strain TWAR and asymptomatic carotid atherosclerosis. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Am J Med.* 1993;95:499-504.
180. Blasi F, Cosentini R, Raccanelli R et al. A possible association of Chlamydia pneumoniae infection and acute myocardial infarction in patients younger than 65 years of age. *Chest.* 1997;112:309-312.
181. Mazzoli S, Tofani N, Fantini A et al. Chlamydia pneumoniae antibody response in patients with acute myocardial infarction and their follow-up. *Am Heart J.* 1998;135:15-20.
182. Wimmer ML, Sandmann-Strupp R, Saikku P et al. Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease. *Stroke.* 1996;27:2207-2210.
183. Campbell LA, O'Brien ER, Cappuccio AL et al. Detection of Chlamydia pneumoniae TWAR in human coronary atherectomy tissues. *J Infect Dis.* 1995;172:585-588.
184. Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA et al. Chlamydia pneumoniae (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:6911-6914.
185. Kuo CC, Shor A, Campbell LA et al. Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis.* 1993;167:841-849.

186. Weiss SM, Roblin PM, Gaydos CA et al. Failure to detect Chlamydia pneumoniae in coronary atheromas of patients undergoing atherectomy. *J Infect Dis.* 1996;173:957-962.
187. Bartels C, Maass M, Bein G et al. Detection of Chlamydia pneumoniae but not cytomegalovirus in occluded saphenous vein coronary artery bypass grafts. *Circulation.* 1999;99:879-882.
188. Moazed TC, Kuo CC, Grayston JT et al. Evidence of systemic dissemination of Chlamydia pneumoniae via macrophages in the mouse. *J Infect Dis.* 1998;177:1322-1325.
189. Maass M, Bartels C, Kruger S et al. Endovascular presence of Chlamydia pneumoniae DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis.* 1998;140 Suppl 1:S25-S30.
190. Muhlestein JB, Hammond EH, Carlquist JF et al. Increased incidence of Chlamydia species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:1555-1561.
191. Ong G, Thomas BJ, Mansfield AO et al. Detection and widespread distribution of Chlamydia pneumoniae in the vascular system and its possible implications. *J Clin Pathol.* 1996;49:102-106.
192. Juvonen J, Juvonen T, Laurila A et al. Demonstration of Chlamydia pneumoniae in the walls of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1997;25:499-505.
193. Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC et al. Isolation of Chlamydia pneumoniae from a carotid endarterectomy specimen. *J Infect Dis.* 1997;176:292-295.
194. Jackson LA, Campbell LA, Schmidt RA et al. Specificity of detection of Chlamydia pneumoniae in cardiovascular atheroma: evaluation of the innocent bystander hypothesis. *Am J Pathol.* 1997;150:1785-1790.
195. Taylor-Robinson D. Chlamydia pneumoniae in vascular tissue. *Atherosclerosis.* 1998;140 Suppl 1:S21-S24.
196. Paterson DL, Hall J, Rasmussen SJ et al. Failure to detect Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic plaques of Australian patients. *Pathology.* 1998;30:169-172.
197. Daus H, Ozbek C, Saage D et al. Lack of evidence for a pathogenic role of Chlamydia pneumoniae and cytomegalovirus infection in coronary atheroma formation. *Cardiology.* 1998;90:83-88.
198. Bauriedel G, Welsch U, Likungu JA et al. [Chlamydia pneumoniae in coronary plaques: Increased detection with acute coronary syndrome]. *Dtsch Med Wochenschr.* 1999;124:375-380.
199. Rassa M, Cazzavillan S, Scagnelli M et al. Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic arteries from various vascular regions. *Atherosclerosis.* 2001;158:73-79.

