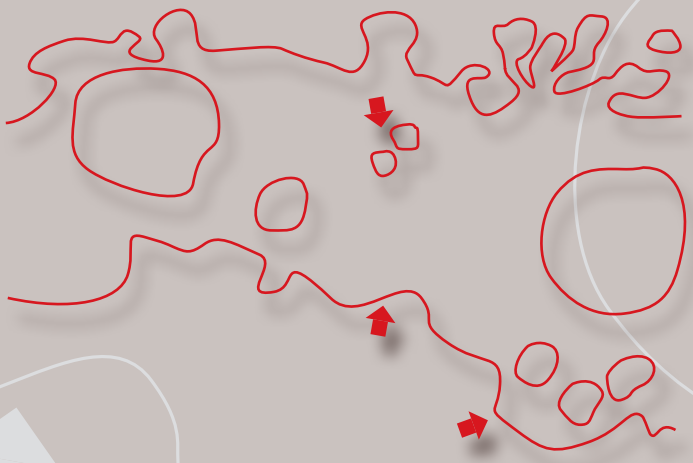
UTE A. ZAKEL

Chlamydia pneumoniae-infizierte humane Monozyten und die proinflammatorische Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB und dessen Inhibitor IκB-α



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Chlamydia pneumoniae-infizierte humane Monozyten und die proinflammatorische Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB und dessen Inhibitor IκB-α

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Ute Agathe Zakel

aus Hermannstadt

Gießen, 2009

Aus dem Zentrum der Medizinischen Klinik I,
Kardiologie & Angiologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen

Leiter Prof. Dr. H. Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. Werner Haberbosch

Gutachter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Tag der Disputation: 14.09.2010

Für meine Eltern Elena und Wilhelm Zakel,

für Jörg

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Einführung und Ziel der Studie 1

1.2 Chlamydia pneumoniae – Risikofaktor in der Pathogenese der Arteriosklerose 3

1.3 Rolle der Antibiotika in der Prävention der Arteriosklerose 13

1.4 Makrophagen/Monozyten 16

1.5 Lipopolysaccharid (LPS) 19

1.6 Transkriptionsfaktor Nuclear Factor kappa B (NF-κB) 20

1.6.1 Proteinstruktur NF-κB 22

1.6.2 Proteinstruktur IκB-α 23

1.6.3 Steuerung der NF-κB-Aktivierung durch IκB-α und Proteinkinasen 25

1.6.4 Biologische Funktion des NF-κB 27

1.7 NF-κB-gesteuerte Tissue Factor-Expression und Arteriosklerose 30

1.8 Themenstellung 32

2 Materialien 34

2.1 Vielfach verwendete Chemikalien 34

2.2 Plastik und Verbrauchmaterialien 35

2.3 Materialien und Lösungen für die Zellisolation und -kultur 36

2.4 Materialien und Lösungen für die indirekte TF-Messung 36

2.5 Materialien und Lösungen für die quantitative Proteinbestimmung 37

2.6 Materialien und Lösungen zur Oligonukleotid-Markierung und EMSA-PAGE 37

2.7 Materialien und Lösungen für das Immunoblotting 38

2.8 Experimentelle Reagenzien und Pharmaka 39

2.9 Verbrauchsmaterialien 39

3 Methoden 40

3.1 Isolierung und Kultur von humanen Blutmonozyten 40

3.1.1 Auftrennung von Blutzellen über einen Ficoll-Dichtegradienten 40

3.1.2 Isolierung von Monozyten durch Adhärenzverfahren 41

3.1.3 Zellkultur 41

3.2 Stimulationsexperimente 42

3.2.1 Stimulation mit bakteriellem Endotoxin 42

3.2.2 Infektion der Monozytenkultur mit Chlamydia pneumoniae 42

3.2.3 Hitzeinaktivierung der Chlamydia pneumoniae 43

3.2.4 Stimulationsprotokolle 43

3.3 Procoagulatory clotting assay (PCA) 46

3.4 Proteinisolierung und Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration 46

3.5 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) 47

3.5.1 Radioaktive Markierung und Aufreinigung einer DNS-Sonde 48

3.5.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) 49

3.5.3 Vorbereitung der Proben und Band Shift-Vorgang 50

3.5.4 Supershift Assay mit NF-κB-Antikörper p50 und p65 51

3.5.5 Spezifische und unspezifische kompetitive Hemmungsreaktion 51

3.6 Western Blot 52

3.6.1 SDS-PAGE 52

3.6.2 Immunoblotting 54

3.6.3 Stripping und Wiederverwendung der PVDF-Transfermembran 55

3.7 Vitalitätsbestimmung der Monozyten 55

4 Ergebnisse 56

4.1 Voruntersuchungen 56

4.1.1 Supershift Assay mit NF-κB-Antikörper p50 und p65 57

4.1.2 Kompetitive Hemmungsreaktionen 59

4.2 Zeitabhängige NF-κB-Aktivierung in LPS-stimulierten humanen Monozyten 60

4.3 Zeitabhängige IκB-α-Aktivierung in LPS-stimulierten humanen Monozyten 61

4.4 Infektion humaner Monozyten mit Chlamydia pneumoniae 63

4.4.1 Zeitabhängige NF-κB-Aktivität in Chlamydia pneumoniae-infizierten humanen Monozyten 63

4.4.2 Zeitabhängige IκB-α-Aktivität in Chlamydia pneumoniae-infizierten humanen Monozyten 64

4.5 Humane Monozyten nach zweistündiger Infektion mit Chlamydia pneumoniae 66

4.5.1 NF-κB-Aktivität 66

4.5.2 IκB-α-Aktivität 68

4.6 Humane Monozyten nach achtstündiger Infektion mit Chlamydia pneumoniae 70

4.6.1 NF-κB-Aktivität 70

4.6.2 IκB-α-Aktivität 73

4.7 Humane Monozyten nach 24-stündiger Infektion mit Chlamydia pneumoniae 75

4.7.1 NF-κB-Aktivität 75

4.7.2 IκB-α-Aktivität 78

4.8 Humane Monozyten nach 72-stündiger Infektion mit Chlamydia pneumoniae 80

4.8.1 NF-κB-Aktivität 80

4.8.2 IκB-α-Aktivität 82

4.9 NF-κB-Aktivität in Chlamydia pneumoniae-infizierten Monozyten – Zeitreihe 8, 24 und 72 Stunden 84

4.10 Infektion humaner Monozyten mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae 85

4.10.1 NF-κB-Aktivität 85

4.10.2 IκB-α-Aktivitäten 88

4.11 Tissue Factor-Expression in humanen Monozyten nach Infektion mit Chlamydia pneumoniae 91

5 Diskussion 93

5.1 Diskussion der Methoden 101

5.1.1 EMSA 101

5.1.2 Western Blot 104

6 Zusammenfassung 106

7 Abkürzungsverzeichnis 108

8 Abbildungsverzeichnis 112

9 Tabellenverzeichnis 115

10 Diagrammverzeichnis 116

11 Literaturverzeichnis 117

12 Erklärung 125

13 Danksagung 126

14 Lebenslauf 127

1 Einleitung

1.1 Einführung und Ziel der Studie

Die Koronare Herzerkrankung (KHK) stellt in den Industriestaaten die häufigste Todesursache dar. Dabei ist die Arteriosklerose der wichtigste Faktor in der Entstehung der KHK. Arteriosklerose wird als eine progressive Erkrankung der Gefäße eingestuft, an der chronische Entzündungs- und proliferative Prozesse beteiligt sein sollen. Die Grundlage arteriosklerotischer Plaques sind rezidivierende Verletzungen der arteriellen Tunica interna durch Mikroläsionen und Stressfaktoren, die zu einer Endotheldysfunktion führen. Zu den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, die Arteriosklerose begünstigen, zählen arterielle Hypertension, Hyperlipidämie, Zigarettenrauchen und Diabetes mellitus. Zusätzlich sind weitere Risikofaktoren der Arteriosklerose untersucht worden. Dabei hat die Diskussion einer infektiösen Genese der Arteriosklerose zunehmende Bedeutung. Nach heutigen Erkenntnissen wird die Entstehung der Arteriosklerose primär als ein chronisch inflammatorisches Geschehen gewertet. In der Unterhaltung dieses Prozesses haben Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten eine wichtige Bedeutung. Die Interaktion zwischen Zellen der Immunabwehr und Endothelzellen führt zur Ausschüttung verschiedenster Zytokine, die eine Entzündungsreaktion und Wachstum der Plaques unterhalten (Muhlestein et al 1996; Moreno P 1997).

Mit verstärktem Interesse wird ein kausaler Zusammenhang zwischen KHK und der Infektion mit dem humanpathogenen Keim Chlamydia pneumoniae untersucht. Diese Annahme basiert auf epidemiologische Studien, die eine Assoziation zwischen dem serologischen Nachweis einer Chlamydia pneumoniae Infektion und der KHK zeigen. Einige Studien belegen das Vorkommen von Chlamydia pneumoniae in arteriosklerotischen Plaques (Saikku et al 1992; Thom et al 1992).

Der zelluläre Pathomechanismus einer Infektion mit Chlamydia pneumoniae und die kausale Auswirkung auf die Genese der Arteriosklerose ist bisher noch nicht geklärt. Die Hypothese, dass eine Chlamydieninfektion durch Unterhaltung lokaler

inflammatorischer Prozesse eine Rolle in der Plaquebildung bzw. Plaqueinstabilität spielen könnte, ist Anlass für den Gegenstand folgender Untersuchungen.

Das strikt intrazelluläre Pathogen Chlamydia pneumoniae kann von Makrophagen phagozytiert werden. Die inflammatorisch aktiven Makrophagen mit Vorkommen in arteriosklerotischen Plaques exprimieren eine Vielzahl NF-κB-regulierter Genprodukte, wie Zytokine, Tissue Factor und Adhäsionsmoleküle (Tab. 1.2) (Lee et al 1998; Rothwarf et al 1999; Albert 2000).

NF-κB ist ein sehr gut charakterisierter Transkriptionsfaktor, der an zellulären Entzündungsreaktionen und Wachstum beteiligt ist. Das NF-κB ist im Zytoplasma als inaktive Form an dem Inhibitorprotein IκB-α gebunden (Baldwin 1996; Lee et al 1998). Es bedarf bestimmter exogener Stimuli, die eine Aktivierung von NF-κB bewirken. Eine NF-κB induzierte Entzündungsreaktion in Makrophagen arteriosklerotischer Plaques könnte ein Kofaktor in der Pathogenese der Arteriosklerose sein (Fabricant et al 1978; Baldwin 1996).

Das Ziel der folgenden Arbeit ist die Untersuchung der Aktivierung von NF-κB und dessen Inhibitor IκB-α in humanen Makrophagen, die in vitro mit Chlamydia pneumoniae infiziert wurden.

1.2 Chlamydia pneumoniae – Risikofaktor in der Pathogenese der Arteriosklerose

Die Ätiologie und der Progress der Arteriosklerose sind multifaktoriell. Die Bildung von Atheromen unterliegt fibroproliferativen, entzündlichen und lipidspeichernden Prozessen. Atherome sind Gefäßläsionen, die aus verändertem Endothel, glatten Muskelzellen, nekrotischem Fettkörper, aktivierten Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten bestehen.

Die chronische Anreicherung von Monozyten/Makrophagen, glatten Muskelzellen, T-Lymphozyten in der Gefäßwand wird durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren ausgelöst. Der immunologisch bedingte Prozess der Arteriosklerose wird durch endogene und exogene Antigene hervorgerufen.

Einige **endogene Faktoren** sind oxidiertes LDL, Lipoprotein a, Lipoproteinlipase, Hitzeschockproteine, Kollagen, Fibrinogen.

Erhöhte Lipoproteinplasmaspiegel können durch Lipideinlagerungen die Entstehung von Gefäßläsionen triggern. Der Lipideinschluss führt zur initialen Phase der Inflammation durch erhöhte Leukozytenadhärenz und Leukozytendiapedese an der Endotheloberfläche. Die dabei beteiligten Adhäsionsmoleküle könnten durch den oxidativen Stress bei der Speicherung von Lipoproteinen exprimiert werden (Milioti et al 2008). Gefäßwandadhärente Monozyten nehmen mittels Scavenger-Rezeptoren Lipide auf und differenzieren zu Schaumzellen.

Die inflammatorischen Mediatoren, die bei der Proliferation und Aktivierung der Schaumzellen entstehen, begünstigen den Progress der Gefäßläsion durch Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen aus der Tunica media in die Tunica intima unter Bildung einer fibrösen Atheromkappe. Der lipidreiche Bereich nekrotisiert im Verlauf durch Zellapoptose. Die ausgeprägten Gefäßveränderungen führen zum Verlust der Gefäßfunktionen (Abb. 1.1).

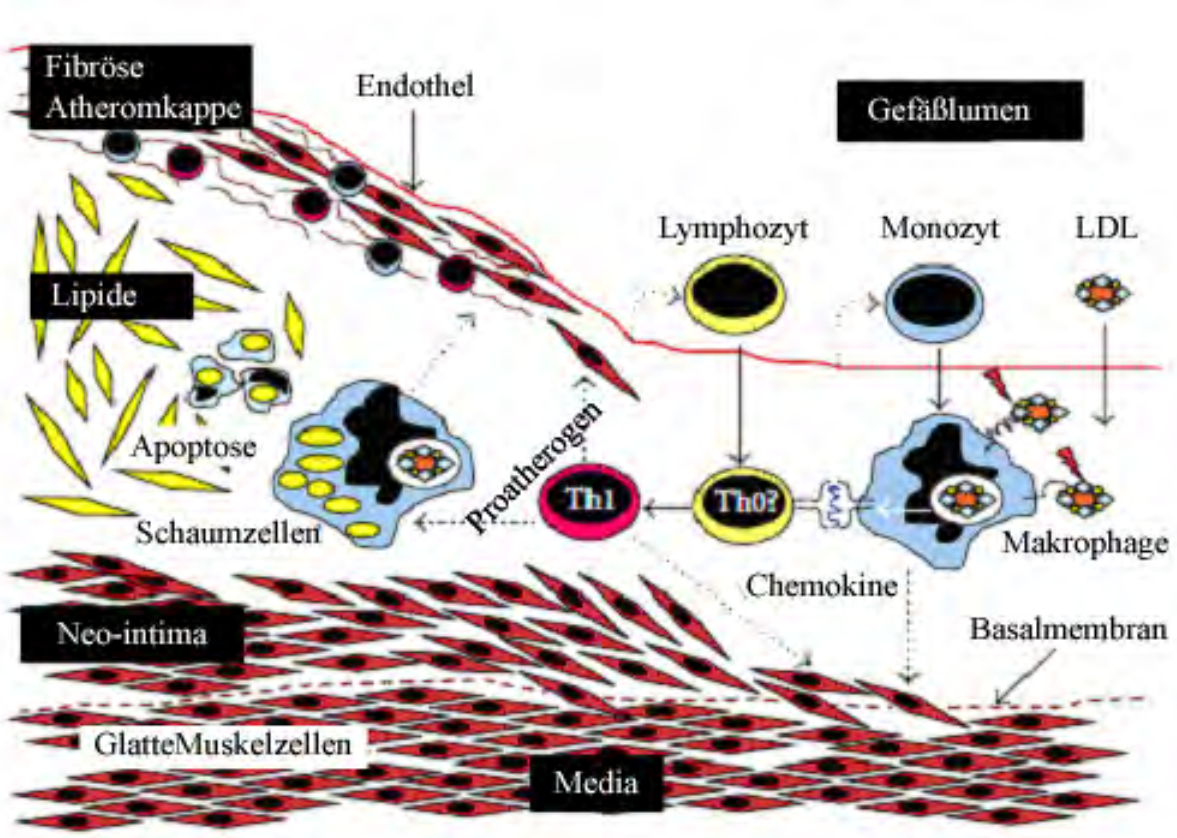


Abb. 1.1 Arteriosklerotische Plaquebildung, inflammatorische Signale ausgehend von geschädigtem Endothel, modifiziert nach Milioti (Milioti et al 2008)

Abb.1.1 zeigt die arteriosklerotische Plaquebildung durch inflammatorische Signale ausgehend von geschädigtem Endothel. Monozyten und Lymphozyten wandern in die Gefäßwand ein. Monozyten differenzieren zu Makrophagen, die oxidiertes LDL phagozytieren. Der Proteinanteil des LDL wird von Makrophagen zu Peptiden umgewandelt und den T-Lymphozyten präsentiert. Die meisten T-Lymphozyten differenzieren zu Effektor-T-Zellen. Durch die Aktivierung von Makrophagen und Lymphozyten werden Zytokine ausgeschüttet, die eine Migration von glatten Muskelzellen zur Bildung einer fibrösen Atheromkappe führen. Im Plaque führt die Apoptose von Schaumzellen zu Lipidablagerungen und zur Bildung eines Lipidcore.

Zu den **exogenen Antigenen** werden mikrobielle Antigene wie Chlamydia pneumoniae diskutiert. Unklar ist, ob Chlamydia pneumoniae in vivo eine Zellapoptose hervorrufen kann. In vitro-Daten mit Chlamydia pneumoniae infizierten, lipidbeladenen Mausmakrophagen bestätigen diese Möglichkeit (Rosenfeld et al 2000).



Abb. 1.2 Antigen induzierte Immunmodulation in der Pathogenese der Arteriosklerose, modifiziert nach Milioti (Milioti et al 2008)

Histopathologische Aufarbeitung eines Atheroms einer Apolipoprotein E-defizienten Maus, Giemsa Färbung, L=Lumen, SR= Schulterregion (mit erhöhter Anzahl proinflammatorischer Zellen) , FC= Fibröse Kappe, LC= Lipidcore, M= Tunica media

Der Hypothese einer infektiösen Kausalität der Arteriosklerose wurde bereits in den 70-er Jahren nachgegangen. Fabricant et al. konnte nachweisen, dass Avian Herpes Virus infizierte Hühner vermehrt vaskuläre Läsionen, ähnlich denen humaner arteriosklerotischer Läsionen, entwickelten (Fabricant et al 1978).

Eine Reihe von Untersuchungen ergaben Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, Herpes simplex Virus (HSV) und Cytomegalievirus (CMV) als Kofaktoren oder primäre Ätiologiefaktoren in der Pathogenese der Arteriosklerose. In diesem Zusammenhang erweckte Chlamydia pneumoniae verstärkte Aufmerksamkeit.

Chlamydien sind obligat intrazelluläre, gramnegative Bakterien, von denen drei Spezies der Chlamydien Gattung bekannt sind. Chlamydia trachomatis, Verursacher urogenitaler Infektionen und des Trachoms. Chlamydia psittaci, Erreger der Ornithose und humaner Atemwegsinfektionen. Chlamydia pneumoniae, welche obere und untere Atemwegsinfektionen verursacht.

Die Replikation von Chlamydia pneumoniae erfolgt in mehreren Stadien. Die infektiöse, invasive, extrazellulär überlebensfähige Form wird Elementarkörperchen (elementar body, EB) bezeichnet. Die Elementarkörperchen (0,3 µm) werden über Aerosole übertragen und befallen im Wirtsorganismus mononukleäre Zellen und Endothelzellen. Die Endozytose in die Wirtszelle erfolgt über Zellmembranrezeptoren in ein Phagosom. Das in dem Phagosom befindliche EB verhindert die lysosomale Fusion und damit die eigene Zerstörung. Im Phagosom entwinden die Elementarkörperchen ihre DNA als Initialkörperchen, um sich anschließend durch Zweiteilung als nichtinfektiöse Retikularkörperchen (reticular body, RB) zu vermehren. Die Retikularkörperchen (1,0 µm) kondensieren zu Einschlusskörperchen, die in der Wirtszelle verweilen können. Die Einschlusskörperchen können erneut in Elementarkörperchen zurück differenzieren, welche die Zellwand lysieren und als infektiöse Form durch Exozytose freigesetzt werden (Abb. 1.3 und Abb. 1.4). Aufgrund des komplexen Infektions- und Replikationszyklus von Chlamydia pneumoniae ist das Immunsystem in der erschwerten Lage, den Keim zu eradizieren oder eine Reinfektion zu verhindern (Belland et al 2004; Campbell et al 2004).

Die äußere Zellmembran von Chlamydia pneumoniae enthält Lipopolysaccharide (LPS), die strukturelle Ähnlichkeiten mit der anderer gramnegativer Bakterien besitzt. Weitere Zellmembranbestandteile sind Spezies spezifische „outer membrane proteins“ (OMP), die von diagnostischer Relevanz sind, da sie von monoklonalen Antikörpern erkannt werden und somit dem Nachweis einer Chlamydia pneumoniae Infektion dienen. Chlamydien enthalten auch „heat shock proteins“ (HSP), die in den OMP der Elementarkörperchen und Retikulärkörperchen vorzufinden sind. HSP wirken äußerst immunstimulierend während des Infektionszyklus.

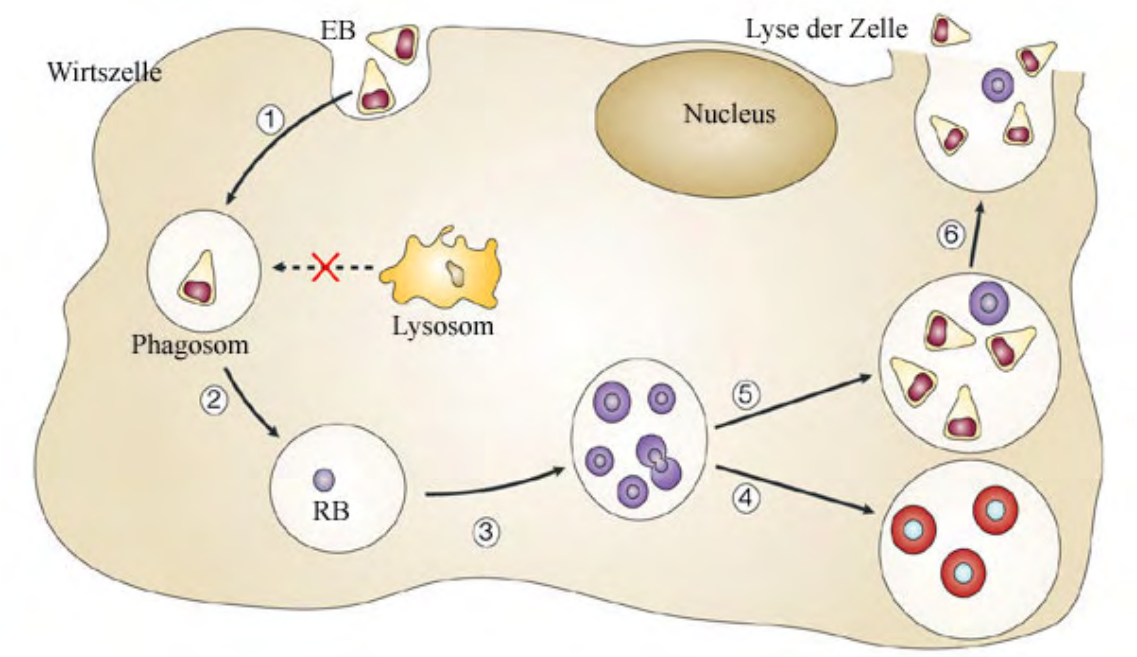


Abb. 1.3 Replikationszyklus von Chlamydia pneumoniae, modifiziert nach Campbell und Kuo (Campbell et al 2004)

(1) Endozytose des elementar body (EB) in ein Phagosom. Durch die Präsenz von Chlamydia pneumoniae wird die Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom verhindert. (2) EB reift zum nichtinfektiösen reticular body (RB) und vermehrt sich durch Zweiteilung (3). (4) Es bilden sich Einschlusskörperchen, die in einer nichtinfektiösen, nicht teilungsfähigen Form in der Wirtszelle persistieren können. Die RB können auch in infektiösen EB zurück differenzieren (5), die von der Wirtszelle durch Lyse freigegeben werden (6).

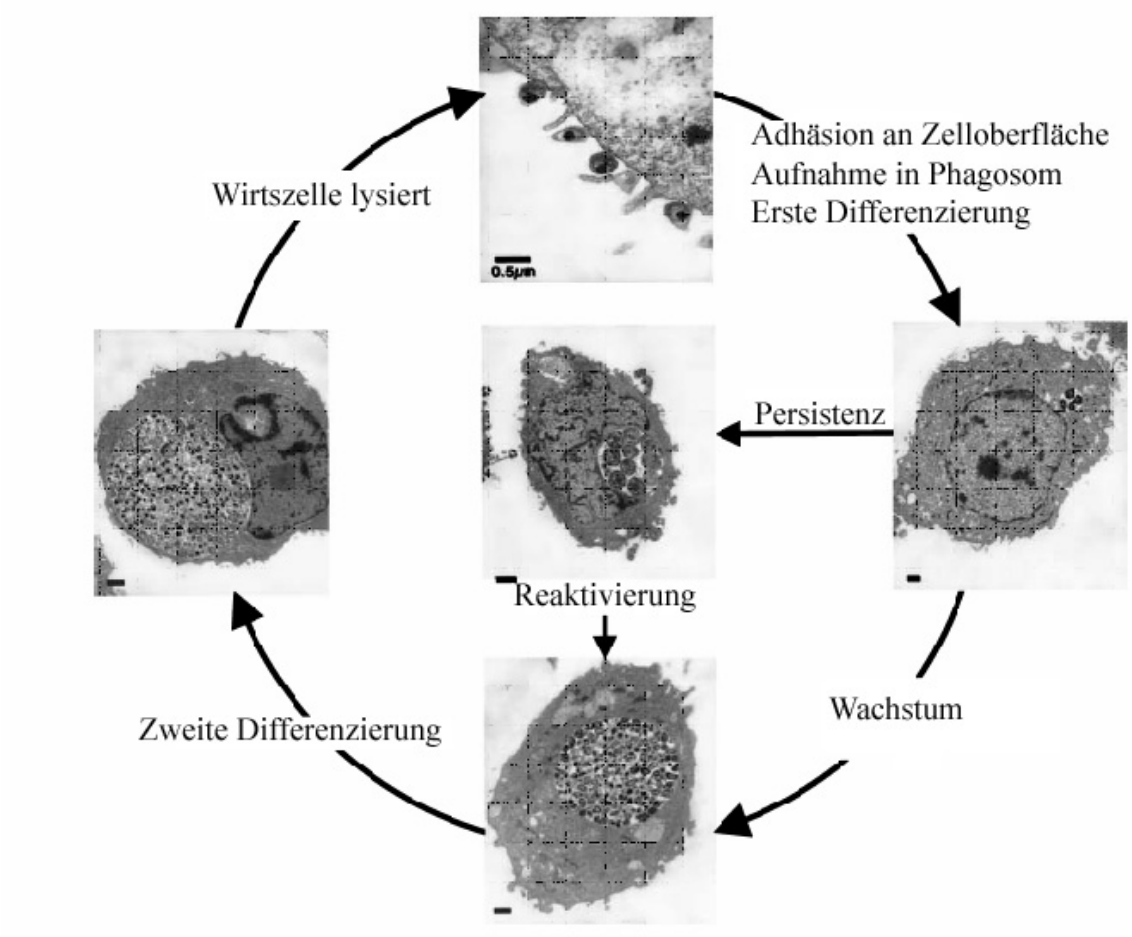


Abb. 1.4 Replikationszyklus von Chlamydia pneumoniae, elektronenmikroskopische Darstellung, modifiziert nach Belland et al. (Belland et al 2004)

Die Prävalenz der Chlamydia pneumoniae Infektion ist in Entwicklungsländern erhöht und nimmt ab dem Vorschulalter kontinuierlich zu, um eine Seroprävalenz von ca. 75 % in der Erwachsenenbevölkerung zu erreichen. Hinweisend auf eine persistierende chronische Chlamydieninfektion sind erhöhte IgA-Spiegel, wobei IgG-Antikörper über Jahre vorhanden sein können. Für eine akute Chlamydieninfektion sprechen erhöhte IgM Titer > 1:32 oder eine vierfacher IgG-Anstieg post infectionem, hingegen führt eine Reinfektionen mit Chlamydien zu keinem IgM-Titer Anstieg. Zur Chlamydien-Antikörperbestimmung hat sich der Spezies spezifische Antikörpertest micro-immuno-fluorescence Test (MIF) etabliert (Jackson et al 1997).

Bereits im Jahr 1992 ergaben Studien die ersten **elektronenmikroskopischen Nachweise** von Chlamydia pneumoniae in Makrophagen arteriosklerotischer Läsionen (Shor et al 1992; Kuo et al 1993). Es folgten weitere Nachweise mittels **immunhistochemischer Methoden** und DNA-Nachweis mittels PCR (Jackson et al 1997).

Frühe **seroepidemiologische Studien** mit Patienten, die an Myokardinfarkt erkrankt sind oder Angina pectoris-Symptome entwickelt haben, weisen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Chlamydia pneumoniae-Antikörperspiegel auf (Saikku et al 1988; Saikku et al 1992; Linnanmaki et al 1993; Melnick et al 1993).

Tierexperimentelle Arbeiten untersuchten die Rolle von Chlamydia pneumoniae in der Entstehung von Arteriosklerose. Dabei zeigten mit Chlamydia pneumoniae infizierte hyperlipidämische Mauslinien (ApoE -/- oder LDL Rezeptor -/- Mäuse) sowohl eine ausgeprägte Atherombildung, als auch gelang der Bakteriennachweis aus dem Plaque (Moazed et al 1997; Moazed et al 1998; Blessing et al 2001; Takaoka et al 2008). Ein zweites Tiermodell mit New Zealand white rabbits, die bei fettreicher Nahrung Arteriosklerose entwickeln, ergab eine vorzeitige Arteriosklerosebildung nach Infektion mit Chlamydia pneumoniae (Fong et al 1999; Muhlestein 2000).

In vitro Versuche zeigen, dass Chlamydia pneumoniae eine Reihe von Wirtszellen wie Lungenepithelzellen, Alveolarmakrophagen, Monozyten, glatte Muskelzellen der Arterien und Gefäßendothelzellen zu infizieren vermag (Godzik et al 1995; Gaydos et al 1996; Kaukoranta-Tolvanen et al 1996; Fryer et al 1997; Jahn et al 2000).

Chlamydia pneumoniae DNA konnte in peripherem Blut aus CD3-positive T-Lymphozyten und Monozyten isoliert werden, so dass die Vorstellung eines Transports von Chlamydia pneumoniae über Monozyten und Lymphozyten aus der Lunge in die Blutbahn und somit in Atherome bekräftigt wurde (Moazed et al 1998; Maass et al 2000; Haranaga et al 2001). Die in vitro Studie von Gaydos belegt, dass eine Monozytenzelllinie, die mit Chlamydia pneumoniae infiziert wurde, das Pathogen auf Endothelzellen der Koronararterien übertragen kann (Gaydos 2000). Bei Persistenz des Erregers könnte die Infektion eine dauerhafte inflammatorische Aktivität der infizierten Makrophagen auslösen (Lindholt et al 1999).

Kalayoglu et al. postulierte eine Triggerung arteriosklerotischer Prozesse über spezifische Virulenzdeterminanten von Chlamydia pneumoniae. Gezeigt wurde, dass

die zwei Chlamydienkomponenten Chlamydien LPS (cLPS) und Chlamydien heat shock protein (cHSP60) eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Inflammation spielen. Die biologisch aktiven cLPS und cHSP60 bewirken in vitro eine Sekretion inflammatorischer Zytokine und Expression von Adhäsionsmolekülen durch Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen (Kalayoglu et al 2000). cLPS induziert die Bildung von Schaumzellen durch Phagozytose von Lipiden, cHSP60 induziert die Oxidation von LDL in Schaumzellen (Abb. 1.5). Die jedoch deutlich niedrigere inflammatorische Potenz von cLPS vergleichbar mit LPS von Enterobakterien könnte für eine Unterhaltung chronischer Infektion der Chlamydien sprechen.

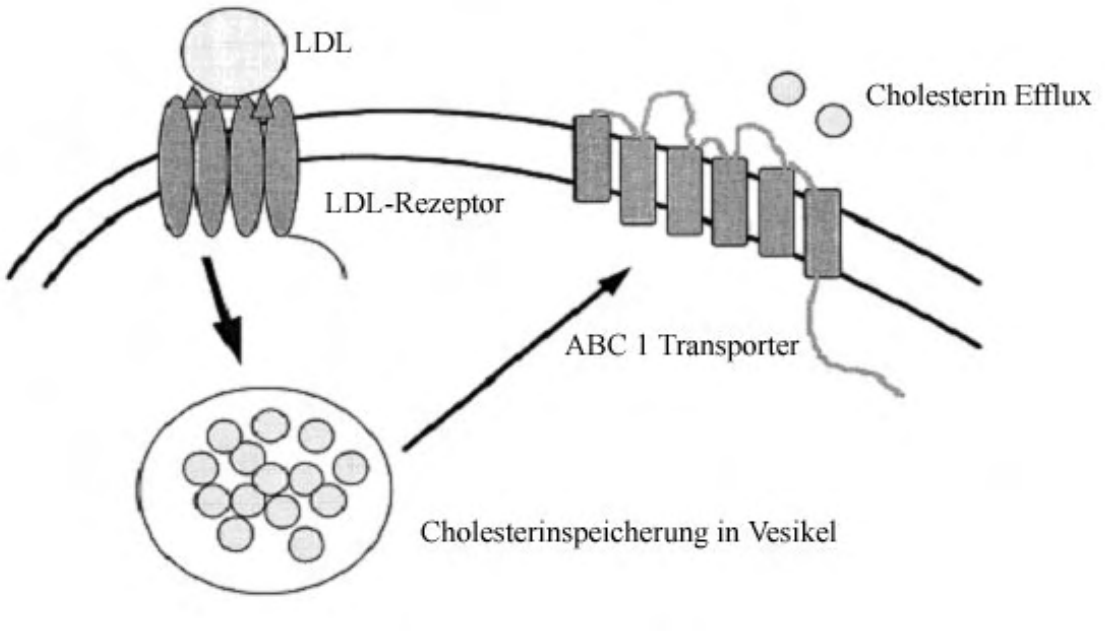


Abb. 1.5 Modell der Schaumzellbildung in der Pathogenese von Arteriosklerose
Chlamydia pneumoniae-infizierte Makrophagen zeigen vermehrten Influx von LDL, verminderten Efflux von LDL (Kalayoglu et al 2000)

Der Pathomechanismus durch den Chlamydia pneumoniae inflammatorische Zellreaktionen hervorruft, dabei die Bildung von arteriosklerotischen Plaques begünstigt und unterhält, wird unter folgenden Gesichtspunkten diskutiert. Durch die Zellinfektion mit Chlamydia pneumoniae werden Adhäsionsmoleküle hochreguliert und Zytokine produziert (Fryer et al 1997; Liuba et al 2000). Untersuchungen speziell an Chlamydia pneumoniae infizierten humanen Monozyten zeigen, dass diese erhöhte Zytokine, wie u.a. TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12, produzieren (Miller et al 2000; Netea et al 2000).

Zusätzlich können infizierte Monozyten eine Makrophagen-Lipoprotein Interaktion derart verändern, dass durch vermehrte Lipoproteinaufnahme Schaumzellen entstehen, die eine Bildung von Atheromen begünstigen können (Kalayoglu et al 1998). Chlamydia pneumoniae infizierte Makrophagen können den intrazellulären Cholesteringehalt nicht mehr regulieren und akkumulieren exzessive Mengen an exogenen Lipiden (Abb. 1.5) (Kalayoglu et al 2000).

Die intrazellulär persistierende Form von Chlamydia pneumoniae unterhält am ehesten eine chronische Infektion und wäre geeignet an dem chronischen Prozess der Arteriosklerose teilzunehmen.

