

Untersuchungen zur Genexpression von primären  
humanen Endothelzellen nach Infektion mit  
*Chlamydophila pneumoniae*

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Mirko Steinmüller

aus Wetzlar

Gießen 2005

Aus der Abteilung  
Hämostaseologie und Transfusionsmedizin  
Kerckhoff-Klinik  
Bad Nauheim  
Direktor: Prof. Dr. med. G. Müller-Berghaus

Betreuer: Dr. rer. nat. Birgit Weiß und PD Dr. rer. nat. Dietmar von der Ahe

Gutachter: PD Dr. rer. nat. Dietmar von der Ahe

Gutachter: PD Dr. rer. nat. Eugen Domann

Tag der Disputation:

14.11.2005

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>4</b>
<b>MASSEINHEITEN</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1 Allgemeines	6
1.2 Physiologie der arteriellen Strombahn	7
1.2.1 Aufbau von Arterien	7
1.2.2 Funktionen des Endothels	8
1.3 Pathophysiologie der Arteriosklerose	9
1.3.1 Histologie arteriosklerotischer Plaques	9
1.3.2 Molekularbiologie der Arteriosklerose	10
1.3.3 Chlamydientheorie	12
1.4 Mikrobiologie von <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	13
1.5 Zielsetzung und experimentelle Strategie	15
<b>2 MATERIALIEN</b>	<b>17</b>
2.1 Geräte	17
2.2 Gebrauchsartikel	18
2.3 Chemikalien	19
2.4 Medien und Zusätze	19
2.5 Proteine und Antikörper	20
2.6 Nuklide, Oligonukleotide und DNA	20
2.7 Enzyme	21
2.8 Spezielle Materialien	21
2.9 Hergestellte Puffer, Medien und Lösungen	22
2.10 Zellen und Zelllinien	27
2.10.1 Prokaryontische Zellen	27
2.10.2 Eukaryontische Zellen	27

---

<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Experimentelle Bedingungen</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>28</b>
3.2.1	Kultur von HEp-2 Zellen	28
3.2.2	Kultur von humanen umbilikal-venösen Endothelzellen	29
3.2.3	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid -Test	30
3.2.4	Mycoplasmen-Test	30
<b>3.3</b>	<b>Infektion humaner Zellen mit <i>Chlamydomphila pneumoniae</i></b>	<b>31</b>
3.3.1	Chlamydienkultur	31
3.3.2	Infektion humaner umbilikal-venöser Endothelzellen	33
<b>3.4</b>	<b>Nukleinsäurechemie</b>	<b>35</b>
3.4.1	Gelelektrophorese von Nucleinsäuren	35
3.4.2	Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung	36
3.4.3	Plasmidpräparation	37
3.4.4	Ribonukleinsäure-Präparation	39
3.4.5	Radioaktive Markierung von Desoxyribonukleinsäure	39
3.4.6	Northern Blot	40
<b>3.5</b>	<b>Immunologische und proteinchemische Verfahren</b>	<b>43</b>
3.5.1	Zellulärer Enzyme linked immuno-sorbent Assay	43
3.5.2	Western Blot	44
<b>3.6</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Anzucht von <i>Chlamydomphila pneumoniae</i></b>	<b>47</b>
<b>4.2</b>	<b>Infektion von humanen umbilikal-venösen Endothelzellen</b>	<b>49</b>
<b>4.3</b>	<b>Änderungen der Thrombomodulin-Expression</b>	<b>51</b>
4.3.1	Kinetik der Proteinexpression	51
4.3.2	Untersuchung der mRNA-Expression	54
<b>4.4</b>	<b>Änderungen der Plasminogen Aktivator Inhibitor-1-Expression</b>	<b>57</b>
4.4.1	Untersuchung der mRNA-Expression	57
<b>4.5</b>	<b>Änderungen der Expression von Transkriptionsfaktoren</b>	<b>61</b>
4.5.1	Untersuchung des Aktivator-Protein-1-Komplexes	61
4.5.2	Untersuchung des Transkriptionsfaktors Egr-2/KROX-20	66
<b>4.6</b>	<b>Ermittlung der Zellaktivität</b>	<b>68</b>

---

<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>69</b>
<b>5.1</b>	<b>Wahl des Experimentalsystems</b>	<b>69</b>
5.1.1	Überlegungen zum experimentellen Design	69
5.1.2	Änderungen von Vitalität und Phänotyp nach Infektion	72
<b>5.2</b>	<b>Differentielle Genexpression nach <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Infektion</b>	<b>74</b>
5.2.1	Einfluss der <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Infektion auf Hämostasefaktoren	74
5.2.2	Einfluss der <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Infektion auf Transkriptionsfaktoren	78
5.2.3	Auswirkungen auf den Arterioskleroseverlauf	80
<b>5.3</b>	<b>Perspektiven</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>87</b>

## Abkürzungen

Abb	Abbildung
AP-1	Aktivator Protein-1
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylenamindiaminoessigsäure
Egr-2	Early growth response-2
ELISA	enzyme linked immuno-sorbent assay
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
HBS	Hepes buffered saline
HUVEC	humane umbilikal-venöse Endothelzellen
HUVE-Zellen	humane umbilikal-venöse Endothelzellen
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1
IFU	Inclusion-body forming unit
IL	Interleukin
LDL	Low density lipoprotein
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid
NF $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
OD	optische Dichte
OPD	ortho-Phenyldiamin
p.a.	Reinheitsgrad „pro analysi“
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
PBS	Phosphate buffered saline
PECAM-1	Platelet-endothelial cellular adhesion molecule-1

---

POD	Peroxydase
RNA	Ribonukleinsäure
TF	Tissue factor, Gewebsthromboplastin
TM	Thrombomodulin
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
WHO	Weltgesundheitsorganisation

## Masseinheiten

g, mg, $\mu$ g, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
h, min, s	Stunde, Minute, Sekunde
l, ml, $\mu$ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM	Molar, Millimolar
mm, $\mu$ m, nm	Millimeter, Mikrometer, Nanometer
g	Erdbeschleunigung
v/v	Verhältnis zweier Flüssigkeiten (Volumen/Volumen)
w/v	Konzentration eines gelösten Stoffes in einer Flüssigkeit (Gewicht/Volumen)

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines

In industrialisierten Ländern stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache dar. Nach Schätzungen der WHO wird die Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen in der Zukunft noch weiter steigen<sup>90</sup>. Die Arteriosklerose hat im Feld der kardiovaskulären Erkrankungen mit Abstand die größte Bedeutung. Die sogenannte „Arterienverkalkung“ stellt eine Erkrankung der arteriellen Blutgefäßwände dar. Durch Verdickung der Gefäßwände kommt es zur Einengung bis hin zum Verschluss eines arteriellen Gefäßes. Eine Vielzahl unterschiedlicher Organerkrankungen können auf arteriosklerotische Veränderungen zurückgeführt werden. So ist die Arteriosklerose beispielsweise bei der überwiegenden Mehrheit der Patienten mit Herzinfarkt, Schlaganfall und peripher arterieller Verschlusskrankheit die zugrunde liegende Erkrankung<sup>79</sup>. Die Arteriosklerose stellt somit eine Erkrankung von herausragender soziologischer und ökonomischer Relevanz dar. Aus diesem Grunde wurde in den vergangenen Jahrzehnten mit großer Anstrengung versucht die Arteriosklerose zu verhindern und zu behandeln. Die Ergebnisse sind jedoch noch nicht zufriedenstellend. Anhand klinischer und epidemiologischer Beobachtungen in großen Studien wie der Framingham-Studie hat man Risikofaktoren für die Arteriosklerose postuliert<sup>43</sup>. Als Risikofaktoren gelten beispielsweise Rauchen, erhöhter Blutcholesterinspiegel und Diabetes mellitus. Aber auch nicht beeinflussbare Faktoren wie hohes Lebensalter, männliches Geschlecht und Herzinfarkte in der Familie kommen bei Patienten mit Arteriosklerose gehäuft vor. Auch in der Aufklärung der Ursachen ist man große Schritte vorangekommen<sup>10,78</sup>. Doch auch heute ist die Ätiologie der Arteriosklerose nicht vollständig geklärt.

## **1.2 Physiologie der arteriellen Strombahn**

### **1.2.1 Aufbau von Arterien**

Arterien sind Blutgefäße, die Blut vom Herzen zur Peripherie leiten. Die Arterienwand, die das Lumen umgibt, muss somit starken Druckschwankungen standhalten.

Sie ist aus drei Schichten aufgebaut, der Tunica intima, der Tunica media und der Tunica externa<sup>41</sup>.

Die direkt das Lumen begrenzende Schicht wird Tunica intima genannt. Sie besteht aus einem einschichtigen Endothelzellverband, welcher durch eine dünne Basallamina von einer Lage subendothelialen Bindegewebes getrennt wird.

An die Tunica intima grenzt die Tunica media. Sie besteht aus elastischen Fasernetzen und Membranen und daran inserierenden glatten Muskelzellen.

Die Tunica externa, auch Adventitia genannt, besteht aus lockerem Bindegewebe.

In der Adventitia und dem äußeren Anteil der Tunica media finden sich zudem noch Gefäße (Vasa vasorum) und vereinzelt Nerven.

Im Aufbau unterscheidet man zwei Arten von Arterien, solche vom elastischen und solche vom muskulären Typ. Arterien vom elastischen Typ findet man herznah. Arterien vom muskulären Typ findet man herzfern. Sie stellen die Mehrheit der Arterien dar. Der Übergang zwischen diesen beiden Unterformen ist fließend.

Arterien vom muskulären Typ besitzen in ihrer Tunica media hauptsächlich glatte Muskelzellen, während sie gegenüber Arterien vom elastischen Typ bei weitem weniger elastische Fasern haben.

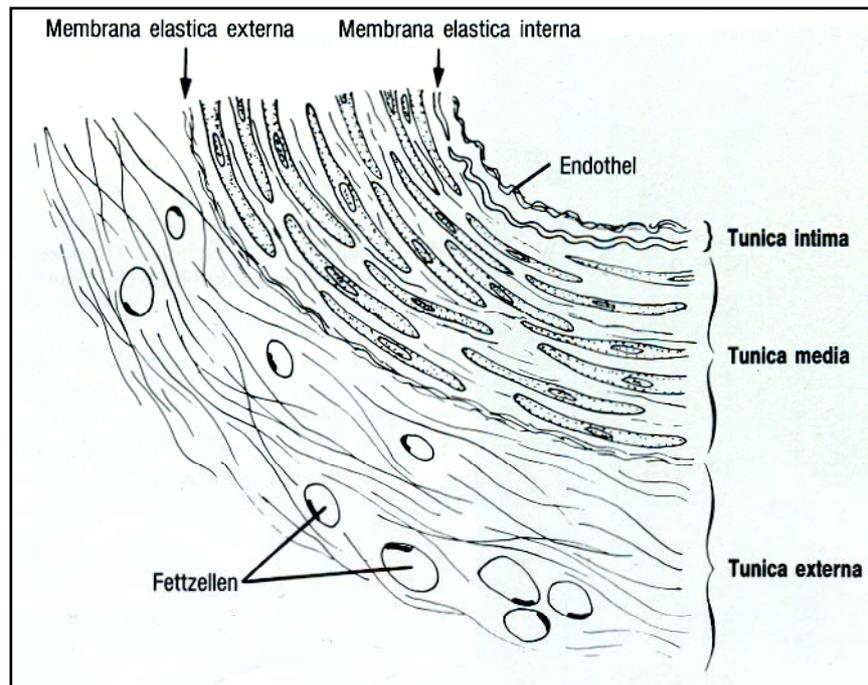


Abbildung 1: Wandaufbau einer Arterie vom muskulären Typ (aus Geneser, Histologie)

## 1.2.2 Funktionen des Endothels

Das Endothel ist eine höchst stoffwechselaktive Zellschicht, die immunologische, regulierende und gerinnungsaktive Funktionen wahrnimmt<sup>116</sup>.

Diese Funktionen sind nicht als unabhängig anzusehen, sondern stehen im engen Zusammenhang<sup>75,97</sup>.

Das Endothel kann sowohl pro- als auch antithrombogene Wirkung besitzen<sup>8</sup>. Unter physiologischen Bedingungen überwiegt die antithrombogene Wirkung. Proteine an der Zelloberfläche inaktivieren aktivierte Gerinnungsfaktoren und verhindern somit eine Thrombosierung des Gefäßlumens<sup>31,75</sup>.

Eine zentrale Rolle spielt hierbei das Oberflächenmolekül Thrombomodulin. Das endotheliale Oberflächenmolekül aktiviert nach Bindung von Thrombin den regulatorischen Faktor Protein C. Des weiteren funktioniert es als Thrombinrezeptor und vermindert auf diesem Wege das frei verfügbare Thrombin. Protein C inaktiviert die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa und bremst dadurch die Gerinnungskaskade<sup>31</sup>.

Unter nicht-physiologischen Bedingungen, wie zum Beispiel in entzündetem Gewebe oder nach Verletzungen, verliert das Endothel seine antithrombogene Wirkung. Im Gegenteil, werden die Endothelzellen aktiviert, wirken sie prothrombogen. In den Endothelzellen wird

vermehrt Tissue Factor (TF) und Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) produziert und ins Gefäßlumen abgegeben<sup>28,47,94,118</sup>. Dies bewirkt auf der einen Seite eine verstärkte Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade und auf der anderen Seite eine Hemmung der entgegenwirkenden Thrombolyse.

Das bereits erwähnte Oberflächenmolekül Thrombomodulin wird unter inflammatorischen Bedingungen vermindert exprimiert<sup>87,92,109</sup>. Dies kann ein Grund für das schwere Gerinnungsungleichgewicht bei septischen Krankheitsbildern sein<sup>33</sup>.

## **1.3 Pathophysiologie der Arteriosklerose**

### **1.3.1 Histologie arteriosklerotischer Plaques**

Die Entstehung der Arteriosklerose ist ein über Jahre andauernder Prozess und durchläuft unterschiedliche aufeinanderfolgende makroskopisch sichtbare Stadien<sup>10,103</sup>.

Erstes Stadium der Arteriosklerose sind die sogenannten Lipidstreifen (engl.: fatty streaks). Diese makroskopisch sichtbaren Lipideinlagerungen können schon bei Säuglingen beobachtet werden. Sie gelten als reversibel. Fibröse Plaques stellen das zweite Stadium der Arteriosklerose dar. Es handelt sich hierbei um bindegewebige Verdickungen der Arterienwand. Als drittes Stadium der Arteriosklerose bezeichnet man komplexe Läsionen. Diese auch Atherom genannten pathologischen Veränderungen bestehen aus tumorartigen Gewebe mit zentraler Nekrose. Durch Einlagerung von Kalksalzen imponieren Atherome als hart und unflexibel. Das betroffene Gefäß versteift.

Auch histologisch können für jedes Stadium der Arteriosklerose spezifische Vorgänge benannt werden.

Im Stadium der Lipidflecke imponieren Ansammlungen von Makrophagen in der Tunica intima. Diese Makrophagen enthalten in ihren Vakuolen große Mengen aufgenommener Cholesterinester. Deshalb bezeichnet man sie als Schaumzellen.

Das Stadium der fibrösen Plaques ist durch die Proliferation glatter Muskelzellen gekennzeichnet<sup>10</sup>. Es kommt zu einer Fibrosierung des Gewebes durch Synthese von Interzellulärmatrix von den proliferierenden glatten Muskelzellen.

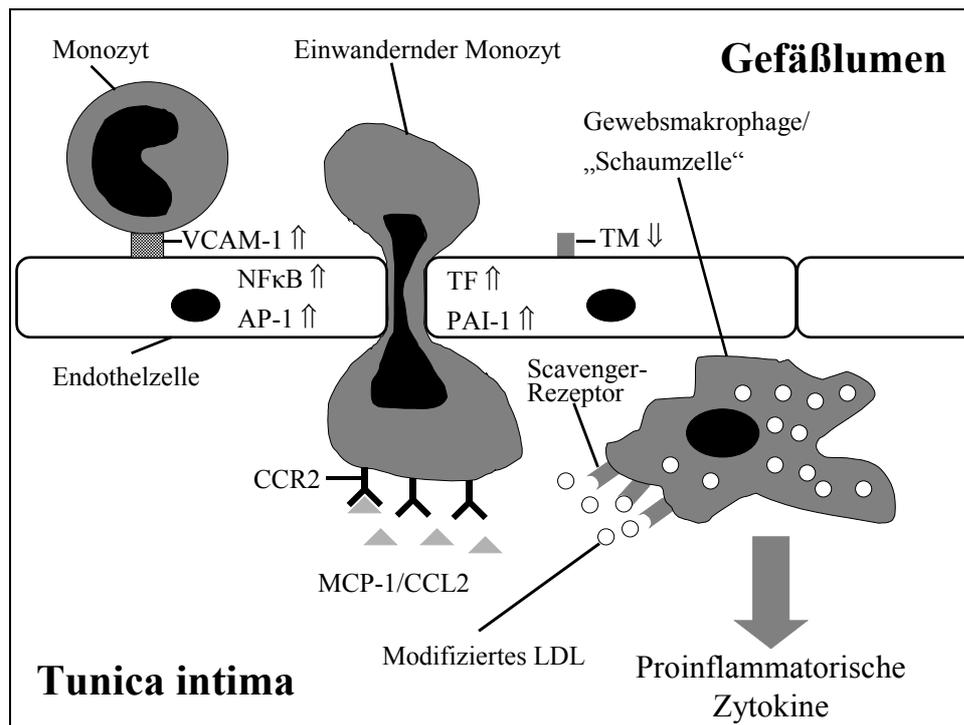
Im Stadium der komplexen Läsion, auch Atherom genannt, findet man eine zentrale Nekrose, welche von Bindegewebe umgeben ist. Im Bindegewebe befinden sich spezialisierte Zellen,

sogenannte „pericyte-like cells“ an welche sich Kalksalze anlagern<sup>10</sup>. Durch langsame Einsprossung von Kapillaren wird das Gewebe organisiert.

### 1.3.2 Molekularbiologie der Arteriosklerose

Die Assoziation von Hypercholesterinämie und Arteriosklerose hat über Jahrzehnte die Arterioskleroseforschung dominiert. Bereits sehr früh hat man erkannt, dass Hypercholesterinämie zu einer verstärkten Adhäsion von Leukozyten an die Tunica intima führt<sup>96</sup>. Diese Leukozyten-Endothel-Interaktion nimmt heute in der Arterioskleroseforschung einen zentralen Platz ein. Sie führte weg von der Arteriosklerose als einer proliferativen Erkrankung einzelner Gefäßabschnitte und hin zu der Sicht der Arteriosklerose als lokale inflammatorische Erkrankung<sup>78,79</sup>.

Die sehr frühe Leukozytenrekrutierung konnte in experimentellen Modellen auf eine Erhöhung endothelialer Oberflächenadhäsionsmoleküle insbesondere vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) zurückgeführt werden<sup>23,24</sup>. Nach Adhäsion der Leukozyten kommt es zur Diapedese durch die Endothelzellschicht. Für diese gerichtete Migration ist ein Chemokingradient der auslösende Faktor. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) und Interleukin-8 (IL-8) konnten als zentrale Mediatoren hierfür ermittelt werden<sup>13,48,120</sup>. Beide Moleküle werden in arteriosklerotischen Plaques vermehrt sezerniert<sup>66</sup>. Der Entzündungsprozess wird durch modifizierte low-density Lipoproteine (LDL) weiter aufrechterhalten. Diese oxidierten oder glykosilierten Lipoproteine werden von den zu Makrophagen differenzierten eingewanderten Monozyten über den Scavenger-Rezeptor unreguliert aufgenommen. Sie speichern die Lipide in Vakuolen. Es entsteht mikroskopisch das Bild von „Schaumzellen“. Aktivierte Schaumzellen produzieren nun ihrerseits eine Reihe von Zytokinen, u.a. Interleukin-1 (IL-1) und Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) welche die Entzündungsreaktion verstärken.



**Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Arterioskleroseinitialphase**

Die Erhöhung der Oberflächenexpression von VCAM-1 und der MCP-1/CCL2-Gradient führen zur Invasion CCR2-positiver Monozyten, welche sich zu Gewebsmakrophagen ausdifferenzieren und über die unregulierte Aufnahme modifizierter LDL Schaumzellen bilden.

Auch die hämostaseologischen Eigenschaften des Endothels werden im Verlauf der Arteriosklerose beeinflusst. Eine Hochregulierung des Gewebsthrumboplastins (Tissue factor, TF) und des Plasminogen Aktivator Inhibitors Typ 1 (PAI-1) konnte sowohl in Patientenproben als auch in experimentellen Arteriosklerosemodellen nachgewiesen werden<sup>30,76,122</sup>. Neben der vermehrten Expression verschiedener Moleküle wird auch eine herabgesetzte Expression einiger anderer Moleküle beobachtet. Als Beispiele seien hier der endotheliale Protein C Rezeptor und Thrombomodulin genannt<sup>72,115</sup>. Diese Veränderungen der Endothelzellen bewirken einen prokoagulatorischen Phänotyp, welcher vor allem bei der Plaqueruptur und darauffolgender Freisetzung der genannten Substanzen die Thrombosierung des Gefäßes begünstigt.

Aus welchem Grund es zu diesen Expressionsveränderungen kommt, ist erst in Ansätzen geklärt.

Den Expressionsveränderungen voraus geht eine Aktivierung von frühen Transkriptionsfaktoren (Immediate Early Transcription Factors). Es konnte nachgewiesen werden, dass in frühen arteriosklerotischen Läsionen die Aktivität von Nuclear Factor Kappa

B (NFκB) heraufgesetzt ist<sup>14,49,77</sup>. NFκB ist ein zentraler Transkriptionsfaktor inflammatorischer Stimuli wie beispielsweise Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNFα) und bewirkt unter anderem die Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen und Chemokinen<sup>6</sup>. Ein weiterer zentraler Transkriptionsfaktor ist der Aktivator-Protein-1 Komplex (AP-1), welcher durch Dimerisation von Onkogenprodukten der Familien c-jun und c-fos entsteht<sup>61</sup>. AP-1 ist in Zellproliferationsprozesse involviert. Auch ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung von AP-1 und der Arteriosklerosepathogenese konnte nachgewiesen werden<sup>91,123</sup>.

### 1.3.3 Chlamydientheorie

Hyperlipidämie stellt nicht den einzigen Risikofaktor der Arteriosklerose dar. Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurde ein Risikofaktorenprofil für die Entstehung der Arteriosklerose aufgestellt<sup>79</sup>. Die Theorie der Arterioskleroseentstehung wurde durch einige wichtige Facetten ergänzt. Seit kurzem wird eine Infektion mit *Chlamydomphila pneumoniae* als ein weiterer unabhängiger Risikofaktor diskutiert<sup>84,104</sup>.

Ende der achtziger Jahre wurde von einer finnischen Arbeitsgruppe beschrieben, dass Patienten mit Arteriosklerose überdurchschnittlich häufig Antikörper gegen ein damals noch unbekanntes Bakterium der Familie *Chlamydiaceae* aufwiesen<sup>104,105</sup>. *Chlamydomphila pneumoniae* ist ein häufiger Erreger ambulant erworbener Pneumonien<sup>56</sup>. In weiteren serologischen Studien konnte eine Korrelation zwischen positivem Antikörpertiter und koronarer Herzkrankheit bestätigt werden<sup>5,11,25,26</sup>, in anderen Studien wurde kein Zusammenhang festgestellt<sup>34</sup>. Zudem wurde *C. pneumoniae* mit den unterschiedlichsten Verfahren in arteriellen Plaques nachgewiesen<sup>5,60,70</sup>, auch hier gab es jedoch widersprüchliche Ergebnisse<sup>58</sup>. In einigen Fällen konnten die Erreger aus Plaques sogar kultiviert werden<sup>85</sup>. Uneinheitlich sind die Ergebnisse aus tierexperimentellen Untersuchungen. Caligiuri et al. konnten keinen Einfluss von *C. pneumoniae* auf die Entwicklung der Arteriosklerose in Apolipoprotein E (ApoE) defizienten Mäusen, welche früh an Arteriosklerose erkrankten, nachweisen<sup>17</sup>. Fong et al. hingegen beschrieben eine Induktion von Arteriosklerose in Kaninchen durch *C. pneumoniae*<sup>35</sup>.

Es stellte sich somit die Frage: Ist *C. pneumoniae* ein Erreger ohne Krankheitswert, der sich in Atheromen niederlässt („innocent-bystander“ Hypothese), oder sind die Chlamydien die Initiatoren der Atherome?

Zur Beantwortung dieses Punktes muss geklärt werden, ob *C. pneumoniae* die Veränderungen hervorrufen kann, die in der Pathogenese der Arteriosklerose eine Rolle spielen. Von

verschiedenen Arbeitsgruppen konnte bereits gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* sich in den unterschiedlichsten Zellen, welche im Arterioskleroseprozess eine Rolle spielen, *in vitro* vermehren kann. Der Beweis hierfür ist für Endothelzellen<sup>42,62</sup>, Makrophagen<sup>40</sup> und glatte Muskelzellen<sup>65,102</sup> erbracht worden.

## **1.4 Mikrobiologie von *Chlamydophila pneumoniae***

*Chlamydophila pneumoniae* ist ein häufiger Erreger von respiratorischen Infektionen bei Jugendlichen<sup>56,82</sup>.

Die Infektion mit *C. pneumoniae* ist vermutlich eine Anthroponose, der Mensch stellt das einzige Erregerreservoir dar<sup>81</sup>. Die Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt aerogen. Die Infektion manifestiert sich als Tracheitis, interstitielle Pneumonie oder als eine andere Affektion des Respirationstraktes. Der Verlauf der Erkrankung ist zumeist gutartig.

Der Keim gehört zur Gattung *Chlamydiophila* der Familie *Chlamydiaceae*. Außer *C. pneumoniae* gehören noch andere humanpathogene Keime zur Familie der *Chlamydiaceae*. Es handelt sich hierbei um *Chlamydia trachomatis*, den Erreger des Trachoms, ascendierender Genitalinfektionen sowie des Lymphgranuloma venereum und um *Chlamydophila psittacii*, den Erreger der Psittakose, einer von Vögeln übertragbaren interstitiellen Pneumonie<sup>81</sup>.