200. Vink A, Poppen M, Schoneveld AH et al. Distribution of Chlamydia pneumoniae in the human arterial system and its relation to the local amount of atherosclerosis within the individual. *Circulation*. 2001;103:1613-1617.
201. Shor A, Phillips JL, Ong G et al. Chlamydia pneumoniae in atheroma: consideration of criteria for causality. *J Clin Pathol*. 1998;51:812-817.
202. Maass M, Bartels C, Engel PM et al. Endovascular presence of viable Chlamydia pneumoniae is a common phenomenon in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:827-832.
203. Ramirez JA. Isolation of Chlamydia pneumoniae from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. The Chlamydia pneumoniae/Atherosclerosis Study Group. *Ann Intern Med*. 1996;125:979-982.
204. Esposito G, Blasi F, Allegra L et al. Demonstration of viable Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic plaques of carotid arteries by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Ann Vasc Surg*. 1999;13:421-425.
205. Laitinen K, Laurila A, Pyhala L et al. Chlamydia pneumoniae infection induces inflammatory changes in the aortas of rabbits. *Infect Immun*. 1997;65:4832-4835.
206. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH et al. Infection with Chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation*. 1998;97:633-636.
207. Muhlestein JB. Chlamydia pneumoniae-induced atherosclerosis in a rabbit model. *J Infect Dis*. 2000;181 Suppl 3:S505-S507.
208. Moazed TC, Kuo C, Grayston JT et al. Murine models of Chlamydia pneumoniae infection and atherosclerosis. *J Infect Dis*. 1997;175:883-890.
209. Hu H, Pierce GN, Zhong G. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to Chlamydia pneumoniae. *J Clin Invest*. 1999;103:747-753.
210. Campbell LA, Kuo C. Mouse models of Chlamydia pneumoniae infection and atherosclerosis. *Am Heart J*. 1999;138:S516-S518.
211. Aalto-Setälä K, Laitinen K, Erkkilä L et al. Chlamydia pneumoniae does not increase atherosclerosis in the aortic root of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:578-584.
212. Caligiuri G, Rottenberg M, Nicoletti A et al. Chlamydia pneumoniae infection does not induce or modify atherosclerosis in mice. *Circulation*. 2001;103:2834-2838.
213. Rothstein NM, Quinn TC, Madico G et al. Effect of azithromycin on murine arteriosclerosis exacerbated by Chlamydia pneumoniae. *J Infect Dis*. 2001;183:232-238.
214. O'Connor CM, Dunne MW, Pfeffer MA et al. Azithromycin for the secondary prevention of coronary heart disease events: the WIZARD study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003;290:1459-1466.

215. Cleland JG, Huan LP, Freemantle N et al. Clinical trials update from the European Society of Cardiology: SENIORS, ACES, PROVE-IT, ACTION, and the HF-ACTION trial. *Eur J Heart Fail.* 2004;6:787-791.
216. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 1973;52:2745-2756.
217. Hirschberg H, Hirschberg T, Nousiainen H et al. The effects of corticosteroids on the antigen presenting properties of human monocytes and endothelial cells. *Clin Immunol Immunopathol.* 1982;23:577-585.
218. Posnett DN, Marboe CC, Knowles DM et al. A membrane antigen (HC1) selectively present on hairy cell leukemia cells, endothelial cells, and epidermal basal cells. *J Immunol.* 1984;132:2700-2702.
219. Voyta JC, Via DP, Butterfield CE et al. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol.* 1984;99:2034-2040.
220. Grimminger F, Hattar K, Papavassilis C et al. Neutrophil activation by anti-proteinase 3 antibodies in Wegener's granulomatosis: role of exogenous arachidonic acid and leukotriene B4 generation. *J Exp Med.* 1996;184:1567-1572.
221. Sanderson RJ, Shepperdson RT, Vatter AE et al. Isolation and enumeration of peripheral blood monocytes. *J Immunol.* 1977;118:1409-1414.
222. Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Futterer A et al. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer.* 1988;41:456-461.
223. Jantos CA, Heck S, Roggendorf R et al. Antigenic and molecular analyses of different Chlamydia pneumoniae strains. *J Clin Microbiol.* 1997;35:620-623.
224. Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK et al. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest.* 1994;94:1147-1155.
225. Hochmuth RM, Mohandas N, Blackshear PL, Jr. Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys J.* 1973;13:747-762.
226. Doroszewski J, Skierski J, Przadka L. Interaction of neoplastic cells with glass surface under flow conditions. *Exp Cell Res.* 1977;104:335-343.
227. Forrester JV, Lackie JM. Adhesion of neutrophil leucocytes under conditions of flow. *J Cell Sci.* 1984;70:93-110.
228. Lawrence MB, McIntire LV, Eskin SG. Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion. *Blood.* 1987;70:1284-1290.
229. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.

230. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983;132:6-13.
231. Dunne M. WIZARD and the design of trials for secondary prevention of atherosclerosis with antibiotics. *Am Heart J.* 1999;138:S542-S544.
232. Cercek B, Shah PK, Noc M et al. Effect of short-term treatment with azithromycin on recurrent ischaemic events in patients with acute coronary syndrome in the Azithromycin in Acute Coronary Syndrome (AZACS) trial: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2003;361:809-813.
233. Kaukoranta-Tolvanen SS, Laitinen K, Saikku P et al. Chlamydia pneumoniae multiplies in human endothelial cells in vitro. *Microb Pathog.* 1994;16:313-319.
234. Krull M, Klucken AC, Wuppermann FN et al. Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with Chlamydia pneumoniae. *J Immunol.* 1999;162:4834-4841.
235. Krull M, Kramp J, Petrov T et al. Differences in cell activation by Chlamydia pneumoniae and Chlamydia trachomatis infection in human endothelial cells. *Infect Immun.* 2004;72:6615-6621.
236. Krull M, Dold C, Hippenstiel S et al. Escherichia coli hemolysin and Staphylococcus aureus alpha-toxin potently induce neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J Immunol.* 1996;157:4133-4140.
237. Jahn HU, Krull M, Wuppermann FN et al. Infection and activation of airway epithelial cells by Chlamydia pneumoniae. *J Infect Dis.* 2000;182:1678-1687.
238. Cromwell O, Hamid Q, Corrigan CJ et al. Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology.* 1992;77:330-337.
239. Gaydos CA, Summersgill JT, Sahney NN et al. Replication of Chlamydia pneumoniae in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infect Immun.* 1996;64:1614-1620.
240. Reszka E, Jegier B, Wasowicz W et al. Detection of infectious agents by polymerase chain reaction in human aortic wall. *Cardiovasc Pathol.* 2008.
241. Ibrahim AI, Obeid MT, Jouma MJ et al. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in atherosclerotic plaques and in unaffected bypass grafts. *J Clin Virol.* 2005;32:29-32.
242. Rupp J, Koch M, vanZandbergen G et al. Transmission of Chlamydia pneumoniae infection from blood monocytes to vascular cells in a novel transendothelial migration model. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;242:203-208.
243. Gieffers J, van Zandbergen G, Rupp J et al. Phagocytes transmit Chlamydia pneumoniae from the lungs to the vasculature. *Eur Respir J.* 2004;23:506-510.

244. Maass M, Jahn J, Gieffers J et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* within peripheral blood monocytes of patients with unstable angina or myocardial infarction. *J Infect Dis.* 2000;181 Suppl 3:S449-S451.

7. Anhang

7.1. Verwendete Materialien

7.1.1. Verwendete Reagenzien

Reagenz	Bezugsquelle
[⁵¹ Cr]Na ₂ CrO ₄	DuPont NEN, Dreieich
Aceton	Merck
Acrylamid/Bisacrylamidlösung 40%	Serva
Agarose	Promega
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Amphotericin B (100 x)	Boehringer Mannheim
ASSRACHROME [®] vWF-ELISA	Boehringer Mannheim
BCECF-AM	Boehringer Mannheim
Biotinylierter Schaf-anti-Maus F(ab) ₂ -Fragment (anti-IgG/IgM)	An der Grub, Kaumberg, A
BSA (bovines Serumalbumin)	Serva, Heidelberg
α- ³² P-dCTP	Amersham
γ- ³² P-ATP	Amersham
Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Serva
EGF (epidermal growth factor)	Life Technologies, Eggenstein
EndoFree [™] Plasmid Kit	Qiagen
FITC-markierter Schaf-anti-Maus-Antikörper	Amersham, Braunschweig
Fötale Kälber Serum (FCS)	Life Technologies, Eggenstein
Gelatine	Sigma, München
Glutamin (200 mM)	Life Technologies, Eggenstein
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
HRP-konjugierter Schaf-anti-Maus-Antikörper	Amersham, Braunschweig
Kollagenase, Typ II	Worthington, New Jersey, U.S.A.
Lachssperma-DNA	Sigma

L-Glutamin 200 mM, 25030-024	GIBCO BRL/LifeTechnologies
MCDB 131 Medium	Life Technologies, Eggenstein
Medium-199 (M-199)	Life Technologies, Eggenstein
β -Mercaptoethanol	Serva
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Serva
Non-essential Amino-acids (100fach), K0293	Seromed Biochrom KG Berlin
OPI-supplement	SIGMA
ortho-Phenylendiamin	DAKO, Glostrup, DN
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin / Streptomycin (500 x)	Boehringer Mannheim
Percoll [®]	Pharmacia, Uppsala, S
PMA	Sigma, München
Polymyxin B	Pfizer, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Life Technologies, Eggenstein
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)	Amersham
RNeasy Total RNA Kit	Qiagen
Streptavidin-TC [®] (Tri-color)	Caltag, Kalifornien, U.S.A.
Penicillin/Streptomycin, A2213	Seromed Biochrom KG Berlin
SuperFect (Transfektionsreagenz)	Qiagen
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
Thrombin	Sigma, München
TRITC-Phalloidin	Sigma, München
Triton X100	Sigma, München
Trypsin-EDTA	Life Technologies, Eggenstein
Trypsin-EDTA, 0,5%	Life Technologies, Eggenstein
Venimmun [®] (humanes Immunglobulin)	Behring Werke, Marburg
X-Gal(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β - D-alactopyranosid)	Sigma

Alle weiteren Reagenzien (Salze, Säuren, Laugen, Lösungsmittel) wurden von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen.

