

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Direktor: Prof. Dr. med. Werner Solbach

Vertreten in der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

durch das Institut für Medizinische Molekularbiologie

der Universität Lübeck

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Peter Müller

**Wechselseitige Modulation der  
Genexpression von *Chlamydia pneumoniae*  
und humanen vaskulären Zellen *in vitro* und *ex vivo***

Inauguraldissertation

Zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität Lübeck

- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

vorgelegt von

Viola Wobbe aus Hamburg

Lübeck, 2006

Datum der mündlichen Prüfung:

29.08.2006

Vorsitzender der Prüfungskommission:

Prof. Dr. rer. nat. R. Hilgenfeld

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. V. Gauss-Müller

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. J. Gieffers

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	7
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
1.1 Entdeckung von <i>Chlamydia pneumoniae</i> ( <i>Chlamydophila pneumoniae</i> ).....	10
1.2 Eigenschaften von <i>C. pneumoniae</i> .....	10
1.3 Epidemiologie .....	13
1.4 Diagnostik von <i>C. pneumoniae</i> -Infektionen.....	13
1.5 Therapie von <i>C. pneumoniae</i> -Infektionen .....	14
1.6 Persistenzzustand von <i>C. pneumoniae</i> .....	16
1.7 Atherosklerose und <i>C. pneumoniae</i> .....	16
1.8 Zielsetzung.....	18
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
<b>I. MATERIAL.....</b>	<b>20</b>
2.1 Primärzellen und Zelllinien .....	20
2.2 Chlamydienstamm .....	20
2.3 Tierversuche an Mäusen .....	20
2.4 Computerprogramme .....	21
2.5 Synthetische Oligonukleotide („Primer“)......	21
2.6 Zytokine.....	22

<b>2.7</b>	<b>Antikörper</b> .....	<b>23</b>
2.7.1	Polyklonaler IncA-Antikörper .....	23
2.7.2	Monoklonale Antikörper.....	23
2.7.3	Farbstoffe .....	23
<b>2.8</b>	<b>Chemikalien und Puffer</b> .....	<b>24</b>
<b>2.9</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>27</b>
<b>2.10</b>	<b>Geräte und Hilfsmittel</b> .....	<b>28</b>
<b>II.</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>29</b>
<b>2.11</b>	<b>Zellkultur</b> .....	<b>29</b>
2.11.1	HEp-2 Zellen (Humane Epithelzellen ) .....	29
2.11.1.1	Einfrieren der HEp-2 Zellen.....	29
2.11.2	HUVEC (Humane Nabelschnurzellen) .....	30
2.11.2.1	HUVEC Isolierung aus Nabelschnur.....	30
2.11.2.2	HUVEC-Anzucht .....	30
2.11.2.3	Einfrieren der HUVEC-Zellen .....	31
<b>2.12</b>	<b>CASMC (Primäre glatte Muskelzellen aus der Koronararterie)</b> .....	<b>31</b>
2.12.1	PBMC Isolierung aus Buffy Coats und Kultivierung.....	31
<b>2.13</b>	<b><i>C. pneumoniae</i>-Anzucht</b> .....	<b>32</b>
<b>2.14</b>	<b>Rekultivierung persistierender <i>C. pneumoniae</i> auf HEp-2</b> .....	<b>32</b>
<b>2.15</b>	<b><i>C. pneumoniae</i> mRNA-Quantifizierung in HEp-2 Zellen</b> .....	<b>32</b>
<b>2.16</b>	<b><i>C. pneumoniae</i> mRNA-Quantifizierung in primären Wirtszellen</b> .....	<b>33</b>
<b>2.17</b>	<b>RNA-Isolierung über Methode I</b> .....	<b>33</b>
<b>2.18</b>	<b>RNA-Isolierung über Methode II</b> .....	<b>34</b>
<b>2.19</b>	<b>Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)</b> .....	<b>35</b>

<b>2.20</b>	<b>Quantitative Real-Time PCR (LightCycler)</b> .....	<b>36</b>
<b>2.21</b>	<b>Färbemethoden für <i>C. pneumoniae</i></b> .....	<b>37</b>
2.21.1	FITC-Chlamydia LPS Färbung (Imagen, DAKO Cytomation).....	37
2.21.2	FITC-LPS-Antikörper .....	37
2.21.3	Endotheldarstellung im CD31-IFT an Mauseorten .....	38
2.21.4	Immunhistologische Färbung der Aortenringe und Zellkulturmonolayer.....	38
2.21.5	<i>Chlamydia pneumoniae</i> – Farbstoffbasierte intrazelluläre pH-Messung .....	40
<b>2.22</b>	<b>Nachweis des IncA Proteins über Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b> .....	<b>41</b>
<b>2.23</b>	<b>Indolamine-2,3-Dioxygenase (IDO) Untersuchung</b> .....	<b>43</b>
<b>2.24</b>	<b>Transkriptionsanalyse humaner Wirtszellen bei <i>C. pneumoniae</i> Infektion</b> .....	<b>44</b>
2.24.1	Vorversuche an Homogenisaten der Mauseorta .....	44
<b>2.25</b>	<b>Vorbereitung und Durchführung der Laser Capture Microdissection (LCM)</b> ...	<b>44</b>
2.25.1	Technischer Hintergrund .....	44
2.25.2	Präparation und Behandlung der Mauseorten.....	45
2.25.3	Erstellen von Gefrierschnitten.....	45
2.25.4	Immunfluoreszenzfärbung für die LCM.....	45
2.25.5	Gewinnung der Gewebe über LCM .....	46
2.25.6	Auswertung der LCM Gewebeproben.....	46
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Entwicklungszyklus von <i>C. pneumoniae</i> in Replikation und Persistenz</b> .....	<b>47</b>
<b>3.2</b>	<b>Infektionsraten in vaskulären und epithelialen Zellpopulationen</b> .....	<b>49</b>
<b>3.3</b>	<b>Vitalität von <i>C. pneumoniae</i> in vaskulären und epithelialen Zellpopulationen</b> ...	<b>49</b>
<b>3.4</b>	<b><i>C. pneumoniae</i>-Entwicklung unter IFN<math>\gamma</math>-Behandlung in HEP-2</b> .....	<b>50</b>
<b>3.5</b>	<b>Analyse der <i>C. pneumoniae</i> IncA-Transkription</b> .....	<b>51</b>
3.5.1	Quantitative Auswirkung der IFN $\gamma$ -Behandlung auf die IncA-mRNA-Synthese.....	51
3.5.2	IncA mRNA-Synthese in Muskelzellen (CASMC) .....	52

3.5.3	IncA mRNA-Synthese in Endothelzellen (HUVEC) .....	53
3.5.4	IncA mRNA-Synthese in PBMC .....	54
<b>3.6</b>	<b>Expressionsanalyse des Typ III Sekretions-Apparates in HEp-2 Zellen.....</b>	<b>55</b>
<b>3.7</b>	<b>Expressionsanalyse des Typ III Sekretions-Apparates in Muskel- und Endothelzellen.....</b>	<b>57</b>
<b>3.8</b>	<b>Expressionsanalyse des Typ III Sekretions-Apparates in PBMC .....</b>	<b>57</b>
<b>3.9</b>	<b>IncA-Proteinnachweis .....</b>	<b>57</b>
3.9.1	<i>C. pneumoniae</i> IncA-Protein in HEp-2 Zellen.....	58
3.9.2	<i>C. pneumoniae</i> IncA-Protein in CASMC .....	59
3.9.3	<i>C. pneumoniae</i> IncA-Protein in HUVEC .....	60
3.9.4	<i>C. pneumoniae</i> IncA-Protein in PBMC .....	61
<b>3.10</b>	<b>Rekultivierung persistierender Erreger aus CASMC in HEp-2.....</b>	<b>61</b>
<b>3.11</b>	<b>Untersuchung der IDO-Aktivität in HEp-2 Zellen .....</b>	<b>61</b>
<b>3.12</b>	<b>pH-abhängige Färbung der <i>C. pneumoniae</i> Einschlüsse in Persistenz und Replikation.....</b>	<b>62</b>
<b>3.13</b>	<b>Vorversuche mit homogenisierten Mäuseaorten.....</b>	<b>64</b>
<b>3.14</b>	<b>Kontrolle mit Hitze-inaktivierten Chlamydien .....</b>	<b>65</b>
<b>3.15</b>	<b>Vorbereitung für die LCM.....</b>	<b>65</b>
3.15.1	Färbung der Gewebsschnitte.....	65
3.15.2	Gewinnung infizierter Gewebe über Laser Capture Microdissection .....	69
3.15.3	Zur LCM Genexpressionsanalyse benötigte Gewebsmengen .....	70
<b>3.16</b>	<b>Gezielte Untersuchung <i>ex vivo</i> infizierter Aortengewebe .....</b>	<b>71</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>74</b>
<b>4.1</b>	<b>Analyse der <i>C. pneumoniae</i> mRNA-Synthese in vaskulären und epithelialen Wirtszellen in Persistenz und Replikation.....</b>	<b>74</b>

4.1.1	<i>C. pneumoniae</i> tritt in vaskulären Zellen spontan in den Persistenzzustand ein .....	75
4.1.2	Genexpression von IncA und Typ-III-Sekretionsapparat in der Persistenz .....	75
4.1.3	IDO und chlamydiale Persistenz .....	81
<b>4.2</b>	<b>Assoziation der <i>C. pneumoniae</i> Infektion mit Atherosklerose .....</b>	<b>83</b>
4.2.1	Einfluss der Chlamydien-Infektion auf Aortenhomogenisate im <i>ex vivo</i> Modell .....	85
4.2.2	Gezielte Untersuchung der vaskulären Infektionsherde mittels LCM .....	86
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>LISTE DER PUBLIKATIONEN, VORTRÄGE UND POSTER.....</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>105</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>106</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammonium Persulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
Ath.	Atherosklerose
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
Cp	Crossing point
Cy2	Cyanine-2
d	Tag, Tage
demin.	demineralisiert
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	deoxy-Nukleotid-Triphosphat
EB	Elementarkörperchen (Elementary Body)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötale Kälber Serum
gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
h	Stunde
HeLa	Cervix Carcinoma Cells
HEp-2	humane Karzinomzellen vom Mundboden (Plattenepithel)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSP	Heat Shock Protein
HRP	Horseradish peroxidase

IFT	Immunfluoreszenztest
IFU	Inclusion Forming Unit
IE	Internationale Einheit
IL	Interleukin
INF $\gamma$	Interferon gamma
kDa	Kilodalton
LCM	Laser Capture Microdissection
LDL	Low-Density Lipoprotein (cholesterol)
LSM	Lymphozyten-Separationsmedium
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor (Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor)
MEM	Minimum Essential Medium
MIF	Mikroimmunfluoreszenztest
MOMP	Major Outer Membrane Protein
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
m/v	Masse-Volumen-Verhältnis
OCT	Einbettmedium für Gefrierschnitte
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEN	Polyethylen Naphthalate
PVDF	Polyvinylidendifluorid (Membran)
rh	rekombinant human
RB	Retikularkörperchen (Reticulary Body)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Chain Reaction

SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Sekunden
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TCA	Trichloracetatsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TF-1	Tissue Factor-1
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen-Volumen-Verhältnis

# 1 Einleitung

## 1.1 Entdeckung von *Chlamydia pneumoniae* (*Chlamydophila pneumoniae*)

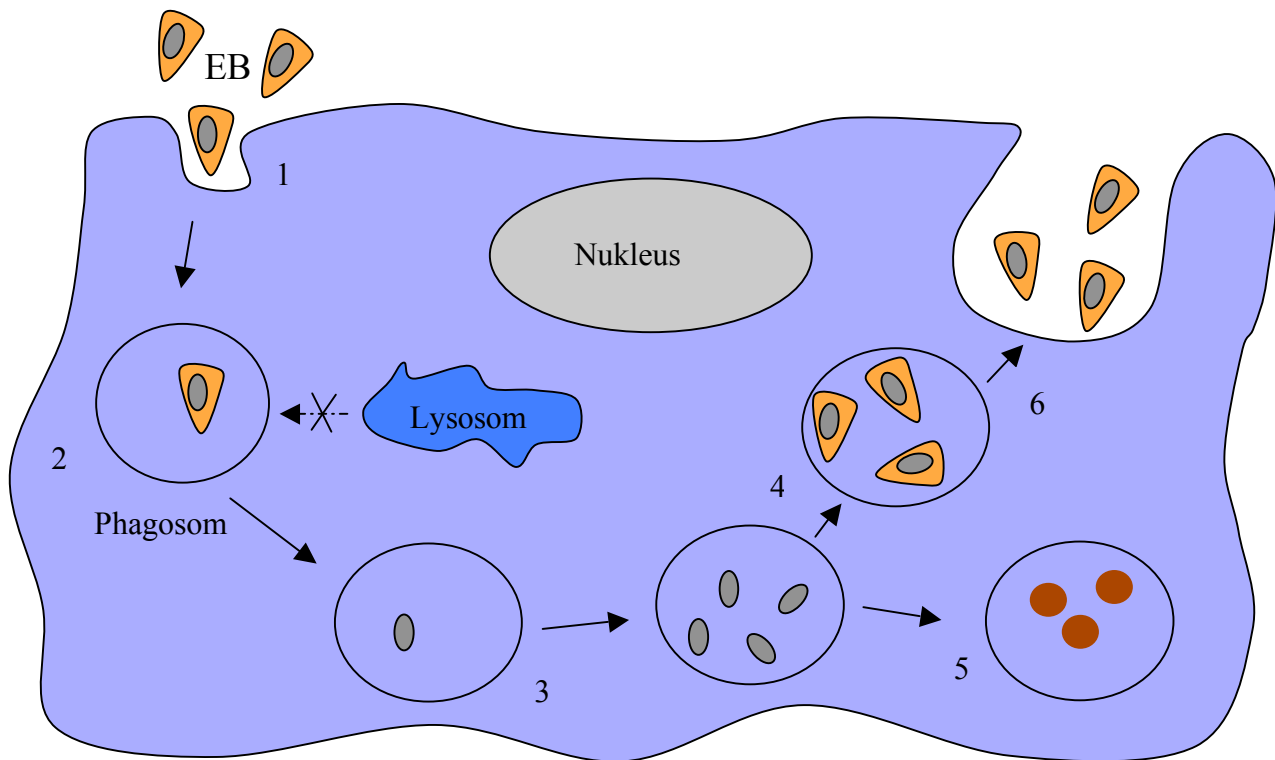
*Chlamydia pneumoniae* ist heute ein bekanntes Pathogen für akute respiratorische Erkrankungen, einschließlich Pneumonie, Bronchitis, Sinusitis und Pharyngitis. Entdeckt wurde das Bakterium (TW-183) zum ersten Mal 1965 in Taiwan, wo es aus der Konjunktiva eines Kindes isoliert werden konnte (Duo C-C, 1986). Die Anzucht war zu dieser Zeit nur im Dotter von Hühnereiern möglich, was die morphologische Beurteilung erschwerte. Erst über die Zellkultur wurde es möglich die Morphologie des entdeckten Isolats zu beurteilen. Das TW-183 Isolat wies Übereinstimmungen mit dem zu der Zeit bereits bekannten *C. psittaci* auf. Der nächste Befund kam von einem Abstrich eines Kindes im Iran 1968, welcher ebenfalls *C. pneumoniae* enthielt (Dwyer RS, 1972). Trotz dieser okulären Lokalisation wurde keine Verbindung von *C. pneumoniae* zu Augenerkrankungen gefunden. Erst 1983 wurde die Rolle des Bakteriums als Humanpathogen geklärt, nachdem man das erste respiratorische Isolat AR-39 in Seattle, Washington, von einem Studenten mit akuter Pharyngitis isolierte (Grayston J T, 1986). Beide Isolate TW-183 und AR-39 konnten der gleichen Spezies zugeordnet werden. Der vorläufige Name TWAR wurde 1989 durch *C. pneumoniae* ersetzt (Grayston JT, 1989). Die Stämme TW-183 und AR wurden daraufhin als dritte Spezies der Gattung *Chlamydia* (*Chlamydophila*) zugeordnet.

## 1.2 Eigenschaften von *C. pneumoniae*

*C. pneumoniae* wird zur Familie der Chlamydiaceae mit wenigstens vier verschiedenen Spezies eingeordnet: *Chlamydia trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* und *C. pecorum*. Vor kurzem wurde aufgrund von DNA-Analysen für *C. pneumoniae* die neue Gattungsbezeichnung *Chlamydophila* vorgeschlagen, die sich jedoch noch nicht durchgesetzt hat (Everett KD, 1999 / Schachter J, 1999).

Alle Spezies dieser Familie sind gram-negative und obligat intrazelluläre Parasiten. In ihrem Entwicklungszyklus durchlaufen sie zwei Zustandsformen, wobei die kleineren Elementarkörperchen (EB) die infektiöse Einheit darstellen. Sie sind ca. 0,3 µm groß und haben eine eher birnenförmige Gestalt und einen länglichen periplasmatischen Raum. Die EB

besitzen eine starre Zellwand, die osmotisch stabil ist und eine Envelope mit geringer Permeabilität aufweist (Hatch TP, 1999). Sie zeigen *in vitro* keine messbare metabolische Aktivität. EB haben die Funktion extrazellulär zu überdauern bis sie eine geeignete Wirtszelle finden, wobei die Überlebensrate extrazellulär kurz ist (Hackstadt T, 1999). Zu Beginn einer Infektion lagern sich die EB mit dem zugespitzten Ende an die Wirtszellen an. (Chi EY, 1987 / Kuo CC, 1988). Vergleicht man sie zu EB anderer Spezies, finden sich sphärische Formen ohne den auffälligen periplasmatischen Raum. Die Aufnahme in die Wirtszelle erfolgt durch Induktion von Phagozytose, hierbei bildet sich ein kleiner Vorsprung an der Zellwand und es kommt zur Invagination der Zellmembran. Chlamydiale Oberflächenproteine, wie Heparansulfat-ähnliche Proteoglykane, sollen bei der Anlagerung an den Wirt beteiligt sein (Su H, 1996). Der genaue Vorgang wurde bisher jedoch nicht geklärt. Die EB differenzieren sich innerhalb von 8-12 Stunden in einem Phagosomen zu den größeren Retikularkörperchen (RB). Die RB haben einen Durchmesser von ca. 1 µm und sind stoffwechselaktiv. Die Bakterien replizieren sich innerhalb der Wirtsphagosomen bei einem pH-Wert über 6 (Al-Younes HM, 1999). Sie befinden sich in der Wirtszelle in der Nähe des Wirtsnukleus und des Golgi-Apparats (Chi EY, 1987). Während der Entwicklung konnte gezeigt werden, dass sich um den Einschluss des Bakteriums frühe Endosomen konzentrieren, mit denen eventuell Interaktionen bestehen. Interaktionen mit späten Endosomen finden jedoch nicht statt. *C. pneumoniae* ist in der Lage die Reifung des Einschlusses zu einem Phagolysosom zu inhibieren und sich hierdurch eine sichere Nische in dem Wirt zu erhalten (Al-Younes HM, 1999). Der Erreger repliziert in den sogenannten Einschlüssen oder inclusions, deren Membran sowohl humane als auch chlamydiale Strukturen aufweist. Vor der induzierten Zellyse ist der Kreislauf von den replizierenden RB, die sich zu den extrazellulär überdauerungsfähigen EB entwickeln, abgeschlossen. Abbildung 1 stellt vereinfacht den Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae* dar. Dieser Zyklus entspricht einer akuten Infektion mit dem Erreger und dem Zelltod als unweigerlicher Folge. *C. pneumoniae* kann jedoch eine Zelle auch chronisch infizieren, ohne sie zu lysieren. Grundlage hierfür ist ein besonderer Persistenzstatus, der Gegenstand dieser Arbeit ist.



**Abbildung 1: Entwicklungszyklus von *Chlamydia pneumoniae*.** Die EB (1) werden über Phagozytose aufgenommen. *C. pneumoniae* kann die Fusion der Einschlüsse (2) mit Lysosomen verhindern. In den Einschlüssen kommt es unter Verlust zellwandstabilisierender Disulfidbrücken und des ausgeprägten periplasmatischen Raumes (orange wiedergegeben) zur Differenzierung der EB zu RB (3) und weiter zur Vermehrung durch Zweiteilung. Nach ca. 72 h findet die Reorganisation (4) von RB zu EB in den Einschlüssen statt oder die Bakterien bleiben in einer persistenten Lebensform ohne Zerstörung ihrer Wirtszelle erhalten (5). Die vollständig differenzierten und infektiösen EB (6) werden durch die induzierte Zellyse freigesetzt.

Vergleicht man die verschiedenen *Chlamydia* spp. miteinander, findet sich 94% Übereinstimmung ihrer 16S rRNA. Die höchsten Homologien finden sich zwischen *C. pneumoniae* und *C. psittaci* (Hermann B, 1996). Die *Chlamydia* spp. besitzen alle ein gemeinsames LPS (Lipopolysaccharid)-Antigen, das in der Diagnostik über fluoreszenzmarkierte Antikörper nachgewiesen werden kann. Zusätzlich finden sich auch genusspezifische LPS-Epitope bei den verschiedenen Spezies. Die vorherrschende Form des LPS ist die „rough“ Form analog zu *Salmonella minnesota* (Nurminen M, 1983). Das Chlamydien-LPS besitzt jedoch eine geringere endotoxische Aktivität als es bei *Salmonella* typisch ist. Das Chlamydien LPS kann eine Zytokinbildung im Wirt induzieren (Ivins BE, 1978/ Ingalls RR, 1995). Durch Antikörper ließ sich nachweisen, dass sich die chemische Struktur des LPS von EB und RB unterscheidet. Das in der äußeren Membran verankerte

MOMP unterscheidet sich strukturell in den beiden Entwicklungsformen. Im MOMP der EB werden Disulfid-Brückenbindungen ausgebildet und durch diese Kondensation entsteht eine Schutzfunktion. Diese Bindungen sind in den RB komplett reduziert (Newhall WJ, 1983 / Hatch TP, 1984). Von besonderem Interesse ist MOMP auch durch die Exposition der variablen Region des Moleküls auf der Oberfläche der Bakterien (Campbell LA, 1990) und der möglichen Bedeutung bei der Adhäsion der Bakterien an ihren Wirt. Zusätzlich wirkt MOMP in reduzierter Form als Porin für den Transport von ATP. Diese Funktion ist nur in den stoffwechselaktiven RB möglich, wo die reduzierte Form des Porins auftritt. Der Transport und die Aufnahme des ATP vom Wirt ist für die Bakterien lebensnotwendig, da eine selbstständige Energieerzeugung aufgrund des Verlustes der notwendigen Gene nicht möglich ist.

### 1.3 Epidemiologie

Studien zeigten, dass *C. pneumoniae* im Durchschnitt für 10% der ambulant erworbenen Fälle von Pneumonien und 5% der auftretenden Bronchitis- und Sinusitis-Fälle verantwortlich ist. (Grayston JT, 1992 / Kuo C-C, 1995). Die meisten Pneumonien verlaufen eher mild und erfordern keine klinische Versorgung. In schwereren Fällen kann die komplette Erholung jedoch trotz Antibiotika-Behandlung langsam vorangehen und mehrere Wochen dauern. Schwere Erkrankungen treten oftmals in Verbindung mit einer oder zwei Grunderkrankungen auf, wie z. B. anderen Infektionskrankheiten oder bei immunsupprimierten Patienten. (Marrie TJ, 1987). Die Erstinfektion ist am häufigsten bei Kindern zwischen 5 und 14 Jahren (Aldous MB, 1992). In vielen Ländern konnte bei erwachsenen Menschen eine Seroprävalenz von über 50% gefunden werden. Vergleicht man verschiedene Länder miteinander, ist in tropischen Ländern eine höhere Prävalenz als in nördlichen, industrialisierten Ländern, wie Dänemark und Kanada zu finden (Forsey T, 1986 / Kanamoto Y, 1991 / Marton A, 1992). Menschen stellen das einzige bekannte Reservoir für *C. pneumoniae* dar. Die Übertragung erfolgt aerogen von Mensch zu Mensch via respiratorische Sekretion. Die Inkubationszeit scheint einige Wochen zu dauern, was einen relativ langen Zeitraum für respiratorische Pathogene darstellt. Bei engem Kontakt konnten Übertragungen nach drei Wochen serologisch nachgewiesen werden (Mordhorst CH, 1994).

### 1.4 Diagnostik von *C. pneumoniae*-Infektionen

Zum Direktnachweis kann das Bakterium aus geeignetem Patientenmaterial über Zellkultur mit hoher Spezifität aber geringer Sensitivität kultiviert werden. Die Anzucht erfolgt über HEP-2-

oder HL-Zellkulturen, in denen *C. pneumoniae* das beste Wachstum zeigt. Das Probenmaterial muss innerhalb von 24 h verarbeitet werden und bei ca. 4°C oder für längere Zeit bei -75°C gelagert werden, um die Bakterien am Leben zu erhalten (Maass M, 1995A). Bei der Anzucht ist weiterhin auf die Zusammensetzung von Medien, den Kohlendioxidgehalt und die Temperatur zu achten (Maass M, 1995B). Die Art des Probenmaterials kann die Anzucht ebenfalls beeinflussen. Proben aus bronchoalveolärer Lavage zeigten gute Ergebnisse, wohingegen Sputum aufgrund der toxischen Wirkung saurer Mukopolysaccharide auf Zellkulturen unbrauchbar ist. Ein Rachenabstrich ist eine schnelle und einfache Möglichkeit, zeigt jedoch oftmals eine geringe Ausbeute.

Der indirekte, serologische Nachweis von *C. pneumoniae* erfolgt über den MIF-Test (Mikroimmunfluoreszenztest), der 1970 für *C. trachomatis* entwickelt wurde (Wang SP, 1970). Er ist der einzige spezifische und sensitive serologische Test für alle Chlamydien. Der heute verwendete MIF-Test für *C. pneumoniae* beinhaltet zumeist Antigene des TW-183 Stammes. Über diese Methode ist die Differenzierung zwischen IgM, IgG und IgA im Serum möglich, wodurch eine vergangene Infektion von einer Reinfektion und Neuinfektion unterschieden werden kann. Er basiert auf dem Nachweis speziesspezifischer Proteine nach Reduktion kreuzreagierender Substanzen (LPS) (Wang SP, 2000). Die Problematik des serologischen Verfahrens besteht neben der Subjektivität der Testablesung in der späten Nachweisbarkeit der Ak. Die IgM Ak erscheinen erst ca. 3 Wochen, IgG 6 bis 8 Wochen nach der Infektion. Für eine frische Infektion gilt entweder ein vierfacher Titer-Anstieg im Verlauf, ein IgM-Titer von mindestens 1:16 oder ein IgG-Titer von mindestens 1:512 als beweisend. Für eine zurückliegende Infektion gilt ein gleichbleibender IgG-Titer von 1:8 bis 1:256 als typisch. Bei einer Reinfektion kann die Bildung von IgM-Ak geringer sein oder ganz fehlen (Kuo CC, 1995). Eine wichtige diagnostische Direktnachweismethode ist heute die PCR. Sie hat eine hohe Sensitivität und Spezifität und die DNA lässt sich in verschiedenen Probenmaterialien direkt nachweisen (Gaydos CA, 1992 / Kuo CC, 1995 / Maass M, 1997). Der Nachweis mittels PCR ist aufgrund der längeren Stabilität der DNA von Vorteil, die Art und Länge des Transports ist hier weniger kritisch. Über diesen genetischen Nachweis kann jedoch keine Aussage über die Vitalität der Bakterien gemacht werden.

### 1.5 Therapie von *C. pneumoniae*-Infektionen

Für milde Erkrankungen mit *C. pneumoniae*, wie eine akute Bronchitis bei Jugendlichen und Erwachsenen, sind keine antibiotischen Behandlungen notwendig. Erst beim Auftreten von

chronischen respiratorischen Erkrankungen, wie chronischer Bronchitis, wird eine Therapie mit Makroliden, Tetracyclinen oder Chinolonen empfohlen (Gilbert DN, 2003). Über minimale Hemmkonzentrationen in Zellkulturen wurden Makrolide und Tetracycline als wirksamste Antibiotika ermittelt (Cooper MA, 1991 / Fenelon LE, 1990). Bei den respiratorischen Erkrankungen werden aufgrund klinischer Studien Behandlungen mit Clarithromycin und Azithromycin empfohlen sowie Kombinationstherapien (Roblin PM, 1997). Die positive Wirkung der Antibiotika kann auch durch ihre gute Anreicherung im Zellinneren und eine lange Halbwertszeit erklärt werden.

In Tierstudien zeigte die Kombinationen von Azithromycin mit Rifampicin die besten Ergebnisse, wobei in diesen Studien die Behandlung kurze Zeit nach der Infektion erfolgte und nicht einer chronischen Erkrankung beim Menschen entsprach (Wolf K, 1999). Eine Vergleichsstudie mit vaskulären und respiratorischen *C. pneumoniae* Stämmen zeigte in Zellkulturen keine deutlichen Vorteile der Kombination gegenüber Antibiotika-Behandlungen mit einer Substanz (Gieffers J, 1998). Einige Patientenstudien zeigten nach kurzen konventionellen Behandlungen mit adäquaten Antibiotika persistierende Infektionen für einen Zeitraum von über einem Jahr, weshalb eine intensive Langzeit-Therapie zur Erreger-Eradikation empfohlen wurde (Hammerschlag MR, 1992).

*In vitro* Studien mit Gemifloxacin oder Azithromycin konnten die Chlamydien-Titer reduzieren, jedoch nicht völlig eliminieren (Kutlin A, 2002). Behandlungen mit Ciprofloxacin und Ofloxacin an *C. trachomatis* in HEp-2 Zellkulturen zeigten ebenfalls keine vollständige Beseitigung der Bakterien aus den infizierten Zellen, sondern induzierten Persistenz der Erreger. Diese persistente Infektion war morphologisch durch eine geringe Anzahl kleiner aberranter Einschlüsse charakterisiert. Durch das Entfernen von Ciprofloxacin konnten die Bakterien wieder zu ihrem normalen Wachstumsverhalten zurückkehren (Dreses-Werringloer U, 2000). Ähnliche Ergebnisse erzielten Versuche mit Gemifloxacin und Levofloxacin, durch die die Bakterien im persistenten Stadium nicht vollständig eliminiert werden konnten (Hammerschlag MR, 2000). Ultrastrukturelle Studien von dauerhaft infizierten Zellen zeigten die Präsenz von zum Teil aberranten chlamydialen Einschlüssen, die morphologisch mit den bei Interferon-γ-behandelten Chlamydien auftretenden Formen übereinstimmten (Kutlin A, 2001).

### 1.6 Persistenzzustand von *C. pneumoniae*

Bei chronischen Infektionen kann *C. pneumoniae* über lange Zeit in den Wirtszellen verweilen, ohne diese wie im normalen Entwicklungszyklus zu zerstören (Abbildung 1). Man bezeichnet diesen Status als Persistenz der Bakterien. Dieser Zustand ist morphologisch charakterisiert durch atypische Formen der Einschlüsse, in denen die Bakterien als RB überleben. Die Mechanismen, die zur Persistenz führen, sind weitgehend ungeklärt. *In vitro* Studien zeigten jedoch, dass Mitglieder aus der Familie der Chlamydien unter einem Zytokin-induzierten Aminosäure-Mangel in ihrer Entwicklung sistieren und in die Persistenz übergehen können. Eine Möglichkeit Persistenz hervorzurufen, besteht auch in der Behandlung der Wirtszellen mit IFN $\gamma$ . IFN $\gamma$  wird nach einer *C. pneumoniae* Infektion bei Th-1 Immunantwort in murinen Modellen von Th-1-Lymphozyten und infizierten Makrophagen gebildet. Durch eine erhöhte Konzentration des IFN $\gamma$  wird die humane zelleigene Indol-Amino 2,3-Dioxygenase (IDO) Aktivität erhöht, was zu einem beschleunigten Abbau des intrazellulären L-Tryptophan-Reservoirs führt und einen L-Tryptophan-Mangel für die davon abhängigen Bakterien zur Folge hat (Rothfuchs AG, 2001 / 2004). Untersuchungen an verschiedenen Chlamydien zeigten Unterschiede in der Abhängigkeit von ihren Wirtszellen. *C. pneumoniae* benötigt alle AMS bis auf Lysin von der Wirtszelle. Im Gegensatz hierzu ist *C. trachomatis* vom Wirts-Threonin unabhängig (Kuo C-C, 1990). Die Wirkung von IFN $\gamma$  auf die bakterielle Genexpression gilt als ein Schlüsselmechanismus für die Persistenz und wird daher in der vorliegenden Arbeit an Modellen der vaskulären Infektion näher untersucht. Ein klinisch relevantes Merkmal des Persistenzzustandes ist zudem die Resistenz gegenüber Antibiotika, die bei akuter Infektion sonst gut wirken (Gieffers J, 2001).

### 1.7 Atherosklerose und *C. pneumoniae*

In Gewebeproben atherosklerotischer Plaques konnte überraschenderweise *Chlamydia pneumoniae* detektiert werden, was eine Beteiligung der Infektion an der Atherosklerose (Ath.) denkbar erscheinen lässt. Die ursprünglichen Modelle der Pathogenese von Ath. stellten eine eher statische Ansammlung von Lipid-beladenen Magrophagen und adhärierenden Thrombozyten in den Mittelpunkt. Diese Vorstellung ist heute durch eine dynamischere Entwicklung verschiedener Mechanismen erweitert worden. Ein wichtiger Faktor ist die hohe Cholesterin- Konzentration und hier vor allem das LDL (Low-density lipoprotein cholesterol) (National Cholesterol Education Program. 1993). Die Anreicherung des Lipids in der Arterienwand stellt einen grundlegenden Risikofaktor für die Entwicklung der Ath. dar. Neben

der LDL-Assoziation zeigt die Entwicklung der Ath. eine Serie von hochspezifischen zellulären und molekularen Antworten, die sich zusammengenommen am besten durch Inflammation beschreiben lässt. (Ross R, 1993). Die Läsionen der Ath. entwickeln sich hauptsächlich in großen und mittelgroßen elastischen und muskulären Arterien und können eine Ischämie des Herzens, des Gehirns oder der Extremitäten hervorrufen, was zum Infarkt führen kann. Die früheste Form von Läsionen, 'fatty streaks' findet man schon bei Kindern (Napoli C, 1997). Es handelt sich hier um eine rein inflammatorische Läsion, bestehend aus Makrophagen und T-Lymphozyten (Stary HC, 1994). In allen Stadien der Ath. sind auch inflammatorische Prozesse vorhanden (Libby P, 2002). Zu Beginn werden Leukozyten zu den Läsionen durch exprimierte Adhäsionsmoleküle der einzelligen Endothelschicht rekrutiert. Durch proinflammatorische Zytokine werden die Leukozyten nach transendothelialer Migration zur Intima dirigiert. Inflammation kann zu einer erweiterten Expression von macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) führen. Hierdurch kommt es zur Aufnahme von modifizierten Lipoproteinpartikeln und zur Formation von Lipid-beladenen Makrophagen, die als typische Schaumzellen in den Plaques zu finden sind. Mediatoren wie M-CSF fördern die Replikation der Makrophagen in der Intima. Transmigrierte Leukozyten, aber auch permanent gefäßwandständige Zellen sezernieren Zytokine und Wachstumsfaktoren und begünstigen die Migration und Proliferation der smooth muscle cells (SMC). Diese Muskelzellen bilden daraufhin Enzyme, die speziell das vaskuläre Elastin und Kollagen schwächen. Diese Schwächung der arteriellen extrazellulären Matrix begünstigt die Migration der SMC durch die elastische Lamina- und Kollagen-Matrix des anwachsenden Plaques. Die Pathogenese der Atherosklerose beinhaltet demnach eine immunologisch vermittelte Inflammation des Wirtsgewebes (Alexander RW, 1994 / Wick G, 1995). Die Ruptur der Intima von koronaren atherosklerotischen Plaques ist immer gekennzeichnet durch inflammatorische Prozesse, die eine wichtige Rolle bei der Destabilisierung faseriger Gewebe und ein gesteigertes Risiko für koronare Thrombose haben (Van der Wal AC, 1994).