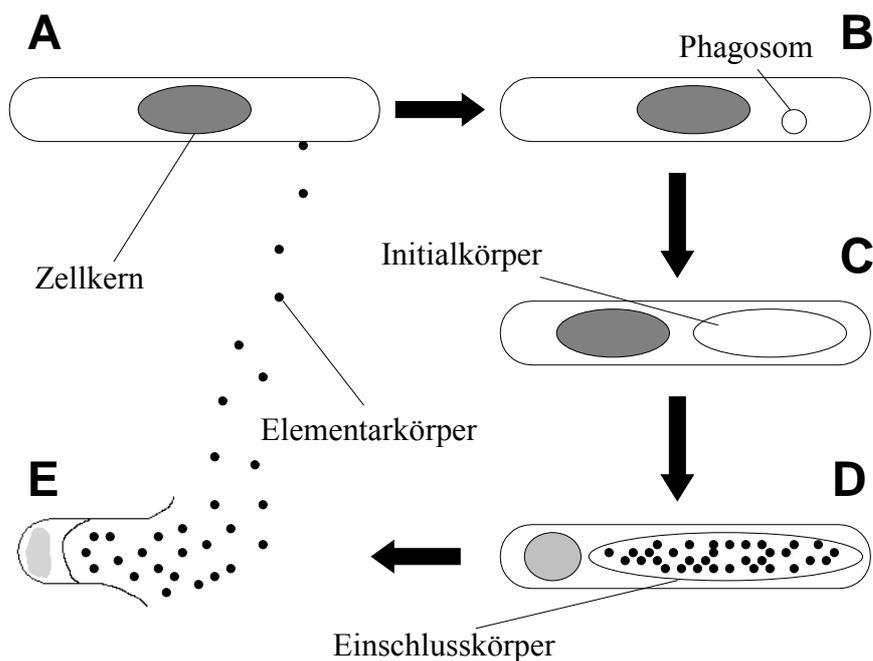
Die Gattung *Chlamydia* ist seit 1907 bekannt. In diesem Jahr wies von Prowazek Einschlusskörper im Konjunktivalepithel von Trachompatienten nach<sup>45</sup>.

*C. pneumoniae* wurde im Jahr 1965 in Taiwan als TW-183 zum ersten Mal isoliert<sup>45</sup>. 1986 wurde *C. pneumoniae* mit respiratorischen Infektionen in Zusammenhang gebracht und ihm der Name TWAR (Taiwan Acute Respiratory) verliehen<sup>46</sup>. Die Umbenennung zu *C. pneumoniae* und die Einordnung in die Gattung *Chlamydia* erfolgte 1989<sup>45</sup>. Die Unterteilung der Gattung *Chlamydia* in *Chlamydia* (*C. trachomatis*) und *Chlamydophila* (*C. pneumoniae* und *C. psittacii*) erfolgte 1999<sup>32</sup>.

Chlamydien sind kleine, obligat intrazelluläre Bakterien<sup>81</sup>. Die obligate intrazelluläre Vermehrung beruht auf der Tatsache, dass Chlamydien, im Gegensatz zu anderen Bakterien, die Fähigkeit zur Synthese von Nukleotiden fehlt. Sie sind somit auf die Versorgung mit Nukleotiden von der eukaryonten Wirtszelle angewiesen und befinden sich bei der Versorgung mit essentiellen Nährstoffen in ständiger Konkurrenz zur Wirtszelle<sup>7</sup>.

Im Lebenszyklus von *C. pneumoniae* unterscheidet man zwei Formen, das Elementarkörper und das Initialkörper<sup>7</sup>.

Das Elementarkörper stellt die extrazelluläre, infektiöse und nicht vermehrungsfähige Form dar. *C. pneumoniae* adhärirt an Glycosaminoglykane der Zelloberfläche<sup>119</sup>. Nach Adhäsion und Eindringen in die eukaryonte Zelle wandelt sich *C. pneumoniae* von einer cystinreichen Membran umgeben in Initialkörper um und fangen an sich in dieser Vakuole zu vermehren. In den Vakuolen entstehen Chlamydien unterschiedlicher Entwicklungsstadien, später auch Elementarkörper. Diese lichtmikroskopisch sichtbare Vakuole wird Einschlusskörper genannt. Etwa drei Tage nach Infektion kommt es zur Ruptur der Wirtszelle und die entstandenen Einschlusskörper werden freigesetzt und können erneut Zellen infizieren.



**Abbildung 3: Der Vermehrungszyklus von *Chlamydia pneumoniae***

In der Darstellung werden die verschiedenen Phasen der Vermehrung schematisch dargestellt.

- A: Adhäsion eines Elementarkörpers an die Wirtszelle
- B: Internalisation und Umwandlung zu einem Initialkörper
- C: Vermehrung der Initialkörper
- D: Umwandlung zu Elementarkörper und Beginn der Degradation des Zellkerns
- E: Lyse der Zelle und Freisetzung von Elementarkörper

Neueste Untersuchungen zeigten einen weiteren Weg, wie *C. pneumoniae* die Wirtszelle ohne Invasion beeinflussen kann. Okashi und Kollegen konnten zeigen, dass das nicht-adaptive Immunsystem über den Rezeptor Toll-like Receptor 4 auf das chlamydiale Protein HSP60 reagiert<sup>95</sup>. Dieser Rezeptor ist auch auf der Oberfläche von Endothelzellen vorhanden und bewirkt eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1<sup>1</sup>. In Epithelzellen des Respirationstraktes konnten von Jahn und Kollegen nach *C. pneumoniae*-Infektion eine Hochregulation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B sowie die vermehrte Synthese von IL-8 und ICAM-1 nachgewiesen werden<sup>55</sup>.

## **1.5 Zielsetzung und experimentelle Strategie**

Endothelzellen sind entscheidend an der Aufrechterhaltung der Funktion der Blutgefäße beteiligt. Durch ihre Hämostase-beeinflussenden Faktoren halten sie das Gleichgewicht von Koagulation und Fibrinolyse aufrecht.

Aus diesem Grund wurden humane Endothelzellen als Experimentalsystem ausgewählt.

Hierbei wurden humane umbilikal-venöse Endothelzellen verwendet<sup>4</sup>. Da diese Zellen von sehr vielen Forschungsgruppen verwendet werden, die ähnliche Untersuchungen durchführten<sup>22,38,68,86</sup>, konnten dadurch gute Vergleichsmöglichkeiten geschaffen werden.

Vorausgegangene Untersuchungen haben eine Änderung des Expressionsmusters verschiedener Gene nach Infektion mit *C. pneumoniae* in den unterschiedlichen beteiligten Zellpopulationen gezeigt<sup>27,68</sup>. Nach Durchsicht der neueren Literatur wurden aufbauend auf kürzlichen Ergebnissen im Bereich der Hämostasefaktoren<sup>27,38</sup> die Moleküle

Thrombomodulin, PAI-1 sowie PECAM-1 auf ihre Expression überprüft.

Weiterhin sollte mit dieser Arbeit Licht auf die noch weitgehend unerforschten Auswirkungen einer Infektion mit *C. pneumoniae* auf die unmittelbare zelluläre Signaltransduktion geworfen werden. Vorausgehende Arbeiten konnten belegen, dass eine Infektion mit *C. pneumoniae* den Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert und die Expression in verschiedenen Zellpopulationen steigert<sup>68</sup>. Somit lag es nahe, einen neben NFκB weiteren zentralen Transkriptionsfaktor für Zellaktivierung und –wachstum zu untersuchen.

Unter inflammatorischen Bedingungen wird neben NFκB ein weiterer intrazellulärer Signaltransduktionsweg über Mitogen-aktivierte Protein(MAP)-Kinasen eingeschaltet. Dieser intrazelluläre Kaskade mündet in der Aktivierung des Aktivator-Protein-1 Komplexes, welcher als Transkriptionsfaktor proinflammatorische und proliferative Gene heraufreguliert<sup>61,107,123</sup>. Der Aktivator-Protein-1 Komplex ist ein Transkriptionsfaktor, welcher sowohl durch inflammatorische Stimuli wie Zytokine als auch durch Wachstumsfaktoren induziert wird. Die Regulation des AP-1 Komplexes erfolgt auf mRNA-Ebene, durch posttranslationale Modifikation und durch Regulation des Abbaus. Aus diesem Grunde wurde die Expression der Monomere c-jun und c-fos auf Ebene der mRNA-Expression und Proteinexpression untersucht.

Als weiterer Transkriptionsfaktor wurde Egr2/KROX-20 untersucht. Er gehört zur Familie der „early growth response“ Gene und stellt einen weiteren proliferativen Transkriptionsfaktor dar<sup>39,59,99,106,121</sup>.

Auf diesem Wege sollte die Chlamydienhypothese auf zellulärer Ebene kritisch überprüft werden. Durch geeignete Testverfahren wurden molekulare Parameter der Blutgerinnung und frühe Transkriptionsfaktoren untersucht.

Die Mehrzahl der zu untersuchenden Faktoren wurde auf zwei Ebenen untersucht, der Ebene der Gentranskription und der Ebene der Translation. Zur Analyse der Transkription wurde die Northern Blot Methode verwendet, die Proteinexpression wurde mittels proteinanalytischer Verfahren (zellulärer ELISA, Western Blot) untersucht.

## 2 Materialien

### 2.1 Geräte

Autoklav	Webeco, Bad Schwabach
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Osterrode
	Memmert, Schwalbach
Betacounter Rackbeta 1217	LKB, Bromma, Schweden
CASY 1 Cell Counter	Schärfe System, Reutlingen
Crosslinker, UV-Stratalinker 1800	Stratagene, Heidelberg
Elektrophoreseapparatur für DNA/RNA-Gele	BioRad, München
Elektrophoreseapparatur für Proteingele	Stratagene, Heidelberg
ELISA-Photometer	SLT, Crailsheim
Filmkammer mit Verstärkerfolie	Intas, Göttingen
Hybridisierungssofen	Stratagene, Heidelberg
Laborwaage	A & D Company, USA
Magnetrührer	Heidolph, Kelkheim
Magnetrührer MR2002	Heidolph Elektro, Kelheim
Mikroskop (Phasenkontrast)	Olympus Optical, Japan
Mikroskop Axiovert	Carl Zeiss, Jena
pH-Meter	WTW, Weilheim
Phosphorimager SF	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
Photometer Genequant <sup>®</sup>	Pharmacia, Freiburg
Pipetten	Gilson, Frankreich
	Eppendorf, Hamburg
Push Column Beta Shield Device	Stratagene, Heidelberg
Rollinkubator	Karl Hecht, Sondheim
Schüttler	Bühler
Signalverstärkerfolien Cronex Lightning Plus	DuPont, Boston, USA
Spannungsgeräte	BioRad, München

Sterile Arbeitsbänke	Flow Laboratories, Meckenheim Heraeus, Osterode
Storage Phosphor Screen	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
Ultraschallgerät Branson Sonifier Cell Disruptor	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla, USA
Vakuumkonzentrator	Bachhofer, Reutlingen
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen
Zellzählgerät	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifugen:	
Sorvall RC 3 (Rotor HG-4)	Sorvall, Langenselbold
Haereus Megafuge 1.0 (Rotor #3360)	Haereus, Hanau
Tischzentrifuge Eppendorf	Eppendorf, Hamburg

## **2.2 Gebrauchsartikel**

Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Lincoln Park, USA
Filme X-OMAT AR	Eastman Kodak Co., Rochester, USA
Gewebekulturröhrchen: Polystyrene-Röhrchen 6 ml, steril	Greiner, Frickenhausen
Glasplättchen (für Kultur in Gewebekulturröhrchen), Ø12mm	Nunc, Roskilde, Dänemark
Glaswaren	Schott, Mainz
Knopfkanülen und Nadeladapter	Greiner, Frickenhausen
Kulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> und 80 cm <sup>2</sup> (aus Polystyrene, steril)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Mikrotiterplatten (mit 96 Vertiefungen)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Nitrozellulose Transfermembran BA 85	Schleicher und Schuell, Dassel
Nylonmembran Hybond N+-	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Reinigungssäulen NucTrap	Stratagene, Heidelberg
Sedimentationsröhrchen 12 ml und 50 ml (Polypropylen)	Greiner, Frickenhausen

Spritzen  
Zellschaber, 23 cm  
Zentrifugenröhrchen 1,5 und 2 ml

Braun, Melsungen  
Nunc, Roskilde, Dänemark  
Eppendorf, Hamburg

## **2.3 Chemikalien**

Allgemeine Laborchemikalien, Lösungsmittel und  
Feinchemikalien in p.a. Qualität

Boeringer, Mannheim  
Merck, Darmstadt  
Pierce, Köln  
Roth, Karlsruhe  
Serva, Heidelberg  
Sigma, Deisenhofen

## **2.4 Medien und Zusätze**

Amphoterin B  
Ampicillin  
Cycloheximid  
Endothelzellmedium Customers Formulation  
Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert  
Gentamicin  
Hanks' Salzlösung (HBSS)  
L-Glutamin  
Minimal essential Medium mit „Earles salts“ und 25 mM  
HEPES  
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)  
Penicillin  
Streptomycin  
Vitaminlösung

GibcoBRL, Karlsruhe  
GibcoBRL, Karlsruhe  
Sigma, Deisenhofen  
Promocell,  
GibcoBRL, Karlsruhe  
Serva, Heidelberg  
GibcoBRL, Karlsruhe  
GibcoBRL, Karlsruhe  
GibcoBRL, Karlsruhe  
GibcoBRL, Karlsruhe  
Serva, Heidelberg  
Serva, Heidelberg  
GibcoBRL, Karlsruhe

## 2.5 Proteine und Antikörper

Anti-Chlamydia-Antikörper (Pathfinder Chlamydia Culture Conformation System, FITC-gekoppelt, Maus)	Sanofi Diagnostics Pasteur, USA
Anti-c-jun(H79)-Antikörper (IgG, Hase)	Santa Cruz Laboratories, USA
Anti-Hasen-IgG-Antikörper (POD-gekoppelt, Ziege)	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG-Antikörper (POD-gekoppelt, Ziege)	Dianova, Hamburg
Anti-PECAM-1-Antikörper (IgG, Maus)	Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim
Anti-Thrombomodulin-Antikörper (IgG, Maus)	Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim
Proteingrößenstandard Prestained SDS-Page Standard Low Range	BioRad, München

## 2.6 Nuklide, Oligonukleotide und DNA

$[\alpha^{32}\text{P}]$ dATP	Amersham Buchler, Braunschweig
DNA-Längenstandards	GibcoBRL, Karlsruhe
PAI-1 cDNA	Institut für Hämostaseologie, Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim
Plasmid E300 (Vektor pUC18, Insert c-fos)	IMT, Marburg
Flankierende Restriktionsschnittstellen: Sac I, Hpa I	AG Prof. Dr. R. Müller
Plasmid pHJ (Vektor Bluescript SK, Insert c-jun)	Institut für Hämostaseologie, Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim
Flankierende Restriktionsschnittstellen: EcoR I, Hind III	Institut für Hämostaseologie, Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim
Plasmid pJDM1118 (Vektor CMVneo, Insert EGR-2/KROX-20)	Institut für Hämostaseologie, Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim
Flankierende Restriktionsschnittstellen: Mlu I, Xba I	Institut für Hämostaseologie, Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim
Thrombomodulin cDNA	Institut für Hämostaseologie, Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim

β-Aktin cDNA

Institut für Hämostaseologie,  
Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim

## 2.7 Enzyme

Kollagenase

GibcoBRL, Karlsruhe

Trypsin

GibcoBRL, Karlsruhe

DNA-Restriktionsendonukleasen

Pharmacia Biotech, Freiburg

(Sac I, Hpa I, EcoR I, Hind III, Mlu I, Xba I)

## 2.8 Spezielle Materialien

ECL-Lösung

Amersham Buchler,  
Braunschweig

High Prime DNA Labelling Kit

Boehringer, Mannheim

- High Prime Reaktionsgemisch
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Hybridisierungslösung Quickhyb

Stratagene, Heidelberg

QIAquick Gel Extraktion Kit

Qiagen, Hilden

- Puffer QX1
- Puffer PE
- Puffer EB

Bicinchonic Acid (BCA) Assay Kit

Pierce, USA

- Lösung A
- Lösung B

## **2.9 Hergestellte Puffer, Medien und Lösungen**

Auftragspuffer (2x) für	0,08	M	Triethanolamin pH 7,5
Denaturierende Agarosegele	4	mM	EDTA
	15	% (v/v)	37% Formaldehyd
	82,5	% (v/v)	Formamid (deionisiert)
	4	% (w/v)	Ficoll 400
	0,2	% (w/v)	Bromphenolblau
Auftragspuffer (5x) für Agarosegele	25	mM	Tris/HCl, pH 7,0
	150	mM	EDTA
	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau
	25	% (w/v)	Glycerin
Auftragspuffer für denaturierende Agarosegele	0,35	M	Tris/HCl, pH 6,8
	10,28	%	SDS
	36	%	Glycerin
	0,6	M	DTT
	0,012	%	Bromphenolblau
Blotpuffer für Western Blot	20	mM	Tris
	216	mM	Glycin
	20	%	Methanol
Coomassie-Färbelösung	0,25	% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R 250
	45,40	% (v/v)	Methanol
	12,80	% (v/v)	Essigsäure
Entfärbelösung für Coomassie	20,0	% (v/v)	Isopropanol
	7,5	% (v/v)	Essigsäure
	3,0	% (v/v)	Glycerin

GuSCN-Puffer	4	M	Guanidinthiozyanat
	25	mM	Natriumzitat
	0,5	% (w/v)	N-Lauroylsarkosin
HBS	137	mM	NaCl
	4	mM	KCl
	11	mM	Glucose
	10	mM	HEPES
			Mit 1M NaOH pH 7,5 einstellen
Laufpuffer für denaturierende Agarosegele	0,04	M	Triethanolamin pH 7,5
	2	MM	EDTA
	8,3	% (v/v)	37% Formaldehyd
LB-Agarplatten	1	% (w/v)	NaCl
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	1	% (w/v)	Casein Hydrolysat
	1,5	% (w/v)	Agar
			autoklavieren, zugeben von Ampicillin und ausplattieren in sterile Petrischalen (25ml)
LB-Medium	1	% (w/v)	NaCl
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	1	% (w/v)	Casein Hydrolysat
			Autoklavieren und Zugabe von Ampicillin (100µg/ml)
Lysepuffer	200	mM	NaOH
	1	%	SDS
Methylenblau+-Lösung	0,04	% (w/v)	Methylenblau
	0,5	M	Natriumacetat pH 5,2

MTT-Lösung	5	mg/ml	MTT in PBS
NaOAc-Lösung	16,42	g	NaOAc
	40	ml	ddH <sub>2</sub> O
	35	ml	Eisessig
			pH 4 einstellen, ad 100ml ddH <sub>2</sub> O
Neutralisationspuffer	3	M	KOAc, pH 5,5
PBS	140,0	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	10,1	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,8	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Pierce Reagenz	10	ml	Lösung A des BCA-Assay Kits
	0,2	ml	Lösung B des BCA-Assay Kits
Ponceau S-Lösung	10	ml	Ponceau S
	40	ml	PBS
Resuspendierungspuffer	50	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	10	mM	EDTA
	100	µg/ml	Rnase A
RIPA-Puffer	50	Ml	1 M Tris/HCl, pH 7,5
	7,5	ml	5 M NaCl
	2,5	ml	Nonidet P-40
	1,25	g	Desoxycholat-Natriumsalz
	250	ml	ddH <sub>2</sub> O
RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor	4,8	ml	RIPA-Puffer
	0,2	ml	Protease-Inhibitor 25 x
Rotiphorese Gel 30	30	%	Acrylamid
	0,8	%	N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid

SDS-Auftragspuffer (6x)	0,35	M	Tris/HCl, pH 6,8
	10,3	% (w/v)	SDS
	36	% (v/v)	Glycerin
	0,6	M	DTT
	0,01	% (w/v)	Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	50	mM	Tris base
	384	mM	Glycin
	0,2	% (w/v)	SDS
SOC-Medium, pH 7,0	2	% (w/v)	Casein Hydrolysat
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	10	mM	NaCl
	2,5	mM	KCl
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	10	mM	MgSO <sub>4</sub>
	20	mM	Glucose
SSC	0,15	M	Natriumchlorid
	0,015	M	Natriumzitat
Standardmedium	10	% (v/v)	Fötale Kälberserum
	1,2	µg/ml	Cycloheximid
	2,5	µg/ml	Amphotericin B
	50	µg/ml	Gentamicin
	2	mM	L-Glutamin
			in minimal essential Medium mit “Earles Salts” und 25 mM HEPES
STE-Lösung	100	mM	NaCl
	10	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	1	mM	EDTA

---

Substratpuffer für cELISA	4	mg	O-Phenyldiamin
	9	ml	0,1M di-Natriumhydrogenphosphat
	1	ml	0,5M Zitronensäuremonohydrat
	100	µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
TAE-Puffer	40	mM	Tris-Base
	1	mM	EDTA
	20	mM	Natriumazetat
TBE-Puffer	0,1	M	Tris-Base
	0,1	M	Borsäure
	0,002	MM	EDTA, pH 8,0
Trypsin/EDTA	20	mM	HEPES-Puffer, pH 7,6
	5	mM	EDTA
	0,72	% (v/v)	NaCl
	0,005	% (v/v)	Trypsin

## **2.10 Zellen und Zelllinien**

### **2.10.1 Prokaryontische Zellen**

*Chlamydomytila pneumoniae*:

GiD; Herkunft: Institut für medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen  
(Isolat eines Patienten mit akuter Bronchitis)<sup>57</sup>

*Escherichia coli*:

JM109; Herkunft: Promega

### **2.10.2 Eukaryontische Zellen**

*HEp-2 Zelllinie*:

Humane Larynxkarzinomzelllinie mit epithelialer Morphologie, HeLa- Charakteristika  
(ECACC Nr.:86030501; ATCC Nr. CCL 23)

*Humane umbilikal-venöse Endothelzellen (HUVEC)*:

Eigene Präparation aus humanen Nabelschnüren (freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Hochwaldkrankenhaus, Bad Nauheim und der Hessenklinik, Wetzlar)

## **3 Methoden**

### **3.1 Experimentelle Bedingungen**

Sofern nicht anders erwähnt wurden alle Reaktionen bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **3.2 Zellkultur**

#### **3.2.1 Kultur von HEp-2 Zellen**

##### **3.2.1.1 Kulturstart**

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten HEp-2 Zellen wurden in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Die Suspension wurde in 20 ml Standardmedium aufgenommen. Es folgte eine Zentrifugation über 10 Minuten bei 43,3 g. Das Sediment wurde mit 8 ml Standardmedium vorsichtig resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

##### **3.2.1.2 Passage der Kultur**

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die HEp-2-Zellen mit 5 ml Trypsin vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Der Prozess wurde mit 5 ml Standardmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Sedimentationsröhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation über 10 Minuten bei 43,3 g. Das Zellpellet wurde in 7 ml Standardmedium aufgenommen und 1:4 in neue Kulturgefäße ausgesät.

##### **3.2.1.3 Herstellung eines HEp-2 Lysates**

Die HEp-2-Zellen wurden vom Boden der Kulturflasche mit Hilfe eines Zellschabers mechanisch abgelöst. Die Zellsuspension aus vier Flaschen wurden vereinigt. Es erfolgte eine Ultraschallbehandlung der Zellsuspension für 30 s bei 75 Watt. Die anschließende Differentialzentrifugation wurde zweimal über 10 Minuten bei jeweils 1560 g durchgeführt.

Der gewonnene Überstand wurde aliquotiert und mit gleicher Menge Einfriermedium versetzt. Die Lagerung erfolgte bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.2 Kultur von humanen umbilikal-venösen Endothelzellen**

#### **3.2.2.1 Isolierung**

Die verwendeten Nabelschnüre wurden maximal drei Tage bis zur Endothelzellpräparation bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Isolierung der humanen umbilikal-venösen Endothelzellen (HUVE-Zellen) erfolgte nach der Methode von Jaffe et. al auf einer sterilen Arbeitsbank<sup>54</sup>.

In die Vene der gereinigten Nabelschnur wurde eine Knopfkanüle eingeführt. Durch spülen der Nabelschnur mit HBS wurde sie von Blut weitgehend gesäubert. Das andere Ende der Vene wurde nun mit einem sterilen Nadeladapter versehen und verschlossen. Die Nabelschnur wurde mit Kollagenaselösung prall gefüllt und bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 5 Minuten inkubiert. Nach vorsichtiger Massage der Nabelschnur wurde sie erneut mit HBS gespült. Der Durchfluss wurde in einem 50 ml Sedimentationsröhrchen mit 1 ml foetalem Kälberserum aufgefangen.

Das Sedimentationsröhrchen wurde 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 ml Endothelzellmedium resuspendiert und in einer mit 0,2%iger Gelatine-beschichteten Petrischale ausgesät.

#### **3.2.2.2 Passage**

Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie mit Trypsin/EDTA vom Schalenboden gelöst. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml Endothelzellmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 50 ml Sedimentationsröhrchen überführt. Durch Zentrifugation bei 300 g für 50 Minuten sedimentierten die Zellen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Endothelzellmedium resuspendiert. Es folgte eine Zellzählung mit einem automatischen Zellzählapparat.

Anschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von 10.000 Zellen/ $\text{cm}^2$  in Kulturgefäße überführt.

Für Northern und Western Blot Versuche dienten 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit 5 ml Endothelzellmedium und für zelluläre ELISAs und Zellaktivitätstests 96-Vertiefungs-Platten mit je 100 µl Endothelzellmedium.

Die Infektion erfolgte vier Tage nach der ersten Passage. In den letzten 24 Stunden wurde Endothelzellmedium gegen Infektionsmedium ausgetauscht. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die mit Endothelzellmedium weiterkultiviert wurden.

### 3.2.3 Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid -Test

Lebende Zellen nehmen das schwach gelbe Tetrazolium-Salz Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) auf und setzen zu einem stark blauem, wasserunlöslichen Farbstoff um<sup>88</sup>. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen. Zu 100 µl Medium wurde je 100 µl MTT-Lösung hinzugegeben und gemischt. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Medium entfernt und je 20 µl 3% SDS und 100 µl Isopropanol hinzugegeben und die Zellen damit lysiert. Durch Schütteln der Zellkulturplatte mit 100 rpm wurde die Lösung gemischt.

Nach 15 Minuten erfolgte eine Messung der Extinktionen mittels eines ELISA-Readers bei 562 nm. Als Referenz diente die Extinktion bei 630 nm.

### 3.2.4 Mycoplasmen-Test

Die Dauerkultur von *Chlamydomphila pneumoniae* in HEp-2-Zellen wurde in regelmäßigen Abständen auf *Mycoplasmen*-Kontamination untersucht. Dies erfolgte mittels *Mycoplasmen*-PCR im Zentrum für medizinische Mikrobiologie des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen.

### **3.3 Infektion humaner Zellen mit *Chlamydomphila pneumoniae***

#### **3.3.1 Chlamydienkultur**

##### **3.3.1.1 Kulturstart**

Zur Anzucht der Chlamydien wurde ein etabliertes Verfahren nach Roblin verwendet<sup>101</sup>. Die bei -70°C gelagerten *C. pneumoniae* Lösungen wurden bei 37°C aufgetaut. Jeweils 1 ml Lösung diente zum Infizieren einer 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit konfluenten HEp-2-Zellen. Eine Zentrifugation über 60 Minuten bei 1320 g und 30°C führte zur Aufnahme der Chlamydien in die HEp-2-Zellen. Nach weiteren 60 Minuten Inkubation in einem Brutschrank bei 37°C erfolgte ein Mediumwechsel mit Standardmedium. Nach drei Tagen Kultur erfolgte die Passage.