Es gibt jedoch auch kontroverse Studien zur Chlamydienhypothese, zum Nachweis und Isolierung von Chlamydia pneumoniae in Makrophagen und glatten Muskelzellen von arteriosklerotischen Plaques. Daus et al. konnte in seinen Untersuchungen an arteriosklerotisch veränderten Koronararterien keinen Nachweis von Chlamydia pneumoniae erbringen (Daus et al 1998). In vitro Untersuchungen von Wolf et al. ergaben eine verringerte Überlebensfähigkeit von Chlamydia pneumoniae in humanen Monozyten/Makrophagen mit einer deutlich verminderten Replikationsfähigkeit aufgrund der Degradation durch lysosomale Abbauprozesse. Geringe Mengen überlebensfähiger Chlamydia pneumoniae waren nach 72 und 96 Stunden post infectionem nachweisbar. Zusätzlich fanden sich Chlamydia pneumoniae Antigene nicht mehr lebensfähiger Chlamydien wieder, deren Nachweis nicht mit fälschlicher Weise funktionstüchtigen Chlamydien interpretiert werden sollte (Wolf et al 2005). Die Arbeit von Maass et al. zeigte keine Korrelation zwischen erhöhtem Chlamydien-Antikörpertiter und dem Nachweis von Chlamydia pneumoniae in arteriosklerotischen Plaques (Maass et al 1998). Im Gegensatz zu den Tierversuchen mit hyperlipidämischen Mauslinien (ApoE -/- Mäuse) von Moazed et al. zeigte Caligiuri et al. kein erhöhtes Arteriosklerose Vorkommen dieser Mäuse durch primäre Infektion mit Chlamydia pneumoniae (Bhakdi 2000; Caligiuri et al 2001). Molekularbiologische Untersuchungen von Mamata et al. untersuchten auf Zytokin Ebene die Chlamydia pneumoniae Infektion von humanen T-Lymphozyten und der monozytären Zelllinie THP-1. Dabei lässt das infektionsbedingte Zytokinprofil dieser Zellen postulieren, dass eine antibakterielle

Immunität gegen eine Chlamydia pneumoniae Infektion entstehen könnte (Mamata et al 2007).

Ieven und Hoymans hinterfragen in Ihrem Review-Artikel aufgrund der, zwischen 1992 und 2003 durchgeführten diagnostischen und therapeutischen Studien am Menschen, den kausalen Zusammenhang zwischen Chlamydia pneumoniae und Arteriosklerose (Ieven et al 2005).

1.3 Rolle der Antibiotika in der Prävention der Arteriosklerose

Zusammenfassend suggerieren Studien, dass Chlamydia pneumoniae in der Arteriosklerosebildung eine Rolle spielt. Daran anknüpfend gibt es in vivo und in vitro Studien, die Effekte einer antibiotischen Behandlung untersuchen (Welsh et al 1996; Anderson et al 2000; Gurfinkel 2000; Meier 2000; Miller et al 2000; Rosen et al 2000; Higgins 2003; Andraws et al 2005). Das gemeinsame Ziel der Studien besteht darin, den Benefit einer antibiotischen Behandlung hinsichtlich sekundärer Prävention von Patienten mit KHK zu untersuchen.

Es gibt vier Antibiotikaklassen, die für die Behandlung einer Chlamydia pneumoniae-Infektion geeignet sind: Quinolone, Makrolide, Tetrazyklin und Tuberkulostatika wie Rifampicin. Darunter haben die Makrolide mehrere antiinflammatorische Effekte. Makrolide beeinflussen die Migration inflammatorischer Zellen, die Produktion inflammatorischer Mediatoren, Zytokine und könnten hypothetisch eine stabilisierende Wirkung auf arteriosklerotische Plaques haben. Daher wurde für die Antibiotikastudien ein Makrolidantibiotikum ausgewählt (Higgins 2003).

Muhlestein et al. und Fong zeigten, dass eine Prävention der arteriosklerotischen Plaquebildung im Tiermodell durch die Behandlung mit Azithromycin/Clarithromycin erfolgte (Muhlestein et al 1998; Fong 2000). Die Umsetzung dieser Therapieansätze am Menschen führte zu Studien, in denen eine Behandlung von KHK Patienten mit erhöhten Chlamydia pneumoniae-Serumtitern mit Makroliden über unterschiedliche Zeiträume vorgenommen wurde.

Eine Zusammenfassung und Metaanalyse wichtiger Antibiotikastudien bei KHK Patienten von 1966 bis 2005 liefert Andraws et al. Demnach hatten die antibiotischen Therapien keinen Einfluss auf Mortalität, Myokardinfarktrate oder Myokardinfarkt und instabile Angina pectoris bei Patienten mit KHK (Higgins 2003; Andraws et al 2005). Die Studienpatienten waren vorwiegend Männer zwischen 60 und 66 Jahren. Die antibiotische Therapie bestand aus Makroliden, die Therapiedauer variierte zwischen fünf Tagen bis zu zwei Jahren. Alle Studien waren randomisiert, doppelt verblindet und Placebo kontrolliert. Die ROXIS und ANTIBIO Studien benutzten Roxithromycin, WIZARD, ACADEMIC, AZACS, ACES, STAMINA-Studien verwendeten Azithromycin, CLARIFY benutzte Clarithromycin, PROVE-IT-Studie Gatifloxacin

(Tab. 1.1). Obwohl die Antibiotikastudien das klinische Ergebnis durch eine antibiotische Behandlung gegen Chlamydia pneumoniae nicht verbessern konnten, ist eine Beteiligung von Chlamydia pneumoniae an der Ätiologie der Arteriosklerose dennoch nicht ausgeschlossen. Die negativen Ergebnisse könnten u.a. durch die komplexe Pathobiologie der Chlamydieninfektion erklärt werden. Eine Chlamydia pneumoniae Infektion könnte einen direkten schädigenden Effekt an der Arterienwand bewirken oder andere inflammatorische, thrombotische Prozesse triggern, die nicht antibiotikasensibel sind. Eine Chlamydia pneumoniae-Eradikation in vivo ist aufgrund der langen Persistenz, deren besonderen Lebenszyklus und der hohen Reinfektionsrate auch bei langer Therapiedauer extrem schwierig. Sie können eine therapieresistente Form annehmen und gleichzeitig potentiell infektiös wirken (Kalayoglu et al 2002). Eine in vitro-Studie konnte sogar belegen, dass Antibiotika gegen Chlamydia pneumoniae infizierte Monozyten keine bakterizide Wirkung hatte. Daher die Hypothese, dass infizierte Monozyten eine Reinfektion fördern können (Gieffers et al 2001).

Unzählige Studien beschäftigen sich mit dem Einfluss von Chlamydia pneumoniae in der Pathogenese der Arteriosklerose. Weitere immunologische Untersuchungen werden notwendig sein, um auch therapeutische Auswirkungen auf die Behandlung der Chlamydia pneumoniae Infektion und evtl. Prävention von Arteriosklerose zu erzielen.

Tab. 1.1 Antibiotika Studien bei Patienten mit KHK. Tabelle aus Andraws et al. (Andraws et al 2005)

Table 1. Antibiotic Trials in Patients With Coronary Artery Disease

Source	Population	Intervention	Follow-up
	Stable CAD		
Gupta et al,[26] 1997	60 Male patients at least 6 mo from documented MI and with titers to *Chlamydia pneumoniae*≥1:64	Azithromycin 500 mg/d for 3 d (28 received 1 course, 12 received 2 courses 3 mo apart) or placebo	18 mo
ACADEMIC,[27] 1999	302 Patients with CAD and *C pneumoniae* titers of ≥1:16. Patients were at least 5 d from an MI	Azithromycin 500 mg/d for 3 d then 500 mg/wk for 3 mo or placebo	2 y
WIZARD,[28] 2003	7722 Patients with a history of MI of more than 6 weeks before and with *C pneumoniae* titers of ≥1:16	Azithromycin 600 mg/d for 3 d then 1/wk for 11 wk or placebo	14 mo
ACES,[35] 2005	4012 Patients with stable CAD	Azithromycin 600 mg/wk for 1 y or placebo	4 y
	Acute Coronary Syndromes		
ROXIS,[29] 1999	202 Patients with documented history of CAD and ACS	Roxithromycin 150 mg 2/d for 30 d or placebo	6 mo
CLARIFY,[30] 2001	148 Patients with ACS	Clarithromycin 500 mg/d for 85 d or placebo	1 y
Leowattana et al,[31] 2001	84 Patients with ACS	Roxithromycin 150 mg/d for 30 d or placebo	3 mo
STAMINA,[32] 2002	218 Patients with ACS	Azithromycin 500 mg/d for 3 d plus omeprazole 20 mg 2/d for 1 wk plus metronidazole 400 mg 2/d for 1 wk or placebo	1 y
ANTIBIO,[33] 2003	868 Patients with unstable angina or MI	Roxithromycin 300 mg/d for 6 wk or placebo	1 y
AZACS,[34] 2003	1439 Patients with ACS	Azithromycin 500 mg on day 1 followed by 250 mg/d for 4 d or placebo	6 mo
PROVE-IT,[36] 2005	4162 Patients hospitalized with ACS in the preceding 10 d	Gatifloxacin 400 mg/d for 10 d/mo for 2 y or placebo	24 mo

Abbreviations: ACADEMIC, Randomized Secondary Prevention Trial of Azithromycin in Patients with Coronary Artery Disease; ACES, Azithromycin and Coronary Events Study; ACS, acute coronary syndromes; ANITBIO, Antibiotic Therapy after Acute Myocardial Infarction; AZACS, Azithromycin on Recurrent Ischaemic Events in Patients with Acute Coronary Syndromes; CAD, coronary artery disease; CLARIFY, Clarithromycin in Acute Coronary Syndrome Patients in Finland; MI, myocardial infarction; PROVE-IT, Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy; ROXIS, Anitibiotic Roxithromycin in Patients with Acute Non–Q-Wave Coronary Syndrome; STAMINA, South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina; WIZARD, Weekly Intervention with Zithromax for Atherosclerosis and Its Related Disorders.

1.4 Makrophagen/Monozyten

Wichtige entzündungsfördernde Zellen in arteriosklerotischen Plaques sind, neben Endothelzellen, T-Lymphozyten, glatten Muskelzellen, Thrombozyten auch Makrophagen.

Makrophagen sind Abkömmlinge von Monozyten und haben durch ihren Scavenger-Rezeptor phagozytierende Eigenschaften. Das Einwandern von Monozyten aus der Blutbahn durch die Blutgefäßendothelschicht in die Intima wird als ein wichtiger Schritt in der Pathogenese der Arteriosklerose angesehen (Gerrity 1981; Faruqi et al 1993). Dieser Vorgang wird u.a. durch die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM auf der Endothelzelloberfläche gefördert. Subendothelial befindliche Makrophagen können über ihren Scavenger-Rezeptor oxidiertes LDL aufnehmen, speichern und sog. Schaumzellen, foam cells, bilden (Suzuki et al 1997). Sie besitzen weiterhin die Fähigkeit, phagozytiertes Material durch intrazelluläre Hydrolyse zu beseitigen, aber auch die Möglichkeit verschiedene inflammatorische Mediatoren, Wachstums- und Proliferationsfaktoren, als zelluläre Antwort auf ihre Aktivierung, zu bilden.

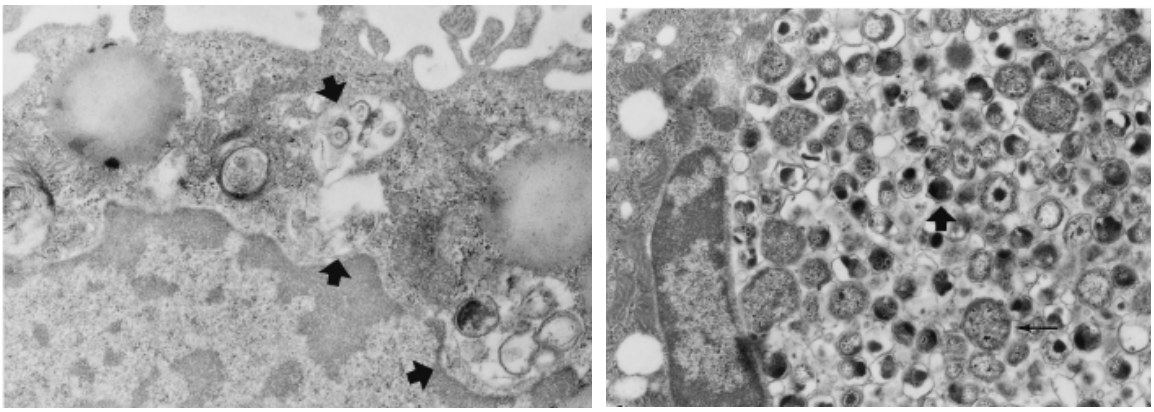
Insgesamt führt eine Aktivierung und Akkumulation von Makrophagen in der Gefäßwand zu einer verstärkten Einwanderung und Proliferation von Fibroblasten und glatten Muskelzellen in die Intima. Dieser Vorgang kann zur Bildung intimaler fibro-muskulären, proliferativen Läsionen führen, die eine Zerstörung der metabolisch aktiven und athrombogenen, schützenden Endothelschicht zur Folge haben. Thrombozyten können zusätzlich an arteriosklerotischen Veränderung haften und zur Thrombusbildung beitragen (Ross 1993; Braunwald 1997).

Makrophagen sind wichtige, inflammatorisch aktive Zellen des arteriosklerotischen Plaque, die eine Vielzahl NF-κB-regulierter Genprodukte, wie z.B. Zytokine, Tissue Factor, Adhäsionsmoleküle exprimieren können.

Aufgrund der Literaturlage besteht der Hinweis, dass eine Chlamydia pneumoniae-Infektion der Gefäßwände den fibroproliferativen inflammatorischen Prozess der Arteriosklerose exazerbieren kann. Dabei spielen die Monozyten/Makrophagen eine entscheidende Rolle.

Untersuchungen ergaben dass, Chlamydia pneumoniae nach der Aufnahme in Alveolarmakrophagen der Lunge über das peribronchial-lymphatische System mittels Blutmonozyten systemisch disseminieren können (Abb. 1.6). Chlamydia pneumoniae infizierte Monozyten können transendothelial migrieren, um sich in Aorta, Milz, arteriosklerotischen Plaques wieder zu finden (Moazed et al 1998; Airenne et al 1999; Gaydos 2000; Maass et al 2000; Kalayoglu et al 2001; Gieffers et al 2004; Krüll M 2005; Rupp 2005). Publikationsergebnisse von Takaoka et al. ergaben eine erhöhte Adhärenz von Chlamydia pneumoniae infizierten Makrophagen an Mausendothelzellen in vitro und in vivo (Takaoka et al 2008).

Maass erbrachte in einer Studie an 238 Patienten mit instabiler Angina pectoris/akuten Myokardinfarkt den Nachweis von Chlamydia pneumoniae mittels PCR in peripheren Blutmonozyten (26 %) (Maass et al 2000).



a. b.

Abb. 1.6 Transmissions-Elektronenmikroskopie von Chlamydia pneumoniae infizierten HL Zellen und Monozyten 72 h post infectionem, Abb. modifiziert nach Airenne (Airenne et al 1999)

(a) Monozyten mit sehr kleinen, von Membran umgebenen Einschlüssen (Pfeile)

(b) Zelleinschlüsse mit Chlamydia pneumoniae Partikel in HL Zellen. EBs sind klein, mit einem elektrodensen Kern (dicker Pfeil). RBs sind groß mit einer grobkörnigen inneren Struktur (dünner Pfeil)

Untersucht wurde in mehreren Studien die inflammatorische Antwort vieler Zelltypen, die bei einer Infektion mit Chlamydia pneumoniae eine Rolle spielen könnten. Chlamydia pneumoniae-infizierte Epithelzellen, als erste Kontaktzelllinie im Infektionsprozess, wurden hinsichtlich Expression von Interleukinen, Adhäsionsmolekülen und Transkriptionsfaktor NF-κB, als Kaskade für proinflammatorische Reaktionen untersucht (Jahn et al 2000). Des Weiteren wurden die Zytokinproduktion (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8) von humanen Monozyten nach Infektion mit Chlamydia pneumoniae untersucht (Gaydos 2000; Netea et al 2000). Humane glatte Gefäßmuskelzellen wurden nach Infektion mit Chlamydia pneumoniae auf die Expression des Transkriptionsfaktors NF-κB und Zytokine untersucht (Gaydos 2000; Miller et al 2000).

Monozyten könnten auf zweierlei Wegen in der Pathogenese der Arteriosklerose eine Bedeutung haben. Zum einen als Transportmedium für die Disseminierung der intrazellulären Chlamydia pneumoniae von der Lunge in die Arterienwand. Zum anderen als immunologisch aktive Zelle mit Bildung inflammatorischer Mediatoren.

1.5 Lipopolysaccharid (LPS)

Lipopolysaccharid (LPS), als Endotoxin der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien, besitzt die Eigenschaft humane Makrophagen zu stimulieren. Deren Antwort auf die Stimulation mit LPS ist die Produktion von endogenen Mediatoren, die u.a. über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB reguliert werden (Schletter et al 1995).

Es ist bekannt, dass LPS seine NF-κB-aktivierende und somit auch zytokinstimulierende Wirkung über membrangebundene Rezeptoren der Monozyten bzw. Makrophagen hervorruft (Schletter et al 1995; Shames et al 1999).

Die Steigerung der NF-κB-Aktivität durch LPS könnte auf die zunehmende Phosphorylierung der IκB-α-Proteine und deren Abbau zurückgeführt werden. Eine diese Aussage unterstützende Untersuchung führten Cordle et al. durch, bei der LPS zu einer Phosphorylierung von IκB-α in der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1 führte (Cordle et al 1993).

LPS führt zu einer zeitlich begrenzten NF-κB-Aktivierung, aufgrund der Tatsache, dass die IκB-α-Genregulation dem negativen feedback Kontrollmechanismus der NF-κB-Aktivierung unterliegt (Kap. 1.6 und Abb. 1.10). Damit würde unter anhaltender LPS-Stimulation nach einer Zeitspanne von ca. 120 Minuten (min) vermehrt IκB-α exprimiert werden mit der Folge einer Abnahme der NF-κB-Aktivität.

Die Literatur beschreibt in unterschiedlichen Zelltypen eine zeitabhängige Zunahme der NF-κB-Aktivität und Abnahme der IκB-α-Intensität unter LPS Stimulation (Henkel et al 1993). Doch eine zeitabhängige Gegenregulation durch die IκB-α-Neusynthese wurde in den Monozyten-Zelltypen U937 und Jurkat T-Zellen für stimulierende Reagenzien wie PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) oder TNF-α gezeigt (Brown et al 1993).

Erstmalig konnte Brand et al. eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB in glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Makrophagen von humanen arteriosklerotischen Plaques nachweisen und somit die Hypothese einer inflammatorischen Genese der Arteriosklerose unterstützen (Brand et al 1996).

1.6 Transkriptionsfaktor Nuclear Factor kappa B (NF-κB)

Die Expression menschlicher Gene wird vor allem auf Ebene der Transkription reguliert. Ein wichtiger Bestandteil des Steuermechanismus zur Bildung des Transkriptionsstartkomplexes (RNA-Polymerase II Initiation), stellen die Transkriptionsfaktoren dar. Sie besitzen DNA-sequenzspezifische Bindungsfähigkeiten an Promotoren, Enhancern, Silencern zu transkribierender Gene (Strachan T 1996).

NF-κB ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor in Zellen der Immunabwehr und in den an Entzündungsreaktionen beteiligten Zellen.

NF-κB wurde von Sen und Baltimore zum ersten Mal als B-Zell spezifisches, DNA-bindendes, nukleäres Protein beschrieben (Sen et al 1986). Die NF-κB-spezifische Oligonukleotidsequenz (GGGACTTTCC) ist Bestandteil von Promotoren und Enhancern verschiedenster Gene, welche z.B. Zytokine, Chemokine, Zelladhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren, Immunrezeptoren, Akut-Phase-Proteine, Enzyme und Transkriptionsfaktoren kodieren (Sen et al 1986; Baeuerle et al 1994). Der Transkriptionsfaktor NF-κB besitzt die Fähigkeit zur schnellen posttranslationellen Eigenaktivierung, gefolgt von der Gentranskription. Diese Eigenschaft beruht auf seine spezielle Struktur und eigenen Regulationsmechanismen.

In seiner inaktiven Form ist NF-κB ein mit seinem Inhibitor IκB komplexiertes, zytoplasmatisches Protein. Extra- und intrazelluläre Signale führen durch Abbau von IκB zur Dissoziation des NF-κB/IκB-Komplexes und zur Translokation von NF-κB in den Zellkern. Im Zellkern bindet NF-κB an ein spezifisches DNA-Motiv und reguliert die Expression des Zielgens (Lee et al 1998).

Es gibt eine Reihe von κB-Motiv-bindenden Proteinen, die zur Gruppe der NF-κB/Rel-Familie gezählt werden. Folgende humane κB-Motiv-bindende Proteine sind bekannt und werden in zwei Gruppen eingeteilt (Abb. 1.7). Die κB-Motiv-bindenden Proteine entstehen aus Vorläufer „precursor“ Proteinen. Dazu zählt das NF-κB1 (p50), ein 50 kDa-Polypeptid, welches durch proteolytische Spaltung von p105, einem Vorläuferprotein entsteht. Das NF-κB2 (p52) entsteht aus der proteolytischen Spaltung des Vorläuferproteins p100, wobei das IκB-α generiert wird. Die andere Gruppe besteht

aus direkt synthetisierten Proteinen, wie RelA (p65), ein 65 kDa Polypeptid, RelB, c-Rel.

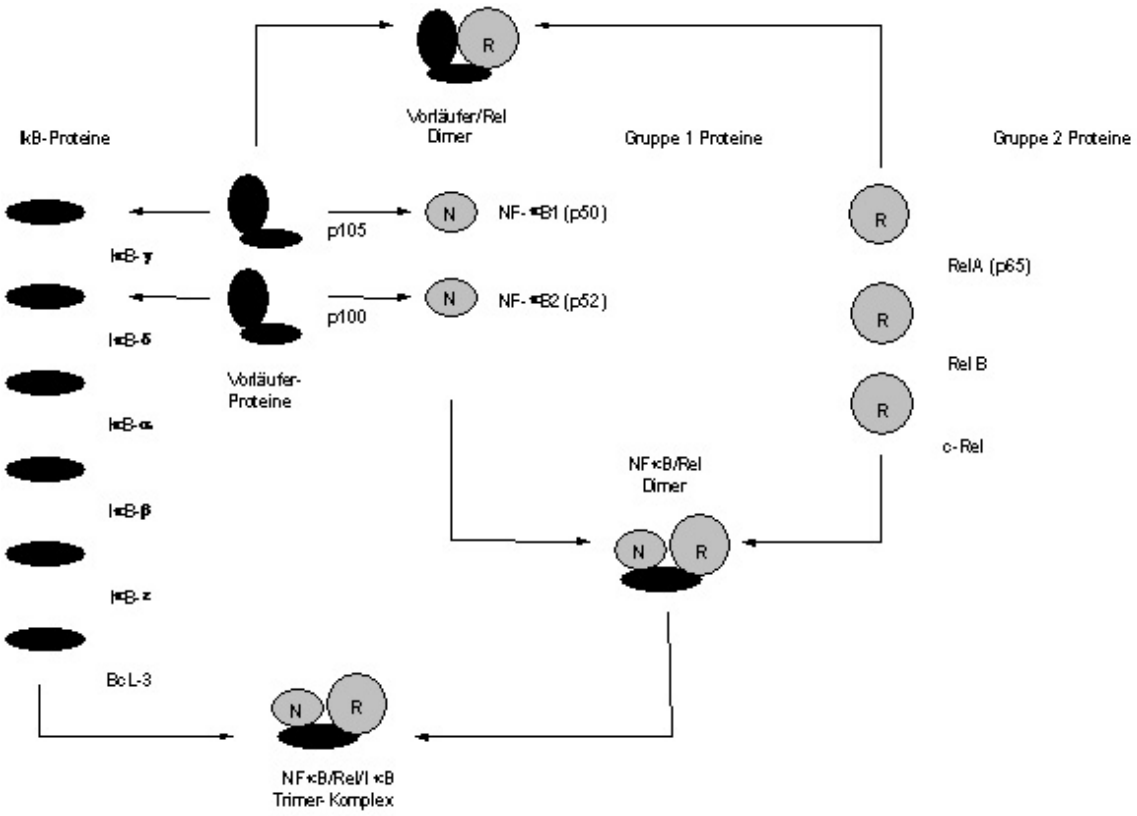


Abb. 1.7 Darstellung der humanen Rel/NF-κB, IκB-Proteine, modifiziert nach Lee et al. (Lee et al 1998)

Die Bindung des NF-κB an die DNA erfolgt als hetero- oder homodimeres Protein bestehend aus den Untereinheiten RelA, NF-κB1, NF-κB2, c-Rel und RelB. Das meist gebildete NF-κB-Dimer, ist das NF-κB1/RelA-Heterodimer, auf welches im weiteren Text Bezug genommen wird. Die Gruppe der NF-κB/Rel-Inhibitoren umfasst, die bis heute bekannten Proteine IκB-β, IκB-γ, IκB-δ, IκB-ε und Bcl-3 (Nabel et al 1993; Baeuerle et al 1994). Die Aufklärung der NF-κB und IκB-Struktur und deren Interaktionen sind Gegenstand vieler Untersuchungen (Grimm et al 1993; Nabel et al 1993; Baeuerle et al 1994; Miyamoto et al 1995; Baeuerle 1998; Huxford et al 1998; Jacobs et al 1998).

1.6.1 Proteinstruktur NF-κB

NF-κB/Rel-Proteine besitzen eine gemeinsam vorkommende Struktur bekannt als Rel-homology domain (RHD) oder NF-κB/Rel/dorsal domain (NRD) (Grimm et al 1993). Die Struktur der C-terminalen Region der RHD verleiht dem Protein die Eigenschaft mit einem zweiten NF-κB/Rel-Protein der Gruppe 1 oder 2 zu Dimerisieren. Da dieser Bereich die Translokation des aktiven NF-κB-Komplexes in den Zellkern ermöglicht, erhielt er die Benennung nuclear location signal (NLS) (Abb. 1.8) (Grimm et al 1993). Die Region, die für die Aktivierung der Transkription des Zielgens, der so genannten Transaktivierung zuständig ist, befindet sich ebenfalls auf dem C-terminalen Ende des RelA(p65)-Proteins (Schmitz et al 1991; Grimm et al 1993; Verma et al 1995). Die N-terminale Region der RHD besitzt eine κB-Sequenz spezifische DNA-Hauptbindungsfläche und ist somit wichtiger Faktor in der Protein/DNA-Interaktion (Baeuerle 1998).

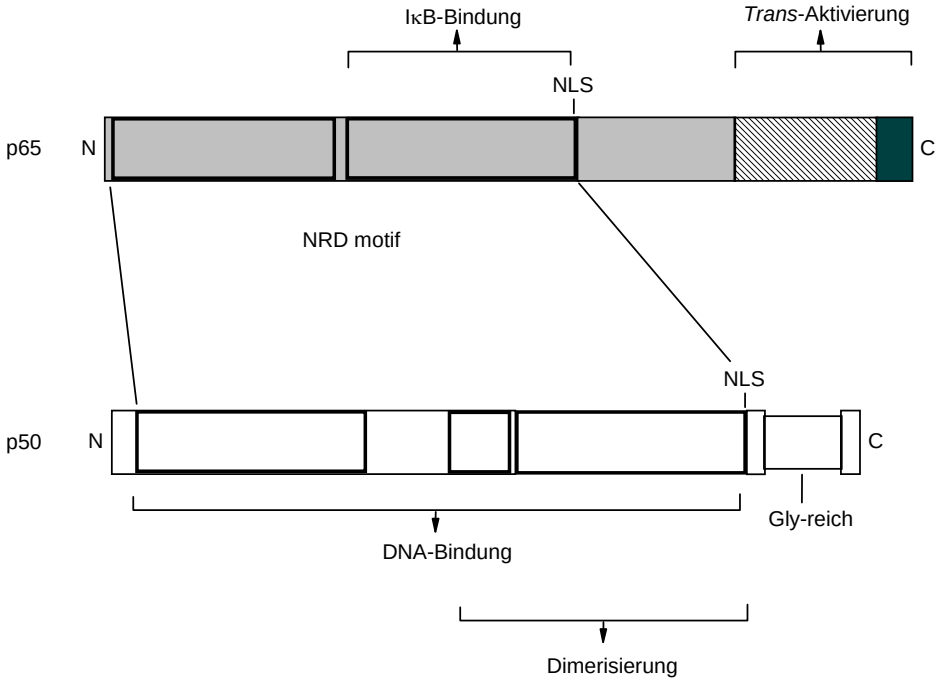


Abb. 1.8 Proteinstruktur und funktionelle Einheiten von RelA(p65) und NF-κB1(p50) modifiziert nach Grimm et al. (Grimm et al 1993)

Die NLS (nuclear location signal) Region ist verantwortlich für die Translokation des NF-κB-Komplexes in den Zellkern.

Die RHD oder NRD ist gemeinsame Struktur der NF-κB/Rel-Proteine. Die RHD hat dimerisierungs- und DNA-bindende Eigenschaften am C-terminalen Ende einerseits und κB-spezifische DNA-Bindungsfähigkeiten am N-terminalen Ende anderseits.

1.6.2 Proteinstruktur IκB-α

Die Steuerung der NF-κB-Aktivierung wird von den IκB-Proteinen übernommen. Das zytoplasmatisch inaktive NF-κB ist ein Komplex bestehend aus NF-κB1/RelA und IκB. Untersuchungen der IκB-α (37 kDa) Struktur durch Jacobs et al. und Huxford et al. geben nähere Aufschlüsse über die Struktur und Funktion dieses Proteins im NF-κB-Regulationsmechanismus (Huxford et al 1998; Jacobs et al 1998).

Gemeinsame Struktur der IκB-Proteine ist eine mittig befindliche, sich wiederholende Aminosäurensequenz, die als Ankyrin repeat domain (ARD) bekannt ist. Diese Domänen sind für die Interaktion mit NF-κB verantwortlich.

IκB-α besitzt sechs ARD (Abb. 1.9), von denen die Ankyrin repeat domain 3-5 die größte Kontaktfläche zu der RHD des NF-κB1/RelA-Heterodimers bilden. Die ARD 1 und 2 binden an die RelA(p65)-NLS-Region und verhindern dadurch die Translokation des gesamten NF-κB1/RelA Heterodimers in den Zellkern. Schließlich interagiert ARD 6 mit dem N-terminalen Ende des RelA(p65) und vermag dessen potente DNA-Bindungsfähigkeit hemmen.

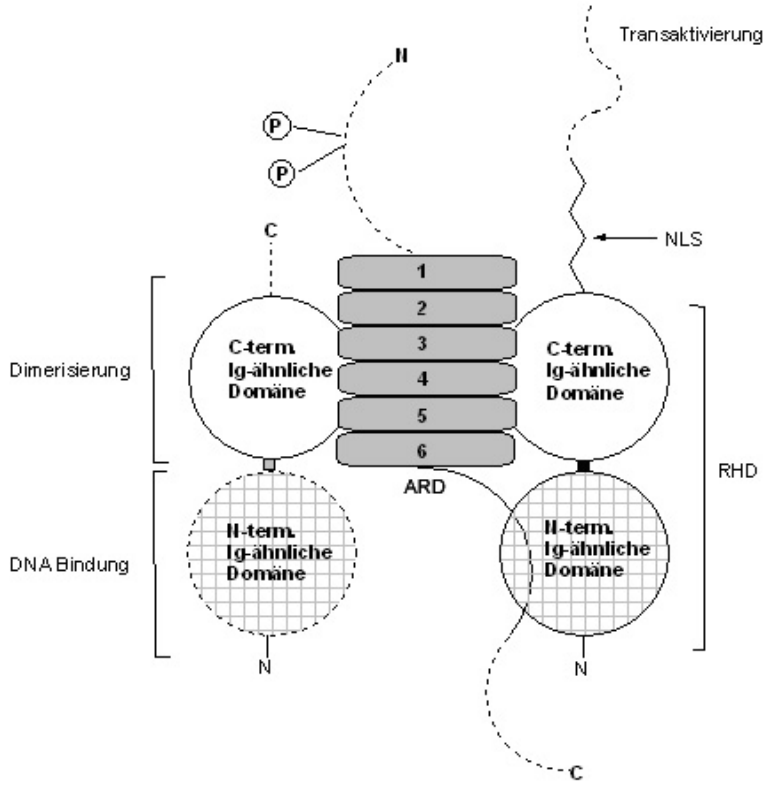


Abb. 1.9 IκB-α Proteinstrukturen in ihrer Funktion als NF-κB-Inhibitor, modifiziert nach Baeuerle et al. (Baeuerle 1998)

RHD (Rel-homology domain) gemeinsame Struktur der RelA(p65) und NF-κB1(p50)-Proteine mit Dimerisierungs- und DNA-Bindungsregionen
ARD (Ankyrin repeat domain) als NF-κB-Interaktionsstrukturen des IκB-α

Zusammenfassend unterbinden die IκB-Proteine die Transkription initiierende Aktivität des NF-κB dadurch, dass sie die DNA-bindenden Untereinheiten des NF-κB maskieren

und zusätzlich die Translokation dieser in den Zellkern verhindern (Verma et al 1995; Baeuerle 1998; Lee et al 1998).

1.6.3 Steuerung der NF-κB-Aktivierung durch IκB-α und Proteinkinasen

IκB-Proteine unterliegen ebenfalls einer zellulären Kontrolle, um eine angemessene Balance der Zellantwort auf äußere Reize zu erhalten.

Das N-terminale Ende der IκB-Proteine wird durch Kinasen phosphoryliert und ermöglicht die Bindung proteolytisch aktiver Enzyme (Ubiquinasen, Proteasen), die zu einer Degradierung des IκB-Proteins führen. Beschrieben wird eine basale Phosphorylierung in unstimulierten Zellen und eine durch Zellstimuli bedingte Phosphorylierung des IκB (Verma et al 1995).

Zellreize, die NF-κB aktivieren, führen mittels verschiedener Proteinkinasen zum IκB-Abbau (Abb. 1.10) (Baeuerle et al 1996). Für die signalgesteuerte Degradierung von IκB-α sind Enzyme verantwortlich, die unter dem Begriff des IκB-Kinase-Komplex (IKK) bekannt sind. Das Enzym Casein Kinase II (IKK II) trägt zur basalen Phosphorylierung des IκB-α bei und ist folglich am signalunabhängigen Abbau des IκB-α beteiligt (Barroga et al 1995; Janosch et al 1996).

Der zweite Schritt, der zum endgültigen zytoplasmatischen IκB-α-Abbau führt, ist ein Phosphorylierungsvorgang, genannt Ubiquitin-proteasome pathway (Abb. 1.10), der zum ersten Mal 1994 von Palombella et al. beschrieben wurde (Palombella et al 1994).

Hierbei binden viele Ubiquitinreste an die N-terminale Region des mit NF-κB-komplexierten IκB-α-Proteins. Der polyubiquinierte IκB-α-Komplex ist nun für die Bindung degradierender Proteasen markiert. Es kommt zur proteolytischen Lösung von IκB-α und NF-κB, so dass NF-κB für die Translokation in den Zellkern freigeben wird (Chen et al 1995; Verma et al 1995).

Mit einer Halbwertszeit von ca. 2,5 Stunden in unstimulierten Zellen ist IκB-α ein instabiles Protein, welches einem ständigen turn over ausgesetzt ist. In seiner Eigenschaft als potenter Inhibitor des NF-κB, unterliegt IκB-α einer negativen feedback Kontrolle durch das NF-κB selbst (Brown et al 1993). Dies bedeutet, dass eine

vermehrte NF-κB-Aktivierung zu einer verstärkten Expression des IκB-α-Gens führt. Dadurch wird der IκB-α-Bestand der Zelle, zum Schutz vor einer unkontrolliert hohen NF-κB-Aktivität, aufrechterhalten.