Diese ganz allgemeinen Pathomechanismen und zellulären Reaktionsmuster zeigen, dass möglicherweise mehr schädliche Stimuli als die bisher bekannten Risikofaktoren eine Arteriosklerose mit initiieren und aggravieren können. Wie gesagt, wurden in atherosklerotischen Plaques *Chlamydia pneumoniae*, aber auch Herpesviren, detektiert. Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass solche zur Persistenz fähigen Erreger in der Aufrechterhaltung der koronaren Arterien-Erkrankung (coronary artery disease / CAD) beteiligt sein können. Grundsätzlich scheint eine Beteiligung persistierender infektiöser Erreger

als proinflammatorische Stimuli mit der Pathogenese der Atherosklerose gut vereinbar. Die potentielle Therapierbarkeit einer solchen Infektion macht das Konzept besonders interessant. Die Verbindung von *C. pneumoniae* mit der koronaren Herzerkrankung wurde zuerst mit Hilfe serologischer Methoden, dann durch direkte Detektion des Organismus in Gefäßen kulturell (Gieffers J, 1998), durch PCR, immunhistochemisch und mittels in situ Hybridisierung nachgewiesen. Eine proarteriosklerotische Modifikation der Genexpression der vaskulären Wirtszelle wurde bereits beschrieben (Dechend R, 1999) und weist auf den möglichen Pathomechanismus der Infektion bei der Atherosklerose hin. Ein möglicher Weg für die primär pulmonalen Chlamydien, sich in der Gefäßwand anzusiedeln, besteht im Transport innerhalb von Blut-Monozyten als Vektoren zum Ort der Gefäßläsionen, die diese Zellen in großen Mengen rekrutieren (Gieffers J, 2004 / Campbell LA, 1998 / Maass M, 1998 / Taylor-Robinson D, 1998). Das durchaus kontrovers diskutierte Konzept einer Beteiligung infektiöser Erreger an der Ath. bedarf dringend weiterer, eingehender Bearbeitung.

### 1.8 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll die gegenseitige Modifikation der Genexpression der Chlamydien und ihrer humanen Wirtszellen bei der chronischen vaskulären Infektion näher analysiert werden.

Aufgrund der therapeutischen Probleme bei *C. pneumoniae* Infektionen stellte sich die Frage: kann die persistente Erscheinungsform der Bakterien und die damit verbundene fehlende Therapiemöglichkeit der chronischen Infektion anhand von veränderten Transkriptions- oder Translationsmustern der Bakterien erklärt werden? Nur ein Verständnis des genetischen Hintergrundes der Persistenz wird ein Eliminieren dieser therapierefraktären Zustandsform der Chlamydien ermöglichen. Bisher liegen hierzu wenige Studien vor. Auf der Seite der Bakterien wird in dieser Arbeit das sezernierbare chlamydiale IncA Molekül untersucht, das für den Aufbau der Membran des chlamydialen Einschlusses essentiell ist. Das IncA Protein von *C. pneumoniae* wird in die Einschlussmembran über den Typ III Sekretions-Apparat der Bakterien transportiert (Subtil A, 2001). Es ist ein 43,3 kDa großes Protein mit einem auffälligen hydrophoben Motiv, das man auch bei den verwandten Proteinen IncB und IncC findet (Bannantine JP, 2000). Das Protein kommt hier in großen Mengen vor und kann im normalen Entwicklungszyklus nach 48 h und 72 h molekularbiologisch gut nachgewiesen werden (Lugert R, 2004). Das IncA Protein wird wahrscheinlich über das Typ III Transportsystem in die Einschlussmembran der Bakterien transportiert. Dieses Transportsystem ist ebenfalls für den

Transport von Effektor-Proteinen der Bakterien in ihre Wirtszelle verantwortlich (Subtil A, 2001). Aus dem Typ III Transportsystem wird die Transkription zweier strukturell essentieller Gene, LcrD und YscN, als Anhalt für die Effizienz der Proteinseznierung unter Bedingungen der Persistenz untersucht. Das LcrD Protein ist am Aufbau des Transportkanals durch die innere Membran beteiligt. Das YscN Protein bildet einen Teil der Injektionsnadel des Typ III Sekretions-Apparates. Da die persistenten Formen von *C. pneumoniae* nur unter speziellen Bedingungen ausgebildet werden, wurden zur Genexpressionsanalyse Modelle in Zellkultur etabliert. Basis waren vaskuläre Wirtszellen, wie glatte Muskelzellen und Endothelzellen, die auch in Patienten mit Atherosklerose Zielzellen für die Chlamydien sind.

Parallel wird der Effekt der Infektion auf den Wirt anhand eines *ex vivo* Modells mit Mäuseaorten untersucht. *C. pneumoniae* kann die Zytokin- und Chemokin-Produktion stimulieren sowie Adhäsionsmoleküle in endothelialen und epithelialen Zelllinien beeinflussen. (Gaydos CA, 2000 / Gaydos CA, 1996 / Kaukoranta-Tolvanen SS, 1996). Diese Mediatoren induzieren und unterhalten inflammatorische Prozesse. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Asthma und Atherosklerose (Horiguchi T, 2005). Beide Erkrankungen zeigten eine Verbindung zu chronischen *C. pneumoniae* Infektionen. In Zellkulturen konnte eine Erhöhung der IL-6 und IL-8 Produktion infolge der andauernden *C. pneumoniae* Infektion nachgewiesen werden. Beide Zytokine wurden in fibrösen Plaques im Frühstadium der Atherosklerose nachgewiesen (Rus H G, 1996). Prokoagulatorische Genprodukte wie TF-1 (Tissue Factor-1) wurden in erhöhter Menge in Plaques von Herzinfarkt-Patienten mit einer Assoziation zu *C. pneumoniae* nachgewiesen (Stintzing S, 2005). Hier soll die durch die Infektion dysregulierte Gentranskription erstmals *ex vivo* analysiert werden.

Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurde eine neue Technik, die Laser Capture Microdissection (LCM), eingesetzt. Die LCM-Technik erlaubt unter mikroskopischer Sicht die infizierten Bereiche eines Gewebes und die verschiedenen Gewebsschichten der Aorten voneinander abzugrenzen. Mit Hilfe eines Lasers wurden die jeweiligen Bereiche herausgeschnitten und für die mRNA-Analyse gesammelt. Die Beeinflussung durch die Chlamydien konnte so gezielt in den verschiedenen Geweben der Aorten untersucht werden. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Untersuchung proinflammatorischer Genprodukte der Wirtszellen wie Interleukin-6 und 8 (IL-6, IL-8) und prokoagulatorischer wie Tissue Factor-1 (TF-1) und Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1). Hiermit wird erstmalig in Projektion auf den Infektionsort die Wirtszelltranskription analysiert.

## 2 Material und Methoden

### I. Material

#### 2.1 Primärzellen und Zelllinien

**CASMC** (Coronary Artery Smooth Muscle Cells): Primäre glatte Muskelzellen aus der Koronararterie wurden von Clonetics (CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen, Product Code CC-2583) bestellt.

**HEp-2** (Human Epithelial Cell-2): Immortalisierte Plattenepithelzellen eines Larynxkarzinoms (American Type Culture Collection (ATCC) Nr. CCL 23)

**HUVEC** (Human Umbilical Vein Endothelial Cells): Bei diesen Zellen handelt es sich um Endothelzellen, die im Labor aus der frischen Nabelschnurvene isoliert wurden (siehe 2.11.2.1).

**PBMC** (Peripheral Blood Mononuclear Cells): Zirkulierende mononukleäre Zellen aus dem Blut. Die Zellen wurden aus Buffy Coats von Blutspendern isoliert (siehe 2.12.1).

#### 2.2 Chlamydienstamm

Die Untersuchungen wurden mit dem *Chlamydia pneumoniae* CV6 Stamm durchgeführt. Dieser Stamm wurde über nested PCR in atheromatösen Läsionen eines reststenosierten koronaren Bypasses eines 68 jährigen Patienten entdeckt und konnte aus diesen Geweben kultiviert werden. Die Patienten aus dieser Studie wiesen oftmals auch die typischen Atherosklerose-Risiken auf wie z.B. Diabetes mellitus und einen erhöhten Cholesterinwert im Plasma ( $> 5$  mmol/Liter) (Maass M, 1998).

#### 2.3 Tierversuche an Mäusen

Alle organisatorischen und personellen Erfordernisse der Tierhaltung sind in der zentralen Tierhaltung der MUL gegeben. Tierexperimente sind vom Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft des Landes Schleswig-Holstein, Az. 53-6/03, genehmigt. Für

die *ex vivo* Experimente wurden 15 Mäuse eingesetzt. Die verschiedenen Organe der Tiere wurden zur optimalen Nutzung für zwei Doktorarbeiten verwendet.

### 2.4 Computerprogramme

Microsoft Office 2003

LightCycler Software Version 3.5 / 2000, Roche.

Photo All-In-One Printer 922, 2004, Dell Inc.

Adobe Photoshop 7.0.1

### 2.5 Synthetische Oligonukleotide („Primer“)

Die Sequenzen der jeweiligen Genabschnitte wurden über Publikationen oder im Internet unter EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>) gesucht. In den Sequenzabschnitten wurden Primerpaare mit einer Länge von ca. 20 Basenpaaren ausgewählt. Die Oligonukleotide sollten keine komplementären Sequenzen aufweisen, um die Bildung von Dimeren während der Amplifizierung zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Sequenzen mit Hilfe des Suchprogramms BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) auf Homologien mit Sequenzen der Genbank EMBL verglichen, um mehrfache Übereinstimmungen auszuschließen. Die für die PCR verwendeten Primer wurden von MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert und HPLC-gereinigt. Die folgende Auflistung gibt die Sequenzen der Primer in 5' nach 3' Richtung wieder. Die Adresse zum Erstellen der passenden Primer: [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Die Primerpaare werden in Tab.1 und Tab.2 dargestellt.

Tabelle 1: Primerpaare für *C. pneumoniae*.

<i>C. pneumoniae</i> Primer	Primer Sequenz (5' - 3')	Produkt Länge
16S-1	TCG CCT GGG AAT AAG AGA GA	210 bp
16S-2	AAT GCT GAC TTG GGG TTG AG	
IncA-1	TTG TTC TGC GCT ACG TCA AG	223 bp
IncA-2	TTG TTG GTG GAG GTG TTT CA	
YscN-1	CCT CGA TTA GCC GAC TCC TG	192 bp
YscN-2	GTT GTT GTG CTG CTT CTT CA	
LcrD-1	TTC GTC AGC AGA ACA CTT GG	202 bp
LcrD-2	AGC TGC AAA GCA CTT GGA AT	

Tabelle 2: Primerpaare für Mausgewebe.

Primer für Mausgewebe	Primer Sequenz (5' - 3')	Produkt Länge
gapdh-1 (housekeeping Gen)	TAT GAT GAC ATC AAG AAG GTG G	190 bp
gapdh-2	CAC CAC CCT GTT GCT GTA	
mIL-6-1	AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA	159 bp
mIL-6-2	TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC	
mIL-8-1	GGT GGG GA GTT CGT GTA GAA	200 bp
mIL-8-2	CGA GGT GCT AGG ATT TGA GC	
mTF-1-1	CCA GGA AGG GAA AAC ACA AA	184 bp
mTF-1-2	TGC AAC ATG AAG CCT GAG AG	
mPAI-1-1	GTC TTT CCG ACC AAG AGC AG	208 bp
mPAI-1-2	ATC ACT TGC CCC ATC AAG AG	

## 2.6 Zytokine

IFN $\gamma$  (rh 300-02, 100 $\mu$ g/ml PBS, TEBU, Frankfurt am Main)

## 2.7 Antikörper

### 2.7.1 Polyklonaler IncA-Antikörper

Der polyklonale IncA Kaninchen-Antikörper, Verdünnung 1:50, wurde von der Arbeitsgruppe Professor U. Groß von der Uniklinik Göttingen, Institut für Medizinische Mikrobiologie, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### 2.7.2 Monoklonale Antikörper

#### Direkte Immunfluoreszenz

Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-markierte Chlamydien LPS Antikörper aus der Maus („Imagen TM Chlamydia“, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg).

Das Endothel der Mauseiten wurde mit einem FITC-markiertem Anti-Maus CD 31 Antikörper, Biolegend, San Diego, CA, gefärbt.

#### Sandwich-Assay

Primär-Antikörper: Maus-Antikörper gegen *C. pneumoniae* LPS wurde freundlicherweise von Professor H. Brade, Abteilung für Biochemische Mikrobiologie, Forschungszentrum Borstel, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde 1:50 verdünnt.

Sekundär Antikörper: FITC-markierter Antikörper (Anti-Maus-IgG, Sigma) 1:200 verdünnt in PBS (10 µl in 2 ml PBS und 100 µl 0,01% Evansblue).

#### Sekundär Antikörper für Western Blot

Anti-Rabbit, HRP-linked (Horseradish Peroxidase) IgG, 1: 4000 verdünnt (Cell Signaling, Danvers, MA).

### 2.7.3 Farbstoffe

LysoSensor probes (Firma Molecular Probes, Leiden, Niederlande): LysoSensor Green DND-189: Absorption bei 443 nm, Emission bei 505 nm. LysoSensor Yellow/Blue DND-160: Absorption bei 329-384 nm, Emission bei 440-540 nm.

**2.8 Chemikalien und Puffer**

Acrylamid 40 %	BioRad, USA
Agarose	Sigma, Deisenhofen
APS (Ammonium persulfat)	Sigma, Deisenhofen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Diethyl Pyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt
Ehrlich Reagenz (4-(Dimethylamino)benzaldehyde)	Sigma, Deisenhofen
Ethanol (96 %)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Evans Blue	Sigma, Deisenhofen
Glycerin, reinst	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
L-Tryptophan 98 %	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	BioRad, CA, USA
Tergitol Typ NP-40	Sigma, Deisenhofen
Tris	BioRad, CA, USA
Trypanblau (0,1 %)	Sigma, Deisenhofen
<u>PCR Zusätze</u>	Roche, Mannheim
SYBR Green	Roche, Mannheim
PCR Nucleotide Mix	Roche, Mannheim
RNase-Inhibitor	Roche, Mannheim
Reverse Transcriptase AMV	Roche, Mannheim

## 2. Material und Methoden

Random Primer	Roche, Mannheim
1st Strand cDNA Synthese Kit (RT-PCR)	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
<u>Medien und Puffer</u>	
Blockpuffer	5 % (w/v) Trockenmilch, 0,1 % Tergitol (NP-40)
Blotpuffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, pH 8,3
HEp-2 Zellmedium	MEM Eagle Medium 500 ml, ohne L- Glutamin und Natrium-Bicarbonat  Weitere Zusätze: 10 % FKS, 1 % MEM Non Essential Amino Acids (PAA, Pasching/Österreich), 200 mM L-Glutamin (PAA, Pasching), 250 µg/ml Amphotericin B (Biochrom, Berlin), 10 mg/ml Gentamicin (Sigma), 1,5 % Natrium-Bicarbonat 7,5 % (Invitrogen)
Chlamydien-Anzuchtmedium	Zusammensetzung wie zum HEp-2 Zellmedium Anzuchtmedium beschrieben, mit der Zugabe von 2,5 ml Vancomycin, 25 mg/ml (Sigma), 0,5 ml Cycloheximid, C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub> , 500 µg/500 ml (Sigma)
CASMC-Medium	Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells Medium (PromoCell, Heidelberg)
DEPC-Wasser	1 ml DEPC/1L Aqua dest. über Nacht rühren lassen und anschließend autoklavieren (134°C)
Elektrophoresepuffer	50 mM Tris-HCl, 380 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
FKS	PAA, Pasching, Österreich
HUVEC Medium	Endothelial Cell Growth Medium Kit (PromoCell, Heidelberg)
Monocyten-Medium	½ L RPMI 1640, 50 ml FKS (10%), 5ml L-Glutamin, 5 ml HEPES (5 mM) Buffer Solution (PAA), 5 ml sterilfiltrierte β-Mercaptoethanol Lösung (1:40)

## 2. Material und Methoden

PBS pH 7,2	1 L: 8 g NaCl, 0,2 g $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g KCl, 1,14 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
PBS pH 7,2-7,4	1 L: 8,5 g NaCl, 1,27 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,39 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 $\mu\text{l}$ Tween (für Immunhistologie)
Probenpuffer pH 7,8 (SDS-Page)	125 mM Tris-HCl, 4% (v/v) SDS, 10% (v/v), 2-Mercaptoethanol, 20% (v/v) Glycerol 100%, 0,01% (w/v) Bromphenolblau
RPMI 1640 (für IFN- $\gamma$ Behandlung)	10 % fötales Rinderserum, 2 mM L-Glutamin, 1 % (v/v) Nonessential Aminosäuren, 10 mM HEPES, 10 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin, 25 $\mu\text{g/ml}$ Vancomycin, (das Medium enthält ca. 5 mg/L L-Tryptophan (Invitrogen, Karlsruhe).
<u>RNA-Extraktionskits</u>	
RNeasy Protect, Mini Kit	Qiagen, Hilden
NucleoSpin RNA II	Macherey & Nagel, Düren
RNase Away	Roth, Karlsruhe
Sammelgelpuffer (4x) (SGP)	0,5 M Tris-HCl, 0,4%(w/v) SDS, pH 6,8
Trenngelpuffer (4x) (TGP)	1,5 M Tris-HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8
TBS (10x)	24,4 g Tris-Base, 80 g NaCl, 38 ml 1M HCl ad 1L $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,6
T-TBS	0,1% Tergitol (NP-40), TBS
<u>Sonstiges</u>	
Accutase	PAA, Pasching
APS	10 % (0,1 g/ml) Aqua dest.
Chemoluminescent Substrat (für Western Blot)	Super Signal West Pico, Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL
Gelatine 2%	PAA, Pasching
HEPES 1M	PAA, Pasching
LSM	Lymphozyten Separations Medium, (PAA, Pasching)
OCT	Einbettmedium für Gefrierschnitte (Leica Instruments, Nussloch,

Protein-Marker	Deutschland, GmbH) Prestained Protein Marker (BioLabs, Ipswich, New England)
RNase Away 250 ml	Th. Geyer, Renningen
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100 Octylphenolpoly(ethylenglycolether) <sub>x</sub>	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA	0,5 g Trypsin (1:250) per L, 0,2 g EDTA/L (PAA)

## 2.9 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen (0,7 mm Ø)	Menzel, Walldorf
Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schuell, BioScience
Glasschrot (3 mm Ø)	Hassa Laborbedarf, Lübeck
Immersionsöl 518F D 58.554	Carl Zeiss, Jena
BAS Kasette 2040	FUJIFILM, Düsseldorf
Küvetten, Tru View Cuvettes	Bio-Rad, München
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Mikrotiterplatten (6-Well, 12-Well, 24-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten (5 ml, 10ml, 25 ml)	Greiner-Bio-One, Frickenhausen
NucleoSpin RNA II	Macherey/Nagel, Düren
Objektträger, Membrane- Slides	PEN-membrane 1mm Glasobjektträger (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried)
Objektträger Superfrost Plus	Menzel, Walldorf
Protran Nitrocellulose	Schleicher und Schuell, BioScience
PVDF Membran	(0,45 µm Porengröße) Roth, Karlsruhe
Röntgenfilm	FUJIFILM, Düsseldorf
Transfer Membran	Schleicher und Schuell, BioScience
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (250 ml, 550 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Zellschaber

Greiner Bio-One, Frickenhausen

### 2.10 Geräte und Hilfsmittel

CO<sub>2</sub>-Brutschrank

Heraeus, Hanau

Blockheizthermostat

Roth, Karlsruhe

#### Elektrophoresekammern

Agarosegelkammer Horizon 11.14

Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

SDS-Gelkammer

BioRad, München

Mini Trans-Blot Cell

BioRad, München

#### Gefrierschränke

-20°C

Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe,  
Liebherr, Ochsenhausen

-80°C Legaci

Hettich, Tuttlingen

Gelfotoanlage digit- store duo

Intas, Göttingen

Glas-Gummipatel 180 mm

Hassa Laborbedarf, Lübeck

Kühlschränke 4°C

Liebherr, Ochsenhausen

#### Mikroskope

Axiovert 200, invers

Carl Zeiss, Jena

Mikroskop, Zeiss, Standard 20

Carl Zeiss, Jena

Mikroskop, Zeiss mit MikroLaser System

Palm, Bernried

Mikrowelle

Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe

Mini-Shaker

Braun, Melsungen

Neubauer-Zählkammer

Neubauer, Marienfeld

#### PCR-Thermocycler

LightCycler 1.2

Roche, Mannheim

Peltier Thermal Cycler, PTC-100, PTC-200

MJ Research, Minnesota

pH-Meter, MP220

Mettler-Toledo, Giessen

Photometer SmarSpec tm Plus

BioRad, München

Scanner

Photo All-In One Printer 922, Dell

#### Waagen

1265 MP

Sartorius, Göttingen

Feinwaage, Delta Range®	Mettler Toledo, Gießen
<u>Zentrifugen</u>	
Biofuge freco	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Megafuge 2.0R	Heraeus, Hanau
Mikro 12-24	Heraeus, Hanau
Vakuumkonzentrator (UVS400A, SpeedVac® Plus SC110A)	Savant, NY, USA

## II. Methoden

### 2.11 Zellkultur

#### 2.11.1 HEp-2 Zellen (Humane Epithelzellen )

Das HEp-2 MEM Zellkulturmedium wurde von den bewachsenen Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen 1 x mit PBS gewaschen. Mit ca. 8 ml (für 550 ml Flasche) Trypsin/EDTA wurde für 5 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Trypsin spaltet Proteinbindungen an den AMS Arginin und Lysin. Das EDTA kann die zweiwertigen Kationen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  binden, die die zellbindenden Membranproteine stabilisieren. Die Zell-Trypsin Flüssigkeit wird in einem Röhrchen kurz bei 4000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml Medium aufgenommen und 5 min bei 1000 rpm im Medium gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit frischem Medium aufgenommen und in 8-10 Sechs-Wellplatten verteilt oder erneut in Flaschen kultiviert. Pro Zellkulturflasche wurden 2 ml der 10 ml Lösung eingesetzt, dies entsprach ca. 2 Millionen Zellen. Für eine Sechs-Wellplatte wurde 1 ml der zentrifugierten Lösung eingesetzt.

##### 2.11.1.1 Einfrieren der HEp-2 Zellen

Das Kulturmedium wurde mit 20% DMSO angesetzt und sterilfiltriert. Eine Zellsuspension mit dem angesetzten DMSO von ca.  $2 \times 10^6$  –  $2 \times 10^8$  Zellen/ml hergestellt und bei  $-80^\circ \text{C}$  eingefroren, anschließend wurden die Zellen im flüssigen Stickstoff gelagert.

### 2.11.2 HUVEC (Humane Nabelschnurzellen)

#### 2.11.2.1 HUVEC Isolierung aus Nabelschnur

Die frisch entnommene Nabelschnur blieb im Transportmedium (500 ml PBS, 5 ml Penicillin, 500 IE/ml Streptomycin) für 5 Tage bei 4°C haltbar. Die Isolierung der Endothelzellen erfolgte unter der sterilen Werkbank. Eine große Glaspetrischale wurde auf eine Heizplatte gestellt und mit sterilem PBS-Puffer auf 37°C erwärmt. Die Nabelschnur wurde an den Enden gerade abgeschnitten und in den Puffer gelegt. Von einem Ende wurde die Vene der Nabelschnur mit PBS durchgespült und von Blutresten gereinigt. Über fixierte Pasteurpipetten an den Enden der Vene wurde eine 20 ml Kollagenase-Lösung in die Vene gespritzt und für 30 min bei 37°C im Puffer inkubiert. Durch anschließendes Massieren der Nabelschnur wurden die Endothelzellen aus der Vene gelöst und mit erwärmtem HUVEC Medium herausgespült. Die aufgefangenen Zellen wurden 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und in frischem HUVEC Medium aufgenommen. Die Zellen können in mit 0,5% Gelatine vorbehandelten Zellkulturflaschen angezogen werden, wobei das Medium am nächsten Tag erneuert werden muss.

#### 2.11.2.2 HUVEC-Anzucht

Die Zellen wachsen als adhärente Zellmonolayer auf dem Flaschenboden, wie auch die HEp-2 Zellen, zeigen jedoch Dichte-abhängig schneller eine Proliferationshemmung (Kontaktinhibition) als die karzinogene HEp-2 Zelllinie. Die Zellkulturflaschen wurden mit 0,5% Gelatine (verdünnt mit PBS) beschichtet und für 15 min inkubiert. Vor dem Befüllen mit HUVEC wurde die Gelatine abgegossen. Dem Endothelial Cell Growth Medium wurde für die ersten zwei Passagen 5-10% FKS zugesetzt. Für die weitere Anzucht waren 2,5% FKS ausreichend. Zum Umsetzen der Zellen wurde das Kulturmedium abgegossen und mit PBS einmal gewaschen. Die Accutase zum Lösen der Zellen ist weniger aggressiv als Trypsin/EDTA. Die Accutase musste ca. 5 min bei 37°C einwirken, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Die gelösten Zellen wurden für 5 min bei 900 rpm zentrifugiert und mit frischem Kulturmedium aufgenommen, um sie auf die vorbereiteten Zellkulturflaschen zu verteilen. Pro Zellkulturflasche (Größe: 550 ml) wurden ca. 1-2 Millionen Zellen eingesetzt. Nach 3 d musste das Medium erneuert werden. Ein Umsetzen der Zellen war erst nötig, wenn die Zellen dicht nebeneinander im Monolayer lagen und keinen Platz mehr zum Ausbreiten hatten.

### 2.11.2.3 Einfrieren der HUVEC-Zellen

Erfolgt wie bei den HEp-Zellen, jedoch mit dem Endothelial Cell Growth Medium und 20% DMSO. Die Zellen wurden bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

## **2.12 CASMC (Primäre glatte Muskelzellen aus der Koronararterie)**

Für die CASMC-Anzucht wurden die Zellkulturflaschen für 15 min mit 0,5% Gelatine inkubiert. Es wurde wie unter der Anleitung für HUVEC (2.11.2.2) fortgefahren und die ersten Passagen mit 5-10% FKS kultiviert. Für die Anzucht wurde das CASMC Medium von PromoCell verwendet. Die Zellen konnten wie zuvor beschrieben mit dem CASMC Medium und DMSO eingefroren werden.

### **2.12.1 PBMC Isolierung aus Buffy Coats und Kultivierung**

Die Isolierung von PBMC erfolgte bei Raumtemperatur, sofern der Buffy Coat direkt von der Blutbank weiterverarbeitet wurde (bei einer Zwischenlagerung bei 4°C muss die Isolierung mit gekühlten Puffern erfolgen). 6-8 50 ml Falcon-Röhrchen wurden mit 15 ml LSM 1077 befüllt. In eine sterile Flasche wurden ca. 200 ml PBS gefüllt und der Buffy Coat steril hinzugegeben. Das LSM konnte mit jeweils 25 ml des verdünnten Buffy Coat überschichten werden und die Röhrchen wurden im Anschluss für 25 min bei 2200 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation enthält die weiße Interphase die Monozyten und weitere PBMC Zellen. Sie konnte mit Pasteurpipetten abgenommen und in PBS gewaschen werden. Gewaschen wurde einmal für 10 min bei 2200 rpm und anschließend 2-3mal bei 900 rpm bis der Überstand klar vorlag. Das Pellet wurde im warmen Monozyten-Medium aufgenommen und auf zwei Zellkulturflaschen verteilt. Die Zellen wurden mit ca. 40 ml Monozyten-Medium aufgefüllt. Die Monozyten sollten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> am Flaschenboden adhärieren, so dass die übrigen Zellen anschließend durch zweimaliges Waschen mit Medium entfernt und die PBMC mit einem Zellscraper von dem Flaschenboden abgeschabt werden konnten. Die Zellen wurden mit dem Medium erneut 10 min bei 900 rpm zentrifugiert und je nach Pelletgröße in 4-8 ml Medium aufgenommen und ausgezählt. Zum Auszählen der Zellen wurden diese mit Trypanblau (0,1%) in einer 1:2 Mischung gefärbt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anionen an Zellproteine binden. Bei toten Zellen gelangt der Farbstoff durch defekte

Zellmembranen in das Zytosol und färbt sie blau. Das Trypanblau wirkt nach längerer Zeit zytotoxisch, weshalb die Auszählung unter dem Mikroskop zügig durchgeführt werden sollte.

$$\text{Zellzahl: } \frac{\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnung} \times \text{Mediummenge (mL)} \times 10^4}{\text{Kammer (mL)}}$$

### 2.13 *C. pneumoniae*-Anzucht

Die Anzucht erfolgte in Sechswell-Kulturplatten mit HEp-2 Zellen. Die HEp-2 Zellen wurden aus den Zellkulturflaschen umgesetzt, so dass ein Zellmonolayer in den Wells entstand (ca. 500 000 Zellen/Well). Die mit Chlamydien infizierten Zellen wurden nach 72 - 96 h Kultur vom Boden der Wells abgespatelt und in 10 ml Röhrchen mit Glasperlen auf einem Vortexer für 1-2 min zerschlagen. Um Zellreste zu entfernen, folgte eine Zentrifugation bei 900 rpm für 5 min. Für die Anzucht wurde ein starker Überschuss an Chlamydien eingesetzt, d. h. etwa 3-6 IFU/Zelle. Dem Infektionsmedium wurde Cycloheximid zugesetzt - es inhibiert die Proteinsynthese der Eukaryonten und ermöglicht eine bessere Infektionsrate der Chlamydien. Im Anschluss erfolgte eine 45 minütige Zentrifugation bei 3500 rpm bei 32-37°C, um eine zeitlich homogene Infektion der Zellen zu erhalten.

### 2.14 Rekultivierung persistierender *C. pneumoniae* auf HEp-2

Die CASMC wurden als primäre Wirtszellen mit *C. pneumoniae* infiziert und für 3-4 Tage inkubiert (2.15). Das Auftreten des Persistenzzustandes konnte über eine LPS Ak Färbung (2.21.1) dargestellt werden. Die infizierten Zellen wurden im Anschluss mit Glasschrot zerschlagen, um die Bakterien aus ihren Wirten zu befreien und auf frische HEp-2 Zellen übertragen. Die HEp-2 wurden in einem Ansatz wie für die Chlamydien-Anzucht (2.13) und in einem weiteren Ansatz mit der doppelten Menge an Bakterien (400 µl/500 000 Zellen) infiziert.

### 2.15 *C. pneumoniae* mRNA-Quantifizierung in HEp-2 Zellen

Eine Hälfte der HEp-2 Zellen wurde 24 h vor der Infektion mit 60 U/ml Interferon gamma (IFN-γ) vorbehandelt, um eine geringe L-Tryptophan-Konzentration durch einen erhöhten Abbau durch die Zellen zu erzielen. Es wurde RPMI Medium mit einer niedrigen L-Tryptophan Menge von ca. 5 mg/L verwendet. HEp-2 Zellen wurden zu 500 000/Well auf Sechswellplatten verteilt. Einen Tag brauchten die Zellen zur Adhärenz bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C. Am folgenden Tag konnten die Zellen mit 3-4 Einschlüssen *C. pneumoniae* (Stamm CV6)/Zelle

infiziert werden. Zur Infektion wurde das RPMI Medium mit 60 U/ml IFN- $\gamma$  frisch zugegeben. Die Zellen wurden wie bei der Chlamydien-Anzucht zentrifugiert (2.13). Verglichen wurde der IFN- $\gamma$  behandelte HEp-2 Zell-Ansatz mit Zellen ohne IFN- $\gamma$  Behandlung, der unter den gleichen Bedingungen kultiviert und infiziert wurde. Die *C. pneumoniae* Infektion und Entwicklung wurde zu den 48 h und 72 h Zeitpunkten über Fluoreszenz-Färbung des chlamydialen LPS kontrolliert (2.21.1). Die Probennahme erfolgte nach der Zentrifugation nach: 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h. Die Zellen wurden 1 x mit PBS gewaschen und in 350  $\mu$ l RA1 Reagenz (Macherey & Nagel) zur mRNA-Gewinnung aufgenommen. Die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung der Proben erfolgte bei -80°C. Die Proben wurden nach 72 h über mRNA-Extraktion (2.17) und RT-PCR (2.19) weiter bearbeitet und über die quantitative PCR mit Hilfe des LightCyclers (2.20) ausgewertet. Die mRNA wurde im Spektrophotometer gemessen und auf etwa 100  $\mu$ g/ml für jede Probe eingestellt. Die Untersuchung konzentrierte sich auf die mRNA Synthese der chlamydialen IncA, LcrD und YscN Gene. Zur Auswertung wurde die mRNA dieser Zielgene auf eine im Überschuß vorhandene, gering regulierte sogenannte Calibrator-Probe (Winer J, 1999), in diesem Fall chlamydiale 16S rRNA, bezogen.