##### **3.3.1.2 Passage der Chlamydienkultur**

Die infizierten HEp-2-Zellen wurden vom Boden der Kulturflasche mit Hilfe eines Zellschabers mechanisch abgelöst. Die Zellsuspension aus vier Flaschen wurden vereinigt. Es erfolgte eine Ultraschallbehandlung der Zellsuspension für 30 Sekunden bei 75 Watt. Mit einer anschließenden Differentialzentrifugation über zweimal 10 Minuten bei jeweils 1560 g bei Raumtemperatur erreichte man eine Abtrennung der größeren Zellbruchstücke von den Chlamydien. Der chlamydienhaltige Überstand wurde mit der gleichen Menge Standardmedium verdünnt und für einen erneuten Infektionszyklus auf konfluente HEp-2-Zellen überführt.

Zur Kontrolle des Chlamydientiters wurden HEp-2-Zellen in Gewebekulturröhrchen mit Chlamydien suspensionen verschiedener Verdünnungsstufen ( $10^{-1}$  –  $10^{-4}$ ) infiziert.

##### **3.3.1.3 Immunfluoreszenzfärbung infizierter Zellen**

Die Fixation der mit *C. pneumoniae* infizierten Zellen erfolgte durch Methanol. Nach 10 Minuten wurde das Methanol entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden 20 µl der *Pathfinder*-Lösung (Anti-*C. pneumoniae*-Antikörper mit Evans blue) hinzugegeben, der Zellrasen für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert und mit PBS gewaschen.

Mit dem Fluoreszenzmikroskop konnten die Chlamydien nun als grüne Einschlüsse nachgewiesen werden.

### 3.3.1.4 Ermittlung des Chlamydientiters

Die Anzahl Chlamydieneinschlusskörper im konfluenten Zellrasen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop gezählt. Der Titer wurde in *inclusion-body forming units* (IFU, Einschlusskörper-bildende Einheiten) angegeben.

Es wurde die Verdünnungsstufe ausgewertet, in welcher die Chlamydieneinschlusskörper klar zu erkennen und gut zu zählen waren. Der Titer der Chlamydien suspension ergab sich nach folgender Formel:

$$IFU / ml = \frac{\text{Anzahl der Einschlusskörper} * \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Mediummenge}[ml]}$$

### 3.3.1.5 Ernte und Lagerung der Chlamydien

Bei ausreichend hoher Zahl an Chlamydieneinschlusskörpern ( $>10^6/ml$ ) konnte die erhaltene Chlamydien suspension für Infektionsexperimente verwendet werden.

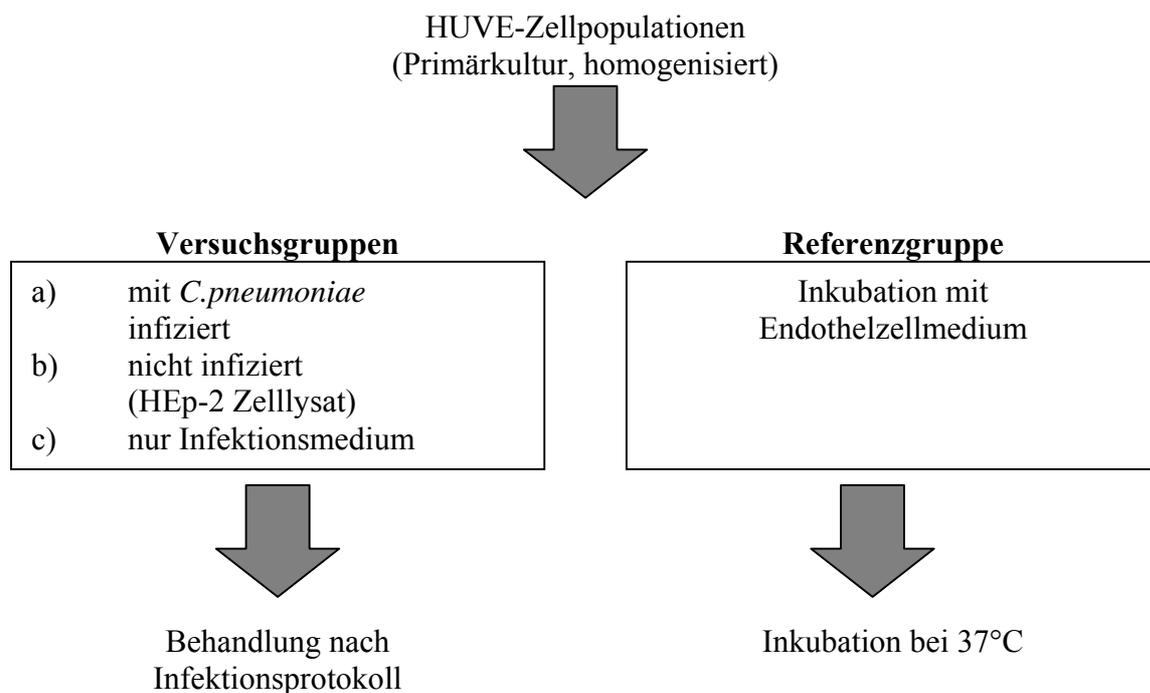
Die Suspension wurde nach Differentialzentrifugation mit gleichen Teilen des SPG-Puffers versetzt und aliquotiert. Anschließend wurde sie bei -70°C gelagert.

Um Einflüsse des Einfriervorgangs auf den Titer der Chlamydien suspension auszuschließen, erfolgte die endgültige und verbindliche Titerbestimmung einige Tage später nach Auftauen eines Aliquots. Damit alle Einschlusskörper fehlerfrei gezählt werden konnten, wurden Mehrfachbestimmungen in Gewebekultur-Multititerplatten mit konfluentem HEp-2-Zellrasen durchgeführt.

### 3.3.2 Infektion humaner umbilikal-venöser Endothelzellen

#### 3.3.2.1 Infektion

Vor der Durchführung der Experimente wurden die HUVE-Zellen in drei bis vier verschiedene Gruppen unterteilt. Für jedes Experiment wurde eine Gruppe der Zellen tatsächlich mit *C. pneumoniae* in HUVE-Zell-Infektionsmedium infiziert, eine Gruppe wurde mit einem HEp-2-Lysat gleicher Verdünnung in HUVE-Zell-Infektionsmedium behandelt und bei einer Gruppe wurde mit Endothelzellmedium weiter inkubiert (Abbildung 3). Für die ELISA-Experimente wurde eine weitere Gruppe nur mit HUVE-Zell-Infektionsmedium behandelt.



**Abbildung 4: Einteilung der unterschiedlichen Gruppen**

Die Kulturflaschen mit HUVE-Zellen wurden in Versuchsgruppe und Referenzgruppe unterteilt. Die Versuchsgruppen wurden jeweils mit *C. pneumoniae* infiziert, mit HEp-2 Lysat oder mit Infektionsmedium inkubiert und nach Infektionsprotokoll behandelt. Die Referenzgruppe wurde nur mit Endothelzellmedium inkubiert und unbehandelt gelassen.

Die HUVE-Zellen wurden mit  $10^7$  IFU/cm<sup>2</sup> Kulturflasche infiziert. Die Verdünnung der Chlamydien suspension in HUVE-Zell-Infektionsmedium ergab sich aus dem zuvor bestimmten Titer (siehe 2.4.2.3). Das HEp-2-Lysat wurde ebenfalls 1:10 verdünnt.

Es folgte eine Zentrifugation für 60 Minuten bei 1340 g bei 30°C und anschließend eine Inkubation für 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C.

Die Zellen wurden zu den vorgesehenen Zeiten fixiert bzw. geerntet.

### **3.3.2.2 Ernte der Zellen für Northern Blot**

Um Mediumrückstände zu entfernen, wurden die Zellen zunächst mit PBS gespült.

Anschließend erfolgte eine Zellyse mit 400µl GuSCN-Puffer/0,7% β-Mercaptoethanol. Nach 2 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mechanisch mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein 1,5ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Proben wurden homogenisiert und sofort auf -20°C überführt.

### **3.3.2.3 Fixierung der Zellen für zellulären Enzyme linked immuno-sorbent assay**

Nach gründlicher Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit 100 µl 2% Formaldehyd pro Vertiefung für 30 Minuten fixiert. Jede Vertiefung wurde dann mit 200 µl HBS und 100 µl 0,1% Tween PBS gespült. Als immunologische Blockierung dienten 200 µl 3% Milchpulver in PBS pro Vertiefung. Bis zur Auswertung mittels cELISA wurden die Platten auf 4°C gelagert.

### **3.3.2.4 Ernte der Zellen für Western Blot**

Die konfluenten HUVE-Zellen wurden in der 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche zweimal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 1 ml RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor zugegeben. Nach 30 Minuten auf einem Schüttler bei 4°C wurden die Zellen mechanisch mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Suspension homogenisiert und schockgefroren mittels Flüssigstickstoff. Die Suspension wurde bis zur Weiterverarbeitung aliquotiert und auf -70°C gelagert.

## **3.4 Nukleinsäurechemie**

### **3.4.1 Gelelektrophorese von Nucleinsäuren**

Die Auftrennung von RNA- und DNA Fragmenten erfolgte durch Gelelektrophorese unter unterschiedlichen Bedingungen<sup>73,110</sup>.

#### **3.4.1.1 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese**

Zur Auftrennung von cDNA-Fragmenten, zur Analyse von Restriktionen und zur Konzentrationsbestimmung wurde ein 0,5-2%iges Agarosegel verwendet. Die Agarose wurden in 80 ml TBE-Puffer zum Kochen gebracht und nach Zugabe von 0,8 µl Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,1 µg/ml) zu einem Gel gegossen. Nach abkühlen des Gels wurde der Kamm entfernt und der Gelschlitten in eine mit Laufpuffer gefüllte Gelkammer eingesetzt. Als Laufpuffer diente TBE-Puffer. Zur präparativen Auftrennung von cDNA-Fragmenten wurde anstatt TBE-Puffer TAE-Puffer verwendet.

Die DNA-Fragmente wurden nun durch eine Spannung von 5 V/cm getrennt. Die spezifischen DNA-Ethidiumbromid-Komplexe wurden nach 90 Minuten Elektrophorese mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

#### **3.4.1.2 Denaturierendes Formaldehyd-Gel**

Die Auftrennung der mRNA-Fragmente erfolgte unter denaturierenden Bedingungen.

Dies wurde mit der Anwesenheit von Formaldehyd erreicht.

1,13 g Agarose wurde zusammen mit 65 ml ddH<sub>2</sub>O, 3 ml Triethanolamin und 0,3 ml EDTA-Lösung zum Kochen gebracht. Nach abkühlen auf 60°C wurden 6,25 ml 37% Formaldehyd und 0,75 ml SDS-Lösung (10x) hinzugegeben und zu einem Gel gegossen.

Nach abkühlen und entfernen des Kamms wurde der Gelschlitten in eine mit Laufpuffer für denaturierende Gele gefüllte Gelkammer eingesetzt. Die Auftrennung der RNA erfolgte durch eine angebrachte Spannung von 5V/cm.

## 3.4.2 Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung

### 3.4.2.1 Bestimmung durch Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten

Die cDNA-Konzentrationen wurden im Gelbild bestimmt, da mit dieser Methode auch Konzentrationen  $<2\mu\text{g/ml}$  quantifiziert werden können.

Die cDNA wurde mit gemeinsam mit Lösungen einer definierten Standard-DNA-Konzentrationsreihe auf einem analytischen Gel beurteilt. Durch Interkalation des Ethidiumbromids konnte die DNA im durchscheinenden UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mittels Abschätzung durch Vergleich mit einer Markerbande gleicher Konzentration.

### 3.4.2.2 Spektralphotometrische Bestimmung

RNA-Konzentrationen wurden mit dieser Methode bestimmt.

Die Absorption der Nukleinsäuren ist im Wellenlängenbereich von 260 nm maximal.

2  $\mu\text{l}$  RNA-Lösung wurden zu 78  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O hinzugegeben. Mit einem Photometer wurde nun die Nukleinsäurekonzentration bestimmt. Die Konzentration wurde anhand der Extinktion der Flüssigkeit gegenüber Wasser bestimmt. Für die Konzentration reiner RNA-Lösungen gilt:

$$\text{RNA-Konzentration}[\mu\text{g/ml}] = OD_{260} * 40 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

OD<sub>260</sub>: optische Dichte bei 260 nm

In diesem Fall hatte der Verdünnungsfaktor ebenfalls den Wert 40.

Mit der Absorption bei 280 nm konnten eventuelle Proteinverunreinigungen festgestellt werden. Für reine Nukleinsäurelösungen sollte der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und der bei 280 nm den Wert 2,0 annehmen.

### 3.4.3 Plasmidpräparation

#### 3.4.3.1 Transformation von kompetenten *Escherichia coli*-Bakterien

Die Plasmide wurden in kompetente JM109-Zellen transformiert. Dies erfolgte anhand der Anwendungsprotokolle des Herstellers. 50 µl JM109-Zellen wurden mit 3 µl Plasmid vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 30 Sekunden bei 42°C inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation auf Eis für 2 Minuten. Es folgte eine Resuspendierung in SOC-Medium und eine Inkubation für 60 Minuten bei 37°C auf einem Schüttler.

30 µl der erhaltenen Suspension wurden auf eine ampicillinhaltige LB-Platte ausplattiert und über Nacht im Bakterienbrutschrank auf 37°C inkubiert. Eine Kolonie wurde in 5 ml LB<sub>amp</sub>-Medium in einem 12 ml Röhrchen suspendiert. Nach erneuter Inkubation über Nacht auf 37°C unter Schütteln erfolgte eine Plasmidpräparation aus der Übernachtskultur.

#### 3.4.3.2 Präparation von Plasmid-Desoxyribonukleinsäure

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach der von Birnboim und Doly beschriebenen Methode<sup>12</sup>.

Von der Übernachtskultur (Punkt 3.4.3.1) wurden 2 ml in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zentrifugation mit 8000g bei 4°C sedimentierten die Zellen. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 150 µl Resuspendierungspuffer gelöst. 150 µl Lysepuffer wurden hinzugegeben, vorsichtig gemischt und die Lösung 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Neutralisationspuffer addiert und erneut 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation mit 10.000g bei 4°C. Der Plasmid-haltige Überstand wurde in neue 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 1 ml Ethanol gefällt. Eine anschließende Zentrifugation mit 10.000g diente zur Sedimentierung der Plasmid-DNA. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet zweimalig mit 70% Ethanol gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde 5 Minuten bei 10.000g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet vier Minuten in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 3.4.3.3 Restriktionsverdau von Plasmid- Desoxyribonukleinsäure

Der Restriktionsansatz wurde mit 0,5 µg des unverdauten Plasmids in ddH<sub>2</sub>O im Gelbild verglichen. Beide Ansätze wurden mit Auftragspuffer (5x) verdünnt. Zur Größenbestimmung der Fragmente diente eine 1kb DNA-Leiter. Nach 5 Minuten erhitzen auf 65°C und anschließendem kurzen Eisbad wurden die Proben aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 100V über 90 Minuten. Das Ergebnis wurde in einem analytischen Gel beurteilt.

Bei erfolgreicher Restriktion schloss sich ein präparativer Verdau über Nacht an. Die in dem präparativen Verdau erhaltenen Fragmente wurden in einem präparativen Gel aufgetrennt. Der Restriktionsansatz wurde mit Auftragspuffer (5x) verdünnt. Zum Größenvergleich dienten eine 1kb DNA-Leiter und fakultativ eine 100bp DNA-Leiter. Durch Erhitzen auf 65°C und anschließendes schnelles abkühlen mit Eis wurden die cDNA-Doppelstränge getrennt.

Die Elektrophorese erfolgte bei 75V über 120 Minuten.

### 3.4.3.4 Isolierung der Desoxyribonukleinsäure-Fragmente aus einem präparativen Gel

Die Extraktion der cDNA aus dem Gel erfolgte mit einem *QIAquick™ Gel Extraction Kit* nach Angaben des Herstellers.

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht mittels eines Skalpell aus dem Gel herausgetrennt, in einem Zentrifugenröhrchen mit 3 Teilen Puffer QX1 versetzt und bei 50°C für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde nun auf eine QIAquick-Zentrifugensäule geladen und eine Minute bei 10.000g zentrifugiert. Die Säule wurde erneut mit 500µl Puffer QX1 geladen und bei 10.000g für eine Minute zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Nach zweimaligem waschen der Säule mit 750µl Puffer PE und anschließendem trocknen der Säule für fünf Minuten erfolgte eine Elution der DNA mit 50µl Puffer EB. Die erhaltene DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

### 3.4.4 Ribonukleinsäure-Präparation

Die RNA-Präparation erfolgte anhand der von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Methode<sup>21</sup>.

Es wurden in jedes Gefäß mit Zelllysat 40 µl NaOAc-Lösung, 400 µl Phenol (H<sub>2</sub>O-gesättigt) und 80 µl Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1 hinzugegeben. Zwischen und nach den einzelnen Schritten wurden die Proben homogenisiert. Es folgten 15 Minuten Inkubation auf Eis. Durch eine Zentrifugation über 20 Minuten bei 10.000g und 4°C erfolgte eine Phasentrennung. Die obere RNA-haltige wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Zu der Lösung wurde die gleiche Menge Isopropanol hinzugegeben. Nach gründlicher Durchmischung folgte eine Inkubation über eine Stunde bei -20°C. Die Proben wurden anschließend erneut 20 Minuten bei 10.000g und 4°C präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment trocknete für 2 Minuten. Anschließend wurde das Sediment in 200 µl GuSCN-Puffer aufgenommen. 200 µl Isopropanol wurden addiert. Nach gründlicher Durchmischung folgte eine Inkubation für 30 Minuten auf -20°C. Durch Wiederholung der Zentrifugation entstand erneut ein Sediment. Der Überstand wurde entfernt.

Das erhaltene Sediment wurde mit 50 µl 70% Ethanol in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach 15 Minuten Zentrifugation mit 10.000g und 4°C wurde das Ethanol abgesaugt.

Das Sediment trocknete für 5 Minuten.

Durch vorsichtiges Erhitzen bis 60°C wurde die RNA in ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 3.4.5 Radioaktive Markierung von Desoxyribonukleinsäure

Zur radioaktiven Markierung der cDNA-Sonden wurden 60 ng cDNA in einem 1,5 ml Zentrifugenröhrchen auf 8 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Durch 10 Minuten Erhitzen in einem kochenden Wasserbad und Abschrecken in einem Eis-Ethanol-Gemisch denaturierte die cDNA. Auf Eis wurden 4 µl High-Prime-Reaktionsgemisch und je 1 µl dCTP, dTTP und dGTP-Lösung (5 mM) hinzugegeben. Anschließend fügte man 5 µl (50 µCi) [ $\alpha^{32}$ P] dATP hinzu. Das Gemisch inkubierte 30 Minuten bei 37°C. Die Reaktion wurde mit 50 µl STE-Lösung gestoppt.

Anschließend wurden die freien Nukleotide mit Hilfe einer Reinigungssäule abgetrennt. Hierzu wurde das Gemisch auf eine mit 70 µl STE-Lösung äquilibrierte Reinigungssäule gegeben. Die freien Nukleotide wurden abgetrennt. Anschließend erfolgte eine Messung der Cerenkow-Strahlung von 1 µl der erhaltenen Sonde mit einem Betacounter.

### **3.4.6 Northern Blot**

Die Northern Blot Analyse der Expression spezifischer mRNA erfolgte mittels Gelelektrophorese, Kapillarblot und anschließender Hybridisierung mittels radioaktiv markierter cDNA-Sonden<sup>64,113</sup>. Die durch Gelelektrophorese aufgetrennte RNA wird mittels spezifischer radioaktiv markierter Sonden detektiert. Die Menge der gebundenen Sonde wird mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert und ist proportional zur gesuchten RNA.

#### **3.4.6.1 Elektrophorese**

Vor Durchführung der Elektrophorese wurde die Konzentration der RNA bestimmt. Je 7,5 µl RNA-Auftragspuffer wurden in RNase-freie 1,5 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt. 12 µl RNA wurden hinzugegeben und die Lösung mit ddH<sub>2</sub>O auf 15 µl aufgefüllt. Nach Homogenisierung wurden die Proben 10 Minuten auf 65°C denaturiert und im Eisbad abgekühlt. Anschließend wurde ein denaturierendes Formaldehyd-Gel mit den Proben beladen und die Gelelektrophorese wie beschrieben durchgeführt.

#### **3.4.6.2 Kapillarblot**

Vor dem Blotvorgang wurde das Gel mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit 20x SSC äquilibriert. Es wurde umgekehrt auf eine mit 10x SSC angefeuchtete Blotapparatur luftblasenfrei aufgelegt. Eine mit 10x SSC angefeuchtete Hybond N+-Membran passender Größe deckte das Gel ab. Zum Kapillartransfer dienten drei Whatman-3MM-Filterpapiere und ein Stapel Papiertücher. Der Stapel wurde mit Hilfe einer Glasplatte und eines Gewichtes beschwert und fixiert.

Der Blotvorgang wurde über Nacht durchgeführt.

#### **3.4.6.3 Fixierung und Färbung der Membran**

Durch UV-Licht bei 1200  $\mu$ Joule x100 wurde die RNA an der Membran fixiert. Nach Reinigen der Membran mit ddH<sub>2</sub>O wurde die Membran 5 Minuten mit Membranfärbelösung gefärbt und anschließend mit 40% Ethanol entfärbt. Die Membran wurde fotografiert. Luftdicht in einer Folie verpackt lagerte die Membran bis zur Hybridisierung auf 4°C.

#### **3.4.6.4 Hybridisierung der Membran**

Als Vorbereitung auf die Hybridisierung wurde die Membran 90 Minuten mit 20 ml QuickHyb-Lösung prähybridisiert. Die Membran rollte diese Zeit in einem Hybridisierungssofen bei 68°C.

Für eine Hybridisierung wurden 1-2 x 10<sup>6</sup> cpm markierte Sonde pro ml Hybridisierlösung eingesetzt. Zu der Sonde wurden 200  $\mu$ l Lachssperma-DNA (10 mg/ml) zur Verhinderung unspezifischer Bindungen gegeben.

Die Sonde wurde für 10 Minuten auf 95°C denaturiert und durch 5 Minuten auf Eis wieder abgekühlt. Anschließend wurde die vorbereitete Sonde in 5 ml QuickHyb-Lösung gegeben. Nach abgießen der Prähybridisierungslösung wurde die Sonde auf die Membran gegeben. Man ließ die Membran nun 60 Minuten bei gleicher Temperatur im Hybridisierungssofen rollen.

Die überschüssige und unspezifisch gebundene Sonde wurden mit den 0,1% SDS in SSC in mehreren Waschschritten von der Membran entfernt. Nach jedem Waschschrift wurde die  $\beta$ -Strahlung mit Hilfe eines Geiger-Müller-Zählrohres gemessen. Bei Unterschreiten von 15 cps wurde das Waschen eingestellt und die Membran in eine Folie luftdicht eingeschweißt.

Über Nacht wurde die Membran mit einem X-OMAT Röntgenfilm in einer Filmkammer mit Verstärkerfolie exponiert.

Nach Kontrolle der Banden am nächsten Morgen konnte die Membran zur Auswertung für mehrere Tage mit einem Storage Phosphor Screen exponiert werden.

Die Quantifizierung der Signale erfolgte an einem Phosphorimager mit der Software Imagequant zur Ermittlung der Signalintensitäten.

#### **3.4.6.5 Standardisierung des Northern Blots mittels $\beta$ -Aktin**

Um die Ergebnisse der Expression spezieller mRNA zu standardisieren und unabhängig von etwaigen Abweichungen in der Menge der aufgetragenen RNA zu machen, wurde jede Membran zunächst mit einer Sonde für das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin hybridisiert. Die

ermittelten Werte dienten bei der Auswertung später als Ausgleichsfaktoren für die mRNA-Expression. Es wurde für die Auswertung der Expression ein Quotient aus Expression der zu untersuchenden mRNA und der  $\beta$ -Aktin mRNA gebildet.

### 3.4.6.6 Auswertung

Nach der Standardisierung durch  $\beta$ -Aktin-Expression erfolgte der Bezug auf die Referenzgruppe. Die Expression der zu untersuchenden mRNA in der unbehandelten Referenzgruppe wurde als 100% definiert. Somit ergibt sich für jede Probe folgende Berechnung der mRNA-Menge im Vergleich zur Referenzgruppe:

$$rel.Expression = \frac{PROBE_{mRNA}}{PROBE_{\beta Aktin}} / \frac{REFERENZ_{mRNA}}{REFERENZ_{\beta Aktin}}$$

$PROBE_{mRNA}$ : Signalintensität der Probe mit spezifischer cDNA-Sonde

$PROBE_{\beta-Aktin}$ : Signalintensität der Probe mit  $\beta$ -Aktin-Sonde

$REFERENZ_{mRNA}$ : Signalintensität der Referenzprobe mit der zu untersuchenden mRNA

$REFERENZ_{\beta-Aktin}$ : Signalintensität der Referenzprobe mit  $\beta$ -Aktin-Sonde

## **3.5 Immunologische und proteinchemische Verfahren**

### **3.5.1 Zellulärer Enzyme linked immuno-sorbent Assay**

Die Methode des *enzyme linked immuno-sorbent assays* (ELISA) stellt eine Methode zur quantitativen Analyse von Proteinen dar<sup>29</sup>. Der zelluläre ELISA (cELISA) stellt eine Abwandlung der ELISA-Technik dar. Hier werden Oberflächenmoleküle fixierter Zellen mittels eines spezifischen Antikörpers gebunden. Dieser Antikörper wird durch einen später hinzugegebenen Zweitantikörper erkannt. Der Zweitantikörper ist mit Peroxidase markiert. Durch Zugabe des Substrats kommt es zu einem Farbumschlag, welcher proportional zur Menge des Oberflächenmoleküls ist.

#### **3.5.1.1 Durchführung des cELISAs**

Zu Beginn der Auswertung mittels eines zellulären enzyme-linked immuno sorbent Assays (cELISA) wurde jede Vertiefung dreimal mit 100 µl 0,1% Tween 20 PBS gespült. 100 µl des Erstantikörpers wurden in jede Vertiefung hinzugegeben. Als Erstantikörper dienten ein Anti-Thrombomodulin-Antikörper und ein Anti-PECAM-1-Antikörper. Beide stammten von einer Maus. Der Anti-TM-Antikörper wurde in der Verdünnung 1:25 in 0,1% Tween 20 PBS eingesetzt, der Anti-PECAM-1-Antikörper in der Verdünnung 1:40. Es wurden je 100 µl pro Vertiefung verwendet.

Die Platten wurden daraufhin 90 Minuten bei 20°C auf einem Schüttler inkubiert.

Anschließend wurde jede Vertiefung dreimal mit 100 µl 0,1% Tween 20 PBS gespült.

Als Zweitantikörper stand ein Peroxidase(POD)-konjugierter gegen Maus-IgG gerichteter Antikörper zur Verfügung. Er wurde zu 100 µl in der Verdünnung 1:4000 in 0,1% Tween 20 PBS pro Vertiefung eingesetzt.

Es folgte eine erneute Inkubation für 60 Minuten bei 20°C auf einem Schüttler.

Nach erneutem dreimaligen Spülen der Vertiefungen mit 0,1% Tween 20 PBS konnte die Auswertung des cELISAs beginnen.

#### **3.5.1.2 O-Phenyldiamin-Entwicklung**

Pro Vertiefung wurden 100  $\mu\text{l}$  Substratpuffer gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte ein Abstoppen der Farbreaktion mittels 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  pro Vertiefung.