7.1.2. Verwendete Zellkulturmaterialien

Es folgt eine Liste der verwendeten (sterilen) Einmalartikel für die Zellkultur.

Material	Bezugsquelle
MICROTEST III™ 96-Well-Platten mit Flachboden 96-Well-Platten mit Rundboden 15 / 50 ml BLUE MAX™ Röhrchen Kanülen, 21G-27G	Falcon®-Serie Becton Dickinson, Heidelberg
Injekt Einmalspritzen 2, 5, 10, 20 ml Luer 50ml Perfusion Plastipak® Perfusorspritzen Heidelberger Verlängerungen Discofix Drei-Wege Hähne Combidyn Druckschläuche, 50 cm	B. Braun AG, Melsungen
T25 / T80 Zellkultur-Flaschen 24-Well-Platten (rund) 4-Well-Platten (rechteckig) Petrischalen 145 x 20 mm TC ChamberSlides™, 8 Kammern Thermanox™ Plättchen 22 x 60 mm Transwell-Systeme 24-Well-Platten (rund)	Nalgene / Nunc, Wiesbaden
Deckgläser, Ø13mm, Stärke 0,085 mm - 0,130 mm	W. Plannet, Wetzlar
Pipettenspitzen Combitips Biopur für Multipette Reaktionsgefäße 1,5 ml / 2,2 ml	Eppendorf, Hamburg
Plastikröhrchen, 12 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Stericup™ 50 ml / 150 ml / 250 ml /500 ml,	Millipore, Göttingen

GP Express Membrane, 0,22 μm

7.1.3. Verwendete Puffer und Medien

PBS

PBS-Stammlösung (s. d.)	50,0 ml
A. bidest	ad 1000,0 ml
pH-Wert auf 7,4 mit 1M HCL bzw. 1M NaOH	

PBS-Stammlösung (20-fach)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	58,5 g
KH_2PO_4	9,8 g
NaCl	320,0 g
A. bidest	ad 1000,0 ml

Waschpuffer Durchflußzytometrie (0,25 % BSA, 0,1 % Na-Azid)

PBS-Stammlösung (s.d.)	50,0 ml
BSA	2,5 g
NaN_3	1,0 g
A. bidest	ad 1000,0 ml
pH-Wert auf 7,4 mit 1M HCL bzw. 1M NaOH, Lagerung auf Eis	

Gelatine (Stocklösung)

Gelatine	5,0 g
A. bidest	ad 1000,0 ml
erhitzen auf ca. 80°C, steril-filtrieren (0,22 μm Poren)	

PUCK's Puffer für Kollagenase

KCl	0,40 g
NaCl	8,00 g
NaHCO_3	0,35 g
D-Glukose	1,00 g
A. bidest	ad 1000,0 ml
pH-Wert auf 7,92 mit 0,1 M HCl einstellen	

Paraformaldehyd (20-fach)

Paraformaldehyd	200,0 g
A. bidest	ad 1000,0 ml

auf 60°C erhitzen (Abzug), tropfenweisen 1M NaOH zugeben, bis Lösung klar wird, bei Raumtemperatur abkühlen lassen, lichtgeschützt aufbewahren (4°C)

Paraformaldehyd (0,5 % in PBS)

Paraformaldehyd 20-fach (s. d.)	5,0 ml
A. bidest	ad 1000,0 ml

HBSS (10-fach)

KCl	4,0 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
NaCl	80,0 g
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	0,9 g
D-Glukose	10,0 g
A. bidest	ad 1000,0 ml

H/H -/-

HBSS (10-fach), s. d.)	100,0 ml
HEPES	6,0 g
A. bidest	ad 1000,0 ml

H/H +/-

HBSS (10-fach), s. d.)	100,000 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,185 g
HEPES	6,000 g
A. bidest	ad 1000,000 ml