### **2.16 *C. pneumoniae* mRNA-Quantifizierung in primären Wirtszellen**

Die Untersuchung erfolgte in HUVEC, CASMC und PBMC. Wie unter 2.15 beschrieben, wurde die gleiche Zellmenge und *C. pneumoniae* Infektionsrate über Einschlüsse bestimmt und eingesetzt. Die Probennahme erfolgte wie zuvor zu 2 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h. Für die Versuchsansätze wurde kein IFN- $\gamma$  eingesetzt, da die Entwicklung in den primären Zellen mit den IFN- $\gamma$  behandelten HEp-2 Zellen verglichen werden sollte. Die mRNA-Isolierung und der quantitative Nachweis erfolgten wie zuvor beschrieben über die quantitative PCR. Es wurden für jede Zellart 3-4 Versuchsansätze ausgewertet. Für CASMC wurde in einem weiteren Ansatz die Konzentration der Chlamydien auf 6 IFU/Zelle erhöht. Die mRNA der Zielgene wurde wie unter 2.15 ausgewertet.

### **2.17 RNA-Isolierung über Methode I**

#### Total RNA Isolation, NucleoSpin RNA II für die Zellkultur

Vor der Extraktion sind folgende Puffer anzusetzen:

$\beta$ -Mercaptoethanol mit RA1 1:100

RA3 mit 100 ml 96 % Ethanol auffüllen

DNase (RNase frei, lyophilisiert) wird mit 540 µl RNase freiem Wasser gelöst und aliquotiert, anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren

Der RNA Extraktions-Kit von Macherey und Nagel ermöglicht es,  $5 \times 10^6$  bis  $2 \times 10^7$  Zellen pro Extraktionsäule zu bearbeiten. Die Methode beruht auf der selektiven Bindung der RNA an einer Silikatsäule. Zu Beginn wurden 350 µl der angesetzter RA1 Lösung auf die Zellen gegeben und mit Hilfe eines Zellspatels aus dem Well gelöst. Die RNA wird durch dieses Reagenz stabilisiert und kann auch bei Raumtemperatur wenige Stunden erhalten werden. Bei  $-70^{\circ}\text{C}$  ist die RNA bis zu einem Jahr haltbar. Das RA1 Gemisch wurde auf den rosa Nucleo Spin Filter geben und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Lysat wird mit 350 µl 70 % Ethanol gemischt und die Lösung auf die Nucleo Spin RNA Säule gegeben und 30 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die RNA sollte in diesem Schritt an der RNA Säule binden und anschließend mit 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) Puffer gewaschen werden. Zur Zerstörung der DNA wurden 95 µl DNase Puffergemisch für 20 min auf die Silikatsäule gegeben. Anschließend wurde jeweils mit 200 µl RA2 und 600 µl RA3 bei 10.000 rpm für 30 s gewaschen. Der letzte Reinigungsschritt erfolgte bei 13000 rpm für 3 min mit 250 µl RA3. Die gereinigte RNA wurde mit 60 µl RNase freiem Wasser und 0,1 µl RNase Inhibitor/60 µl Wasser (entspricht 4 U) bei 13.000 rpm für 1 min aus dem Filter eluiert. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zur Inaktivierung der RNasen oder die Probe wurde direkt für die RT-PCR eingesetzt.

### **2.18 RNA-Isolierung über Methode II**

#### RNeasy Protect, Mini Kit für die LCM Proben

Vor der Extraktion sind folgende Puffer anzusetzen:

β-Mercaptoethanol mit RLT Puffer 1:100 (1 Monat haltbar)

RPE Puffer + 4 faches Volumen 96% Ethanol

Alle verwendeten Puffer und Materialien zur RNA-Isolierung wurden aus dem QIAamp RNA Isolation Kit eingesetzt. Zusätzlich wurde 96% Ethanol und β-Mercaptoethanol zum Ansetzen der Puffer benötigt. Das Prinzip der RNA-Isolierung beruht auch hier auf der selektiven Bindung an der Silika-Membran, welche in Abhängigkeit von dem pH-Wert und der umgebenden Salzkonzentration reversibel ist. Die Zellen wurden mit 350 µl des RLT Puffers aufgeschlossen. Es konnten bis zu  $5 \times 10^6$  Zellen mit dieser Methode aufgeschlossen werden.

Anschließend wurde 1 Volumen (350  $\mu$ l) 70% Ethanol zum homogenisierten Lysat zugegeben und gemischt. Die 700  $\mu$ l wurden auf eine RNeasy mini spin Säule gegeben, auf eine 2 ml Auffangssäule gesetzt und für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Gewaschen wurde mit 700  $\mu$ l RW1 Puffer für 15 s bei 10.000 rpm. Die RNeasy Säule wurde auf eine neue Auffangssäule gegeben und mit 500  $\mu$ l RPE Puffer bei 10.000 rpm für 15 s gewaschen. Der letzte Puffer wurde nochmals eingesetzt und für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die RNeasy Säule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und die RNA mit 30-50  $\mu$ l RNase freiem Wasser bei 10.000 rpm eluiert. Die eluierte RNA wurde direkt für die RT-PCR eingesetzt oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, um eine RNase Aktivität zu unterbinden.

### 2.19 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die extrahierte mRNA wurde direkt für die RT-PCR eingesetzt oder bei geringen Gewebismengen, wie bei der Microdissection durch Zentrifugation in einem Vakuum-Konzentrator auf 5  $\mu$ l eingengt. Die Reagenzien für die RT-PCR (**Tabelle 3**) wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen unter Kühlung pipettiert, in den Thermocycler gestellt und den entsprechenden Reaktionsschritten unterzogen (**Tabelle 4**). Im ersten Schritt bei  $25^{\circ}\text{C}$  wurde der Random hexamer Primer aktiviert, um sich an der mRNA anzulagern, wobei diese Art von Primern an allen Sequenzbereiche binden können. Die anschließende Transkription erfolgte mit Hilfe der Reversen Transkriptase AMV für eine Stunde. Ihre Aktivität kann durch die erhöhte Temperatur von  $85^{\circ}\text{C}$  beendet werden. Die cDNA kann über Jahre bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

**Tabelle 3: Reagenzien für einen RT-PCR Ansatz zur Umschreibung von mRNA in cDNA.**

Reagenzien	Volumen/Ansatz	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer	2,0 $\mu$ l	1 x
25 mM $\text{MgCl}_2$	4,0 $\mu$ l	5 mM
dNTP Mix	2,0 $\mu$ l	1 mM
Random Primer	2,0 $\mu$ l	0,04 U/ $\mu$ l
Rnase Inhibitor	1,0 $\mu$ l	50 Units
AMV Reverse Transkriptase	0,8 $\mu$ l	$\geq 20$ Units
Steriles Wasser	3,2 $\mu$ l	--
RNA Probe	5,0 $\mu$ l	$\leq 1$ $\mu$ g
Gesamte Menge	20 $\mu$ l	

Tabelle 4: Schritte der RT-PCR im Thermocycler

Vorgang	Temperatur	Zeit in min
Hybridisierung	25°C	10
Transkription in DNA	55°C	60
Beendung des Vorganges	85°C	5
Lagertemperatur	4°C	∞

### 2.20 Quantitative Real-Time PCR (LightCycler)

Mit Hilfe der quantitativen PCR ist es möglich die Menge der eingesetzten cDNA zu ermitteln und mit weiteren Proben zu vergleichen. Die Real-Time PCR baut sich aus den Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation auf (Tabelle 5). Im Anschluss kann mit Hilfe der Schmelzkurve die Reinheit des Amplifikates ermittelt werden und z. B. Primerdimere ausgeschlossen werden.

Tabelle 5: Schritte der quantitativen PCR. Die eingesetzten Temperaturen gelten für alle Primerpaare (Tabelle 1 / Tabelle 2).

Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit	Temperatur Überleitung (°C/s)	Zyklen der Fluoreszenz- Messung
Denaturierung	95	10 min	20	None
Amplifizierung (45 Zyklen)	95	10 sec	20	None
	60	5 sec	20	None
	72	10 sec	20	Single
Schmelzkurve	95		20	None
	50	30 sec	20	None
	95	0	0,20	Cont.
Kühlung	40	15 sec	20	None

## 2.21 Färbemethoden für *C. pneumoniae*

### 2.21.1 FITC-Chlamydia LPS Färbung (Imagen, DAKO Cytomation)

Für die Färbung wurden die verschiedenen Zellarten auf Deckgläschen kultiviert (HEp-2, CASMC, HUVEC) und mit *C. pneumoniae* infiziert, um die Entwicklung nach 48 h und 72 h über die LPS Antikörper-Färbung zu untersuchen. Die zum Teil nicht adhärenenten PBMC konnten mit Hilfe eines Zentrifugationsschrittes im Cytospin aus dem Medium auf Objektträger gebracht und hiernach fixiert werden.

Die Deckgläschen wurden beim Umsetzen der Zellen in die Kulturgefäße gelegt, so dass die Zellen während der Kultivierung auf den Deckgläschen haften blieben. Die Zellen wurden wie unter 2.15 beschrieben mit *Chlamydia pneumoniae* (CV6) infiziert und im Anschluss nach verschiedenen Inkubationszeiten entnommen. Fixiert wurden die Zellen mit Methanol für 10 min. Der Methanolrest wurde anschließend entfernt und die Deckgläschen bei Raumtemperatur getrocknet. Der FITC-konjugierte monoklonale LPS-Antikörper wurde für die Microdissection konzentriert aufgetragen, für die Zellkultur mit PBS 1:2 verdünnt und zur besseren Differenzierung der Wirtszellen mit Evans Blue versetzt. Evans Blue diente als Kontrastfärbung, man erhält eine intensive Rotfärbung der Wirtszellen und kann bei der Fluoreszenzfärbung eine ungünstige Hintergrund-Autofluoreszenz vermindern. Die Deckgläschen wurden in einer feuchten Kammer im Dunkeln bei 37°C für 15 min inkubiert und anschließend mit PBS 1-2 x gespült und getrocknet. Anschließend wurde das Deckglas mit dem gelieferten Eindeckmedium von DAKO mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger gelegt. Im Mikroskop wurde zur Anregung der Filter für 450-490 nm und zur Emission der Filter für 515-565 nm eingesetzt. Das gefärbte Präparat konnte in dieser Form bei -20°C im Dunkeln für Wochen gelagert werden. Der DAKO-Antikörper ist gattungsspezifisch und weist die Elementarkörperchen und Retikularkörperchen aller humanen Serotypen von *C. trachomatis*, Stämme von *C. psittaci* und auch *C. pneumoniae* nach.

### 2.21.2 FITC-LPS-Antikörper

(von Professor H. Brade, Abteilung Biochemische Mikrobiologie, Forschungszentrum Borstel)

1. Antikörper wurde 1:50 mit PBS verdünnt (50 µl in 2,45 ml Puffer)
2. Antikörper (Anti-Maus-IgG, Sigma) 1:200 in PBS verdünnen (10 µl in 2 ml PBS und 0,01% Evans Blue)

Die mit *Chlamydia pneumoniae* infizierten Zellen wurden auf den Deckgläschen für 10 min in Methanol fixiert und getrocknet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einer feuchten Kammer. Der 1. Antikörper wurde für 30 min inkubiert und anschließend 2 x mit PBS-Puffer gewaschen und das noch feuchte Deckgläschen mit dem 2. Antikörper unter gleichen Bedingungen im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde nochmals mit PBS 2 x gewaschen. Nach einer kurzen Trocknung im Dunkeln wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Eindeckmedium (aus dem Testkit von DAKO) auf einem Objektträger mit der Zellseite nach unten eingedeckt. (Lagerung siehe 2.21.1). Bei dieser Färbung konnte wie bei der FITC Färbung von DAKO (2.21.1) der 2. AK mit Evans Blue versetzt werden, um die Wirtszellen besser von den gefärbten Bakterien zu differenzieren. Betrachtet wurden die Präparate im Fluoreszenzmikroskop wie unter 2.21.1 beschrieben.

### **2.21.3 Endotheldarstellung im CD31-IFT an Mauseorten**

Die CD31 Färbung sollte es ermöglichen, unter mikroskopischer Sicht das Endothel von den Muskelzellen der Mauseorten besser zu differenzieren und getrennt auszuschneiden. Die Gefrierschnitte der Mauseortenringe wurden mit einer Schnittdicke von ca. 5 µm mit eiskaltem 70% Ethanol für 2 min fixiert und anschließend in RNase freiem PBS gewaschen bis keine Alkohol-Rückstände mehr sichtbar waren. Der mit FITC markierte Maus CD31 Ak wurde im Kaninchen generiert und für die Färbung 1:200 mit PBS verdünnt eingesetzt. Für die Microdissectionsproben wurde eine kurze Inkubationszeit im Dunkeln gewählt, um den Abbau des Fluoreszenzfarbstoffes zu unterbinden sowie den mRNA-Abbau möglichst gering zu halten. Im Anschluss wurden die Aortenschnitte sofort zur Gewinnung des Endothelgewebes mit Hilfe der Microdissection (2.25.2) eingesetzt.

### **2.21.4 Immunhistologische Färbung der Aortenringe und Zellkulturmonolayer**

#### **Verwendeter Kit:**

Horse Normal Serum Peroxidase Substrate Kit DAB

Vectastain Elite, ABC Kit / Mouse IgG

Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA

1. Ak: *Chlamydia pneumoniae* LPS Ak (Borstel)

Die in Paraffin eingebetteten Mäuse Aorten aus dem *ex vivo* Infektionsversuch (2.24.2) wurden in 2-4 µm dünne Ringe geschnitten und mit einem Objektträger aufgenommen. Um unspezifische Färbungen kontrollieren zu können, wurden Gewebe von nicht-infizierten Mäusearten und Gewebe von Kaninchen parallel gefärbt. Eine anschließende Trocknung erfolgte bei 60°C im Brutschrank für 30 min. Vor dem Färben mussten die Schnitte entparaffinisiert werden:

3 x 10 min in Xylol spülen

3 x 2 min in 100% Ethanol spülen

1 x 2 min in 95% Ethanol spülen

1 x 2 min in 70% Ethanol spülen

Im Anschluss folgten die Schritte zur immunhistologischen Ak Färbung. Zu dieser Färbung wurde die Avidin-Biotin-Methode eingesetzt. Sie beruht auf der Fähigkeit des Glykoproteins Avidin vier Moleküle Biotin zu binden. Zu Beginn wurde der 1. Ak, in diesem Falle gegen das Chlamydien LPS gerichtet, eingesetzt. Der 2. Ak, der sich an den ersten binden kann, ist mit Biotin konjugiert. Die dritte Substanz ist ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Freie Stellen am Avidinmolekül ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Peroxidaseaktivität wurde mit Chromogen sichtbar gemacht. Um einen Kontrast zu erzielen, wurde zum Schluss der Färbung einige Sekunden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Hämatoxylin wird durch Oxidation in Hämatein überführt und bildet mit Aluminiumionen eine positiv geladene Komplexverbindung, die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Zellkern-DNA reagiert. Die Zellkerne erscheinen hiernach blau und bilden einen deutlichen Kontrast zu der braun-grauen Ak Färbung.

### Reihenfolge der Arbeitsschritte:

Gewebe 5 min mit Peroxidase Blocking Reagenz (1-3 Tropfen) inkubieren

Mit PBS-Tween spülen

15 min in Serum Blocking Reagenz D inkubieren

Anschließend nicht waschen, nur abtrocknen

15 min mit Avidin Blocking Reagenz inkubieren

Mit PBS-Tween waschen und trocknen

15 min Biotin Blocking Reagenz inkubieren

Mit PBS-Tween waschen und trocknen

1. AK für 45-60 min inkubieren

Mit PBS-Tween 3 x 15 min waschen

30-60 min 2. AK (biotinyliert) inkubieren

3 x 15 min waschen mit PBS-Tween

30 min mit HSS-HRP Reagenz inkubieren

3 x 2 min mit PBS-Tween waschen

10 min DAB inkubieren (hierfür 2 Tropfen DAB Chromogen in 2 ml Chromogen Puffer geben und mischen)

5 min mit Aqua. dest. waschen

20-35 sec. Hämatoxylin einwirken lassen

Unter fließendem Leitungswasser waschen (Bläuen)

Im Anschluss wurden die Schnitte in entgegengesetzter Richtung entwässert und nach dem 3. Schritt in Xylol mit einem Deckglas und Eukit eingedeckt. Nach der Trocknung sind die Präparate für Jahre haltbar.

### **2.21.5 *Chlamydia pneumoniae* – Farbstoffbasierte intrazelluläre pH-Messung**

Bei den LysoSensor Probes handelt es sich um azidotrophe Substanzen, die sich in aziden Organellen aufgrund ihrer Protonierung akkumulieren. Die ersten Untersuchungen wurden mit LysoSensor Green DND-189 durchgeführt. Der Farbstoff kann keine genauen pH-Werte anzeigen, d. h. er stellt einen Bereich zwischen pKa 5,2 bis 7,5 dar. Hierüber konnten die Chlamydien-Einschlüsse angefärbt werden, jedoch erst mit dem Farbstoff LysoSensor Yellow/Blue DND-160 wurde eine genauere Aussage möglich. DND-160 stellt sich überwiegend als gelb fluoreszierend in aziden Organellen und in weniger aziden Bereichen der Zelle als blau fluoreszierend dar. Der pH-Wert kann zwischen pH 3,0 bis 9,0 dargestellt werden. Die Protonierung unterstützt das Fluoreszenz-Quenching der Farbstoffe, welches durch den photoinduzierten Elektronen-Transfer (PET) durch die schwach-basische Seitenkette entsteht und führt zu einer erhöhten Fluoreszenz-Intensität. Die Anreicherung der verwendeten Farbstoffe kann eine Alkalisierung der Lysosomen oder anderer azider Bereiche hervorzurufen, weshalb die pH-Messung schnell nach der Inkubation mit dem Farbstoff (1-5 min bei 37°C) vorgenommen werden sollte (**Tabelle 6**).

Tabelle 6: pH abhängige Farbstoffe: LysoSensor Probes.

Farbstoff	Absorption	Emission	pK <sub>a</sub>
LysoSensor Green DND-189	443	505	5,2
LysoSensor Yellow/Blue-160	329/384	440/540	4,2

Es wurden vier Kammerdeckgläser mit Borosilikatglas (Lab-Tek II Chambered, Nunc) mit einem ca. 0,2 mm dünnen Boden verwendet, die für den Einsatz im inversen Mikroskop geeignet sind.

Die HEP-2 und CASMC Zellen wurden mit *Chlamydia pneumoniae* infiziert und für 48 h oder 72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (2.13). Es sollte der pH-Wert der Einschlüsse zu 48 h und 72 h in CASMC und HEP-2 Zellen verglichen werden.

## 2.22 Nachweis des Inca Proteins über Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Tabelle 7: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele (10 ml).

Reagenzien	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Sammelgel 4%
A. dest.	4,9 ml	4,08 ml	6,4 ml
1,5 M Tris/HCl	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid-Bis	2,5 ml	3 ml	1 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	5 µl	10 µl
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl

1. Antikörper: IncA 1: 2000
2. Antikörper: Anti-Rabbit, HRP-linked IgG, 1: 4000 verdünnt (Cell Signaling)

Die SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) dient der Analyse von Proteingemischen. Mit Hilfe eines Protein-Markers konnte das Molekulargewicht der aufgetragenen Proben bestimmt werden. Die Proteine wurden im β-Mercaptoethanol-haltigen Probenpuffer reduziert und durch das anionische Detergenz SDS zur Lösung der Tertiär- und Sekundärstruktur der

Proteine durch Spaltung der Wasserstoffbrücken veranlasst. Es kommt hierdurch nur zur Größenauftrennung der Proteine aufgrund ihrer molekularen Masse durch die poröse Polyacrylamidmatrix unabhängig von ihrer Ladung. Der SDS-Protein-Komplex wandert im elektrischen Feld zum Plus-Pol. Die 1 mm feinen Gele wurden in einem Gießstand angesetzt, wobei zuerst das Trenngel mit einer Höhe von ca. 4 cm gegossen wurde und die Sammelgele bis zum Abschluss der Glasplatten reichten, in denen die Geltaschen zum Einpipettieren der Proteinproben liegen (Tabelle 7). Die Zusätze der Gele wurden bis auf TEMED und APS vermengt, durch diese Substanzen beginnt die Flüssigkeit zu polymerisieren, so dass die Gele zügig nach der Zugabe gegossen und mit 1 ml Aqua. dest. überschichtet werden konnten, um die Oberfläche zu glätten. Nach 30-60 min ist das Gel polymerisiert und das Sammelgel kann bis zum oberen Rand der Glasplatten eingefüllt und der Kamm eingesteckt werden. Die Gele wurden im Elektrophoresepuffer mit den vorbereiteten Proben zu 30 µl - 35 µl und dem Protein-Marker befüllt.

Für den IncA Protein-Nachweis der Chlamydien wurden von den Wirtszellen HEp-2, CASMC, HUVEC und PBMC jeweils 500 000 Zellen eingesetzt und mit 200 µl des CV6 Stammes infiziert (entspricht ca. 3,3 IFU/Zelle). Die Zeitpunkte der Probennahme entsprachen denen der mRNA Untersuchungen von 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h. Diese Proben wurden in Probenpuffer (Lysispuffer) aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert, d. h. die Tertiärstruktur wurde gelöst und mögliche Proteasen inaktiviert. Um eine Verbesserung des Proteinnachweises zu erzielen, wurden die Ansätze mit PBMC und CASMC mit größeren Mengen wiederholt. Es wurden 2 Millionen PBMC mit 400 µl infiziert (entspricht 1,6 IFU/Zelle) und die 500 000 CASMC mit 400 µl CV6 (entspricht 6,6 IFU/Zelle) infiziert. Nach dem Befüllen der Gele startet die Elektrophorese mit 70 V für 15 min zum Sammeln der Proben in einer Ebene und läuft danach bei 200 V für 45 min weiter. Für den anschließenden Blot wurden Blotpapier und Schaumstoff im Blotpuffer eingeweicht, die verwendete hydrophobe PVDF-Membran musste für 10 min in Methanol quellen und wurde anschließend ebenfalls in den Blotpuffer gegeben.

Die Blotkassette wurde in folgender Reihenfolge von der schwarzen Seite der Kassette aus befüllt: Schaumstoff, Blotpapier, Elektrophoresegel, Blotmembran, Blotpapier, Schaumstoff.

Der Blot lief 1½ h bei 75 V unter Kühlung. Die Proteine wandern zum positiven Pol und wurden von dem Gel auf die Membran gebロットet. Die Membranen wurden mit 5% Blockpuffer für 2 h bei RT auf dem Schüttler geblockt (ca. 10 ml/Membran). Dieser Vorgang soll überflüssige Proteinbindungsstellen auf der Membran absättigen. Anschließend wurde mit T-TBS (mit NP 40) gewaschen (3 x je 5 min). Der Primärantikörper wurde nach Anleitung im

Blockpuffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Die Membran wurde wie zuvor mit T-TBS gewaschen und mit dem HRP-markierten Sekundärantikörper im Blockpuffer für 1 h bei RT inkubiert. Wie zuvor wurde mit T-TBS gewaschen und die Membranen in die Röntgenkassette zwischen die gereinigten Klarsichtfolien gelegt. Die ECL-Detektionslösung wurde nach Anleitung angesetzt und auf die Membranen gegeben. Nach 5 min der Inkubation wurde die überschüssige Flüssigkeit abgenommen. Bei dieser Reaktion kam es zur Aussendung von Licht durch Chemolumineszenz, die durch die Schwärzung eines Röntgenfilms dargestellt wurde.

### **2.23 Indolamine-2,3-Dioxygenase (IDO) Untersuchung**

Über die IDO-Bestimmung konnte der L-Tryptophan-Abbau bestimmt werden. Versuche zeigten, dass durch eine IFN $\gamma$  Zugabe der Abbau in einiger Zellarten beschleunigt wird (Obojes K, 2005). In *C. pneumoniae* Untersuchungen ließ sich zeigen, dass die Bakterien von dem Tryptophan der Wirtszelle abhängig sind und bei Mangel an dieser Aminosäure (AMS) in den Persistenzzustand übergehen. Für die Untersuchungen wurden HEp-2 Zellen mit IFN $\gamma$  behandelt und anschließend die im Überstand vorhandene L-Kynurenin-Konzentration gemessen, da der Abbau über L-Kynurenin als Zwischenprodukt erfolgt. Für jeden Versuchsansatz wurden Dreifachbestimmungen mit den folgenden IFN $\gamma$ -Mengen angesetzt: 1000 U, 500 U, 250 U, 125 U, 62 U, 31 U, 15 U, 0 U. Das verwendete Zellkulturmedium wurde mit einer L-Tryptophan Menge von 50-100  $\mu\text{g/ml}$  versetzt, um für die Untersuchung keinen Mangel an der AMS zu erhalten. Die Versuchsdauer betrug 3 bis 4 Tage, nach dieser Inkubationszeit wurde das L-Kynurenin, das sich nach dem L-Tryptophan-Degradation im Medium anreichert und damit einen indirekter Nachweis der IFN $\gamma$  Einwirkung auf die Zelle erlaubt, nachgewiesen. Hierzu wurden 160  $\mu\text{l}$  des Mediums nach der Inkubation abgenommen, mit 30% Trichloracetatsäure (TCA) (10  $\mu\text{l}$ /Ansatz und Well) gemischt und für 30 min bei 50°C inkubiert. Das entstandene Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 10 min sedimentiert. 100  $\mu\text{l}$  des Überstands wurden in eine neue 96 Wellplatte gegeben und die gleiche Menge Ehrlich Reagenz wurde zugefügt. Die Auswertung des L-Tryptophan Abbaus über L-Kynurenin erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 492 nm.

### 2.24 Transkriptionsanalyse humaner Wirtszellen bei *C. pneumoniae* Infektion

#### 2.24.1 Vorversuche an Homogenisaten der Mauseorta

Untersucht wurde der Einfluss der *C. pneumoniae* Infektion auf Aortengewebe mit Hilfe eines *ex vivo* Modells. Über dieses Modell war es möglich die Infektion direkt durchzuführen und den Einfluss auf einen Gewebeverband zu untersuchen, bzw. den Einfluss auf die einzelnen Gewebearten im Anschluss differenziert darzustellen. Um einen allgemeinen Einfluss der *C. pneumoniae* Behandlung auf die Aortengewebe von Mäusen zu untersuchen, fanden Vorversuche mit homogenisierten Aorten statt. Für diese Vorversuche wurden die Gewebe wie unter 2.25.2, Microdissection inkubiert und nach 24 h, 48 h und 72 h über flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur mRNA Extraktion gelagert. Zur Kontrolle dienten Gewebeproben, die unter den gleichen Bedingungen behandelt, jedoch nur mit Medium kultiviert wurden. Im Anschluss wurden die Aortengewebe der Mäuse in kleinen RNase freien Glasmörsern zerrieben und die mRNA über den Extraktions-Kit von Macherey & Nagel (2.17) isoliert.

### 2.25 Vorbereitung und Durchführung der Laser Capture Microdissection (LCM)

Die Laser Capture Microdissection diente dazu, gezielt in exakt definierten Gewebsbereichen die mRNA-Expression zu analysieren. Bei der Durchführung ist deshalb eine Verunreinigung mit RNasen zu vermeiden, d. h. es wurde nur mit sauberen Handschuhen gearbeitet. Die Materialien wurden wenn möglich (Glasware) für 4 h bei 180°C gebacken und mit RNase Away behandelt. Alle Schritte wurden möglichst schnell durchgeführt, um den mRNA-Abbau bei Raumtemperatur gering zu halten.

#### 2.25.1 Technischer Hintergrund

Im Micro Laser System ist ein UV-Laser (337 nm Wellenlänge, Pulsenergie >270 µJ) der Klasse 3B eingebaut. Der Laser kann auf das jeweilige Objekt fokussiert werden und mit einem Durchmesser von weniger als 1 µm schneiden. Diese Laserweite ist abhängig von den Einstellungen, wie z. B. der Fokussierung, dem Probenmaterial und der Wahl des Objektivs. Der Laser wird über einen Adapter in den Fluoreszenzkanal des inversen Mikroskops geleitet und auf das Objekt fokussiert.

### 2.25.2 Präparation und Behandlung der Mauseorten

Für die Untersuchungen wurden frisch entnommene Aorten von Mäusen (C57/BL6) eingesetzt. Die Tiere wurden schmerzlos mit Ether getötet, auf dem Rücken liegend fixiert und auf der Bauchseite über einen medianen Schnitt nach vorn bis zum Hals geöffnet. Die Aorta wurde im Bereich des Arcus aortae und bis etwas oberhalb der A. abdominalis herauspräpariert. Die Aorten hatten eine Länge von 9 – 12 mm und konnten für die Experimente in 2-3 Stücke geteilt werden. Die Gefäße wurden mit dem vaskulären *C. pneumoniae* Stamm CV6 infiziert. Über eine dünne Injektionsnadel konnte die Bakterien-Medium-Mischung in das Lumen der Aorten eingebracht werden und in dieser Flüssigkeit bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für die verschiedenen Zeiten kultiviert werden. Die Chlamydia-Medium-Lösung beinhaltete etwa 1,4-2 Millionen Retikularkörperchen/Gewebsstück. Parallel wurde Kontrollgewebe nur mit Medium unter den gleichen Bedingungen wie die infizierten Gewebe kultiviert und eingefroren.

Die Untersuchungen der Aortengewebe fanden nach 24 und 48 h statt. Um die Gewebe für eine parallele Extraktion zu sammeln und bei der Lagerung vor einem RNA-Abbau zu schützen, wurden sie über flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C für einige Tage gelagert.

### 2.25.3 Erstellen von Gefrierschnitten

Die bei -80°C gelagerten Aortengewebe wurden in einem Einbettmedium (OCT) so positioniert, dass die Aorten im Kryostaten bei -25°C in Ringe geschnitten werden konnten. Die verwendeten Objektträger (von PALM) sind mit einer PEN-Membran beschichtet, deren hydrophile Eigenschaft durch eine Vorbehandlung mit UV-Licht (254 nm) für eine halbe Stunde aktiviert werden kann. Durch diese Behandlung haften die Gewebe besser an der Folie. Die Aortenringe wurden im Kryostaten in 5 µm feine Ringe geschnitten und mit den beschichteten Objektträgern aufgenommen. Im Anschluss konnten die Gewebsschnitte für die Microdissection gefärbt oder für spätere Verwendungen wieder bei -80°C eingefroren werden.

### 2.25.4 Immunfluoreszenzfärbung für die LCM

Zur Färbung der Gewebe wurden die Schnitte auf den Palm-Objektträgern für 2 min in 70% eiskaltem Ethanol fixiert und anschließend mit PBS-Puffer (RNase frei) bis zur Entfernung des Alkohols gewaschen. Gefärbt wurden die Schnitte mit Fluoreszenz-markierten Chlamydien-

LPS-Antikörpern von der Firma DAKO, wobei der Ak konzentriert eingesetzt wurde und nur mit Evans Blue zur besseren Darstellung der Zellen versetzt wurde. Die Färbung wurde möglichst kurz für ca. 5 min vorgenommen, um einen mRNA-Abbau gering zu halten. Nach der Färbung wurde die restliche Flüssigkeit des Ak mit PBS abgewaschen und der Objektträger zuletzt mit 1:10 verdünntem PBS gespült. Hiernach konnten die Präparate direkt für die LCM eingesetzt werden.

### **2.25.5 Gewinnung der Gewebe über LCM**

Die Präparate wurden unter mikroskopischer Sicht mit der 10fachen oder 20fachen Vergrößerung betrachtet. Die interessierenden infizierten Bereiche konnten über das Computerprogramm von Palm markiert und mit dem Laser ausgeschnitten werden. Beim Ausschneiden wurde die PEN-Membran der Objektträger mit ausgeschnitten, wodurch das Gewebe stabilisiert wurde und mit dieser Membran mit einem einzelnen Laserschuss in den Deckel eines 0,5 ml Reaktionsgefäßes oberhalb des Objektträgers katapultiert wurde. Der Deckel wurde zuvor mit Öl befeuchtet, um eine bessere Haftung der Gewebstücke zu erzielen. Die gesammelten Gewebsmengen lagen zwischen 800 000 und 1 Million  $\mu\text{m}^2$  pro Ansatz.

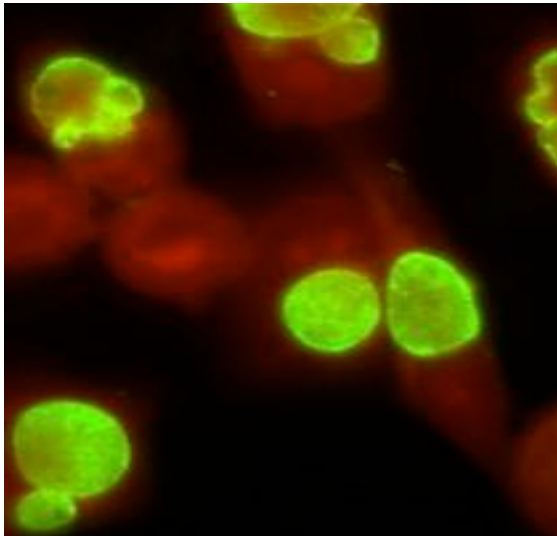
### **2.25.6 Auswertung der LCM Gewebeproben**

Die mRNA der Gewebeproben aus den LCM Untersuchungen wurde im Anschluss über den Qiagen Kit (2.18) extrahiert und über die quantitative PCR auf proinflammatorische (IL-6, IL-8) und prokoagulatorische Genprodukte (TF-1, PAI-1) des Wirtes hin untersucht. Die mRNA Menge wurde in Relation zu der gapdh mRNA der Wirtszellen ausgewertet. Zum Vergleich wurden Aortengewebe eingesetzt, die der gleichen Behandlung ohne *C. pneumoniae* Infektion unterzogen wurden.