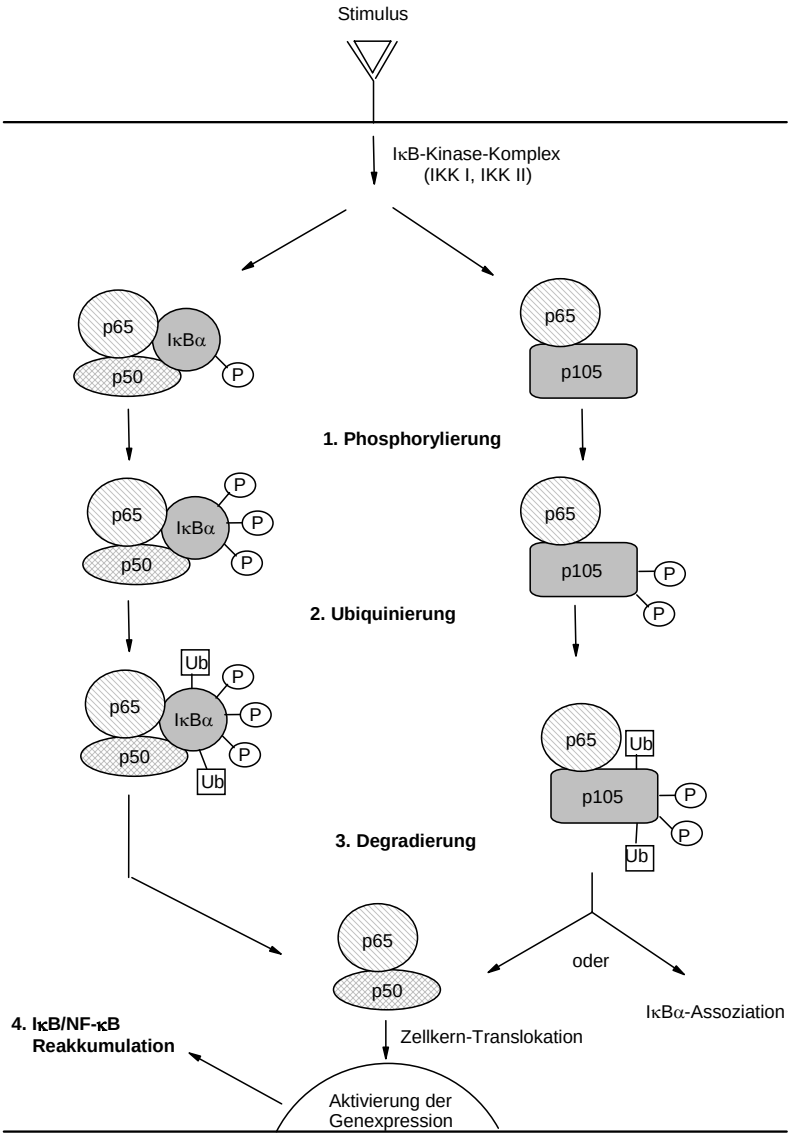


Abb. 1.10 Steuerung der NF-κB-Aktivierung durch IκB-α und Proteinkinasen, modifiziert nach Verma (Verma et al 1995)

1.6.4 Biologische Funktion des NF-κB

Die NF-κB-Aktivierung ist als Reaktion auf extrazelluläre Reize für eine Reihe zellulärer Aktivitäten verantwortlich. Eine Aufzählung bekannter NF-κB-Aktivatoren gibt Tab. 1.3 wieder. Physiologisch spielt NF-κB eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung einschließlich der Apoptose und Onkogenese, der embryonalen Entwicklung, der Entwicklung und Funktion des Immunsystems (Baeuerle et al 1996).

Pathophysiologische Phänomene, wie septischer Schock und Graft-versus-Host Disease, werden durch NF-κB-induzierte Produktion von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Akut-Phase-Proteinen ausgelöst (Tab. 1.2). Die Bedeutung der NF-κB-induzierten Zytokinproduktion liegt in der Steuerung der Immun- und Entzündungsantwort der Zelle. In reifen B-Zellen ist eine NF-κB-Aktivierung für die Antikörperproduktion erforderlich (Sen et al 1986). NF-κB ist durch Bildung der leichten κ-Kette der Immunglobuline und durch Beteiligung am „immunglobulin-class-switch“ an der humoralen Immunantwort beteiligt (Baeuerle et al 1994; Lee et al 1998). In Synergie mit anderen Transkriptionsfaktoren induziert NF-κB in T-Zellen die Bildung von IL-2 und der α-Kette des High-Affinity-Rezeptors IL-2R, welche beide für die T- Zell-Proliferation unerlässlich sind.

Eine weitere Rolle spielt die NF-κB-Aktivierung möglicherweise bei Reperfusionsschäden am Gewebe infolge Trauma, neurodegenerativen Erkrankungen, die mit einer Dysfunktion des zellulären Redoxsystems einhergehen, wie z.B. Down - Syndrom, Amyotrophische Lateralsklerose (Baeuerle et al 1994). Des Weiteren bei rheumatoider Arthritis, Asthma, ARDS, Morbus Alzheimer, Virusreplikation und möglicherweise Arteriosklerose (Lee et al 1998).

Es gibt eine Reihe biologischer und physikalischer Mediatoren, die eine NF-κB-Aktivierung hervorrufen. Diese sind in Tab. 1.3 zusammengefasst.

Tab. 1.2 NF-κB-regulierte Genexpression

Klasse	Zielgene
Zelladhäsionsmoleküle	•E-Selektin •Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM 1) •Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM 1)
Akute Phase Proteine	•C-reaktives Protein •Komplementfaktor B •Komplementfaktor C3 und C4 •Serum Amyloid A precursor •α1-acid glycoprotein •Angiotensinogen
Zytokine	•Tumor necrosis factor (TNF)-α •Lymphtoxin (TNF)-β •Interferon (IFN)-β •Interleukin (IL)-1β •IL-2, IL-6, IL-12
Chemokine	•IL-8 •Macrophage chemotactic peptide-1
Wachstumsfaktoren	•Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) •Monocyte colony-stimulating factor (M-CSF) •Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) •IL-3 •Melanoma growth stimulating activity (*groα–γ*/MGSA)
Immunrezeptoren	•Immunoglobulin κ-leichte Kette •T-Zellrezeptor β •T-Zellrezeptor α-Kette •Major histocompatibility complex (MHC) class I •Major histocompatibility complex (MHC) class II •β_2-Mikroglobulin •Tissue Factor
Viren und ihre Produkte	•Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) •Cytomegalievirus (CMV) •Adenovirus •Simian virus 40 (SV40)
Enzyme	•Nitrat Oxidase Synthase (NO-Synthase) •Cyclooxygenase-2 •12-Lipoxygenase •Phospholipase A2
Transkriptionsfaktoren	•IκB-α, p105, p100, Bcl-3, c-Rel

Tab. 1.3 NF-κB-Aktivierung durch Mediatoren

Klasse	NF-κB-Aktivitätssteigerung durch
Zytokine	•Tumor necrosis factor (TNF)-α •Lymphtoxin (TNF)-α •IL-2 •IL-17
Wachstumsfaktoren	•Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) •Insulin •Nerve growth factor •Platelet-derived growth factor
Viren und ihre Produkte	•Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) •Human T cell lymphotrophic virus 1 (HTLV-1) •Cytomegalievirus (CMV) •Epstein-Barr-Virus (EBV) •Doppelsträngige RNA
Bakterien und ihre Produkte	•M. tuberculosis •Lysteria monocytogenes •Lipopolysaccharid •Exotoxin B •Toxic shock syndrome toxin
Immunorezeptoren	•Immunoglobulin M •CD3, CD4, CD28, CD40
Mediatoren	•H_2O_2 •Thrombin •Angiotensin II •Leukotriene B4 •oxidiertes Lipoprotein
Stress Reaktionen	•Reoxigenierung •Hypoxie •Hämorrhagie
Xenobiotika	•Antigen •Cycloheximide •Phorbol ester •Concavalin A •Phytohämagglutinin •Calcium Ionophore
Umwelteinflüsse	•Ultraviolett Licht, Schwermetalle •ionisierende Strahlen, Ozon

1.7 NF-κB-gesteuerte Tissue Factor-Expression und Arteriosklerose

Tissue Factor (TF) ist wichtiger Initiator der Blutgerinnung. Es ist ein Rezeptor der Zytokinrezeptorfamilie und wird als Membranprotein mit einem extrazellulären, transmembranären und zytoplasmatischen Anteil auf der Zelloberfläche exprimiert. Der extrazelluläre Anteil von TF komplexiert mit dem Blutgerinnungsfaktor VII/VIIa und vermag somit die Blutgerinnungsfaktoren X und IX zu aktivieren und zur Blutgerinnung führen (Osterud 1997).

TF wird von vielen Zellen exprimiert, die nicht dem direkten Blutfluss ausgesetzt sind, so z.B. im Grenzgewebe zwischen Körper und Umwelt wie Epidermis, Bronchialepithel aber auch Adventitia der Gefäßwand, in fibrösen Kapseln von Leber, Milz und Niere, im Parenchym des Gehirnes, Lunge und Plazenta (Luther et al 1996). Als Reaktion auf eine Gewebeschädigung und folglich einer Gefäßschädigung, die eine Bildung des zellmembrangebundenen TF/VII-Komplexes zur Folge hat, wird die Blutgerinnungskaskade aktiviert und Fibrin gebildet. Da der Kontakt von TF mit zirkulierendem Blut einen prokoagulatorischer Stimulus darstellt, muss die Expression von TF in Blutgefäßen strengsten reguliert werden.

Die im Blut befindlichen Zellen z.B. Lymphozyten, Monozyten und Endothelzellen exprimieren unter physiologischen Bedingungen kein TF, es sei denn sie werden zur Bildung dieses durch inflammatorische Mediatoren, wie Endotoxine, Zytokine, Lymphokine und Immunkomplexe stimuliert. Monozyten können durch stimulierte T-Helfer Zellen oder durch LPS gramnegativer Bakterien zur TF-Bildung angeregt werden. LPS bildet einen Komplex mit LPS-bindenden Proteinen (LBP), der mit dem CD14-Rezeptor der Monozyten reagiert und durch Signaltransduktion die Transkription des TF-Gens ermöglicht (Luther et al 1996).

Die Kontrolle der TF-Genexpression unterliegt einer Reihe von Transkriptionsfaktoren wie activator protein-1 (AP-1), SP-1, Egr-1 und NF-κB (Mackman 1995). Eine große Bedeutung kommt TF in der Erhaltung der Hämostase, der Thrombosebildung, des Sepsisverlaufs, der Angiogenese, Embryonalentwicklung und vermutlich auch in der Pathogenese der Arteriosklerose zu (Luther et al 1996; Osterud 1997).

Makrophagen, die als LDL-geladene Foam Cells in der Intima arteriosklerotischer Läsionen vorkommen, vermögen ebenfalls TF exprimieren. Reißt die fibröse Kappe eines arteriosklerotischen Plaques wird ein direkter Kontakt des Makrophagen-TF mit dem im Blut befindlichen Faktor VII ermöglicht und kann zur sofortigen Thrombusbildung führen. Eine weitere Beteiligung des makrophagenassoziierten TF könnte darin bestehen, dass durch Thrombin aktivierte Thrombozyten ihrerseits die Bildung von IL-8 und MCP-1 in Monozyten initiieren, die ebenfalls an der Entwicklung von Arteriosklerose beteiligt sein können (Osterud 1997). Die Tatsache, dass oxidiertes LDL nur in Verbindung mit LPS die TF-Aktivität in Monozyten beeinflusst, führt zu der Fragestellung, welche weiteren Stimuli an der Pathogenese der Arteriosklerose beteiligt sein könnten.

In Endothelzellen wurden nach Infektion mit Chlamydia pneumoniae erhöhte Konzentrationen von TF nachgewiesen (Mackman 1995; Osterud 1997; van Gorp et al 1999). Infolgedessen könnte Chlamydia pneumoniae an der Entstehung thrombotischer Vorgänge beteiligt sein, die ihrerseits zu einer Progression arteriosklerotischer Plaques beitragen können (Lindholt et al 1999).

1.8 Themenstellung

Die vorliegende Arbeit ist ein in vitro Modell zur Untersuchung der inflammatorischen Antwort auf der Transkriptionsebene von NF-κB/IκB-α in Buffy coat-isolierten humanen Monozyten/Makrophagen gesunder Spender auf eine Chlamydia pneumoniae Infektion.

Die Idee der Untersuchungen beruht auf Hinweisen vieler Studien, die eine infektiöse Genese der Arteriosklerose postulieren. Dabei erhärtete sich der Verdacht einer Beteiligung des humanen Pathogens Chlamydia pneumoniae an der Ätiologie der Arteriosklerose

Der kausale Zusammenhang zwischen Chlamydia pneumoniae und Arteriosklerose wird basierend auf seroepidemiologische, tierexperimentelle und in vitro Studien jedoch kontrovers diskutiert (Saikku et al 1988; Godzik et al 1995; Jackson et al 1997; Moazed et al 1997; Whiteside et al 1997; Daus et al 1998; Maass et al 1998; Caligiuri et al 2001; Ieven et al 2005; Wolf et al 2005). Die klinischen Antibiotikastudien erbrachten keinen Benefit hinsichtlich Senkung der Mortalität und Inzidenz von Myokardinfarkt bei KHK Patienten durch eine antibiotische Therapie mit Makroliden, Chininolonen oder Tetrazyklin (Higgins 2003; Andraws et al 2005). Die fehlenden Antibiotika-Effekte werden u.a. dem besonderen 48- bis 72-stündigen Replikationszyklus des intrazellulär persistierenden, gram negativen Bakteriums Chlamydia pneumoniae zugeschrieben (Belland et al 2004; Campbell et al 2004).

Das aerogen übertragene Chlamydia pneumoniae verursachen beim Menschen respiratorische Infektionen. Die Arteriosklerose-Infektionshypothese beschreibt, dass Monozyten die Dissemination von Chlamydia pneumoniae aus der Lunge in das Gefäßendothel übernehmen (Maass et al 2000; Rupp 2005). Nach Adhärenz der infizierten Monozyten an die Endothelschicht können sie andere Gefäßzellen infizieren oder zu Gewebsmakrophagen differenzieren, wo sie u.a. NF-κB-regulierte Genprodukte wie Zytokine, Adhäsionsmoleküle oder Tissue factor exprimieren können (Takaoka et al 2008). Dem Tissue factor, als Zelloberflächenrezeptor für Faktor VIIa und Initiator der extrinsischen Gerinnung, kommt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von z.B. Sepsis mit Disseminiter intravasaler Gerinnungsstörung oder Arteriosklerose zu (Osterud 1997).

Basierend darauf, dass Blutmonozyten ein Transportmedium für Chlamydia pneumoniae darstellen können, dass infizierte Monozyten nach Differenzierung in Gewebsmakrophagen zur Expression von NF-κB/IκB-α regulierten Tissue factor fähig sind, wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung einer in vitro Infektion von humanen Monozyten mit Chlamydia pneumoniae und die proinflammatorische Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB und dessen Inhibitor IκB-α untersucht.

Um kurzfristige und längerfristigere inflammatorische Effekte zu untersuchen, wurden humane Monozyten in jeweils drei Versuchsreihen mit Chlamydia pneumoniae über 2, 8, 24 und 72 Stunden infiziert. Im Proteinlysat der Versuchsreihen wurden mittels Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) der Transkriptionsfaktor NF-κB, mittels Western blot dessen Inhibitor IκB-α und zum Infektionszeitpunkt 8 und 72 Stunden die Tissue factor-Aktivität mittels Procoagulatory clotting assay (PCA) gemessen.

Um festzustellen, ob die zu untersuchenden Effekte an die Replikationsfähigkeit der Chlamydien gebunden ist, wurden die Versuche zu den o.g. Zeiten auch mit hitzeinaktivierten, nicht replikationsfähigen Chlamydien durchgeführt. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Zugabe des Antibiotikums Tetrazyklin zu einer Änderung der NF-κB/IκB-α Aktivität beiträgt.

Von der Hypothese ausgehend, dass infektiöse Erreger, wie Chlamydia pneumoniae in der Pathogenese der Arteriosklerose eine Rolle spielen könnten, ist es Ziel der Untersuchung festzustellen, ob Chlamydia pneumoniae in Makrophagen die Expression von NF-κB beeinflusst. Die Ergebnisse dieses Untersuchungsmodells könnten eine Beteiligung von Chlamydia pneumoniae an der inflammatorischen Arteriosklerose-Hypothese reflektieren.

2 Materialien

2.1 Vielfach verwendete Chemikalien

Acrylamid 40 %	SIGMA, Taufkirchen
Aprotinin	Merck®, Darmstadt
APS	Roth, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia	Pharmacia u.Upjohn, Nürnberg
DTT	SIGMA, Taufkirchen
EDTA	Seromed®
Glycerin	Merck®, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hanks balanced salt solution (HBSS)	PAA Laboratories, Cölbe
Leupeptin	Merck®, Darmstadt
Na2 MOO4	Merck®, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck®, Darmstadt
Phosphate buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe
PMSF	SIGMA, Taufkirchen
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
TEMED p.a. 99 %	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe

2.2 Plastik und Verbrauchmaterialien

Röhrchen (Polypropylen) 50 ml steril	Becton Dickinson/Falcon, New Jersey, USA
24-Wells Platten, steril	Becton Dickinson/Falcon, New Jersey, USA
6-Wells Platten, steril	Greiner, Frickenhausen
96-Wells Platten, steril	Greiner, Frickenhausen
Pipetten, steril, verschiedene Größen	Costar, Cambridge
Pipettenspitzen, steril	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße, verschiedene Größen	Greiner, Frickenhausen
Perfusorspritze, 50 ml steril	Becton Dickinson/Falcon, New Jersey, USA
Einmalfilter, 0,20 qm steril	Sartorius AG, Göttingen
Verschlusskonus (Comi rot), steril	Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen 250ml	Greiner, Frickenhausen
Elektrophoresematerial	Keutz Laborgeräte GBR, Reiskirchen
Combitip Pipettenspitzen	Eppendorf, Köln
Silikonschlauch $\varnothing_{außen}$ 3 mm	Kalensee, Gießen
Gewebekultur Petrischalen 60 x 15 mm	Becton Dickinson/Falcon, New Jersey, USA,
Multireaktionsgefäße	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Disposable Cell scraper, steril	Greiner, Frickenhausen

2.3 Materialien und Lösungen für die Zellisolation und -kultur

BisBenzimide No. 33258	Hoechst
Brutschrank Vacutherm	Heraeus, Hanau
Ficoll-Paque® Research Grade	Pharmacia Uppsala, Schweden
Gelatine Typ A Porcine skin	SIGMA, Taufkirchen
Kulturflasche (75 cm^3)	Greiner Labortechnik
Macrophage-SFM Medium	GIBCO BRL, Karlsruhe
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Mikroskop Leica-DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar
Millex®-GS sterile Filter (Ø 0,22 µm)	Millipore, Eschborn
Penicillin-Streptomycin (PenStrep)	GIBCO BRL, Karlsruhe
pH-Meter	Radiometer, Kopenhagen
Propidium-Jodid	Sigma, Taufkirchen
Sterilbank	Heraeus, Hanau

2.4 Materialien und Lösungen für die indirekte TF-Messung

Calciumchlorid	Behring Diagnostics®, Marburg
Standard Humanplasma Dade	Behring, Marburg
Wasserbad Köttermann	Uetze-Hänigsen

2.5 Materialien und Lösungen für die quantitative Proteinbestimmung

96-Well Mikrotiterplatte	Falcon®BectonDickinsonLabware
DC Protein-Assay-Kit 500-0112	Bio-rad®
NP 40 Igepal CA-630	SIGMA, Taufkirchen
Spektrophotometer	Spectra SLT
Titramax 100 Rüttler	Heidolph
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg

2.6 Materialien und Lösungen zur Oligonukleotid-Markierung und EMSA-PAGE

5 x TBE-Puffer	Tris-Base 54 g
	Borsäure 27,5 g
	0,5 M EDTA 20 ml
	ad 1 l pH = 8,2
β-Counter	Remcor Products Co
(γ-32P) ATP	NEN®, Boston, USA
Calf thymus DNS	Amersham, Braunschweig
Elektrophorese Spannungsquelle	Biometra®, Göttingen
Elektrophoresekammer System-Kit	Keutz, Reiskirchen 1130131-00
Geltrockner	Keutz, Reiskirchen
Ladepuffer	0,05 % Bromphenolblau 0,005 g
	GRBB-Puffer 10 ml
Poly (di-dc)	Amersham, Braunschweig

Polynucleotid-Kinase	Boehringer, Mannheim
	(aus E.coli E.D. pFDX)
Röntgenfilme	AGFA Ortho medium curix
Röntgenkassette	REGO, Augsburg 0067703
Sephadex® Säulen G 25	Boehringer, Mannheim
TE-Puffer	Tris HCl pH 8,0 100 µl
	0,5 M EDTA 20 µl
Whatman®-Papier	Schleicher und Schüll, Dassel

2.7 Materialien und Lösungen für das Immunoblotting

10 x PBS	GIBCO BRL, Karlsruhe
Anti-rabbit-goat IgG-HRP	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Blotgerät	Keutz, Reiskirchen 033035110
ECL + p0Plus Kit	Amersham, Braunschweig
Methanol	Riedel-deHaën®, Seelze
Skim milk powder	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
Standardproteingemisch	Amersham, Braunschweig
	Rainbow™ Marker
Tween 20	SIGMA, Taufkirchen
	(Polyoxyethylenosorbitan Monolaurate)

2.8 Experimentelle Reagenzien und Pharmaka

IκB-α-rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Tetrazyklin	SIGMA A 4034,Taufkirchen
LPS (E.coli O111:B4)	SIGMA L 4391,Taufkirchen
NF-κB-Oligonukleotid **(5´-CAGAGGGACTTTCCGAGA-3´)**	Promega, Heidelberg
NF-κB-Antikörper p50	Promega, Heidelberg
NF-κB-Antikörper p56	Promega, Heidelberg
Nicht NF-κB-spezifisches Oligonukleotid	Promega, Heidelberg
Xanthine	SIGMA X 3627
Xanthinoxidase (EC 1.1.3.22)	Calbiochem 682151, Darmstadt

2.9 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Szintillationsgefäße	Canberra-Packard, Frankfurt
Tissue Culture Plate 24 Well Multiwell™	Falcon®BectonDickinson Labware
Versuchsröhrchen 50 ml Cellstar®	Greiner Labortechnik
Zellkulturschale Falcon®	Becton Dickinson Labware
Zellschaber, steril	Greiner Labortechnik

3 Methoden

3.1 Isolierung und Kultur von humanen Blutmonozyten

3.1.1 Auftrennung von Blutzellen über einen Ficoll-Dichtegradienten

Humane periphere Blutmonozyten wurden nach der Methode von Bøyum durch Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten gewonnen (Boyum 1968). Das Prinzip der Zellauftrennung über Ficoll-Dichte-Paque beruht auf der unterschiedlichen Migration von Blutzellen im Dichtegradienten. Mononukleäre Zellen (Monozyten und Lymphozyten) sammeln sich in der oberen Gradientenschicht, während Granulozyten und Erythrozyten aufgrund ihrer höheren Dichte schneller sedimentieren und durch das Medium wandern.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Monozyten diente ein mit 0,38-prozentiges Natriumzitrat versetzte Vollblut von gesunden Spendern, welches von der Blutbank der JLU Gießen in Form von Buffy Coats (zelluläre Bestandteile von Blutspenden) zur Verfügung gestellt wurde. In 50 ml Reaktionsgefäßen wurden je 25 ml der Zellsuspension auf 25 ml Ficoll-Paque geschichtet und anschließend 30 min Raumtemperatur (RT) bei 1.700 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Die aus mononukleären Zellen bestehenden Interphasen zwischen Plasma und Ficoll-Paque über dem Dichtegradienten wurden vorsichtig abgenommen, mit HBSS verdünnt und 10 min bei 1.100 rpm RT zentrifugiert. Zur Entfernung von Thrombozyten und Ficoll-Paque Lösung wurden die Zellen noch zweimal mit HBSS gewaschen und jeweils bei 1.100 rpm für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Makrophagen-Serumfreien-Medium (M-SFM) mit 2,5 µg/ml Amphotericin B resuspendiert.

3.1.2 Isolierung von Monozyten durch Adhärenzverfahren

Bei dieser Methode wird die starke Adhärenz von Monozyten an Fibronektin genutzt, um Monozyten von anderen mononukleären Zellen zu trennen. Hierfür wurden die bei der Dichtegradientenzentrifugation gewonnen mononukleären Zellen in mit einprozentiger Gelatine und Plasma vorbehandelten Zellkulturflaschen pippetiert und für eine Stunde bei 37 ºC und fünfprozentigem CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die nicht adhärenten Zellen durch mehrmaliges Waschen mit HBSS entfernt und die adhärenten Monozyten durch 10-minütige Inkubation in einer 10 mM EDTA/PBS-Lösung (Verhältnis 3:7) bei 37 ºC abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen pipettiert und 10 min RT bei 1.100 rpm zentrifugiert und anschließend in vorgewärmtem M-SFM resuspendiert. Die Quantifizierung der Zellen erfolgte durch lichtmikroskopische Zählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bei 400-facher Vergrößerung. Die Reinheit der isolierten Monozyten wurde in regelmäßigen Abständen durch die FACS Analyse kontrolliert, dabei ergab sich ein Blutmonozytenanteil von 85 - 95 %.

3.1.3 Zellkultur

Als Inkubationsmedium diente immer M-SFM supplementiert mit 2,5 µg/ml Amphotericin B. Die Kultivierung der Zellen erfolgte stets bei 37 ºC und fünfprozentiger CO_2 Feuchtigkeit gesättigter Atmosphäre. Für die PCA-Versuche wurden die Zellen auf 24er Kulturplatten mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/Well ausgesät.

Für die Proteinanalyse wurden die Monozyten in Zellkulturschalen mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/Kulturschale ausgesät. Nach einer Ruhephase von 24 Stunden erfolgte ein einmaliges Waschen der adhärenten Monozyten mit 37 °C warmen HBSS, ein Mediumwechsel mit M-SFM plus Amphotericin und daran anschließend die Stimulation der Zellen.

3.2 Stimulationsexperimente

3.2.1 Stimulation mit bakteriellem Endotoxin

Als bakterielles Endotoxin wurde LPS von E. coli Serotyp O111:B4, (10 µg/ml) verwendet. Zur Induktion von NF-κB sowie der IκB-α-Degradation wurden die Zellen für zwei Stunden mit LPS stimuliert. Bei allen Versuchen wurden unstimulierte Zellproben mitgeführt.

3.2.2 Infektion der Monozytenkultur mit Chlamydia pneumoniae

Die Infektion der Monozyten erfolgte mit einem humanpathogenen Chlamydia pneumoniae Pool der Konzentration 2,7 x 10^5 /ml Medium, der bei -80 °C gelagert war. Die Kultur und Präparation der Chlamydien wurde vom Institut für Mikrobiologie der Universitätsklinik Giessen durchgeführt. Dort fanden die gesamten Infektionsversuche mit Chlamydia pneumoniae statt.

Die Chlamydienaliquots wurden mit M-SFM im Verhältnis 1:20 verdünnt. Die Monozytenkulturen in den sechs- bzw. 24-Well Zellkulturplatten wurden nach Zugabe von chlamydienhaltigem M-SFM bei 2.700 rpm für 45 min bei 30 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der infizierten Zellen für eine Stunde bei 37 ºC und fünfprozentiger CO_2-feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre, gefolgt von einem Mediumwechsel mit M-SFM und Amphotericin B (2,5 µg/ml). Dies entspricht dem Zeitpunkt t_0. Laut Versuchsanordnung wurden einige infizierte Zellreihen mit Tetrazyklin 10 µg/ml versetzt. Die Infektionsrate wurde anhand der Einschlüsse in den Monozyten lichtmikroskopisch beurteilt.

Zur Untersuchung einer NF-κB-Induktion sowie einer IκB-α-Degradation wurden die infizierten humanen Monozyten für 2, 8, 24 und 72 Stunden inkubiert. Bei allen Versuchen wurde eine unstimulierte Zellprobe mitgeführt.

3.2.3 Hitzeinaktivierung der Chlamydia pneumoniae

Zur Hitzeinaktivierung wurden die bei -80 °C gelagerten Chlamydienaliquots im Wasserbad bei 37 °C für 10 min inkubiert und anschließend für 30 min bei 56 °C Heizblocktemperatur inaktiviert. Die Infektion der humanen Monozyten mit hitzeinaktivierten Chlamydien erfolgte wie unter Kapitel 3.2.4 beschrieben.

3.2.4 Stimulationsprotokolle

Analyse der NF-κB-Aktivität und IκB-α-Degradation (EMSA/Western Blot) in humanen Makrophagen folgender Versuchsreihen. Für alle Versuchsreihen unterschiedlicher Zeitachsen beträgt die LPS Stimulationsdauer einheitlich zwei Stunden. Die Versuchsreihen wurden in Triplikaten durchgeführt.

Legende

K	Kontrollgruppe unstimulierter Monozyten
LPS	Lipopolysaccharid stimulierte Monozyten
C. p.	Chlamydia pneumoniae infizierte Monozyten
h. C. p.	Hitzeinaktivierte Chlamydia pneumoniae infizierte Monozyten
C. p. + LPS	Chlamydia pneumoniae infizierte Monozyten plus LPS
C. p. + T.	Chlamydia pneumoniae infizierte Monozyten plus Tetrazyklin
C. p. + LPS + T.	Chlamydia pneumoniae infizierte Monozyten plus LPS plus Tetrazyklin

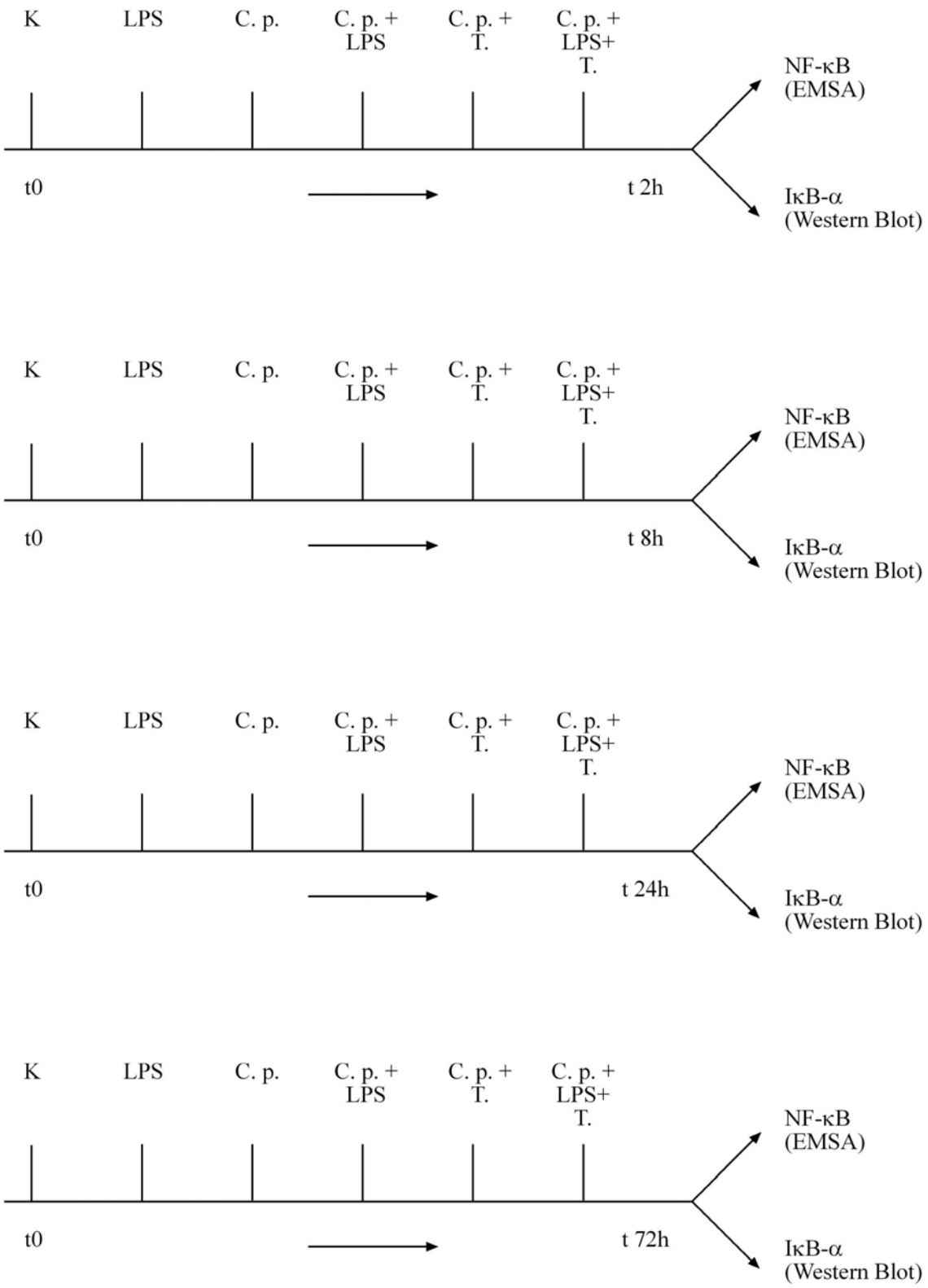


Abb. 3.1 Versuchsandordnung der zeitabhängigen Infektion humaner Makrophagen mit Chlamydia pneumoniae (Abkürzungen siehe Legende).