Zur Auswertung wurde die Extinktion bei 492 nm Wellenlänge gemessen. Als Referenz diente eine Messung bei 620 nm.

### **3.5.2 Western Blot**

Der Western Blot stellt eine Methode zur quantitativen Detektion von wasserlöslichen Proteinen dar<sup>114</sup>. Die unterschiedlichen Proteine werden mittels Gelelektrophorese getrennt. Daraufhin werden die Proteine durch Anlegen elektrischer Spannung auf eine Membran transferiert. Durch Inkubation der Membran mit spezifischen Antikörpern, Zugabe eines peroxidase markierten Zweitantikörpers und Inkubation mit Substrat kommt es zu einem Farbumschlag. Dieser ist proportional zur Menge des detektierten Proteins.

#### **3.5.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BCA-Assay-Reagenz nach Lowry<sup>80</sup>. Der Proteingehalt des Lysats wurde ermittelt, indem 20  $\mu\text{l}$  jeder Probe mit 200  $\mu\text{l}$  Pierce-Reagenz bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und danach die Extinktion bei 550 nm gegen einen Leerwert gemessen wurde. Die Konzentration wurde anschließend mit Hilfe einer Kalibriergeraden aus in 20 mM Tris/HCl gelösten bovinem Serumalbumin ermittelt.

### 3.5.2.2 SDS-Polyacrylamidelektrophorese

Die Trennung von Proteinen nach ihren Molmassen erfolgte durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen<sup>71</sup>.

Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel ist in der folgenden Tabelle aufgeführt:

	Trenngel (10% Agarose)	Sammelgel (5 % Agarose)
ddH <sub>2</sub> O	3,85 ml	5,65 ml
Rotiphorese Gel 30	3,35 ml	1,65 ml
3 M Tris/HCl pH 8,8	2,50 ml	
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	-	2,40 ml
50 % Glycerin	200 µl	200 µl
10 % SDS	100 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	200 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Pro Probe wurden 10 µg Protein mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt und mit 4 µl 6x SDS-Auftragspuffer versetzt. Die Lösungen und 5 µl Proteingrößenstandard-Marker wurden 10 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend auf die SDS-Page aufgetragen. Es folgte eine Elektrophorese in einer Protean II-Minigelapparatur über 120 Minuten bei 100 V.

### 3.5.2.3 Elektrotransfer

Der Elektrotransfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde in einer Mini-Trans-Blot-Zelle in Blotpuffer durchgeführt. Diese wurde durch Eis gekühlt. Der Transfer erfolgte bei 100 V und 240 A über 90 Minuten.

### 3.5.2.4 Färbung

Die Färbung der Membran erfolgte mit Ponceau S-Lösung. Daraufhin wurde die Membran eingescannt und das Bild digital gespeichert. Es diente zur Feststellung, ob der Elektrotransfer gleichmäßig geschehen war. Nach Entfärbung mit ddH<sub>2</sub>O wurde die Membran eingeschweißt und bis zur Auswertung auf 4°C gelagert.

### 3.5.2.5 Auswertung

Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurde die Membran über Nacht mit 10% Milchpulver in PBS in einem 50 ml Röhrchen auf einem Roller bei 4°C inkubiert.

Jede Antikörperbindung und die Elektrochemolumineszenz(ECL)-Detektion erfolgte nach waschen mit 0,1% Tween 20 PBS in einem 50 ml Röhrchen bei 4°C.

Zuerst rollte die Membran 60 Minuten mit dem spezifischen Antikörper (anti-c-jun (IgG, Hase) 1:500 in 0,1% Tween 20 PBS). Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase (POD)-gekoppelten Antikörper. Hierzu wurde die Membran nach Entfernung des ungebundenen spezifischen Antikörpers 30 Minuten mit dem POD-gekoppelten (anti-Hase (POD-gekoppeltes IgG, Ziege) 1:5000 in 0,1% Tween 20 PBS) Antikörper inkubiert.

Die ECL-Detektion erfolgte mit der ECL-Lösung. Nach einer Minute Inkubation wurde die Membran eingeschweißt und mit einem X-OMAT-Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeiten variierten von 10 Sekunden bis zu 5 Minuten je nach Bandenstärke.

## 3.6 Statistische Auswertung

Die Angabe der Daten erfolgt als Mittelwert  $\pm$ Standardabweichung. Die statistische Auswertung und die Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen erfolgte mittels Students t-Test unter Zuhilfenahme des Statistikprogrammes SPSS<sup>®</sup> für MS Windows<sup>®</sup>. Ein signifikantes Ergebnis wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  angenommen.

## 4 Ergebnisse

*Chlamydomphila pneumoniae* wurde in HEp2-Zellen angezüchtet. Daraufhin wurden aus Nabelschnüren isolierte humane umbilikal-venöse Endothelzellen (HUVE-Zellen) mit *C. pneumoniae* infiziert. Die Zellen wurden aufgearbeitet und die mRNA- und Proteinexpression mit verschiedenen Methoden analysiert.

### 4.1 Anzucht von *Chlamydomphila pneumoniae*

Da es sich bei *Chlamydomphila pneumoniae* um ein obligat intrazelluläres Bakterium handelt, erfolgte die Kultur in lebenden Zellen. Als Wirtszellen dienten Zellen der humanen Larynxkarzinomzelllinie HEp-2.

Die HEp-2-Zellen wurden ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz inkubiert. Die Infektion mit *C. pneumoniae* erfolgte nach genanntem Protokoll<sup>101</sup>.

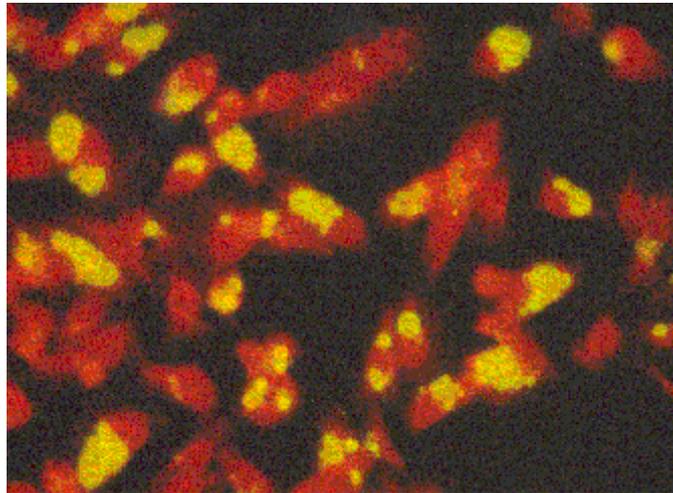
Vor jeder Passage wurde der Infektionsgrad mittels Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Dies erfolgte durch direkte Mikroskopie des Zellverbandes. Eine starke Infektion zeigte sich durch Ablösen der Zellen vom Untergrund.

Zudem konnten mit chlamydialen Einschlusskörper beladene abgekugelte Zellen beobachtet werden.

In Abbildung 5 sieht man eine mit *C. pneumoniae* infizierte HEp-2-Kultur. Nach Immunfluoreszenzfärbung der chlamydialen Einschlusskörper und Färbung der Zellbestandteile mit Evans blue (beides enthalten in *Pathfinder*-Lösung) sind deutlich chlamydiale Einschlusskörper in jeder Zelle zu erkennen. Einige Zellen sind abgekugelt, einige lösen sich bereits von der Kulturplatte. Es ist ersichtlich, dass keine Konfluenz mehr vorhanden ist.

Bei ausreichendem Infektionsgrad wurden *C. pneumoniae* nach Protokoll, wie in Kapitel 2.4.1.5 beschrieben, geerntet, mit Lagermedium versetzt und aliquotiert bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach einigen Tagen wurde 1 ml des Ansatzes aufgetaut und es erfolgte die endgültige Titerkontrolle. Hierfür wurde erneut ein konfluenter Zellrasen der Linie HEp-2 mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen des *C. pneumoniae*-Ansatzes infiziert.

Die anschließende Titerkontrolle erfolgte nach Protokoll wie in Kapitel 2.4.1.4 beschrieben und ergab die in der Tabelle 1 aufgeführten Titer. Der Titer errechnet sich aus dem Quotienten der chlamydialen Einschlusskörper und der Menge der Chlamydiensuspension, die auf die Zellen gegeben wurde.



**Abbildung 5: HEp2-Zellen 4 Tage nach Infektion mit *C. pneumoniae***

Die Färbung der Zellen erfolgte wie in Kap 2.4.1.3 beschrieben. Einige Zellen haben sich bereits vom Boden gelöst. Der ehemals konfluente Zellrasen weist einige lichte Stellen auf. In den am Boden haftenden Zellen sind die chlamydialen Einschlusskörper deutlich sichtbar.

Chlamydienansatz	errechneter Titer (IFU/ml)
1	$5,5 \cdot 10^6$
2	$8,0 \cdot 10^6$
3	$6,0 \cdot 10^6$
4	$3,0 \cdot 10^7$
5	$9,0 \cdot 10^7$
6	$1,3 \cdot 10^8$

**Tabelle 1: kultivierte Chlamydienansätze**

Die Kultivierung von *C. pneumoniae* in Zellen der Linie HEp-2 erbrachte Titer zwischen  $5,5 \cdot 10^6$  und  $1,3 \cdot 10^8$  IFU/ml. Die chlamydialen Einschlusskörper wurden nach spezifischer Färbung im Fluoreszenzmikroskop gezählt.

Die Titer wurden in Einschlusskörper formenden Einheiten (IFU) angegeben.

Es wurden sechs Infektionsansätze mit Titern zwischen  $5,5 \cdot 10^6$  und  $1,3 \cdot 10^8$  IFU/ml gewonnen (Tabelle 1). Mittels *Mycoplasmen*-PCR konnte das Vorliegen von *Mycoplasmen* ausgeschlossen werden.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde der Ansatz Nr. 4 verwendet.

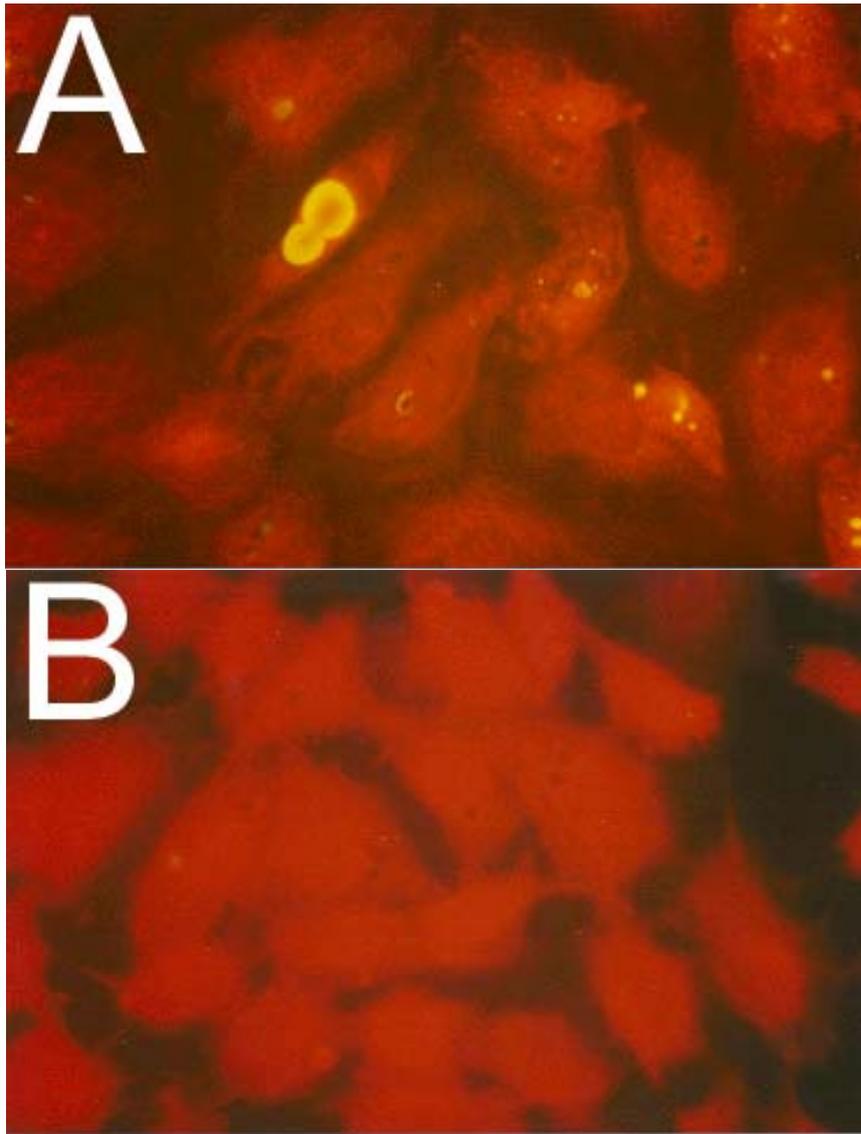
## **4.2 Infektion von humanen umbilikal-venösen Endothelzellen**

In dieser Arbeit sollte der Effekt einer Chlamydieninfektion auf humane Endothelzellen beobachtet werden. Von vorrangigem Interesse war deshalb die Frage, ob sich HUVE-Zellen mit *C. pneumoniae* infizieren lassen.

Das Vorliegen chlamydialer Einschlusskörper ist Indiz für die Replikation der Chlamydien in der Zelle. Es wurden deshalb Versuche durchgeführt, die zum Ziel hatten, chlamydiale Einschlusskörper in HUVE-Zellen zu beurteilen.

HUVE-Zellen wurden isoliert und nach der ersten Passage in Gewebekulturröhrchen zur Konfluenz gezüchtet. Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben infiziert. Nach Infektion erfolgte eine Inkubation über vier Tage. Mittels Immunfluoreszenz (Kapitel 2.4.1.3) wurden Chlamydien und Zellstrukturen sichtbar gemacht.

Schon in der einfachen Phasenkontrastmikroskopie zeigten sich nach zwei Tagen deutliche Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen. In den infizierten Zellen konnten im Zytoplasma Vakuolen beobachtet werden, die in nicht infizierten Zellen fehlten.



**Abbildung 6: Mit *C. pneumoniae* infizierte (A) und nicht infizierte (B) HUVE-Zellen vier Tage nach Infektion**

In infizierten Zellen (A) kann man deutlich die Einschlusskörper erkennen, während in nicht infizierten Zellen (B) keinerlei Einschlusskörper zu sehen sind.

Es konnten deutliche chlamydiale Einschlusskörper in einem Großteil der Zellen gefunden werden (siehe Abbildung 6A). Die Einschlusskörper variierten in Form und Größe. In nicht infizierten Zellen hingegen konnten keine Einschlusskörper beobachtet werden (siehe Abbildung 6B). Verglich man die Anzahl und Größe der Einschlusskörper in den HUVE-Zellen mit denen in HEp-2-Zellen (Abbildung 5), so erkannte man einen deutlichen Unterschied. In HEp-2-Zellen waren weitaus mehr Einschlusskörper zu sehen. Das Volumen der Einschlusskörper war in HEp-2-Zellen deutlich größer als in HUVE-Zellen. Gegenüber infizierten HEp-2-Zellen waren die in HUVE-Zellen vorhandenen Einschlusskörper nicht in jeder Zelle vorhanden. Auch nahmen die Einschlusskörper im Zytoplasma nicht die

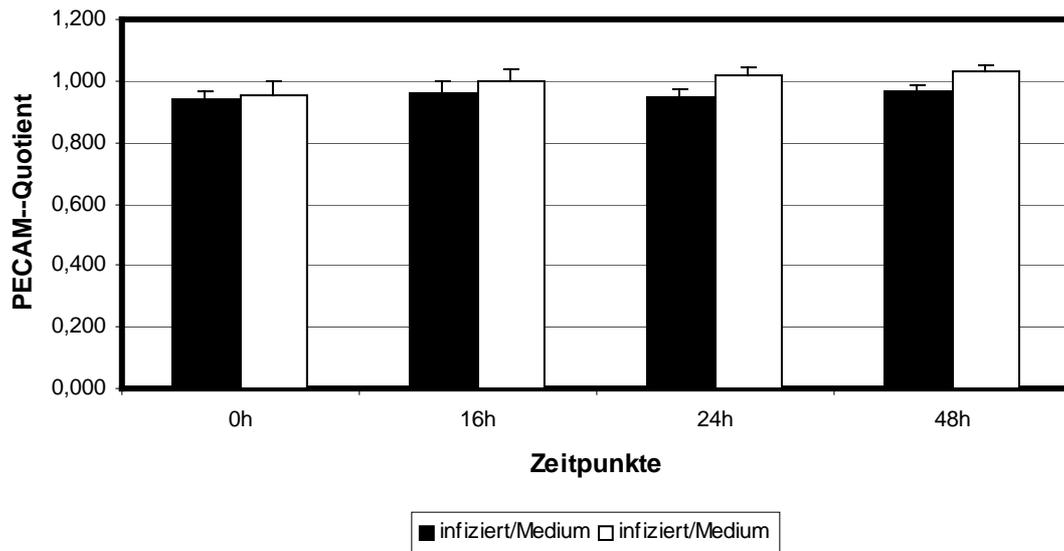
dominierende Rolle ein wie in HEp-2-Zellen, wo teilweise mehrere Einschlusskörper in einer Zelle beobachtet werden konnten.

### **4.3 Änderungen der Thrombomodulin-Expression**

#### **4.3.1 Kinetik der Proteinexpression**

Um Änderungen der Thrombomodulin-Expression durch *C. pneumoniae*-Infektion an der Zelloberfläche zu beurteilen, wurde ein zellulärer ELISA durchgeführt (Kapitel 3.5.1). Die Expression des vaskulären Adhäsionsmoleküls Platelet-Endothelial-Cellular-Adhesion-Molecule-1 (PECAM-1) diente als Vergleichsparameter. Zu den Zeitpunkten 0, 16, 24 und 48 Stunden wurden mittels des ELISA-Verfahrens in jedem Versuch sowohl die Thrombomodulin als auch die PECAM-1-Expression an der Zelloberfläche gemessen. Die Expression von Thrombomodulin und PECAM-1 an der Zelloberfläche in infizierten und nicht infizierten Zellen wurde in Relation zur nur mit HUVE-Zell-Infektionsmedium inkubierten Vergleichspopulation gesetzt.

Zur Standardisierung der Ergebnisse wurde der PECAM- bzw der Thrombomodulin(TM)-Quotient gebildet. Der PECAM-Quotient für infizierte Zellen bezeichnete den Quotienten aus mittlerer Extinktion der infizierten und der mittleren Extinktion der mit Medium inkubierten Zellen. Der PECAM-Quotient der nicht infizierten Zellen wurde durch den Quotienten aus der mittleren Extinktion der nicht infizierten Zellen und der mittleren Extinktion der mit HUVE-Zell-Infektionsmedium inkubierten Kontrollgruppe gebildet.



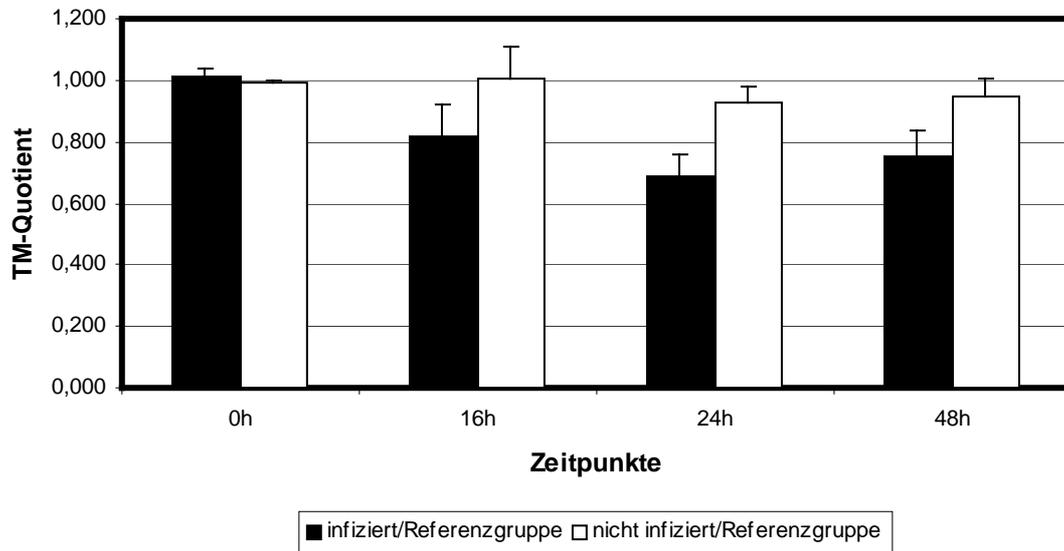
### Diagramm 1: PECAM-1 Expression im zellulären ELISA

In diesem Diagramm sind die PECAM-Quotienten von *C. pneumoniae* infizierten und nicht infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten aufgetragen.

In den hier dargestellten Versuchen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von PECAM-1 in infizierten Zellen gegenüber nicht infizierten.

Die Expression des PECAM-1-Moleküls blieb trotz Infektion nahezu unverändert (Diagramm 1). Der PECAM-Quotient infizierter Zellen lag ebenso wie der PECAM-Quotient nicht infizierter Zellen zu allen Zeitpunkten nahe 1,0.

Auch zur Beurteilung der Thrombomodulin-Expression wurde für jeden Zeitpunkt ein Quotient aus infizierten bzw. nicht infizierten und der nur mit Medium behandelten Kontrollgruppe gebildet.



#### Diagramm 2: Thrombomodulin (TM)-Expression im zellulären ELISA

In diesem Diagramm sind die TM-Quotienten von *C. pneumoniae* infizierten und nicht infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten aufgetragen. Der TM-Quotient nicht infizierter Zellen änderte sich im Verlauf von 48 Stunden nur wenig. 24 und 48 Stunden nach Infektion fiel der TM-Quotient lediglich auf 0,95 ab.

In *C. pneumoniae* infizierten Zellen zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Expression von Thrombomodulin. Der TM-Quotient infizierter Zellen war 16 bis 48 Stunden nach Infektion signifikant um 20-30% erniedrigt.

Zum Zeitpunkt 0 war noch kein Unterschied in der Thrombomodulin-Expression zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen nachweisbar (Diagramm 2). Der TM-Quotient betrug für beide Zellpopulationen 1,0.

Bereits 16 Stunden nach Infektion ging die Thrombomodulin-Expression in infizierten Zellen auf 80% zurück. Nach 24 Stunden betrug die Thrombomodulin-Expression infizierter Zellen nur noch 70% gegenüber Zellen, die mit HUVE-Zell-Infektionsmedium inkubiert wurden.

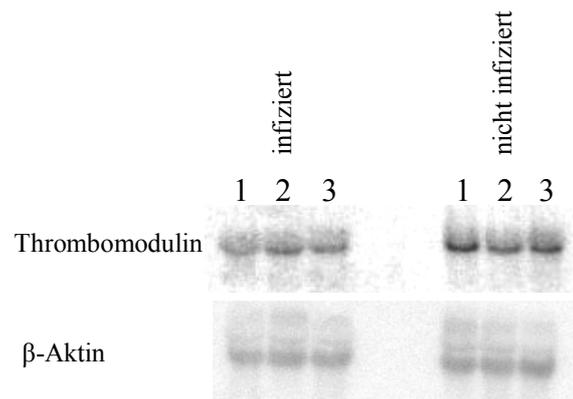
Nach 48 Stunden stieg die Expression wieder leicht auf 75% an.

Die Unterschiede in der Expression von Thrombomodulin von *C. pneumoniae* infizierten Zellen zu der von nicht infizierten Zellen waren zu den Zeitpunkten 16h, 24h und 48h mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  im t-Test signifikant.

### 4.3.2 Untersuchung der mRNA-Expression

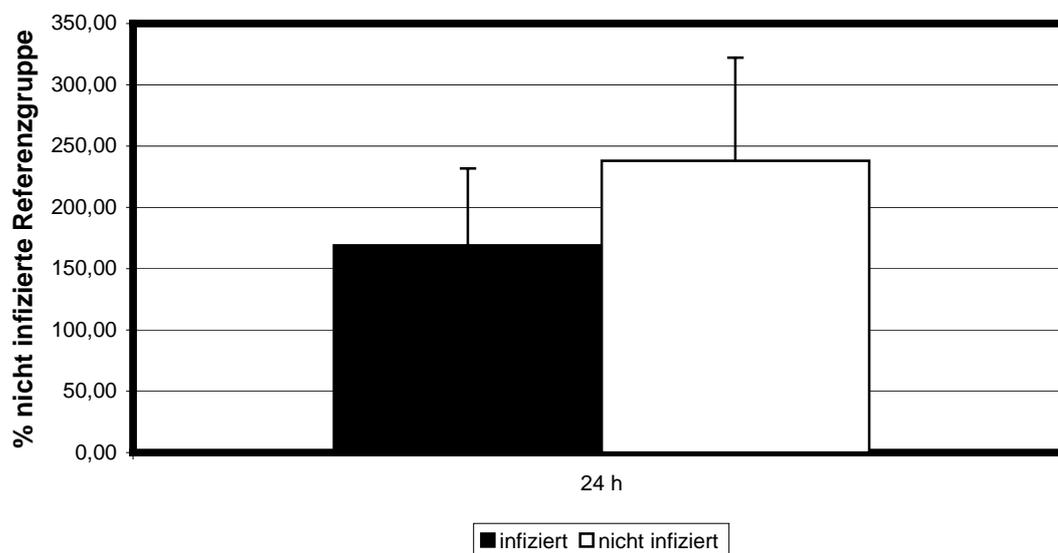
Zur Verifizierung der Ergebnisse zur Expression von Thrombomodulin auf der Zelloberfläche, wurde die Thrombomodulinexpression auf der mRNA-Ebene untersucht. Da die Expression auf der Zelloberfläche 24 Stunden nach Infektion stark reduziert war, erschien es sinnvoll, zu diesem Zeitpunkt die mRNA-Expression von Thrombomodulin zu untersuchen.

Die *C. pneumoniae* infizierten und nicht infizierten Zellen wurden 24 Stunden nach Infektion lysiert. Die Thrombomodulin-Expression wurde mittels Northern Blot quantitativ ausgewertet. Um die Ergebnisse zu normieren, wurde die Thrombomodulin-Expression mit der Expression des Haushalts-Gens  $\beta$ -Aktin abgeglichen. Unbehandelte, ebenfalls mit  $\beta$ -Aktin abgeglichene Zellen wurden auf 100% gesetzt und die Ergebnisse der infizierten und nicht infizierten Zellen hierzu in Relation gesetzt. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen wie in 3.3.2.2 beschrieben verarbeitet und mittels Northern Blots analysiert. Abbildung 7 ist die Abbildung des Northern Blot Gelbildes von drei Infektionsversuchen. In den drei Spuren der infizierten Zellen findet sich ein deutlich geringeres Signal als in den Spuren der nicht infizierten Zellen. Diagramm 3 stellt die quantitative Auswertung von acht Infektionsexperimenten dar.