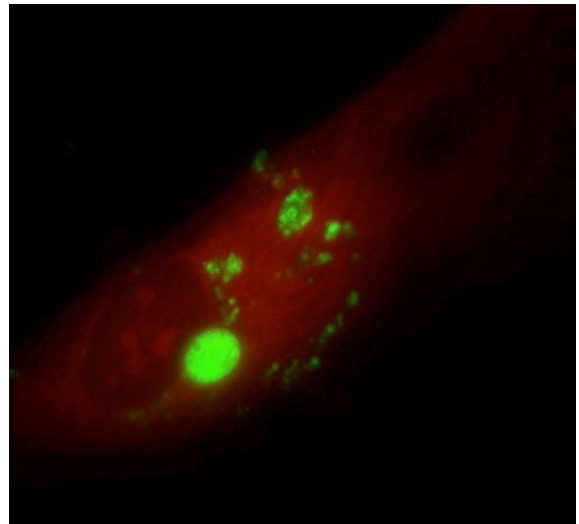
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae* in Replikation und Persistenz

Für die Anzucht von *C. pneumoniae* wurden HEp-2 Zellen eingesetzt (2.13). Wie beschrieben brauchten die Bakterien in den HEp-2 Epithelzellen ca. 72 h, um den replikativen Zyklus vom Elementarkörper (EB) über die Retikularkörper (RB) und wieder zum EB zu durchlaufen. Zur Untersuchung der Lebensfähigkeit und Entwicklung von *C. pneumoniae* in anderen Zellen, die im Gefäß und in der Gefäßwand vertreten und damit auch für die Atherosklerose von Bedeutung sind, wurden drei Zellarten eingesetzt: CASMC, HUVEC und PBMC. Die Entwicklung der Bakterien konnte über FITC-markierte Antikörper (2.21.1) gegen Chlamydien-LPS dargestellt werden. Die Entwicklung der RB in den verschiedenen Zellarten konnte somit direkt visualisiert und die Lebensfähigkeit der Chlamydien auch anhand der entwickelten Einschlüsse dargestellt werden. In den CASMC und HUVEC Zellen zeigte *C. pneumoniae* nach ca. 72 h kleine, weniger stark entwickelte Einschlüsse. Die Wirtszellen konnten nach den ersten drei Tagen mit frischem Medium weiter kultiviert werden, ohne dass es zur Zerstörung der Wirtszelle durch die Chlamydien kam. Die Entwicklung verlief in diesen Zellen also nicht nach dem typischen replikativen Zyklus wie in den HEp-2 Zellen, der die akute Infektion darstellt. Die Bakterien scheinen hier spontan zu persistieren und keine vollständige Reorganisation zu den infektiösen EB zu durchlaufen (siehe auch Versuch zur Wiederanzucht der Chlamydien aus CASMC auf HEp-2 unter 3.10). In den PBMC konnten ebenfalls sehr kleine Einschlüsse im Persistenzstatus angefärbt werden, die so auch nach 7 Tagen noch zu finden waren (Abbildung 2/Abbildung 3).

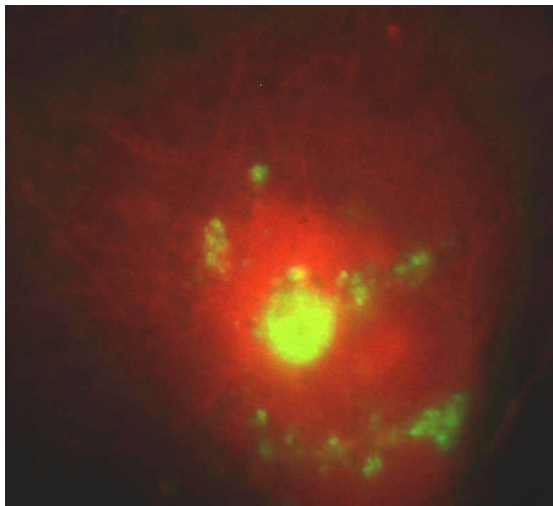


A

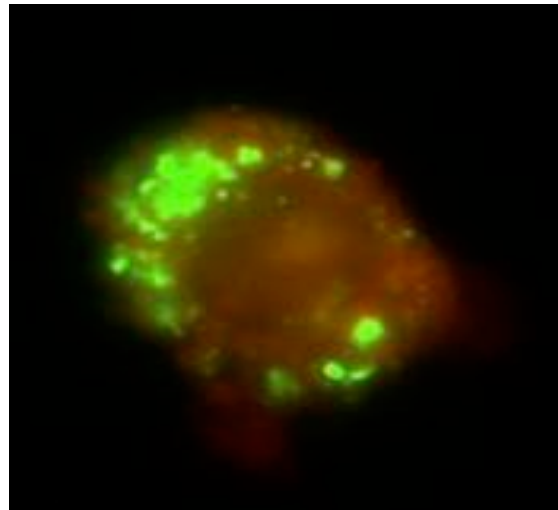


B

**Abbildung 2: *C. pneumoniae*-Einschlüsse in HEP-2 und CASMC 72 h nach Infektion.** (A) HEP-2-Zellen mit klassischen Einschlüssen. In diesem Stadium findet bereits die Reorganisation zu EB statt, kurz darauf wird die Wirtszelle zerstört und die infektiösen EB freigesetzt. Dies entspricht einer akuten Infektion. (B) In CASMC, primären koronaren Muskelzellen, zeigen sich ebenfalls Einschlüsse. Deren Entwicklung sistiert jedoch, d. h. nach längerer Inkubationszeit von 4-6 Tagen persistiert der Erreger intrazellulär. Die Wirtszellen werden nicht zerstört. Dies entspricht einer chronischen Infektion.



A



B

**Abbildung 3: *C. pneumoniae*-Einschlüsse in HUVEC und PBMC 72 h nach Infektion.** (A) HUVEC sind primäre Endothelzellen, in denen sich ähnlich wie in CASMC aberrante kleine Chlamydien-Einschlüsse bilden. Der Erreger tritt spontan in den Persistenzstatus ein, ohne die Wirtszelle zu lysieren. (B) Die aus Buffy Coats isolierten PBMC wiesen sehr kleine aberrante chlamydiale Einschlüsse auf, die auch nach 4-7 Tagen noch nachweisbar waren, ein Merkmal der Erregerpersistenz und der chronischen Infektion.

### 3.2 Infektionsraten in vaskulären und epithelialen Zellpopulationen

Die HEp-2 Zellen sind sehr widerstandsfähig und überstehen längere Zentrifugationsschritte oder Lagerungen in flüssigen Stickstoff ohne schwerwiegende Schäden. Die Infizierbarkeit dieser Zellen mit *C. pneumoniae* ist sehr hoch. Zur Auswertung wurden Monolayer von HEp-2, CASMC und PBMC auf Deckgläschen angezogen und mit dem CV6 Stamm von *C. pneumoniae* infiziert. Verglichen wurde die Anzahl der infizierten Zellen nach 72 h. Hierzu wurden die Deckgläschen mit einem FITC markierten Ak gegen Chlamydien LPS (2.21.1) gefärbt. Die Infektion erfolgte über 200 µl einer konzentrierten *C. pneumoniae* (Stamm CV6) Lösung direkt aus der Anzucht mit HEp-2 Zellen. Die Zellmenge von 500 000 Zellen wurde für alle Versuche eingesetzt. Infiziert wurde mit ca. 1,6 Millionen Einschlüssen auf 500 000 Zellen, also ca. 3 IFU/Zelle. Zur Infektion wurde eine Zentrifugation für 45 min bei 3500 rpm durchgeführt. Die HEp-2 Zellen wiesen danach einen 80-100% infizierten Monolayer auf. Bei dieser hohen Konzentration an Chlamydien kam es bei den HEp-2 Zellen auch zu mehrfachen Infektionen einzelner Zellen. Infizierte man CASMC Zellen mit der gleichen Konzentration an Chlamydien (CV6) erhielt man eine Infektionsrate von ca. 50-60%, bei der gleichen Behandlung mit einem Zentrifugationsschritt. Auch bei den CASMC kam es teils zu mehrfach infizierten Zellen. Die Infizierbarkeit der CASMC Zellen ist jedoch wesentlich geringer im Vergleich zu den HEp-2 Zellen. Als weitere Zellart wurden die PBMC herangezogen. Die PBMC nehmen die Bakterien aktiv auf, hierdurch kam es zu einer 100% Infektion der Zellen.

### 3.3 Vitalität von *C. pneumoniae* in vaskulären und epithelialen Zellpopulationen

Die Überlebensfähigkeit von *C. pneumoniae* wurde anhand der 16S Primer überprüft und über 72 h in verschiedenen Zellen miteinander verglichen. Wie zuvor wurden die Bakterien in HEp-2, CASMC, HUVEC und PBMC untersucht. Zellmenge und Infektionsrate waren einheitlich. Tabelle 8 zeigt die Auswertung zur Überlebensrate von *C. pneumoniae*. Der Zeitpunkt der Detektion wird über den Crossing-point der quantitativen PCR dargestellt. Ein früherer Crossing-point, also eine schnellere Detektierbarkeit des Zielgens in der PCR, entspricht dabei einer größeren Anzahl an Zielgenen und damit Erregern im Ausgangsmaterial. Deutlich ist eine vermehrte 16S rRNA-Bildung in den HEp-2 Zellen während des replikativen Zyklus zu verfolgen, wohingegen unter IFN $\gamma$  Behandlung der HEp-2 eine Abnahme der 16S Werte zu beobachten ist: Es kommt nicht zur Vermehrung der Bakterien. In den Endothelzellen (HUVEC) ist ohne Zusätze eine fast gleichbleibende Menge der 16S rRNA zu beobachten. Ähnlich verläuft die Entwicklung in den Muskelzellen (CASMC), hier ist eine geringe

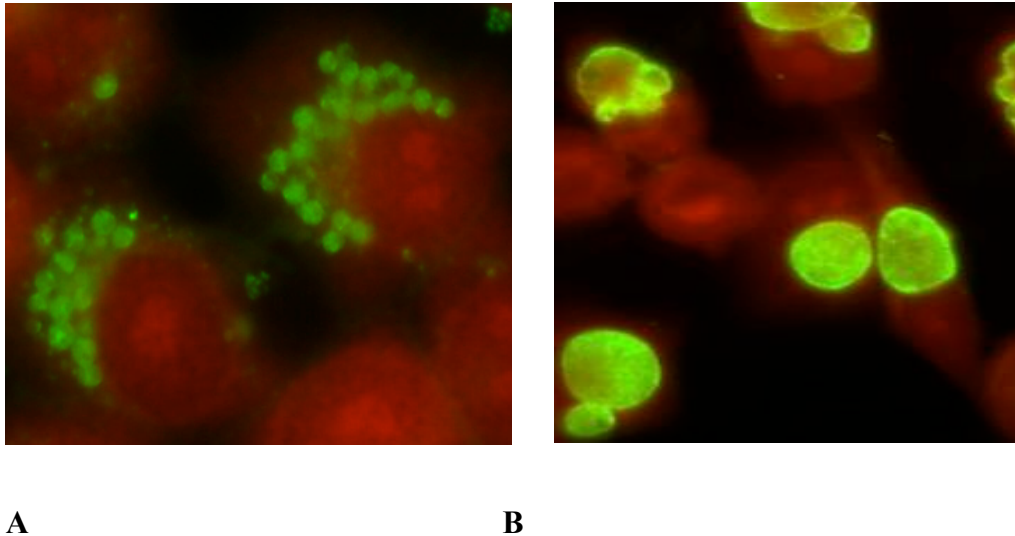
Abnahme der 16S rRNA im Verlaufe der Zeit zu sehen. Dem entgegen ist die Abnahme über die Zeit von 2 h bis 72 h bei den PBMC Zellen deutlich zu sehen ( $n = 3$ ). In HEp-2 Zellen repliziert der Erreger, in Endothel- und Muskelzellen, sistiert die Erregermenge auf gleichem Niveau, in PBMC reduziert sich die Anzahl lebender Chlamydien langsam.

**Tabelle 8: *C. pneumoniae* 16S rRNA-Menge in diversen Zellpopulationen in Abhängigkeit von der Zeit.** Die Zahlenwerte entsprechen dem Crossing-point (Cp) der quantitativen PCR. Kleine Werte zeigen einen früheren mRNA-Nachweis und damit eine größere Menge an Zielgen und Erreger an. Zellzahl und Infektionsrate standardisiert ( $n = 3$ ).

Zeitpunkte	HEp-2 ohne IFN $\gamma$ (Cp)	HEp-2 mit IFN $\gamma$ (Cp)	CASMC (Cp)	HUVEC (Cp)	PBMC (Cp)
2 h	17,16	16,75	9,39	10,76	14,46
6 h	16,54	16,11	10,91	11,59	16,14
24 h	13,76	15,27	10,20	11,99	15,65
48 h	13,05	18,15	10,90	11,51	15,68
72 h	12,54	18,55	11,83	10,94	18,54

### 3.4 *C. pneumoniae*-Entwicklung unter IFN $\gamma$ -Behandlung in HEp-2

Durch den Einsatz des Zytokins IFN $\gamma$  an den infizierten HEp-2 Zellen wurde es möglich die Entwicklung der Chlamydien zu beeinflussen. Diese Möglichkeit hängt maßgeblich von der L-Tryptophanmenge im Kulturmedium ab. Das verwendete Zellkulturmedium musste eine L-Tryptophankonzentration von 4 - 5 mg/L aufweisen. Bei höheren Konzentrationen war keine deutliche Beeinflussung der Chlamydien-Entwicklung durch die IFN $\gamma$  Zugabe möglich. Für die angeführten Versuche wurden 60 U/mL IFN $\gamma$  in das Zellkulturmedium gegeben. Färbungen (2.21.1) der Einschlüsse mit und ohne IFN $\gamma$  Behandlung zeigten die verminderte Entwicklung der Bakterien (Abbildung 4). Die Chlamydien entwickelten kleinere Einschlüsse, wobei die Wirtszelle nach 72 h nicht zerstört wurde. *C. pneumoniae* zeigte also eine persistierende Entwicklung in den IFN $\gamma$  behandelten Zellkulturen, eine IFN $\gamma$  induziert Erregerpersistenz



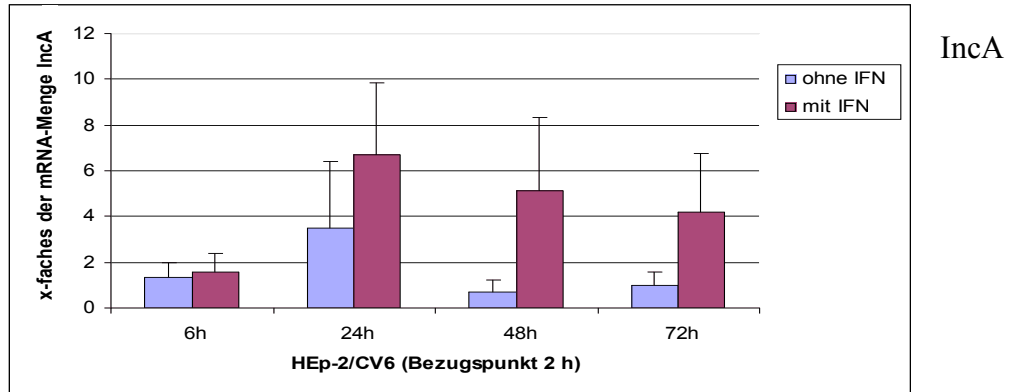
**Abbildung 4: Replikative und persistierende Infektion in HEP-2 Zellen. (A)** Mit 60 U/mL IFN $\gamma$  behandelte Chlamydien im Status der Persistenz mit kleinen aberranten Einschlüssen nach 72 h der Kultivierung und **(B)** die normal entwickelten Einschlüsse in HEP-2 Zellkultur ohne IFN $\gamma$ .

### 3.5 Analyse der *C. pneumoniae* IncA-Transkription

#### 3.5.1 Quantitative Auswirkung der IFN $\gamma$ -Behandlung auf die IncA-mRNA-Synthese

Untersucht wurde die mRNA des CV6 Stammes in HEP-2 Zellen. Hierzu diente die gleiche Zell- und Bakterienmenge aus jeweils einer Anzucht, so dass die Bakterien im gleichen Entwicklungsstadium vorlagen. In den parallelen Ansätzen wurde die eine Hälfte der HEP-2 Zellen 24 h vor und während der Infektion mit 60 U/mL IFN $\gamma$  behandelt. Das Kulturmedium hatte eine L-Tryptophan Konzentration von 4 mg/mL (RPMI Medium). Die andere Hälfte wurde ohne IFN $\gamma$  Zugabe kultiviert. Die infizierten Zellen wurden nach 2 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h mit dem RA1 Reagenz lysiert und zur späteren RNA Extraktion (2.17) bei -80°C gelagert. Zur RT-PCR wurden nach photometrischer Messung ca. 100  $\mu$ g/ml der RNA eingesetzt. Die ersten Untersuchungen bezogen sich auf die mRNA Menge des IncA Gens. Das Protein kommt während der normalen Entwicklung der Chlamydien in großen Mengen in der Einschlussmembran vor. Es zeigte sich in den IFN $\gamma$  behandelten Kulturen, in denen die Bakterien kleinere Einschlüsse mit den morphologischen Charakteristika der Persistenz aufwiesen, eine erhöhte Transkription des IncA Gens, insbesondere zu den 24 h, 48 h und 72 h Zeitpunkten. Die mRNA Synthese des IncA Gens nach 6 h wies unter beiden Bedingungen nahezu den gleichen Wert auf (Graphik 1). Die Errechnung der Werte verlief unter Bezug auf

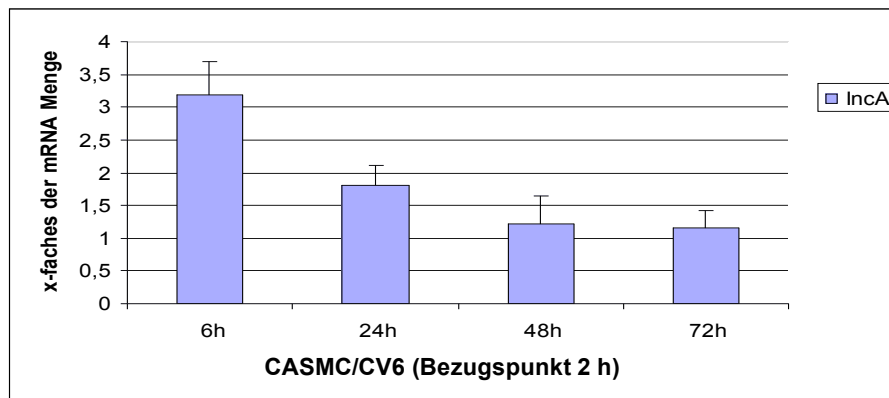
die 16S Werte, so dass eine veränderte Überlebensrate der Bakterien oder die Infektionsrate zu Beginn hier mit einbezogen wurde.



**Graphik 1: IncA mRNA-Synthese der Chlamydien unter HEp-2 Kultivierung.** Es ist eine deutliche Erhöhung unter dem Einfluss der Persistenzinduktion durch  $\text{IFN}\gamma$  nach 24, 48 und 72 h zu sehen. Die Chlamydien im replikativen Zyklus ohne  $\text{IFN}\gamma$ -Zugabe wiesen dagegen eine gesteigerte mRNA Expression nach 6 h und 24 h auf, jedoch keine Erhöhung während der späteren Zeitpunkte. Es kommt also zu einer verstärkten verzögerten IncA-Synthese unter der  $\text{IFN}\gamma$  Zugabe, bzw. im Persistenzstatus (n = 5).

### 3.5.2 IncA mRNA-Synthese in Muskelzellen (CASMC)

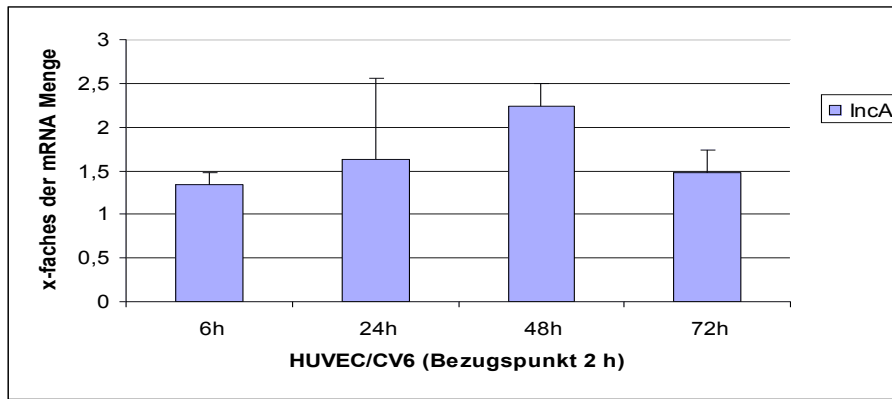
Die Entwicklung der Chlamydien in CASMC war, wie unter 3.1 beschrieben, nicht replikativ, d. h. die Bakterien bildeten zumeist kleinere, sistierende Einschlüsse und zerstörten die Wirtszellen nicht nach 72 h, wie es bei der normalen replikativen Entwicklung in den HEp-2 Zellen sonst typisch ist. Die mRNA wurde wie oben (3.5.1) beschrieben gesammelt und über die quantitative Real Time-PCR analysiert. Wie in Graphik 2 zu sehen ist, kommt es bei den CASMC zu einer kontinuierlichen IncA-Transkription, wobei zum 6 h Wert die Expression auffällig erhöht ist - im Vergleich zu der replikativen Situation in den HEp-2 Zellen (Graphik 1). Die Ergebnisse wurden aus 3 Versuchen gemittelt.



**Graphik 2: IncA-Transkription in CASMC.** Die IncA Bildung der Chlamydien in CASMC verläuft kontinuierlich, mit einem Maximum nach 6 h. Glatte Muskelzellen sind die dominierende Zellpopulation in Aortengewebe (n = 3).

### 3.5.3 IncA mRNA-Synthese in Endothelzellen (HUVEC)

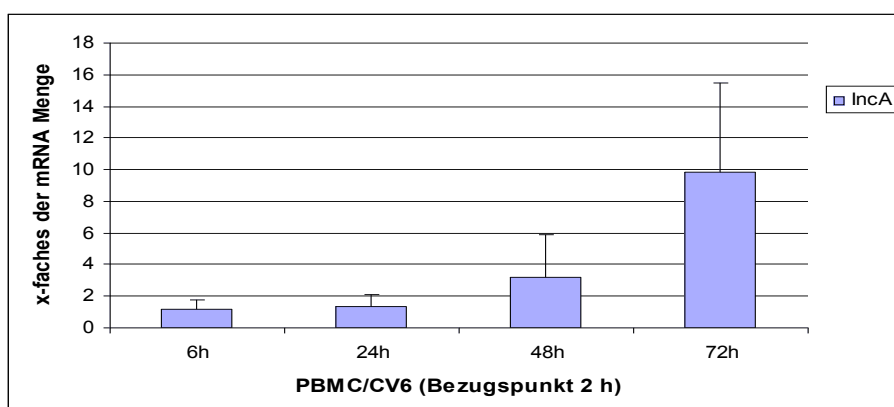
Der Versuchsaufbau stimmte mit dem der HEp-2 und CASMC Ansätze (3.5.1/3.5.2) überein. Die Proben wurden nach 2, 6, 24, 48 und 72 h der Chlamydienkultivierung in RA1 RNA-Lysispuffer aufgenommen. Graphik 3 zeigt auch in HUVEC Zellen eine kontinuierliche - Transkription, ohne eine hervorstechende Erhöhung zu einem der Messzeitpunkte. Die mRNA-Menge und ihre zeitliche Bildung stimmen mit denen der CASMC nahezu überein. Auch die HEp-2 Zellen unter IFN $\gamma$  zeigten diese kontinuierliche IncA-Transkription, jedoch in erhöhter Menge (Graphik 1/Graphik 2) – offenbar handelt es sich um ein Merkmal des auch morphologisch sichtbaren Zustands der Erregerpersistenz. Die Ergebnisse wurden in 3 Versuchen ermittelt.



**Graphik 3: IncA-Transkription in HUVEC.** Die IncA Synthese der Chlamydien in HUVEC Zellen verläuft weitgehend kontinuierlich ohne einen auffälligen Anstieg zu einem der Zeitpunkte (n = 3).

#### 3.5.4 IncA mRNA-Synthese in PBMC

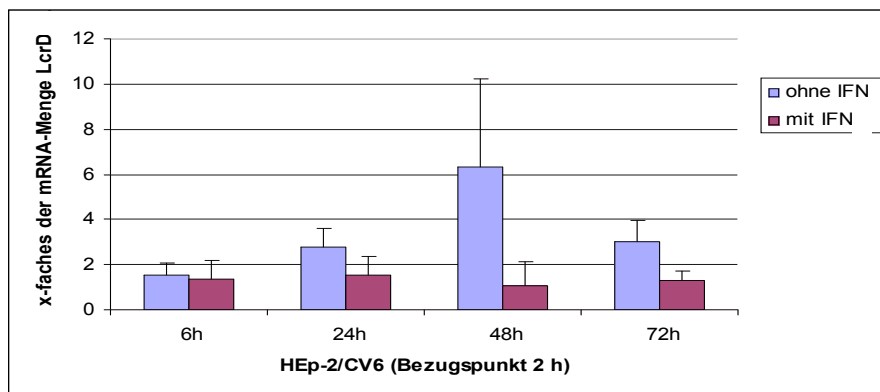
Der Versuchsaufbau stimmte mit den zuvor beschriebenen Versuchen überein (3.5.1/3.5.2/3.5.3). Graphik 4 zeigt deutlich eine leichte Zunahme der IncA-mRNA im Verlauf. Im Vergleich zu Endothel- oder Muskelzellen nimmt die Vitalität der Chlamydien in PBMC nach der Beurteilung des 16S Werte (Tabelle 8), mit der Inkubationszeit ab. Setzt man die IncA-mRNA in Relation zur 16S kommt es hier dennoch zu einer erhöhten mRNA Bildung der Bakterien. Die Ergebnisse wurden in 3 Versuchen ermittelt.



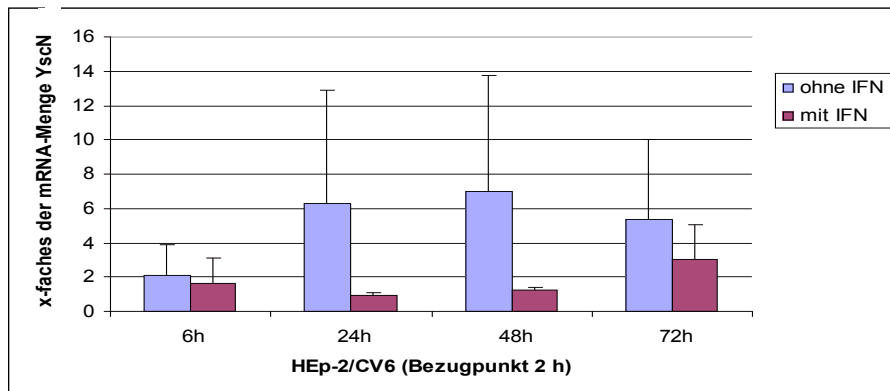
**Graphik 4: IncA-Transkription in PBMC.** Die IncA Bildung der Chlamydien in PBMC verläuft kontinuierlich mit einem auffälligen Anstieg zu dem 72 h Zeitpunkt (n = 3).

### 3.6 Expressionsanalyse des Typ III Sekretions-Apparates in HEp-2 Zellen

Aus den unter 3.5.1 beschriebenen Kulturen wurde zugleich die mRNA des Typ III Sekretions-Apparates von *C. pneumoniae* zwischen den HEp-2-Zellen mit und ohne IFN $\gamma$ -Behandlung verglichen. Von dem Typ III System wurde das LcrD Gen und das YscN Gen untersucht. Die Untersuchungen in HEp-2 zeigten unter dem Einfluss von IFN $\gamma$  eine verminderte mRNA Bildung dieser Gene im Vergleich zum Ansatz ohne den Einfluss von IFN $\gamma$  (n = 5) (dargestellt in Graphik 5).

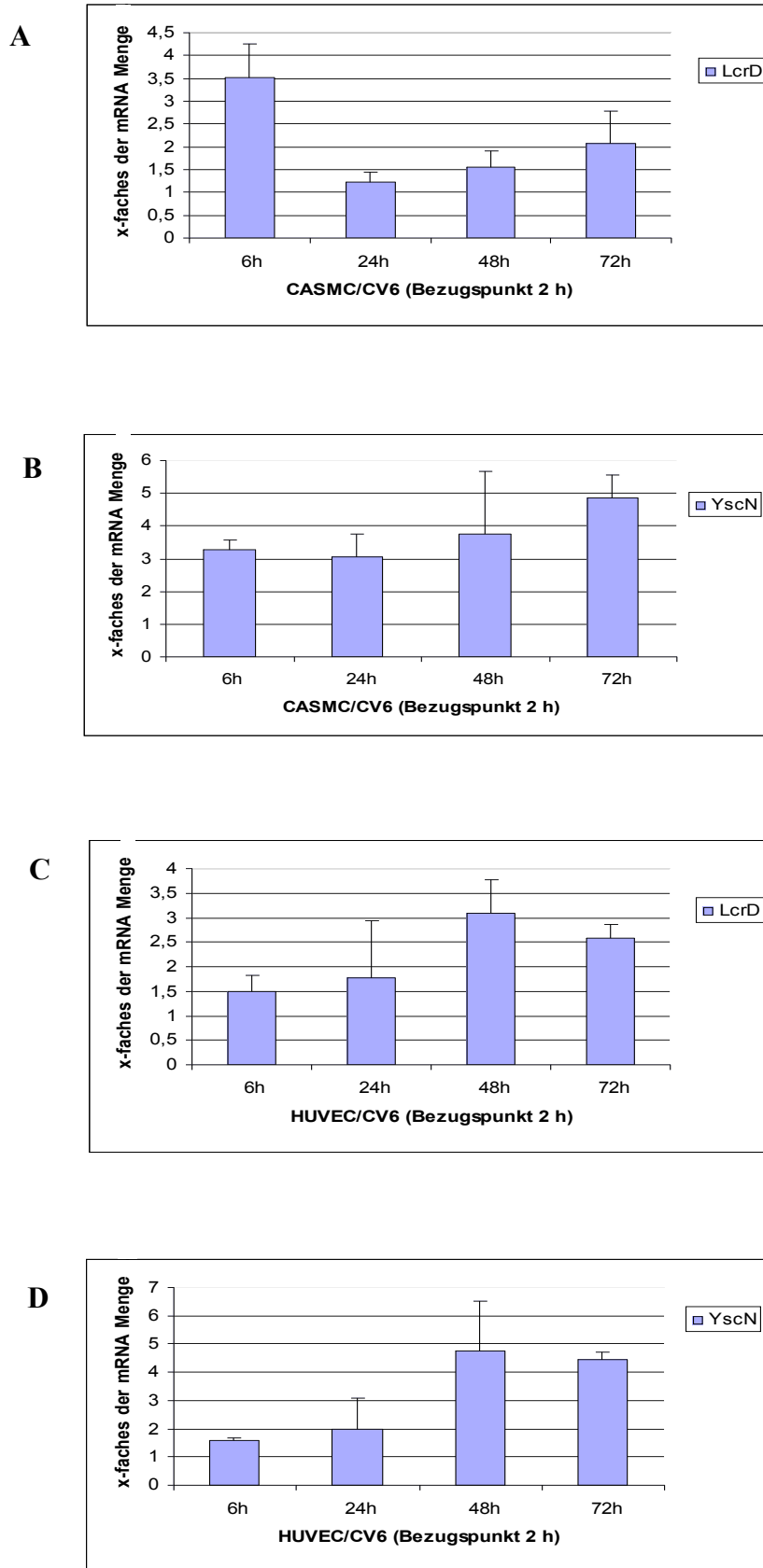


**LcrD**



**YscN**

**Graphik 5:** Die Chlamydien in HEp-2 Zellen ohne IFN $\gamma$  Behandlung zeigen eine regelmäßige und hohe mRNA Bildung im Vergleich zu den Chlamydien mit IFN $\gamma$  Einwirkung. Die Bakterien mit IFN $\gamma$  bilden nahezu konstant über 72 h mRNA des Typ III Sekretions-Apparates (LcrD, YscN) mit einer Erhöhung zum 72 h Wert bei YscN. Unter IFN $\gamma$  Zugabe wurde nur eine reduzierte Menge mRNA für diese Struktur des Typ III Sekretionsapparates gebildet (n = 5).



**Graphik 6: Expression des chlamydialen Typ III Sekretions-Apparates in CASC (A/B) und HUVEC (C/D). Kontinuierliche mRNA-Synthese mit zeitlichem Anstieg von YscN und LcrD-mRNA (n = 3).**

### **3.7 Expressionsanalyse des Typ III Sekretions-Apparates in Muskel- und Endothelzellen**

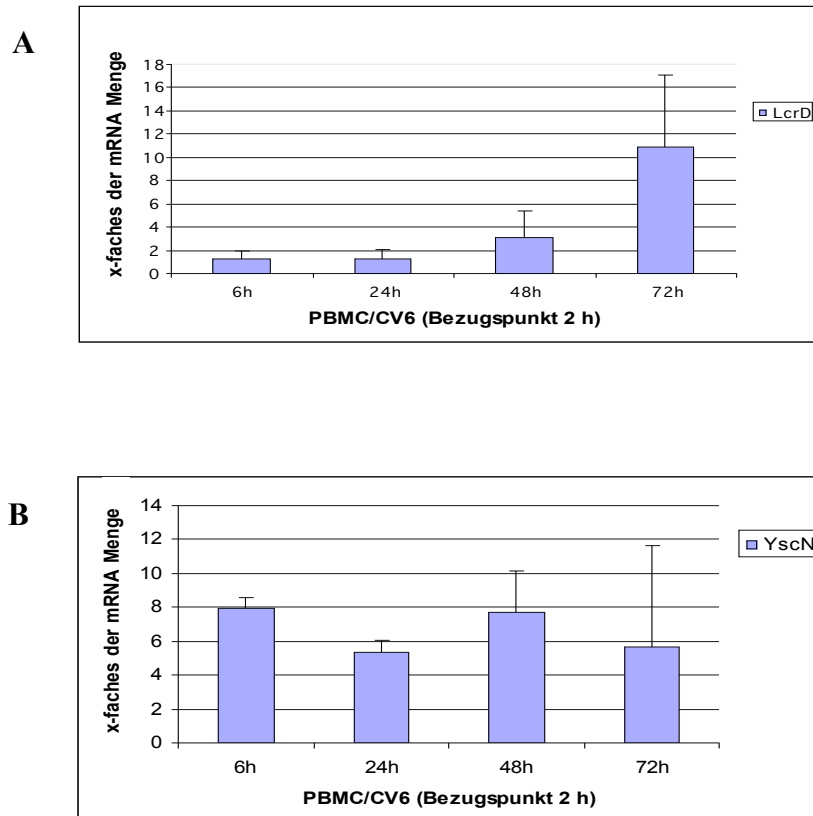
Die CASMC und HUVEC Kulturen (3.5.2/3.5.3) wurden ebenfalls zur Auswertung der mRNA des Typ III Sekretions-Apparates von *C. pneumoniae* herangezogen. In Graphik 6 A/B ist eine kontinuierliche Steigerung der Bildung der mRNA von LcrD und YscN zu sehen. Bei den HUVEC Zellen kam es nach 72 h zu keiner weiteren Steigerung mehr.

### **3.8 Expressionsanalyse des Typ III Sekretions-Apparates in PBMC**

Der PBMC-Versuchsansatz unter 3.5.4 wurde zugleich auch für die Untersuchung des chlamydialen Typ III Sekretions-Apparates benutzt. Die mRNA Menge des LcrD Gens des Transportsystems zeigt eine geringe Expression nach 6 h und 24 h und steigt nach 48 h und besonders nach 72 h stark an (Graphik 7). Beim YscN Gen, kommt es zu einer kontinuierlichen recht starken Expression. Die Expressionsmenge variiert bei den PBMC stärker als bei den zuvor untersuchten Endothel- und Muskelzellen (n = 4).