H/H +/+

HBSS (10-fach), s. d.)	100,000 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,185 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,100 g
MgSO ₂ x 7 H ₂ O	0,100 g

HEPES	6,000 g
A. bidest	ad 1000,000 ml

PMN-Medium (RPMI 1640, 10 % FCS)

FCS	50,0 ml
Penicillin / Streptomycin	1,5 ml
RPMI 1640	ad 500,0 ml

Monozyten-Medium (RPMI 1640 mit 10% FCS)

FCS	50,0 ml
Glutamin	2mM
Penicillin/Streptomycin	1,5 ml
OPI Media Supplement (Sigma Aldrich)	2ml
Non Essential Amino Acids (NEAA, Gibco)	0,02 %
RPMI 1640	ad 500,0 ml

RPMI für MM6-Zellen

Penicillin/Streptomycin der Firma *Seromed Biochrom KG Berlin*, A2213, 10 ml mit 10000 U/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin.

L-Glutamin 200 mM der Firma *GIBCO BRL/LifeTechnologies*, 25030-024, 5 ml.

Non-essential Amino-acids (100fach) der Firma *Seromed Biochrom KG Berlin*, K0293, 5 ml.

OPI-supplement Sigma, *SIGMA*, O-5003, 5 ml; (enthält: Oxalsäure, Natrium-Pyruvat und Insulin).

Fötale Kälberserum (30 Minuten inaktiviert bei 56 °C), *Seromed Biochrom KG Berlin*, 10-20 %

7.1.3.1. Herstellung der Leukozyten-Medien

Das Medium für die Aufnahme der Leukozyten im Anschluß an die Isolation wurde unmittelbar vor Gebrauch durch Supplementierung des Fertigmediums (RPMI 1640, Life Technologies) unter sterilen Bedingungen hergestellt.

Medium für HAEC- / HUVEC-Isolation

Penicillin / Streptomycin	1,5 ml
Amphotericin B	2,0 ml
Medium 199	ad 500,0 ml

HAEC-Medium (M-199, 10 % FCS)

FCS	50,0 ml
Penicillin / Streptomycin	1,5 ml
Amphotericin B	2,0 ml
Medium 199	ad 500,0 ml

HUVEC-Medium (MCDB 131, 10 % FCS)

FCS	50,0 ml
Glutamin (200 mM)	5,0 ml
EGF	2,5 µg
Penicillin / Streptomycin	1,5 ml
Amphotericin B	1,0 ml
MCDB 131	ad 500,0 ml

Herstellung der Endothelzell-Medien

Sterilfiltration der Supplemente (Stericup™, 0,22 µm , GP Express Membrane, Millipore).
 Supplementierung von 450 ml MCDB 131 (Life Technologies) und erneute Sterilfiltration.
 Lagerung des fertigen Mediums im Kühlschrank

PMN-Gradient I (55 % Percoll®)

Percoll®	55,0 ml
NaCl (1,5 M)	10,0 ml
A. bidest	ad 100,0 ml

Gradient immer frisch ansetzen, Lagerung bei 4°C

PMN-Gradient II (70 % Percoll®)

Percoll®	70,0 ml
NaCl (1,5 M)	10,0 ml
A. bidest	ad 100,0 ml

Gradient immer frisch ansetzen, Lagerung bei 4°C

7.1.4. Verwendete monoklonale Antikörper (mAk)

Es folgt eine Übersicht über die verwendeten monoklonalen Primärantikörper und die entsprechenden Anwendungszwecke:

EL	ELISA (Cell-Surface-ELISA)
IN	funktionelle Inhibition / Neutralisation
IF	Immunfluoreszenz
FC	Durchflußzytometrie

7.1.4.1. Monoklonale Antikörper gegen Antigene humaner Endothelzellen

Erkanntes Antigen	Klon	Anwendung	Bezugsquelle
P-Selektin (CD62P)	CLB/thromb6	EL, IN	Immunotech, Hamburg
E-Selektin (CD62E)	1.2B6	IN, IF	Cymbus, Cambridge, UK
	BBIG-E4	EL	R&D Systems, Wiesbaden
ICAM-1 (CD54)	15.2	IN	Cymbus, Cambridge, UK
	BBIG-I1	EL	R&D Systems, Wiesbaden
VCAM-1 (CD106)	1.G11B1	IN, IF	Cymbus, Cambridge, UK
	BBIG-V1	EL	R&D Systems, Wiesbaden
PECAM-1 (CD31)	HEC-7	EL, IN, IF	NatuTec, Frankfurt
		IF	Santa Cruz
NF-KB P65			
sek. Ak Alexa [®] konjug.		IF	Molecular Probes
F(ab') ₂ , 488 FITC			
sek. Ak Alexa [®] konjug.		IF	Molecular Probes
F(ab') ₂ , 546 Rhodamin			