**Abbildung 7: Thrombomodulin-Expression 24 Stunden nach Infektion im Northern Blot**

Darstellung eines exemplarischen Thrombomodulin Northern Blots mit drei unabhängigen Infektionsexperimenten. Als Kontrolle der Gelladung ist der zugehörige  $\beta$ -Actin Northern Blot dargestellt.



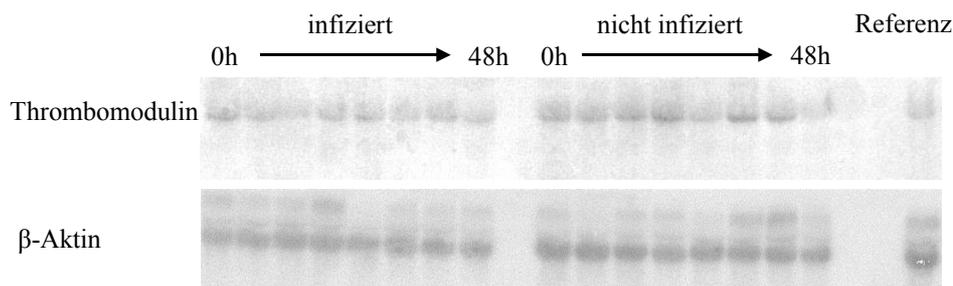
**Diagramm 3: Thrombomodulin(TM)-mRNA-Expression 24h nach Infektion mit *C. pneumoniae***

Diagramm 3 stellt die Auswertung von acht unabhängigen Versuchen dar. Sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Zellen war die TM-mRNA Expression nach 24 Stunden erhöht. In nicht infizierten Zellen war diese Erhöhung jedoch bei weitem deutlicher.

Die Thrombomodulin-mRNA-Expression war nach 24 Stunden sowohl in der infizierten als auch in der nicht infizierten Zellpopulation gegenüber der unbehandelten, mit Medium inkubierten Zellpopulation mit 170% bzw. 240% deutlich höher (Diagramm 3).

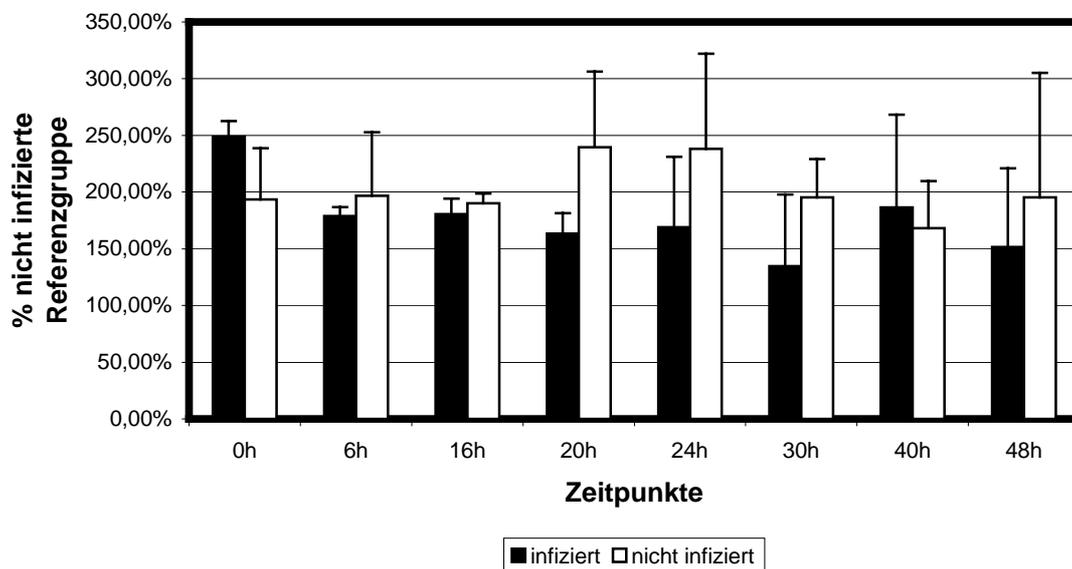
Weiterhin ist in Diagramm 3 ersichtlich, dass die Expression von TM-mRNA in infizierten gegenüber nicht infizierten Zellen weitaus weniger beträgt. Im Mittel war die Thrombomodulin-mRNA-Expression nach Infektion gegenüber nicht infizierten Zellen um 25% reduziert.

Der Unterschied ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  im t-Test signifikant.



**Abbildung 8: Kinetik der Thrombomodulin-Expression bis 48 Stunden nach Infektion im Northern Blot**

Darstellung eines exemplarischen Thrombomodulin Northern Blots. Als Kontrolle der Gelladung ist der zugehörige β-Actin Northern Blot dargestellt.



**Diagramm 4: Thrombomodulin-mRNA-Kinetik nach Infektion mit *C. pneumoniae***

Diagramm 4 stellt die Auswertung von drei unabhängigen Versuchen dar. Die Thrombomodulin-Expression war sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Zellen gegenüber der Referenz (Kontrolle) erhöht. Im Zeitraum um 24h zeigte sich eine deutlich höhere Thrombomodulin-Expression in nicht infizierten Zellen als in infizierten Zellen. Zu späteren und früheren Zeitpunkten war dies jedoch nicht zu beobachten.

Um die Kinetik der Thrombomodulin-Expression nach Infektion mit *C. pneumoniae*

beurteilen zu können, wurde die Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion ermittelt.

Die Inkubation der infizierten und nicht infizierten Zellen wurde zu den Zeitpunkten 0, 6, 16, 20, 24, 30, 40 und 48 Stunden gestoppt. Im Northern Blot wurde die Thrombomodulin-mRNA Expression quantifiziert. Die Ergebnisse wurden mit der β-Aktin-Expression und der unbehandelten Referenzgruppe abgeglichen.

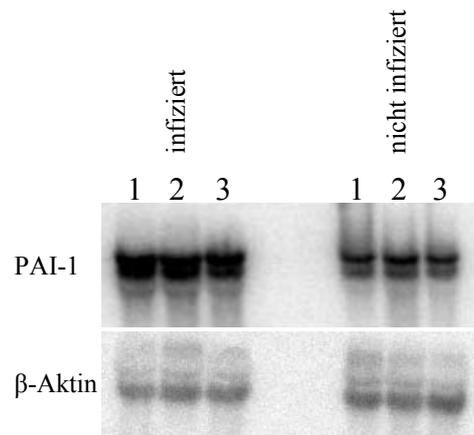
Die Expression von Thrombomodulin mRNA war direkt nach Infektion sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Zellen mit 200-250% gegenüber der Referenzgruppe erhöht

(Diagramm 4). Bis zum Zeitpunkt 16 Stunden nach Infektion fiel die Expression von Thrombomodulin in beiden Versuchsgruppen auf 180%. Zu den Zeitpunkten 20, 24 und 30 Stunden nach Infektion war in nicht infizierten Zellen die Expression von Thrombomodulin mit 200% bis 240% deutlich über der Expression von Thrombomodulin in infizierten Zellen, die nur bei 150% der Expression in der unbehandelten Referenzgruppe lag. 40 und 48 Stunden nach Infektion zeigte sich kein Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen.

## **4.4 Änderungen der Plasminogen Aktivator Inhibitor-1-Expression**

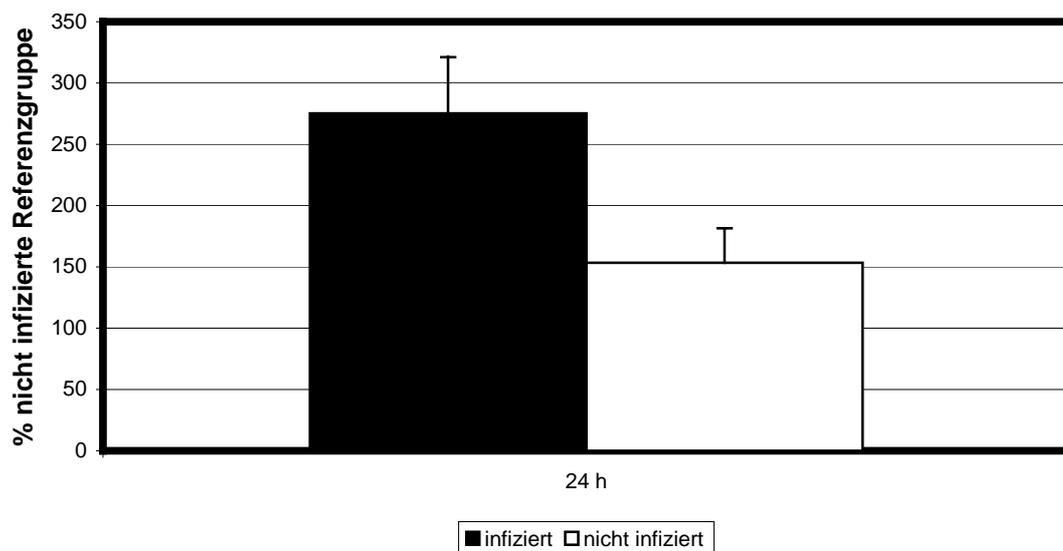
### **4.4.1 Untersuchung der mRNA-Expression**

Konfluente HUVE-Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert. Die Kontrollzellen der gleichen Passage wurden ohne *C. pneumoniae* behandelt. Nach Zentrifugation der verschiedenen behandelten Zellpopulationen erfolgte eine Inkubation über 24 Stunden. Daraufhin wurden die Zellen lysiert und die RNA wie in Kapitel 3.3.2.2 beschrieben aufbereitet. Es folgte eine quantitative Analyse mittels radioaktiv markierter Thrombomodulin-cDNA im Northern Blot, in der auch eine Probe einer unbehandelten HUVE-Zellpopulation gleicher Passage aufgetragen wurde. Es erfolgte ein Abgleich mit dem Haushalts-Gen  $\beta$ -Aktin durch eine weitere Hybridisierung mittels radioaktiv markierter  $\beta$ -Aktin-cDNA (Kapitel 3.4.6). Die so ermittelten Expressionen wurden in Relation mit der PAI-1-Expression der unbehandelten Zellen gesetzt.



**Abbildung 9: PAI-1-Expression 24 Stunden nach Infektion im Northern Blot**

Darstellung eines exemplarischen PAI-1 Northern Blots mit drei unabhängigen Infektionsexperimenten. Als Kontrolle der Gelladung ist der zugehörige β-Aktin Northern Blot dargestellt.

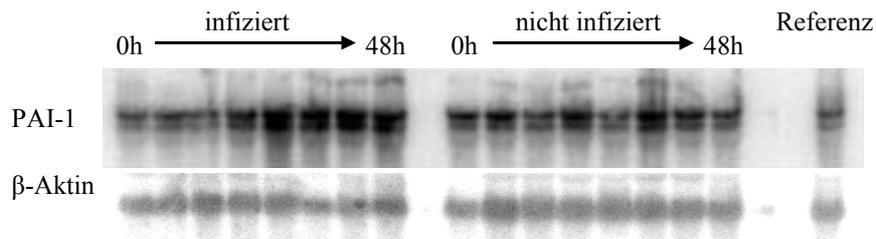


**Diagramm 5: PAI-1-mRNA-Expression 24h nach Infektion mit *C. pneumoniae***

Diagramm 5 stellt die Auswertung von acht unabhängigen Versuchen dar. Die PAI-1 Expression erhöhte sich sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Zellen. Die Expression von PAI-1 war in infizierten Zellen im Mittel mit 280% der Kontrolle jedoch deutlich stärker als in nicht infizierten. Dort betrug sie 150% der Kontrolle.

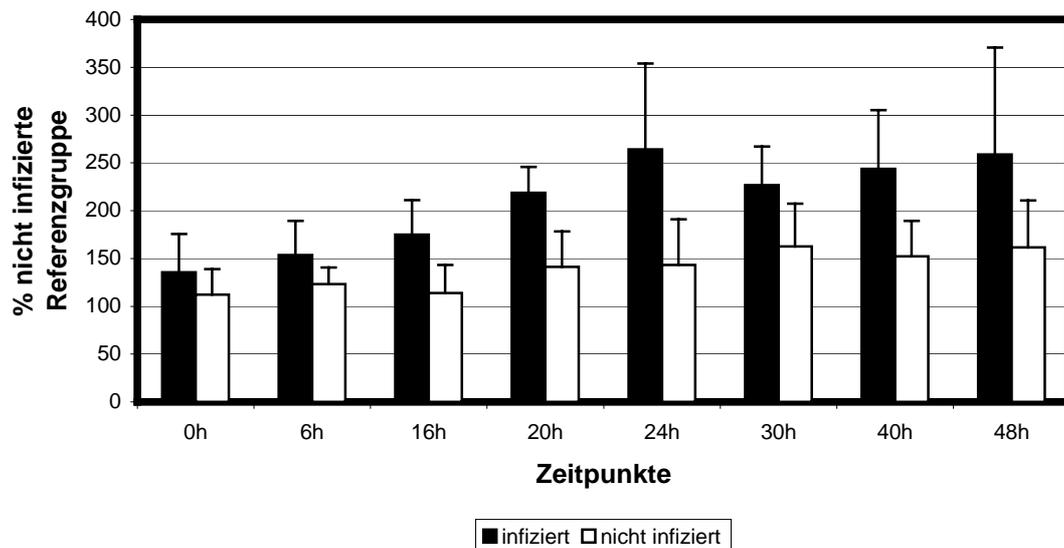
Die PAI-1-Expression nahm nach 24 Stunden sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Zellen zu. In infizierten Zellen stieg sie auf über 250% gegenüber unbehandelten Zellen an, in nicht infizierten Zellen auf 150% (Diagramm 5). Der Unterschied ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  im t-Test signifikant.

Um die Kinetik der PAI-1-Expression nach Infektion mit *C. pneumoniae* beurteilen zu können, wurde die Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion ermittelt. Die Inkubation der infizierten und nicht infizierten Zellen wurde zu den Zeitpunkten 0, 6, 16, 20, 24, 30, 40 und 48 Stunden gestoppt. Im Northern Blot wurde die PAI-1-mRNA Expression quantifiziert (Abb.10). Die Ergebnisse wurden mit der  $\beta$ -Aktin-Expression und der unbehandelten Referenzgruppe abgeglichen



**Abbildung 10: Kinetik der PAI-1 Expression bis 48 Stunden nach Infektion im Northern Blot**

Darstellung eines exemplarischen PAI-1 Northern Blots mit drei unabhängigen Infektionsexperimenten. Als Kontrolle der Gelladung ist der zugehörige  $\beta$ -Aktin Northern Blot dargestellt.



**Diagramm 6: PAI-1-mRNA-Kinetik nach Infektion mit *C. pneumoniae***

Diagramm 6 stellt die Auswertung von zwei unabhängigen Versuchen dar. Die PAI-1 Expression erhöhte sich sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Zellen.

In nicht infizierten stieg sie annähernd stetig an und erreichte zu den gemessenen Zeitpunkten nie einen Wert von über 200% der Kontrolle.

Die Expression von PAI-1 stieg in infizierten Zellen bis 24 Stunden post infectionem stetig auf 320% der Kontrolle an. 30 Stunden nach Infektion betrug sie nur noch im Mittel 250%, um dann wieder auf 320% nach 48 Stunden anzusteigen.

Bis sechs Stunden nach Infektion konnte kein Unterschied in der PAI-1-mRNA-Expression infizierter und nicht infizierter Zellen nachgewiesen werden (Diagramm 6). Bereits 16 Stunden nach Infektion zeigte sich eine deutliche Zunahme der PAI-1-Expression in infizierten Zellen auf 200% der unbehandelten Kontrollgruppe. Die PAI-1-Expression in nicht infizierten Zellen blieb auf 140% zurück. Nach 20 Stunden nahm die PAI-1-Expression in infizierten Zellen weiter zu und stieg auf 240%, die PAI-1-Expression in nicht infizierten Zellen stieg auf 160%. Nach 24 Stunden lag die PAI-1-Expression in infizierten Zellen bei 320% der unbehandelten Kontrollgruppe. Die PAI-1-Expression in nicht infizierten Zellen blieb bei 160%. 30 Stunden nach Infektion zeigte sich ein Rückgang der PAI-1-mRNA-Expression in infizierten Zellen. Sie betrug nun 250%. Nicht infizierte Zellen exprimierten doppelt so viel PAI-1-mRNA wie unbehandelte Zellen. Nach 40 Stunden stieg die PAI-1-Expression in infizierten Zellen wieder auf 280% an, in nicht infizierten Zellen fiel sie auf 170%. 48 Stunden nach Infektion betrug die PAI-1-mRNA-Expression in infizierten Zellen 320% und in nicht infizierten Zellen 190% der Expression in unbehandelten Zellen.

## **4.5 Änderungen der Expression von Transkriptionsfaktoren**

Das mRNA- und Proteinexpressionsmuster einer Zelle wird durch Transkriptionsfaktoren gesteuert. Auf unterschiedliche Reize werden verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert. Zu den schnell reagierenden, sogenannten *immediate early transcription factors* gehört der Aktivatorprotein-1-Komplex (AP-1). Dieses Dimer setzt sich aus je einem Molekül der jun-Familie und fos-Familie zusammen. Ein weiterer schnell reagierender Transkriptionsfaktor ist der Transkriptionsfaktor KROX-20, auch egr-2 genannt.

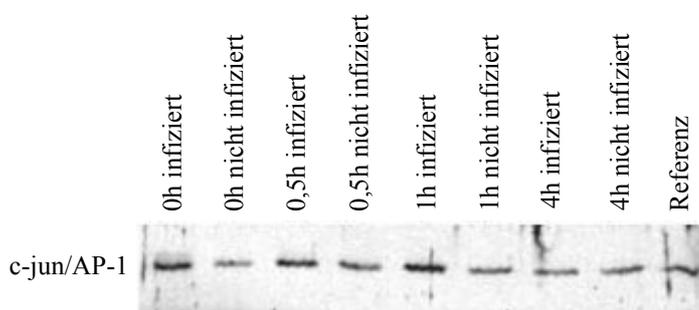
### **4.5.1 Untersuchung des Aktivator-Protein-1-Komplexes**

Um die Einflüsse der Chlamydieninfektion auf die unmittelbare intrazelluläre Signaltransduktion zu untersuchen, wurde die Expression des Aktivator-Protein-1-Komplexes (AP-1) auf Nukleinsäure- und Protein-Ebene untersucht. Die Zellen wurden in kurzen Zeitabständen nach Infektion mit *C. pneumoniae* analysiert.

#### 4.5.1.1 Expression des AP-1-Proteins

Zur Ermittlung der AP-1 Proteinexpression wurden konfluente HUVE-Zellen mit *C. pneumoniae* infiziert bzw als Kontrollgruppe nicht infiziert inkubiert (Kapitel 3.3.2). Die Auswertungszeitpunkte waren 0, 0,5, 1 und 4 Stunden. Als Kontrolle dienten unbehandelte HUVE-Zellen gleicher Passage. Die Zellen wurden lysiert und für ein Proteingel aufbearbeitet (Kapitel 3.3.2.4).

Im Western-Blot kamen mit Hilfe eines gegen die c-jun Untereinheit gerichteten Antikörpers Änderungen in der Proteinexpression zur Darstellung.



**Abbildung 11: Proteinexpression von AP-1 im Western Blot**

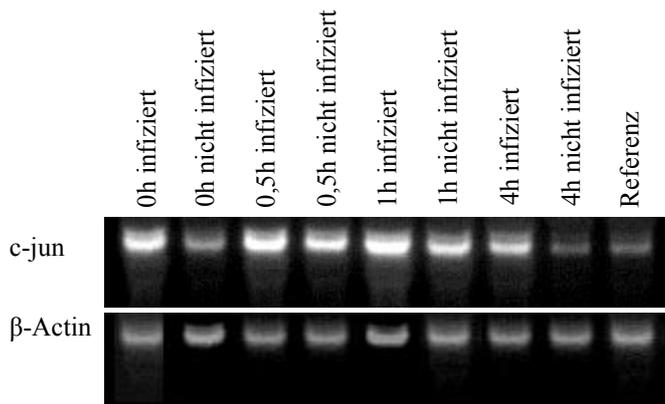
Abbildung 11 zeigt eine exemplarische Auswertung eines c-jun/AP-1 Western Blots. Es ist deutlich zu sehen, dass vermehrt Aktivator-Protein-1-Komplexe schon direkt nach Infektion mit *C. pneumoniae* nachzuweisen war. Auch 30 Minuten und eine Stunde nach Infektion war die Menge an AP-1-Protein in den Zellen deutlich höher als in nicht infizierten Zellen. Vier Stunden nach Infektion war die Expression von AP-1 in infizierten Zellen wieder auf den Wert der Referenzgruppe abgesunken. Die Expression von AP-1 war in nicht infizierten Zellen nur nach 30 Minuten gegenüber der Referenzgruppe aus unbehandelten Zellen leicht erhöht.

Die Expression von AP-1 nahm sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Zellen gegenüber der Kontrolle mit unbehandelten Zellen zu. Vier Stunden nach Infektion war die Expression wieder auf den Wert der Kontrollgruppe abgesunken. Es ist zu erkennen, dass die Expression des c-jun/AP-1-Moleküls bereits direkt nach Infektion mit *C. pneumoniae* gegenüber der Kontrollgruppe deutlich höher lag. Nach einer halben Stunde war dieser Unterschied noch deutlicher sichtbar. Im weiteren Verlauf der Infektion fiel die Expression wieder ab. Der Unterschied in der Expression von AP-1 zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen war nach einer Stunde kaum noch wahrzunehmen. Vier Stunden post infectionem war die Expression nach Infektion mit *C. pneumoniae* auf die Höhe der Kontrollgruppe abgesunken.

#### 4.5.1.2 mRNA-Expression des AP-1 Monomers c-jun

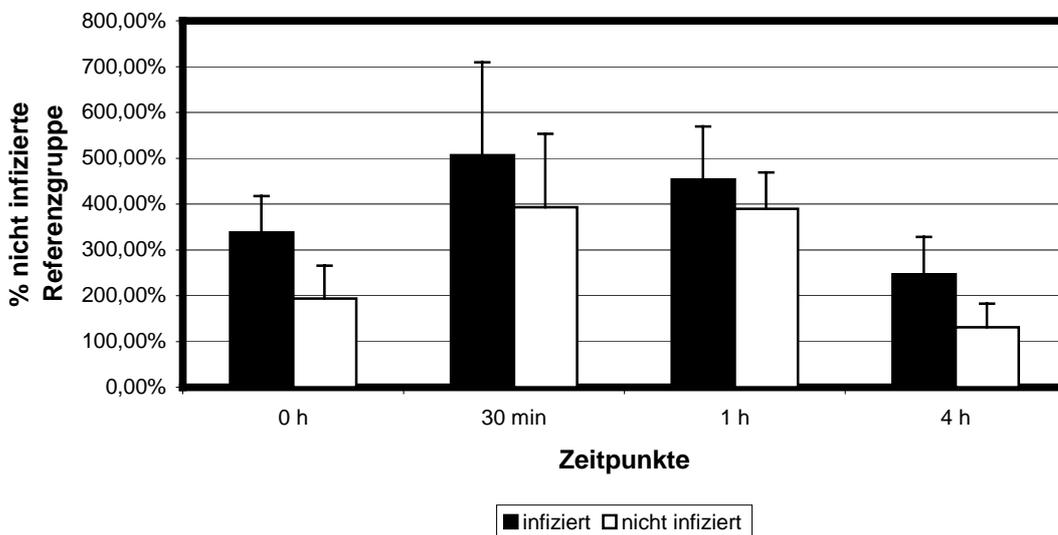
Da AP-1 aus zwei Untereinheiten besteht, die von Protoonkogenen der c-fos- und c-jun-Familie gebildet werden, wurde die mRNA-Expression der jeweiligen Hauptvertreter ermittelt.

Konfluente HUVE-Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert und die mRNA-Expression von c-jun mit der nicht infizierten Kontrollgruppe verglichen.



**Abbildung 12: Expression von c-jun nach Infektion mit *C. pneumoniae***

Darstellung eines exemplarischen c-jun Northern Blots. Als Kontrolle der Gelladung ist der zugehörige β-Actin Northern Blot dargestellt.



**Diagramm 7: c-jun mRNA-Expression nach Infektion mit *C. pneumoniae***

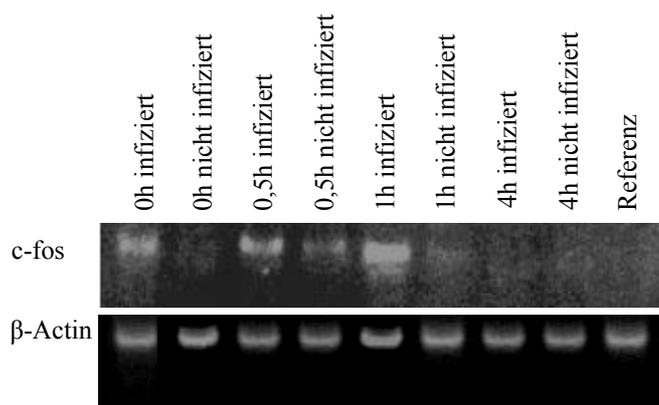
Diagramm 7 stellt die Auswertung von vier unabhängigen Versuchen dar. Es fanden sich deutliche Unterschiede in der Expression von c-jun mRNA zu den untersuchten Zeitpunkten. Direkt nach Infektion war eine Zunahme der c-jun Expression in infizierten Zellen auf 400% und in nicht infizierten auf 200% der Referenzgruppe sichtbar, die sich nach 30 Minuten noch verstärkte. Eine Stunde nach Infektion nahm sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Zellen die Expression von c-jun ab. Nach vier Stunden war c-jun Expression in infizierten und nicht infizierten Zellen auf 200% bzw. 100% der Referenzgruppe zurückgegangen.

Das Ergebnis der Western Blots ließ sich hier auf mRNA-Ebene verifizieren (Diagramm 7). In infizierten Zellen und auch in der Gruppe der nicht infizierten Zellen erhöhte sich die mRNA-Expression von c-jun und sank nach 4 Stunden wieder auf den Wert von unbehandelten Zellen ab. Nach Infektion mit *C. pneumoniae* war die Expressionssteigerung jedoch deutlicher zu erkennen. Zum Zeitpunkt 0 der Infektion, nach 60 Minuten Zentrifugation, lag die Expression von c-jun in mit *C. pneumoniae* infizierten Zellen gegenüber der Referenzgruppe bei nahe 350%, die nicht infizierter Zellen bei 200%. Nach 30 Minuten stieg die Expression in infizierten Zellen auf 500% an, wohingegen die Expression von nicht infizierten Zellen sich auf 400% erhöhte. Eine Stunde nach Infektion betrug die Expression in infizierten Zellen 450% in nicht infizierten Zellen 390%. Nach 4 Stunden war die Expression in infizierten Zellen auf 250% und in nicht infizierten auf 150% gesunken.