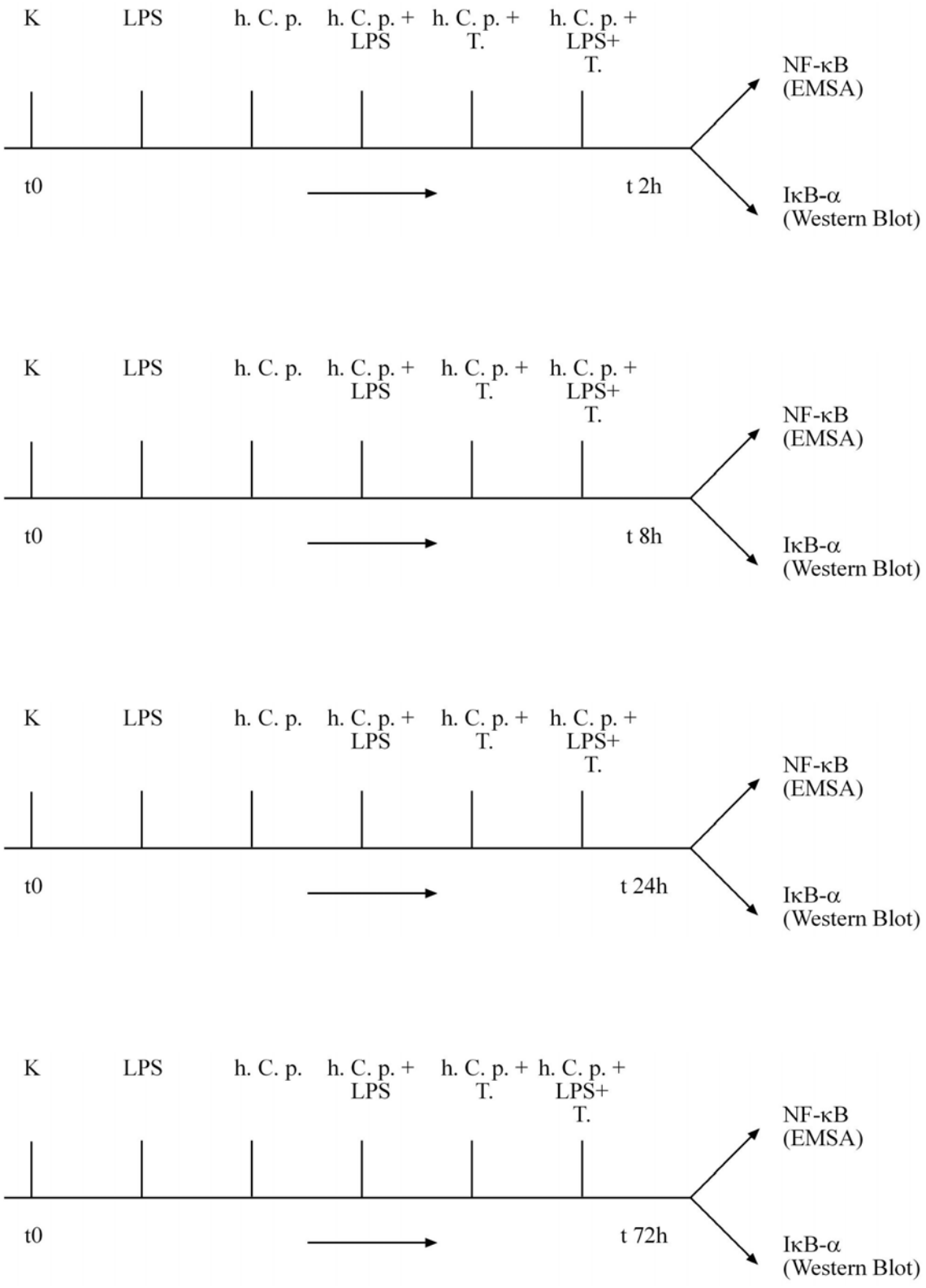


Abb. 3.2 Versuchsandordnung der zeitabhängigen Infektion humaner Makrophagen mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae (Abkürzungen siehe Legende)

3.3 Procoagulatory clotting assay (PCA)

Das PCA ist eine Methode zur indirekten Messung der TF-Aktivität auf Zelloberflächen. Dafür wurden die Zellen nach den Experimenten in Kulturmedium bei -80 °C schockgefroren. Anschließend wurden die Zellen aufgetaut, vom Boden der Wells abgeschabt, das Zelllysat in ein Reaktionsgefäß überführt und erneut bei -80 °C eingefroren. Zur vollständigen Homogenisierung der Zellen folgten noch drei weitere Auftau- und Einfrierschritte. 50 µl Zelllysat wurden zusammen mit 50 µl Standard Humanplasma für drei min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Gerinnung durch Zugabe von 50 µl Calciumchloridlösung (0,025 mmol) ausgelöst und die Zeit bis zur Bildung eines Gerinnsels bestimmt (Häkeltechnik). Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Gerinnungszeit der Proben wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve in Milliunits (mU) Thromboplastinaktivität umgerechnet. Die Standardkurve leitet sich aus einer Verdünnungsreihe eines Rabbit-brain-Thromboplastinstandards (10 mg/ml) ab. Die Gerinnungszeiten wurden linear in einer doppellogarithmischen Darstellung zwischen 1 mU (310 sec) und 10.000 mU (20 sec) aufgetragen. Als Negativkontrolle diente Faktor VII-defizientes Plasma.

3.4 Proteinisolierung und Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die adhärenten Monozyten wurden dreimal mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 150 µl White-Cell-Extraction Buffer (WCE Puffer), supplementiert mit Proteinaseinhibitoren (5 µM einprozentiges Aprotinin; 0,225 µM Leupeptin; 0,25 M PMSF; 100 mM DTT (D2-Dithiothreitol) und mit Hilfe eines Zellschabers aufgenommen.

WCE Puffer bestehend aus:

1 M Hepes pH 8,0 0,2 ml (20 mM),	0,5 M EDTA 4 µl (0,2 M),
5 M NaCl 0,9 ml (0,45 M),	Glycerin 2,5 ml (25-prozentig)
1 M Na_2 MO_4 0,1 ml (10 mM),	ad 10 ml Aqua bidest

Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und sofort auf Eis gestellt. Die vollständige Lyse der Zell- und Kernmembran erfolgte durch Zugabe von 10-prozentigem NP40 nach mehrmaligem Vortexen der Proben und Inkubation für 10 min auf Eis. Anschließend wurden die Proben bei 14.000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert und der Überstand (Proteinlösung) in eiskalte Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C bis zur Analyse aufbewahrt.

Die Quantifizierung des Gesamtproteins erfolgte nach der modifizierten Methode von Lowry mittels eines kommerziellen Kits (BIORAD DC Protein Assay) entsprechend der Herstellerangaben (Lowry et al 1951; Qanbar et al 1994). Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationsbereichen von 0,08 - 1,4 µg/ml eingesetzt.

Die Durchführung erfolgte in 96-Mikrotiterplatten und die photometrische Auswertung in einem ELISA Reader (bei 620 nm).

3.5 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

EMSA ist ein Nachweisverfahren für Protein-DNS Wechselwirkungen. Man kann damit die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische Sequenzen der Promotoren ihrer Zielgene untersuchen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Tatsache, dass Protein-DNS-Komplexe im elektrischen Feld der Gelelektrophorese langsamer laufen als freie DNS, da größere Komplexe im Gel stärker zurückgehalten werden. Dafür wird die gewünschte DNS-Bindungssequenz (Oligonukleotid) radioaktiv markiert und anschließend mit der Proteinlösung inkubiert. Die Auftrennung erfolgt auf einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel (PAGE) und die Detektion dieser Protein-DNS-Komplexe mittels Autoradiographie.

3.5.1 Radioaktive Markierung und Aufreinigung einer DNS-Sonde

Die radioaktive Markierung der sequenzspezifischen NF-κB-Oligonukleotide erfolgte an den endständigen 5´Hydroxguppen mit (γ-^{33}P) ATP durch die T_4-Polynukleotid-kinase.

Markierungsansatz

NF-κB-Oligonukleotid 4 µl

(γ-^{33}P) ATP 5 µl [1.250 µCi]

T4-Polynukleotidkinase (10 U/µL) 1,2 µl

Aqua bidest 8 µl

10 x Kinase Puffer 2 µl

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 ºC inkubiert und daran anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 x STE-Lösung gestoppt.

Stopplösung 1 x STE

0,1 M NaCl 10 ml

1 M Tris pH 7,5 2 ml

0,5 M EDTA 2 ml

ad 100 ml Aqua destillata

Die Aufreinigung der doppelsträngigen DNS-Sonden erfolgte mit 25 G Sephadex Säulen. Der Markierungsansatz wurde auf die Säule aufgebracht und bei 2.200 rpm für 5 min zentrifugiert (Fraktion 1). Anschließend wurde die Säule zweimal mit 100 µl STE-Puffer eluiert (Fraktion 2 und 3). Der Radioaktivitätsgehalt wurde in einem Szintillationszähler gemessen. Fraktionen mit einem Gehalt an Radioaktivität von mehr als 400.000 cpm konnten für die Experimente genutzt werden. Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden bei -20 ºC bis zum Gebrauch unter Berücksichtigung der kurzen Halbwertszeit von 25,4 Tagen gelagert.

3.5.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine im EMSA Verfahren wurde ein vierprozentiges Polyacrylamid-Gel verwendet.

Polyacrylamid-Gel Ansatz:

vierprozentige Acrylamidlösung	40 ml 30-prozentiges Acrylamidgel
	7,5 ml TBE 10-prozentig
	252,5 ml steriles Wasser
10-prozentige Ammoniumperoxidsulfatlösung	0,1 mg APS
(APS)	1 ml steriles Wasser
¼ x TBE-Elektrophoresepuffer	25 ml 10-fach TBE Puffer Lösung
	975 ml sterilem Wasser

Zum Ansetzen der 10-fach TBE-Pufferlösung wurden 108 g Trisbase (TBE), 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA pH 8 auf 1 l steriles Wasser verwendet.

Ein vierprozentiges Polyacrylamidgel wurde aus 30 ml vierprozentiger Acrylamidlösung, 30 µl TEMED und 300 µl 10-prozentiger APS Lösung hergestellt. Dieser Ansatz wurde in flüssiger Form in die Gelkammer zwischen zwei Elektrophoreseglasplatten (14 x 16 cm) gegossen. Ein Elektrophoresekamm wurde zur Bildung der Geltaschen in die Gelkammer eingeführt. Nach Polymerisierung des Gels wurde der Elektrophoresekamm entfernt und die Geltaschen mit Elektrophoresepuffer gespült, um eine Austrocknung zu verhindern. Das fertige Gel wurde in eine Gelapparatur eingesetzt und die Kammern mit Elektrophoresepuffer (¼ x TBE-Elektrophoresepuffer) aufgefüllt. Vor dem Probenauftrag wurden die Taschen durchgespült und ein 30-minütiger Vorlauf bei 50 V durchgeführt.

3.5.3 Vorbereitung der Proben und Band Shift-Vorgang

Hergestellt wurde ein Gelshift-Bindungspuffer, der die Bindung von γ^{33}-P-markierten NF-κB-Oligonukleotiden mit dem Transkriptionsfaktor NF-κB ermöglicht.

Dabei wurden 7 µg Proteinlösung mit jeweils 13 µl Inkubationspuffer für 20 min bei RT inkubiert und anschließend weitere 20 min bei RT mit der radioaktiv markierten DNS-Sonde inkubiert.

Inkubationspuffer EMSA-PAGE

GRBB-Puffer 4 µl

Poly (Di-DC) 1 µl

Calf-thymus-DNS 1 µl

PMSF 1 µl

GRBB-Puffer (gel retardation binding buffer)

10 mM Hepes pH 7,9

60 mM KCl

vierprozentiges Ficoll

1 mM DTT

1 mM EDTA

Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Angesetzt wurden, außer die zu untersuchenden Proben, eine negativ Kontrolle, eine spezifische und unspezifische kompetitive DNA-Proteinbindungsreaktion.

Die Negativkontrolle bestand aus Gelshift-Bindungspuffer und Gesamtzellprotein ohne γ^{33}-P-NF-κB-Oligonukleotiden. Die spezifische kompetitive DNA-Protein-bindungsreaktion wurde zusätzlich, zu dem Gelshift-Bindungspuffer und Gesamtzellprotein, mit einem Überschuss nicht radioaktiv markierter NF-κB-

spezifischer Oligonukleotide versetzt. Die unspezifische kompetitive DNA-Proteinbindungsreaktion wurde zusätzlich mit einem Überschuss an nicht radioaktiv markierten NF-κB-unspezifischen Oligonukleotiden versehen. Zugesetzt wurden die überschüssigen Oligonukleotide zum gleichen Zeitpunkt mit den γ^{33}-P-NF-κB-Oligonukleotiden.

Die Gelelektrophorese erfolgte für 60 min bei 100 V. Das Gel wurde aus den Glasplatten herausgelöst, auf Whatman®-Papier übertragen und zwei Stunden auf dem Geltrockner unter Vakuum bei 80 ºC getrocknet. Detektiert wurden die DNA-Proteinkomplexe mit Hilfe der Autoradiographie. Die Bandenstärke konnte mit Hilfe eines Phosphoimager (BAS 2000, Fujix) und der Tina®-Software ausgewertet werden.

3.5.4 Supershift Assay mit NF-κB-Antikörper p50 und p65

Es wurde die Inkubation des Proteinlysats LPS stimulierter Monozyten mit Antikörper gegen die Untereinheiten des NF-κB p50 und p65 vorgenommen. Es wurden Antikörperkonzentrationsreihen der Verdünnungen 1:100 [20 µg/ml], 1:500 [4 µg/ml], 1:1.000 [2 µg/ml] angesetzt.

3.5.5 Spezifische und unspezifische kompetitive Hemmungsreaktion

Bei der spezifischen kompetitiven Hemmungsreaktion wurde das Proteinlysat LPS-stimulierter Monozyten mit radioaktiv markierten γ^{33}-P-NF-κB-Oligonukleotiden und zusätzlich mit nicht radioaktiv markierten NF-κB-Oligonukleotiden im Überschuss inkubiert.

Die unspezifische kompetitive Hemmung erfolgt nach dem o. g. Prinzip mit dem Unterschied, dass NF-κB-unspezifische Oligonukleotide verwendet werden.

3.6 Western Blot

Die Western Blot Technik nach der Methode von Towbin dient zum Nachweis von Proteinen, die im ersten Schritt der Methode mit Hilfe eines Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgels (SDS-PAGE) aufgetrennt werden (Towbin et al 1979). Im zweiten Schritt, dem eigentlichen Vorgang des „Blottens", werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, wo mit Hilfe einer antikörpergekoppelten Farbreaktion spezifische Proteine detektiert werden können.

3.6.1 SDS-PAGE

Die Gelelektrophorese dient der Analyse komplexer Proteinmischungen und ermöglicht den schnellen Nachweis zu identifizierender Proteine. SDS-PAGE wird standardmäßig zur Trennung von Proteingemischen, die zuvor durch Hitzeinwirkung denaturiert wurden, eingesetzt. Durch SDS werden die Polypeptidkonglomerate entfaltet, um spezifische Bindungsstellen im Molekül für die spätere Antigen-Antikörperbindung freizulegen. Die Elektrophorese erfolgt in einem diskontinuierlichem Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystem (U.K. Laemmli).

Elektrophoresepuffer (SDS-Reducing-Buffer)

Tris Base 15,1 g

Glycin 94 g

10-prozentiges SDS 50 ml

ad 1.000 ml Aqua dest

Das Western Blot-Gel besteht aus zwei Phasen. Ein weitporiges Sammelgel überschichtet ein engmaschiges Trenngel.

Tab. 3.1 Zusammensetzung des Western Blot Gels

Reagenzien	**Trenngel 10 %**	**Sammelgel 5 %**
30-prozentiges AAG	10 ml	1,67 ml
1M Tris 6,8 pH	/	1,25 ml
1M Tris 8,8 pH	11,2 ml	/
10-prozentiges SDS	300 ml	100 ml
Temed	24 ml	15 ml (zum Schluss)
H_2O	8,7 ml	7,0 ml
10-prozentiges APS	300 ml	50 ml (zum Schluss)

Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Aqua destillata überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach 20 min wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und ein Kamm zur Bildung von Geltaschen eingefügt. Dieser wurde nach Polymerisation des Gels entfernt und das Gel in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte Gelapparartur eingesetzt. 10 µg Proteinextrakt wurden mit Western Blot Auftragspuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und für 5 min bei 100 °C erhitzt, danach für eine Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert.

Western Blot Auftragspuffer

DTT 50 µl

Aqua destillata 4,0 ml

0,5 M Tris-HCl pH 6,8 1,0 ml

Glycerol 0,8 ml

10-prozentiges SDS 1,6 ml

0,05-prozentiges Bromphenolblau 0,2 ml

Nach Abkühlung der Proben auf RT wurden diese in die Taschen des Gels eingebracht. Als Molekulargewichtsstandard wurde Rainbow™ Marker verwendet. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 30 V RT. Danach wurde das Gel für einen Western Blot eingesetzt.

3.6.2 Immunoblotting

Das Trenngel wurde zunächst für 15 min in Western Blot-Transferpuffer inkubiert.

Transferpuffer Immunoblotting

25 mM Tris Base 3,02 g

192 mM Glycin 14,4 g

100-prozentiges Methanol 200 ml

10-prozentiges SDS 10 ml

ad 1.000 ml Aqua destillata

Anschließend wurden die Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,2 µm) auf Gelgröße zugeschnittene Whatman® Papierbögen mit Western Blot Transferpuffer getränkt und in die Transferzelle des Blotgerätes gelegt. Auf die Anode der Blotapparatur wurden zuerst drei Filterpapiere, darüber Nitrozellulosemembran, das Gel und schließlich erneut drei Filterpapiere gelegt und Luftblasen durch vorsichtiges Rollen mit einer kleinen Walze entfernt. Nach Auflegen der Kathode erfolgte der Transfer für 1,5 Stunden bei 38 V. Der fertige Blot wurde zum Immunnachweis von Proteinen verwendet. Die Membran wurde zur Blockierung überschüssiger Proteinbindungsstellen für eine Stunde in Blockungspuffer inkubiert. Anschließend wurde der in Blockungspuffer (10 x PBS, 0,1-prozentiges Tween 20, fünfprozentiges Magermilchpulver) verdünnte Primärantikörper (1:3.000 Anti-human IκB-α-rabbit polyclonal IgG) für 60 min RT auf einem Zellschüttler inkubiert.

Die Membran wurde anschließend dreimal mit Waschpuffer (PBS, 0,1-prozentigem Tween 20) gewaschen und für eine Stunde RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

Als Sekundärantikörper diente ein Peroxidase gekoppelter anti-rabbit goat IgG. Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe der Chemilumineszenz (ECL + Plus-Kit) zum Visualisieren spezifisch gebundener Antikörperkomplexe. Die Inkubation mit ECL + Plus erfolgte für fünf min bei RT. Im Anschluss daran wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Molekulargewichtsbestimmung der Proteinbanden erfolgte an Hand des mitgeführten Molekulargewichtsstandards (Rainbow™ Marker).

3.6.3 Stripping und Wiederverwendung der PVDF-Transfermembran

Die komplette Entfernung der membrangebundenen Primär- und Sekundärantikörper erfolgte nach folgendem Protokoll: Die Membran wurde mit Strippingpuffer bedeckt und 30 min lang bei 50 - 55 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde sie zweimal 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Der Strippingpuffer wurde aus 7,8 ml Mercaptoethanol; 6,25 ml 1M Tris Lösung pH 6,7; 20 ml 10-prozentiger SDS-Lösung auf 100 ml sterilem Wasser hergestellt. Die PVDF-Transfermembran wurde folgend für eine Stunde mit fünfprozentiger Molkelösung in PBS und 0,1-prozentigem Tween 20 geblockt. Es folgten die Schritte der Antikörper-Proteinbindungsreaktion und Western blotting detection systems.

3.7 Vitalitätsbestimmung der Monozyten

Um potentielle toxische Effekte der Stimuli auszuschließen, wurden die Zellen parallel in 24-Well Kulturplatten kultiviert und nach Ablauf der Stimulation auf Nekrose und Apoptose untersucht. Zum Nachweis von apoptotischen Zellen wurde ein DNA-Staining mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (1 mg/ml) durchgeführt. Zum Nachweis von nekrotischen Zellen wurde Propidium Iodide (1 mg/ml) verwendet. Die Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert (Boyum 1968; Darzynkiewicz et al 1992). Die Zellvitalität der Zellkulturen lag stetig über 95 % und auch die Stimulation der Zellen mit LPS führte zu keiner nachweisbaren Veränderung der Zellvitalität.

4 Ergebnisse

4.1 Voruntersuchungen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer in vitro Chlamydieninfektion von humanen Monozyten auf die Aktivierung von NF-κB und IκB-α untersucht. Eine Stimulation der Monozyten mit hitzeinaktivierten Chlamydien wurde parallel durchgeführt. Des Weiteren erfolgte die Anwendung von Tetrazyklin in chlamydieninfizierten Monozyten. Als Kontrollgruppen wurden unstimulierte und als Positivkontrolle LPS-stimulierte Monozyten verwendet. Es wurden verschiedene Infektionszeitreihen gewählt. Die Versuchsreihen wurden jeweils dreimal durchgeführt, dargestellt wird jeweils ein repräsentatives Versuchsergebnis.

4.1.1 Supershift Assay mit NF-κB-Antikörper p50 und p65

Humane Monozyten wurden für zwei Stunden mit LPS [10 µg/ml] stimuliert und deren Proteinlysat mit Antikörper gegen die Untereinheiten p65 und p50 des NF-κB-Komplexes inkubiert. Es werden Antikörperkonzentrationsreihen der Verdünnungen von 1:100 [20 µg/ml], 1:500 [4 µg/ml], 1:1.000 [2 µg/ml] angesetzt, um einen optimalen Effekt durch unterschiedliche Wirkungskonzentrationen zu erzielen.

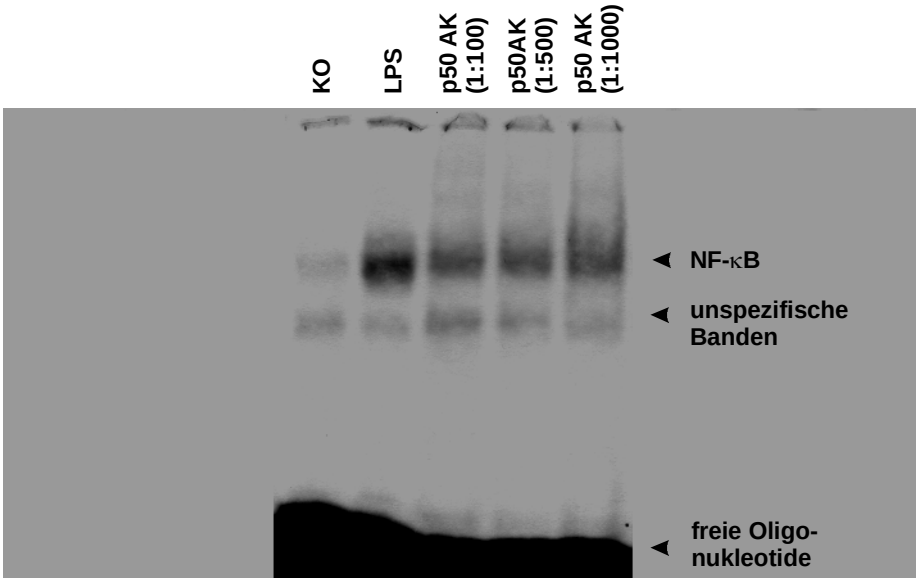


Abb. 4.1 Supershift Assay mit Antikörper p50 in verschiedenen Konzentrationen (EMSA)

KO = Kontrollgruppe aus unbehandelten Monozyten, LPS = LPS-stimulierte Monozyten, p50 AK (1:100) = LPS-stimulierte Monozyten versetzt mit Antikörper p50 der Konzentration [20 µg/ml], p50 AK (1:500) = LPS-stimulierte Monozyten versetzt mit Antikörper p50 der Konzentration [4 µg/ml], p50 AK (1:1.000) = LPS-stimulierte Monozyten versetzt mit Antikörper p50 der Konzentration [2 µg/ml]

Wie aus Abb. 4.1 hervorgeht, besitzt die NF-κB-Bande der Kontrollgruppe eine deutlich geringere Intensität, als diejenige LPS-stimulierter Zellgruppen. Durch Hinzufügen von Antikörper p50 zu dem Proteinlysat LPS-stimulierter Zellen lässt sich eine Intensitätsabnahme der NF-κB-Banden erzielen, verglichen mit der Intensität der NF-κB-Bande ausschließlich LPS-stimulierter Zellen. Zu beobachten ist eine Zunahme der NF-κB-Bandenintensität mit abnehmenden Antikörperkonzentrationen. Die

geringste NF-κB-Intensität ist bei einer p50 Antikörperkonzentration von 20 µg/ml zu verzeichnen.

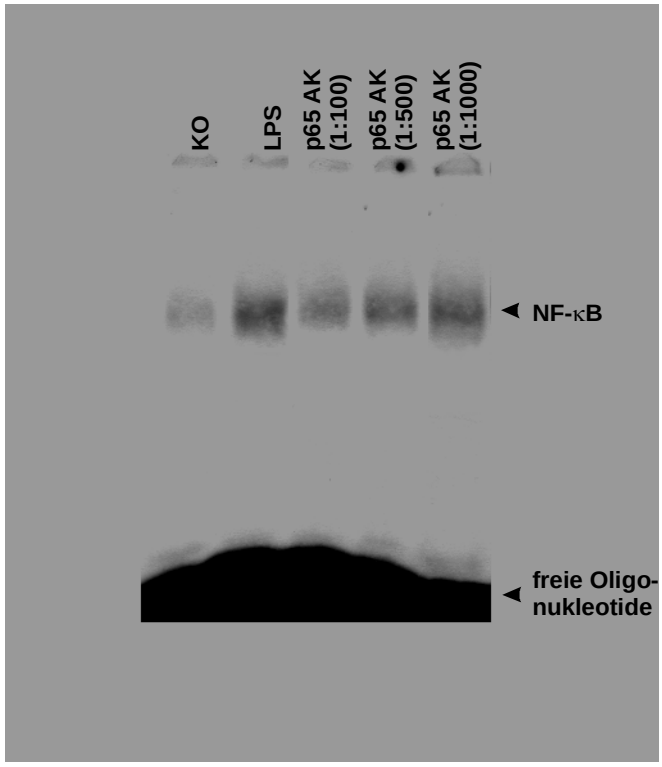


Abb. 4.2 Supershift Assay mit Antikörper p65 in verschiedenen Konzentrationen (EMSA)

KO = Kontrollgruppe aus unbehandelten Monozyten, LPS = LPS-stimulierte Monozyten, p65 AK (1:100) = LPS-stimulierte Monozyten versetzt mit Antikörper p65 im Verdünnungsverhältnis von 1:100, p65 AK (1:500) = LPS-stimulierte Monozyten versetzt mit Antikörper p65 im Verdünnungsverhältnis von 1:500, p65 AK (1:1.000) = LPS-stimulierte Monozyten versetzt mit Antikörper p65 im Verdünnungsverhältnis von 1:1.000

Die Ergebnisse in Abb. 4.2 sind vergleichsweise mit denen der Abb. 4.1 zu interpretieren. Zu beobachten ist eine Zunahme der NF-κB-Bandenintensität mit abnehmenden p65-Antikörperkonzentrationen. Die geringste NF-κB-Intensität ist bei einer p65-Antikörperkonzentration von 20 µg/ml zu verzeichnen.

4.1.2 Kompetitive Hemmungsreaktionen

Spezifische kompetitive Hemmungsreaktion und unspezifische kompetitive Hemmungsreaktion in zweistündig LPS-stimulierten Monozyten.

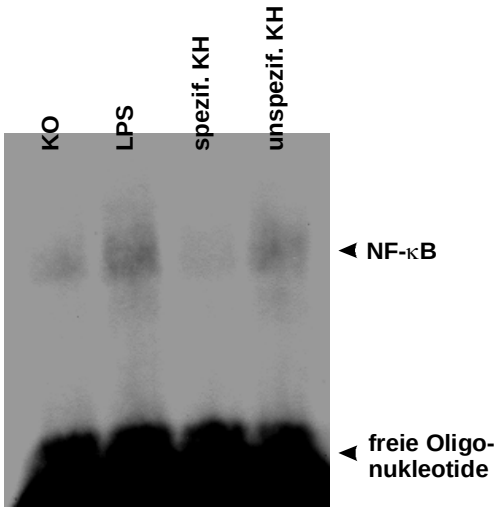


Abb. 4.3 Spezifitätsnachweis des verwendeten NF-κB-Oligonukleotids (EMSA)

KO = Kontrollgruppe aus unbehandelten Monozyten, LPS = 2h LPS-stimulierte Monozyten, spezif. KH = spezifische kompetitive Hemmung mit LPS-stimulierten Monozyten, unspezif. KH = unspezifische kompetitive Hemmung mit LPS-stimulierten Monozyten

Bei der spezif. KH zeigte die NF-κB-Bande eine deutlich schwächere Bandenintensität im Vergleich zu der Bandenintensität der unspezif. KH.

Vergleicht man die Intensitäten der NF-κB-Bande aus der Gruppe der unspezif. KH mit der NF-κB-Bande LPS-stimulierter Zellen (LPS), die ausschließlich radioaktiv markierte γ^{33}-P-NF-κB-Oligonukleotide enthält, so lässt sich kaum ein Unterschied zwischen diesen beiden feststellen.

4.2 Zeitabhängige NF-κB-Aktivierung in LPS-stimulierten humanen Monozyten

Monozyten, die mit LPS stimuliert wurden, zeigten eine starke Zunahme der NF-κB-Aktivität. Daher wurden in den durchgeführten Versuchsreihen LPS-behandelte Zellen als Positivkontrolle verwendet. Da das Ausmaß der NF-κB-Aktivität in Monozyten auch von der Einwirkungszeit des Stimulans abhängig ist, wurde für LPS ein zeitabhängiges NF-κB-Aktivitätsprofil erstellt. Die humanen Monozyten wurden für die Zeiträume 30, 45, 60, 120 und 180 min mit LPS [10 µg/ml] behandelt. Die NF-κB-Banden dieses Versuches werden in Abb. 4.4 dargestellt.

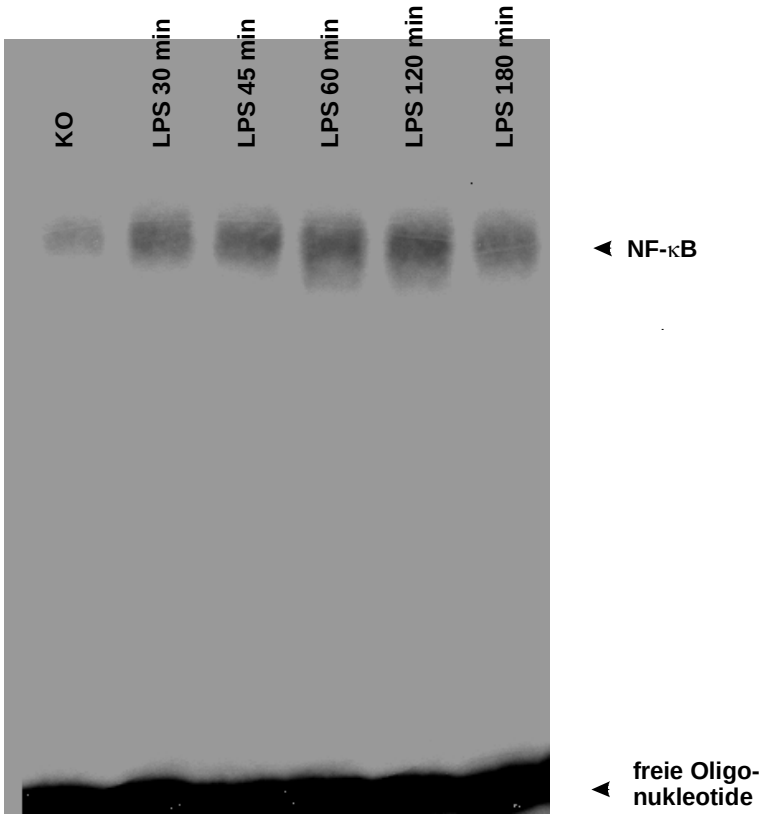


Abb. 4.4 Zeitverlauf der NF-κB-Aktivität von LPS-stimulierten humanen Monozyten (EMSA)

KO = Kontrollgruppe, LPS 30 min = LPS-Einwirkzeit von 30 min, LPS 45 min = LPS-Einwirkzeit von 45 min, LPS 60 min = LPS-Einwirkzeit von 60 min, LPS 120 min = LPS-Einwirkzeit von 120 min, LPS 180 min = LPS-Einwirkzeit von 180 min

Die Kontrollzellen (KO) zeigen eine schwache NF-κB-Aktivität und bieten die geringste Bandenintensität verglichen mit der Intensität der übrigen LPS-stimulierten Monozyten. Die Elektrophoresebanden der 30- und 45-minütigen LPS-Stimulation zeigen bereits eine deutliche Intensitätsverstärkung gegenüber der Kontrolle. Die maximale NF-κB-Aktivität ergibt sich in einem LPS-Wirkungszeitraum von 60 bis 120 min. Nach einer LPS-Stimulation von 180 min wird eine Abnahme der Bandenintensität sichtbar.

4.3 Zeitabhängige IκB-α-Aktivierung in LPS-stimulierten humanen Monozyten

Während die NF-κB-Aktivität unter LPS-Stimulation ihr Maximum in dem Stimulationszeitraum von 60 bis 120 min erreicht (Abb. 4.4), ist mittels Western Blot das Verhalten der IκB-α-Aktivität von LPS-stimulierten humanen Monozyten im Zeitverlauf analysiert worden (Abb. 4.5).

Monozyten wurden mit LPS von gleichbleibender Konzentration [10 µg/ml] über die Zeiträume von 15, 30, 45, 60, 120 und 180 min inkubiert.

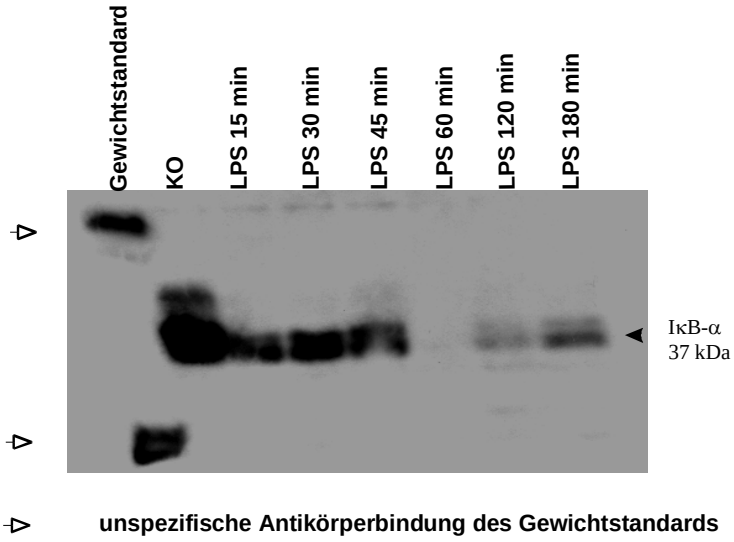


Abb. 4.5 Zeitverlauf der IκB-α–Aktivität von LPS-behandelten humanen Monozyten (Western Blot)

KO = Kontrollgruppe aus unbehandelten Monozyten, LPS 15 min = LPS-Stimulation von 15 min, LPS 30 min = LPS-Stimulation von 30 min, LPS 45 min = LPS-Stimulation von 45 min, LPS 60 min = LPS-Stimulation von 60 min, LPS 120 min = LPS-Stimulation von 120 min, LPS 180 min = LPS-Stimulation von 180 min

Die Abb. 4.5 zeigt IκB-α spezifische Banden bei 37 kDa. Die durch Pfeile angedeuteten Banden sind Bestandteil einer unspezifischen Reaktion zwischen Antikörper und dem Gewichtstandard und sind für den Versuchsausgang ohne Bedeutung.

Betrachtet man die IκB-α-Banden der Versuchsreihe, so ist die Intensität der Kontrollzellenbande am stärksten. Innerhalb der unterschiedlichen LPS-Einwirkungszeiten ist eine Abnahme der IκB-α-Bandenintensität gegenüber der von Kontrollzellen zu beobachten. Bereits eine LPS-Stimulationsdauer von 15 min führt zu einer geringeren IκB-α-Aktivität als die der Kontrollgruppe. Ähnlich verhalten sich auch die Bandenintensitäten der für 30 und 45 min LPS-stimulierter Monozyten. Die Bande der 60-minütigen LPS-Stimulation verzeichnet den größten Intensitätsverlust und ist kaum noch sichtbar. Die darauf folgende IκB-α-Bande der 120 min LPS-Stimulation zeigt eine wiederkehrende Intensitätszunahme, die verstärkt in der Bande der 180-minütigen LPS-Stimulation auftritt.

Daher lässt sich für die Stimulation humaner Monozyten mit LPS ein zeitabhängiger, zweiphasiger Verlauf der IκB-α-Aktivität beschreiben. Bis zu einem Zeitraum von

60 min nimmt die IκB-α-Aktivität stark ab, um wieder ab dem Zeitraum von 120 min bis zu dem untersuchten Zeitraum von 180 min anzusteigen.

4.4 Infektion humaner Monozyten mit Chlamydia pneumoniae

4.4.1 Zeitabhängige NF-κB-Aktivität in Chlamydia pneumoniae-infizierten humanen Monozyten

Um festzustellen, ab welchem Zeitpunkt NF-κB-Aktivitätsveränderungen eintreten könnten, wurden Monozyten mit Chlamydia pneumoniae über Zeiträume von 15, 30, 60 und 120 min infiziert (Abb. 4.6).