### **3.9 IncA-Proteinnachweis**

Nachdem die Transkriptionanalyse bei replikativer und persistierender Infektion abgeschlossen war, sollte auch die IncA-Translation untersucht werden. Die *C. pneumoniae*-Infektion in den verschiedenen Wirtszellen wurde für den IncA-Proteinnachweis über eine Chlamydien Antikörper Färbung (2.21.1) kontrolliert, um Fehler durch schlechte Infektionsraten auszuschließen. Das IncA Protein wurde mit Hilfe polyklonaler Ak (2.7.1) nachgewiesen. Die Zellen und Chlamydien wurden für die ersten Ansätze in der gleichen Mengen wie zuvor für die mRNA Untersuchung eingesetzt: 200 µl des *Chlamydia pneumoniae* CV6 Stammes/500000 Wirtszellen (entspricht ca. 3 IFU/Zelle). Der Proteinnachweis erfolgte über die SDS-Page (2.22) nach Laemmli (1970).

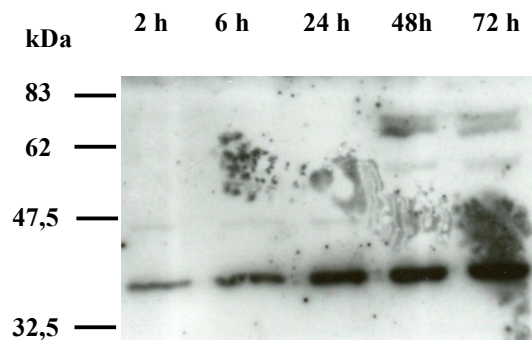


**Graphik 7: YscN und LcrD-Transkription in PBMC.** Die mRNA Menge für diese Komponenten des Typ III Sekretions-Apparates zeigt in PBMC stärkere Unterschiede im Verlaufe der Untersuchungszeit als in Endothel- und Muskelzellen. (A) Die mRNA des LcrD Gens zeigt zu Beginn eine kontinuierliche Expression mit starkem Anstieg zum 72 h Wert. Die YscN Werte (B) zeigen eine kontinuierliche mRNA Bildung (n = 4).

### 3.9.1 *C. pneumoniae* IncA-Protein in HEp-2 Zellen

Für die Untersuchung wurden die Zellen wie für die mRNA Gewinnung (2.15) mit 60 U/ml IFN $\gamma$  behandelt, der parallele zweite Ansatz wurde ohne IFN $\gamma$  durchgeführt. Zum Nachweis der Molekularen Masse des dargestellten Proteins wurde in jedem Ansatz ein Proteinmarker eingesetzt. In Abbildung 5 ist das IncA Protein der HEp-2 Zellen ohne eine zusätzliche IFN $\gamma$ -Behandlung dargestellt. Das Protein wurde mit polyklonalem IncA Ak markiert (2.22). Abbildung 5 zeigt eine deutliche Bande zwischen den Markerbanden 47,5 und 32,5 kDa. Dies entspricht dem IncA Protein von *C. pneumoniae* mit einer Größe von 43,4 kDa. Die Banden zu dem 2 h und 6 h Zeitpunkt erscheinen sehr schwach, wobei sich ein Übertrag des IncA Proteins von der vorherigen Zellkultur nicht ganz ausschließen lässt. Die Banden zu 24, 48 und 72 h erscheinen deutlich und weisen auf eine neue IncA- Synthese hin. Die Untersuchung der mit IFN $\gamma$  behandelten infizierten HEp-2 Zellen zeigte keine Banden (ohne Abbildung). Unter dem

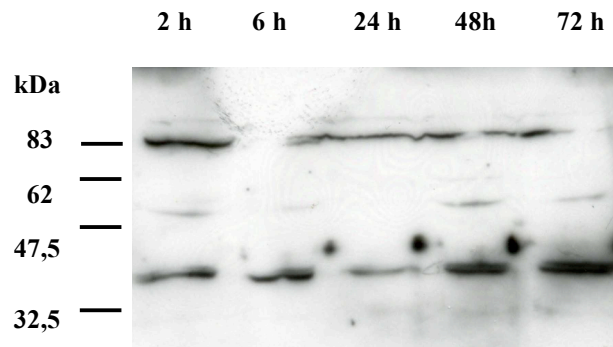
Einfluss des IFN $\gamma$  kam es also zu keiner IncA-Synthese mehr. In einem zweiten Ansatz mit der doppelten Bakterienmenge unter IFN $\gamma$  Behandlung konnte ebenfalls keine deutliche IncA Proteinbande über die SDS-Page dargestellt werden. Die erhöhte Bakterienzahl führte bei den gut zu infizierenden HEp-2 Zellen zu einer frühzeitigen Zerstörung der Zellen, wobei die Einschlüsse nicht stärker entwickelt waren, jedoch die infizierten Zellen durch die Zytotoxizität der hochkonzentrierten Erreger (errechnete Menge ca. 6 IFU/Zelle) zerstört wurden.



**Abbildung 5: IncA-Proteinsynthese in HEp-2 Zellen.** Dargestellt wird die im zeitlichen Verlauf ansteigende IncA Proteinmenge bei 43,3 kDa im Western Blot ohne IFN $\gamma$  Behandlung, also bei replikativer Infektion mit *C. pneumoniae*. Auf der linken Seite ist der Proteinmarker zur Größenorientierung abgebildet.

### 3.9.2 *C. pneumoniae* IncA-Protein in CASMC

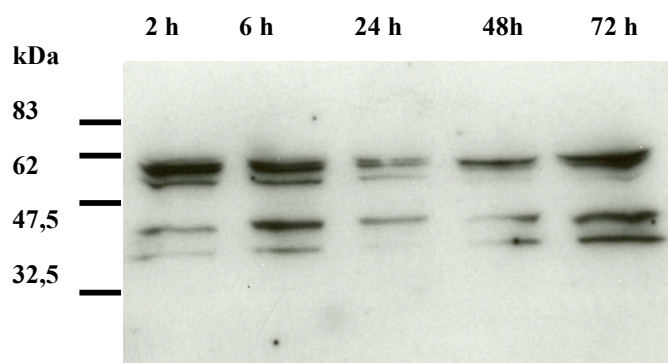
Der Proteinnachweis wurde mit der gleichen Zell- und Bakterienmenge wie unter den HEp-2 Zellen (3.9.1) beschrieben durchgeführt. Da die Chlamydien in den Muskelzellen eine spontane Persistenz zeigten (3.1) wurden die CASMC Ansätze nicht mit IFN $\gamma$  behandelt. Die Abbildung 6 zeigt den IncA Protein Nachweis, wobei wie zuvor ca. 3 IFU/Zelle eingesetzt wurden. Es sind schwächere Proteinbanden als in HEp-2 Zellen zu sehen, die Banden zu 2 und 6 h sind möglicherweise auf übertragenes IncA Protein aus der vorherigen Kultur zurückzuführen. Die Proteine zu 48 h und 72 h zeigen ebenfalls relativ dünne Doppelbanden auf der für das IncA Protein korrekten Höhe von 43,3 kDa. Der gleiche Versuch wurde mit einer erhöhten Anzahl an *C. pneumoniae* angesetzt, wobei die Zellzahl beibehalten wurde und ca. 6 IFU/Zelle eingesetzt wurden. Es zeigte sich jedoch keine erhöhte Proteinmenge durch die gesteigerte Chlamydien Infektion. Die Banden auf der Höhe der Markerbande 83 kDa stellt die doppelte Größe des IncA Proteins dar und kann eine Komplexbildung zweier Proteine darstellen.



**Abbildung 6: IncA-Proteinsynthese in CASCs.** Im Vergleich zu replikativ infizierten HEP-2 Zellen gibt es in CASCs für das chlamydiale IncA Protein relativ schwach ausgeprägte Banden bei ca. 43,3 kDa. Durch die doppelte Bakterienmenge ließ sich die Proteinmenge in den Muskelzellen auch nicht weiter steigern. Die in den CASCs induzierte Erregerpersistenz führt also zu einer reduzierten IncA-Translation. Auf der Höhe von 83 kDa ist eine schwache Proteinbande zu sehen, eventuell Resultat einer Komplexbildung.

### 3.9.3 *C. pneumoniae* IncA-Protein in HUVEC

Der Versuchsaufbau erfolgte wie unter dem CASCs 3.9.2 Versuch beschrieben. Eine IFN $\gamma$  Behandlung war bei den Endothelzellen ebenfalls nicht nötig, da es auch hier zur spontanen Persistenz der Chlamydien kam (3.1). Die Abbildung 7 zeigt eine schwache Proteinbande des IncA im Bereich von 43,3 kDa, mit vielen unspezifischen Banden im hohen kDa Bereich.



**Abbildung 7: IncA-Proteinsynthese in HUVECs.** Die chlamydiale IncA-Synthese in Endothelzellen (HUVECs) erscheint ähnlich reduziert wie in den Muskelzellen. Es sind starke unspezifische Proteinbanden zu sehen und eher schwach ausgebildete Banden in Höhe der 43,3 kDa für das IncA Protein. Auch die in den HUVECs induzierte Erregerpersistenz führt zu einer reduzierten IncA-Translation.

### 3.9.4 *C. pneumoniae* IncA-Protein in PBMC

Der Versuchsansatz für die PBMC Infektion erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen, da nicht alle Zellen über die Zeit der Kultivierung, wie die primären Muskelzellen und Endothelzellen, in Zellkulturschalen adhärirten. Zur Proteingewinnung wurden die infizierten Zellen zentrifugiert und mit Lysispuffer der SDS-Page aufgenommen. Die ersten Untersuchungen wurden mit 500 000 PBMC und 200 µl CV6 durchgeführt (3 IFU/Zelle), wie in den zuvor beschriebenen Versuchen. Für einen zweiten Versuchsansatz wurden die Zellen zu 2 Millionen Zellen und die Bakterien zu 400 µl eingesetzt (entspricht 1,6 IFU/Zelle). Ein IncA Proteinnachweis war über diese Methode sowohl mit der geringeren, als auch mit der erhöhten Zell- und Bakterienmenge nicht möglich (ohne Abbildung).

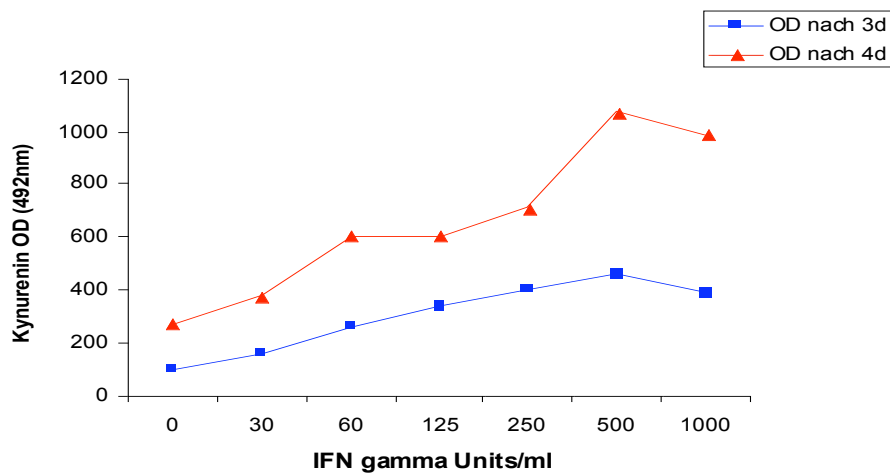
### 3.10 Rekultivierung persistierender Erreger aus CASMC in HEp-2

Um die Infektiosität der Bakterien nach Kultivierung in den Muskelzellen (CASMC) zu überprüfen, wurden CASMC mit einer hohen Konzentration von ca. 3 IFU/Zelle des CV6 Stammes infiziert und für 4 Tage inkubiert. Die Infektion wurde über FITC-markierte Ak (2.21.1) kontrolliert und zeigte die morphologischen Charakteristika der Persistenz (Abbildung 3). In den infizierten CASMC konnten noch eine Woche nach der Infektion Einschlüsse nachgewiesen werden, ohne dass die Wirtszelle zerstört worden wäre. Die infizierten Zellen wurden zerschlagen (2.13) und auf einen HEp-2 Zell-Monolayer übertragen. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wiesen die Zellen kaum Infektionen auf. Vereinzelt Anfärbungen könnten auf eine geringe Übertragung hinweisen, die jedoch nicht deutlich genug für eine Auszählung war. Die Rekultivierung aus dem Persistenzstatus ist offenbar schwierig und wenig effektiv.

### 3.11 Untersuchung der IDO-Aktivität in HEp-2 Zellen

Die IDO (Indolamin-2,3-desoxygenase) Untersuchung gibt einen Hinweis auf die Fähigkeit der Zellen, das im Zellkulturmedium vorhandene L-Tryptophan über die Zwischenstufe des L-Kynurenins abzubauen. Das Zwischenprodukt L-Kynurenin, reichert sich im Überstand der Zellkultur je nach Aktivität und Zelltyp an. Die Menge hängt natürlich auch von der vorhandenen L-Tryptophan-Konzentration im Medium ab (2.23). Eine Möglichkeit diese Aktivität zu steigern, besteht durch die Zugabe des Zytokins IFN $\gamma$ . Graphik 8 zeigt den

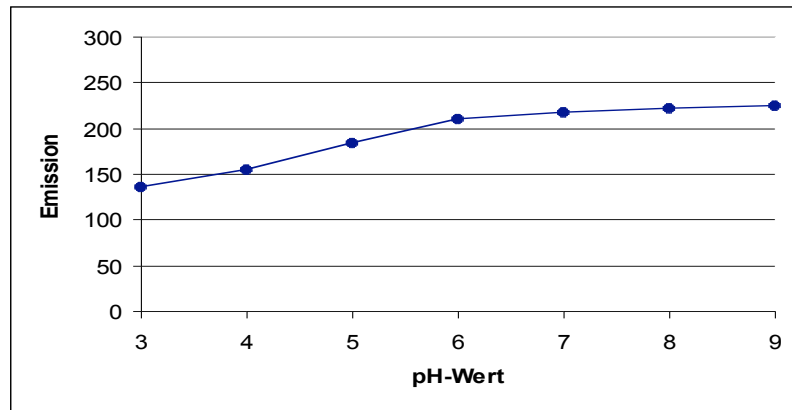
gesteigerten L-Tryptophan Abbau der HEp-2 Zellen, infolge der schrittweise erhöhten IFN $\gamma$  Konzentration.



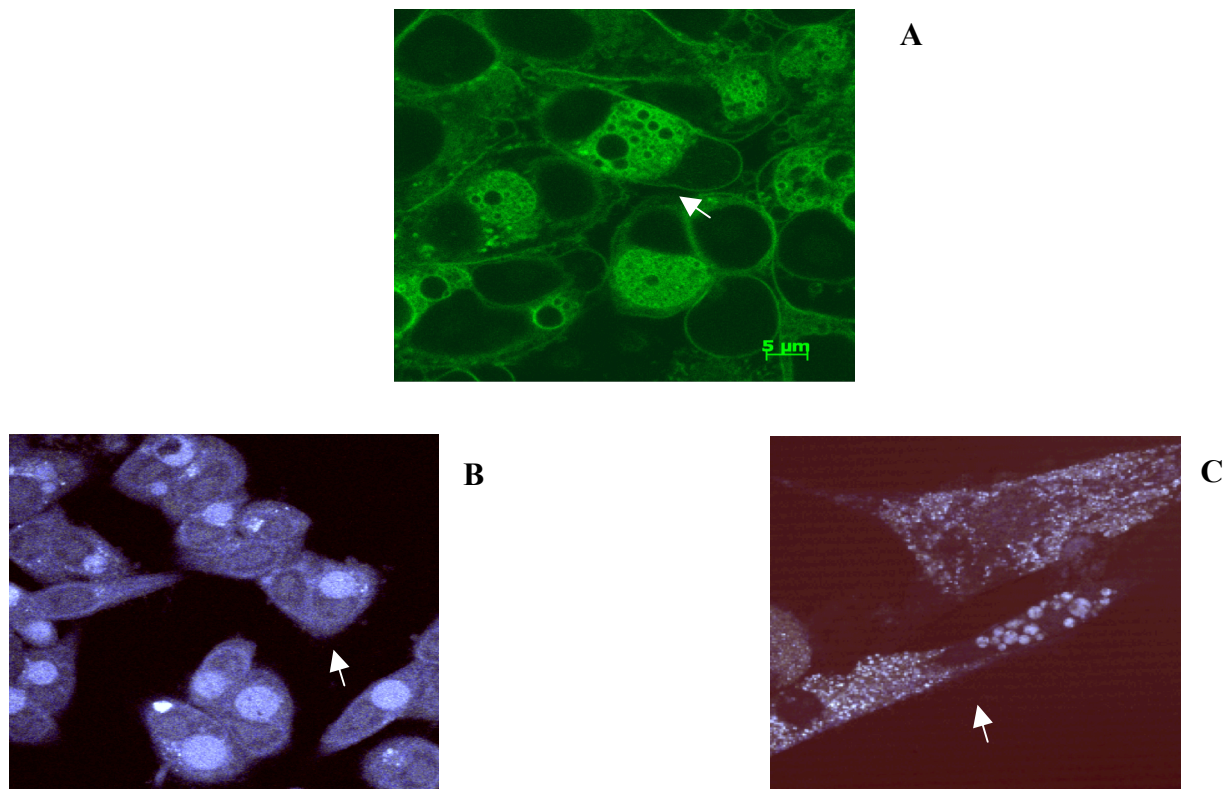
**Graphik 8: IDO-Aktivität in HEp-2 Zellen unter IFN $\gamma$ .** Es ist eine deutliche Beeinflussung der IDO-Aktivität durch die IFN $\gamma$  Konzentration zu sehen. Die hohe L-Kynurenin Konzentration im Überstand weist auf einen schnellen Abbau von L-Tryptophan, dessen Abbauprodukt Kynurenin ist, hin. Nach 4 Tagen kommt es zu einer weiteren Steigerung der Kynurenin-Konzentration.

### 3.12 pH-abhängige Färbung der *C. pneumoniae* Einschlüsse in Persistenz und Replikation

Die pH-abhängigen Farbstoffe LysoSensor Green DND-189 und Yellow/Blue DND-160 von Molecular Probes wurden für Untersuchungen am konfokalen Mikroskop eingesetzt. Der erste Farbstoff Green DND-189 konnte nur einen breiten pH-Bereich anzeigen (Abbildung 8 A). Gezeigt wird ein Querschnitt durch einen über 72 h alten Einschluß von *C. pneumoniae* in HEp-2. Um eine Messung verschiedener pH-Werte unabhängig von Zellbestandteilen vorzunehmen, wurde über einen Puffer mit eingestellten pH-Werten zwischen 3 und 9 eine Messreihe mit dem Farbstoff DND-160 durchgeführt und graphisch (Graphik 9) dargestellt. Diese Messungen dienten zur späteren Untersuchung der pH-Werte chlamydialer Einschlüsse. Die *C. pneumoniae* Einschlüsse werden in Abbildung 8 gezeigt.



**Graphik 9: Standardkurve für die Emission von LysoSensor DND-160 in Abhängigkeit vom pH-Wert.** Die Messung erfolgte für den Farbstoff LysoSensor DND-160 in Ringer Lösung. Der Farbstoff ändert bei Anregung seine Emission im pH-Bereich von 3-9.



**Abbildung 8: Darstellung des pH-Wertes von *C. pneumoniae*-Einschlüssen mit Fluoreszenzfarbstoffen.** (A) Querschnitt durch 72 h alte replikative *C. pneumoniae*-Einschlüsse in HEp-2, gefärbt mit DND-189. (B) Nach 48 h konnten Einschlüsse von *C. pneumoniae* mit DND-160 angefärbt werden. Sie wiesen einen pH von 8 auf (nach 72 h einen pH von 6,5, nicht dargestellt). (C) In CASMC wiesen die aberranten Einschlüsse der persistierenden Erreger nach 48 h den pH 4,5 auf. Originalvergrößerung 600x.

### **Untersuchung der Wirtszell-Genexpression *ex vivo***

Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen lag die proatherogene Genexpression vaskulärer Wirtszellen unter chlamydialer Infektion. Um möglichst nahe am physiologischen System zu arbeiten, wurden Aortengewebe von Mäusen *ex vivo* eingesetzt. Die Gewebe bestehen aus einem Verband verschiedener Zellarten (Endothel, glatte Muskelzellen), die über die Laser Capture Microdissection nach der Infektion getrennt voneinander in ihrem Expressionsprofil analysiert wurden. Von Interesse als Zielgene waren die Gene proinflammatorischer Mediatoren (IL-6, IL-8) und prokoagulatorischer Faktoren (TF-1, PAI-1). Die *C. pneumoniae* Infektion erfolgte in einem neu etablierten *ex vivo* Model, wofür frische entnommene Aorten 24 h oder 48 h kultiviert wurden. Die Ausgangskonzentration der Chlamydien lag bei 4,2 Millionen IFU/500µl Medium, diese Konzentration wurde 1:2 verdünnt und für 2-3 Gewebstücke eingesetzt.

#### **3.13 Vorversuche mit homogenisierten Mäuseaorten**

Um eine Modifikation der Gentranskription der ausgewählten Zielgene im Aortengewebe bei *C. pneumoniae* Infektion zu belegen, fanden Vorversuche mit homogenisierten Mäuseaorten statt. Die Aortengewebe wurden nach der Infektion und einer Inkubationszeit von 24 h, 48 h und 72 h in kleinen Mörsern zerrieben, um die mRNA (2.17) zu isolieren. Über die RT-PCR wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die quantitative Auswertung wurde anschließend mittels Real-Time-PCR (2.20) vorgenommen. Für die Auswertung wurden die mit *Chlamydia pneumoniae* (Stamm CV6) infizierten Gewebe mit Negativkontrollen verglichen. Die mit *C. pneumoniae* behandelten Gewebe zeigten auffällige Expressionsunterschiede verglichen zu den Aortengeweben aus dem Kulturmedium ohne Bakterien (Graphik 10) Die mRNA des proinflammatorischen IL-8 (Interleukin-8) weist nach 24 h eine 4fache Erhöhung auf, die auch nach 48 h bestehen bleibt. Ebenfalls erhöht ist die mRNA Synthese nach 24 h und 48 h für das proinflammatorische IL-6. Zusätzlich wurde die mRNA-Synthese der prokoagulatorischen Faktoren TF-1 (Tissue Factor-1) und PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) untersucht, wobei vor allem der TF-1 zum 24 h Wert eine stark Erhöhung der mRNA Synthese und eine leichte Erhöhung nach 48 h aufweist. Das PAI-1 Gen zeigt erst nach 48 h eine zweifach erhöhte Transkription. Die Ergebnisse wurden aus zwei gleich aufgebauten Versuchsansätzen ermittelt.

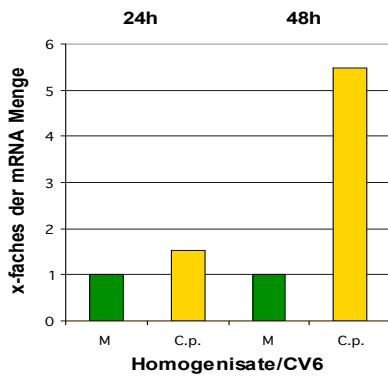
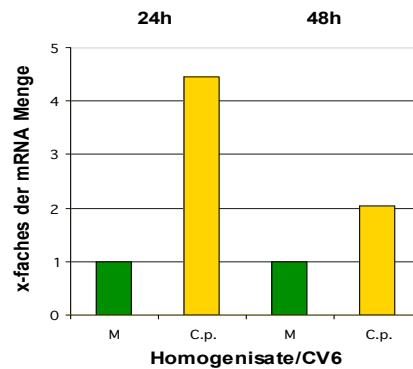
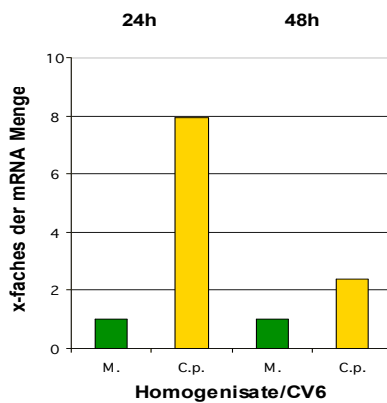
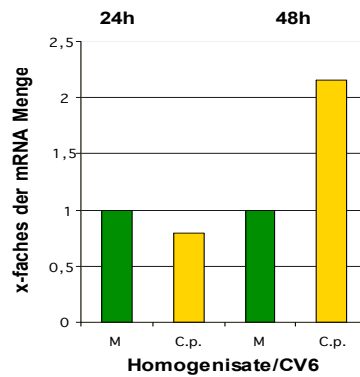
### **3.14 Kontrolle mit Hitze-inaktivierten Chlamydien**

Um zu kontrollieren, ob lebende Chlamydien für die Dysregulation der Wirtszell mRNA Bildung essentiell sind, wurden Infektionsversuche wie unter 3.13 beschrieben mit abgetöteten Chlamydien durchgeführt. Die Bakterien wurden hierzu 1 h bei 100°C in einem Wasserbad abgetötet, wobei das LPS intakt bleibt. Graphik 11 zeigt eine geringe Veränderung in der Wirtszell mRNA Synthese. Diese Modulation der Genexpression durch die inaktivierten Chlamydien ist jedoch wesentlich geringer als bei den lebenden Bakterien, was auf eine große Bedeutung vitaler Erreger bei der vaskulären Infektion hinweist.

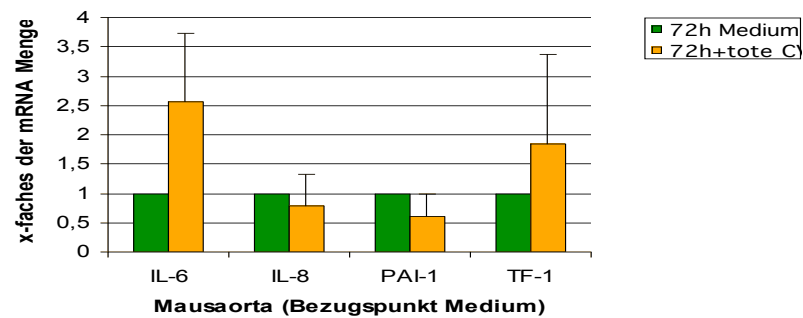
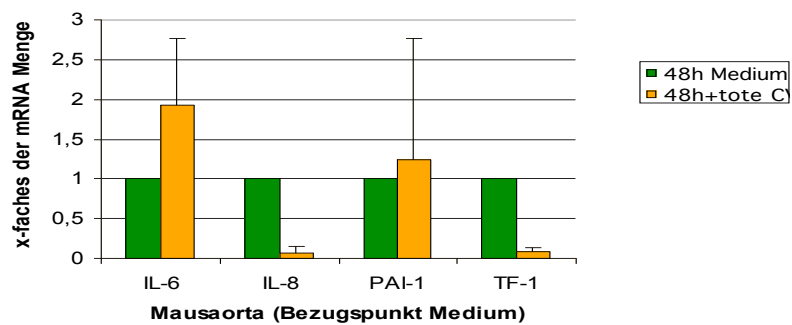
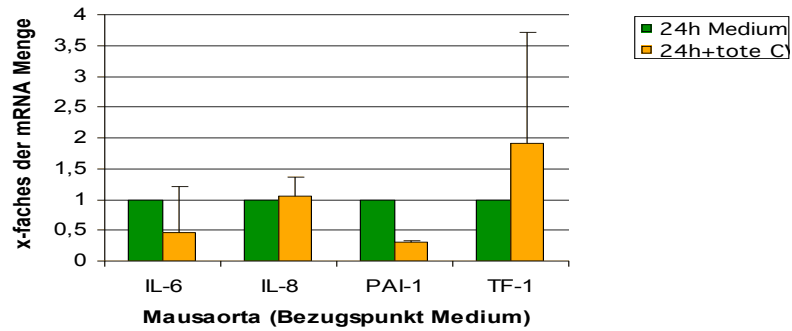
### **3.15 Vorbereitung für die LCM**

#### **3.15.1 Färbung der Gewebsschnitte**

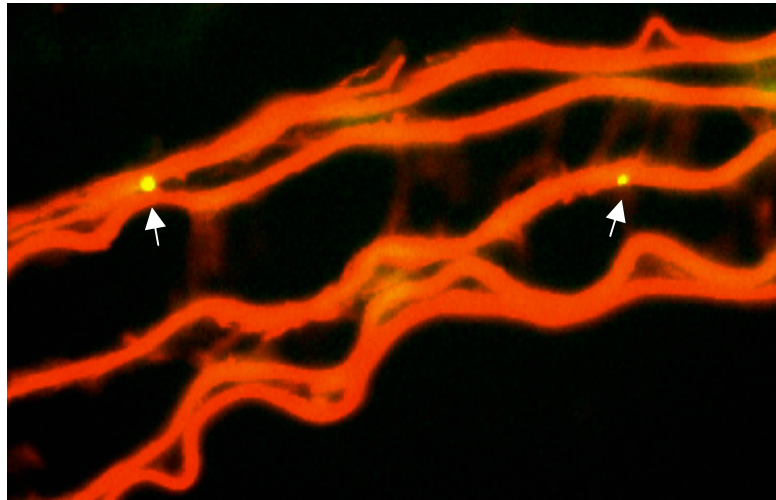
Zur Darstellung der mit *C. pneumoniae* fokal infizierten Bereiche im vaskulären Gewebe, wurden FITC-markierte Antikörper gegen Chlamydien LPS (2.21.1) eingesetzt, dargestellt in Abbildung 9. Zur Differenzierung des Endothels von den Muskelzellen wurde ein Ak gegen CD 31, ebenfalls FITC-markiert, zur Anfärbung des Endothelzell-Monolayers im Aortenring benutzt (Abbildung 10). Diese Färbungen wurden für Durchführung der Laser Capture Microdissection eingesetzt. Zur weiteren Kontrolle und besseren Darstellung der Infektion dienten immunhistologische Färbungen (2.21.4) gegen das LPS von *C. pneumoniae* (Abbildung 11). Zu sehen ist ebenfalls eine LPS-Färbung im Bereich des Fettgewebes.

**IL-6****IL-8****TF-1****PAI-1**

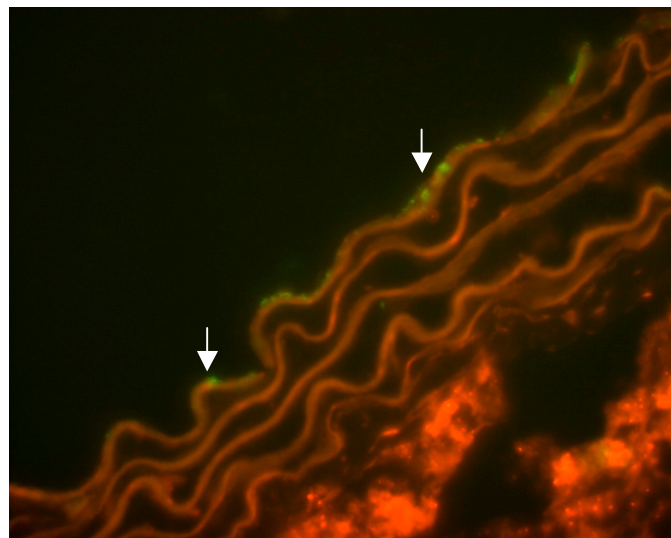
**Graphik 10: Proatherogene Genexpression nach *C. pneumoniae*-Infektion in Aortenhomogenisaten *ex vivo*.** Gezeigt wird die mRNA-Synthese der IL-6, IL-8, TF-1 und PAI-1 Genprodukte zu 24 h und 48 h aus homogenisierten murinen Geweben (M = Medium, C.p. = *C. pneumoniae*). Es ist eine deutlich gesteigerte mRNA Bildung für IL-6, IL-8 und TF-1 unter dem Einfluss der Infektion zu erkennen. Die PAI-1 mRNA zeigt nur zu 48 h eine gesteigerte Synthese. (n = 2).



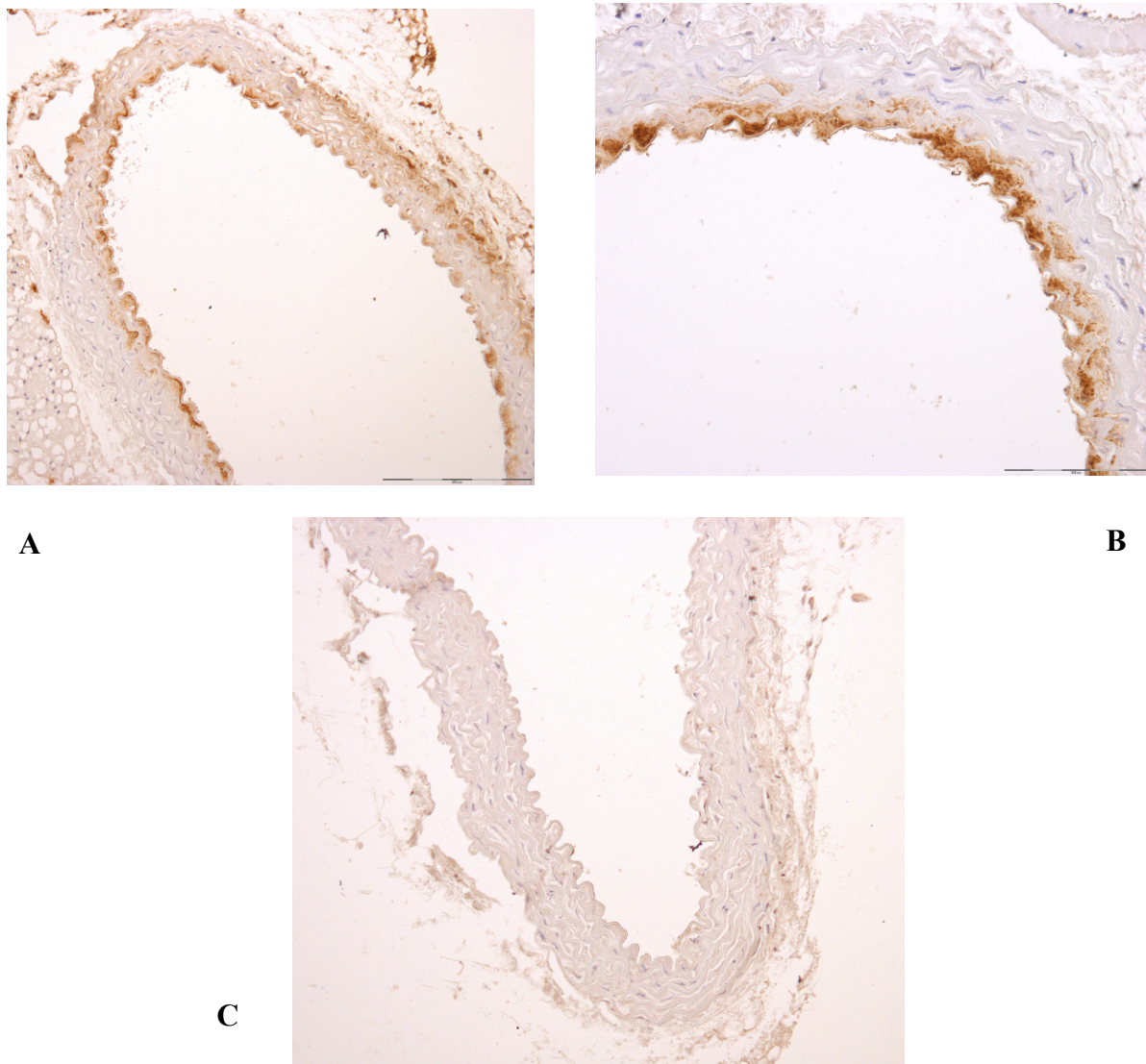
**Graphik 11: Expression der Zielgene bei Zugabe abgetöteter *C. pneumoniae*.** Es ist nur eine gering erhöhte mRNA Synthese unter dem Einfluss Hitze-inaktivierter *C. pneumoniae* (C) zu sehen. IL-6 zu 48 h und 72 h und TF-1 zu 24 h und 72 h zeigen leicht erhöhte mRNA-Synthese im Vergleich zur Infektion mit lebenden Erregern (n = 3). Eine deutliche proatherogene Modulation der vaskulären Genexpression benötigt offenbar lebensfähige Erreger, wie in Graphik 10 dargestellt.