#### 4.5.1.3 mRNA-Expression des AP-1 Monomers c-fos

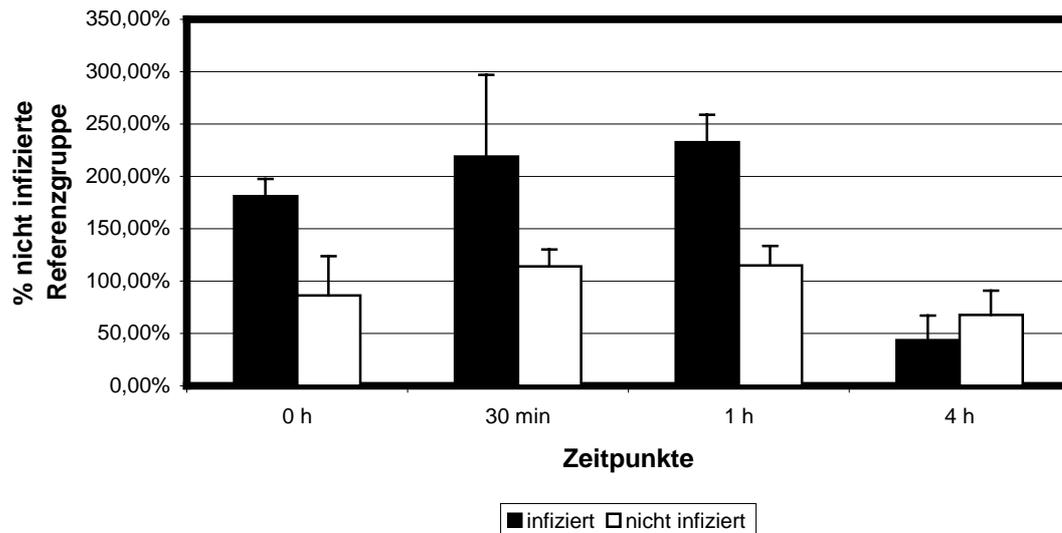
Der zweite Bestandteil des AP-1-Komplexes wird aus einem Mitglied der fos-Familie gebildet. Deshalb wurde die mRNA-Expression von c-fos untersucht.

Nach Infektion mit *C. pneumoniae* wurde die c-fos mRNA-Expression in infizierten Zellen mit der in nicht infizierten Zellen verglichen.



**Abbildung 13: Expression von c-fos nach Infektion mit *C. pneumoniae***

Darstellung eines exemplarischen c-fos Northern Blots. Als Kontrolle der Gelladung ist der zugehörige β-Actin Northern Blot dargestellt.



**Diagramm 8: c-fos mRNA-Expression nach Infektion mit *C. pneumoniae***

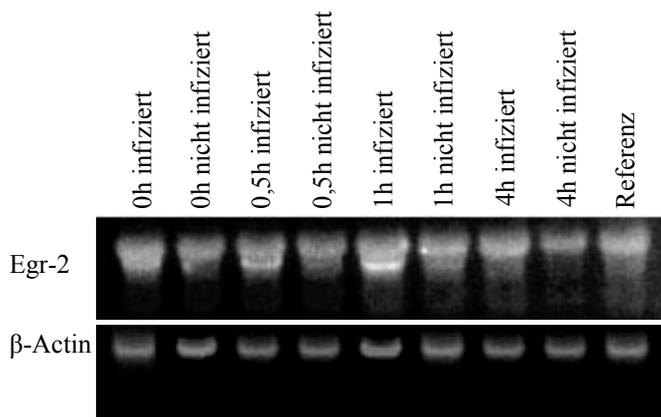
Diagramm 8 stellt die Auswertung von drei unabhängigen Versuchen dar. Die Expression von c-fos in nicht infizierten Zellen änderte sich gegenüber der Kontrolle nur geringfügig, in infizierten Zellen jedoch deutlich. Direkt nach Infektion war eine Zunahme der c-fos Expression sichtbar, die sich 30 Minuten später noch verstärkte. Ein Maximum erreichte die Expression von c-fos in infizierten Zellen nach einer Stunde. Nach vier Stunden war kein Unterschied zur Kontrolle mehr sichtbar.

In der Kontrollgruppe kam es zu keiner Induktion von c-fos. Die Expression von c-fos in zentrifugierten, nicht infizierten Zellen blieb im Verlauf der vier Stunden nach Infektion unverändert zu unbehandelten Zellen.

Die Expression von c-fos in infizierten Zellen war jedoch deutlich erhöht (Diagramm 8). Die Expression von c-fos nach Infektion mit *C. pneumoniae* war direkt nach Zentrifugation auf 200% der Kontrolle angestiegen. An den weiteren gemessenen Zeitpunkten 30 Minuten und eine Stunde blieb die Expression in infizierten Zellen bei 200% der Kontrolle um dann auf unter die Expression der Kontrollgruppe abzusinken.

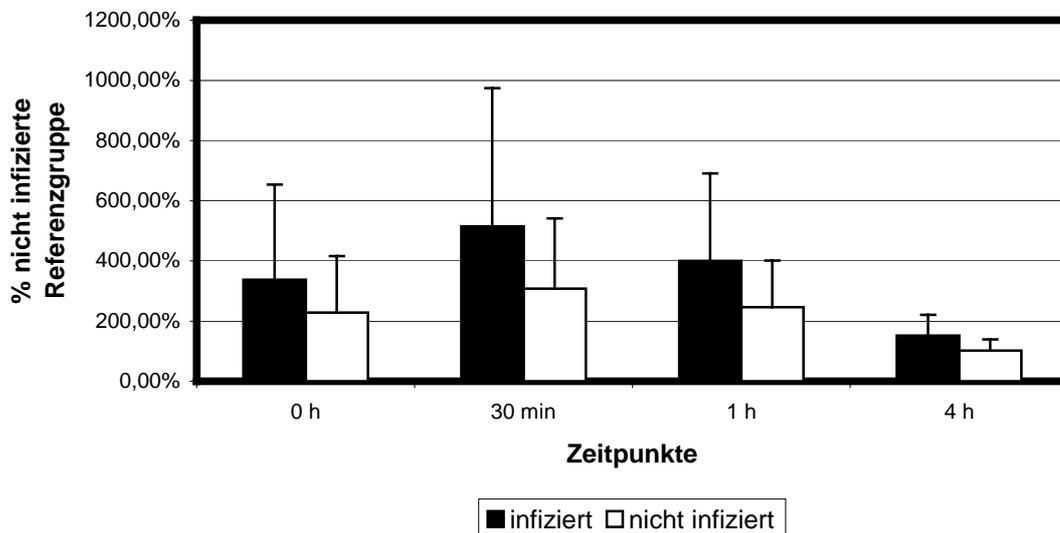
#### 4.5.2 Untersuchung des Transkriptionsfaktors Egr-2/KROX-20

Als Ergänzung des Aktivator-Komplexes-1 wurde die Expression des Transkriptionsfaktors Egr-2/KROX-20 analysiert.



**Abbildung 14: Expression von Egr-2/KROX-20 nach Infektion mit *C. pneumoniae* im Northern Blot**

Darstellung eines exemplarischen Egr-2/KROX-20 Northern Blots. Als Kontrolle der Gelladung ist der zugehörige  $\beta$ -Actin Northern Blot dargestellt.



**Diagramm 9: Egr-2/KROX-20 mRNA-Expression nach Infektion mit *C. pneumoniae***

Diagramm 9 stellt die Auswertung von drei unabhängigen Versuchen dar. Die Expression von Egr-2/KROX-20 nicht infizierten Zellen hatte sich im Verlauf von vier Stunden nur geringfügig verändert. In infizierten Zellen hingegen konnte ein deutlicher Anstieg der Egr-2/KROX-20 Expression festgestellt werden. Direkt nach Infektion und nach 30 Minuten war bereits eine Steigerung in der Expression festzustellen. Eine Stunde nach Infektion erreichte die Expression ihren Höhepunkt, um dann nach vier Stunden wieder auf Niveau der Kontrolle abzusinken.

Auch bei dem Transkriptionsfaktor Egr-2/KROX-20 konnte man einen Unterschied in der Expression zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen finden (Diagramm 9).

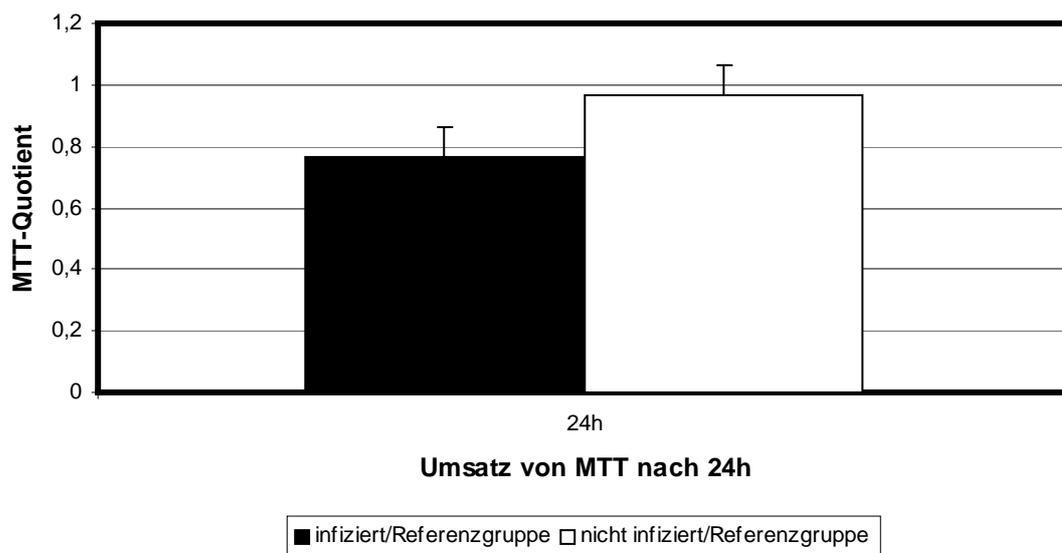
Direkt nach Zentrifugation betrug die Expression von Egr-2/KROX-20 in infizierten Zellen 320% der Expression in der Referenzgruppe, in nicht infizierten Zellen 200%. Nach 30 Minuten war die Expression in infizierten Zellen auf 500% angestiegen. Nicht infizierte Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt eine Expression von 300%. Nach einer Stunde war die Egr-2/KROX-20 Expression in infizierten Zellen auf 400% und in nicht infizierten Zellen auf 250% abgesunken. Nach 4 Stunden betrug die Egr-2/KROX-20 Expression in infizierten Zellen nur noch 150%, während die Expression in nicht infizierten Zellen auf den Wert von unbehandelten Zellen zurückgesunken war.

## 4.6 Ermittlung der Zellaktivität

Ein weiterer Parameter, der bestimmt werden sollte, war die Stoffwechselaktivität der infizierten Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen.

Zur Einschätzung der Stoffwechsellleistungen diente der MTT-Test.

Das schwach gelbe Tetrazoliumsalz MTT wird von lebenden Zellen mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen in einen blauen wasserunlöslichen Farbstoff umgewandelt. Die Anzahl der Zellen und die metabolische Aktivität korrelieren beide mit der Intensität der Blaufärbung. Der Umsatz des Tetrazoliumsalzes wurde mit Hilfe der für die unlösliche Form des Salzes spezifischen Absorption bei 570 nm Wellenlänge gemessen. Als Referenz diente die Wellenlänge 630 nm.



**Diagramm 10: Umsatz von MTT**

Diagramm 10 zeigt die Auswertung von drei unabhängigen Versuchen zur Quantifizierung der Zellvitalität mittels MTT. Der Umsatz von MTT wurde photometrisch gemessen.

Der Umsatz von MTT in infizierten Zellen ist gegenüber nicht infizierten Zellen um 20% reduziert.

Um die Stoffwechsellleistung der infizierten Zellen zu quantifizieren, wurde der MTT-Quotient eingeführt. Er ist Maß für den Umsatz von MTT in infizierten Zellen bzw in nicht infizierten Zellen in Relation zum Umsatz in der Kontrollgruppe der nur mit HUVE-Zell-Infektionsmedium behandelten Zellen.

Der Umsatz, und somit die Zellaktivität, unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Versuchsgruppen.

## 5 Diskussion

Die Theorie, dass *Chlamydomphila pneumoniae* Arteriosklerose auslösen können, ist seit ca. 15 Jahren im Gespräch<sup>104</sup>. Es gibt zahlreiche Anzeichen hierfür, aber ein endgültiger Beweis konnte bisher noch nicht erbracht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Thrombomodulin, einem wichtigen antikoagulatorischen Faktor, Plasminogen Aktivator Inhibitor-1, einen Inhibitor der Fibrinolyse sowie verschiedenen zentralen Transkriptionsfaktoren auf zellulärer Ebene untersucht.

### 5.1 Wahl des Experimentalsystems

#### 5.1.1 Überlegungen zum experimentellen Design

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der *C. pneumoniae* infizierten Endothelzelle. Endothelzellen gehören neben Thrombozyten, Leukozyten, Monozyten und glatten Muskelzellen zu den wichtigsten Zellpopulation bei der Entwicklung der Arteriosklerose<sup>10</sup>. Der Endothelzelle kommt aufgrund ihrer regulativen Funktionen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose zu. Für die beschriebenen Versuche wurden humane umbilikal-venöse Endothelzellen (HUVE-Zellen) gewählt. Es handelt sich hierbei um Zellen, die aus menschlichen Nabelschnüren direkt für die beschriebenen Versuche präpariert wurden. HUVE-Zellen sind somit primäre Endothelzellen, was einen entscheidenden Vorteil gegenüber permanenten Zelllinien darstellt. Da die Möglichkeit besteht, dass sich die Zelleigenschaften in späteren Passagen verändern, wurden ausschließlich Zellen der ersten Passage verwendet. Die aus den Nabelschnüren gewonnenen Zellen wurden, nachdem sie zur Konfluenz gewachsen waren, gemischt und dann ausgesät. Dadurch wurde eine Homogenisierung der Zellpopulation erreicht. Durch die Kulturdauer und die Passage wurde zudem weitgehend ausgeschlossen, dass eine relevante Zahl interagierender Leukozyten sich im Überstand befinden und die Ergebnisse verfälschen können. Ein Nachteil von HUVE-Zellen ist jedoch, dass es sich hierbei um venöse Zellen handelt. Das Krankheitsbild der Arteriosklerose betrifft jedoch Arterien. Da HUVE-Zellen jedoch ein anerkanntes System zur Erforschung von Einflüssen auf makrovaskuläre Endothelzellen

darstellen und ihre Gewinnung standardisiert und reproduzierbar ist, wurden in den beschriebenen Versuchen HUVE-Zellen verwendet.

Eine Analyse des Einflusses der Infektion mit *C. pneumoniae* auf eine genau definierte Zellpopulation hat zudem gegenüber dem Tiermodell den Vorteil, dass die Einflussfaktoren in vielerlei Hinsicht gut gesteuert werden können. Der Effekt des Immunsystems und anderer Zellpopulationen wie glatter Muskelzellen kann hier ausgeschlossen werden.

Nachteil der Analyse auf zellulärer Ebene ist Abstand zur physiologischen Situation und eine nicht direkte Übertragbarkeit auf erkrankte Menschen oder Tiere. Die ausschließliche Analyse einer bestimmten Zellpopulation wirft zweifelsohne die Frage der Relevanz im klinischen pathophysiologischen Zusammenhang auf.

Zur Kultur der Zellen wurde ein standardisiertes Endothelzellmedium verwendet, welches zur Aufzucht endothelialer Zellen optimiert war. Um jedoch diese Endothelzellen zu infizieren, wurde auf ein anderes Medium zurückgegriffen, welches für die Chlamydieninfektion optimiert war. Zu den wichtigen Unterschieden zählen die erhöhte Glukosekonzentration und das Fehlen von Heparin. Da Chlamydien parasitär die Nukleotide der Wirtszelle nutzen, müssen diese verstärkt produziert werden. Hierfür wird Glukose als Substrat in höherer Konzentration zugesetzt<sup>101</sup>. Das Weglassen von Heparin als Zusatz des Mediums spielt eine essentielle Rolle, da nach neueren Erkenntnissen für die physiologische Adhäsion und Internalisation von *C. pneumoniae* ein Heparinrezeptor eine entscheidende Rolle spielt<sup>119</sup>. Das Wachstum unbehandelter HUVE-Zellen wird durch dieses modifizierte Medium nur geringfügig beeinträchtigt.

Zur Infektion der Endothelzellen wurde der *C. pneumoniae* Stamm GiD, gewonnen aus dem Sputum eines Patienten mit einer Infektion des oberen Respirationstraktes, verwendet<sup>57</sup>.

Der Vorteil gegenüber den aus Atheromen isolierten Stämmen, wie sie von vielen Forschergruppen verwendet werden, ist der, dass hier ein *C. pneumoniae* Isolat verwendet wurde, das seine Pathogenität als Erreger von Atemwegsinfektionen bereits bewiesen hat. Es sollte gezeigt werden, dass Chlamydien, die respiratorische Infekte auslösen, auch diejenigen sind, die den Arterioskleroseverlauf modifizieren können. Obwohl die aus Atheromen isolierten Chlamydien genetisch übereinstimmen mit den bekannten Erregern einer interstitiellen Pneumonie<sup>57,70</sup>, konnte so die Möglichkeit unterschiedlicher Erregergruppen von vorneherein ausgeschlossen werden. Nur von Molestina et al. konnten Unterschiede zwischen dem von ihrer Forschergruppe aus einem Koronaratherom isolierten *C. pneumoniae*-Stamm und respiratorischen *C. pneumoniae* Erregern festgestellt werden<sup>85</sup>.

Das Bakterium *Chlamydomphila pneumoniae* ist ein sich obligat intrazellulär vermehrendes Bakterium. Ort der Primärinfektion beim Menschen ist das Epithel des Nasen-Rachen-Raumes<sup>70</sup>. Auch in der Kultur dieses Bakteriums spielen Epithelzellen des Nasen-Rachen-Raumes eine große Rolle. Wir verwenden zur Kultur der Chlamydien Zellen der humanen Larynxkarzinomzelllinie Hep 2, wie von Roblin et al. Beschrieben<sup>101</sup>.

Durch die Kultur von *C. pneumoniae* wurden hohe Titerstufen erreicht. Die erzielten Titer von  $5,5 \times 10^6$  bis  $1,3 \times 10^8$  IFU/ml sind ausreichend, um HUVE-Zellen in 10-facher Verdünnung zu ca. 80% zu infizieren (Kapitel 3.3.2).

Zur Infektion humaner Zellen mit *C. pneumoniae* existieren zwei verbreitete Methoden. Die eine besteht in der Inkubation von Zielzellen mit einer konzentrierten *C. pneumoniae*-Lösung<sup>38</sup>. Der Nachteil dieser Methode ist, dass hohe Titerstufen nur durch eine sich an die Kulturphase anschließende Gradientenzentrifugation erreicht werden können<sup>42</sup>. Der Vorteil besteht darin, dass hierbei Adhäsion und Integration der Chlamydien unter weitgehend physiologischen Bedingungen stattfinden können.

Die zweite Methode besteht darin, dass durch Differentialzentrifugation gereinigte Chlamydien einem Medium zugesetzt werden und durch Zentrifugation in die Zelle gelangen, um sich dort zu reproduzieren<sup>38</sup>. Hier besteht der Vorteil in der hohen Infektiosität. Mit der geeigneten Konzentration erreicht man eine Infektion von nahezu jeder Zelle (Abbildung 6). Der Nachteil besteht in der weitgehenden Umgehung der initialen Adhäsions- und Integrationsphase.

Für die Versuchsplanung wurde ein System benötigt, in dem alle Zellen infiziert werden. Da hierbei weniger Wert auf Adhäsions- und Integrationsvorgänge als auf persistierende Infektion der Zellen gelegt wurde, war die Infektion via Zentrifugation die geeignetere Methode.

Durch diesen von uns gewählten Infektionsmodus konnte die Bildung von Einschusskörper induziert werden. Dieser Befund ist ein Beweis für die Replikation von *C. pneumoniae* in den Endothelzellen. Eine wichtige Voraussetzung ist somit erfüllt. *C. pneumoniae* kann humane unibilikal-venöse Endothelzellen infizieren und sich dort replizieren. Dies wurde auch von anderen Forschungsgruppen – auch für andere Endothelzellen – gezeigt<sup>38,42</sup>.

In den Befunden aus der Immunfluoreszenz ist deutlich zu erkennen, dass in HUVE-Zellen die Chlamydien sich weitaus schwächer replizieren als in HEp-2-Zellen (Abbildung 5). Da dem Kulturmedium für HEp-2-Zellen Cyclophosphamid zugesetzt wurde, sind diese Ergebnisse für die Analyse des Wachstumsverhaltens von *C. pneumoniae* in

unterschiedlichen Zellpopulationen nicht benutzbar. Dies war auch kein zentrales Anliegen dieser Arbeit.

### 5.1.2 Änderungen von Vitalität und Phänotyp nach Infektion

Nach Infektion der HUVE-Zellen mit *C. pneumoniae* wurden die Zellen bis zum Analysezeitpunkt inkubiert. Je nach zu untersuchendem Molekül handelte es sich um Inkubationszeiten von bis zu 48 Stunden. Zu diesen Zeiten kam es zu morphologisch sichtbaren Veränderungen der infizierten gegenüber nichtinfizierten Zellen. Bei den infizierten Zellen imponierte eine Vakuolenbildung. Der Zellrasen zeigte sich jedoch innerhalb dieser Zeiten sowohl in den infizierten als auch in den nichtinfizierten Zellen als konfluent. Daraus kann geschlossen werden, dass es zu keinem nennenswerten Zelltod von HUVE-Zellen nach Infektion mit *C. pneumoniae* kommt. Von Beatty et al. wird eine Chlamydienpersistenz beschrieben<sup>7</sup>. Diese Forschergruppe geht davon aus, dass schlechte intra- oder extrazelluläre Wachstumsbedingungen zu einem Ausbleiben der Zelllyse und vergrößerten Einschlusskörpern führen. Dieses Verhalten könnte erklären, warum es in den hier beschriebenen Versuchen zu keinem Zelltod in HUVE-Zellen gekommen ist. Im Hinblick auf die Theorie der Arterioskleroseentstehung durch *C. pneumoniae* bietet diese Theorie eine Erklärung für den möglichen chronischen Verlauf der Infektion in Koronarendothelzellen.

Von Fryer et al. wurden Untersuchungen zur Zytotoxizität von *C. pneumoniae* auf Endothelzellen durchgeführt<sup>38</sup>. Hier kam man aufgrund eines <sup>51</sup>Cr-Tests zu dem Schluß, dass *C. pneumoniae* auf Endothelzellen zytotoxisch wirkt.

Zu diesem Zweck wurde auch in dieser Arbeit eine Zytotoxizitätsuntersuchung mittels MTT-Test durchgeführt. Hierbei zeigte sich keine signifikante Reduktion der Zellaktivität.

Nachteil des MTT-Tests und der von Fryer et al. durchgeführten Untersuchung ist, dass beide auf den Stoffwechsellleistungen der infizierten Zellen beruhen. Der in dieser Arbeit durchgeführte Test basiert auf der Umsetzung von MTT durch mitochondriale Enzyme, der von Fryer et al. auf der Freisetzung von <sup>51</sup>Cr durch absterbende Zellen. Diese sind jedoch aufgrund des intrazellulären Parasitismus der Chlamydien ohnehin stark modifiziert. Deshalb ist der MTT-Test zwar bezüglich der Stoffwechsellleistungen aussagekräftig. Der Schluss, dass eine Verminderung der Stoffwechsellleistungen in diesen Tests gleichzusetzen ist mit einer Verminderung der Zellzahl, ist jedoch nicht zulässig. Ebenso wenig erfüllt der <sup>51</sup>Cr-Test in diesem Fall seinen Zweck. Eine gleichmäßige Aufnahme von <sup>51</sup>Cr durch die Zellen muss

für diesen Test gewährleistet sein. Dies kann aber aufgrund der Stoffwechselveränderungen durch *C. pneumoniae* nicht als sicher angesehen werden.

In dem hier beschriebenen zellulären ELISA zur Analyse des Oberflächenmoleküls Thrombomodulin wurde als Parameter für die Zellzahl das für Endothelzellen charakteristische Oberflächenmolekül PECAM-1 verwendet. Beekhuizen et al. beschrieben keine Veränderung der Expression von PECAM-1 auf eine *Staphylococcus aureus* Infektion der Endothelzellen<sup>9</sup>. Von Rival et al. wurde jedoch eine Herabregulierung dieses Oberflächenmoleküls durch IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  beschrieben<sup>100</sup>.

Es fand sich eine Konstanz in der Umsetzung des Substrats in der ELISA-Untersuchung der PECAM-1 Expression bei infizierten und nichtinfizierten Zellen.

Da PECAM-1 nach heutigem Stand der Wissenschaft von Infektionsreizen nicht heraufreguliert wird, ist bei gleichbleibender PECAM-1-Oberflächenexpression von einer Konstanz der Zellzahl auszugehen. Der verminderte Nachweis von Thrombomodulin beruht also in der Tat auf einer verminderten Expression und nicht auf einer Reduktion der Zellzahl. Aufgrund der Konfluenz in der Phasenkontrastmikroskopie und der im ELISA erlangten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Expression von PECAM-1 durch Infektion mit *C. pneumoniae* im beobachteten Zeitraum nicht verändert wird, und somit die Zellzahl in den beobachteten Zeiträumen konstant bleibt.

Dies deutet darauf hin, dass HUVE-Zellen die Infektion mit *C. pneumoniae* zu einem gewissen Maße tolerieren und nicht die Apoptose einleiten. Eine persistierende Infektion von Endothelzellen mit *C. pneumoniae* ist demzufolge möglich. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die hier erbrachten Hinweise auf ein fehlendes Absterben der HUVE-Zellen im beobachteten Zeitraum äußerst indirekt sind. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein ,wenn auch geringer Teil der Endothelzellen, in den ersten 48 Stunden nach Infektion mit *C. pneumoniae* direkt durch die Vermehrung von *C. pneumoniae* lysiert wird oder durch Apoptose auf die intrazelluläre Vermehrung reagiert.

## **5.2 Differentielle Genexpression nach *Chlamydomphila pneumoniae* Infektion**

Godzik et al. konnten zeigen, dass sowohl Endothelzellen, glatte Muskelzellen als auch Makrophagen durch *C. pneumoniae* infizierbar sind<sup>42</sup>.

Verschiedene Forschungsgruppen konnten eine Änderung der Genexpression bzw. der Proteinsynthese in Endothelzellen nachweisen, die spezifisch auf eine *C. pneumoniae*-Infektion zurückzuführen sind<sup>93</sup>. So konnte von Fryer et al. eine Induktion des Gewebsthromboplastins (Tissue factor/TF) nach *C. pneumoniae*-Infektion nachgewiesen werden<sup>38</sup>. Weitergehende Studien zeigten eine Vermehrung von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche. Krüll und Kollegen zeigten eine Erhöhung von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1<sup>68</sup>.