7.1.4.2. Monoklonale Antikörper gegen Antigene humaner Leukozyten

Erkanntes Antigen	Klon	Anwendung	Bezugsquelle
LFA-1 (CD11a)	25.3.1	IN	Immunotech, Hamburg

	38-FITC	FC	Cymbus, Cambridge, UK
Mac-1 (CD11b)	44	IN	Cymbus, Cambridge, UK
	44-FITC	FC	Cymbus, Cambridge, UK
p150, 95 (CD11c)	BU15	IN	Immunotech, Hamburg
	3.9-FITC	FC	Cymbus, Cambridge, UK
CD18	7E8	IN	Immunotech, Hamburg
	MEM 48-FITC	FC	Cymbus, Cambridge, UK
L-Selektin (CD62L)	DREG56	IN	Immunotech, Hamburg
	DREG56-FITC	FC	Immunotech, Hamburg
CD29	Lia 1/2	IN	Immunotech, Hamburg
	TDM29-FITC	FC	Immunotech, Hamburg
CD49d	HP2/1	IN	Immunotech, Hamburg
	44H6-FITC	FC	Immunotech, Hamburg

7.1.5. Plasmide

Bezeichnung	Resistenzen	Referenz
pGL-2	Ap	Promega
pSV- b- Gal	Ap	Promega

7.1.6. PCR-Primerpaare

Primer	Sequenz (forward / reverse)	Firma
E-Selektin	5'-ACCTCCACGGAAGCTATGAC-3'	Promega
	5'-TCCCAGATGAGGTACACTGA-3'	
ICAM-1	5'-AAAGGATGGCACTTTCCCAC-3'	TIB Molbiol, Berlin
	5'-TTCCCCTCTCATCAGGCTAGAC-3'	
VCAM-1	5'-TCCGTCTCATTGACTTGACAG-3'	MWG-Biotech
	5'-CTCTTGGTTTCCAGGGACTTC-3'	
GAPDH	5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3'	TIB Molbiol, Berlin
	5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCC-3'	

7.1.7. DNA-Sonden und Oligonukleotide

Sonde	Länge [bp]	Quelle
E-Selektin	932	Cid <i>et al.</i> , <i>J. Clin. Invest.</i> 1994
GAPDH	598	Giembycz M. A. <i>et al.</i> , <i>Br. J. Pharmacol.</i> 1996
ICAM-1	594	Cid <i>et al.</i> , <i>J. Clin. Invest.</i> 1994
VCAM-1	1000	Blease <i>et al.</i> , <i>Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.</i> 1998

Anhand der publizierten humanen DNA-Sequenz und in Anlehnung an Publikationen wurden Primerpaare mit Apa/Sac Restriktionsschnittstellen zur Herstellung der jeweiligen Sonden entwickelt. Die Amplifizierung der entsprechenden Sonden-Fragmente erfolgte mittels PCR. Anschließend wurden die Fragmente Apa/Sac restriktionsverdaut, in den pGEM-T Vektor ligiert und in kompetente Bakterienzellen (Epicurian XL1-blue, Stratagene) transformiert.

Oligonukleotid	Sequenz	Quelle
NF-κB	5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3' 3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5'	Promega

Die Sonden wurden kommerziell als doppelsträngige DNA-Fragmente erworben und terminal radioaktiv markiert.

7.1.8. Zusammensetzung der Gele

Das RNA-Gel setzt sich zusammen aus 1,2 g Agarose, 120 ml 1x MOPS und 8,7 ml Formaldehyd, welches erst nach kurzem Abkühlen der aufgekochten Agarosesubstanz zugegeben wird.