**Abbildung 9: Fokale vaskuläre *C. pneumoniae*-Infektion.** Dargestellt ist ein 5 µm dünner Gefrierschnitt eines *ex vivo* infizierten Aortenrings der Maus. Das Gewebe wurde über einen Fluoreszenz-markierten Ak gegen Chlamydien-LPS gefärbt und zeigt vereinzelte fluoreszierende Anfärbungen, die einer fokalen Infektion mit Chlamydien entsprechen (siehe Pfeile).



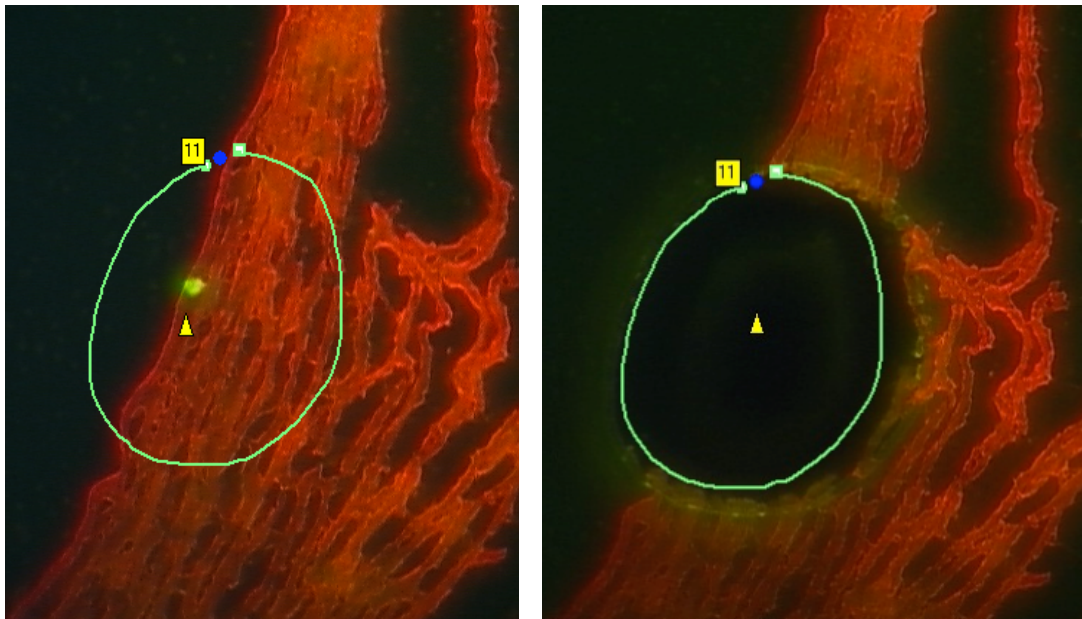
**Abbildung 10: Aortenring von 5 µm Schnittdicke einer Maus (Gefrierschnitt).** Mit FITC-markiertem CD31 Antikörper ist die vaskuläre Endothelauskleidung zur besseren Abgrenzung von anderen Gefäßzellpopulationen dargestellt. Zu sehen ist grüne Fluoreszenz im Bereich des Endothels (Pfeile).



**Abbildung 11: Immunhistochemische Darstellung der Chlamydien-Infektion im murinen Aortenring.** Die immunhistologische Färbung gegen *C. pneumoniae* LPS stellt eine Kontrolle der tatsächlich erfolgten Infektion dar. (A) zeigt eine Übersicht über den infizierten Ring mit Anfärbungen speziell im Endothel und Fettgewebe. Im vergrößerten Ausschnitt unter (B) sieht man die Infektion in Endothel und glatten Muskelzellen nach Färbung mit anti Chlamydia-LPS Ak. (C) Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Mäuseaorten aus parallel angesetzten Kulturen. Die infizierten Mäuseaorten wurden für 48 h mit *C. pneumoniae* bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.15.2 Gewinnung infizierter Gewebe über Laser Capture Microdissection

Fluoreszenz-gefärbte Infektionsherde in den Aortenringen wurden in der Microdissection unter mikroskopischer Sicht bei 200-facher Vergrößerung markiert (Abbildung 12) und mit Laser ausgeschnitten. Durch einen einzelnen Laserschuss konnte das ausgeschnittene Gewebstück herauskatapultiert werden und im Deckel eines darüber fixierten Reaktionsgefäßes aufgefangen werden (2.25.5). Die Gewebe wurden dann sofort für die mRNA-Extraktion eingesetzt.



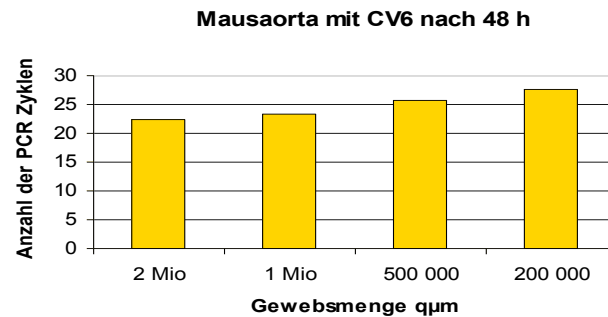
A

B

**Abbildung 12: Gewinnung eines chlamydialen Infektionsherdes im Gewebsverbund mittels Laser Capture Microdissection (LCM).** Zeigt einen murinen Aortenring mit *C. pneumoniae*-Infektionsfokus vor (A) und nach (B) dem Ausschneiden mittels LCM. In den ausgeschnittenen Infektionsherden wurde sofort die Genexpression proatherogener Faktoren analysiert.

### 3.15.3 Zur LCM Genexpressionsanalyse benötigte Gewebsmengen

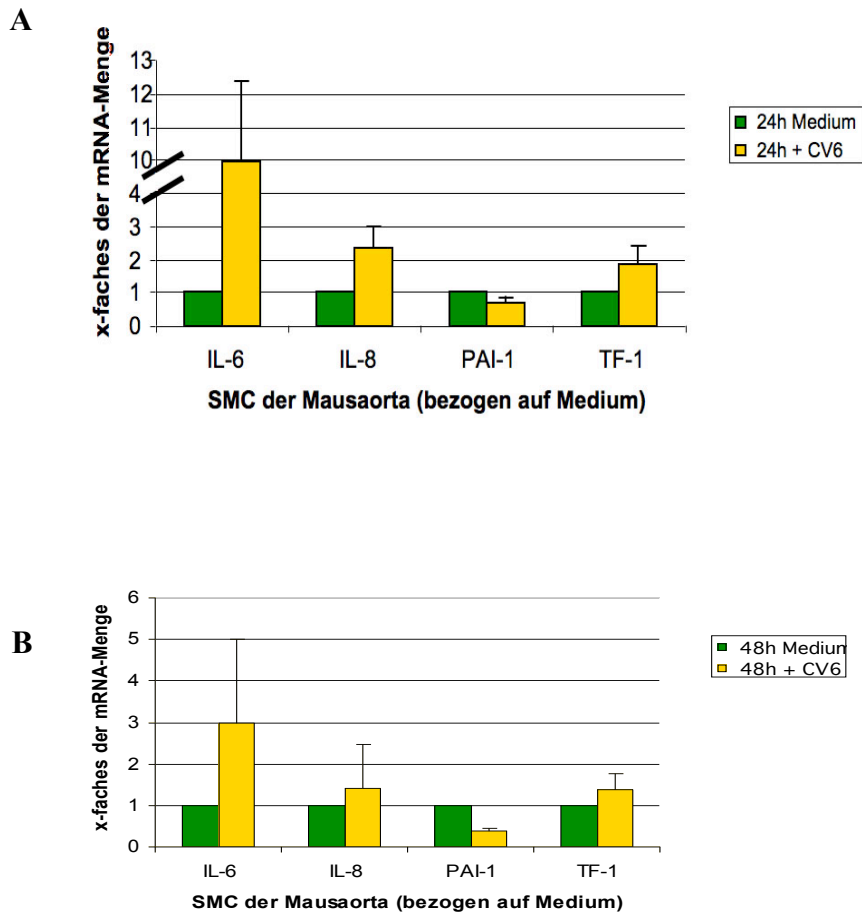
Die *ex vivo* infizierten Gewebe wurden für 24 h und 48 h mit der Bakterien-Medium-Suspension bei 37°C inkubiert. Die für die Untersuchung eingesetzten Gewebstückchen wurden über den Nachweis von *gapdh* mRNA auf ihre Vitalität hin geprüft. Bei diesen ersten Untersuchungen von verschiedenen Mengen ausgeschnittener Gewebe zeigte sich, ab welcher Gewebsmenge ein Nachweis des Housekeeping Gens für *gapdh* möglich war und damit auch die Gentranskription für IL-6, IL-8 als inflammatorische und TF-1 und PAI-1 als prokoagulatorische Faktoren zu detektieren waren. Bei diesen Voruntersuchungen spielten sowohl die Gewebsmenge als auch die Färbeschritte und Bearbeitungszeit während des Ausschneidens eine wichtige Rolle. Die ersten Proben mit 140 000 – 200 000  $\mu\text{m}^2$  erlaubten keinen Nachweis der *gapdh* mRNA. Hiernach wurde die Gewebefläche auf 1 – 2 Millionen  $\mu\text{m}^2$  erhöht, was etwa 25 einzeln auszuschneidenden Infektionsherden entspricht. Graphik 12 zeigt einen *gapdh* mRNA Nachweis über die quantitative RT-PCR. Die Menge der RNA steigt mit der ausgeschnittenen Gewebsmenge an, wobei eine hohe Crossing point Zahl auf eine geringe Gewebe/RNA-Menge hinweist, da mehr Zyklen nötig sind, um die DNA zu detektieren.



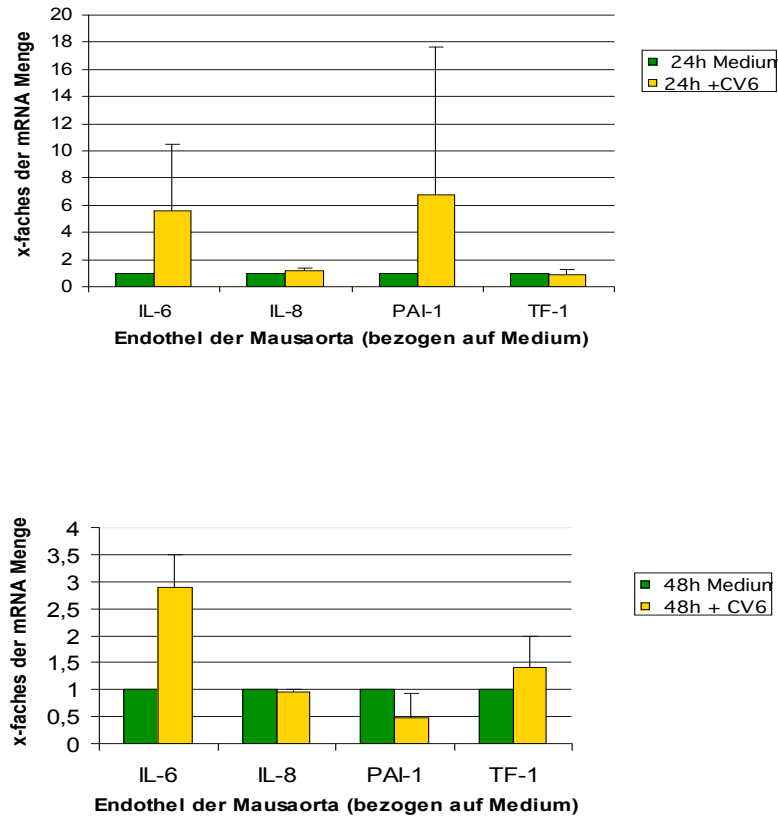
**Graphik 12: Abhängigkeit der Sensitivität des RNA-Nachweises nach LCM von der ausgeschnittenen Gewebefläche.** Verschiedene Gewebsmengen der gefärbten Aortenringe wurden über die Laser Capture Microdissection ausgeschnitten und das Detektionslimit für *gapdh* mRNA analysiert. Zu erkennen ist ein schnellerer RNA-Nachweis mit steigender Gewebsmenge. Die Crossing points (Cp) auf der y-Achse zeigen die Anzahl an PCR Zyklen an, die nötig sind, um die DNA nachzuweisen, d. h. eine hohe Cp Zahl weist auf eine niedrige Ausgangsmenge hin. Um mRNA nachzuweisen, wurde mindestens eine Gewebefläche von 1 mio  $\mu\text{m}^2$  benötigt, dies entspricht etwa 25 einzeln in der LCM auszuschneidenden Infektionsherden.

### 3.16 Gezielte Untersuchung *ex vivo* infizierter Aortengewebe

Nach diesen Voruntersuchungen wurde eine Gewebsmenge von ca. 1 Million  $\mu\text{m}^2$  für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Da die Infektionsrate trotz hoher Chlamydien-Konzentration inhomogen und nicht großflächig war, wurden infizierte Gewebe mit umliegenden Zellen ausgeschnitten und in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Die Untersuchungen konzentrierten sich jeweils auf die zwei pathogenetisch relevanten, permanent gefäßwandständigen Zellpopulationen. Es wurden Muskelzellen aus dem Aortenring ausgeschnitten oder die Endothelzellen, die in Form eines Monolayers den Aortenring auskleiden. Mit diesen spezifischen Bereichen des Aortenrings wurden immer auch die dort befindlichen Bindegewebszellen mit ausgeschnitten, da hier keine weitere Differenzierung möglich war. Wie unter 3.13 beschrieben, wurde die mRNA infizierter und nicht-infizierter Aortengewebe verglichen, wobei die gleichen Gewebsmengen analysiert und über das Housekeeping Gen *gapdh* abgeglichen wurden. Die Ergebnisse sind in der Graphik 13 für die Auswertung der Muskelzellen aus der Aorta aufgetragen. Die Auswertung zeigt die Ergebnisse nach 24 h und 48 h der Kultivierung. Es kommt vor allem zu einer erhöhten mRNA-Bildung der proinflammatorischen Gene wie IL-6 und auch IL-8. Von den prokoagulatorischen Genen zeigt nur TF-1 eine erhöhte Synthese unter dem Einfluss von *C. pneumoniae*, die Synthese vom PAI-1 wurde nicht beeinflusst. Die Auswertung des isoliert analysierten Endothels wies ebenfalls eine erhöhte mRNA Synthese des IL-6 Gens auf, jedoch nicht IL-8. Von den prokoagulatorischen Genen wies nur TF-1 nach 48 h eine erhöhte mRNA Bildung auf (n = 4).



**Graphik 13: Genexpressionsanalyse glatter Muskelzellen mittels LCM gewonnenen *C. pneumoniae*-Infektionsherden im murinen Aortenring.** Über die Microdissectionstechnik wurden die Gewebereiche unter mikroskopischer Sicht gezielt ausgeschnitten. Dargestellt werden die ausgeschnittenen Muskelzellen (SMC) aus Aortenringen von Mäusen nach 24 h (A) und 48 h (B) mit und ohne *ex vivo* Infektion über *C. pneumoniae* CV6. Zu der 24 h Auswertung zeigten vor allem die Gene für IL-6 und IL-8 erhöhte mRNA Synthese, von den prokoagulatorischen Faktoren wies lediglich TF-1 eine erhöhte mRNA Menge auf. Die 48 h Werte wiesen insgesamt eine geringere Expression auf; auch hier zeigten die Gene für IL-6 und IL-8 erhöhte mRNA-Synthesen und die TF-1 mRNA war leicht erhöht verglichen zu den nicht infizierten Gewebeproben (n = 4).



**Graphik 14: Genexpressionsanalyse des Endothels mittels LCM gewonnenen *C. pneumoniae*-Infektionsherden im murinen Aortenring.** Dargestellt werden die gezielt ausgewerteten Endothelzellen aus den Aortenringen von Mäusen mit und ohne *ex vivo* Infektion mit *C. pneumoniae* nach 24 h (A) und 48 h (B). Die 24 h Ergebnisse zeigten eine Aufregulation der mRNA proinflammatorischer (IL-6) und prokoagulatorischer (PAI-1) Faktoren, hingegen wurden IL-8 und TF-1 nicht beeinflusst. Die mRNA Werte für die 48 h Untersuchungen (B) zeigten ebenfalls für den proinflammatorischen Faktor IL-6 eine starke Erhöhung unter der Infektion. Von den prokoagulatorischen Genprodukten ist bei den Endothelzellen eine erhöhte mRNA Expression des TF-1 nach 48 h nachzuweisen, nicht jedoch für das PAI-1 Gen (n = 3).

## 4 Diskussion

### 4.1 Analyse der *C. pneumoniae* mRNA-Synthese in vaskulären und epithelialen Wirtszellen in Persistenz und Replikation

*Chlamydia pneumoniae* ist wie alle Chlamydien-Arten ein obligat intrazelluläres prokaryotisches Pathogen. Es kann ein breites Spektrum an Wirtszellen infizieren und in ihnen überleben. Hierzu gehören Lungenepithelzellen, Makrophagen, zirkulierende Monozyten, arterielle Muskelzellen und vaskuläre Endothelzellen (Gaydos, 1996). Der Entwicklungszyklus der diversen Chlamydien speziees ähnelt sich sehr. Die Entwicklung verläuft biphasisch über zwei funktionell und morphologisch unterschiedliche Formen. Die metabolisch inaktive aber infektiöse Form stellen die EB (Elementarkörper) dar, die in der Lage sind außerhalb des Wirtes zu überdauern. Die EB binden an bisher ungeklärte Wirtszell-Rezeptoren, um von der Zelle aufgenommen zu werden. Von Seiten der Chlamydien kann das MOMP oder Heat-Shock Protein 70 an der Anlagerung beteiligt sein (Raulston JE, 1993 / Su H, 1990). Die Bakterien befinden sich in der Wirtszelle in einem Membran-gebundenen Vesikel. Diese Vesikel sind in der Lage mit Sekretionsvesikeln des Golgi-Apparates zu interagieren, wodurch es den Bakterien möglich wird, Wirts-Phospholipide aufzunehmen (Hachstadt T, 1997). *Chlamydia pneumoniae* ist fähig, die Abwehr-Mechanismen der Wirte zu beeinflussen, indem es die Fusion der Endosomen mit den Lysosomen des Wirtes blockiert und hiermit ein ungestörtes Überleben innerhalb der Zelle ermöglicht. Bald nach der Aufnahme der EB kommt es zur Differenzierung zu den intrazellulär lebenden replikativen Form, den RB (Retikularkörper). Während dieser Umwandlung kommt es zu starken morphologischen Veränderungen, wie dem Verlust an Disulfid-Brückenbindungen des äußeren Membran-Komplexes, der Dekondensation des Genoms und der Initiation der DNA-, RNA- und Protein-Synthese. Durch die Multiplikation der RB kommt es zur Formation kleiner intrazellulärer Mikrokolonien, Einschlüsse genannt. Die Chlamydien bleiben während ihres gesamten intrazellulären Entwicklungszykluses von ca. 72 h bis 96 h innerhalb dieser Einschlüsse. Während dieser Replikation wächst der Einschluss stark an und kann bis zu 1000 Bakterien beinhalten (Belland RJ, 2004).

#### 4.1.1 *C. pneumoniae* tritt in vaskulären Zellen spontan in den Persistenzzustand ein

Die Lebensfähigkeit der Chlamydien und der Einfluss der verschiedenen Wirtszellen auf *Chlamydia pneumoniae* (Stamm CV 6) wurde hier anhand ihrer 16S rRNA untersucht. Nach der Entwicklungszeit von 72 bis 96 h ist die Differenzierung zu den infektiösen Einheiten den EB, beendet und es kommt zur Zerstörung der Wirtszelle. Diesen Vorgang, der im Grunde einer akuten Infektion entspricht, findet man jedoch in der Zellkultur nicht immer. In den epithelialen HEp-2 oder auch in den HeLa Zellen durchlaufen die Bakterien diesen lytischen Kreislauf. Diese Zellen werden deshalb bevorzugt für die Anzucht und Vermehrung der Chlamydien eingesetzt. In den Zellen, die eine Rolle bei der Entwicklung der Atherosklerose spielen scheint dieser Verlauf *in vitro* unterbrochen zu sein. Die Chlamydien zeigen sowohl in den primären CASMC (Muskelzellen) als auch in den HUVEC (Endothelzellen) eine anhaltende Infektion, die als persistente Infektion bezeichnet werden kann. In beiden Zelltypen konnte der CV6 Stamm von *C. pneumoniae* über 6-7 Tage kultiviert werden, wobei die Zellen nicht zerstört wurden und die gesamte Zeit über kleine Einschlüsse aufwiesen, also chronisch infiziert waren. Tabelle 8 zeigt den 16S rRNA Nachweis der Bakterien über 72 h als Beweis ihrer Lebensfähigkeit innerhalb dieser verschiedenen Wirte. In den HEp-2 ist im Verlauf von 72 h eine gesteigerte 16S rRNA Menge nachzuweisen, was auf eine starke Replikation hinweist. Diese vermehrte rRNA Bildung wird in HEp-2 durch die Zugabe von IFN $\gamma$  gestoppt. Unter dem Einfluss von IFN $\gamma$  kommt es zur konstanten mRNA Bildung, die ab 48 h leicht sinkt. Eine ähnliche Situation zeigt sich in den CASMC und HUVEC, wo eine konstante rRNA Menge über 72 h gebildet wird, ohne starke Erhöhung oder Abnahme. Die Situation in den PBMC ist im Vergleich schlechter für die Bakterien, über die 72 h kommt es hier zu einer leichten Verminderung der rRNA Produktion und demnach haben sie wahrscheinlich eine geringere Überlebensrate. Die 16S Nachweise und auch die Darstellung kleiner persistenter Einschlüsse in primären Zellen über 6-7 Tage, gibt einen Hinweis auf die mögliche persistente Lebensweise und Entwicklung der Bakterien in den chronisch inflammatorischen Läsionen, die die Atherosklerose kennzeichnen. Letztlich können die Erreger in vaskulären Zellen spontan persistieren, ohne dass wie in HEp-2 Zellen eine IFN $\gamma$ -Zugabe erforderlich wäre. Da die Erreger im Persistenzzustand therapieresistent sind, ist dies von erheblicher klinischer Bedeutung.

#### 4.1.2 Genexpression von Inca und Typ-III-Sekretionsapparat in der Persistenz

Die Bakterien können die Struktur ihrer Einschlüsse während der Entwicklungszeit auf verschiedene Arten verändern. Die Einschlussmembran muß im Verlaufe der Bakterien-

Entwicklung mit diesen anwachsen. Die Membran zeigt eine Zusammensetzung aus Wirtszelllipiden, die ihren Ursprung im Golgi-Apparat, wie Sphingomyelin, haben, von dort zu den Bakterien transportiert werden und in die Membran eingebaut werden (Hackstadt T, 1995). Weiter befindet sich Cholesterol der Wirtszellen, das auf dem gleichen Wege über den Golgi-Apparat transportiert wird in den Einschlüssen (Carabeo RA, 2003). Es sind Wirtsproteine bekannt, die mit der Membran interagieren, es konnten jedoch keine inkorporierten Proteine entdeckt werden (Scidmore MA, 2003 / Rzomp KA, 2003). Eukaryotische Proteine spielen bei dem Aufbau der Einschlussmembran keine Rolle, jedoch eine große Familie bakterieller Proteine, die Inc-Proteine (Rockey DD, 2002). Es handelt sich um typische Chlamydien Proteine mit einer geringen Sequenzhomologie zwischen den Chlamydien Spezies (um 20 %). Der Aufbau dieser Proteine ist sehr ähnlich: Sie besitzen eine kurze N-terminale Domäne, eine große (50 - 80 Aminosäuren) zweisträngige hydrophobe Domäne und eine C-terminale zytoplasmatische Domäne. Diese Domäne wird auf der zytoplasmatischen Seite der Einschlussmembran exponiert (Hackstadt T, 1999A). Das IncA-Protein ist das zuerst entdeckte Protein der Inc-Familie. Bei *C. caviae* und *C. psittaci* zeigte sich die Exposition auf der zytoplasmatischen Seite des Einschlusses und eine Phosphorylierung des Proteins durch die Wirtszelle (Rockey DD, 2002 / Rockey DD, 1997). IncA wird abhängig von der Spezies eher spät transkribiert im Vergleich zu den anderen Inc-Genen. So kann es bei *C. trachomatis* nach ca. 12-16 h nach der Infektion detektiert werden (Belland RJ, 2003). In einer Arbeit von Lugert L, 2004, über *C. pneumoniae* konnte das IncA Transkript schon 2 h nach der Infektion nachgewiesen werden, was die Unterschiede in dem Entwicklungszyklus der verschiedenen Spezies aufzeigt. Eine weitere Beeinflussung auf die Chlamydien-Entwicklung kann von ihren verschiedenen Wirtszellen ausgehen. Wie die Untersuchungen von *C. pneumoniae* Stamm CV6 in verschiedenen Wirten (Abbildung 2-5) zeigen, entwickeln sich die Einschlüsse morphologisch verschieden stark und nicht in allen Fällen kommt es nach 72 h Entwicklung zur Zerstörung des Wirts, wie an den primären Zellen, den CASMC, HUVEC und PBMC gezeigt werden konnte – hier kam es spontan zur Persistenz, der chronischen Infektion. Die durchgeführten Untersuchungen an den Chlamydien in ihren verschiedenen Wirtszellen bezogen sich nun auf das für Chlamydien typische IncA Protein bzw. die gebildete mRNA und dem dazugehörigen Typ III Sekretions-System, wobei die quantitative Auswertung der mRNA die metabolische Aktivität der Bakterien widerspiegelt. Die quantitative mRNA-Untersuchung für den CV6 Stamm setzte 6 h nach der Infektion der Wirtszellen ein. In HEp-2 ohne IFN $\gamma$ -Behandlung zeigte sich eine Transkription für das IncA-Gen nach 6 h welches quantitativ zu 24 h weiter anstieg und zu den späten Zeiten von 48 h und 72 h abnahm. Im Vergleich hierzu kam

es unter dem Einfluss von IFN $\gamma$  zu einem Anstieg des IncA-Transkripts bis zu 24 h und einer auch nach 72 h erhöhten Transkription (Graphik 1). Ähnlich wie unter dem IFN $\gamma$ -Einfluss in HEp-2 verlief die mRNA Bildung in den primären Zellen. Die IncA-Bildung in primären Zellen, den HUVEC und CASMC stieg nach 6 h weiter an und blieb bis zu 72 h erhöht. Vergleicht man diese Kulturbedingungen der Bakterien in den verschiedenen Zelltypen ist die mRNA Bildung unter IFN $\gamma$  Einfluss in HEp-2 ähnlich zu der Entwicklung in den primären Zelltypen, so wie auch die morphologische Entwicklung ähnlich erscheint. Es wurden kleine dauerhafte Einschlüsse gebildet, die über längere Zeit in den Wirten leben konnten, ohne diese nach 72 h zu zerstören. Die Infektionsrate war jedoch geringer im Vergleich zu den HEp-2 Zellen ohne IFN $\gamma$  Zugabe (3.5.1). Nach der Beurteilung der mRNA-Werten lag die Vermutung nah, dass die Bakterien in den IFN $\gamma$  behandelten HEp-2 die gleiche Entwicklung durchlaufen, wie in den primären Endothel- oder Muskelzellen. Vergleicht man hierzu die infizierten PBMC zeigt sich eine geringere mRNA Menge zu Beginn und eine Steigerung zu 48 h und 72 h. Auffällig ist hier die abnehmende 16S rRNA Menge der Chlamydien in den PBMC zu 72 h. Die Vitalität bleibe zwar erhalten - diese Zellen gelten ja auch als systemische Vektoren für den Erreger im Gefäßsystem – nimmt jedoch mit der Zeit in den PBMC ab.

Untersuchungen über *C. trachomatis* zeigten eine Rolle des IncA Proteins bei der Fusion der einzelnen Einschlüsse. So ist es in stark infizierten Zellen möglich, dass die Einschlüsse miteinander fusionieren. 1,5% der klinischen *C. trachomatis* Isolate zeigten multiple nicht-fusionierende Einschlüsse und diese Isolate könnten IncA nicht exprimieren (Suchland RJ, 2000), und bilden Einschlüsse, die morphologisch an die bei Persistenz auftretenden aberranten Einschlüsse erinnern. In Abbildung ist die Entwicklung sehr vieler kleiner Einschlüsse bei *C. pneumoniae* unter IFN $\gamma$  Behandlung zu sehen, wohingegen die normale Entwicklung einen großen lysogenen Einschluss zeigt. Eine Fusion der Einschlüsse von *C. pneumoniae* ist bisher nicht beobachtet oder beschrieben worden, möglicherweise kann der Einfluss von IFN $\gamma$  eine Fusion der Einschlüsse jedoch unterbinden. Dies würde die einzelnen kleinen Einschlüsse in den HEp-2 erklären.

Nach den Ergebnissen zur Transkription des IncA Gens war die Untersuchung des IncA-Proteins von besonderem Interesse. Wird IncA auch translatiert? Der Western-Blot zur Darstellung der chlamydialen Proteine zeigte ganz im Gegensatz zu den hohen mRNA Mengen der primären Zellen eine sehr geringe Proteinbildung der primären Muskel- und Endothelzellen (CAMC/HUVEC) und einem nicht mehr nachzuweisendes Protein bei den infizierten PBMC. Im Western-Blot der CASMC zeigten sich im Marker Bereich von 83 kDa ebenfalls

Proteinbanden. In der Arbeit von Delevoye C, 2004 konnten für *C. trachomatis* und *C. caviae* multimere IncA Proteine dargestellt werden. Die Proteinbanden im 83 kDa Bereich könnten demnach ein IncA-Dimer für *C. pneumoniae* darstellen. Ebenfalls zu 48 h und 72 h wiesen die HEp-2 Zellen doppelte Proteinbanden dieser Größe auf. Doppelbanden des IncA Protein sind durch eine unterschiedliche Phosphorylierung des Proteins möglich (Delevoye C, 2004). Aufgrund der eventuell zu geringen Menge an infizierten PBMC wurden die Versuche mit größeren Zell- und Bakterienmengen wiederholt, um einen bakteriellen Proteinnachweis zu begünstigen. Eine IncA-Proteinbildung der sehr klein entwickelten Einschlüssen in den PBMC lies sich über die Methode der SDS-Page auch über größere Zellmengen und Bakterienmengen nicht nachweisen. Vergleicht man die Proteinbanden der replizierenden Bakterien aus den HEp-2 Zellen ohne IFN $\gamma$  mit denen der Primärzellen, in welchen *C. pneumoniae* nicht zu replizieren scheint, ist die Proteinmenge in den HEp-2 Zellen größer, ohne dass hohe mRNA Mengen in der quantitativen PCR angezeigt werden. Die Werte wurden in diesen Versuchsansätzen quantitativ im Vergleich zu dem Ausgangswert von 2 h errechnet, so dass es im Verlauf der Entwicklung in HEp-2 Zellen möglicherweise zu keiner großen Steigerung kommt, jedoch eine kontinuierliche Transkription vom frühen Zeitpunkt aus erfolgt. In den hier gezeigten Versuchen wird das IncA Protein in den HEp-2 nach 24 h, 48 h und 72 h gebildet.

Die Arbeitsgruppe von Prof. U. Gross aus Göttingen, die den IncA-Antikörper zur Verfügung stellte, wies das Protein erst nach 48 h und 72 h nach (Lugert R, 2004). Möglicherweise ist der frühere Nachweis des Proteins vom *C. pneumoniae* Stamm CV6 durch veränderte Kulturbedingungen und durch den Einsatz eines anderen Bakterien-Stammes (AR39 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Gross eingesetzt) bedingt. Der hier eingesetzte CV 6 Stamm ist ein bekanntermaßen zur vaskulären Persistenz fähiges Isolat. Ähnlich scheint die Entwicklung bei den IFN $\gamma$  behandelten HEp-2 Zellen und den PBMC zu sein. Das IncA Protein ist in beiden Zelltypen nicht mehr deutlich nachzuweisen. Die Entwicklung der Chlamydien ist demnach unter diesen Bedingungen stark beeinträchtigt, wobei die Überlebensrate über 72 h in den PBMC ungünstiger ist als unter IFN $\gamma$ -Einfluss in HEp-2 Zellen. Die verschiedenen Wirtszellen können demnach die Entwicklung der Einschlussmembran und damit die Entwicklung von *C. pneumoniae* stark beeinflussen und hemmen. Das IncA Protein wird im replizierenden Zyklus auch außerhalb der eigenen Wirtszelle transportiert. Experimente von Suchland RJ, 2005 zeigten deutliche Färbungen über fluoreszierende Ak gegen das IncA Protein, wie dieses zu Nachbarzellen gelangt. Es gilt als möglicher Pathogenitätsfaktor, ein klarer Einfluss des

Proteins auf die Nachbarzellen konnte jedoch noch nicht geklärt werden. Bekannt ist der IncA-Proteintransport über den Typ III Sekretions-Apparat (Subtil A, 2001). Das Transportsystem ermöglicht eine Interaktion zwischen Parasit und Wirtszelle (Hsia R, 1997). Es ist typisch für gram-negative Bakterien und ermöglicht eine Sekretion und Injektion spezifischer Proteine in das Zytoplasma der eukaryotischen Wirtszelle (Hueck CJ, 1998). Weitere Effektorproteine aus der Yop-Familie werden über dieses Transportsystem in die Wirtszelle übertragen und sind sowohl bei Chlamydien, als auch bei anderen Bakterien wie *Shigella* und *Yersinia* bekannt. Das Transport System wurde besonders an den *Yersinia* und *Shigella* untersucht. Effektorproteine von *Yersinia* das YopH und bei *Salmonella* SptP sind z. B. Tyrosin Phosphatasen, sie können intrazelluläre Wirtsproteine dephosphorylieren, was zur Inhibierung der Phagozytose-Aktivität führt (Kaniga K, 1996). Weitere Proteine, wie Yop- und Sop-Proteine von z. B. *Salmonella typhimurium*, können ebenfalls ins Zytoplasma ihrer Wirtszellen gelangen und hierdurch die Zellen aktiv beeinflussen (Lee CA, 1997). All diesen Pathogenitätsfaktoren ist der Transportweg über das Typ III-System der Bakterien gemeinsam.