### **5.2.1 Einfluss der *Chlamydomphila pneumoniae* Infektion auf Hämostasefaktoren**

Im Anschluss an bereits durchgeführte Untersuchungen sollte in dem gewählten Experimentalsystem der Effekt einer Infektion mit *C. pneumoniae* auf weitere essentielle Hämostasefaktoren dargestellt werden. So wurde von Fryer et al. der Effekt auf die Expression von Gewebsthromboplastin zwar beschrieben<sup>38</sup>. Die im Hämostasesystem ebenso wichtigen Parameter Thrombomodulin und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 blieben jedoch bis jetzt weitgehend unerforscht. Lediglich Dechend et al. konnten im Western Blot einen Anstieg der Konzentration von PAI-1 auf eine Infektion mit *C. pneumoniae* zeigen<sup>27</sup>. Zur Analyse der Thrombomodulinexpression wurden zwei Ansätze verwendet. Die Expression wurde sowohl auf Protein- als auch auf Nucleinsäureebene untersucht. Die Probleme bei der Etablierung des ELISAs bezüglich einer eventuellen Zytotoxizität der von *C. pneumoniae* wurden unter Punkt 5.1.2 bereits ausführlich diskutiert. Um alleine die Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen beurteilen zu können, wurde der TM-Quotient eingeführt. Sowohl die infizierten Zellen als auch die nicht infizierten Zellen in jedem Versuch stammten aus derselben Zellpopulation. Abgesehen von der Infektion mit *C. pneumoniae* wurden sie gleich behandelt. Der TM-Quotient ermöglichte einen Vergleich zwischen den Versuchen.

Wie in Kapitel 4.3 beschrieben ist die Thrombomodulinexpression an der Zelloberfläche 16 bis 48 Stunden nach Infektion gegenüber der nicht infizierten Kontrollgruppe signifikant um über 20% reduziert. Die Analyse der Thrombomodulin-mRNA-Expression erfolgte mittels Northern Blot. Gegenüber der Referenzgruppe zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Thrombomodulin-mRNA-Expression nach 24 Stunden sowohl in der infizierten als auch in der nicht infizierten Zellpopulation.

Ein weiteres Problem stellte die unspezifische Zunahme der mRNA-Thrombomodulinexpression in den Versuchsgruppen gegenüber der Referenzgruppe dar. Die Thrombomodulin-mRNA-Expression in der nicht infizierten Kontrollgruppe war gegenüber der Referenzgruppe nach 24 Stunden um den Faktor 2,4 gesteigert. Dieser Effekt kann auf die unspezifische Stimulation der Zellen durch die Behandlung und vor allem das unterschiedliche Medium zurückgeführt werden, ist aber für die Bewertung der Ergebnisse letztlich ohne Bedeutung. Für die hier getroffenen Aussagen ist lediglich der Unterschied unter den Versuchsgruppen entscheidend.

Sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene konnte somit gezeigt werden, dass die Expression von Thrombomodulin in infizierten Zellen gegenüber gleichbehandelten nicht infizierten Zellen reduziert wird.

Die Expression von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI)-1 wurde auf mRNA-Ebene analysiert. Somit konnte zusätzlich der von Dechend et al. festgestellten Erhöhung der Proteinkonzentration eine Induktion der Transkription gezeigt werden<sup>27</sup>. Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass die Erhöhung der Serumkonzentration von PAI-1 nur ein kurzfristiger Effekt ist, der auf einer Freisetzung der Substanz aus präformierten Granula beruht.

Zur Quantifizierung der PAI-1 mRNA-Expression wurde die Northern Blot Methode verwendet. Wie auch im Fall des Thrombomodulins erfolgte auch bei PAI-1 eine unspezifische Stimulation durch die Behandlung und das Medium. Sie fällt jedoch weitaus weniger deutlich aus. Nach 24 Stunden war die Expression von PAI-1 um den Faktor 1,5 in nicht infizierten Zellen gegenüber der Referenzgruppe erhöht. Dagegen ist die Expression von PAI-1 mRNA in infizierten Zellen nach 24 Stunden annähernd um den Faktor drei gestiegen. Dieses deutliche Ergebnis wird auch durch die in Kapitel 4.4 beschriebene Kinetikuntersuchung bestätigt. Es zeigt sich zu allen Zeitpunkten ein deutlicher Unterschied in der PAI-1 mRNA-Expression zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen. Zu bemerken ist, dass dieser Unterschied nach 24 Stunden am größten ist. Während die

Expression von PAI-1 mRNA Expression in nicht infizierten Zellen kontinuierlich bis auf 200% nach 48 Stunden ansteigt, erlangt die Expression von PAI-1 mRNA in infizierten Zellen nach 24 Stunden ein Maximum und fällt dann leicht ab.

Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür ist der chlamydiale Vermehrungszyklus, der 24-48 Stunden beträgt<sup>7</sup>. Somit ist die Replikation der Chlamydien in den ersten 24 Stunden am stärksten. Die stärkste Beeinflussung der Zelle ist somit auch in diesem Zeitraum zu erwarten.

Sowohl Thrombomodulin als auch PAI-1 spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung der Arteriosklerose<sup>30,122</sup>. Von Laszik und Kollegen wurde gezeigt, dass Thrombomodulin in Endothelzellen arteriosklerotischer Plaques auf Protein-Ebene herunterreguliert ist<sup>72</sup>. Auch eine erhöhte PAI-1-Expression konnte mit Arteriosklerose in Zusammenhang gebracht werden. Zhu und Kollegen konnten im Tiermodell zeigen, dass PAI-1 die Bildung der Neointima fördert<sup>122</sup>. Eine weitere Forschergruppe beschrieb das vermehrte Auftreten von Koronarthrombosen in transgenen Mäusen, welche PAI-1 überexprimieren<sup>30</sup>. Beide Ergebnisse deuten darauf hin, dass das vermehrte Angebot von PAI-1 in einem Gefäßabschnitt zu sowohl einer Progression der Arteriosklerose als auch später zu Komplikationen durch verminderte Fibrinolyse führen kann.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich replizierende Chlamydien in Endothelzellen sowohl eine Reduktion der Expression von Thrombomodulin als auch eine Induktion der Expression von PAI-1 bewirken (Kapitel 4.3 und 4.4).

Für Thrombomodulin konnte sowohl eine Reduktion auf mRNA-Ebene mittels Northern Blot mit anschließender quantitativer Analyse als auch auf Proteinebene mittels eines zellulären ELISAs dargestellt werden. Für PAI-1 erfolgte die Analyse zusätzlich zu bereits bekannten Ergebnissen auf Proteinebene nur auf Ebene der mRNA-Expression<sup>27</sup>.

Die in den durchgeführten Versuchen dargestellten Veränderungen zeigen in Übereinstimmung zu vorherigen Untersuchungen, dass die durch *C. pneumoniae* in Endothelzellen hervorgerufenen Veränderungen den Phänotyp der betroffenen Endothelzellen zugunsten eines prokoagulatorischen Phänotyps umwandeln<sup>68</sup>. Dieser Schritt spielt vor allem im Stadium der komplexen Läsion für den klinischen Verlauf des betroffenen Patienten eine herausragende Rolle<sup>10</sup>. Die Induktion bzw. im Falle des Thrombomodulins eintretende Reduktion bewirken eine starke Aktivierung des Gerinnungssystems und führen somit zur verstärkten Thrombusbildung im Falle einer Plaqueruptur.

Neben dieser Wirkung im Sinne einer Akzelleration der Gefäßstenose kommt der Reduktion des Thrombomodulins eine weitere, für den Verlauf der Arteriosklerose nicht minder

bedeutende Rolle zu. Die Tatsache, dass es sich bei Thrombomodulin um einen Rezeptor für Thrombin handelt, ist hierfür ausschlaggebend. Thrombin ist ein bekannter wachstumsfördernder Faktor für glatte Muskelzellen<sup>37,69,117</sup>. Thrombomodulin als Rezeptor für das im Serum vorhandene Thrombin reduziert somit in betroffenen Gefäßabschnitten die Konzentration von biologisch aktivem Thrombin. Dies kann zur Folge haben, dass glatte Muskelzellen in der Gefäßwand verstärkt proliferieren.

Von Coombes et al. wird ein „endothelial cell-derived soluble factor(s)“ postuliert, welcher die Proliferation glatter Muskelzellen anregt<sup>22</sup>. Die hier dargelegten Ergebnisse legen jedoch nahe, dass nicht eine Erhöhung eines Wachstums-beschleunigenden Faktors die beschriebenen Auswirkungen hervorruft, sondern vielmehr die Verminderung eines Wachstums-inhibierenden Faktor, nämlich Thrombomodulin.

Weiterhin ist bekannt, dass Thrombin eine Aktivierung des Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) hervorruft. Es konnte gezeigt werden, dass dies zu einer deutlich verstärkten Expression von E-Selektin auf der Zelloberfläche durch TNF $\alpha$  Stimulation führt<sup>3</sup>. Hier trifft ebenfalls zu, dass eine durch *C. pneumoniae* induzierte verminderte Thrombomodulinexpression die Menge an ungebundenem Thrombin steigern und somit zu einer vermehrten Expression von proinflammatorischen Oberflächenmolekülen führen könnte.

## 5.2.2 Einfluss der *Chlamydomytila pneumoniae* Infektion auf Transkriptionsfaktoren

Verschiedene Forschergruppen konnten eine Veränderung der Gen-Transkription in Endothelzellen nach *C. pneumoniae*-Infektion zeigen<sup>27,38,68</sup>. Somit lag es nahe, die Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren zu untersuchen. Krüll et al. konnten eine Induktion des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B finden<sup>68</sup>, der die Expression vieler unterschiedlicher Gene reguliert, die nach heutigen Erkenntnissen beim Arterioskleroseprozess eine Rolle spielen. c-jun und c-fos sind Mitglieder einer Familie von Proteinen, die das Aktivator-Protein-1 bilden. Das Aktivator-Protein-1 (AP-1) ist neben NF- $\kappa$ B ein wichtiger Transkriptionsfaktor. Er spielt bei der Regulation der Zellproliferation und des Überlebens einer Zelle eine herausragende Rolle<sup>61</sup>. So wird eine erhöhte mRNA-Expression der Monomere c-jun und c-fos beispielsweise nach Stimulus durch den Wachstumsfaktor PDGF beobachtet<sup>36,108</sup>. Zudem ist AP-1 wie auch NF- $\kappa$ B in die nachgeschaltete Signaltransduktion von Toll-like Rezeptoren involviert<sup>1</sup>.

Die Erhöhung der Aktivität des Transkriptionsfaktors Aktivator-Protein-1 kann auf zweierlei Weise erfolgen. Einerseits führt die Phosphorylierung durch Serin-Threonin-Kinasen der Gruppe der Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinasen zur aktiven Form, indem die Monomere aus der jun- und der fos-Familie sich zu einem Homo- bzw. Heterodimer verbinden<sup>61</sup>.

Desweiteren kann durch eine Zunahme der AP-1 Konzentration in der Zelle die Antwort auf einen späteren Reiz amplifiziert werden.

Zu der Gruppe der frühen Transkriptionsfaktoren gehört auch die Egr-Familie. Aus dieser Familie wurde der für Endothelzellen noch kaum beschriebene Vertreter Egr-2/KROX-20 untersucht. Vertreter aus der Egr-Familie spielen ebenfalls in der Zellproliferation eine wichtige Rolle<sup>39,59,99,106,121</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurden die genannten Transkriptionsfaktoren bezüglich der Reaktion auf eine *C. pneumoniae* Infektion untersucht. Der c-jun/Aktivator-Protein-1-Komplex wurde auf Proteinebene und die c-jun und c-fos Expression auf mRNA-Ebene untersucht. Zusätzlich wurde der Transkriptionsfaktor Egr-2/KROX-20 auf mRNA-Ebene untersucht.

Bei der Untersuchung im Western Blot der c-jun/AP-1 Expression findet sich keine sichtbare Expressionssteigerung der nicht infizierten Kontrollgruppe (Kapitel 4.5.1). Deutlich zu

erkennen ist dahingegen eine starke Expressionssteigerung von c-jun/AP-1 nach einer Stunde, die nach vier Stunden auf Höhe der nicht infizierten Kontrollgruppe und der Referenz abgefallen ist.

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression von c-jun und c-fos findet sich eine ähnliche Aussage. Zu bemerken ist jedoch, dass hier eine unspezifische Stimulation auch der nicht infizierten Kontrollgruppe sichtbar ist. Bei beiden Molekülen findet sich eine Erhöhung der Expression bereits direkt nach der Infektion. Das Maximum wird nach 30-60 Minuten erreicht und die Expression fällt wieder ab. Nur bei infizierten Zellen bleibt c-jun nach 4 Stunden deutlich über dem Level der nicht infizierten Kontrollgruppe und der Referenzgruppe. Man erkennt einen Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen. Sowohl c-jun als auch c-fos werden durch *C. pneumoniae* Infektion verstärkt exprimiert.

Das Verhalten von Egr-2/KROX-20 ist annähernd deckungsgleich mit dem der anderen untersuchten Transkriptionsfaktoren. Auch hier findet sich eine unspezifische Stimulation sowie eine spezifische Stimulation durch *C. pneumoniae* Infektion.

Im vorliegenden Egr-2/KROX-20 Northern Blot sind zwei Banden zu sehen. Die obere, welche breiter und diffuser erscheint, liegt auf Höhe der 28S-RNA. Sie wurde als eine unspezifische Hybridisierung der Sonde mit der 28S-RNA interpretiert und somit nicht zur Auswertung herangezogen. Die Auswertung bezog sich nur auf die darunter laufende scharf abgrenzbare Bande.

In der Auswertung der Egr-2/KROX-20 Expression fielen starke Standardabweichungen auf. Hierzu ist jedoch festzustellen, dass sich bei der Auswertung der einzelnen Versuche das Verhältnis zwischen der Expression in infizierten zu der in nicht infizierten Zellen konstant verhielt. Erst bei der Normierung mit der jeweiligen Referenzgruppe entstanden diese großen Varianzen. Da für jedes Experiment neu präparierte HUVE-Zellen verwendet wurden, ist eine Erklärungsmöglichkeit hierfür eine eventuell vorhandene Vorstimulation einer Zellpopulation, die zu einem verminderten oder erhöhten Ansprechen der Zellen auf die hier gesetzten Reize führten. Es ist jedoch zu bemerken, dass lediglich ein quantitativer Unterschied, nicht jedoch ein qualitativer Unterschied zwischen den Experimenten bestand.

Die Reaktionen der hier untersuchten Transkriptionsfaktoren stimmen in der Weise überein, dass sie allesamt nach einer kurzen Zeit ein Expressionsmaximum erreichen und danach wieder abfallen. Dies bedeutet, dass *C. pneumoniae* zwar kurzfristig eine Expressionserhöhung von AP-1 und Egr-2/KROX-20 bewirkt, diese aber nicht über längere Zeit aufrecht erhalten wird.

Mit den hier dargelegten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Untereinheiten des AP-1 Heterodimers, c-jun und c-fos, stark durch eine *C. pneumoniae*-Infektion heraufreguliert werden als auch nachweisen, dass das Protein AP-1 in mit *C. pneumoniae* infizierten Endothelzellen in höherer Konzentration vorliegt als in nicht infizierten.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Huang und Kollegen erhobenen Daten überein. Im Tiermodell mit *C. pneumoniae* infizierten Mäusen konnten Huang und Mitarbeiter zeigen, dass die Transkriptionsfaktoren PPAR $\gamma$ , NF $\kappa$ B und AP-1 in aortalen Endothelzellen nach Infektion erhöht sind<sup>51</sup>.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Auswirkungen von Scherkräften auf Endothelzellen, so findet man ähnliche Ergebnisse. Auch hier werden die zentralen Transkriptionsfaktoren c-jun und c-fos heraufreguliert<sup>20,50</sup>.

### 5.2.3 Auswirkungen auf den Arterioskleroseverlauf

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass es nach Infektion mit *C. pneumoniae* in humanen Endothelzellen zu einer passageren Heraufregulation des AP-1 Komplexes kommt. Darauf folgt eine prolongierte Herabregulation des Oberflächenmoleküls Thrombomodulin und eine ebenso prolongierte Heraufregulation des prokoagulatorischen Faktors PAI-1. Auf eine kurze proinflammatorische Phase folgt demnach eine prolongierte prokoagulatorische und proarteriosklerotische Antwort. Dies könnte in vivo zur Folge haben, dass durch die verminderte Expression von Thrombomodulin es zu einem vermehrten Auftreten des Liganden Thrombin führt. Für Thrombin ist gezeigt, dass es als Wachstumsfaktor für glatte Muskelzellen wirken kann<sup>37,69,117</sup>. Somit ist dies eine Erklärungsmöglichkeit für die vermehrte Muskelzellproliferation in arteriosklerotischen Läsionen. Desweiteren wirkt Thrombomodulin im Zusammenspiel mit APC antikoagulatorisch. Eine verminderte Expression von Thrombomodulin führt somit zu einem prokoagulatorischem Zustand der Gefäßwand. Insbesondere bei der akuten Exazerbation der Arteriosklerose, der Plaqueruptur, kann dies die Thrombosierung und somit den Verschluss des Gefäßes fördern.

Einen ähnlichen Einfluß hat PAI-1. Als prokoagulatorischer Faktor inhibiert PAI-1 die Fibrinolyse. Die vermehrte Bildung von PAI-1 hat somit zur Folge, dass die intravasale Fibrinolyse, welche im Gleichgewicht mit der Gerinnung steht, gehemmt wird. Dies bewirkt ebenso wie die Herunterregulation von Thrombomodulin einen prokoagulatorischen Effekt.

Die hier dargestellten Daten erhärten den Verdacht, dass eine Infektion humaner Endothelzellen mit *C. pneumoniae* den Arterioskleroseverlauf entscheidend beeinflussen kann. Die in den Versuchen verwendeten humanen umbilikal-venösen Endothelzellen zeigen nach Infektion einen prokoagulatorischen, aktivierten Phänotyp. Die in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen nach *C. pneumoniae* Infektion stimmen überein mit Daten, die aufgrund von Studien bei Arteriosklerose-Patienten und in experimentellen Tiermodellen erhoben wurden<sup>10,72</sup>.

### 5.3 Perspektiven

Die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche konnten klären, inwiefern *C. pneumoniae* die Expression von einigen ausgesuchten Genen in HUVE-Zellen verändert. Dieses Modell muss in weiteren Versuchen erweitert und auf arterielle Zellen des Gefäßsystems ausgedehnt werden. Zusätzlich muss geklärt werden, ob die hier beobachtete Zunahme der Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren auch zu einer Erhöhung der Aktivität führt. Geeignete Untersuchungen wären der *electric mobility shift assay* (EMSA) und die Untersuchung der Expression von Zielgenen.

Des Weiteren sollten zukünftige Untersuchungen klären, ob die Beobachtungen nur auf sich in Endothelzellen replizierende Chlamydien zurückzuführen sind oder ob ebenfalls durch erhitzten oder UV-Bestrahlung abgetötete Bakterien die gleichen Effekte hervorrufen können. Ein Einfluß des nicht-adaptiven Immunsystems über chlamydiales HSP60 und Toll-like Rezeptor 4 muss eventuell über funktionsblockierende Antikörper oder RNA-silencing ausgeschlossen werden.

Doch auch hierbei wird man an die Grenzen der *in vitro* Modelle stoßen. Für die Klärung des Zusammenhangs zwischen einer Infektion mit *C. pneumoniae* und Arteriosklerose müssen deshalb zusätzlich zu den *in vitro* Modellen weitere *in vivo* Untersuchungen erfolgen. Die hier bereits durchgeführten Untersuchungen sind uneinheitlich. Eine Induktion der Arteriosklerose im Kaninchen durch *C. pneumoniae* konnte durch Fong und Kollegen nachgewiesen werden<sup>35</sup>. Dagegen konnten Caliguri und Kollegen in ApoE-defizienten Mäusen durch *C. pneumoniae*-Infektion keine Akzelleration des Arterioskleroseverlaufs feststellen<sup>17</sup>.

Zudem sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass es neben der in dieser Arbeit vorgestellten Möglichkeit der Arterioskleroseakzelleration durch *C. pneumoniae*-Infektion der Endothelzellen noch eine andere Theorie existiert, die *C. pneumoniae* mit der Arteriosklerose in Verbindung bringt. Ein Zusammenwirken von durch eine *C. pneumoniae* Infektion induzierten Antikörpern gegen das humane HSP60 und der Infektion verschiedener Zellpopulationen ist durchaus denkbar<sup>16</sup>.

Ob und zu welchem Anteil *C. pneumoniae* den Arterioskleroseverlauf beeinflusst, konnte aber bis heute nicht endgültig geklärt werden. Diese und auch andere Arbeiten konnten jedoch

zeigen, dass auf zellbiologischer Ebene *C. pneumoniae* die Genexpression von Endothelzellen verändern kann.

Somit wurden mittels serologischen Studien, Nachweis von *C. pneumoniae* in Atheromen, in-vitro und in-vivo Modellen Hinweise für die chlamydiale Beeinflussung der Arteriosklerose gefunden.

Es bleibt abzuwarten, welche Ergebnisse die bereits angelaufenen Antibiotikainterventionsstudien erbringen. Die bis jetzt abgeschlossenen Studien zeigen kein einheitliches Bild<sup>2,19,45,89,111</sup>.

Wenn auch diese Studien darauf hinweisen würden, dass Antibiotika die Prävalenz von Arteriosklerose vermindern, so könnte man den Beweis, dass *C. pneumoniae* Arteriosklerose beeinflusst, als erbracht ansehen.

Die aktuell veröffentlichte, groß angelegte PROVE-IT-Studie zeigt jedoch in der Sekundärprophylaxe von Herzinfarkten keinen Vorteil bei Patienten, die mit Antibiotika behandelt werden<sup>18</sup>.

Ein Nachteil von vielen aktuellen Studien ist, dass dort Antibiotika als Sekundärprophylaxe verwendet werden. Man kann jedoch die Frage stellen, ob es zu diesem Zeitpunkt schon zu spät ist, die Bakterien mittels Antibiotika zu therapieren.

Eine endgültige Beurteilung, ob *Chlamydomphila pneumoniae* ursächlich an der Arterioskleroseentwicklung beteiligt ist, kann zu dem jetzigen Zeitpunkt nicht mit Gewissheit gesagt werden. Die vielen widersprüchlichen Ergebnisse klinischer Studien lassen diesen Schluss nicht zu.

## 6 Zusammenfassung

*Chlamydomphila pneumoniae* ist ein gram-negatives, obligat intrazelluläres Bakterium. Beim Menschen ist es als Erreger von Infektionen des oberen und unteren Respirationstraktes weit verbreitet. Seit einigen Jahren mehren sich die Hinweise für eine *C. pneumoniae* vermittelte Initiation oder Akzelleration der Arteriosklerose. Der pathogenetische Zusammenhang ist jedoch noch weitgehend unklar.

Ziel dieser Arbeit war es, die Reaktionen von humanen Endothelzellen auf Infektion mit *C. pneumoniae* zu untersuchen.

Von besonderem Interesse waren hierbei Hämostasefaktoren (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und Thrombomodulin (TM)) und frühe Transkriptionsfaktoren (c-jun, c-fos, Egr-2/KROX-20).

Zu diesem Zweck wurden sowohl *C. pneumoniae* als auch humane umbilikal-venöse Endothelzellen (HUVE-Zellen) kultiviert. Die HUVE-Zellen wurden daraufhin mit *C. pneumoniae* infiziert, inkubiert und nach bestimmten Zeiten analysiert. Als Vergleich diente eine nicht infizierte Referenzgruppe.

Die Analyse der Endothelzellreaktion erfolgte im Bezug auf Zellaktivität, mRNA-Expression und Protein-Synthese. Die verwendeten Verfahren waren Northern Blot, zellulärer Enzyme-linked immuno sorbent Assay (ELISA) und Western Blot.

Bei den untersuchten Hämostasefaktoren zeigte sich nach 24 Stunden eine erniedrigte Thrombomodulin-mRNA-Expression (um 20%) und eine erhöhte PAI-1-mRNA-Expression (um 40%) gegenüber der Kontrollgruppe. Die Differenz zu der Kontrollgruppe ließ sich bei der PAI-1-mRNA-Expressionskinetik noch bis zu 48 Stunden nach Infektion nachweisen. In der Präsenz von Thrombomodulin an der Zelloberfläche konnte mittels eines zellulären ELISAs ebenfalls ein Unterschied zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Es fand sich ein Rückgang des Thrombomodulin-Antigens um 20-30% in einem Zeitraum von 48 Stunden nach der Infektion.

Es konnte eine deutliche Erhöhung der mRNA-Expression der untersuchten frühen Transkriptionsfaktoren festgestellt werden. Bei allen kontrollierten Zeitpunkten zeigte sich ein Expressionsunterschied von infizierten Zellen zu nicht infizierten. Ein Maximum erreichte die Expression nach 30 Minuten bei c-jun und Egr-2/KROX-20, nach 1 Stunde bei c-fos. Im Western Blot wurde bei infizierten Zellen ebenfalls eine Erhöhung von c-jun/AP-1 ermittelt.

Die Ergebnisse legen nahe, daß eine Infektion mit *C. pneumoniae* humane Endothelzellen in einen aktivierten, prokoagulatorischen Zustand versetzen. Eine Infektion mit *C. pneumoniae* bewirkt somit pro-arteriosklerotische Veränderungen der Gefäße.

Ob dies jedoch in der klinischen Praxis eine Rolle spielt, kann man aufgrund dieser Ergebnisse nicht vorhersagen. Diese Aussage muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

## 7 Summary

*Chlamydophila pneumoniae* is a gram-negative, intracellular bacterium. It is well known as cause of upper and lower respiratory tract infections. For some years evidence has been found that *C. pneumoniae* induces or accelerates atherosclerosis. However, the underlying pathophysiology still remains unclear.

It was therefore aim of this study to examine the effects of *C. pneumoniae* infections on endothelial cells which are involved in the process of atherosclerosis.

This study focuses on hemostasis factors, such as plasminogen-activator-inhibitor-1 (PAI-1) and thrombomodulin (TM), as well as immediate early transcription factors, such as c-jun, c-fos and Egr-2/KROX-20.

Human umbilical venous cells (HUVEC) were infected with *C. pneumoniae* isolated from a patient suffering from an acute infection. The mRNA respectively protein expression of infected HUVE-cells were analysed and compared to not infected control cells.

HUVE-cells showed a significantly decreased thrombomodulin- and a significantly increased PAI-1-mRNA-expression 24h after infection with *C. pneumoniae*. The presence of thrombomodulin at the cell surface was decreased to up to 30% as analyzed using a cellular ELISA.

The analysis of immediate early transcription factors unveiled a strong increase of c-jun, c-fos and Egr-2/KROX-20 mRNA shortly after infection showing maximal mRNA levels at 30-60min after infection. Additionally an increase of the important proinflammatory transcription factor c-jun/AP-1 was observed on protein level by Western Blot analysis.