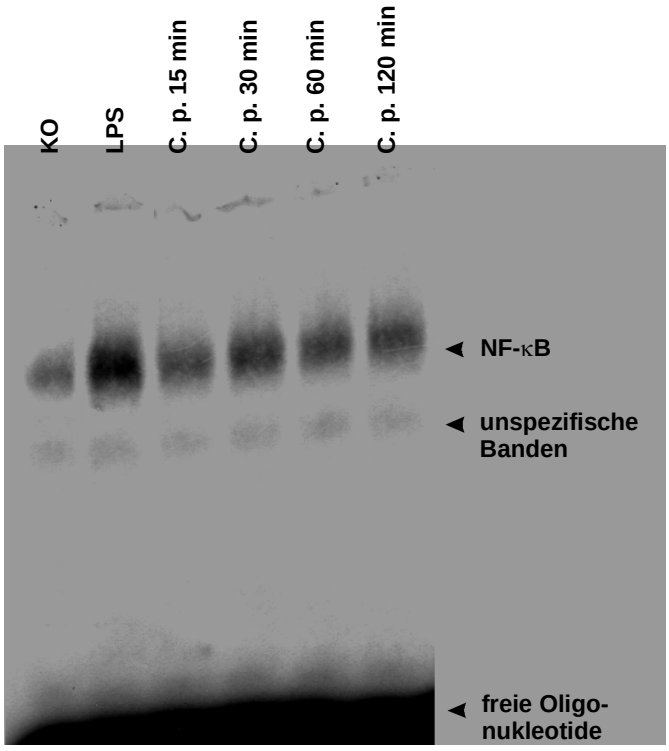


Abb. 4.6 NF-κB-Aktivität nach Infektion humaner Monozyten mit Chlamydia pneumoniae - eine Zeitreihe (EMSA)

KO = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Stimulation von 2 Stunden, C. p. 15 min = Infektion mit Chlamydia pneumoniae für 15 min, C. p. 30 min = Infektion mit Chlamydia pneumoniae für 30 min, C. p. 60 min = Infektion mit Chlamydia pneumoniae für 60 min, C. p. 120 min = Infektion mit Chlamydia pneumoniae für 120 min

Vergleicht man die NF-κB-Bandenintensität in Monozyten, die über 15, 30, 60 und 120 min mit Chlamydia pneumoniae-infizierten wurden, so zeigt sich keine erhebliche NF-κB-Aktivierung.

4.4.2 Zeitabhängige IκB-α-Aktivität in Chlamydia pneumoniae-infizierten humanen Monozyten

Entsprechend der NF-κB-Aktivität wurde die Auswirkung einer kurz andauernden Chlamydia pneumoniae Infektion auf humane Monozyten bezüglich der IκB-α-Aktivität untersucht. Die qualitative IκB-α-Aktivitätsbestimmung wird für die Zeiträume 15, 30, 60 und 120 min nach einer Chlamydien Infektion im Western Blot der Abb. 4.7 gezeigt.

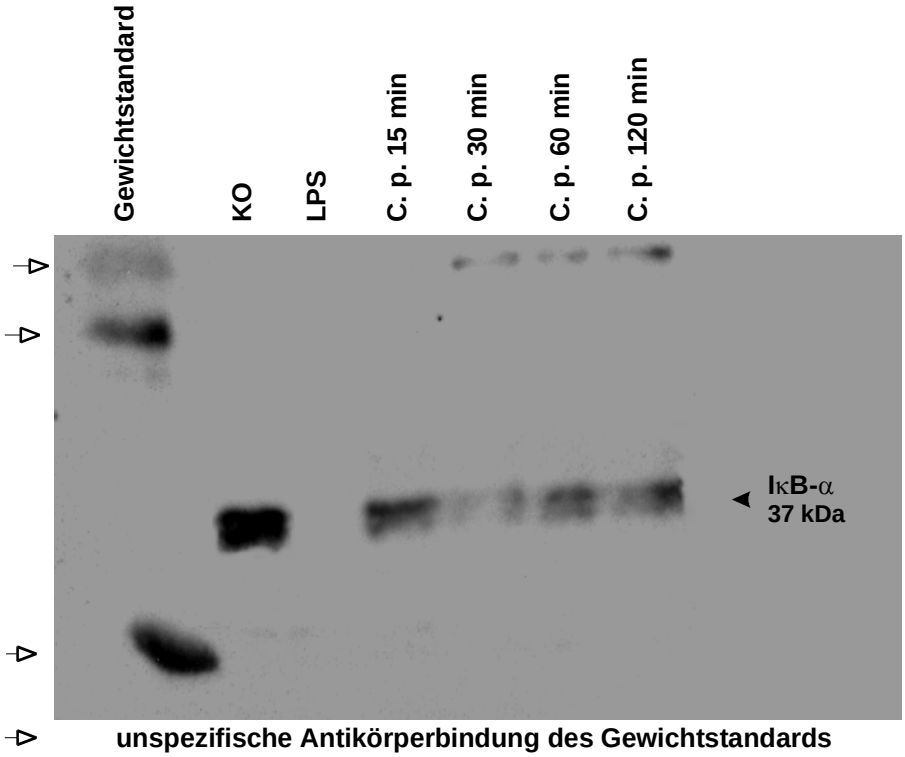


Abb. 4.7 IκB-α-Aktivität in humanen Monozyten im Zeitverlauf nach einer Chlamydia pneumoniae Infektion (Western Blot)

KO = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Stimulation von 2 Stunden, C. p. 15 min = Infektion mit Chlamydia pneumoniae für 15 min, C. p. 30 min = Infektion mit Chlamydia pneumoniae für 30 min, C. p. 60 min = Infektion mit Chlamydia pneumoniae für 60 min, C. p. 120 min = Infektion mit Chlamydia pneumoniae für 120 min

Die IκB-α-Banden aus Abb. 4.7 zeigen im Western Blot ein spezifisches Auftreten bei 37 kDa. Die durch Pfeile angedeuteten unspezifischen Banden ergeben sich aus der Reaktionsfreudigkeit des Gewichtstandards mit dem verwendeten IκB-α-Antikörper. Die IκB-α-Bandenintensitäten der Kontrollgruppe in Abb. 4.7 weisen die größte Intensität auf. Die IκB-α-Bande der LPS-stimulierten Zellen ist kaum sichtbar und lässt auf eine sehr geringe IκB-α−Aktivität schließen.

Vergleicht man die Intensität der IκB-α-Bande der Monozyten, die 15 Minuten lang mit Chlamydia pneumoniae infiziert wurden, mit der Intensität der Kontrollgruppe, so ist die Ausprägung dieser geringer, doch deutlich stärker als die der LPS-Gruppe. Innerhalb der Zeitreihe chlamydieninfizierter Monozyten führt die 15-minütige Infektion zur stärksten und die 30-minütige Infektion zur geringsten IκB-α-Bandenintensität.

Nach einer Infektionszeit von 30 min ist ein Abfall der IκB-α-Bandenintensität gegenüber der Infektionszeit von 15 min und der Kontrollgruppe zu verzeichnen.

Die IκB-α-Banden der Zellgruppen, die 60 und 120 Minuten lang mit Chlamydia pneumoniae infiziert wurden, sind von gleichstarker Intensität. Jedoch sind diese von geringerer Ausprägung, als die IκB-α-Bande der 15-minütigen Infektion und der Kontrollgruppe.

Zusammengefasst führt die Infektion von humanen Monozyten mit Chlamydia pneumoniae, verglichen mit der IκB-α-Intensität der Kontrollzellen, zu einer Abnahme der IκB-α-Bandenintensität bereits ab einem Infektionszeitraum von 15 min und wird deutlicher über den Zeitverlauf von 30, 60 und 120 min Infektionszeit.

Tab. 4.1 Überblick der IκB-α-Bandenintensitäten der Abb. 4.7
C. p. 15 min > C. p. 60 min > C. p. 120 min > C. p. 30 min

KO	>	C. p. 15 min	>	LPS
KO	>	C. p. 30 min	>	LPS
KO	>	C. p. 60 min	>	LPS
KO	>	C. p. 120 min	>	LPS

4.5 Humane Monozyten nach zweistündiger Infektion mit Chlamydia pneumoniae

4.5.1 NF-κB-Aktivität

Diese Untersuchungsreihe zeigt die NF-κB-Aktivität humaner Monozyten nach einer Infektionszeit von zwei Stunden mit Chlamydia pneumoniae.

Die Abb. 4.8 zeigt die NF-κB-spezifischen Banden dieser Versuchsreihe.

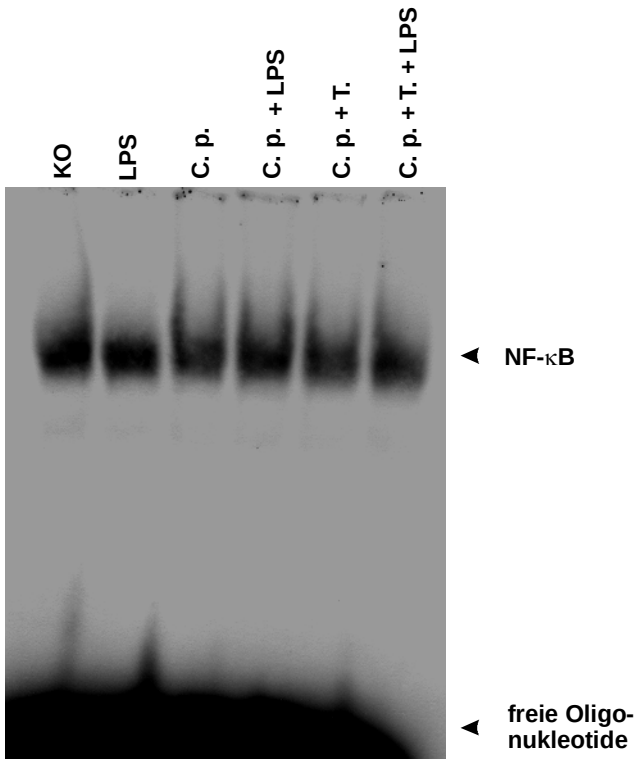


Abb. 4.8 NF-κB-Aktivität humaner Monozyten nach einer Infektionsdauer mit Chlamydia pneumoniae von zwei Stunden (EMSA)

KO = Kontrollgruppe, LPS = 2 Stunden LPS behandelte Monozyten, C. p. = Infektion der Monozyten für 2 Stunden, C. p. + LPS = Infektion der Monozyten für 2 Stunden und zweistündige LPS-Stimulation, C. p. + T. = Infektion der Monozyten für 2 Stunden und gleichzeitige Tetrazyklin Behandlung für 2 Stunden, C. p. + T. + LPS = Infektion der Monozyten für 2 Stunden mit gleichzeitiger Tetrazyklin Behandlung für 2 Stunden und LPS Zugabe für 2 Stunden

Die Intensität der NF-κB-Bande unbehandelter Monozyten (KO) ist geringer als die, der LPS versetzten Zellen (LPS). Letztere besitzt die größte Ausprägung aller in Abb. 4.8 untersuchten Zellgruppen. Die zweistündige Infektion humaner Monozyten mit Chlamydia pneumoniae führt zu einem geringfügigen Anstieg der NF-κB-Bandenintensität gegenüber der Kontrollzellen. Ein LPS-Zusatz zu den Chlamydien-infizierten Zellen (C. p. + LPS), führt zu einer Steigerung der NF-κB-Aktivität. Werden die infizierten Monozyten mit Tetrazyklin versetzt (C. p. + T.), ist eine Abnahme der NF-κB-Bandenintensität sichtbar, verglichen mit dem Wert ausschließlich Chlamydien-infizierter Monozyten. Ebenfalls führt ein Zusatz von LPS (C. p. + T. + LPS) auch in diesem Fall zu einer gesteigerten Bandenintensität, gegenüber der mit Tetrazyklin versetzten, infizierten Monozyten.

4.5.2 IκB-α-Aktivität

Die Auswirkungen einer zweistündigen Chlamydia pneumoniae-Infektion auf humane Monozyten bezüglich ihrer IκB-α-Aktivität werden in dieser Untersuchung dargestellt.



Abb. 4.9 IκB-α-Aktivität in humanen Monozyten nach einer Infektion mit Chlamydia pneumoniae von zwei Stunden (Western Blot)

KO = Kontrollgruppe, LPS = 2 Stunden LPS-behandelte Monozyten, C. p. = Infektion der Monozyten für 2 Stunden, C. p. + LPS = Infektion der Monozyten für 2 Stunden und 2-stündige LPS-Stimulation, C. p. + T. = Infektion der Monozyten für 2 Stunden und gleichzeitige Tetrazyklin-Behandlung für 2 Stunden, C. p. + T. + LPS = Infektion der Monozyten für 2 Stunden mit gleichzeitiger Tetrazyklin-Behandlung für 2 Stunden und LPS-Zugabe für 2 Stunden

In Abb. 4.9 ist die IκB-α-Bande der unbehandelten Zellen (KO) von größerer Intensität, als die kaum sichtbare Bande der LPS stimulierten Zellen (LPS). Die IκB-α-Bandenintensität der zweistündig chlamydieninfizierten Monozyten (C. p.) ist von stärkstem Ausmaß verglichen mit den gesamten Versuchsgruppen der Abb. 4.9. Ein Hinzufügen von LPS zu den chlamydieninfizierten Zellen (C. p. + LPS) bewirkt eine Abnahme der IκB-α-Aktivität. Der Zusatz von Tetrazyklin zu der Gruppe der chlamydieninfizierten Monozyten (C. p. + T.) führt zu einer IκB-α-Bandenintensität vergleichbar jener der Kontrollgruppe. Wird zusätzlich LPS hinzugefügt (C. p. + T. + LPS), so ist ein leichter Intensitätsabfall zu verzeichnen gegenüber der letztgenannten Gruppe.

4.6 Humane Monozyten nach achtstündiger Infektion mit Chlamydia pneumoniae

4.6.1 NF-κB-Aktivität

In dieser Versuchsreihe werden die Auswirkungen auf die NF-κB-Aktivität von Monozyten nach einer achtstündigen Infektion mit Chlamydia pneumoniae untersucht. Des Weiteren wird die NF-κB-Aktivität in chlamydieninfizierten Zellen, die zusätzlich mit LPS, Tetrazyklin oder gleichzeitig mit LPS und Tetrazyklin behandelt wurden, gemessen. Die NF-κB-Banden dieser Versuchsanordnung werden in Abb. 4.10 veranschaulicht.

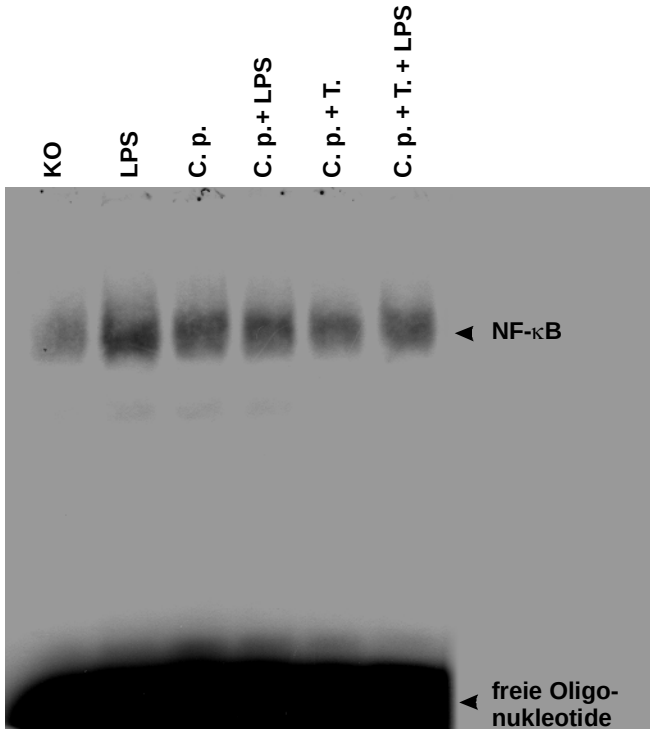
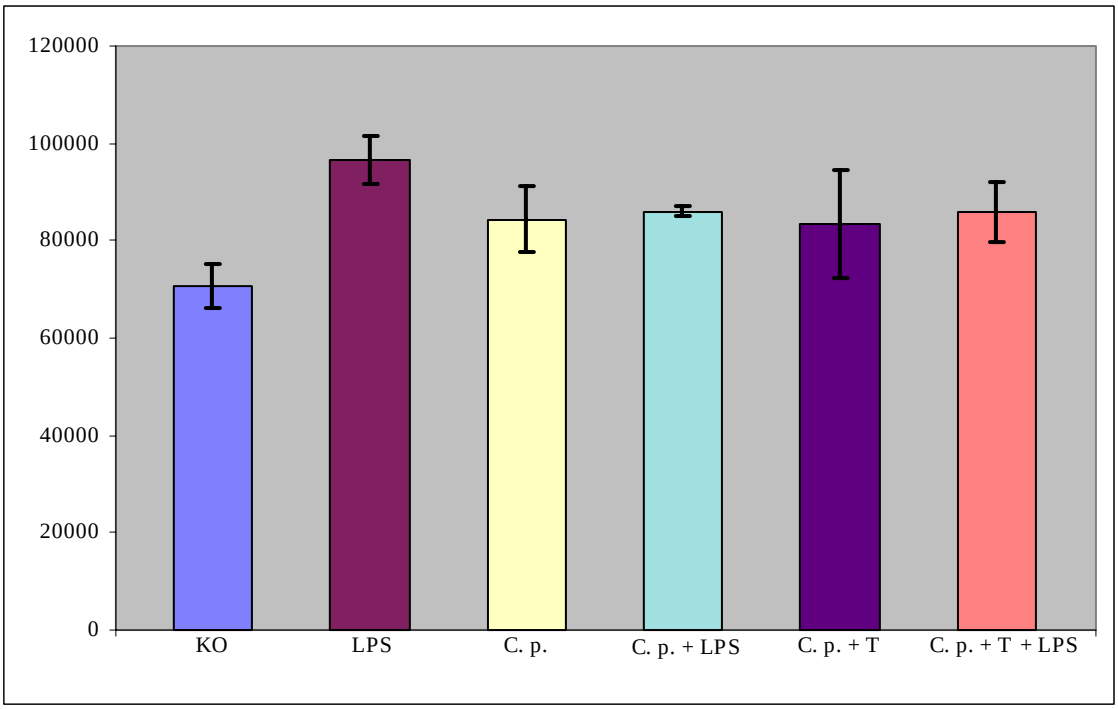


Abb. 4.10 NF-κB-Aktivität humaner Monozyten nach einer Infektionsdauer mit Chlamydia pneumoniae von acht Stunden (EMSA)

KO = Kontrollgruppe, LPS = 2 Stunden LPS behandelte Monozyten, C. p. = Infektion der Monozyten für 8 Stunden, C. p. + LPS = Infektion der Monozyten für 8 Stunden und zweistündige LPS-Stimulation, C. p. + T. = Infektion der Monozyten für 8 Stunden und gleichzeitige Tetrazyklin-Behandlung für 8 Stunden, C. p. + T. + LPS = Infektion der Monozyten für 8 Stunden mit gleichzeitiger Tetrazyklin Behandlung für 8 Stunden und LPS-Zugabe für 2 Stunden



Diag. 4.1 NF-κB-Bandenintensitäten nach achtstündiger Infektion der Monozyten mit Chlamydia pneumoniae und zusätzlicher Behandlung mit LPS, Tetrazyklin oder LPS und Tetrazyklin gleichzeitig. Darstellung der drei Versuchsreihen mit Mittelwerten und Standardabweichung.

x-Achse: untersuchte Zellgruppen der Versuchsanordung
y-Achse: Zahlenwerte der untergrundkorrigierten Intensitäten der NF-κB-Banden

Die Betrachtung der NF-κB-Bandenintensitäten aus Abb. 4.10 und deren quantitative Auswertung in Diag. 4.1 ergibt folgende Ergebnisse:

Die schwächste Intensitätsausprägung besitzt die NF-κB-Bande der Kontrollgruppe, die stärkste lässt sich in den LPS stimulierten Monozyten verzeichnen. Eine achtstündige Infektion der Monozyten mit Chlamydia pneumoniae (C. p.) hat einen Anstieg der NF-κB-Bandenintensität, vergleichsweise mit der Kontrollgruppe, zur Folge. Die zusätzliche, gleichzeitige Stimulation der Zellen mit LPS (C. p. + LPS) führt zu einer weiteren geringfügigen Zunahme der Intensität gegenüber der ausschließlich chlamydieninfizierten Monozyten. Versetzt man die für acht Stunden infizierten Monozyten gleichzeitig mit Tetrazyklin (C. p. + T.), so ist eine Abnahme der NF-κB-Aktivität unterhalb der Aktivität ausschließlich chlamydieninfizierter Zellen, jedoch oberhalb des Kontrollwerts, sichtbar. Zu erkennen ist eine leichte Zunahme der NF-κB-

Bandenintensität in der Gruppe der chlamydieninfizierten und Tetrazyklin/LPS-versetzten Zellen (C. p. + T. + LPS) verglichen mit der Intensität der zu letzt beschriebenen Gruppe (C. p. + T.).

Diese Versuchsreihe zeigt, dass Chlamydien nach einer achtstündigen Infektion einen Anstieg der NF-κB-Bandenintensität verursachen, wenn man den Intensitätswert mit dem Wert der unbehandelten Monozyten vergleicht. Eine Zugabe von LPS führt zu einem Anstieg der NF-κB-Aktivität verglichen mit der Aktivität infizierter doch nicht LPS-stimulierter Zellen. Ebenfalls vermag eine Zugabe von Tetrazyklin zu chlamydieninfizierten Zellen, die NF-κB-Bandenintensität zu verringern.

4.6.2 IκB-α-Aktivität

Die gleiche Versuchsanordnung aus Abb. 4.10 ist beibehalten worden. Die Intensität der IκB-α Banden der Abb. 4.11 stellen die IκB-α-Aktivität einer achtstündigen Infektion von Monozyten mit Chlamydia pneumoniae dar. Weiterhin wird die IκB-α-Bandenintensität der chlamydieninfizierten Zellen, die zusätzlich mit LPS, Tetrazyklin oder gleichzeitig mit LPS und Tetrazyklin behandelt wurden, untersucht.



Abb. 4.11 IκB-α-Aktivität in humanen Monozyten nach einer Infektion mit Chlamydia pneumoniae von acht Stunden (Western Blot)

KO = Kontrollgruppe, LPS = 2 Stunden LPS-behandelte Monozyten, C. p. = Infektion der Monozyten für 8 Stunden, C. p. + LPS = Infektion der Monozyten für 8 Stunden und zweistündige LPS-Stimulation, C. p. + T. = Infektion der Monozyten für 8 Stunden und gleichzeitige Tetrazyklin-Behandlung für 8 Stunden, C. p. + T. + LPS = Infektion der Monozyten für 8 Stunden mit gleichzeitiger Tetrazyklin-Behandlung für 8 Stunden und LPS-Zugabe für 2 Stunden

Die LPS-Gruppe weist die schwächste Bandenintensität der gesamten Versuchsreihe auf. Vergleicht man die Intensität der IκB-α-Bande, der für acht Stunden mit Chlamydia pneumoniae-infizierten Zellen (C. p.), mit der übriger Banden, so zeigt sich hierbei die größte Intensität. Ein zusätzlicher LPS Zusatz zu den Chlamydien infizierten Monozyten (C. p. + LPS) führt zu einer Abnahme der IκB-α-Aktivität gegenüber, der ausschließlich mit Chlamydien infizierten Zellen (C. p.). Die Zugabe von Tetrazyklin erfolgt zur gleichen Zeit mit der Infektion der Monozyten durch Chlamydia pneumoniae (C. p. + T.) und trägt zu einer Zunahme der IκB-α-Banden-Intensität gegenüber der Kontrollgruppe bei. Den gleichen Sachverhalt zeigt auch die Gruppe der chlamydieninfizierten Monozyten, die zusätzlich mit Tetrazyklin und LPS (C. p. + T. + LPS) versehen wurden.

Tab. 4.2 Überblick der IκB-α-Bandenintensitäten der Abb. 4.11

KO	<	C. p.	>	LPS
KO	<	C. p + LPS	>	LPS
KO	<	C. p. + T.	>	LPS
KO	<	C. p.+ T. + LPS	>	LPS

C. p. > C. p. + T.

C. p. + LPS < C. p. + T. + LPS

4.7 Humane Monozyten nach 24-stündiger Infektion mit Chlamydia pneumoniae

4.7.1 NF-κB-Aktivität

In dieser Versuchsreihe werden die Auswirkungen auf die NF-κB-Aktivität von Monozyten nach einer 24-stündigen Infektion mit Chlamydia pneumoniae untersucht. Des Weiteren wird die NF-κB-Aktivität in chlamydieninfizierten Zellen, die zusätzlich mit LPS, Tetrazyklin oder gleichzeitig mit LPS und Tetrazyklin behandelt wurden, gemessen. Die NF-κB-Banden dieser Versuchsanordnung werden in Abb. 4.12 veranschaulicht.

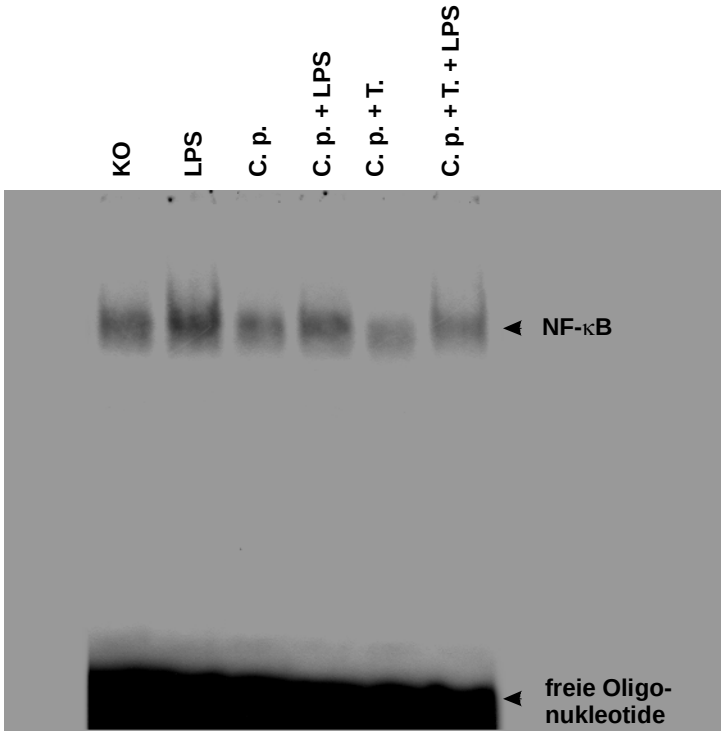
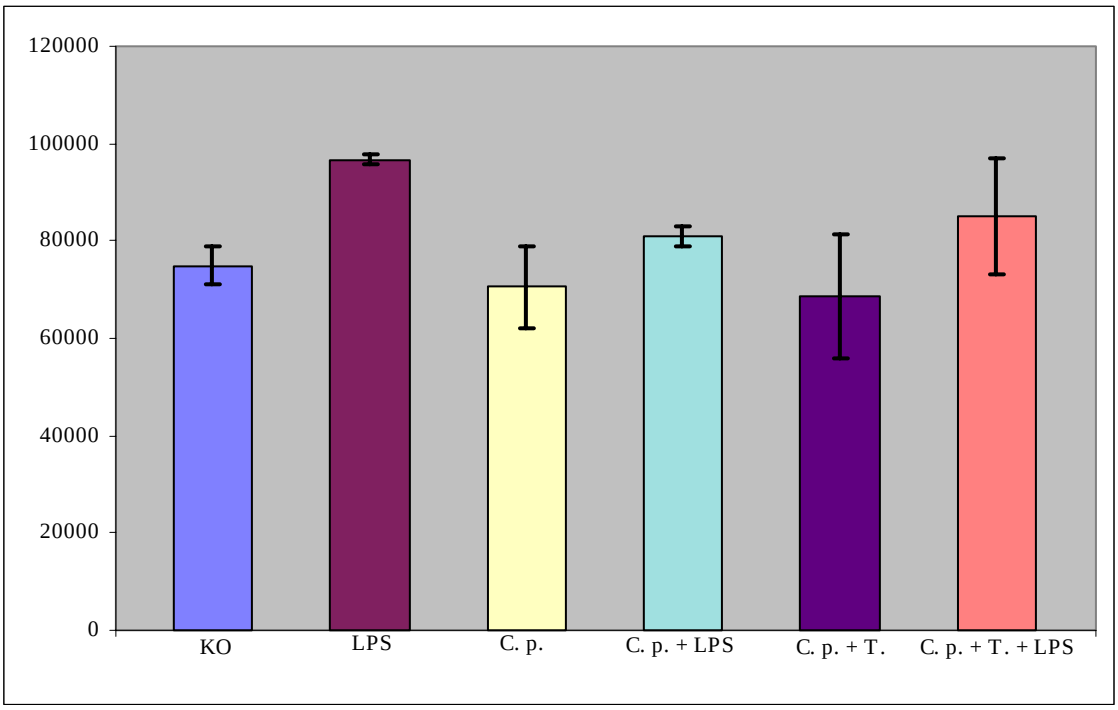


Abb. 4.12 NF-κB-Aktivität humaner Monozyten nach einer Infektionsdauer mit Chlamydia pneumoniae von 24 Stunden (EMSA)

KO = Kontrollgruppe, LPS = 2 Stunden LPS-behandelte Monozyten, C. p. = Infektion der Monozyten für 24 Stunden, C. p. + LPS = Infektion der Monozyten für 24 Stunden und zweistündige LPS-Stimulation, C. p. + T. = Infektion der Monozyten für 24 Stunden und gleichzeitige Tetrazyklin-Behandlung für 24 Stunden, C. p. + T. + LPS = Infektion der Monozyten für 24 Stunden mit gleichzeitiger Tetrazyklin-Behandlung für 24 Stunden und LPS-Zugabe für zwei Stunden



Diag. 4.2 NF-κB-Bandenintensitäten nach 24-stündiger Infektion der Monozyten mit Chlamydia pneumoniae und zusätzlicher Behandlung mit LPS, Tetrazyklin oder LPS und Tetrazyklin gleichzeitig. Darstellung der drei Versuchsreihen mit Mittelwerten und Standardabweichung.

x-Achse: untersuchte Zellgruppen der Versuchsanordung
y-Achse: Zahlenwerte der untergrundkorrigierten Intensitäten der NF-κB-Banden

Abbildung 4.12 zeigt NF-κB-Banden von unterschiedlichen Intensitäten, deren quantitative Auswertungen in Diag. 4.2 veranschaulicht sind.

Die NF-κB-Bandenintensität der Kontrollgruppe zeigt eine geringere Ausprägung, als die der LPS-stimulierten Zellen (LPS), welche auch in dieser Versuchsreihe den höchsten NF-κB-Aktivitätsgrad aufweist. Nach einer in vitro-Infektionszeit von 24 Stunden mit Chlamydia pneumoniae (C. p.) zeigen humane Monozyten einen deutlichen Verlust der NF-κB-Bandenintensität verglichen mit dem Ausgangswert der Kontrollgruppe. Eine der Chlamydieninfektion folgende zusätzliche Stimulation der Zellen mit LPS (C. p. + LPS) führt zu einer Zunahme der NF-κB-Aktivität über der des Kontrollwertes. Werden die Zellen zu Beginn der Infektion gleichzeitig mit Tetrazyklin versetzt (C. p. + T.), so nimmt die Intensität der NF-κB-Bande ab, sogar unter dem Wert der Zellen, die ausschließlich mit Chlamydien infizierten wurden. Werden Chlamydien infizierte Zellen post infectionem mit Tetrazyklin und LPS versetzt (C. p. + T. + LPS), so registriert man wieder eine Zunahme der NF-κB-Aktivität verglichen mit der Intensität ausschließlich Tetrazyklin behandelter infizierter Zellen (C. p. + T.).

4.7.2 IκB-α-Aktivität

Die gleiche Versuchsanordnung der Abb. 4.12 wurde eingehalten, um die IκB-α-Aktivität in humanen Monozyten nach 24-stündiger Infektion mit Chlamydia pneumoniae zu untersuchen.

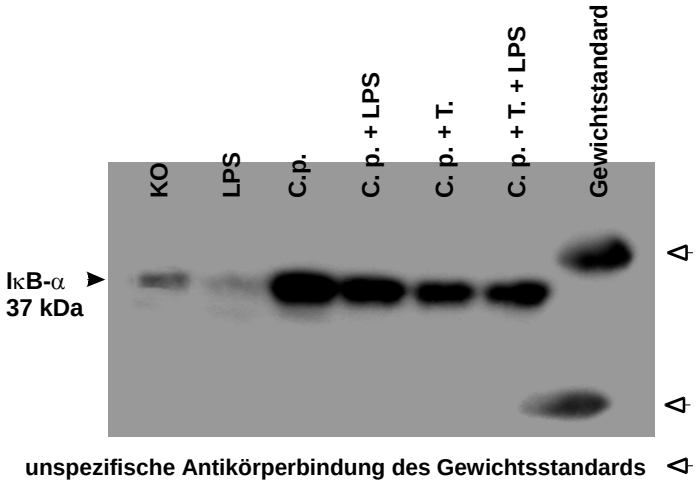


Abb. 4.13 IκB-α-Aktivität in humanen Monozyten nach einer Infektion mit Chlamydia pneumoniae von 24 Stunden (Western Blot)

KO = Kontrollgruppe, LPS = 2 Stunden LPS behandelte Monozyten, C. p. = Infektion der Monozyten für 24 Stunden, C. p. + LPS = Infektion der Monozyten für 24 Stunden und zweistündige LPS-Stimulation, C. p. + T. = Infektion der Monozyten für 24 Stunden und gleichzeitige Tetrazyklin-Behandlung für 24 Stunden, C. p. + T. + LPS = Infektion der Monozyten für 24 Stunden mit gleichzeitiger Tetrazyklin-Behandlung für 24 Stunden und LPS-Zugabe für 2 Stunden

Der Western Blot der Abb. 4.13 zeigt IκB-α-spezifische Elektrophoresebanden bei einer Proteingröße von 37 kDa. Ebenfalls sichtbar sind die unspezifischen Banden der Antikörper – Gewichtsstandardinteraktion. Vergleicht man die IκB-α-Bande der Kontrollzellen (KO) mit denen der LPS-stimulierten Zellen (LPS), so ist die Intensität Ersterer deutlich stärker ausgeprägt. Die Bande der LPS-behandelten Zellen ist von geringster Intensität in der gesamten Versuchsreihe. Auffällig ist die starke IκB-α-Bande der Monozyten, die für 24 Stunden mit Chlamydia pneumoniae infiziert worden sind (C. p.). Sie stellt die Bande mit der größten Intensitätsausprägung dar. Die

ebenfalls starke IκB-α-Aktivität der Zellen, die zusätzlich zur in vitro Infektion mit LPS behandelt wurden (C. p. + LPS), ist jedoch geringer als die der reinen Chlamydieninfektion. Eine geringere Ausprägung der IκB-α-Aktivität als die bisher beschriebener Chlamydien infizierter Zellen weisen die Monozyten auf, die mit Tetrazyklin (C. p. + T.) und Tetrazyklin und LPS (C. p. + T. + LPS) versetzt wurden.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich eine starke IκB-α-Aktivität von Monozyten verzeichnen, die 24 stundenlang mit Chlamydia pneumoniae infizierten wurden.

Tab. 4.3 Überblick der IκB-α-Bandenintensitäten der Abb. 4.13

KO	<	C. p.	>	LPS
KO	<	C. p + LPS	>	LPS
KO	<	C. p. + T.	>	LPS
KO	<	C. p. + T. + LPS	>	LPS

C. p. > C. p. + T.

C. p. + LPS > C. p. + T. + LPS

4.8 Humane Monozyten nach 72-stündiger Infektion mit Chlamydia pneumoniae

4.8.1 NF-κB-Aktivität

Die Messung der NF-κB-Aktivität in humanen Monozyten nach einer Infektionszeit von 72 Stunden mit Chlamydia pneumoniae ist Gegenstand dieser Untersuchungen und wird in Abb. 4.14 dargestellt.