Die mRNA von zwei essentiellen Genen des Typ III System wurde daher stellvertretend für das Gesamtsystem parallel zum IncA untersucht, um einen möglichen Aufschluss über die Aktivität des Transportes zu erhalten. Es ist bekannt, dass viele bakterielle Proteine ausserhalb des Bakteriums wirken. Extrazelluläre Proteine spielen oft eine wichtige Rolle für die bakterielle Virulenz, da sie direkt mit den Wirtsfaktoren interagieren können. In Gram-negativen Bakterien gibt es verschiedene Mechanismen, die es erlauben die Proteine der Bakterien vom Ort der Synthese im Zytoplasma durch das Bakterienzell-Envelope und zur eukaryotischen Membran zu transportieren (Hueck C, 1998). Ein Sec-unabhängiger Transportweg ist das Typ III-System. Es wird aus mehr als 20 verschiedenen Ysc/Lcr Proteinen aufgebaut, die einen Sekretionskanal durch das Bakterienzell-Envelope bilden. Untersucht wurde dieses Transportsystem vor allem bei *Yersinia* und *Shigella* (Mota LJ, 2005 / Journet L, 2003). Spezifische Amino-terminale-Zielsequenzen binden an das Sekretionsprotein Yop und werden durch den Ysc/Lcr Sekretionskanal des Typ III-Systems transportiert, ohne dass die notwendige Aminosequenz von dem transportierten Protein entfernt werden muss, wie es bei Sec-abhängigen Transporten vorkommt (Lee CA, 1997).

Herangezogen wurden für die Teiluntersuchung des Transportsystems bei *C. pneumoniae* die Gene YscN und LcrD. Das LcrD Protein ist wesentlich am Aufbau des Transportkanals durch die innere Membran beteiligt. Das YscN Protein bildet einen Teil der Injektionsnadel des Typ III Sekretion-Apparates.

Die in PBMC kultivierten Chlamydien weisen keine IncA-Proteinsynthese auf, wohl aber mRNA-Synthese. Zugleich ist das Transportsystem auf Basis der mRNA-Analysen zu Beginn (6 h und 24 h) nicht exprimiert und zu den 48 h und 72 h Zeitpunkten nur leicht ausgebildet. Sehr ähnlich verhalten sich die Bakterien unter der IFN $\gamma$  Behandlung. Die mRNA des LcrD Gens (Bildung des Kanals des Typ III Systems) erscheint in den PBMC höher exprimiert als unter der Behandlung mit IFN $\gamma$  in den HEp-2. Die primären Endothel- und Muskelzellen weisen dementsprechend höhere Mengen an YscN und LcrD auf, was auf eine bessere Entwicklung des Typ III Sekretions-Apparates hindeutet. Demnach weisen die mRNA Mengen der PBMC und HEp-2 unter IFN $\gamma$  eine ähnliche Situation auf. Um einen besseren Aufschluss über die Situation der Chlamydien zu erhalten, wäre der Proteinnachweis aller Komponenten des Typ III Systems in weiteren Studien von Interesse, um die Translation unter den verschiedenen Lebensbedingungen der Bakterien zu vergleichen und eine mögliche Parallele zur Translation des IncA-Proteins zu untersuchen. Möglicherweise wird in den PBMC und IFN $\gamma$  behandelten HEp-2 Zellen die Translation ebenfalls gehemmt, wie für das IncA Protein gezeigt werden konnte. Weitere Proteine um die Aktivität des Transportsystems zu untersuchen, sind die Effektorproteine oder Yop-Proteine. Am Beispiel von *Yersinia* und *Shigella* konnte gezeigt werden, dass einige Proteine post-translational durch den Kontakt mit Wirtsfaktoren reguliert werden können. So ist bekannt, dass einige Yop-Proteine bis zum Kontakt mit dem Bakterium assoziiert bleiben und erst hiernach abgegeben werden (Watarai M, 1995). Weitere Proteine der Yop-Familie können die Protein Sekretion regulieren, wie z. B. die YopN (LcrE) und LcrG. Sie befinden sich auf der Oberfläche von *Yersinia*, können auch selbst sezerniert werden und nach Kontakt mit Wirtsfaktoren den Type III-Sekretions-Kanal öffnen (Straley SC, 1993). Diese einzelnen Funktionen der Proteine des Transportsystems aber auch der transportierten Proteine könnten auch bei *C. pneumoniae* einen Hinweis auf die Aktivität in der verschiedenen Zellen wiedergeben.

Die Untersuchung des bakteriellen Proteins IncA lässt sich in den verschiedenen Zelltypen nicht standardisieren. Die Proteine der Chlamydien werden durch die IFN $\gamma$  Behandlung und durch die verschiedenen Wirte beeinflusst. Ein Protein, welches sowohl in den EB als auch in den RB vorkommt, wie das MOMP (Major Outer Membrane Protein), könnte vermeintlich als Standard angegeben werden. MOMP wird jedoch unter dem Einfluss von IFN $\gamma$  hochreguliert und kann daher auch nicht als Standard eingesetzt werden (Molestina RE, 2002). Auch weitere Proteine der Bakterien variieren stark während des Entwicklungszyklus der Bakterien (Newhall und Jones, 1983 / Hatch, 1984). Ein weiterer Hinweis auf die gestörte Entwicklung der CV6

Chlamydien wird auch durch die Untersuchung der Infektiösität der in CASMC kultivierten Bakterien aufgezeigt (3.2). Die mit *C. pneumoniae* infizierten CASMC wurden nach 3-4 Tagen zerschlagen und auf HEp-2 Zellen übertragen, um wie bei der Chlamydien-Anzucht die Infektionsfähigkeit zu überprüfen. Das Ergebnis zeigte keine deutlichen Infektionen in den HEp-2 Zellen. Die Versuche wurden nur einmal wiederholt und können somit nur einen Hinweis auf die geringe Infektiösität der Bakterien im Persistenzzustand zeigen. Es wird jedoch deutlich wie stark vermindert die Differenzierung zu den infektiösen Einheiten, den EB, ist und dass sich diese verminderte Entwicklung wahrscheinlich nicht nur auf die verminderte Ausbildung des IncA Proteins beschränkt. Generell lässt sich der Persistenzzustand unter den artifiziellen Bedingungen der Zellkultur nur schwer wieder in den replikativen Zustand überführen.

Eine weitere Möglichkeit die veränderte Chlamydien-Entwicklung zu analysieren, lag in der Betrachtung der Einschlüsse in den verschiedenen Zelltypen und dem dort auftretenden pH-Wert. Über die konfokale Mikroskopie und den Einsatz pH-abhängiger Farbstoffe (3.12) wurden die Einschlüsse des CV6 Stammes nach 48 h in HEp-2 und CASMC miteinander verglichen. Die Untersuchungen zeigten deutlich geringere pH-Werte in den Einschlüssen innerhalb der primären CASMC (Muskelzellen), was eine schlechtere Entwicklung der CV6 erklären könnte. Zusätzlich kann dieser niedrigere pH-Wert bedeuten, dass es den Bakterien nicht möglich ist, die Fusion der Lysosomen mit den Chlamydien-Einschlüssen ganz zu unterbinden, wie dies in HEp-2 beobachtet wurde (Al-Younes HM, 1999). Die pH-Wert-Änderung könnte mit der fehlenden Wirksamkeit auf persistierende Chlamydien zusammenhängen, da Antibiotika-Wirkung pH-abhängig sein kann.

### 4.1.3 IDO und chlamydiale Persistenz

Durch die Einwirkung von IFN $\gamma$  konnten die Chlamydien auch in den HEp-2 Zellen in einer persistierenden Lebensform gehalten werden und hiermit die mRNA Synthese der Chlamydien in der gleichen Wirtszellart miteinander verglichen werden. Die IFN $\gamma$  Zugabe kann auf verschiedene Arten wirken. Zum Teil lässt sich die Beeinflussung, nach dem aktuellen Erkenntnisstand auf eine Depletierung der AMS L-Tryptophan zurückführen. Wie die Ergebnisse zur IDO-Messung (3.11) zeigen, lässt sich die IDO-Aktivität der HEp-2 Zellen und der damit verbundene L-Tryptophan-Abbau stark über die IFN $\gamma$ -Zugabe steigern. Im Kulturüberstand lässt sich dies an der gesteigerten Menge von L-Kynurenin nachweisen, ein

Zwischenprodukt des L-Tryptophan Abbaues. Der initiierende und Rate-limitierende Faktor im L-Tryptophan-Abbau ist die oxidative Spaltung des Pyrrolringes zu N-formyl-L-Kynurenin, die durch Tryptophan 2,3-Dioxygenase oder Indolamine 2,3-Dioxygenase (IDO) katalysiert wird. Der weitere Abbau erfolgt über Zwischenprodukte wie L-Kynurenin, Kynureninsäure und Anthranilic Säure bis zu den Endprodukten Picolinic Säure, Kohlendioxid, NAD und Quinolinic Säure. In den hier durchgeführten Versuchen wurden sehr hohe L-Tryptophan-Konzentrationen und IFN $\gamma$ -Mengen eingesetzt, was den natürlichen Gegebenheiten nicht entspricht, jedoch die mögliche Beeinflussung der Zellen wiedergibt. Eine natürliche L-Tryptophan Menge liegt z. B. bei den Erythrozyten im menschlichen Körper bei 1  $\mu\text{mol/kg}$  (Wissenschaftl. Tabellen, 1979). Die im Kulturmedium (RPMI) eingesetzte Menge von 20  $\mu\text{mol/L}$  liegt näher am physiologischen Wert als in den IDO-Versuchen. Die in den HEp-2 Zellkultur-Versuchen verwendeten Mengen an IFN $\gamma$  wurden über verschiedene Konzentrationen getestet, wobei die L-Tryptophan Menge im Kulturmedium 20  $\mu\text{mol/L}$  nicht überschreiten durfte, da die eingesetzten 60 U/ml IFN $\gamma$  den AMS Abbau der Zellen nicht so stark steigern konnte wie in den IDO-Versuchen. Bei einer höheren L-Tryptophan Menge für die IFN $\gamma$  Ansätze reichte die Konzentration der AMS für 72 h der Bakterienkultivierung aus, ohne eine Persistenz hervorzurufen. Die Messung der IDO von Endothelzellen ist schwieriger, da die Zellen das Zwischenprodukt L-Kynurenin schon innerhalb von 5 h weiter zur Kynureninsäure abbauen (Stazka J, 2002). Ein möglicher Grund der Persistenz in diesen Zellen könnte auch der schnelle Abbau des L-Tryptophan in den Wirtszellen sein, wodurch *C. pneumoniae* nur eine mangelhafte Versorgung erhält. Da *C. pneumoniae* von dieser Wirtszell-Aminosäure abhängig ist, kommt es zu einem verminderten Wachstum, bzw. zur Persistenz. Diese Folgen der IFN $\gamma$ -Behandlung konnte auch bei HSV-2 (Herpes simplex Virus-2) in HeLa Zellen gezeigt werden. Bei diesen Untersuchungen konnte die inhibierende Wirkung des IFN $\gamma$  ebenfalls durch eine erhöhte L-Tryptophan-Menge aufgehoben werden (Adams O, 2004), was den Effekt über den L-Tryptophan-Abbau beweist. Zusätzlich hat auch das Zwischenprodukt des IDO vermittelten L-Tryptophan-Abbaues die Quinolinic Säure, eine antivirale Wirkung (MacKenzie CR, 1999), was möglicherweise auch auf die intrazellulär lebenden Chlamydien zutrifft. Eine Mangelversorgung an anderen Mineralstoffen oder AMS kann bei *C. pneumoniae* ebenfalls die Replikation unterbinden. So kann auch ein Mangel an Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) oder anderen Aminosäuren einen persistenten Status der *C. pneumoniae* verursachen (Wehrl W, 2004). Nach diesen Untersuchungen lassen sich verschiedene Ursachen für eine Persistenz von *C. pneumoniae* aufzählen. Eine mögliche Ursache kann der geringere pH-Wert in den Wirtszellen sein, ebenso wie auch das geringe L-Tryptophan Angebot infolge eines beschleunigten

Abbaues und der damit erhöhten Menge an toxischen Zwischenprodukten, wie der Quinolinic Säure. Eine Folge dieser veränderten Lebensbedingung kann sowohl die verminderte Translation des IncA Proteins sein, als auch die insgesamt verminderte Reorganisation zu den infektiösen EB. Dies kann auch die verminderten Infektiösität (3.2) der Bakterien nach einer Kultivierung in primären Zellen wie den CASMC erklären.

#### **4.2 Assoziation der *C. pneumoniae* Infektion mit Atherosklerose**

Die *C. pneumoniae* Infektion hat ihrerseits auch Einfluss auf die jeweilige Wirtszelle. Die typischen Infektionen mit *C. pneumoniae* befinden sich in der Lunge und dem oberen Respirationstrakt (Grayston JT, 1992) und verlaufen meist bei immunkompetenten Menschen auch ohne medizinische Behandlung mild. In selteneren Fällen kommt es trotz Behandlungen zu langwierigen chronischen Erkrankungen. *In vitro* Untersuchungen an immortalisierten Lungenepithelzellen (A549) wiesen starke inflammatorische Reaktionen nach *C. pneumoniae*-Infektion auf. Es lassen sich dann Interleukine wie IL-8 und TNF- $\alpha$  über RT-PCR nachweisen (Yang J, 2003). Weitere, pathogenetisch schwerer einzuordnende Fundorte von *C. pneumoniae* stellen die atherosklerotischen Läsionen in menschlichen Gefäßen dar (Campbell LA, 1998 / Taylor-Robinson D, 1998). Atherosklerose (Ath.) ist der Hauptgrund für Erkrankungen und Tod in der westlichen Welt (Murray DJL, 1997). Als Hauptkomponenten für Induktion und Fortschreiten der Ath. werden chronische fibroproliferative Stimulationen, Inflammation und oxidative Schäden des endothelialen Monolayers der Arterien im Verlauf der Erkrankung gesehen (Ross R, 1998). Frühe Ereignisse in der Entwicklung von Ath. einschließlich der Aktivierung des Endothels („endotheliale Dysregulation“) können durch zahlreiche Risikofaktoren ausgelöst werden. Bekannte Faktoren sind z. B. Rauchen, Hyperglykämie, Hypercholesterolämie, genetische Anlagen und eventuell eben auch pathogene Mikroorganismen (Campbell LA, 2004). Ein möglicher Weg, wie *C. pneumoniae* zur Arterie gelangt und hier die Entwicklung der Ath. beeinflusst oder fördert, beginnt mit der Infektion von Alveolarmakrophagen in der Lunge des Menschen, die in das lymphoepitheliale Gewebe der Lunge wandern. Blutmonozyten werden dann infiziert und zirkulieren im Körper des Menschen. Die Bakterien können in den infizierten Makrophagen eine verstärkte Neigung zur endothelialen Adhäsion hervorrufen, wohl bedingt durch die erhöhte Expression von  $\beta$ 2-Integrin auf der Oberfläche der Makrophagen. Dies ermöglicht eine leichtere Anlagerung an das Endothelium der Gefäße (Kalayoglu MV, 2001) und in der Folge eine transendotheliale Migration in das Gefäß. Die Interaktion der infizierten Monozyten/Makrophagen mit den

Gefäßmuskel- und Endothelzellen eröffnet die Möglichkeit der Übertragung der Infektion auf die permanent gefäßwandständigen Zellpopulationen.

In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass es in infizierten Endothelzellen zur erhöhten Expressionen der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, P-Selektin und weiteren kommt, welche die Leukozyten-Adhärenz an Endothel und die Migration in die Intima erhöhen (Kaukoranta-Tolvanen SS, 1996 / Coombes BK, 2001). Die Infektion der endothelialen Zellen kann ebenfalls die Gefäßmuskelzell-Proliferation steigern, vermittelt durch die Induktion des platelet-derived growth factor (PDGF). PDGF wirkt stark mitogen (Coombes BK, 2002). Zusätzlich kommt es durch die Infektion von Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen zur Bildung von proinflammatorischen Chemokinen wie IL-8 und IL-6 (Dechend R, 1999). *C. pneumoniae* konnte ebenfalls in Schaumzellen der Ath.-Läsionen gefunden werden. Schaumzellen sind Makrophagen, die mit Fetttropfen beladen sind und hierdurch eine schaumartige Erscheinung haben. In der Intima nehmen die Makrophagen oxidiertes Low-density Lipoprotein (LDL) auf und werden in die arterielle Matrix eingebaut, wo sie zu Schaumzellen transformiert werden. Ist nun LDL in der Intima vorhanden, kann *C. pneumoniae* die Schaumzell-Formation und Oxidation von LDL zusätzlich induzieren (Kalayoglu MV, 1998). Auch die Schaumzellen können durch das Bakterium zur proinflammatorischen Zytokinbildung aktiviert werden und die Bakterien können in ihnen überleben (Blessing E. 2002). Eine wichtige Folge der Infektion ist die Produktion von Matrix Metalloproteinasen (MMP), welche zu einer Plaque-Destabilisierung führen kann (Choi EY, 2002) sowie die Tissue-Faktor-1 (TF-1) Produktion, die zu prokoagulatorischer Aktivität führt (Bea F, 2003). Vor allem *in vitro* Untersuchungen an primären Endothelzellen und Muskelzellen, die für den Gefäßwandaufbau relevant sind, zeigten sich deutliche Hinweise auf die Beeinflussung der Wirtszell-Genexpression. Die vaskulären *C. pneumoniae* Stämme konnten die proinflammatorische und prokoagulatorische mRNA Synthesen stark beeinflussen (Rupp J, 2005A).

Die Abläufe der Reaktionen der Wirtszellen aufgrund einer *C. pneumoniae* Infektion hat man zum Teil klären können. Ob die Gegenwart im Gewebsverband oder nur die direkte Infektion mit den Bakterien eine veränderte Genexpression verursacht, ist nicht ganz geklärt. So nimmt man an, dass auch Nachbarzellen von *C. pneumoniae* infizierten Zellen durch Mediator-

Wirkung beeinflusst werden. Die Untersuchungen zu dieser Arbeit zeigten auch einen Einfluss, wenn auch gering ausgeprägt, der toten Chlamydien (CV6) auf die Wirtsgewebe, z. B. durch die Wirkung des LPS. Die Signalkaskade wird möglicherweise über TLR 2/4 in der Wirtszelle gestartet, was jedoch nicht vollständig geklärt ist. Die nächsten Signale in vaskulären Zellen erfolgen über die Aktivierung von GTPasen (Dechend R, 1999). GTPasen können nach ihrer Aktivierung auf die sogenannten MAP-Kinasen wie ERK 1/2 wirken, wodurch der Signalweg für eine erhöhte Proliferation in Gang gesetzt wird. Es kommt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Egr-1 und Ets-1. Die Proteine der Transkriptionsfaktoren werden in den Zellkern transportiert und lösen die vermehrte Transkription von VEGF und Endothelin aus, wodurch aufgrund der Mediator-Wirkung eine erhöhte Zellteilung, Migration und Zytokinbildung gestartet wird. Die gesteigerte Proliferation ist auch ein typischer Verlauf in der Ath.-Entwicklung. Ebenfalls über die GTPasen kann die MAP-Kinase p38 aktiviert werden. Über diese Aktivierung kann der Signalweg über den Transkriptionsfaktor NFκB gestartet werden. NFκB ist in der Lage proinflammatorische Zytokine, wie IL-6, IL-8 und das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) zu aktivieren (Rupp J, 2005). Es kommt hierdurch zu einer erhöhten Chemotaxis der Monozyten zu dem Ort der Läsionen und zu einer T-Zell Stimulation. NFκB kann ebenfalls den prokoagulatorischen Signalweg über die Aktivierung von TF-1 und PAI-1 initiieren (Rupp J, 2005). Ein weiterer Signalweg führt zur Aktivierung von VCAM-1 und ICAM-1 und zu einer erhöhten Leukozyten Adhäsion und Transmigration zu dem Infektionsort der Läsionen. All diese durch Chlamydien *in vitro* beschriebenen pathologischen Veränderungen der Signaltransduktion sind auch gleichzeitig bekannte Charakteristika der Pathogenese der Atherosklerose.

### **4.2.1 Einfluss der Chlamydien-Infektion auf Aortenhomogenisate im *ex vivo* Modell**

Im Bezug auf die Entwicklung und Förderung der Atherosklerose wurde die Genexpression in dieser Arbeit während der Infektion mit dem CV6 Stamm an Mauseorten untersucht. Um der natürlichen Erkrankung näher zu kommen, wurden die Experimente erstmals *ex vivo* an lebenden Aortengeweben von Mäusen durchgeführt. Diese Untersuchungen an lebenden Geweben sollten der physiologischen Situation im Patienten möglichst nahe kommen und die Reaktion eines natürlichen Gewebeverbandes darstellen. Die infizierten Gewebe wurden mit nicht infizierten Geweben, die unter den gleichen Kulturbedingungen gehalten wurden, verglichen. Die *C. pneumoniae*-Infektion konnte in den Aortenringen nach Inkubation mit Hilfe der immunhistologischen Färbungen gegen Chlamydien-LPS mikroskopisch nachgewiesen

werden (Abbildung 11). Der Einsatz der Laser Capture Microdissection (LCM) ermöglichte es, in dem infizierten Gewebeverband des Aortenrings die infizierten Zelltypen (Endothel bzw. glatte Muskelzellen) separat auf ihre mRNA-Expression zu analysieren. Die Gewebsschnitte wurden hierfür mit FITC-markierten LPS-Antikörpern gefärbt. Über die LCM wurden die Endothelzellen und Muskelzellen des Aortenringes getrennt voneinander ausgeschnitten und die mRNA Synthese über die quantitative PCR untersucht. Voruntersuchungen an homogenisierten Aortenringen (3.13) mit allen verschiedenen Zelltypen dienten dazu, einen allgemeinen Effekt der Infektion darzustellen und erfolgversprechende Zielgene für die LCM-basierte Expressionsanalyse auszuwählen. Die Effekte waren deutlich sowohl für die proinflammatorischen Gene IL-6 und IL-8 als auch für die prokoagulatorischen Gene TF-1 und PAI-1 zu erkennen. IL-8 zeigte nach 24 h eine 4fache und nach 48 h eine 2fache mRNA Erhöhung. Die IL-6 mRNA stieg nach 48 h auf das 5fache an im Vergleich zu den nicht-infizierten Geweben. Von den prokoagulatorischen Genen zeigte vor allem der TF-1 einen starken Anstieg zu 24 h und etwas geringer zu 48 h. PAI-1 wies nur zu dem späten Zeitpunkt von 48 h eine leichte Erhöhung der mRNA-Synthese auf. Nach diesen Untersuchungen ist in den Homogenisaten der Mäuseaorten eine deutliche Beeinflussung der Wirtszell-Genexpression durch die Chlamydien Infektion zu erkennen. Prokoagulatorische und proinflammatorische Gene zeigten eine erhöhte mRNA-Expression. Um die Notwendigkeit lebender *C. pneumoniae* bei diesem Effekt zu klären, wurden zum Vergleich Aortengewebe mit hitzeinaktivierten CV6 Chlamydien kultiviert. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls eine Beeinflussung der mRNA-Synthese an den Geweben, jedoch weit geringer als bei den Infektionen mit lebenden Chlamydien. Vor allem das IL-6 Gen zeigte eine erhöhte mRNA Bildung, was unter anderen auch auf das vorhandene LPS oder dem HSP 60 (Kol A, 1999 / Rupp J, 2005A) zurückgeführt werden kann. Festzuhalten bleibt, dass für eine stark ausgeprägte Induktion der pro-atherosklerotischen Gene lebendige Chlamydien notwendig sind.

#### **4.2.2 Gezielte Untersuchung der vaskulären Infektionsherde mittels LCM**

Um die Wirkung der Chlamydien-Infektion gezielt zu betrachten, wurde die LCM durchgeführt. Die Analysen wurden unter mikroskopischer Sichtkontrolle durchgeführt, um die Infektionsherde im Endothel- oder Muskelgewebe gezielt auszuschneiden. Die Muskelzell-Gewebssverbände zeigten ein ähnliches Bild wie bei den Homogenisaten. Die Muskelzellen wiesen zu 24 h eine Erhöhung aller mRNA-Werte auf mit Ausnahme des PAI-1 Gens. Die 48 h

Auswertung wies hauptsächlich im Bereich der proinflammatorischen Gene eine erhöhte Synthese auf. Von den prokoagulatorischen Faktoren zeigte TF-1 einen Anstieg, jedoch nicht PAI-1. Es war demnach anzunehmen, dass die erhöhten mRNA-Werte des PAI-1 von den infizierten Endothelzellen stammen müssten. Diese Zellen sind durch ihre Lokalisierung als Gefäßauskleidung der *C. pneumoniae* Infektion stärker ausgesetzt. Die immunhistologischen Färbungen gegen Chlamydien-LPS in Abbildung **Abbildung 11** zeigten deutlich die Anfärbungen der Infektionsherde im Endothel und auch im Fettgewebe, das die Aorta umgibt. Die Infektion des Fettgewebes im *ex vivo* Model ist auffällig stark ausgeprägt, ein überraschender Nebenbefund.

Wie in *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt werden konnte, kann es durch eine Chlamydien-Infektion zu starken Veränderungen und Steigerungen der Wirtszell-Genexpression kommen (Rupp J, 2005 / Schumacher A, 2005). Die Ergebnisse der LCM an Mäusearten wiesen eine geringere Beeinflussung der Endothelzellen auf die proinflammatorischen Gene und eine erhöhte Transkription des PAI-1 auf. Die mRNA-Synthese des Endothels zeigte eine Steigerung der IL-6 und PAI-1 mRNA um das 6fache im Vergleich zu den Negativkontrollen zu 24 h. Die Gene IL-6 und TF-1 wiesen vor allem zu den 48 h Zeitpunkten eine gesteigerte mRNA Synthese auf. Die deutlich stärkere Beeinflussung des TF-1 zu 24 h und die Erhöhung des PAI-1 zu dem 48 h Zeitpunkt in den Gewebshomogenisaten lässt sich in dieser Form nicht in den separat untersuchten Gewebeproben finden. Vor allem der PAI-1 mRNA-Wert zu 48 h scheint nach diesen Untersuchungen nicht vornehmlich an den Endothel- und Muskelzellen zu liegen, zumindest nicht in unmittelbarer Nähe des Infektionsherdes. Die Infektion der Gewebe erfolgte sowohl bei den Homogenisaten als auch bei den LCM Präparaten in gleicher Weise. In den gefärbten Gewebsschnitten wird deutlich, dass viele Bakterien bzw. das LPS im Bereich des Endothels und des Fettgewebes verbleiben. Die isolierte Untersuchung des Fettgewebes über LCM um die mögliche Beeinflussung der dortigen Transkriptionsregulation durch die Infektion zu klären, wäre nach diesen Ergebnissen von erheblichem Interesse. Es ist nämlich bekannt dass es bei Atherosklerose immer zu einer begleitenden Inflammation im perivaskulären Fettgewebe kommt, deren Ursache bisher unerklärt ist. Es konnte über das *ex vivo* Model mit *C. pneumoniae*-infizierten Mäusearten eine deutliche Steigerung der mRNA für proinflammatorische Faktoren wie IL-6 und IL-8 gezeigt werden, eine erhöhte mRNA-Expression des prokoagulatorischen TF-1 in Muskel- und Endothelzellen und eine teilweise erhöhte Synthese des PAI-1.

Die Analyse verschiedener Gewebsmengen (3.3) über die LCM-Methode zeigte zusätzlich die Grenzen der quantitativen Untersuchung nach LCM-basierter Gewinnung auf. Vor allem durch die lange Vorbereitungszeit der Gewebe, durch die Anfertigung von Gefrierschnitten und Anfärbung der infizierten Bereiche der Aortenringe, ist zu befürchten, dass ein Teil der mRNA schon vor der Untersuchung degradiert wird und nicht mehr nachzuweisen ist. Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurden die Färbungen mit FITC-markierten Chlamydien-LPS-Antikörpern zur Definition der Infektionsherde deshalb nur für kurze Zeiten (wenige Minuten) durchgeführt. Ein weiteres Problem stellt die lange Kultivierungszeit im *ex vivo* Model bei 37°C zur Infektion der Gewebe dar. Diese Schritte können zu einem RNA-Verlust führen und erfordern einen erhöhten Mengeneinsatz der Gewebe. Letztlich mussten ca. 25 einzelne Infektionsherde mit umliegendem Gewebeverband ausgeschnitten werden, um eine ausreichende Sensitivität der quantitativen mRNA-Analyse zu gewährleisten. Eine Möglichkeit die Zeit der Probennahme durch die LCM zu verkürzen besteht theoretisch in dem Einsatz eines zusätzlichen Amplifikationsschrittes. Hierfür können sehr geringe Gewebsmengen, bis hin zur Einzelzelle eingesetzt werden und Zielsequenzen amplifiziert werden. Im Anschluss wird die PCR zur Auswertung eingesetzt (Toellner KM, 1996). Dieses Verfahren kann zum Nachweis definierter Gene eingesetzt werden. Der quantitative Nachweis könnte jedoch verfälscht werden und eine erhöhte mRNA-Menge vortäuschen, weswegen auf dieses Verfahren hier verzichtet wurde.

Der Einsatz der *ex vivo* Methode zur Infektion der Gewebe kann durch die lange Inkubation zum Verlust von mRNA führen. Eine bessere mRNA-Ausbeute kann durch den Einsatz von frischen Geweben erzielt werden. Die Infektion muss im Tiermodell erfolgen und die Gewebe direkt nach der Entnahme für weitere Analysen eingesetzt werden. Für diese Untersuchungen zeigte sich das Mausmodell als nicht unproblematisch, da die nasale Infektion in Mäusen (im Gegensatz zum Kaninchen) keine gute Streuung über die Lunge in das Gefäßsystem zur Folge hat (persönliche Mitteilung Prof. Maass). Eine Möglichkeit besteht in der Infektion über die Schwanzvene oder peritoneal. An genetisch intakten Mäusen kommt es zwar zur chronischen vaskulären Infektion, die Herde sind jedoch nur vereinzelt und daher schwer zu finden. Die Vermutung, dass *C. pneumoniae* präferentiell kleine bereits vorhandene Läsionen in den Gefäßen besiedelt, da infizierte Monozyten über Adhäsionsmoleküle zu diesen Orten gelockt werden (Stary HC, 1994), kann weitere Ansätze für *in vivo* Versuche aufzeigen. Der Einsatz von einer Fettdiät bei Mäusen kann die Bildung der Atherosklerose fördern und hiermit vermutlich auch die Besiedlung durch Chlamydien. Desweiteren kann der Einsatz von ApoE<sup>-/-</sup>

Mäusen, die eine gestörte LDL-Aufnahme der Leber haben und dadurch eine spontane Atherosklerose entwickeln (de Kruif MD, 2004) oder LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup> Mäusen, die unter dem Einfluss fettreicher Ernährung Läsionen entwickeln, die Besiedlung von Chlamydien in den Läsionen in der kurzen Lebensdauer der Mäuse fördern. Erste Untersuchungen an diesen Mäusen zeigten vermehrte Ansammlungen der Chlamydien in den Läsionen, mit einer erhöhten inflammatorischen Reaktion am Infektionsort, von dem die Chlamydien auch wieder isoliert und kultiviert werden konnten (Campbell LA, 2000). Ein Mausmodell mit gut infizierten Gefäßen könnte ebenfalls zur dringend benötigten Klärung der Behandlungsmöglichkeiten mittels Medikamenten dienen, da die Antibiotika-Behandlung persistent lebender *C. pneumoniae* bisher nicht möglich ist. So zeigten *in vitro* Untersuchungen an *C. pneumoniae*-infizierten Monozyten keine Eradikation der Bakterien durch Antibiotika wie Azithromycin und Rifampin (Gieffers J, 2001). Eingesetzt wurden Antibiotika-Konzentrationen, die bei Therapie gegen *C. pneumoniae* in Fibroblasten Erfolg zeigten. In den infizierten Monozyten konnten die Chlamydien über längere Zeit über die quantitative PCR als lebende Organismen detektiert werden. Tatsächlich kann man serologisch in fast 80% der kardiovaskulär erkrankten Patienten einen stattgefundenen Kontakt zu *C. pneumoniae* nachweisen. Studien mit einer einmonatigen Antibiotika-Behandlung (z. B. Roxithromycin) an Patienten zeigten eine statistisch signifikante Reduzierung der Angina pectoris und dem Tod der Patienten in den ersten Monaten, was sich nach 6 Monaten jedoch wieder anglich (Gurfinkel E, 1999). Eine kurzzeitige Antibiotika-Behandlung gegen Atherosklerose hat demnach keinen Erfolg. Viele der Untersuchungen weisen auf den pathogenetischen Zusammenhang von Atherosklerose und *C. pneumoniae* hin, eine erfolgreiche Behandlung gegen die Chlamydien-Infektion in vaskulären Geweben hat man bis heute aber noch nicht gefunden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gezielte Untersuchung vaskulärer Infektionsherde mittels LCM die Möglichkeit bietet, einzelne Gewebstypen aus einem Verband isoliert zu analysieren und gezielt die Orte der *C. pneumoniae* Infektion differenziert auf ihre Genexpression zu analysieren. Die Bakterien passen sich ihren verschiedenen möglichen Wirtszellen an bzw. werden von diesen erheblich beeinflusst. Die veränderten Lebensbedingungen der Bakterien äußern sich in einer veränderten morphologischen Erscheinung, die als Persistenz bezeichnet wird. Die Transkription des IncA Gens und des Typ III Sekretions-Apparates zeigen in der Persistenz eine erhöhte mRNA-Synthese für IncA und eine verringerte mRNA-Synthese für das Typ-III System. Es kommt aber letztlich aufgrund

einer Translationsblockade zur verminderten Synthese des IncA-Proteins in der Persistenz. Die veränderte Entwicklung der Chlamydien in der Persistenz resultiert einerseits in einer Schutzfunktion gegenüber Antibiotika, andererseits bedeutet sie für die Chlamydien aber auch die zumindest zeitweise Einstellung der Replikation.