The results show that infection with *C. pneumoniae* alters the expression patterns of endothelial cells towards an activated, procoagulatory state. An infection with *C. pneumoniae* leads to pro-atherosclerotic changes in endothelial cells supporting the hypothesis that *C. pneumoniae* can act as an initiating and accelerating factor in the cause of atherosclerosis. However, if this is an important risk factor for developing atherosclerosis in patients cannot be answered by this study. This has to be analysed in further patient orientated studies.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Akira S, Takeda K  
Toll-like receptor signalling  
Nat Rev Immunol 2004; 4: 499-511
2. Andraws R, Berger JS, Brown DL  
Effects of antibiotic therapy on outcomes of patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized controlled trials  
JAMA 2005; 293: 2641-2647
3. Anrather D, Millan MT, Palmethofer A, Robson SC, Geczy C, Ritchie AJ, Bach FH, Ewenstein BM  
Thrombin activates nuclear factor- $\kappa$ B and potentiates endothelial cell activation by TNF  
J Immunol 1997; 159: 5620-5628
4. Bachetti T, Morbidelli L  
Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions  
Pharmacol Res 2000; 42: 9-19
5. Bartels C, Maass M, Bein G, Brill N, Bechtel JFM, Leyh R, Sievers HH  
Association of serology with endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* and cytomegalovirus in coronary artery and vein graft disease  
Circulation 2000; 101: 137-141
6. Baud V, Karin M  
Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives  
Trends Cell Biol 2001; 11: 372-377
7. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI  
Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis  
Microbiol Rev 1994; 58: 686-699
8. Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S  
Endothelial function and hemostasis  
Z Kardiol 2000; 89: 160-167
9. Beekhuizen H, van de Gevel JS, Olsson B, van Benten IJ, van Furth R  
Infection of human vascular endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces hyperadhesiveness for human monocytes and granulocytes  
J Immunol 1997; 157: 774-782
10. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ  
Atherosclerosis: basic mechanisms, Oxidation, inflammation, and genetics  
Circulation 1995; 91: 2488-2496

11. Biasucci LM, Liuzzo GL, Grillo RL, Caligiuri G, Rebuffi AG, Buffon A, Summaria F, Ginnetti F, Fadda G, Maseri A  
Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability  
*Circulation* 1999; 90: 855-860
12. Birnboim HC, Doly J  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA  
*Nucleic Acid Res* 1979; 7: 1513-1523
13. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA  
A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice  
*J Clin Invest* 1998; 101: 353-363
14. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D  
Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion  
*J Clin Invest* 1996; 97: 1715-1722
15. Buján J, Gimeno MJ, Prieto A, Pascual G, Bellón JM, Alvarez-Mon M  
Modulation of PECAM-1 (CD31) expression in human endothelial cells: effect of IFN $\gamma$  and IL-10  
*J Vasc Res* 1999; 36: 106-113
16. Burian K, Kis Z, Virok D, Endresz V, Prohaszka Z, Duba J, Berencsi K, Boda K, Horvath L, Romics L, Fust G, Gonczol E  
Independent and joint effects of antibodies to human heat-shock protein 60 and *Chlamydia pneumoniae* infection in the development of coronary atherosclerosis  
*Circulation* 2001; 103: 1503-1508
17. Caligiuri G, Rottenberg M, Nicoletti A, Wigzell H, Hansson GK  
*Chlamydia pneumoniae* infection does not induce or modify atherosclerosis in mice  
*Circulation* 2001; 103: 2834-2838
18. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Grayston JT, Muhlestein B, Giugliano RP, Cairns R, Skene AM; Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators.  
Antibiotic treatment of *Chlamydia pneumoniae* after acute coronary syndrome.  
*N Engl J Med* 2005;352:1646-1654.
19. Cercek B, Shah PK, Noc M, Zahger D, Zeymer U, Matetzky S, Maurer G, Mahrer P and AZAKS investigators  
Effect of short-term treatment with azithromycin on recurrent ischemic events in patients with acute coronary syndrome in the azithromycin in acute coronary syndrome (AZACS) trial: a randomized controlled trial  
*Lancet* 2003; 36: 809-813

20. Chien S, Li S, Shyy JY  
Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells  
Hypertension 1998; 31: 162-169
21. Chomczynski P, Sacchi N  
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction  
Analytical Biochemistry 1987; 162: 156-159
22. Coombes BK, Mahony JB  
Chlamydia pneumoniae infection of human endothelial cells induces proliferation of smooth muscle cells via an endothelial cell-derived soluble factor(s)  
Infect Immun 1999; 67: 2909-2915
23. Cybulsky MI, Gimbrone MA  
Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis  
Science 1991;251: 788-791
24. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS  
A major role for VCAM-1, but not ICAM-1 in early atherosclerosis  
J Clin Invest 2001; 107: 1255-1262
25. Danesh J  
Coronary heart disease, *Helicobacter pylori*, dental disease, *Chlamydia pneumoniae*, and *cytomegalovirus*: Meta-analysis of prospective studies  
Am Heart J 1999; 138: S434-S437
26. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Wong Y, Bernades-Silva M, Ward ME  
Chlamydia pneumoniae IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis  
Brit Med J 2000; 321: 208-213
27. Dechend R, Maass M, Gieffers J, Dietz R, Scheidereit C, Leutz A, Gulba DC  
Chlamydia pneumoniae infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF- $\kappa$ B and induces tissue factor and PAI-1 expression  
Circulation 1999; 100: 1369-1373
28. Edelberg JM, Christie PD, Rosenberg RD  
Regulation of vascular bed-specific prothrombotic potential  
Circ Res 2001; 89: 117-124
29. Engvall E, Perlmann P  
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 1971; 8: 871-879.
30. Eren M, Painter CA, Atkinson JB, Declerck PJ, Vaughan DE  
Age-dependent spontaneous coronary arterial thrombosis in transgenic mice that

- express a stable form of human plasminogen activator inhibitor-1  
Circulation 2002; 106: 491-496
31. Esmon NL, Esmon CT  
Protein C and the endothelium  
Sem Thromb Hemost 1988; 14: 210-215
32. Everett KD, Bush RM, Andersen AA  
Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms.  
Int J Syst Bacteriol. 1999;49: 415-440
33. Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhard MS, Kondaveeti S, Laszik S, Esmon CT, Heyderman RS  
Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis  
N Engl J Med 2001; 345: 408-416
34. Ferrari M, Werner GS, Richartz BM, Oehme A, Straube E, Figulla HR  
Lack of association between Chlamydia pneumoniae serology and endothelial dysfunction of coronary arteries  
Cardiovasc Ultrasound 2005; 3: 12
35. Fong IW, Chiu B, Viira E, Jang D, Mahony JB  
De novo induction of atherosclerosis by *Chlamydia pneumoniae* in a rabbit model  
Infect Immun 1999; 67: 6048-6055
36. Franchimont N, Durant D, Rydzziel S, Canalis E  
Platelet-derived growth factor induces interleukin-6 transcription in osteoblasts through the activator protein-1 complex and activating transcription factor-2  
J Biol Chem 1999; 274: 6783-6789
37. Freedman JE  
Thrombin, thrombomodulin, and extracellular signal-regulated kinases regulating cellular proliferation  
Circ Res 2001; 88: 651-654
38. Fryer RH, Schwobe EP, Woods ML, Rodgers GM  
Chlamydia species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity  
J Investig Med 1997; 45: 168-174
39. Gashler A, Sukhatme VP  
Early growth response protein 1 (Egr-1): Prototype of a zinc-finger family of transcription factors  
Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 1995; 50:191-224

40. 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* 1997; 64: 1614-20
41. Geneser F  
Histologie  
1. Aufl. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 1990
42. Godzik KL, O'Brian ER, Wang SK, Kuo CC  
In vitro susceptibility of human vascular wall cells to infection with *Chlamydia pneumoniae*  
*J Clin Microbiol* 1995; 33: 2411-2414
43. Gordon T, Kannel WB  
Predisposition to atherosclerosis in the head, heart and legs. The Framingham study  
*JAMA* 1972; 221:661-666
44. Grayston JT  
Antibiotic treatment of *Chlamydia pneumoniae* for secondary prevention of cardiovascular events  
*Circulation* 1998; 97: 1669-1670
45. Grayston JT, Divan VK, Cooney M, Wang P  
Community- and hospital acquired pneumonia associated with *Chlamydia TWAR* infection demonstrated serologically  
*Arch Intern Med* 1989 ; 149 : 169-173
46. Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J  
A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections  
*N Engl J Med* 1986; 315: 161-168
47. Grulich-Henn J, Müller-Berghaus G  
The role of vascular endothelial cells in the regulation of fibrinolysis  
*Z Kardiol* 1989; 78 (Suppl.6): 25-29
48. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ  
Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice  
*Mol Cell* 1998; 2: 275-281
49. Hajra L, Evans AI, Chen M, Hyduk SJ, Collins T, Cybulsky MI  
The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation  
*Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9052-9057
50. Hsieh HJ, Li NQ, Frangos JA  
Pulsatile and steady flow induces c-fos expression in human endothelial cells  
*J Cell Physiol* 1993; 154: 143-151

51. Huang B, Dong Y, Mai W, Li Y  
Effect of *Chlamydia pneumoniae* infection and hyperlipidaemia on the expression of PPARgamma, P50 and c-fos in aortic endothelial cells in C57bL/bJ mice  
*Acta Cardiol* 2005; 60: 43-49
52. Ishii H, Kizaki K, Horie S, Kazama M  
Oxidized low density lipoprotein reduces thrombomodulin transcription in cultured human endothelial cells through degradation of the lipoprotein in lysosomes  
*J Biol Chem* 1996; 271: 8458-8465
53. Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC, Rodriguez DI, Lee A, Grayston JT  
Isolation of *C. pneumoniae* from a carotid endarterectomy specimen  
*J Infect Dis* 1997; 176: 292-295
54. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR  
Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphology and immunologic criteria  
*J Clin Invest* 1973; 52: 2745-2756
55. Jahn HU, Krull M, Wuppermann FN, Klucken AC, Rosseau S, Seybold J, Hegemann JH, Jantos CA, Suttorp N  
Infection and activation of airway epithelial cells by *Chlamydia pneumoniae*  
*J Infect Dis* 2000; 182: 1678-1687
56. Jantos CA, Wienpahl B, Schiefer HG, Wagner F, Hegemann JH  
Infection with *Chlamydia pneumoniae* in infants and children with acute lower respiratory tract disease  
*Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 117-122
57. Jantos CA, Heck S, Roggendorf R, Sen-Gupta M, Hegemann JH  
Antigenic and molecular analysis of different *C. pneumoniae* strains  
*J Clin Microbiol* 1997; 35: 620-623
58. Jantos CA, Nesseler A, Waas W, Baumgartner W, Tillmanns H, Haberbosch W  
Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in atherectomy specimens from patients with coronary heart disease.  
*Clin Infect Dis* 1999; 28 : 988-992
59. Joseph LJ, LeBeau MM, Jamieson GA, Acharya S, Shows TB, Rowley JD, Sukhatme VP  
Molecular cloning, sequencing, and mapping of *Egr2*, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure  
*Proc Nat Acad Sci* 1988; 85: 7164-7168
60. Kalayoglu MV, Libby P, Byrne GI  
*Chlamydia pneumoniae* as an emerging risk factor in cardiovascular disease  
*JAMA* 2002; 288, 2724-2731

61. Karin M, Zheng-Gang L, Zandi E  
AP-1 function and regulation  
Curr Opin Cell Biol 1997; 9: 240-246
62. Kaukaranta-Tolvanen SSE, Laitinen K, Saikku P, Leinonen M  
Chlamydia pneumoniae multiplies in human endothelial cells in vitro  
Microb Pathog 1994; 16, 313-9
63. Kaukoranta-Tolvanen SSE, Ronni T, Leinonen M, Saikku P, Laitinen K  
Expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated by *Chlamydia pneumoniae*  
Microb Pathog 1996; 21: 407-411
64. Khandjian EW  
Optimized hybridization of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membranes  
BioTechnology 1987; 5: 165-171
65. Knoebel E, Vijayagopal P, Figueroa JE, Martin DH  
In vitro infection of smooth muscle cells by Chlamydia pneumoniae  
Infect Immun 1997; 65: 503-6
66. Koch AE, Kunkel SL, Pearce WH, Shah MR, Parikh D, Evanoff HL, Haines GK, Burdick MD, Strieter RM  
Enhanced production of the chemotactic cytokines interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in human abdominal aortic aneurysms  
Am J Pathol 1993; 142: 1423-1431
67. Kojima S, Hayashi S, Shimokado K, Suzuki Y, Shimada J, Crippa MP, Friedman SL  
Transcriptional activation of urokinase by the Krüppel-like factor Zf9/COPEB activates latent TGF- $\beta$ 1 in vascular endothelial cells  
Blood 2000; 95: 1309-1316
68. Krüll M, Klucken AC, Wuppermann FN Fuhrmann O, Magerl C, Seybold J, Hippenstiel S, Hegemann JH, Jantos CA, Suttorp N  
Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with Chlamydia pneumoniae  
J Immunol 1999; 162: 4834-4841
69. Krymskaya VP, Goncharova EA, Ammit AJ, Lim PN, Goncharov DA, Eszterhas A, Pannetieri RA jr  
Src is necessary and sufficient for human airway smooth muscle cell proliferation and migration.  
FASEB J 2005; 19 :428-30
70. Kuo CC, Shor A, Campbell LA, Fukoshi H, Patton DL, Grayston JT  
Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries  
J Infect Dis 1993; 167: 841-849

71. Laemmli UK  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4  
*Nature* 1970; 227: 680-685
72. Laszik ZG, Zhou XJ, Ferrell GL, Silva FG, Esmon CT  
Down-regulation of endothelial expression of endothelial cell protein C receptor and thrombomodulin in coronary atherosclerosis  
*American Journal of Pathology* 2001; 159: 797-802
73. Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedker H  
RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination  
*Biochemistry* 1977; 16: 4743-4751
74. Lentz SR, Tsiang M, Sadler JE  
Regulation of thrombomodulin by tumor necrosis factor- $\alpha$ : comparison of transcriptional and posttranscriptional mechanisms  
*Blood* 1991; 77: 542-550
75. Levi M, ten Cate H, van der Poll T  
Endothelium: Interface between coagulation and inflammation  
*Crit Care Med* 2002; 30: S220-S224
76. Levi PJ, Gonzalez MF, Hornung CA, Chang WW, Haynes JL, Rush DL  
A prospective evaluation of atherosclerotic risk factors and hypercoagulability in young adults with premature lower extremity atherosclerosis.  
*J Vasc Surg* 1996; 23: 36-43
77. Liao F, Andalibi A, deBeers FC, Fogelman AM, Lusis AJ  
Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice  
*J Clin Invest* 1993; 91: 2572-2579
78. Libby P  
Inflammation and atherosclerosis  
*Nature* 2002; 420: 868-874
79. Libby, P  
Atherosclerosis, 1345-1352  
In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL (Hrsg.): *Harrison's principles of internal medicine*  
14. Aufl. McGraw-Hill Company, New York 1998
80. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ  
Protein measurement with the folin phenol reagent  
*J Biol Chem* 1951; 193: 265-275

81. Marre R, Hahn H  
Chlamydien, 441-450  
In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie  
3. Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1999
82. Marrie TJ, Grayston JT, Wang SP, Kuo CC  
Pneumonia associated with the TWAR strain of *Chlamydia*  
Ann Int Med 1987; 106: 507-511
83. Meijer A, van der Vliet A, Roholl PJM, Gielis-Proper SK, de Vries A, Ossewaarde JM  
*Chlamydia pneumoniae* in abdominal aortic aneurysms – abundance of membrane components in the absence of heat shock protein 60 and DNA  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2680-2686
84. Mlot C  
Chlamydia linked to atherosclerosis  
Science 1996; 272: 1422
85. Molestina RE, Dean D, Miller RD, Ramirez JA, Summersgill JT  
Characterisation of a strain of *Chlamydia pneumoniae* isolated from a coronary atheroma by analysis of the *omp1* gene and biological activity in human endothelial cells  
Infect Immun 1998; 66: 1370-1376
86. Molestina RE, Miller RD, Ramirez JA, Summersgill JT  
Infection of human endothelial cells with *Chlamydia pneumoniae* stimulates transendothelial migration of neutrophils and monocytes  
Infect Immun 1999; 67: 1323-1330
87. Moore KL, Esmon CT, Esmon NL  
Tumor necrosis factor leads to the internalisation and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture  
Blood 1989; 73: 159-165
88. Mosmann T  
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.  
J Immunol Methods 1983; 65: 55-63
89. Muhlestein JB, Anderson JL, Carlquist JF, Salunkhe K, Horne BD, Pearson RR, Bunch TJ, Allen A, Trehan S, Nielson C  
Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease: primary clinical results of the ACADEMIC study  
Circulation 2000; 102: 1755-1760
90. Murray CJL, Lopez AD  
Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study  
Lancet 1997; 349: 1269-1276

91. Nagel T, Resnick N, Dewey CF, Gimbrone MA  
Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1825-1834
92. Nawroth PP, Stern DM  
Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor  
*J Exp Med* 1986; 163: 740-745
93. Ngeh J, Anand V, Gupta S  
Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis – what we know and what we don't  
*Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 2-13
94. Nordt TK, Bode C  
Endothel und endogene Fibrinolyse  
*Z Kardiol* 2000; 89: 219-226
95. Okashi K, Burkaart V, Flohe S, Kolb H  
Cutting edge: Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor 4 complex  
*J Immunol* 2000; 164: 558-561
96. Poole JC, Florey HW  
Changes in the endothelium of the aorta and the behaviour of macrophages in experimental atheroma of rabbits  
*J Pathol Bacteriol* 1958; 75: 245-251
97. Quaschnig T, Ruschitzka FT, Maier W, Lüscher TF  
Die Rolle des Endothels bei der Entstehung und Behandlung von Gefäßkrankheiten  
*Internist* 2000; 41: 355-362
98. Quinn TC, Gaydos CA  
In vitro infection and pathogenesis of *Chlamydia pneumoniae* in endothelial cells  
*Am Heart J* 1999; 138: S507-S511
99. Rangnekar VM, Aplin AC, Sukhatme VP  
The serum and TPA responsive promoter and intron-exon structure of EGR2, a human early growth response gene encoding a zinc finger protein  
*Nucleic Acid Res* 1990; 18: 2749-2757
100. Rival Y, Del Maschio A, Rabiet MJ, Dejana E, Duperray A  
Inhibition of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 synthesis and leucocyte transmigration in endothelial cells by the combined action of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$   
*J Immunol* 1996; 157: 1233-1241
101. Roblin PM, Dumornay W, Hammerschlag MR  
Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*  
*J Clin Microbiol* 1992; 30: 1968-1971

102. Rödel J, Prochnau D, Prager K, Pentcheva E, Hartmann M, Straube E  
Increased production of matrix metalloproteinases 1 and 3 by smooth muscle cells upon infection with *Chlamydia pneumoniae*  
FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 38: 159-164
103. Rosenfeld ME  
An overview of the evolution of the atherosclerotic plaque: from fatty streak to plaque rupture and thrombosis  
Z Kardiol 2000; 89: VII/2-VII/6
104. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, Huttunen JK, Valtonen V  
Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction  
Lancet 1988; 2: 983-986
105. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnanmäki E, Ekman MR, Manninen V, Mänttari M, Frick MH, Huttunen JK  
Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the helsinki heart study  
Ann Int Med 1992; 116: 273-278
106. Schwachtgen JL, Houston P, Campbell C, Sukhatme V, Braddock M  
Fluid shear stress activation of egr-1 transcription in cultured human endothelial and epithelial cells is mediated via the extracellular signal-related kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway.  
J Clin Invest 1998; 101: 2540-2549
107. Shaulian E, Karin M  
AP-1 as a regulator of cell life and death  
Nature Cell Biol 2002; 4: E131-E136
108. Shimizu T, Kinugawa K, Yao A, Sugishita K, Harada K, Matsui H, Kohmoto O, Serizawa T, Takahashi T  
Platelet-derived growth factor induces cellular growth in cultured chick ventricular myocytes  
Cardiovasc Res 1999; 41: 641-653
109. Sohn RH, Deming CB, Johns DC, Champion HC, Bian C, Gardner K, Rade JJ  
Regulation of endothelial thrombomodulin expression by inflammatory cytokines is mediated by activation of nuclear factor-kappa B  
Blood 2005; 105: 3910-3917
110. Southern EM  
Detection of specific sequences among DNA-fragments seperated by gel electrophoresis  
J Mol Biol 1975; 98: 503-517

111. Stone AF, Mendall MA, Kaski JC, Edger TM, Risley P, Poloniecki J, Camm AJ, Northfield T  
Effect of treatment for Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori on markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes: South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina (STAMINA)  
Circulation 2002; 106: 1219-1223
112. Swirnoff AH, Milbrandt J  
DNA-binding specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors  
Mol Cell Biol 1995; 15: 2275-2287
113. Thomas PS  
Hybridisation of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose  
Proc Natl Acad Sci 1980; 77: 5201-5205
114. Timmons TM, Dunbar BS  
Protein blotting and immunodetection  
Meth Enzymol 1990; 182: 679-688
115. Tohda G, Oida K, Okada Y, Kosaka S, Okada E, Takahashi S, Ishii H, Miyamori I  
Expression of thrombomodulin in atherosclerotic lesions and mitogenic activity of recombinant thrombomodulin in vascular smooth muscle cells  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 1861-1869
116. Wu KK, Thiagarajan P  
Role of endothelium in thrombosis and hemostasis  
Annu Rev Med 1996; 47: 315-331
117. Wu SQ, Aird WC  
Thrombin, TNF- $\alpha$  and Lipopolysaccharide Exert Overlapping but Non-identical Effects on Gene Expression in Endothelial Cells and Vascular Smooth Muscle Cells.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005; [Epub ahead of print]
118. Wun TC, Kretzmer KK  
cDNA cloning and expression in E. coli of a plasminogen activator inhibitor (PAI) related to a PAI produced by Hep G2 hepatoma cell.  
FEBS Lett 1987; 210: 11-16
119. Wuppermann FN, Hegemann JH, Jantos CA  
Heparan sulfat-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for Chlamydia pneumoniae  
J Infect Dis 2001; 184: 181-187
120. Young JL, Libby P, Schonbeck U  
Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis  
Thromb Hemost 2002; 88: 554-567

121. Zeng XR, Sun Y, Wenger L, Cheung HS  
Induction of early growth response gene Egr2 by basic calcium phosphate crystals through a calcium-dependent protein kinase C-independent p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway  
Cells Tissues Organs 2003; 174: 63-72
122. Zhu Y, Farrehi PM, Fay WP  
Plasminogen activator inhibitor-1 enhances neointima formation after oxidative vascular injury in atherosclerosis-prone mice  
Circulation 2001; 103: 3105-3110
123. Zou Y, Hu Y, Metzler B, Xu Q  
Signal transduction in atherosclerosis: mechanical stress-activated MAP kinases in vascular smooth muscle cells (review)  
Int J Mol Med 1998; 1: 827-834

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

## Danksagung

Herrn PD Dr. Dietmar von der Ahe, Herrn PD Dr. Christian Jantos und Herrn Prof. Dr. Johannes Hegemann danke ich für die Überlassung des Themas und die engagierte Betreuung.

Frau Dr. Birgit Weiß danke ich ganz besonders für die hervorragende experimentelle Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Müller-Berghaus und Herrn Prof. Dr. Chakraborty danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Für das tolle Arbeitsklima und ständige Hilfsbereitschaft danke ich Dr. Stephanie Hehlhans, Dr. Astrid Wietelmann, Bettina Gissel, Dr. Frederik Wuppermann und Dr. Martin Keller.

Für das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich meinen Eltern Christa und Reinhard Steinmüller und Lars Giebeler.

Mein größter Dank gilt Mirja Glotzbach, die mir in allen Phasen dieser Doktorarbeit liebevoll beigestanden hat.

Pestalozzistr. 74  
35394 Gießen  
Tel: 0641-203042

## Mirko Steinmüller

<b>Persönliche Daten</b>	geboren am 27.1.1976 in Wetzlar Familienstand: ledig
<b>Schulbildung</b>	1982-1988 Wilhelm Leuschner Schule, Heuchelheim 1988-1995 Herderschule, Gießen Abitur 1995
<b>Studium</b>	Universität Gießen, Humanmedizin Physikum 1997 1.Staatsexamen 1998 2.Staatsexamen 2001 3. Staatsexamen 2002
<b>Famulaturen</b>	1998 Innere Medizin Klinikum Wetzlar, Medizinische Klinik II 1998 Innere Medizin Kreiskrankenhaus Gießen in Lich 1999 Chirurgie Dr. Mackinnon Memorial Hospital Broadford, Isle of Skye, UK 2000 Lungen- und Bronchialheilkunde/Allergologie Gemeinschaftspraxis Dr.Breuer/Dr.Troß, Gießen
<b>Praktisches Jahr</b> (11/2001-10/2002)	1. Terial: Rheumatologie Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim 2. Terial: Innere Medizin Universitätsklinikum Gießen 3. Terial: Chirurgie Queen Elizabeth Hospital, University of Birmingham Universitätsklinik Gießen
<b>Berufliche Laufbahn</b>	1/2003-6/2004 AIP an der Medizinischen Klinik II der Justus Liebig Universität Gießen im Bereich allgemeine Innere Medizin / Pneumonologie / Infektiologie Seit 7/2004 Stipendiat im Rahmen des internationalen Graduiertenkollegs „Molecular Biology and Medicine of the Lung“

Giessen, den 25.7.2005

### **Experimentelle Doktorarbeit**

Untersuchungen zur Genexpression von primären humanen Endothelzellen nach Infektion mit *Chlamydia pneumoniae*  
Abteilung Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim  
Februar 1999-September 2000

### **Kongressbeiträge**

Birgit Weiss, Frederick Wuppermann, **Mirko Steinmüller**, Christian Jantos, Johannes H. Hegemann and Dietmar von der Ahe  
*Chlamydia pneumoniae* infection alters gene expression in endothelial cells.  
Fourth Meeting of the European Society for *Chlamydia* research, Helsinki, Finland 2000.

Birgit Weiss, Frederick Wuppermann, **Mirko Steinmüller**, Christian Jantos, Johannes H. Hegemann and Dietmar von der Ahe  
*Chlamydia pneumoniae* infection alters gene expression in endothelial cells. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 32:3 (2000). Xth International Vascular Biology Meeting, Geneva, Switzerland, 2000.

**Mirko Steinmüller**, Birgit Weiss, Frederick Wuppermann, Christian Jantos, Johannes H. Hegemann and Dietmar von der Ahe  
Alterations in endothelial cell expression patterns and hemostatic function due to *Chlamydia pneumoniae* infection. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 32:3 (2000). Xth International Vascular Biology Meeting, Geneva, Switzerland, 2000.

B. Weiss, F.N. Wuppermann, **M. Steinmüller**, C. Jantos, J.H. Hegemann, D. von der Ahe.  
*Chlamydia pneumoniae* Infections Alters Gene Expression in Endothelial Cells. Cellular and Molecular Events in the Pathogenesis of Atherosclerosis. Keystone Symposia, Keystone Colorado, USA, April 2001.

**M.Steinmueller**, B.Weiss, F.N.Wuppermann, C.Jantos, J.H.Hegemann, R.Zimmermann, D.von der Ahe  
*Chlamydia pneumoniae* infection alters gene expression in endothelial cells  
3rd Symposium on the Biology of Endothelial Cells, Giessen, May 2001

### **Publikationen in Zeitschriften**

**Mirko Steinmüller**, Birgit Weiss, Frederick Wuppermann, Christian Jantos, Johannes H. Hegemann and Dietmar von der Ahe  
*Chlamydia pneumoniae* infection of primary human endothelial cells decreases expression of thrombomodulin  
Manuskript in Vorbereitung