7.2. Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Aqua bidestillata
AS	Aminosäure (n)
BCECF-AM	2'7'-Bis-(carboxyethyl)-5(6)-Carboxyfluorescein-Acetoxy-methylester
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	cluster of differentiation
<i>C.pneumoniae</i>	<i>Chlamydia / Chlamydophila pneumoniae</i>
DAG	Diazylglyzerol
DiI-azetyl-LDL	3,3'-Diiodo-decylindocarbocyanin-azetyl-LDL
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	endothelial cells, Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELAM-1	Endothelial cell adhesion molecule-1
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-aided cell sorter, Durchflußzytometer
FCS	Fetal calf serum, fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
H/H -/-	Hanks-HEPES Puffer ohne Calcium und Magnesium
H/H +/-	Hanks-HEPES Puffer mit Calcium, ohne Magnesium
HBSS	Hanks buffered salt solution, Hanks' gepufferte Salzlösung
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-Ethansulfonsäure
HEV	high endothelial venules
HRP	horseradish-peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
HUVEC	Humane umbilikalvenöse Endothelzellen
ICAM-1/2/3	Intercellular adhesion molecule-1/2/3
Ig	Immunglobulin
IL-1 β	Interleukin-1 β
kDa	Kilodalton
LBP	LPS-bindendes Protein
LDL	low density lipoprotein

LFA-1	leukocyte function antigen 1, CD11a/18
LPS	Lipopolysaccharid A aus der Zellwand gramnegativer Bakterien
LTB ₄	Leukotrien B ₄
M199	Medium 199
MAdCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule-1
mAk	monoklonale(r) Antikörper
MHC	major histocompatibility complex
MLCK	Myosin-Leichtkettenkinase
mRNA	messenger-RNA, Boten-Ribonukleinsäure
n. d.	not determined, nicht gemessen
OPD	ortho-Phenylendiamin
PAF	Plättchenaktivierungsfaktor
PBS -/-	Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Calcium oder Magnesium
PECAM-1	Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
RPE	R-Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
s. d.	siehe dort
T75	Zellkulturflasche mit 75 cm ² Kulturfläche
TNF α	Tumornekrose-Faktor ?
TRITC	Tetramethylrhodamin B Isothiocyanat
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA ₄	very late antigen-4, CD29/49d
vWF	von-Willebrand-Faktor
WPB	Weibel-Palade-bodies, Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen

8. Publikationsverzeichnis

8.1. Originalarbeiten

Krull M, **Klucken AC**, Wuppermann FN, Fuhrmann O, Magerl C, Seybold J, Hippenstiel S, Hegemann JH, Jantos CA, Suttorp N. Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. **J Immunol.** 1999 Apr 15; 162(8):4834-41

Jahn HU, Krull M, Wuppermann FN, **Klucken AC**, Rosseau S, Seybold J, Hegemann JH, Jantos CA, Suttorp N. Infection and activation of airway epithelial cells by *Chlamydia pneumoniae*. **J Infect Dis.** 2000 Dec; 182(6):1678-87. Epub 2000 Oct 18

Krull M, Kramp J, Petrov T, **Klucken AC**, Hocke AC, Walter C, Schmeck B, Seybold J, Maass M, Ludwig S, Kuipers JG, Suttorp N, Hippenstiel S. Differences in cell activation by *Chlamydomphila pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* infection in human endothelial cells. **Infect Immun.** 2004 Nov; 72(11):6615-21.

Krüll, M, Bockstaller P, Wuppermann FN, Mühling J, **Klucken AC**, Schmeck B, Seybold J, Walter C, Maass M, Rosseau S, Hegemann JH, Suttorp N, and Hippenstiel S. Mechanisms of *Chlamydomphila pneumoniae* mediated GM-CSF release in human bronchial epithelial cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 2005

Noga O, Hanf G, Brachmann I, **Klucken AC**, Kleine-Tebbe J, Rosseau S, Seybold J, Suttorp S, Kunkel, G; Impact of omalizumab-induced apoptosis on peripheral eosinophis in patients with allergic asthma, **AJRCCM**

8.2. Veröffentlichte Vorträge

Klucken AC, Krull M, Wuppermann FN, Fuhrmann O, Magerl C, Seybold J, Hippenstiel S, Hegemann JH, Jantos CA, Suttorp N. Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. Pneumologie 54:577, DGP-Kongress

8.3. Abstracts

Hanf G, Noga O, Brachmann I, **Klucken AC**, Seybold J, Rosseau S, Kunkel G, Suttorp N. Omalizumab (rhuMAb-E25) hemmt die IgE-Freisetzung stimulierter PBMC bei allergischen Asthmatikern in vitro. **46. Kongress der DGP 2005**

Noga O, Hanf G, Brachmann I, **Klucken AC**, Seybold J, Rosseau S, Kunkel G, Suttorp N. Omalizumab (rhuMAb-E25) induziert Apoptose in eosinophilen Granulozyten bei allergischen Atshmatikern. **46. Kongress der DGP 2005**