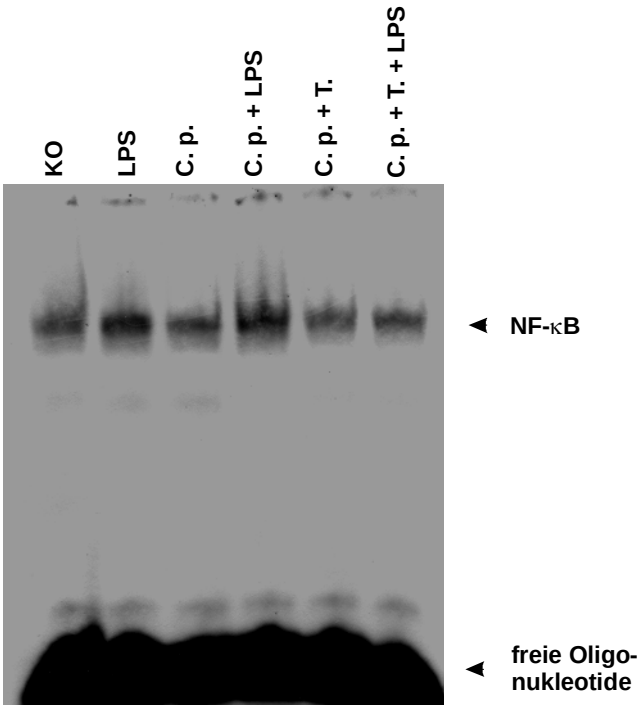
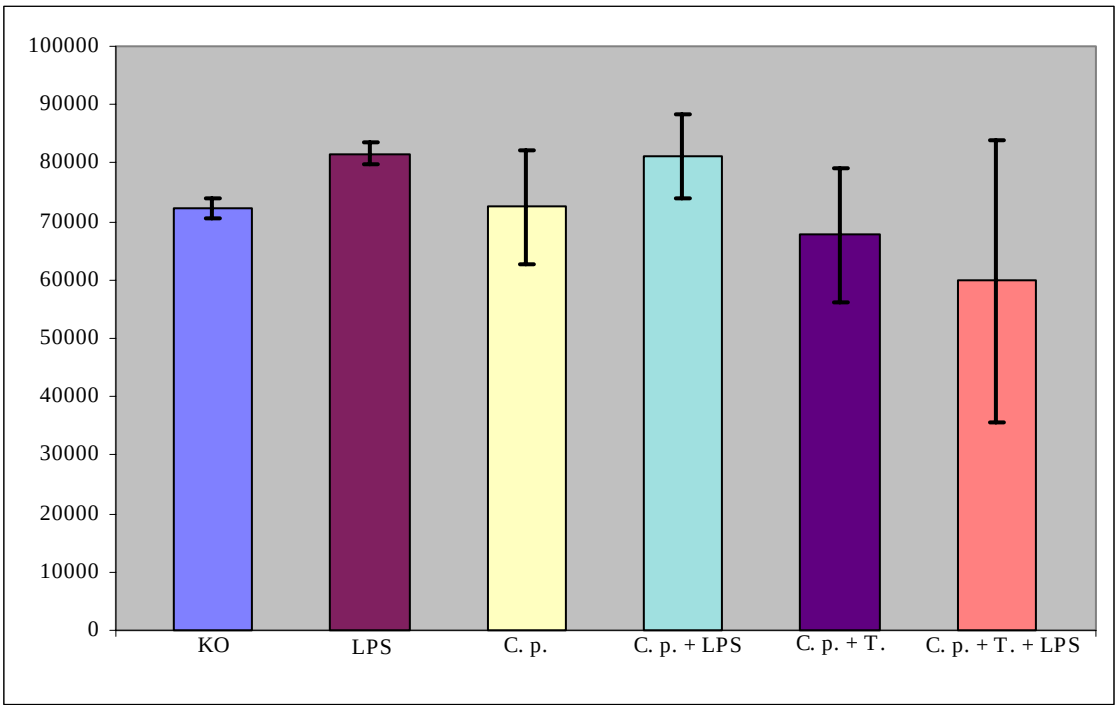


Abb. 4.14 NF-κB-Aktivität humaner Monozyten nach einer Infektionsdauer mit Chlamydia pneumoniae von 72 Stunden (EMSA)

KO = Kontrollgruppe, LPS = 2 Stunden LPS behandelte Monozyten, C. p. = Infektion der Monozyten für 72 Stunden, C. p. + LPS = Infektion der Monozyten für 72 Stunden und zweistündige LPS-Stimulation, C. p. + T. = Infektion der Monozyten für 72 Stunden und gleichzeitige Tetrazyklin-Behandlung für 72 Stunden, C. p. + T. + LPS = Infektion der Monozyten für 72 Stunden mit gleichzeitiger Tetrazyklin-Behandlung für 72 Stunden und LPS- Zugabe für 2 Stunden



Diag. 4.3 NF-κB-Bandenintensitäten nach 72-stündigen Infektion der Monozyten mit Chlamydia pneumoniae und zusätzlicher Behandlung mit LPS, Tetrazyklin oder LPS und Tetrazyklin gleichzeitig. Darstellung der drei Versuchsreihen mit Mittelwerten und Standardabweichung.

x-Achse: untersuchte Zellgruppen der Versuchsanordung
y-Achse: Zahlenwerte der untergrundkorrigierten Intensitäten der NF-κB-Banden

Die NF-κB-Bandenintensität, der für 72 Stunden mit Chlamydien infizierten Zellen (C. p.) ist geringer als, die unbehandelter Monozyten (KO). Wird LPS den chlamydieninfizierten Zellen zugefügt (C. p. + LPS), so nimmt die Intensität der Banden zu, vergleichsweise mit der Intensität der ausschließlich chlamydieninfizierten Zellen (C. p.), ohne jedoch die Intensität der mit LPS-behandelten Monozyten zu erreichen. Werden Monozyten nach dem Infektionsvorgang mit Tetrazyklin versehen (C. p. + T.), so ergibt sich nach 72 Stunden eine geringere NF-κB-Bandenintensität als die der Chlamydien infizierten Zellen und als die der Kontrollgruppe. Ein Zusatz von LPS (C. p. + T. + LPS) steigert die NF-κB-Aktivität geringfügig, bleibt jedoch ebenfalls unter dem Wert der Kontrollgruppe.

Somit lässt sich allgemein kaum eine Abnahme der NF-κB-Aktivität unter einer 72-stündigen Infektion der humanen Monozyten mit Chlamydia pneumoniae verzeichnen. Ein Zusatz von Tetrazyklin führt zu einem zusätzlichen NF-κB-Aktivitätsverlust unter dem des Kontrollwertes.

4.8.2 IκB-α-Aktivität

Die IκB-α-Aktivität von humanen Monozyten, die gemäß der Versuchsanordnung aus Abb. 4.14 für 72 Stunden mit Chlamydia pneumoniae infiziert wurden, wird in Abb. 4.15 dargestellt.

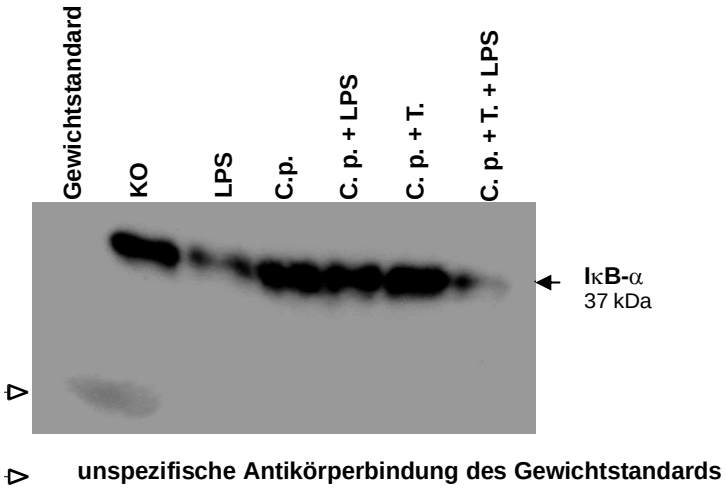


Abb. 4.15 IκB-α Aktivität in humanen Monozyten nach einer Infektion mit Chlamydia pneumoniae von 72 Stunden (Western Blot)

KO = Kontrollgruppe, LPS = 2 Stunden LPS-behandelte Monozyten, C. p. = Infektion der Monozyten für 72 Stunden, C. p. + LPS = Infektion der Monozyten für 72 Stunden und zweistündige LPS-Stimulation, C. p. + T. = Infektion der Monozyten für 72 Stunden und gleichzeitige Tetrazyklin-Behandlung für 72 Stunden, C. p. + T.+ LPS = Infektion der Monozyten für 72 Stunden mit gleichzeitiger Tetrazyklin-Behandlung für 72 Stunden und LPS-Zugabe für 2 Stunden

In Abb. 4.15 ist die Intensität der IκB-α-Bande der unbehandelten Monozyten (KO) erheblich stärker als die, der mit LPS-behandelten Zellen. Eine Infektion der humanen Monozyten mit Chlamydia pneumoniae für 72 Stunden (C. p.) führt zu einer ebenfalls starken IκB-α-Bandenintensität, die etwas stärker ausgeprägt ist, als die der Kontrollgruppe. Fügt man LPS den infizierten Zellen hinzu (C. p. + LPS), so ist eine geringe Abnahme der Intensität gegenüber der ausschließlich infizierten Zellen (C. p.) zu verzeichnen. Eine Zugabe von Tetrazyklin post infectionem für 72 Stunden lang

(C. p. + T.) erhöht in Monozyten die IκB-α-Bandenintensität noch mehr, als die der alleinigen Infektion mit Chlamydia pneumoniae oder der Kontrollgruppe. Ein starker Intensitätsverlust der IκB-α-Bande ist zu verzeichnen, wenn man zusätzlich zum Tetrazyklin auch LPS (C. p. + T. + LPS) der Monozytenkultur hinzufügt. Diese Zellgruppe weist die schwächste IκB-α-Bandenintensität unter den Chlamydien infizierten Zellen auf.

Tab. 4.4 Überblick der IκB-α-Bandenintensitäten der Abb. 4.15

KO	=	C. p.	>	LPS
KO	=	C. p + LPS	>	LPS
KO	≤	C. p. + T.	>	LPS
KO	>	C. p .+ T. + LPS	≤	LPS

C. p. < C. p. + T.

C. p. + LPS > C. p. + T. + LPS

4.9 NF-κB-Aktivität in Chlamydia pneumoniae-infizierten Monozyten – Zeitreihe 8, 24 und 72 Stunden

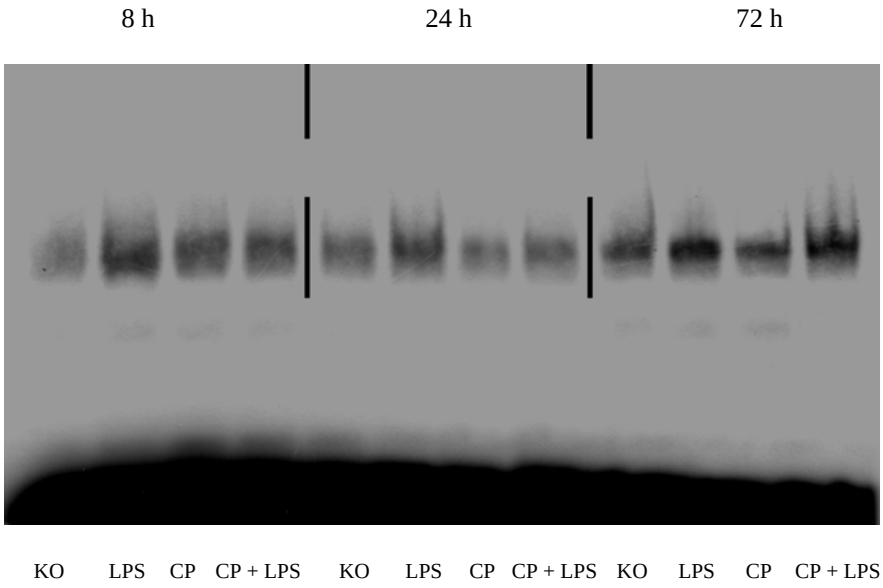


Abb. 4.16 Vergleich der NF-κB-Expression in Monozyten nach Infektion mit Chlamydia pneumoniae bzw. Chlamydia pneumoniae plus LPS über 8, 24 und 72 Stunden (zusammenfassender Vergleich).

4.10 Infektion humaner Monozyten mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae

4.10.1 NF-κB-Aktivität

Diese Untersuchungsreihen erfassen die NF-κB-Aktivität bzw. IκB-α-Aktivität humaner Monozyten, nach Infektion mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae über unterschiedliche Infektionszeiträume von 2, 8, 24 und 72 Stunden.

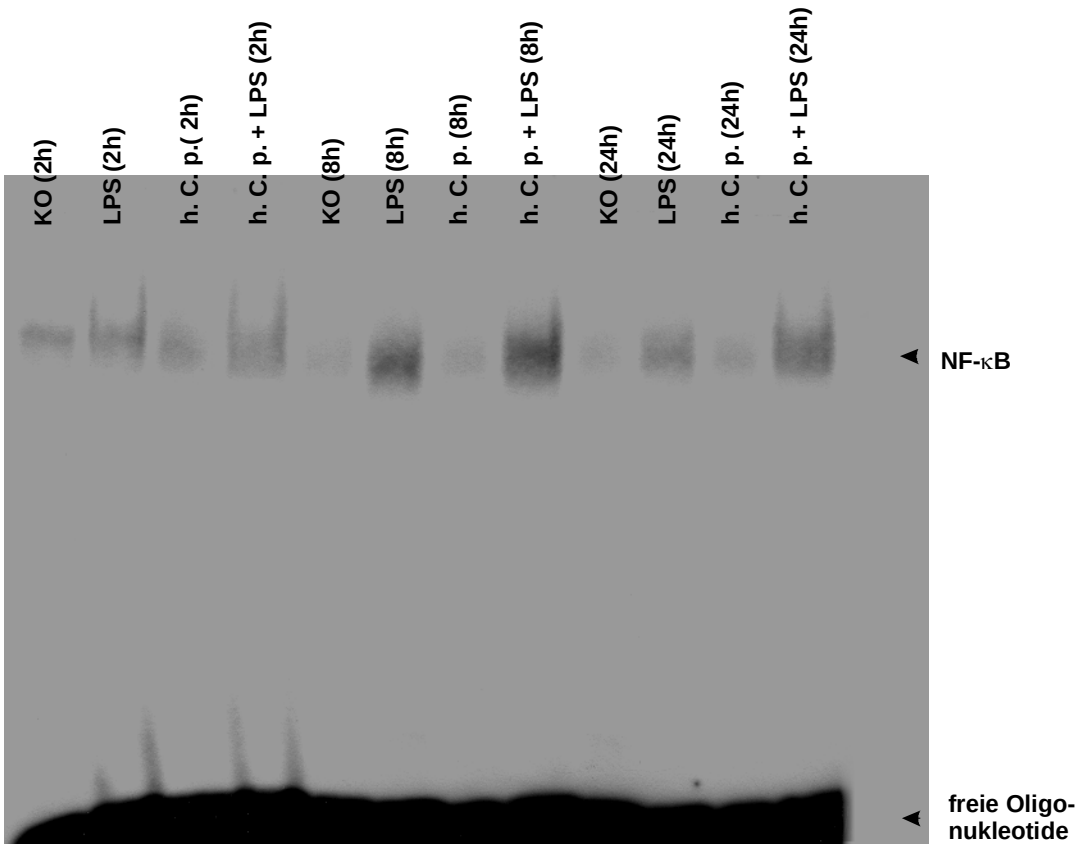


Abb. 4.17 NF-κB-Aktivität humaner Monozyten nach einer Infektionsdauer von 2, 8 und 24 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae

KO = Kontrollgruppe, LPS = 2 Stunden LPS-behandelte Monozyten, h. C. p. = Infektion der Monozyten für 2, 8 bzw. 24 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae,
h. C. p. + LPS = Infektion der Monozyten für 2, 8 bzw. 24 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae und zweistündiger LPS-Stimulation

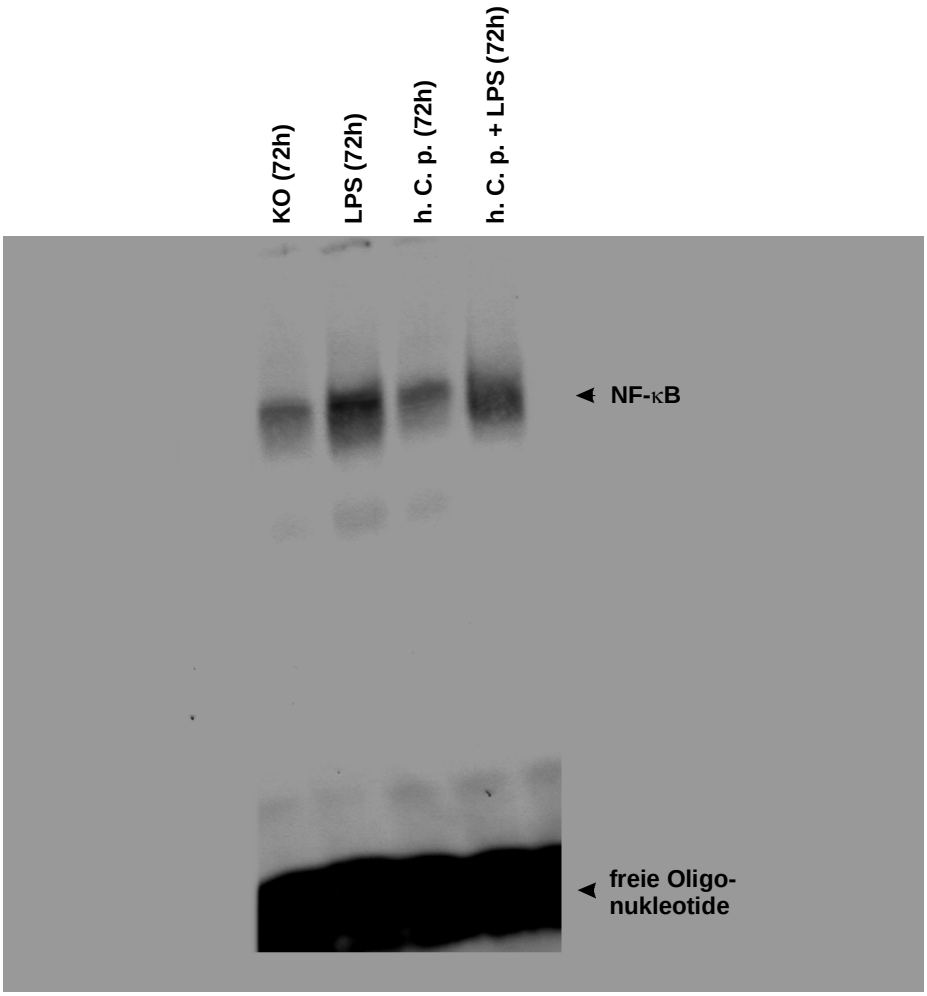
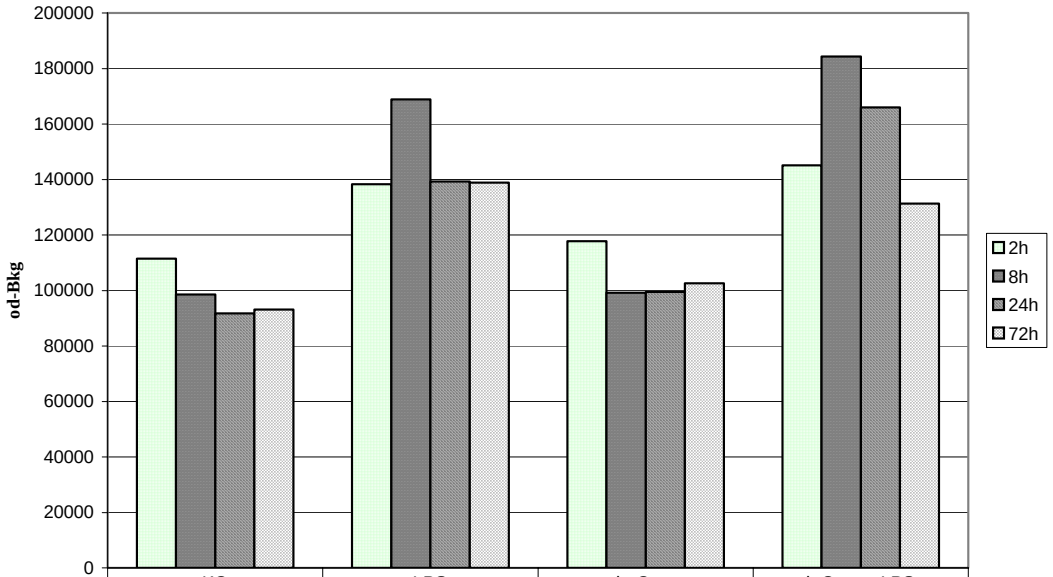


Abb. 4.18 NF-κB-Aktivität humaner Monozyten nach einer Infektionsdauer von 72 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae

KO = Kontrollgruppe, LPS = 2 Stunden LPS-behandelte Monozyten, h. C. p. = Infektion der Monozyten für 72 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae, h. C. p. + LPS = Infektion der Monozyten für 72 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae und zweistündiger LPS-Stimulation

NF-κB Aktivität in humanen Monozyten nach einer Infektionszeit von 2, 8, 24 und 72 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae



	KO	LPS	h. C. p.	h.C. p. + LPS
2h	111524	138309	117781	145104
8h	98603	168910	99136	184371
24h	91690	139297	99493	166003
72h	93112	138876	102625	131348

Diag. 4.4 Darstellung monozytärer NF-κB-Bandenintensitäten, nach Infektion mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae (Abb. 4.17 und Abb. 4.18)

x-Achse: untersuchte Zellgruppen der Versuchsanordnung
y-Achse: Zahlenwerte der untergrundkorrigierten Intensitäten der NF-κB-Banden

Betrachtet man aus Abb. 4.17 und Abb. 4.18, sowie Diag. 4.4 die Intensitäten der NF-κB-Banden der Monozyten, die für 2, 8, 24 oder 72 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydien infiziert worden sind, so ist für alle Zeitreihen folgendes festzustellen: Die unterschiedlich lange infizierten Monozyten (h. C. p.) verzeichnen keinen Anstieg der NF-κB-Aktivität verglichen mit der NF-κB Intensität der unbehandelten Kontrollzellen (KO). Eine Zugabe von LPS (h. C. p + LPS) führt zusätzlich zu einem deutlichen Anstieg der NF-κB-Aktivität, vergleichbar mit der NF-κB-Bandenintensität ausschließlich LPS-stimulierter Monozyten (LPS 2 h).

4.10.2 IκB-α-Aktivitäten

Es erfolgt die Darstellung der IκB-α-Aktivitäten von humanen Monozyten, die mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae in verschiedenen Zeiträumen von 2, 8, 24 und 72 Stunden infiziert wurden.

Die Abb. 4.19 zeigt die IκB-α-Aktivität der Infektionszeiträume von 2 und 24 Stunden und Abb. 4.20 die der 8 und 72 Stunden.

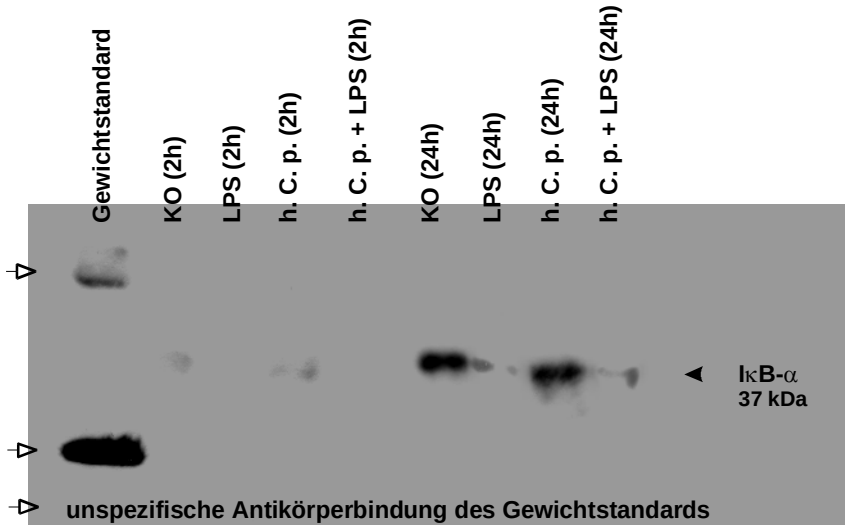


Abb. 4.19 IκB-α-Aktivität in humanen Monozyten nach einem Infektionszeitraum von 2 und 24 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae (Western Blot)

KO = Kontrollgruppe, LPS = 2 Stunden LPS-behandelte Monozyten, h. C. p. = Infektion der Monozyten für 2 bzw. 24 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae,
h. C. p. + LPS = Infektion der Monozyten für 2 bzw. 24 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae und zweistündiger LPS-Stimulation

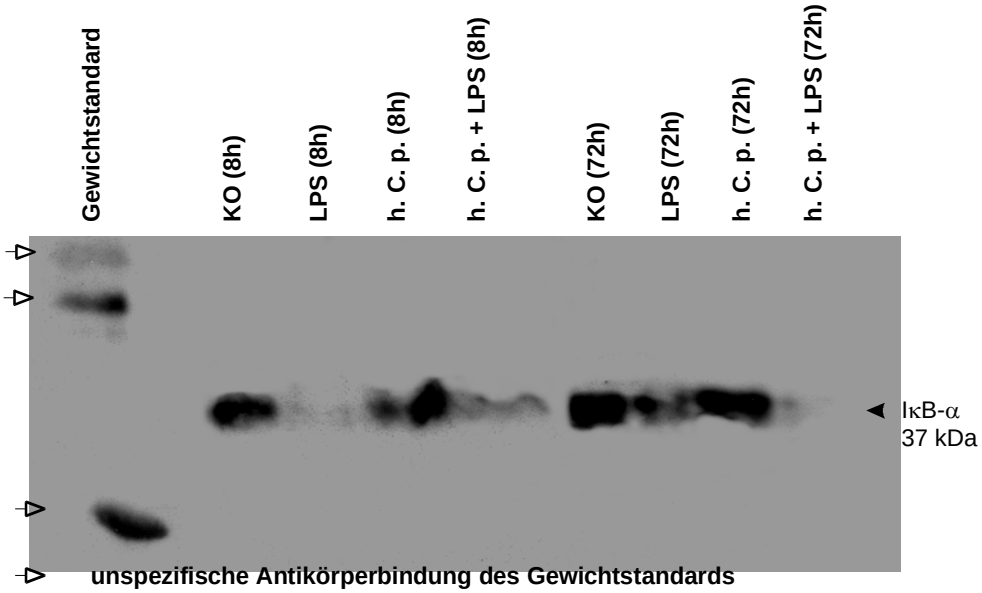


Abb. 4.20 IκB-α-Aktivität in humanen Monozyten nach einem Infektionszeitraum von 8 und 72 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae (Western Blot)

KO = Kontrollgruppe, LPS = 2 Stunden LPS-behandelte Monozyten, h. C. p. = Infektion der Monozyten für 8 bzw. 72 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae,
h. C. p. + LPS = Infektion der Monozyten für 8 bzw. 72 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae und zweistündiger LPS-Stimulation

Die IκB-α-Banden der zweistündigen Versuchsreihe aus Abb. 4.19 zeigen allgemein eine sehr schwache Intensität. Die bei 37 kDa IκB-α-spezifische Bande der Kontrollzellen (KO 24 h) ist vergleichbar mit der Intensitätsausprägung der für 24 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydien infizierten Zellen (h. C. p. 24 h). Ein Zusatz von LPS zur letzt genannten Zellgruppe (h. C. p. + LPS 24 h) führt ebenfalls, wie auch eine ausschließliche Stimulation der Monozyten mit LPS (LPS 2 h) zu einer kaum nachweisbaren IκB-α-Aktivität.

Die Abb. 4.20 veranschaulicht die IκB-α-Banden der achtstündigen Versuchsreihe, in der die Monozyten der Kontrollgruppe (KO 8 h) die stärkste Intensität aufweisen, gefolgt von der IκB-α-Bandenintensität, der für acht Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydien infizierten Zellen (h. C. p. 8 h). Eine ergänzende LPS Stimulation der

Zellen (h. C. p. + LPS 8 h) führt zu einer Abnahme der IκB-α-Bandenintensität. Doch die geringste IκB-α-Aktivität zeigt die alleinige Stimulation der Monozyten mit LPS (LPS 8 h).

Betrachtet man schließlich die IκB-α-Banden der 72-stündigen Versuchsgruppen, so befindet sich hier, die stärkste Intensität verglichen mit den bereits erwähnten Zeitreihen. Vergleichbar mit dem Ergebnis der 24-stündigen Versuchsanordnung, besitzen die Monozyten der Kontrollgruppe (KO 72 h) die stärkste IκB-α-Bandenintensität, gefolgt von der geringeren Intensität, der mit hitzeinaktivierten Chlamydien infizierten Zellen (h. C. p. 72 h). Die IκB-α-Aktivität, der nur mit LPS-stimulierten Monozyten (LPS 72 h) ist deutlich geringer, als die der Kontrollzellen, doch stärker als die schwächsten IκB-α-Aktivität, der zusätzlich zur Chlamydieninfektion LPS-versetzten Zellen (h. C. p. + LPS 72 h).

4.11 Tissue Factor-Expression in humanen Monozyten nach Infektion mit Chlamydia pneumoniae

Untersucht wurde die Auswirkung einer 8- bzw. 72-stündigen in vitro-Infektion von humanen Monozyten mit Chlamydia pneumoniae in Hinsicht auf deren TF-Expression. Die drei Versuche der zwei Zeitreihen bestehen jeweils aus einer Kontrollgruppe, aus LPS behandelten Monozyten, aus Chlamydien infizierten Zellen und aus infizierten Monozyten mit LPS-Zusatz. Die Ergebnisse der Tab. 4.5 und Diag. 4.5 zusammengefasst.

Tab. 4.5 Tissue Factor Expression von humanen Monozyten in [mU] nach einer Infektionsdauer mit Chlamydia pneumoniae von 8 und 72 Stunden

	n1 [mU]	n2 [mU]	n3 [mU]	Mittelwert
8 h KO	40	45	35	40
8 h LPS	320	430	300	350
8 h C. p.	700	680	720	700
8 h C. p. + LPS	860	860	950	890
72 h KO	110	92	92	98
72 h LPS	380	490	490	453
72 h C. p.	380	330	330	347
72 h C. p. + LPS	330	360	380	357

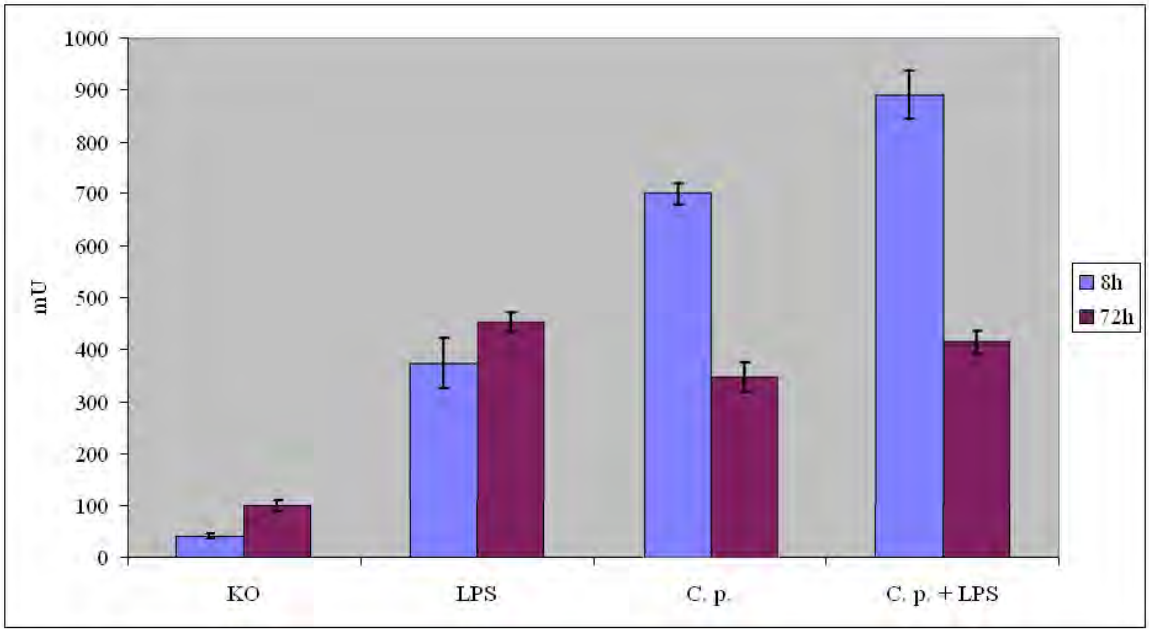
8 h (72 h) KO = unbehandelte Monozyten, Kontrollwert

8 h (72 h) LPS = für 8 Stunden LPS-stimulierte Monozyten

8 h (72 h) C. p. = für 8 (72) Stunden mit Chlamydia pneumoniae infizierte Monozyten

8 h (72 h) C. p. + LPS = für 8 (72) Stunden mit Chlamydia pneumoniae infizierte Monozyten und LPS Stimulation.

n = Anzahl der Versuchsreihen



Diag. 4.5 TF Expression in humanen Monozyten nach einer Infektionszeit mit Chlamydia pneumoniae von 8 bzw. 72 Stunden. Verwendet werden die Mittelwerte, der jeweiligen Versuchsgruppen aus Tab. 4.5

In der 8 Stunden-Zeitreihe ist folgendes beobachtet worden. Die TF-Expression in unbehandelten Zellen weist den niedrigsten Wert auf, gefolgt von dem Wert, der LPS-behandelten Monozyten. Eine achtstündige Infektion der Zellen mit Chlamydia pneumoniae führt zu einem starken Anstieg der TF-Expression, der sogar den Wert der LPS-stimulierten Zellen übersteigt. Eine gleichzeitige Stimulation der infizierten Monozyten mit LPS führt zusätzlich zu einer maximalen Bildung von TF.

Die TF-Werte der 72-stündigen Zeitreihe sind allgemein geringer im Vergleich zu den nach 8 Stunden gemessenen Werten. Nach 72 Stunden zeigen die Kontrollzellen eine erhöhte TF-Basalaktivität verglichen mit dem 8 Stunden Wert, doch bleibt dieser der geringste Wert in seiner Zeitreihe. Die stärkste TF-Expression ergibt sich in den LPS-behandelten Monozyten. Eine 72-stündige Chlamydieninfektion bewirkt eine höhere TF-Bildung als der Kontrollwert, hält sich jedoch unter dem Niveau der LPS-stimulierten Zellen. Eine zusätzliche LPS-Zugabe post infectionem führt zu einer Steigerung der TF-Aktivität, vergleichsweise zu der alleinigen Infektion der Monozyten mit Chlamydia pneumoniae.

5 Diskussion

Der Regelkreislauf von NF-κB und IκB-α steuert die Transkription vieler inflammatorisch aktiver Proteine, die in der Pathogenese der Arteriosklerose diskutiert werden. In der vorliegenden Arbeit werden die Aktivitäten des Transkriptionsfaktors NF-κB, dessen Inhibitor IκB-α sowie die Expression von Tissue Factor in humanen Monozyten/Makrophagen nach in vitro-Infektion mit Chlamydia pneumoniae untersucht. In den Versuchsreihen zeigten sich zeitabhängige Veränderungen der oben beschriebenen Untersuchungsparameter.