## 5 Zusammenfassung

*Chlamydia pneumoniae* ist ein obligat intrazelluläres gram-negatives Bakterium, das akute respiratorische Erkrankungen verursacht, aber auch aus atherosklerotischen Gefäßläsionen isoliert werden konnte. Die Assoziation zum chronisch-inflammatorischen Krankheitsbild der Atherosklerose hat zu zahlreichen Studien geführt, die die systemische Dissemination über zirkulierende Blutmonozyten und einen möglichen chlamydialen Einfluß auf die Pathogenese der Atherosklerose aufwiesen. Als Schlüssel zur Pathogenese der Chlamydien-Infektion und ihrer Beteiligung an der Atherosklerose gilt der Persistenzstatus, eine nicht-replikative intrazellulär überdauernde Zustandsform, deren Charakterisierung auch im Mittelpunkt dieser Arbeit steht. Einerseits wurde die bakterielle Genexpression anhand pathogenetisch wichtiger Zielgene charakterisiert, auf der anderen Seite die Erreger-bedingte Modulation der vaskulären Genexpression. Um möglichst nahe am physiologischen System zu bleiben, wurden hierzu primäre humane Gefäßzellen benutzt. Zudem wurde für die Infektion im vaskulären Gewebsverband mit dem murinen Aortenring ein *ex vivo* Infektionsmodell etabliert, in dem die dysregulierte vaskuläre Genexpression erstmals mittels Laser Capture Microdissection (LCM) mikroskopisch kontrolliert in Projektion auf den Infektionsort untersucht werden konnte

Die morphologische Erscheinungsform von *C. pneumoniae* variiert in unterschiedlichen Wirtszelle und wurde daher näher charakterisiert. In epitheliale Lungengewebe replizieren die Bakterien in großen Einschlüssen, die die Wirtszelle zerstören, was der akuten Infektion entspricht. In vaskulären Endothel- und Muskelzellen entstanden spontan kleine aberrante Einschlüsse, in denen die Erreger ohne Zellyse überdauerten - ein Hinweis auf chronische Infektion. Entsprechende persistente Einschlüsse lassen sich im Epithel durch IFN $\gamma$  induzieren. Mit einer Farbstoffbasierten intrazellulären pH-Messung wurde gezeigt, dass die persistenten Einschlüsse bei der chronischen Infektion durch einen erniedrigten pH-Wert charakterisiert sind, was möglicherweise Basis für die fehlende Antibiotika-Wirkung auf den Persistenzzustand ist. Der Persistenz-induzierende IFN $\gamma$ -Effekt beruht offenbar auf beschleunigtem Abbau des für Chlamydien essentiellen L-Tryptophans aufgrund gesteigerter Aktivität der Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO). In Endothelzellen, in denen Persistenz spontan entsteht, wird das zur IDO-Messung herangezogene L-Kynurenin beschleunigt abgebaut.

Möglicherweise ist diese physiologische Besonderheit mit Ursache der vaskulären Chlamydien-Persistenz.

Das chlamydiale IncA-Protein wird über den Typ III-Sekretions-Apparat in die Einschlussembran transportiert, wo es essentiell für den strukturellen Aufbau ist, und als potentieller Virulenzfaktor in das Wirtszellzytosol sezerniert wird. Es wurde daher als Zielgen für die Analyse der Genexpression vaskulär persistierender Erreger ausgewählt. Es zeigte sich eine hochregulierte IncA-Transkription, jedoch parallel eine reduzierte Translation des IncA-Proteins. In infizierten PBMC und IFN $\gamma$ -behandelten HEp-2-Zellen konnte sogar überhaupt kein IncA-Protein nachgewiesen werden. Die für den Typ-III-Sekretions-Apparat strukturell essentiellen Produkte des LcrD und YscN Gens waren in der Transkription in Endothel- und Muskelzellen deutlich reduziert. Offenbar ist der Persistenzzustand von *C. pneumoniae* durch einschneidende regulatorische Veränderungen sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene gekennzeichnet. Diese *in vitro* Versuche geben einen Anhalt für die veränderte Lebenssituation von *C. pneumoniae* in atherosklerotischen Läsionen von Patienten.

Auch bei der vaskulären *C. pneumoniae* Infektion ist die Genexpression im chronisch infizierten Gefäß verändert. Über die LCM wurden infizierte Mausarten gezielt auf die postinfektiöse Expression pro-atherosklerotischer Faktoren in Endothel- oder Muskelgewebe untersucht. Der Infektionsherd in den *ex vivo* kultivierten und infizierten Aortenringen wurde mit dem umliegenden Gefäßgewebe ausgeschnitten. In diesen Schnitten war Erreger-bedingt die m-RNA-Synthese proinflammatorischer (IL-6, IL-8) und prokoagulatorischer (TF-1, PAI-1) Faktoren gesteigert, wobei der zeitliche Verlauf und das Ausmaß dieser Dysregulation in Endothel und Muskelzellen divergierte. Es zeigte sich auch, dass nicht alle zuvor in homogenisierten Geweben gesehenen Expressionsmuster simultan im physiologischen Gewebeverband auftraten. Im *ex vivo* Infektionsmodell wurde eine unerwartet ausgeprägte Infektion im periaortalen Fettgewebe festgestellt. Da bei Atherosklerose stets eine bislang unerklärte Inflammation des perivaskulären Fettgewebes beobachtet wurde, können weitere Untersuchungen Aufschluss zur Bedeutung dieses Gewebes bei vaskulären Infektion geben.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden, dass die vaskuläre *C. pneumoniae*-Infektion für Erreger und Wirt erhebliche biologische Konsequenzen hat. Die vaskuläre Wirtszelle drängt Chlamydien in einen genetisch charakterisierbaren nicht-replikativen Persistenzzustand. Der persistierende Erreger induziert im Wirt ein Genexpressionsmuster, das für die Atherosklerose charakteristisch ist.

## 6 Literaturverzeichnis

**Adams O**, Besken K, Oberdorfer C, MacKenzie CR, Russing D, Daubener W. Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Microbes Infect.* **2004**; 6: 806-12.

**Alexander R W**. Inflammation and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **1994**; 331: 468-9.

**Aldous MB**, Grayston JT, Wang S-P, Foy HM. Seroepidemiology of Chlamydia pneumoniae TWAR infection in Seattle families, 1966-1979. *J. Infect. Dis.* **1992**; 166: 646-649.

**Al-Younes HM**, Rudel T, Meyer TF. Characterization and intracellular trafficking pattern of vacuoles containing Chlamydia pneumoniae in human epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **1999**; 3: 237-247.

**Belland RJ**, Ouellette SP, Gieffers J, Byrne G. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Cell. Microbiol.* **2004**; 6: 117-127.

**Belland RJ**, Zhong GM, Crane DD, Hogan D, Sturdevant D, Sharma J, Beatty WL, Caldwell HD. Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of Chlamydia trachomatis. *Infect. Immun.* **2003**; 100: 8478-8483.

**Bannantine JP**, RS Griffiths, W Viratyosin, WJ Brown, DD Rockey. A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cell. Microbiol.* **2000**; 2, 35-47.

**Bea F**, Puolakkainen MH, McMillen T, Hudson FN, Mackman N, Kuo CC, Campbell LA, Rosenfeld ME. Chlamydia pneumoniae induces tissue factor expression in mouse macrophages via activation of Egr-1 and the MEK-ERK 1/2 pathway. *Circ. Res.* **2003**; 92: 394-401.

**Blessing E**, Kuo CC, Lin TM, Campbell LA, Bea F, Chesebro B, Rosenfeld ME. Foam cell inhibits growth of C. pneumoniae but does not attenuate C. pneumoniae induced secretion of pro-inflammatory cytokines. *Circulation.* **2002**; 105: 1976-182.

**Campbell LA**, Blessing E, Rosenfeld M, Lin T, Kuo C. Mouse models of C. pneumoniae infection and atherosclerosis. *J. Infect. Dis.* **2000**; 181 508-513.

- Campbell LA**, Kuo CC, Grayston JT. Chlamydia pneumoniae and cardiovascular disease. *Emerg. Infect. Dis.* **1998**; 4: 571-579.
- Campbell LA**, Kuo CC, Grayston JT. Structural and antigenic analysis of Chlamydia pneumoniae. *Infect. Immun.* **1990**; 58: 93-97.
- Campbell LA**, Kuo CC. Chlamydia pneumoniae: an infectious risk factor for atherosclerosis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**; 2: 23-32.
- Carabeo RA**, Mead DJ, Hackstadt T. Golgi-dependent transport of cholesterol to the Chlamydia trachomatis inclusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2003**; 100: 6771-6776.
- Chi, EY, Kuo CC**, Grayston JT. Unique ultrastructure in the elementary body of *Chlamydia* sp. Strain TWAR. *J. Bacteriol.* **1987**; 169: 3757-3767.
- Choi EY**, Kim D, Hong BK, Kwon HM, Song YG, Byun KH, Park HY, Whang KC, Kim HS. Upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and gelatinases in human atherosclerosis infected with *C. pneumoniae*: The potential role of *C. pneumoniae* infection in the progression of atherosclerosis. *Exp. Mol. Med.* **2002**; 31: 391-400.
- Coombes BK**, Chiu B, Fong IW, Mahony JB. Chlamydia pneumoniae infection of endothelial cells induces transcriptional activation of platelet-derived growth factor: a potential link to intimal thickening in a rabbit model of atherosclerosis. *J. Infect. Dis.* **2002**; 185: 1621-1630.
- Coombes BK**, Chiu B, Mahony JB. cDNA array analysis of altered gene expression in human endothelial cells in response to Chlamydia pneumoniae infection. *Infect. Immun.* **2001**; 69: 1420-1427.
- Cooper MA**, Baldwin D, Matthews RS, Andrews JM, Wise R. In vitro susceptibility of Chlamydia pneumoniae (TWAR) to seven antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **1991**; 28: 407-13.
- Dechend R**, Maass M, Gieffers J, Dietz R, Schneidereit C, Lentz A, Galba DC. *C. pneumoniae* infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI-1 expression: a potential link to accelerated atherosclerosis. *Circulation.* **1999**; 100: 1369-1373.
- De Kruif MD**, van Gorp ECM, Keller TT, Ossewaarde JM, ten Cate H. Chlamydia pneumoniae infections in mouse models: relevance for atherosclerosis research. *Cardiovascular Research.* **2004**; 65:317-327.

- Dreeses-Werringloer U**, Padubrin I, Jurgens-Saathoff B, Hudson A P, Zeidler H, Kohler L. Persistence of *Chlamydia trachomatis* is induced by ciprofloxacin and ofloxacin in vitro. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **2000**; 44: 3288-97.
- Dwyer RS**, Treharne JD, Jones BT, Herring J. Chlamydial infection. Results of micro-immunofluorescence test for detection of type-specific antibody in certain chlamydial infections *Br. J. Vener. Dis.* **1972**; 48: 452-459.
- Everett KD**, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order Chlamyiales, proposal of *Parachlamydia* fam. nov. and each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2001**; 51: 251-3.
- Fenelon LE**, Mumtaz G, Ridgway GL. The in vitro antibiotic susceptibility of *Chlamydia pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **1990**; 26: 763-7.
- 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.
- Gaydos CA**. Growth in vascular cells and cytokine production by *Chlamydia pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **2000**; 181: S 473-8.
- Gaydos CA**, Quinn TC, Bobo LD, Eiden JJ. Similarity of *Chlamydia pneumoniae* strains in the variable domain IV region of the major outer membrane protein gene. *Infect. Immun.* **1992**; 60: 5219-5323.
- Gaydos CA**, Summersgill JT, Sahney NN, Ramirez JA, Quinn TC. Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infect. Immun.* **1996**; 64: 1614-20.
- Gieffers J**, Füllgraf H, Jahn J, Klinger M, Dalhoff K, Katus HA, Solbach W, Maass M. *Chlamydia pneumoniae* infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation.* **2001**; 103: 351-6.
- Gieffers J**, Solbach W, Maass M. In vitro susceptibilities of *Chlamydia pneumoniae* strains recovered from atherosclerotic coronary arteries. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* **1998**; 42: 2762-64.

- Gieffers J**, van Zandbergen G, Rupp J, Sayk E, Kruger S, Ehlers S, Solbach W, Maass M. Phagocytes transmit Chlamydia pneumoniae from the lung to the vasculature. *Eur. Respir. J.* **2004**; 23: 506-510.
- Gilbert DN**, Moellering RC, Eliopoulos GM, Sande MA. Guide to Antimicrobial Therapy. The Sanford Guide. Thirty-fifth Edition. **2005**; Page 24-25.
- Grayston JT**. Infections caused by Chlamydia pneumoniae strain TWAR. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 15: 757-763.
- Grayston JT**, Kuo CC, Campbell LA, Wang SP. Chlamydia pneumoniae sp. nov. for Chlamydia sp. strain TWAR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1989**; 39: 88-90.
- Grayston JT**, Wang SP, Yeh L-J, Kuo CC. A new Chlamydia psittaci strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infection. *N. Engl. J. Med.* **1986**; 315: 161-168.
- Gurfinkel E**, Bozovich G, Beck E, Testa E, Livellara B, Mautner. Treatment with the antibiotic roxithromycin in patients with acute non-Q-wave coronary syndromes. The final report of the ROXIS Study. *Eur. Heart J.* **1999**; 20: 121-7.
- Hackstadt T**: Cell biology. In: Stephens RS: Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis and Immunity. **1999**; p. 101. ASM Press, Washington, D.C.
- Hackstadt T**, Scidmore-Carlson MA, Shaw EI, Fischer ER. The Chlamydia trachomatis InCA protein is required for homotypic vesicle fusion. *Cell. Microbiol.* **1999A**; 1: 119-130.
- 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. USA* **1995**; 92: 4877-4881.
- Hammerschlag MR**. Activity of gemifloxacin and other new quinolones against Chlamydia pneumoniae: a review. *Journal Antimicrobial Chemotherapy.* **2000**; 45, Suppl. S1, 35-9.
- Hammerschlag MR**, Chirgwin K, Roblin PM, Gelling M, Dumornay W, Mandel L, Smith P, Schachter J. Persistent infection with Chlamydia pneumoniae following acute respiratory illness. *Clin. Infect. Dis.* **1992**; 14: 178-182.
- Hatch TP**: Developmental biology. In: Stephens RS: Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis and Immunity. 1999; p. 30. ASM Press, Washington, D. C.

- 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.
- Hermann B**, Winqvist O, Mattsson JG, Kirsebom LA. Differentiation of *Chlamydia* spp. by sequence determination and restriction endonuclease cleavage of RNase P genes. *J. Clin. Microbiol.* **1996**; 34: 1897-1902.
- Horiguchi T**, Miyazaki J, Ohira D, Watanabe Y, Hayashi N, Kobayashi K, Torigoe T, Fukumoto K, Ito T, Hirose M, Sasaki Y, Shiga M, Kondo R, Handa M, Tachikawa S. Usefulness of sparflaxacin against *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with bronchial asthma. *J. Int. Med. Res.* **2005**; 33: 668-76.
- Hueck CJ**. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**; 62: 379-433.
- Hsia RC**, Pannekoek Y, Ingerowski E, Bavoil M. P. Type III secretion genes identify a putative virulence locus of *Chlamydia*. *Mol. Microbiol.* **1997**; 25: 361-359.
- Ingalls RR**, Rice PA, Qureshi N, Takayama K, Lin JS, Golenbock DT. The inflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* infection is endotoxin mediated. *Infect. Immun.* **1995**; 63: 3125-3130.
- Ivins BE**, Wyrick PB. Response of C3H/HeJ and C3H/HeN mice and their peritoneal macrophages to the toxicity of *Chlamydia psittaci* elementary bodies. *Infect. Immun.* **1978**; 22: 620-622.
- Journet L**, Agrain C, Broz P, Cornelis GR. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science.* **2003**; 302: 1757-1760.
- Kalayoglu MV**, Perkins BN, Byrne GI. *Chlamydia pneumoniae*-infected monocytes exhibit increased adherence to human aortic endothelial cells. *Microbe. Infect.* **2001**; 3: 963-969.
- Kalayoglu MV**, Byrne GI. Induction of macrophage foam-cell formation by *C. pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **1998**; 177: 725-729.
- Kanamoto Y**, Ouchi K, Mizui M, Ushio M, Usui T. Prevalence of antibody to *Chlamydia pneumoniae* TWAR in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **1991**; 29: 816-818.

- Kaukoranta-Tolvanen SS**, Ronni T, Leinonen M, Saikku P, Laitinen K. Expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated by *C. pneumoniae*. *Microb. Pathogen.* **1996**; 21: 407-411.
- Kaukoranta-Tolvanen SS**, Teppo AM, Laitinen K, Saikku P, Linnavuori K, Leinonen M. Growth of *Chlamydia pneumoniae* in cultured human peripheral blood mononuclear cells and induction of a cytokine response. *Microbial Pathogen.* **1996**; 21: 215-21.
- Kol A**, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60 activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest.* **1999**; 103 (4): 571-7.
- Kuo CC**, Grayston JT. Amino acid requirements for growth of *Chlamydia pneumoniae* in cell culture: growth enhancement by lysine or methionine depletion. *J. Clin. Microbiol.* **1990**. 28: 1098-1100.
- Kuo CC**, Chen HH, Wang SP, Grayston JT. Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR. *J. Clin. Microbiol.* **1986**; 24: 1034-1037.
- Kuo CC**, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin. Microbiol. Rev.* **1995**; 8: 451-461.
- Kuo CC**, Chi Y, Grayston JT. Ultrastructural study of entry of *Chlamydia* strain TWAR into HeLa cells. *Infect. Immun.* **1988**; 56: 1668-1672.
- Kutlin A**, Flegg C, Stenzel D, Reznik T, Roblin PM, Mathews S. et al. Ultrastructural study of *Chlamydia pneumoniae* in a continuous infection model. *J. Clin. Microbiol.* **2001**; 39: 3721-3.
- Kutlin A**, Roblin PM, Hammerschlag MR. Effect of gemifloxacin on viability of *Chlamydia pneumoniae* (*Chlamydomphila pneumoniae*) in an in vitro continuous infection model. *J. Antimicrobial Chemotherapy.* **2002**; 49: 763-767.
- Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Lee CA.** Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trends in Microbiology.* **1997**; 4: 148-156.
- Libby P**, Ridker P M, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation.* **2002**; 105: 1135-43.

- Lugert R**, Kuhns M, Polch T, Gross U. Expression and localisation of Typ III secretion-related proteins of *C. pneumoniae*. *Med. Microbiol. Immunol.* **2004**; 193: 163-71.
- MacKenzie CR**, Langen R, Takikawa O, Däubener W. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophages inhibits interferon- $\gamma$ -induced bacteriostasis but does not abrogate toxoplasmatosis. *Eur. J. Immunol.* **1999**; 29:3254-3261.
- Marrie T J**, Grayston JT, Wang SP, Kuo CC. Pneumonia associated with the TWAR strain of *Chlamydia*. *Ann. Intern. Med.* **1987**; 106: 507-511.
- Marton A**, Károlyi A, Szalka A. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in Hungary. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1992**; 11:139-142.
- Maass M**, Bartels C, Engel PM, Mamat U, Sievers HH. Endovascular presence of viable *Chlamydia pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. *J. Americ. Coll. Cardiol.* **1998**; 31: 827-832.
- Maass M**, Dalhoff K. Transport and storage conditions for cultural recovery of *Chlamydia pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **1995A**; 33: 1793-1796.
- Maass M**, Harig U. Evaluation of culture conditions used for isolation of *Chlamydia pneumoniae*. *Am. J. Clin. Pathol.* **1995B**; 103: 141-148.
- Maass M**, Krause E, Engel PM, Krüger S. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* in patients with hemodynamically effective carotid artery stenosis. *Angiology.* **1997**; 48: 699-706.
- Molestina RE**, Klein JB, Miller RD, Pierce WH, Ramirez JA, Summersgill JT. Proteomic analysis of differentially expressed *C. pneumoniae* genes during persistent infection of HEp-2 cells. *Infect. Immun.* **2002**; 70: 2976-2981.
- Mordhorst CH**, Wang SP, Grayston JT. Transmission of *C. pneumoniae* (TWAR), **1994**; p. 488- 491. In J. Orfila, G. I. Byrne, M. A. Cherneskey, J. T. Grayston, R. P. Jones, G. L. Ridgway, P. Saikku, J. Schachter, W. E. Stamm, and R. S. Stephens (ed.), *Chlamydia infections-1994*; Societa Editrice Esculapio, Bologna, Italy.
- Mota LJ**, Sorg I, Cornelis GR. Type III secretion: The bacteria-eukaryotic cell express. *FEMS Microb. Letters* 252. **2005**; 1-10.
- Murray CJL**, Lopez LD. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet.* **1997**; 349: 1269-1276.

**Napoli C**, D'Armiento FP, Mancini FP, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia : intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* **1997**; 100: 2680-90.

**National Cholesterol Education Program.** Second report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). Bethesda, Md.: National Heart, Lung, and Blood Institute, **1993** (NIH publication no. 93-3095).

**Newhall WJ**, Jones V, Jones RB. Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of chlamydiae. *J. Bacteriol.* **1983**; 154: 998-1001.

**Nurminen M**, Leinonen M, Saikku P, Mäkelä PH. The genus-specific antigen of Chlamydia: resemblance to the lipopolysaccharide of enteric bacteria. *Science.* **1983**; 220:1279-1281.

**Raulston JE**, Davis CH, Schmiel DH, Morgan MW, Wyrick PB. Molecular characterization and outer membrane association of a Chlamydia trachomatis protein related to the hsp70 family of proteins. *J. Biol. Chem.* **1993**; 268; 23139- 23147.

**Roblin PM**, Hammerschlag MR. Microbiologic efficacy of azithromycin and susceptibilities to azithromycin of isolates of Chlamydia pneumoniae from adults and children with community-acquired pneumoniae. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* **1997**; 42: 194-6.

**Roblin PM**, Kutlin A, Hammerschlag MR. Production of IL-4 and IL-6 in HEp-2 cells infected with Chlamydia pneumoniae. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology.* **1996**; 4: 195-6.

**Rockey DD**, Grosenbach D, Hruby DE, Peacock MG, Heinzen RA, Hackstadt T. Chlamydia psittaci IncA is phosphorylated by the host cell and is exposed on the cytoplasmic face of the developing inclusion. **1997**; *Mol. Microbiol.* 24: 217-228.

**Rockey DD**, Scidmore MA, Bannantine JP, Brown WJ. Proteins in the chlamydial inclusion membrane. *Microbes Infection.* **2002**; 4: 333-340.

**Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature.* **1993**; 362: 801-8.

**Ross R.** Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **1998**; 340: 115-126.

- Rothfuchs AG**, Gigliotti D, Palmblad K, Andersson U, Wigzell H, Rottenberg ME. IFN- $\alpha\beta$ -dependent, IFN-secretion by bone marrow-derived macrophages controls an intracellular bacterial infection. *J. Immunol.* **2001**; 167: 6453-6461.
- Rothfuchs AG**, Kreuger MR, Wigzell H, Rottenberg ME. Macrophages, CD 4+ or CD 8+ cells are each sufficient for protection against *Chlamydia pneumoniae* infection through their ability to secrete IFN-gamma. *J. Immunol.* **2004**; 172: 2407-2415.
- Rupp J**, Hellwig-Burgel T, Wobbe V, Brandt E, Maass M. *Chlamydia pneumoniae* infection promotes a proliferative phenotype in the vasculature through Egr-1 activation in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2005A**; 102: 3447-52.
- Rupp J**, Koch M, Zandbergen G, Solbach W, Brandt E, Maass M. Transmission of *Chlamydia pneumoniae* infection from blood monocytes to vascular cells in a novel transendothelial migration model. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**; 242: 203-8.
- Rus HG**, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in the human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis.* **1996**; 127: 263-71.
- Rzomp KA**, Scholtes LD, Briggs BJ, Whittaker GR, Scidmore MA. Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner. *Infection Immun.* **2003**; 71: 5855-5870.
- Schachter J**, Stephens RS, Timms P, Kuo CC, et al. Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* **2001**; 51: 249.
- Schumacher A**, Seljeflot I, Lerkerod AB, Sommervoll L, Otterstad JE, Arnesen H. *Chlamydia* LPS and MOMP seropositivity are associated with different cytokine profiles in patients with coronary heart disease. *Eur. J. Clin. Invest.* **2005**; 35: 431-7.
- Scidmore MA**, Hackstadt T. Mammalian 14-3-3 $\beta$  associates with the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane via its interaction with IncG. *Mol. Microbiol.* **2001**; 39: 1638-1650.
- 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. *Circulation* **1994**; 89: 2462-78.
- Stintzing S**, Heuschmann P, Barbera L, Ocker M, Jung A, Kirchner T, Neureiter D. Overexpression of MMP9 and tissue factor in unstable carotid plaques associated with *Chlamydia pneumoniae*, inflammation, and apoptosis. *Ann. Vasc. Surg.* **2005**; 19: 310-9.

- Straley SC**, Plano GV, Skrzypek E, Haddix PL, Fields KA. Regulation by  $\text{Ca}^{2+}$  in the *Yersinia* low- $\text{CA}^{2+}$  response. *Mol. Microbiol.* **1993**; 8: 1005-10.
- Su H**, Watkins NG, Zhang YX, Caldwell HD. Chlamydia trachomatis-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesion. *Infect. Immun.* **1990**; 58: 1017-1025.
- Su H**, Raymond L, Rockey DD, Fischer E, Hackstadt T, Caldwell HD. A recombinant Chlamydia trachomatis major outer membrane protein binds to heparan sulphate receptors on epithelial cells. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.* **1996**; 93: 11143-8.
- Subtil A**, Parsot C, Dautry-Varsat A. Secretion of predicted Inc proteins of Chlamydia pneumoniae by an heterologous type III machinery. *Mol. Microbiol.* **2001**; 39: 792-800.
- Suchland RJ**, Rockey DD, Bannantine JP, Stamm WE. Isolates of Chlamydia trachomatis that occupy nonfusogenic inclusions lack IncA, a protein localized to the inclusion membrane. *Infection Immun.* **2000**; 1: 360-367.
- Suchland RJ**, Rockey DD, Weeks SK, Alzhanov DT, Stamm WE. Development of secondary inclusions in cells infected by Chlamydia trachomatis. *Infection Immun.* **2005**; 73: 3954-62.
- Taylor-Robinson D**, Thomas BJ. Chlamydia pneumoniae in arteries: the facts, their interpretation, and future studies. *J. Clin. Pathol.* **1998**; 51: 793-797.
- Toellner KM**, Scheel-Toellner D, Seitzer U, Sprenger R, Trumper L, Schluter C, Flad HD, Gerdes J. The use of reverse transcription polymerase chain reaction to analyse large numbers of mRNA species from a single cell. *J. Immunol. Methods.* **1996**; 191: 71-5.
- Van der Wal AC**, Becker AE, Van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation.* **1994**; 83: 34-44.
- 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.
- Wang SP**. The Microimmunofluorescence test for Chlamydia pneumoniae infection: technique and interpretation. *J. Inf. Dis.* **2000**; 181: 421-425.

**Watarai M**, Tobe T, Yoshikawa M, Sasakawa C. Contact of Shigella with host cells triggers release and is an essential function of invasiveness. *EMBO*. **1995**; 14: 2461-2470.

**Wehrl W**, Meyer TF, Jungblut PR, Muller EC, Szczeppek AJ. Action and reaction: Chlamydia pneumoniae proteome alteration in a persistent infection by iron deficiency. *Proteomics*. **2004**; 4: 2969-81.

**Wick G**, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol. Today* **1995**; 16: 27-33.

**Winer J**, Jung CKS, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal. Biochem*. **1999**; 270: 41-49

**Wissenschaftliche Tabellen** Geigy. Teilband Hämatologie und Humangenetik. Herausgegeben von CIBA-Geigy AG, Basel, Schweiz. 1979, p 93.

**Wolf K**, Malinverni R. Effect of azithromycin plus rifampin versus that of azithromycin alone on the eradication of Chlamydia pneumoniae from lung tissue in experimental pneumonitis. *Antimicrob. Agents Chemotherapy* **1999**; 43: 1491-11493.

**Yang J**, Hooper WC, Phillips DJ, Tondella ML, Talkington DF. Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during Chlamydia pneumoniae infection. *Infect. Immun.* **2003**; 71: 614-620.

## 7 Liste der Publikationen, Vorträge und Poster

### Publikationen

1. **Heinze C**, Wobbe V, Lesemann DE, Zhang DY, Willingmann P, Adam G. Pelargonium necrotic spot virus: a new member of the genus *Tombusvirus*. Arch. Virol. **2004**; 149: 1527-39.
2. **Rupp J**, Wobbe V, Solbach W, Maass M. Wirkprofil von Moxifloxacin in Modellen der akuten und chronischen Chlamydia-pneumoniae-Infektion *in vitro*. Klinik und Forschung. 2004; 10 Suppl. 1: 63-64.
3. **Rupp J**, Hellwig-Burgel T, Wobbe V, Seitzer U, Brandt E, Maass M. *Chlamydia pneumoniae* infection promotes a proliferative phenotype in the vasculature through Egr-1 activation in vitro and in vivo. PNAS. **2005**; 102: 3447-3452.

### Poster

1. **Wobbe V**, Rupp J, Maass M. Etablierung der Laser Microdissection zur in situ Analyse der differentiellen Genexpression nach *Chlamydia pneumoniae* Infektion am Aortic Ring Modell. Deutscher Chlamydienworkshop. Mai. **2005**; Jena, Deutschland.
2. **Kern JM**, Rupp J, Wobbe V, Maass M. Dysregulation of the vascular endothelin-1 system by Chlamydia pneumoniae. Gemeinsame Tagung der DGHM und VAAM. Okt. **2005**, Göttingen, Deutschland.

### Vorträge

1. **Wobbe V**, Rupp J, Maass M. Establishment of the Laser Capture Microdissection for in situ analysis of the differential gene expression after Chlamydia pneumoniae infection in an aortic ring model. 2. Gemeinsame Tagung der DGHM und VAAM. Okt. **2005**, Göttingen, Deutschland.
2. **Wobbe V**, Rupp J, Maass M. Establishment of the Laser Capture Microdissection technique for in situ analysis of the differential gene expression after vascular *Chlamydia pneumoniae* infection. Infection, Inflammation and Atherosclerosis. Okt. **2005**, University of Helsinki, Finland.
3. **Wobbe V**, Rupp J, Maass M. Microdissection analysis of the differential gene expression after *Chlamydia pneumoniae* infection in an aortic ring model. 28. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen. Nov. **2005**, Borstel, Deutschland.

## 8 Lebenslauf

Viola Wobbe

Geboren 28. Juni 1972 in Hamburg

### AUSBILDUNG

1984 – 1989 Realschule, Poppenbüttler Stieg

1989 – 1993 Erich Kästner-Gesamtschule

1993 Abitur

1993 – 1995 Lehranstalt für Technische AssistentenInnen i. d. Medizin (MTRA)

10/1996 – 11/2002 Studium der Biologie an der Universität Hamburg

Diplomarbeit im Institut für Angewandte Botanik, in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Adam mit dem Thema: Sequenzierung des unbekanntes Pflanzenvirus UPEV

11/2002 Diplom

05/2003 Beginn der Doktorarbeit im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene an der Universität zu Lübeck in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Maaß über *Chlamydia pneumoniae*

### BERUFSTÄTIGKEIT

10/1995 – 10/1996 Vollzeitbeschäftigung im AK Barmbek, als medizinisch- technische Radiologieassistentin

10/1996 – 04/2000 Teilzeitbeschäftigung im AK Barmbek, als medizinisch-technische Radiologieassistentin

seit 5/2006 wiss. Mitarbeiterin, Molekularbiologie, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Hygiene und Infektiologie, Universitätsklinikum Salzburg

## 9 Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Betreuer aus der Medizinischen Mikrobiologie der Universität Lübeck, Herrn Prof. Dr. med. M. Maaß, danken für die Überlassung des Themas, die Unterstützung und beratenden Gespräche, sowie für das nette Arbeitsklima und die Möglichkeit der selbständigen Arbeit.

Ebenfalls geht mein großer Dank an Herrn Dr. med. Jan Rupp für die langen fachlichen Gespräche und Hilfestellungen bei Vorträgen, Postern und Laborarbeit.

Bei Frau Prof. Dr. rer. nat. V. Gauss-Müller bedanke ich mich herzlich für kontinuierliche Anregungen während meiner praktischen Tätigkeit und der Begutachtung meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. med. W. Solbach bedanke ich mich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die Kritik und Anregungen zu meinen Vorträgen.

Weiterhin danke ich den lieben MTAs der Arbeitsgruppe, Angela Gravenhorst, Anke Hellberg und Tanja Lüdemann, für die gute Einarbeitung in die verschiedenen Methoden und natürlich für die besonders gute Arbeitsatmosphäre in der Gruppe.

Für die Einarbeitung im Bereich der IDO-Untersuchung und der netten Aufnahme im Laborbereich danke ich Herrn Prof. Dr. med. W. Däubener aus der Medizinischen Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Für die zeitaufwendige Einarbeitung am konfokalen Mikroskop und der Mikrodisektion im Institut für Anatomie der Universität Lübeck danke ich Herrn Prof. Dr. med. A. Gebert.

Für die Überlassung des chlamydialen IncA-Antikörpers von Herrn Prof. Dr. med. U. Gross, Medizinische Mikrobiologie, Universität Göttingen, möchte ich mich sehr bedanken.

Für die nette und unterhaltsame Atmosphäre, die jede Arbeit erleichtert, danke ich den DoktorandInnen aus meiner Arbeitsgruppe, zuerst Jan Marco Kern für die immer gute Laune und Aufmunterungen, sowie Simone Weikert und aus der Leishmanien Arbeitsgruppe Dr. rer. nat. Inga Wilde, Uta Bußmeyer, Dr. rer. nat. Sonja Lotz und Dr. rer. nat. Annalenna Bollinger aus der Diagnostik allen Ärzten besonders Dr. med. Andrea Starke. Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Jens Gieffers danke ich für den Informationsaustausch zu Antibiose und Persistenz von *C. pneumoniae*.

## Danksagung

Bei meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich mich besonders herzlich für die stetige und liebe Unterstützung und Hilfe bedanken.