Klucken AC, Wricke K, Hocke A, Hammerschmidt S*, Witzenrath M, Suttorp N, Rosseau S
Pulmonale Abwehrmechanismen: Rekrutierung und Aktivierung von NK-Zellen bei der
Pneumokokken-Pneumonie, **44. Kongress der DGP 2003**

Hocke A, Lampe M, **Klucken AC**, Witzenrath M, Frisch E, Suttorp N, Rosseau S IL-15 und IL-
15Alpha in der Lunge: zelluläres und subzelluläres Expressionsmuster. **44. Kongress der
DGP 2003**

Krüll M, **Klucken AC**, Wuppermann FN, Fuhrmann O, Seybold J, Hippenstiel S, Hegemann
JH, Jantos CA, and Suttorp N. 1999. *Chlamydia pneumoniae*-mediated endothelial cell activa-
tion. **Clin. Microbiol. Infect.** 5/3:68

Krüll M, **Klucken AC**, Fuhrmann O, Seybold J, Hippenstiel S, Wuppermann FN, Hegemann
JH, Jantos CA, and Suttorp N. 1998. Endothelial cell activation following infection with *Chla-
mydia pneumoniae* - Impact on Adhesion molecules. **FASEB J.** 12/5:1999.

Krüll, M, **Klucken AC**, Fuhrmann O, Seybold J, Hippenstiel S, Wuppermann FN, Hegemann H,
Jantos CA, and Suttorp N. 1998. Endothelial cell activation following infection with *Chlamy-
dia pneumoniae* - Impact on Adhesion molecules. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.** 157/3:A205.

8.4. Buchbeiträge

AC Klucken und N Suttorp, Pneumokokkeninfektionen, In: Harrisons Innere Medizin, Berlin
2005. Ed.: M. Dietl, N. Suttorp, M. Zeitz. ABW Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin.2005.

AC Klucken, M Witzenrath und N Suttorp, Pneumokokkeninfektionen, In: Harrisons Innere
Medizin, Berlin 2002. Ed.: M. Dietl, J. Dudenhausen, N. Suttorp. ABW Wissenschaftsverlag
GmbH, Berlin. 2002

M Witzenrath, **AC Klucken** und N Suttorp, Infektionen durch *Staphylokokkus aureus*,
In: Harrisons Innere Medizin, Berlin 2002. Ed.: M. Dietl, J. Dudenhausen, N. Suttorp. ABW
Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin. 2002

A Hocke, **AC Klucken** und N Suttorp, Streptokokken- und Enterokokkeninfektionen,
In: Harrisons Innere Medizin, Berlin 2002. Ed.: M. Dietl, J. Dudenhausen, N. Suttorp. ABW
Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin. 2002

9. Erklärung

„Ich, Andrea Christina Klucken, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „*Chlamydomydia pneumoniae* – induzierte Aktivierung humaner Endothelzellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

24.04.2008

A.C. Klucken

10. Danksagung

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Matthias Krüll, der mir dieses Thema überlassen hat. Durch seine Betreuung, die sich zu jeder Zeit durch ein überaus großes Engagement und beeindruckende Hilfsbereitschaft auszeichnete, hat er das Gelingen dieser Doktorarbeit ermöglicht. Sein immer „offenes Ohr“ für neue Ideen sowie seine Bereitschaft, diese zu diskutieren haben für mich das Fundament der guten Zusammenarbeit ausgemacht.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. N. Suttorp, Direktor der Med. Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie, Charité, Universitätsmedizin Berlin bedanken. In vielen Laborbesprechungen über Ergebnisse, experimentelle Ansätze und Probleme habe ich über die immer neuen Ideen und die Diskussionsbereitschaft einen Einblick in wissenschaftliches Denken erhalten.

Herrn PD Dr. Frederik Wuppermann und Herrn PD Dr. Christian Jantos möchte ich für die Einarbeitung in die komplizierte Welt der Chlamydien danken, besonders haben mich die Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft von PD Dr. Wuppermann beeindruckt.

Weiter möchte ich mich bei all meinen Laborkollegen, insbesondere Herrn Dr. Oliver Fuhrmann, Frau Dr. Nicole Schwarzer, Frau Heike Geisel und Frau Dipl. Ing. Susanne Tannert-Otto für die Unterstützung, Aufmunterungen und das gute Arbeitsklima bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt natürlich meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mich während der ganzen Zeit der Ausbildung und meiner Promotion vorbehaltlos unterstützt und aufgemuntert haben. Und zu guter Letzt einen großen Dank an Christian.