Chlamydia pneumoniae wurde anhand vieler seroepidemiologischer, experimenteller und histopathologischer Studien eine Beteiligung an der Pathogenese der Arteriosklerose zugeschrieben (Kaukoranta-Tolvanen et al 1996; Noll 1998; Grayston et al 1999; Ross 1999; Albert 2000; Rosenfeld et al 2000; Kalayoglu et al 2002; Belland et al 2004; Mussa et al 2006; Sessa et al 2009).

Obwohl Chlamydia pneumoniae als auslösender Kofaktor der Arterioskleroseentstehung angesehen wird, ist der Mechanismus über die Initiierung und den Progress der Erkrankung durch Chlamydia pneumoniae Gegenstand kontroverser Diskussionen.

Die Hypothese besagt, dass Chlamydia pneumoniae über die primäre Infektion des respiratorischen Traktes via peripheren Blutmonozyten nach deren Umwandlung in Makrophagen in die endothelial ausgekleidete Gefäßwand disseminiert. Dort könnte Chlamydia pneumoniae durch Initiierung inflammatorischer Prozesse und LDL-Oxidation in den Schaumzellen die Bildung arteriosklerotischer Läsionen begünstigen (Kalayoglu et al 1998; Kalayoglu et al 2000; Rosenfeld et al 2000; Yamaguchi et al 2002).

Tierexperimentelle Untersuchungsergebnisse an Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen bekräftigen die Chlamydienhypothese der Arterioskleroseentstehung (Moazed et al 1997; Moazed et al 1998; Haranaga et al 2001).

Untersuchungen am Menschen zeigen, dass Chlamydia pneumoniae sowohl humane T-Lymphozyten und Monozyten des peripheren Blutes, als auch Endothelzellen der Koronararterien infizieren kann (Gaydos 2000; Maass et al 2000).

Gestützt von der Hypothese einer Beteiligung der Chlamydia pneumoniae an der Genese der Arteriosklerose, untersucht die vorliegende Arbeit, ob eine in vitro-Infektion von humanen Monozyten mit Chlamydia pneumoniae zu einer zeitabhängigen Aktivierung von NF-κB und IκB-α führt. Der Transkriptionsfaktor NF-κB ist aufgrund seiner zentralen Rolle in der Bildung inflammatorischer Zytokine und antiapoptotischer Moleküle Hauptaugenmerk dieser Versuchsreihen.

Die Inkubation der humanen Monozyten mit Chlamydia pneumoniae über einen Zeitraum von 15, 30, 60 und 120 min soll der Frage nachgehen, ob ein kurzfristiger Chlamydia pneumoniae Kontakt zu Monozyten eine NF-κB-Aktivierung auslöst. Die NF-κB-Aktivitäten in Monozyten, die diesem geringen Chlamydieninkubationszeitraum ausgesetzt sind, könnten einen Effekt der NF-κB-Aktivierung über Chlamydienoberflächenproteine, z.B. durch cLPS, widerspiegeln. Die Monozyten dieser Versuchsanordnung, die über einen Zeitraum von 15 bis 120 min mit Chlamydien infiziert wurden, zeigen jedoch keine Zunahme der NF-κB-Aktivität. Die abnehmende IκB-α-Aktivität dieser Zellen wird hingegen bereits ab einem Chlamydien-inkubationszeitraum von 15 min deutlich (Abb. 4.6, Abb. 4.7). Die NF-κB-Aktivierung der LPS-stimulierten Monozyten bestätigt die Aktivierbarkeit der Zellen. Die Monozyten nur dieser Versuchesreihe wurden ohne Zentrifugationsvorgang mit Chlamydia pneumoniae versetzt, um eine kurzweilige Stimulation der Zellen durch den Zentrifugationsvorgang zu vermeiden.

Baer et al. beschreibt eine NF-κB-Aktivierung in Endothelzellen durch Chlamydia pneumoniae, ohne dass eine aktive Infektion der Endothelzellen durch Chlamydia pneumoniae notwendig war. Wahl et al. und Donath et al. untersuchten im Rahmen der Chlamydienhypothese die Aktivierung von NF-κB in einer humanen Monozyten-Zelllinie. Sie fanden eine Aktivierung von NF-κB über 48 Stunden mit einem Maximum bei Stunde eins. Während dieses Zeitraums gab es keine apoptotischen Monozyten, so dass der NF-κB-Aktivierung in Chlamydia pneumoniae infizierten Monozyten ein antiapoptotischer Effekt zugeschrieben wurde. Die Aktivierung von

NF-κB wurde somit als notwendig angesehen, um das Überleben der Chlamydia pneumoniae infizierte Monozyten zu gewährleisten (Wahl et al 2001; Donath et al 2002).

Ähnliche antiapoptotische Ergebnisse von Chlamydia pneumoniae-infizierten HeLa-Zellen beschreibt Fischer et al. Er belegt einen für die Replikation der Chlamydien in der Wirtszelle wichtigen Apoptoseschutz durch die NF-κB-Aktivierung. Diese Untersuchungen würden die Annahme befürworten, dass chlamydieninfizierte-humane Monozyten zum Transport von Chlamydia pneumoniae ins endotheliale Gefäßbett geeignet wären (Fischer et al 2001). Eine methodische Problematik der o. g. Untersuchungen, die eine frühe NF-κB-Aktivierung belegen, könnte sich daraus ergeben, dass Monozyten durch Adhärenz an Zellkultur-Wells zusätzlich aktiviert werden. Viele Aktivierungsparameter der Monozyten erreichen Basalwerte erst nach einer 24-stündigen Zellkultur.

Unsere Untersuchungsergebnisse in humanen Monozyten können keine kurzfristige NF-κB-Aktivierung über einen Infektionszeitraum von 15 bis 120 min bestätigen.

Die verstärkte NF-κB-Aktivierung der Monozyten durch LPS ist bekannt. Der LPS-Zusatz wurde als Positivkontrolle der monozytären Stimulierbarkeit in den hiesigen Versuchsanordnungen verwendet. Die LPS behandelten Monozyten zeigen bereits ab der Wirkzeit von 30 min eine Zunahme der NF-κB-Aktivität mit einem Maximum zwischen 60 und 120 min (Abb. 4.4). In allen Infektionsversuchsreihen zeigt die zweistündige Stimulation der Monozyten mit LPS die stärkste NF-κB-Aktivität. Der Anstieg der NF-κB-Aktivität bei zusätzlicher Gabe von LPS zu den Chlamydia pneumoniae-infizierten Zellen ist somit dem LPS-Effekt zuzuschreiben (Diag. 4.1, Diag. 4.2, Diag. 4.3). Die IκB-α-Aktivität ist bei den LPS-stimulierten Monozyten passend zum NF-κB/IκB-α-Pathway stark vermindert (Abb. 4.5). Die zusätzliche Behandlung der chlamydieninfizierten Monozyten mit LPS ergibt eine IκB-α-Aktivität vergleichbar jener der Kontrollgruppen.

In den Versuchsreihen mit achtstündiger Infektionszeit der humanen Monozyten mit Chlamydia pneumoniae zeigt sich eine NF-κB-Aktivierung, die von einer stark erhöhten Tissue Factor-Aktivität begleitet ist (Abb. 4.10, **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, Diag. 4.5). Die NF-κB-Aktivierung nach acht Stunden ist jedoch geringer als die der LPS-stimulierten Zellen. Nach einem Chlamydieninfektionszeitraum von 72 Stunden zeigt sich ein Abfall der Tissue Factor-Aktivität. Ob die starke Tissue Factor-Aktivierung allein durch die hier gemessene NF-κB-Aktivierung zu erklären ist bleibt fraglich, da Tissue Factor der Regulation weiterer Transkriptionsfaktoren, die diese Induktion mitbewirkt haben könnten, unterliegt.

Nach einer Chlamydieninfektionszeit von 24 Stunden beobachten wir einen NF-κB-Aktivitätsabfall, der auch zur Stunde 72 zu keiner erneuten NF-κB-Aktivierung führt (Abb. 4.12, Diag. 4.2, Abb. 4.14, Diag. 4.3). Die IκB-α-Aktivität in den chlamydieninfizierten Monozyten ist demnach auch zu den Zeitpunkten 24 und 72 Stunden erhöht (Abb. 4.13, Abb. 4.15). Das NF-κB-regulierte Protein Tissue Factor weist parallel zu der NF-κB-Aktivitätsminderung auch einen Aktivitätsabfall zum Infektionszeitpunkt 72 Stunden (Diag. 4.5).

Die Versuchsreihen der Infektionszeiträume von 24 und 72 Stunden sollten einen längerfristigeren Effekt, der möglicherweise durch den Replikationszyklus von Chlamydia pneumoniae bedingt ist, untersuchen. In der vorliegenden Arbeit erfolgt jedoch keine NF-κB-Aktivierung in humanen Monozyten, die über 24 und 72 Stunden mit Chlamydia pneumoniae infiziert wurden.

Es ist bekannt, dass die Adhärenz und Ausbreitung der Monozyten in Kultur die Ausbildung der Monozyten zu Makrophagen induziert und viele zelluläre Rezeptoren hochreguliert. Aus Versuchsreihen mit Infektion von Monozyten durch Chlamydia trachomatis ist bekannt, dass eine Vermehrung der Chlamydien von der Länge der Inkubationszeit in der Zellkultur stark abhängig ist. Erst eine Inkubationszeit von acht Tagen führte in der Untersuchung von Wolf et al. zu einer signifikanten Bildung infektiöser Chlamydien-Elementar bodys (Wolf et al 2005). Unsere Versuchsreihen enden jedoch nach 72 Stunden, so dass anhand dieser These keine Aussage zu einer längerfristigeren Infektion mit Chlamydia pneumoniae und die mögliche NF-κB-Aktivierung getroffen werden kann. Eine längere Versuchsreihe wurde aufgrund der beschränkten Lebensdauer der Monozyten in unserer Kultur nicht durchgeführt.

Aufgrund der Datenlage stellt sich die Frage, ob eine Chlamydia pneumoniae-Replikation zur Zellstimulation notwendig ist, oder ob Oberflächenproteine der Chlamydien für eine NF-κB-Aktivierung ausreichend sind. Baer et al. konnte zeigen, dass Chlamydia Heat shock protein 60 (cHSP60) zu einer NF-κB-Aktivierung in Schweineendothelzellen führt. Durch Hitzeinaktivierungsversuche der Chlamydia pneumoniae bei 100 °C wurde das hitzeresistente Chlamydien-LPS nicht zerstört. Die Hitzeeinwirkung zerstört jedoch die Replikationsfähigkeit der Chlamydien. Diese Endothelzellen hatten eine begrenzte gesteigerte NF-κB-Aktivität nach Infektion mit hitzeinaktivierten Chlamydien über vier bis sechs Stunden. Danach war nach 24 Stunden keine erhöhte NF-κB-Aktivität mehr nachweisbar.

Auch andere Oberflächenproteine wie Major outer membrane protein (MOMP), cHSP60, cLPS führen zur Stimulation von Makrophagen und zur Oxidation von LDL, Mechanismen die eine pathogenetisch entscheidende Rolle in der Arteriosklerosebildung spielen (Baer et al 2003).

In den hiesigen Untersuchungen könnten demnach die NF-κB-Aktivierungen nach achtstündiger Infektionszeit mit Chlamydia pneumoniae dem Effekt durch Chlamydien-Oberflächenproteine zugeschrieben werden.

Um die Frage zu klären, ob hitzeinaktivierte, nicht replikationsfähige Chlamydien eine NF-κB-Aktivität induzieren können, wurden Infektionsversuchsreihen mit hitzeinaktivierten Chlamydien über 2, 8, 24 und 72 Stunden durchgeführt. Diese Versuchsreihen zeigen jedoch keine NF-κB/IκB-α-Aktivierungen durch hitzeinaktivierte Chlamydia pneumoniae (Diag. 4.4). Diese Ergebnisse in humanen Monozyten decken sich nicht mit denen von Baer et al. beschriebenen Untersuchungen in Schweineendothelzellen.

Die in der Literatur beschriebenen Studien, die der Chlamydienhypothese nachgehen, untersuchen sowohl die Replikationsfähigkeit von Chlamydia pneumoniae in kultivierten humanen peripherer Blutmonozyten, als auch eine mögliche Degradation der Monozyten durch die Chlamydia pneumoniae Infektion. Wolf et al. zeigt in seinen Untersuchungen, dass Chlamydia pneumoniae Bakterien in humanen Monozyten nicht replikationsfähig sind, da diese in der Wirtszelle durch lysosomale Lyse degradiert werden (Wolf et al 2005).

Die Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit mit Chlamydia pneumoniae-Infektionen über einen Zeitraum von 24 und 72 Stunden zeigen keine NF-κB-Aktivierung. Eine mögliche Erklärung wäre die von Wolf beschriebene Instabilität von Chlamydia pneumoniae-LPS im zeitlichen Verlauf. Dadurch war in dessen Versuchen nach 120 Stunden kein Chlamydia pneumoniae-LPS mehr nachweisbar.

Unter der Vorstellung einer Replikationshemmung der Chlamydien durch Inkubation mit dem Proteinsynthesehemmer Tetrazyklin wurden Versuchreihen, wie in den Abb. 4.10, Abb. 4.12, Abb. 4.14 dargestellt, angelegt. Über einen Zeitraum von 2, 8 bzw. 24 Stunden ergibt sich kein Abfall der NF-κB-Aktivität und kein Anstieg der IκB-α-Aktivität in Chlamydia pneumoniae-infizierten Monozyten, die mit Tetrazyklin versetzt wurden. Ein geringer NF-κB-Aktivitätsabfall wird in den über 72 Stunden mit Chlamydia pneumoniae-infizierten Monozyten, die mit Tetrazyklin versetzt werden, beobachtet. Passend dazu zeigt sich eine stärkere IκB-α-Aktivität . Es bleibt jedoch fraglich, ob dieser geringe NF-κB-Aktivitätsabfall durch eine Tetrazyklin bedingte Proteinsynthesehemmung verursacht werden kann.

Die bisher in der Literatur beschriebenen in vivo Antibiotikastudien ergeben keine positive Auswirkung einer Makrolidtherapie auf die Vorbeugung von Arteriosklerose. Die negativen Ergebnisse könnten u.a. durch die komplexe Pathobiologie der Chlamydieninfektion erklärt werden. Eine Chlamydia pneumoniae-Infektion könnte einen direkten schädigenden Effekt an der Arterienwand bewirken oder andere inflammatorische oder thrombotische Prozesse triggern, die nicht antibiotikasensibel sind.

Die hier gewählten in vitro-Infektionszeiträume sind kurz gemessen am Lebenszyklus der Chlamydia pneumoniae. Chlamydia pneumoniae gehört zu den humanen Pathogenen, die intrazellulär lange persistieren können. Die fehlende längerfristigere Aktivierung von NF-κB dieser Versuchsreihen könnte auf einen zu kurzen Infektionszeitraum zurückzuführen sein. Da Chlamydien on vivo länger überleben, wäre ein in vitro-Versuchsaufbau mit Infektionszeiten länger als 72 Stunden geeignet, um längerfristige NF-κB/IκB-α-Aktivitätsveränderungen zu untersuchen.

Andererseits wird von Stassen et al. eine inflammatorische Arteriosklerosehypothese favorisiert, die von einer über dem Infektionszeitraum des Pathogens erhaltene immunologische Stimulation unterhalten wird (Stassen et al 2008). Hierbei kann ein kurzzeitiger Pathogenkontakt zur Immunstimulation führen. Die Expression von Toll-like receptors (TLR) durch immunologisch aktive Zellen und die Stimulation von TLR durch Pathogen-assoziierte Moleküle (PAMPs) kann zur Bildung einer Reihe von inflammatorischen Arteriosklerosеplaque-fördernden Zytokinen führen. Versuchsreihen ergaben, dass auch transient vorhandene Pathogene ausreichend sind, um die TLR-Expression auch über die Infektionszeit hinaus zu steigern (Stassen et al 2008). Inwiefern dieser Mechanismus auch für Chlamydia pneumoniae zutreffen könnte, ist bisher nicht untersucht.

Die Literatur diskutiert die Chlamydienhypothese und den Zusammenhang zwischen Nachweis von Chlamydien-DNA in peripheren humanen Monozyten und der Atherombildung kontrovers (Ieven et al 2005).

Die Ätiologie der Arteriosklerose ist multifaktoriell, dementsprechend könnten weitere Versuchsreihen zielführend sein, z.B. durch Verwendung humaner Monozyten von Patienten mit Hypercholesterinämie oder Patienten mit anderen Risikofaktoren für Arteriosklerose. Eine Verwendung von höheren Chlamydien- Infektionskonzentrationen in vitro könnte deutlichere inflammatorische Effekte aufzeigen.

Diskutiert wird, ob eine Reinfektion mit Chlamydia pneumoniae das Arterioskleroserisiko erhöht. Hierbei könnten Monozyten von Probanden mit hohen Chlamydia pneumoniae Antikörpertitern für die in vitro-Versuchsreihen verwendet werden.

Ob und über welchem Infektionszeitraum Chlamydia pneumoniae arteriosklerotische Veränderungen ursächlich beeinflussen kann ist auch heutzutage noch unklar.

Die Infektionszeiträume in dieser Arbeit sind variiert worden, um kurzfristige und längerfristige Auswirkung einer Chlamydia pneumoniae Infektion auf die Monozytenaktivierung zu beurteilen. Die aktuelle Arbeit ergibt nur in den Versuchsreihen mit achtstündiger Infektionszeit der humanen Monozyten mit Chlamydia pneumoniae eine NF-κB-Aktivierung, die von einer stark erhöhten Tissue Factor-Aktivität begleitet wird. Die Tissue Factor-Genexpression unterliegt u.a. der

Kontrolle des Transkriptionsfaktors NF-κB. Tissue Factor kommt eine entscheidende Rolle in der Erhaltung der Hämostase und Thrombusbildung zu.

Ein eindeutiger Effekt von Tetrazyklin auf die NF-κB/IκB-α-Aktivierung ist nicht zu verzeichnen. Die Versuchsreihen mit hitzeinaktivierten, nicht replikationsfähigen Chlamydien zeigen keine NF-κB/IκB-α-Aktivierung. In der Literatur werden weitere proliferative Signalkaskaden beschrieben, die durch eine Interaktion von Chlamydia pneumoniae mit den Wirtszellen ausgelöst werden. Signalkaskaden die über andere Signalwege als die der NF-κB-Aktivierung einhergehen und welche inflammatorische Prozesse auslösen (Kern et al 2009).

In den späten 70-iger Jahren wurde die Infektionshypothese als Mitbeteiligung in der Entwicklung der Arteriosklerose postuliert. Anhand von seroepidemiologischen Daten, Tierversuchen und histopathologischen Aufarbeitungen von arteriosklerotischen Plaques wurde Chlamydia pneumoniae in Assoziation mit Arteriosklerose gebracht. Einige Molekularmechanismen über eine Verbindung von Chlamydia pneumoniae zur Arterioskleroseentstehung wurden diskutiert. Dennoch haben groß angelegte randomisierte, prospektive Studien zur sekundären Prävention von Arteriosklerose und KHK durch antibiotische Therapie von Chlamydia pneumoniae keinen Effekt gezeigt (Ieven et al 2005; Kuppuswamy et al 2006; Stassen et al 2008).

Die Datenlage ist weiterhin kontrovers, es bedarf weiterer Überlegungen und Untersuchungen hinsichtlich der ätiologischen Faktoren der Arteriosklerose.

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 EMSA

Die Interaktion von Proteinen mit der DNA ist wichtige Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der zellulären Funktionen, wie z.B. die Transkription. Gel Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) ist eine Untersuchungsmethode, die solche Protein-DNA-Interaktionen darstellt und wurde zur Ermittlung der NF-κB-Aktivität der im Ergebnisteil zusammengefassten Versuche angewandt. EMSA ermöglicht sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Auswertung der NF-κB-Aktivität in den untersuchten humanen Monozyten. Dies wird dadurch erreicht, dass die Protein-DNA-Komplexe elektrophoretisch von der freien, ungebundenen DNA und den Proteinkomponenten getrennt werden. Dabei bleibt die Menge des untersuchten Proteins, wie in diesem Falle NF-κB, im Gel erhalten und reflektiert die ursprüngliche Quantität an Protein im Zelllysat. Um optimale Bedingungen für die Durchführung von EMSA zu schaffen, sind einige Faktoren zu beachten, die eine Auswirkung auf Halbwertszeit und Mobilität des NF-κB/DNA-Oligonukleotidkomplexes haben (Fried 1989).

So ist die Gel-Vorlaufzeit von Bedeutung, um eine gleichmäßige Weiterleitung der Elektrophoreseproben zu gewährleisten. Die Durchführung der Elektrophorese unter niedriger Spannung verringert den hierbei eintretenden Temperaturanstieg und verhindert somit eine Degradierung der Proteine und Dissoziation des NF-κB/DNA-Komplexes.

Die Pufferzusammensetzung ist entscheidend für die Halbwertszeit des NF-κB/DNA-Komplexes. Ebenfalls trägt die Konzentration des nicht denaturierenden Polyamidacrylgels, je nach Größe und Ladung der untersuchten Proteine, zur Stabilität dieser Komplexe bei. Zusätzlich zu den Salzen und Pufferreagenzien werden den Puffern Moleküle zugesetzt, wie z.B. NP 40, DTT oder Glycerol, die eine Protein-DNA-Komplexierung stabilisieren.

Die Mobilität des NF-κB/DNA-Komplexes wird beeinflusst von der Anzahl dieser Molekülkomplexe. Folglich sind bestimmte Konzentrationen des Proteinlysats ausgewählt worden (Schreck et al 1994; Staal et al 1995).

Bei der Proteinextraktion sind die Zugabe von Proteaseinhibitoren und eine Temperatur von +4 °C erforderlich, da ansonsten die zellulären Proteasen die Proteine degradieren. Für die Proteinausbeute ist die gute Dispersion der Zellpalets von Bedeutung (Dignam et al 1983; Kerr 1995).

Die radioaktive DNA-Oligonukleotidmarkierung wird durch die T4-polynukleotid Kinase katalysiert, indem es den Transfer des ATP γ Phosphats auf die 5´-Hydroxyl Gruppe der DNA erleichtert. Die Qualität der radioaktiv markierten DNA ist weiterhin für saubere Elektrophoresebanden von Bedeutung und lässt sich durch Entfernen von nicht markierten DNA-Nukleotiden und Proteinen in einer Spin-Column-Chromatographie mittels Sephadexsäule verbessern.

Der Bindungspuffer wird, um eine Interaktion des Proteins NF-κB mit der radioaktiv markierten DNA zu ermöglichen, dem zu untersuchenden Protein zugesetzt. Die unspezifische DNA konkurriert mit der spezifischen radioaktiv markierten DNA um die Bindestelle an dem Protein. Diese unspezifische DNA muss entfernt werden, da sonst das Protein aufgrund einer geänderten Komplexgröße das Elektrophoresegel nicht durchdringen kann. Zum Abfangen dieser unspezifischen, kompetitiven DNA wird dem Bindungspuffer Calf Thymus DNA und poly (dI-dC) zugesetzt (Dignam et al 1983; Kerr 1995).

Für die Darstellung der DNA-bindenden NF-κB-Aktivität im gesamt Zelllysat wird folgende doppelsträngige Oligonukleotidsequenz verwendet:

5`-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3`

3`-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5´

Die Stimulation der Zelle, die eine Dissoziation des IκB-α vom NF-κB bewirkt, verursacht eine Freisetzung hoher Mengen von NF-κB. Dieses NF-κB ist nun befähigt, mit der für sich spezifischen DNA-Sequenz zu reagieren. Somit liefert es auch das Substrat für die Darstellung im EMSA.

Ein Supershift Assay wurde, wie in den Abbildungen 4.1 und 4.2. dargestellt, durchgeführt. Damit wird die Validität des EMSA´s bezüglich der NF-κB-Elektrophoresebanden überprüft. Es wird festgestellt, ob die dargestellten Banden auch tatsächlich einen Rückschluss speziell auf die NF-κB-Aktivität erlauben.

Die Komplexierung der Antikörper p50 bzw. p65 mit der NF-κB-Untereinheit p50 bzw. p65 führt zu einer Abnahme der aktivierten NF-κB-Konzentration im Proteinlysat von LPS-stimulierten Monozyten und ergibt somit eine schwächere Bandenintensität. Die Intensität der NF-κB-Banden nimmt folglich mit steigenden p50 bzw. p65 Antikörperkonzentrationen von 2 µg/ml (1:1.000), 4 µg/ml (1:500), 20 µg/ml (1:100) ständig ab.

Da die Intensität der EMSA-Banden auf die Quantität des aktiven NF-κB-Proteins schließen lässt, deutet eine Intensitätsabnahme bedingt durch diese Antikörper-NF-κB-Interaktion auf eine Abnahme der reaktionsfähigen aktivierten NF-κB Komplexe hin. Anhand der Abbildungen 4.1 und 4.2 ist somit festzustellen, dass es sich bei den in EMSA dargestellten Elektrophoresebanden um NF-κB-spezifische Banden handelt.

Die Anwendung des Supershift Assays zur Klärung der oben dargestellten Problematik wird allgemein in der Literatur postuliert (Schreck et al 1994; Caligiuri et al 2001).

Die in Abbildung 4.3 dargestellte kompetitive Hemmungsreaktion wird angewandt, um die Spezifität des verwendeten NF-κB-Oligonukleotids bezüglich seiner ausschließlichen NF-κB-Affinität und Komplexierungsfähigkeit zu untersuchen. Hierbei unterscheidet man zwei Arten der kompetitiven Hemmung:

- spezifische kompetitive Hemmungsreaktion
- unspezifische kompetitive Hemmungsreaktion

Bei der spezifischen kompetitiven Hemmungsreaktion wird das Zellproteinlysat von LPS-stimulierten Zellen mit radioaktiv markierten γ^{33}-P-NF-κB-Oligonukleotiden und zusätzlich mit nicht radioaktiv markierten NF-κB-Oligonukleotiden im Überschuss inkubiert. Die radioaktiv markierten und die unmarkierten NF-κB-Oligonukleotide konkurrieren um die Bindungsstellen an dem NF-κB. Die überschüssigen, nicht radioaktiv markierten NF-κB-Oligonukleotide übernehmen den größten Anteil an der NF-κB-Komplexierung. Folglich nimmt die Menge radioaktiv markierten NF-κB ab und führt zu einer Abnahme der NF-κB-Elektrophoresebandenintensität (Abb. 4.3).

Die unspezifische kompetitive Hemmung erfolgt nach dem oben genanten Prinzip jedoch mit der Unterscheidung, dass NF-κB-unspezifische Oligonukleotide, die

ebenfalls nicht radioaktiv markiert sind, verwendet werden. Diese können nicht mit den radioaktiv markierten NF-κB-Oligonukleotiden um die Bindung an NF-κB konkurrieren und vermögen daher nicht die Intensität der NF-κB-Elektrophoresebande zu beeinflussen.

Gestützt durch beide Beobachtungen aus Abb. 4.3 wurde der Spezifitätsnachweis des verwendeten NF-κB-Oligonukleotids erbracht.

Die hier dargestellte Vorgehensweise zur Durchführung der kompetitiven Hemmungsreaktion, vor der Anwendung eines spezifischen Oligonukleotids zum Nachweis eines DNA-bindenden Proteins, wird in der Literatur empfohlen (Schreck et al 1994).

5.1.2 Western Blot

Die Methode des Western Blots ermöglicht es, zelluläre Proteine unter Mitwirkung von spezifischen Antikörpern darzustellen. Diese Methode wurde ausgewählt, um die IκB-α-Aktivität aus dem Gesamtzelllysat von Monozyten aus den Versuchreihen dieser Arbeit zu untersuchen.

Vorgänge, die bei der Durchführung des Western Blots beachtet werden müssen, werden im Folgenden ursächlich erklärt:

Von der zu untersuchenden Proteingröße hängt die Wahl der Polyacrylamid-konzentration des Gels ab, denn diese bestimmt die Porengröße des Gels. Je höher die Konzentration, desto geringer die Porengröße. Die Poren des Gels sollten ungefähr die Größe der darzustellenden Proteine haben. Dadurch werden größere Moleküle im Gel zurückgehalten, kleinere Moleküle haben freien Durchfluss. Durch die Ladungsdifferenzen während der Elektrophorese wandern die Proteinmoleküle durch das Gel.

Die im SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteine werden durchs Blotten auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Ferner wird neben den Proteinen ein Gewichtstandard auf das Gel aufgetragen, das aus farblich markierten Proteinen von unterschiedlichem Molekulargewicht besteht. Diese dienen als Erkennungsmarke für die Molekulargröße der im Western Blot dargestellten Proteinbanden. Die Effizienz des

Proteintransfers ist von der angewandten Zeit, Spannung, Porengröße des Gels, Polyacrylamidkonzentration und Dicke des Gels abhängig. Die Konzentration des Transferpuffers spielt eine Rolle, denn ein Zusatz von Methanol verbessert die Proteinreaktionsfähigkeit mit der Membran.

Die immobilisierten Proteine werden mit dem proteinspezifischen Primärantikörper versetzt, gefolgt von dem Sekundärantikörper, welcher Spezifität für den Primärantikörper besitzt. Vor Zusatz des jeweiligen Antikörpers müssen unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Blotmembran geblockt werden. Dies geschieht durch Behandlung der Membran mit einer fünfprozentigen Molkelösung.

Die Proteine werden anschließend durch Chemilumineszenz-Reagenzien, die mit dem Sekundärantikörper reagieren, sichtbar gemacht.

Die zu verwendende Antikörperkonzentration wird durch Verdünnungsreihen optimiert, so dass die Spezifität der Protein-Antikörperbindungsreaktion erhöht wird und der Aktivitätshintergrund minimal gehalten wird (Hoefer 1994).

Die im Ergebnisteil dargestellten Western Blots zeigen IκB-α-spezifische Banden von einer Proteingröße von 37 kDa. Einige unspezifische Banden am Rande des Western Blots deuten auf eine unspezifische Reaktion der Antikörper mit den Proteinen des Gewichtstandards.

Das zytoplasmatische Protein IκB-α befindet sich in unterschiedlichen Assoziationsformen zu dem NF-κB-Protein (Abb. 1.7 und Kap. 1.6).

Es ergibt sich die Frage, in welchem Stadium des IκB-α-Kreislaufs das Protein im Western Blot dargestellt wird. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, führt die Stimulation der Zelle zu einer Dissoziation des IκB-α vom NF-κB-Protein, welches anschließend umgehend von Proteinasen abgebaut wird. Dieses IκB-α-Protein wird vom Western Blot nicht erfasst. Die NF-κB-Aktivierung führt zur vermehrten Expression des IκB-α, das somit neu gebildet wird und der Zelle zur erneuten Interaktion mit NF-κB zur Verfügung steht. Dieses freie, ungebundene IκB-α-Protein der Molekulargröße von 37 kDa steht der Antikörpererkennung zur Verfügung. Da der verwendete Antikörper nicht an Komplexe unterschiedlicher Molekulargröße binden kann, kann er folglich nicht mit dem höher molekulargewichtigen NF-κB/IκB-α-Komplex interagieren.

6 Zusammenfassung

In den späten 70-iger Jahren wurde die Infektionshypothese in der Entwicklung der Arteriosklerose postuliert. Anhand von seroepidemiologischen Daten, Tierversuchen und histopathologischen Aufarbeitungen von arteriosklerotischen Plaques wird Chlamydia pneumoniae in Assoziation mit Arteriosklerose gebracht. Einige Molekularmechanismen über eine Verbindung von Chlamydia pneumoniae zur Arterioskleroseentstehung werden diskutiert. Dennoch haben groß angelegte randomisierte und prospektive Studien zur sekundären Prävention von Arteriosklerose und KHK durch antibiotische Therapie von Chlamydia pneumoniae keinen Effekt gezeigt.

Gestützt von der Hypothese einer Beteiligung der Chlamydia pneumoniae an der Genese der Arteriosklerose, ist es Ziel dieser in vitro-Arbeit eine zeitabhängige Aktivierung von NF-κB und IκB-α in humanen Monozyten nach Infektion mit Chlamydia pneumoniae zu untersuchen. Der Transkriptionsfaktor NF-κB ist aufgrund seiner zentralen Rolle in der Expression inflammatorischer Zytokine Hauptaugenmerk der Versuchsreihen.

Die Infektionszeiträume in dieser Arbeit sind von zwei bis 72 Stunden variiert worden, um kurzfristige und längerfristige Auswirkung einer Chlamydia pneumoniae Infektion auf die Monozytenaktivierung zu beurteilen. Die aktuelle Arbeit ergibt nur in den Versuchsreihen mit achtstündigem Infektionszeitraum der humanen Monozyten mit Chlamydia pneumoniae eine NF-κB-Aktivierung, die von einer erhöhten TF-Aktivität begleitet wird. Ob die TF-Aktivierung allein durch die hier gemessene NF-κB-Aktivierung zu erklären ist bleibt fraglich, da TF der Regulation weiterer Transkriptionsfaktoren, die diese Induktion mitbewirkt haben könnten, unterliegt. TF kommt eine entscheidende Rolle in der Erhaltung der Hämostase, Thrombusbildung und in der Pathogenese der Arteriosklerose zu. Ein eindeutiger in vitro-Effekt von Tetrazyklin auf die NF-κB/IκB-α-Aktivierung von Chlamydia pneumoniae infizierten Monozyten ist nicht zu erkennen. Die Versuchsreihen mit hitzeinaktivierten, nicht replikationsfähigen Chlamydien zeigen keine NF-κB/IκB-α-Aktivierung.

Aufgrund der kontroversen aktuellen Literaturdatenlage und der Ergebnisse dieser Arbeit bedarf es weiterer Überlegungen und Untersuchungen zur Klärung der ätiologischen Arteriosklerose risikofaktoren.

The hypothesis of an infectious cause of atherosclerosis was born in the late seventies. Based on seroepidemiological data, experimental animal and human studies and histopathological investigations of atherosclerotic plaque Chlamydia pneumoniae was associated with the development of atherosclerosis. Several molecular mechanisms by which Chlamydia pneumoniae could potentially induce and support atherosclerosis are postulated. Nevertheless large randomised, prospective antibiotica studies for secondary prevention of atherosclerosis in patients with cardiovascular disease could not show a protective effect by antibiotic treatment of Chlamydia pneumoniae.

Considering an involvement of Chlamydia pneumoniae in the genesis of atherosclerosis, we investigate a time dependent in vitro NF-κB and IκB-α activation in Chlamydia pneumoniae infected human monocytes. The transcription factor NF-κB plays a crucial role in the expression of proinflammatory cytokines and is therefore focus of these studies. The time of infection is varied from 2 to 72 hours in order to investigate short and longterm effects upon NF-κB activation in human monocytes infected with Chlamydia pneumoniae.

These in vitro experiments show only an increased NF-κB activation in human monocytes after an eight hour infection with Chlamydia pneumoniae. The investigation of the NF-κB triggered expression of the TF protein in Chlamydia pneumoniae infected human monocytes resulted also in a maximum of expression after eight hour infection time. It is questionable, if the increased TF activation is induced by the here measured NF-κB activity because the regulation of the TF gene expression relies upon several other transcription factors that migth have affected this induction. TF is substantially involved in the pathogenesis of atherosclerosis. A distinct in vitro effect of Tetracyclin in Chlamydia pneumoniae infected monocytes upon NF-κB/IκB-α activation could not be shown. The infection with heat inactivated Chlamydia pneumoniae did not lead to a NF-κB activation or determining IκB-α alteration. Due to the controversial current literature data and the results of this study there is more need for scientific reflections and investigations in order to explore the etiological factors of atherosclerosis.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACADEMIC	Azithromycin in Coronary Artery Disease: Elimination of Myocardial Infection with Chlamydia
ACES	Azithromycin and coronary events study
ANTIBIO	Antibiotic therapy after acute myokardial infarction study
AP-1	Activator protein 1
ApoE -/-	Apolipoprotein E deficient mouse
APS	Ammoniumperoxidsulfatlösung
ARD	Ankyrin repeat domain
ATP	Adenosintriphosphat
AZACS	Azithromycin on recurrent ischaemic events in patient with acute coronary syndromes
Bkg	Background
C. p.	Chlamydia pneumoniae
chsp60	Chlamydien heat shock protein
CLARIFY	Clarythromycin in acute coronary syndrome patients in Finland
cLPS	Chlamydien-Lipopolysaccharid
CMV	Cytomegalievirus
CO_2	Kohlendioxid
cpm	Character per minute (Zerfälle pro Minute)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	D2-Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EB	Elementar body

Egr-1	Early growth response Gene, humaner Transkriptionsfaktor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
h	Stunde
HBSS	Hanks balanced salt solution
HL-Zellen	Hodgkin Lymphoma cell line
HSP	Heat shock proteins
i. C. p.	hitzeinaktivierte Chlamydia pneumoniae
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IgA, M, G	Immunglobuline A, M, G
IKK	IκB-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IκB-α	I kappa B
kDA	Kilodalton
KHK	Koronare Herzerkrankung
KO	Kontrolle
LDL Rezeptor -/-	Lipoprotein-receptor deficient mouse
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MIF	Micro-immuno-fluorescence Test
min	Minuten
M-SFM	Makrophagen-Serumfreien-Medium
mU	Milliunits
NF-κB	Nuklear Faktor kappa B
NLS	nuclear location signal
NP 40	Nonidet P-40 Zell Lyse Puffer

NRD	NF-κB/Rel/dorsal domain
od	optische Dichte
OMP	Outer membrane proteins
p50 AK	p50 Antikörper
p65 AK	p65 Antikörper
PAGE	Polyacrylamidgel
PAMP	Pathogen-assoziierte Moleküle
PBS	Phosphate buffered Saline
PCA	Procoagulatory clotting assay
PCR	Polymerase chain reaction
PROVE-IT	Pravastatin or Atorvastatin evaluation and infection therapy
RB	Reticular body
Rel	Reticuloendotheliosis
RHD	Rel-homology domain
ROXIS	Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgel
SP-1	humaner Transkriptionsfaktor
spezif. KH	Spezifische kompetitive Hemmungsreaktion
STAMINA	South Thames trial of antibiotics in myocardial infarction and unstable angina
T.	Tetrazyklin
TE buffer	TRIS/EDTA buffer
TF	Tissue factor
THP-1	Human acute monocytic leukemia cell line

TLR	Toll-like receptors
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
unspezif. KH	unspezifische kompetitive Hemmungsreaktion
V	Volt
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
WCE Puffer	White-Cell-Extraction Buffer
WIZARD	Weekly intervention with Zithromax for Atherosclerosis study

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Arteriosklerotische Plaquebildung, inflammatorische Signale ausgehend von geschädigtem Endothel, modifiziert nach Milioti (Milioti et al 2008) 4

Abb. 1.2 Antigen induzierte Immunmodulation in der Pathogenese der Arteriosklerose, modifiziert nach Milioti (Milioti et al 2008) 5

Abb. 1.3 Replikationszyklus von Chlamydia pneumoniae, modifiziert nach Campbell und Kuo (Campbell et al 2004) 7

Abb. 1.4 Replikationszyklus von Chlamydia pneumoniae, elektronenmikroskopische Darstellung, modifiziert nach Belland et al. (Belland et al 2004) 8

Abb. 1.5 Modell der Schaumzellbildung in der Pathogenese von Arteriosklerose 10

Abb. 1.6 Transmissions-Elektronenmikroskopie von Chlamydia pneumoniae infizierten HL Zellen und Monozyten 72 h post infectionem, Abb. modifiziert nach Airenne (Airenne et al 1999) 17

Abb. 1.7 Darstellung der humanen Rel/NF-κB, IκB-Proteine, modifiziert nach Lee et al. (Lee et al 1998) 21

Abb. 1.8 Proteinstruktur und funktionelle Einheiten von RelA(p65) und NF-κB1(p50) modifiziert nach Grimm et al. (Grimm et al 1993) 23

Abb. 1.9 IκB-α Proteinstrukturen in ihrer Funktion als NF-κB-Inhibitor, modifiziert nach Baeuerle et al. (Baeuerle 1998) 24

Abb. 1.10 Steuerung der NF-κB-Aktivierung durch IκB-α und Proteinkinasen, modifiziert nach Verma (Verma et al 1995) 26

Abb. 3.1 Versuchsandordnung der zeitabhängigen Infektion humaner Makrophagen mit Chlamydia pneumoniae (Abkürzungen siehe Legende). 44

Abb. 3.2	Versuchsandordnung der zeitabhängigen Infektion humaner Makrophagen mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae (Abkürzungen siehe Legende)	45
Abb. 4.1	Supershift Assay mit Antikörper p50 in verschiedenen Konzentrationen (EMSA)	57
Abb. 4.2	Supershift Assay mit Antikörper p65 in verschiedenen Konzentrationen (EMSA)	58
Abb. 4.3	Spezifitätsnachweis des verwendeten NF-κB-Oligonukleotids (EMSA)	59
Abb. 4.4	Zeitverlauf der NF-κB-Aktivität von LPS-stimulierten humanen Monozyten (EMSA)	60
Abb. 4.5	Zeitverlauf der IκB-α–Aktivität von LPS-behandelten humanen Monozyten (Western Blot)	62
Abb. 4.6	NF-κB-Aktivität nach Infektion humaner Monozyten mit Chlamydia pneumoniae - eine Zeitreihe (EMSA)	63
Abb. 4.7	IκB-α-Aktivität in humanen Monozyten im Zeitverlauf nach einer Chlamydia pneumoniae Infektion (Western Blot)	64
Abb. 4.8	NF-κB-Aktivität humaner Monozyten nach einer Infektionsdauer mit Chlamydia pneumoniae von zwei Stunden (EMSA)	66
Abb. 4.9	IκB-α-Aktivität in humanen Monozyten nach einer Infektion mit Chlamydia pneumoniae von zwei Stunden (Western Blot)	68
Abb. 4.10	NF-κB-Aktivität humaner Monozyten nach einer Infektionsdauer mit Chlamydia pneumoniae von acht Stunden (EMSA)	70
Abb. 4.11	IκB-α-Aktivität in humanen Monozyten nach einer Infektion mit Chlamydia pneumoniae von acht Stunden (Western Blot)	73
Abb. 4.12	NF-κB-Aktivität humaner Monozyten nach einer Infektionsdauer mit Chlamydia pneumoniae von 24 Stunden (EMSA)	75

Abb. 4.13 IκB-α-Aktivität in humanen Monozyten nach einer Infektion mit Chlamydia pneumoniae von 24 Stunden (Western Blot) 78

Abb. 4.14 NF-κB-Aktivität humaner Monozyten nach einer Infektionsdauer mit Chlamydia pneumoniae von 72 Stunden (EMSA) 80

Abb. 4.15 IκB-α Aktivität in humanen Monozyten nach einer Infektion mit Chlamydia pneumoniae von 72 Stunden (Western Blot) 82

Abb. 4.16 Vergleich der NF-κB-Expression in Monozyten nach Infektion mit Chlamydia pneumoniae bzw. Chlamydia pneumoniae plus LPS über 8, 24 und 72 Stunden (zusammenfassender Vergleich). 84

Abb. 4.17 NF-κB-Aktivität humaner Monozyten nach einer Infektionsdauer von 2, 8 und 24 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae 85

Abb. 4.18 NF-κB-Aktivität humaner Monozyten nach einer Infektionsdauer von 72 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae 86

Abb. 4.19 IκB-α-Aktivität in humanen Monozyten nach einem Infektionszeitraum von 2 und 24 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae (Western Blot) 88

Abb. 4.20 IκB-α-Aktivität in humanen Monozyten nach einem Infektionszeitraum von 8 und 72 Stunden mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae (Western Blot) 89

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Antibiotika Studien bei Patienten mit KHK. Tabelle aus Andraws et al. (Andraws et al 2005)	15
Tab. 1.2	NF-κB-regulierte Genexpression	28
Tab. 1.3	NF-κB-Aktivierung durch Mediatoren	29
Tab. 3.1	Zusammensetzung des Western Blot Gels	53
Tab. 4.1	Überblick der IκB-α-Bandenintensitäten der Abb. 4.7 C. p. 15 min > C. p. 60 min > C. p. 120 min > C. p. 30 min	65
Tab. 4.2	Überblick der IκB-α-Bandenintensitäten der Abb. 4.11	74
Tab. 4.3	Überblick der IκB-α-Bandenintensitäten der Abb. 4.13	79
Tab. 4.4	Überblick der IκB-α-Bandenintensitäten der Abb. 4.15	83
Tab. 4.5	Tissue Factor Expression von humanen Monozyten in [mU] nach einer Infektionsdauer mit Chlamydia pneumoniae von 8 und 72 Stunden	91

10 Diagrammverzeichnis

Diag. 4.1 NF-κB-Bandenintensitäten nach achtstündiger Infektion der Monozyten mit Chlamydia pneumoniae und zusätzlicher Behandlung mit LPS, Tetrazyklin oder LPS und Tetrazyklin gleichzeitig. Darstellung der drei Versuchsreihen mit Mittelwerten und Standardabweichung. 71

Diag. 4.2 NF-κB-Bandenintensitäten nach 24-stündiger Infektion der Monozyten mit Chlamydia pneumoniae und zusätzlicher Behandlung mit LPS, Tetrazyklin oder LPS und Tetrazyklin gleichzeitig. Darstellung der drei Versuchsreihen mit Mittelwerten und Standardabweichung. 76

Diag. 4.3 NF-κB-Bandenintensitäten nach 72-stündigen Infektion der Monozyten mit Chlamydia pneumoniae und zusätzlicher Behandlung mit LPS, Tetrazyklin oder LPS und Tetrazyklin gleichzeitig. Darstellung der drei Versuchsreihen mit Mittelwerten und Standardabweichung. 81

Diag. 4.4 Darstellung monozytärer NF-κB-Bandenintensitäten, nach Infektion mit hitzeinaktivierten Chlamydia pneumoniae (Abb. 4.17 und Abb. 4.18) 87

Diag. 4.5 TF Expression in humanen Monozyten nach einer Infektionszeit mit Chlamydia pneumoniae von 8 bzw. 72 Stunden. Verwendet werden die Mittelwerte, der jeweiligen Versuchsgruppen aus Tab. 4.5 92

11 Literaturverzeichnis

Airenne, S., H. M. Surcel, H. Alakarppa, K. Laitinen, J. Paavonen, P. Saikku and A. Laurila (1999). Chlamydia pneumoniae infection in human monocytes. Infect Immun **67**: 1445-9.

Albert, N. M. (2000). Inflammation and infection in acute coronary syndrome. J Cardiovasc Nurs **15**: 13-26.

Anderson, J. L. and J. B. Muhlestein (2000). The ACADEMIC study in perspective (Azithromycin in coronary artery disease: elimination of myocardial infection with Chlamydia). J Infect Dis **181 Suppl 3**: S569-71.

Andraws, R., J. S. Berger and D. L. Brown (2005). Effects of antibiotic therapy on outcomes of patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. Jama **293**: 2641-7.

Baer, J. T., T. V. Du Laney, P. B. Wyrick, A. S. McCain, T. A. Fischer, E. P. Merricks, A. S. Baldwin and T. C. Nichols (2003). Nuclear factor-kappaB activation in endothelium by Chlamydia pneumoniae without active infection. J Infect Dis **188**: 1094-7.

Baeuerle, P. A. (1998). IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control. Cell **95**: 729-31.

Baeuerle, P. A. and D. Baltimore (1996). NF-kappa B: ten years after. Cell **87**: 13-20.

Baeuerle, P. A. and T. Henkel (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. Annu Rev Immunol **12**: 141-79.

Baldwin, A. S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol **14**: 649-83.

Barroga, C. F., J. K. Stevenson, E. M. Schwarz and I. M. Verma (1995). Constitutive phosphorylation of I kappa B alpha by casein kinase II. Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 7637-41.

Belland, R. J., S. P. Ouellette, J. Gieffers and G. I. Byrne (2004). Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. Cell Microbiol **6**: 117-27.

Bhakdi, S. (2000). Pathogenesis of atherosclerosis: infectious versus immune pathogenesis. A new concept. Herz **25**: 84-6.

Blessing, E., L. A. Campbell, M. E. Rosenfeld, N. Chough and C. C. Kuo (2001). Chlamydia pneumoniae infection accelerates hyperlipidemia induced atherosclerotic lesion development in C57BL/6J mice. Atherosclerosis **158**: 13-7.

Boyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand J Clin Lab Invest Suppl **97**: 77-89.

Brand, K., S. Page, G. Rogler, A. Bartsch, R. Brandl, R. Knuechel, M. Page, C. Kaltschmidt, P. A. Baeuerle and D. Neumeier (1996). Activated transcription

factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. J Clin Invest **97**: 1715-22.

Braunwald, E. (1997). Heart disease, a textbook of cardiovascular medicine. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, W B Saunders Company.

Brown, K., S. Park, T. Kanno, G. Franzoso and U. Siebenlist (1993). Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 2532-6.

Caligiuri, G., M. Rottenberg, A. Nicoletti, H. Wigzell and G. K. Hansson (2001). Chlamydia pneumoniae infection does not induce or modify atherosclerosis in mice. Circulation **103**: 2834-8.

Campbell, L. A. and C. C. Kuo (2004). Chlamydia pneumoniae--an infectious risk factor for atherosclerosis? Nat Rev Microbiol **2**: 23-32.

Chen, Z., J. Hagler, V. J. Palombella, F. Melandri, D. Scherer, D. Ballard and T. Maniatis (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. Genes Dev **9**: 1586-97.

Cordle, S. R., R. Donald, M. A. Read and J. Hawiger (1993). Lipopolysaccharide induces phosphorylation of MAD3 and activation of c-Rel and related NF-kappa B proteins in human monocytic THP-1 cells. J Biol Chem **268**: 11803-10.

Darzynkiewicz, Z., S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M. A. Hotz, P. Lassota and F. Traganos (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry **13**: 795-808.

Daus, H., C. Ozbek, D. Saage, B. Scheller, H. Schieffer, M. Pfreundschuh and A. Gause (1998). Lack of evidence for a pathogenic role of Chlamydia pneumoniae and cytomegalovirus infection in coronary atheroma formation. Cardiology **90**: 83-8.

Dignam, J. D., R. M. Lebovitz and R. G. Roeder (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res **11**: 1475-89.

Donath, B., C. Fischer, S. Page, S. Prebeck, N. Jilg, M. Weber, C. da Costa, D. Neumeier, T. Miethke and K. Brand (2002). Chlamydia pneumoniae activates IKK/I kappa B-mediated signaling, which is inhibited by 4-HNE and following primary exposure. Atherosclerosis **165**: 79-88.

Fabricant, C. G., J. Fabricant, M. M. Litrenta and C. R. Minick (1978). Virus-induced atherosclerosis. J Exp Med **148**: 335-40.

Faruqi, R. M. and P. E. DiCorleto (1993). Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation. Br Heart J **69**: S19-29.

Fischer, S. F., C. Schwarz, J. Vier and G. Hacker (2001). Characterization of antiapoptotic activities of Chlamydia pneumoniae in human cells. Infect Immun **69**: 7121-9.

Fong, I. W. (2000). Antibiotics effects in a rabbit model of Chlamydia pneumoniae-induced atherosclerosis. J Infect Dis **181 Suppl 3**: S514-8.

Fong, I. W., B. Chiu, E. Viira, D. Jang and J. B. Mahony (1999). De Novo induction of atherosclerosis by Chlamydia pneumoniae in a rabbit model. Infect Immun **67**: 6048-55.

Fried, M. G. (1989). Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay. Electrophoresis **10**: 366-76.

Fryer, R. H., E. P. Schwobe, M. L. Woods and G. M. Rodgers (1997). Chlamydia species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. J Investig Med **45**: 168-74.

Gaydos, C. A. (2000). Growth in vascular cells and cytokine production by Chlamydia pneumoniae. J Infect Dis **181 Suppl 3**: S473-8.

Gaydos, C. A., J. T. Summersgill, N. N. Sahney, J. A. Ramirez and T. C. Quinn (1996). Replication of Chlamydia pneumoniae in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. Infect Immun **64**: 1614-20.

Gerrity, R. G. (1981). The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. Am J Pathol **103**: 181-90.

Gieffers, J., H. Fullgraf, J. Jahn, M. Klinger, K. Dalhoff, H. A. Katus, W. Solbach and M. Maass (2001). Chlamydia pneumoniae infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. Circulation **103**: 351-6.

Gieffers, J., G. van Zandbergen, J. Rupp, F. Sayk, S. Kruger, S. Ehlers, W. Solbach and M. Maass (2004). Phagocytes transmit Chlamydia pneumoniae from the lungs to the vasculature. Eur Respir J **23**: 506-10.

Godzik, K. L., E. R. O'Brien, S. K. Wang and C. C. Kuo (1995). In vitro susceptibility of human vascular wall cells to infection with Chlamydia pneumoniae. J Clin Microbiol **33**: 2411-4.

Grayston, J. T. and L. A. Campbell (1999). The role of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis. Clin Infect Dis **28**: 993-4.

Grimm, S. and P. A. Baeuerle (1993). The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. Biochem J **290 (Pt 2)**: 297-308.

Gurfinkel, E. (2000). Inflammation, infection, or both in atherosclerosis: the ROXIS trial in perspective. J Infect Dis **181 Suppl 3**: S566-8.

Haranaga, S., H. Yamaguchi, H. Friedman, S. Izumi and Y. Yamamoto (2001). Chlamydia pneumoniae infects and multiplies in lymphocytes in vitro. Infect Immun **69**: 7753-9.

Henkel, T., T. Machleidt, I. Alkalay, M. Kronke, Y. Ben-Neriah and P. A. Baeuerle (1993). Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. Nature **365**: 182-5.

Higgins, J. P. (2003). Chlamydia pneumoniae and coronary artery disease: the antibiotic trials. Mayo Clin Proc **78**: 321-32.

Hoefer (1994). Protein Electrophoresis: Applications guide. San Francisco, CA, Hoefer Scientific Instruments**:** 17, 44-48, 77-94.

Huxford, T., D. B. Huang, S. Malek and G. Ghosh (1998). The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. Cell **95**: 759-70.

Ieven, M. M. and V. Y. Hoymans (2005). Involvement of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis: more evidence for lack of evidence. J Clin Microbiol **43**: 19-24.

Jackson, L. A., L. A. Campbell, C. C. Kuo, D. I. Rodriguez, A. Lee and J. T. Grayston (1997). Isolation of Chlamydia pneumoniae from a carotid endarterectomy specimen. J Infect Dis **176**: 292-5.

Jacobs, M. D. and S. C. Harrison (1998). Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. Cell **95**: 749-58.

Jahn, H. U., M. Krull, F. N. Wuppermann, A. C. Klucken, S. Rosseau, J. Seybold, J. H. Hegemann, C. A. Jantos and N. Suttorp (2000). Infection and activation of airway epithelial cells by Chlamydia pneumoniae. J Infect Dis **182**: 1678-87.

Janosch, P., M. Schellerer, T. Seitz, P. Reim, M. Eulitz, M. Brielmeier, W. Kolch, J. M. Sedivy and H. Mischak (1996). Characterization of IkappaB kinases. IkappaB-alpha is not phosphorylated by Raf-1 or protein kinase C isozymes, but is a casein kinase II substrate. J Biol Chem **271**: 13868-74.

Kalayoglu, M. V. and G. I. Byrne (1998). Induction of macrophage foam cell formation by Chlamydia pneumoniae. J Infect Dis **177**: 725-9.

Kalayoglu, M. V., Indrawati, R. P. Morrison, S. G. Morrison, Y. Yuan and G. I. Byrne (2000). Chlamydial virulence determinants in atherogenesis: the role of chlamydial lipopolysaccharide and heat shock protein 60 in macrophage-lipoprotein interactions. J Infect Dis **181 Suppl 3**: S483-9.

Kalayoglu, M. V., P. Libby and G. I. Byrne (2002). Chlamydia pneumoniae as an emerging risk factor in cardiovascular disease. Jama **288**: 2724-31.

Kalayoglu, M. V., B. N. Perkins and G. I. Byrne (2001). Chlamydia pneumoniae-infected monocytes exhibit increased adherence to human aortic endothelial cells. Microbes Infect **3**: 963-9.

Kaukoranta-Tolvanen, S. S., A. M. Teppo, K. Laitinen, P. Saikku, K. Linnavuori and M. Leinonen (1996). Growth of Chlamydia pneumoniae in cultured human peripheral blood mononuclear cells and induction of a cytokine response. Microb Pathog **21**: 215-21.

Kern, J. M., V. Maass and M. Maass (2009). Chlamydia pneumoniae adversely modulates vascular cell properties by direct interaction with signalling cascades. Thromb Haemost **102**: 1064-70.

Kerr, L. D. (1995). Electrophoretic mobility shift assay. Methods Enzymol **254**: 619-32.

Krüll M, M. M., Suttorp N, Rupp J (2005). Chlamydophila pneumoniae. Mechanisms of target cell infection and activation. Thromb Haemost. **94(2)**: 319-26.

Kuo, C. C., A. M. Gown, E. P. Benditt and J. T. Grayston (1993). Detection of Chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. Arterioscler Thromb **13**: 1501-4.

Kuppuswamy, V. C. and S. Gupta (2006). Antibiotic therapy for coronary heart disease: the myth and the reality. Timely Top Med Cardiovasc Dis **10**: E2.

Lee, J. I. and G. J. Burckart (1998). Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. J Clin Pharmacol **38**: 981-93.

Lindholt, J. S., H. Fasting, E. W. Henneberg and L. Ostergaard (1999). A review of Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. Eur J Vasc Endovasc Surg **17**: 283-9.

Linnanmaki, E., M. Leinonen, K. Mattila, M. S. Nieminen, V. Valtonen and P. Saikku (1993). Chlamydia pneumoniae-specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease. Circulation **87**: 1130-4.

Liuba, P., P. Karnani, E. Pesonen, I. Paakkari, A. Forslid, L. Johansson, K. Persson, T. Wadstrom and R. Laurini (2000). Endothelial dysfunction after repeated Chlamydia pneumoniae infection in apolipoprotein E-knockout mice. Circulation **102**: 1039-44.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem **193**: 265-75.

Luther, T., C. Flossel, N. Mackman, A. Bierhaus, M. Kasper, S. Albrecht, E. H. Sage, L. Iruela-Arispe, H. Grossmann, A. Strohlein, Y. Zhang, P. P. Nawroth, P. Carmeliet, D. J. Loskutoff and M. Muller (1996). Tissue factor expression during human and mouse development. Am J Pathol **149**: 101-13.

Maass, M., J. Gieffers, E. Krause, P. M. Engel, C. Bartels and W. Solbach (1998). Poor correlation between microimmunofluorescence serology and polymerase chain reaction for detection of vascular Chlamydia pneumoniae infection in coronary artery disease patients. Med Microbiol Immunol **187**: 103-6.

Maass, M., J. Jahn, J. Gieffers, K. Dalhoff, H. A. Katus and W. Solbach (2000). Detection of Chlamydia pneumoniae within peripheral blood monocytes of patients with unstable angina or myocardial infarction. J Infect Dis **181 Suppl 3**: S449-51.

Mackman, N. (1995). Regulation of the tissue factor gene. Faseb J **9**: 883-9.

Mamata, Y., A. Hakki, C. Newton, N. Burdash, T. W. Klein and H. Friedman (2007). Differential effects of Chlamydia pneumoniae infection on cytokine levels in human T lymphocyte- and monocyte-derived cell cultures. Int J Med Microbiol **297**: 109-15.

Meier, C. R. (2000). Antibiotics in the prevention and treatment of coronary heart disease. J Infect Dis **181 Suppl 3**: S558-62.

Melnick, S. L., E. Shahar, A. R. Folsom, J. T. Grayston, P. D. Sorlie, S. P. Wang and M. Szklo (1993). Past infection by Chlamydia pneumoniae strain TWAR and asymptomatic carotid atherosclerosis. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. Am J Med **95**: 499-504.

Milioti, N., A. Bermudez-Fajardo, M. L. Penichet and E. Oviedo-Orta (2008). Antigen-induced immunomodulation in the pathogenesis of atherosclerosis. Clin Dev Immunol **2008**: 723539.

Miller, S. A., C. H. Selzman, B. D. Shames, H. A. Barton, S. M. Johnson and A. H. Harken (2000). Chlamydia pneumoniae activates nuclear factor kappaB and activator protein 1 in human vascular smooth muscle and induces cellular proliferation. J Surg Res **90**: 76-81.

Miyamoto, S. and I. M. Verma (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B story. Adv Cancer Res **66**: 255-92.

Moazed, T. C., C. Kuo, J. T. Grayston and L. A. Campbell (1997). Murine models of Chlamydia pneumoniae infection and atherosclerosis. J Infect Dis **175**: 883-90.

Moazed, T. C., C. C. Kuo, J. T. Grayston and L. A. Campbell (1998). Evidence of systemic dissemination of Chlamydia pneumoniae via macrophages in the mouse. J Infect Dis **177**: 1322-5.

Moreno P, F. J. (1997). The Role of Immune Mechanisms in Cardiovascular Disease. Berlin, Springer-Verlag.

Muhlestein, J. B. (2000). Chlamydia pneumoniae-induced atherosclerosis in a rabbit model. J Infect Dis **181 Suppl 3**: S505-7.

Muhlestein, J. B., J. L. Anderson, E. H. Hammond, L. Zhao, S. Trehan, E. P. Schwobe and J. F. Carlquist (1998). Infection with Chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. Circulation **97**: 633-6.

Muhlestein, J. B., E. H. Hammond, J. F. Carlquist, E. Radicke, M. J. Thomson, L. A. Karagounis, M. L. Woods and J. L. Anderson (1996). Increased incidence of Chlamydia species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. J Am Coll Cardiol **27**: 1555-61.

Mussa, F. F., H. Chai, X. Wang, Q. Yao, A. B. Lumsden and C. Chen (2006). Chlamydia pneumoniae and vascular disease: an update. J Vasc Surg **43**: 1301-7.

Nabel, G. J. and I. M. Verma (1993). Proposed NF-kappa B/I kappa B family nomenclature. Genes Dev **7**: 2063.

Netea, M. G., C. H. Selzman, B. J. Kullberg, J. M. Galama, A. Weinberg, A. F. Stalenhoef, J. W. Van der Meer and C. A. Dinarello (2000). Acellular components of Chlamydia pneumoniae stimulate cytokine production in human blood mononuclear cells. Eur J Immunol **30**: 541-9.

Noll, G. (1998). Pathogenesis of atherosclerosis: a possible relation to infection. Atherosclerosis **140 Suppl 1**: S3-9.

Osterud, B. (1997). Tissue factor: a complex biological role. Thromb Haemost **78**: 755-8.

Palombella, V. J., O. J. Rando, A. L. Goldberg and T. Maniatis (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. Cell **78**: 773-85.

Qanbar, R. and F. Possmayer (1994). A quantitative method for detecting surfactant-associated protein C in pulmonary surfactant. Anal Biochem **216**: 262-70.

Rosen, H., J. B. Muhlestein, J. Bartlett, S. Chen, G. Chikami, M. Corson, P. K. Shah, E. Gurfinkel, H. Handsfield, L. Jackson, C. Knirsch, R. Kronmal, J. A. McCutchan and S. Shea (2000). Collaborative multidisciplinary workshop report: clinical antimicrobial trials for primary and secondary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease. J Infect Dis **181 Suppl 3**: S582-4.

Rosenfeld, M. E., E. Blessing, T. M. Lin, T. C. Moazed, L. A. Campbell and C. Kuo (2000). Chlamydia, inflammation, and atherogenesis. J Infect Dis **181 Suppl 3**: S492-7.

Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature **362**: 801-9.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med **340**: 115-26.

Rothwarf, D. M. and M. Karin (1999). The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. Sci STKE **1999**: RE1.

Rupp, J. e. a. (2005). Transmission of Chlamydia pneumoniae infection from blood monocytes to vascular cells in a novel transendothelial migration model. FEMS Microbiol Lett **242**: 203-8.

Saikku, P., M. Leinonen, K. Mattila, M. R. Ekman, M. S. Nieminen, P. H. Makela, J. K. Huttunen and V. Valtonen (1988). Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. Lancet **2**: 983-6.

Saikku, P., M. Leinonen, L. Tenkanen, E. Linnanmaki, M. R. Ekman, V. Manninen, M. Manttari, M. H. Frick and J. K. Huttunen (1992). Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. Ann Intern Med **116**: 273-8.

Schletter, J., H. Heine, A. J. Ulmer and E. T. Rietschel (1995). Molecular mechanisms of endotoxin activity. Arch Microbiol **164**: 383-9.

Schmitz, M. L. and P. A. Baeuerle (1991). The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. Embo J **10**: 3805-17.

Schreck, R. and P. A. Baeuerle (1994). Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-kappa B. Methods Enzymol **234**: 151-63.

Sen, R. and D. Baltimore (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell 1986. 46: 705-716. J Immunol **177**: 7485-96.

Sessa, R., M. Nicoletti, M. Di Pietro, G. Schiavoni, I. Santino, C. Zagaglia, M. Del Piano and P. Cipriani (2009). Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: current state and future prospectives. Int J Immunopathol Pharmacol **22**: 9-14.

Shames, B. D., C. H. Selzman, E. J. Pulido, X. Meng, D. R. Meldrum, R. C. McIntyre, Jr., A. H. Harken and A. Banerjee (1999). LPS-Induced NF-kappaB activation and TNF-alpha release in human monocytes are protein tyrosine kinase dependent and protein kinase C independent. J Surg Res **83**: 69-74.

Shor, A., C. C. Kuo and D. L. Patton (1992). Detection of Chlamydia pneumoniae in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. S Afr Med J **82**: 158-61.

Staal, F. J., M. T. Anderson and L. A. Herzenberg (1995). Redox regulation of activation of NF-kappa B transcription factor complex: effects of N-acetylcysteine. Methods Enzymol **252**: 168-74.

Stassen, F. R., T. Vainas and C. A. Bruggeman (2008). Infection and atherosclerosis. An alternative view on an outdated hypothesis. Pharmacol Rep **60**: 85-92.

Strachan T, R. A. (1996). Molekulare Humangenetik. Heidelberg; Berlin; Oxford, Spektrum, Akad. Verl.

Suzuki, H., Y. Kurihara, M. Takeya, N. Kamada, M. Kataoka, K. Jishage, O. Ueda, H. Sakaguchi, T. Higashi, T. Suzuki, Y. Takashima, Y. Kawabe, O. Cynshi, Y. Wada, M. Honda, H. Kurihara, H. Aburatani, T. Doi, A. Matsumoto, S. Azuma, T. Noda, Y. Toyoda, H. Itakura, Y. Yazaki, T. Kodama and et al. (1997). A role

for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. Nature **386**: 292-6.

Takaoka, N., L. A. Campbell, A. Lee, M. E. Rosenfeld and C. C. Kuo (2008). Chlamydia pneumoniae infection increases adherence of mouse macrophages to mouse endothelial cells in vitro and to aortas ex vivo. Infect Immun **76**: 510-4.

Thom, D. H., J. T. Grayston, D. S. Siscovick, S. P. Wang, N. S. Weiss and J. R. Daling (1992). Association of prior infection with Chlamydia pneumoniae and angiographically demonstrated coronary artery disease. Jama **268**: 68-72.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A **76**: 4350-4.

van Gorp, E. C., C. Suharti, H. ten Cate, W. M. Dolmans, J. W. van der Meer, J. W. ten Cate and D. P. Brandjes (1999). Review: infectious diseases and coagulation disorders. J Infect Dis **180**: 176-86.

Verma, I. M., J. K. Stevenson, E. M. Schwarz, D. Van Antwerp and S. Miyamoto (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. Genes Dev **9**: 2723-35.

Wahl, C., F. Oswald, U. Simnacher, S. Weiss, R. Marre and A. Essig (2001). Survival of Chlamydia pneumoniae-infected Mono Mac 6 cells is dependent on NF-kappaB binding activity. Infect Immun **69**: 7039-45.

Welsh, L., C. Gaydos and T. C. Quinn (1996). In vitro activities of azithromycin, clarithromycin, erythromycin, and tetracycline against 13 strains of Chlamydia pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother **40**: 212-4.

Whiteside, S. T., J. C. Epinat, N. R. Rice and A. Israel (1997). I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. Embo J **16**: 1413-26.

Wolf, K., E. Fischer and T. Hackstadt (2005). Degradation of Chlamydia pneumoniae by peripheral blood monocytic cells. Infect Immun **73**: 4560-70.

Yamaguchi, H., S. Haranaga, R. Widen, H. Friedman and Y. Yamamoto (2002). Chlamydia pneumoniae infection induces differentiation of monocytes into macrophages. Infect Immun **70**: 2392-8.

12 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht 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.“

13 Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Werner Haberbosch, für die Themenvergabe sowie für sein Vertrauen, dass er mir entgegen brachte und dass er für das Gelingen der Arbeit mit wertvollen Ratschlägen sorgte. Er gab mir mit seinem fundierten Fachwissen viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit. Bei Professor Dr. H. Tillmanns Abteilungsleiter der Kardiologie und Angiologie des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, möchte ich mich für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen, bedanken. Ein großer Dank geht aber auch an alle Auswerterinnen und Auswerter, insbesondere an die leitende MTA Behnoush Parviz, denn die Zusammenarbeit mit ihnen war ein Meilenstein bei der Erstellung meiner Doktorarbeit. Außerdem möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Christian Jantos aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Bereitstellung und Unterstützung in der Arbeit mit Chlamydia pneumoniae. Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern Elena und Wilhelm Zakel und meinem Bruder Robert Zakel bedanken, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären. Ganz herzlich möchte ich mich bei Jörg Leonhardt für die Geduld und die mentale Unterstützung bedanken. Mein Dank gilt auch Nicole Leonhardt und Prof. Dr. Lars Daniel Berthold für die Korrekturen und Vorschläge bei der Erstellung des Manuskriptes. Danke auch an meine Freunde, die mir durch stetes Nachfragen und Glauben an die Fertigstellung dieses Werkes geholfen haben.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

Berufserfahrung

10/2001 – 05/2007	Ärztin an der Universitätskinderklinik Gießen, Abt. Allgemeinpädiatrie mit Betreuung des Projekts „Prävalenz des Melanocortin 4 Rezeptor (MC4R) Mutationen und Polymorphismen bei adipösen Kindern und Jugendlichen“
seit 05/2007	Ärztin an der Universitätskinderklinik Gießen, Abt. Hämatologie und Onkologie
seit 09/2008	Fachärztin für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
seit 10/2008	Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

Publikationen

Hoelschermann, H., Terhalle, H. M., Zakel, U., Maus, U., Parviz, B., Tillmanns, H., Haberbosch, W. (1999). "Monocyte tissue factor expression is enhanced in women who smoke and use oral contraceptives." Thromb Haemost 82(6): 1614-20

Zakel, U. A., Wudy, S. A., Heinzel-Gutenbrunner, M., Gorg, T., Schafer, H., Gortner, L., Blum, W. F., Hebebrand, J., Hinney, A. (2005). "[Prevalence of melanocortin 4 receptor (MC4R) mutations and polymorphisms in consecutively ascertained obese children and adolescents from a pediatric health care utilization population]." Klin Padiatr 217(4): 244-9

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5632-2