Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. W. Solbach

Transendotheliale Migration *Chlamydia pneumoniae* infizierter Monozyten in einem in vitro Modell der Gefäßwand

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der medizinischen Fakultät-

vorgelegt von:
Marcus Koch
aus Lübeck

Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Maaß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Helmut Brade

Tag der mündlichen Prüfung: 29.08.2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 29.08.2005

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Αἶσα γὰρ ἦν ἀπολέσθαι, ἐπὴν πόλις ἀμφικαλύψῃ
δουράτεον μέγαν ἵππον, ὅθ‘ εἵατο πάντες ἄριστοι
'Αργεῖοι Τρώεσσι φόνον καὶ κῆρα φέροντες.

(Untergehen mußte die Stadt, sobald sie das große hölzerne Pferd bei sich aufnahm, in dem die besten Argäer sämtlich saßen, bereit zu Tod und Mord an den Troern.)

Homer, Odyssee

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 3

1.1 Eigenschaften von *Chlamydia pneumoniae* 3
1.2 Vermehrungszyklus 4
1.3 Persistenz in infizierten Zellen 4
1.4 Durch *Chlamydia pneumoniae* verursachte Erkrankungen 4
1.5 Epidemiologie 4
1.6 Diagnostik 4
1.7 Therapie 4
1.8 Assoziation von *Chlamydia pneumoniae* und Arteriosklerose 4
1.9 Fragestellung 4

2 MATERIAL UND METHODEN 4

2.1 Abkürzungen 4
2.2 Anzucht von *Chlamydia pneumoniae* 4
2.3 Infektiositätsbestimmung 4
2.4 Für das Transmigrationsmodell verwendete Zellarten und Medien 4
2.5 Isolation und Infektion von humanen Monozyten 4
2.6 FACS-Experimente 4
2.7 Transmigrationsmodell 4
2.8 Quantifizierung der transmigrierten Zellen 4
2.9 Infektionsübertragung durch transmigrierte Zellen 4

3 ERGEBNISSE 4

3.1 Reinheit der in den Experimenten verwendeten Leukozyten 4
3.2 FACS-Experimente 4
3.3 Transmigrationsmodell 4
3.3.1 Quantifizierung der transmigrierten Zellen 4
3.3.2 Infektionsstatus der transmigrierten Zellen 4
3.3.3 Infektionsübertragung durch transmigrierte Zellen 4

4 DISKUSSION 4

4.1 Übersicht 4

4.2 Expression von MHC-Klasse-I Molekülen in infizierten Monozyten 4

4.3 Transmigration im in vitro Gefäßwandmodell 4

4.4 Infektionsübertragung durch transmigrierte Zellen 4

4.5 Ausblick 4

5 ZUSAMMENFASSUNG (ABSTRACT) 4

6 LITERATURVERZEICHNIS 4

7 PUBLIKATIONEN 4

7.1 Publikation 4

7.2 Kongreßbeiträge 4

8 DANKSAGUNG 4

9 LEBENSLAUF 4

1 Einleitung

1.1 Eigenschaften von *Chlamydia pneumoniae*

Chlamydien sind obligat intrazellulär wachsende gramnegative Bakterien. Zu den beiden bereits bekannten humanpathogenen Arten *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia trachomatis* trat 1989 als dritte Art *Chlamydia pneumoniae*. 1999 wurde der Versuch unternommen, die Ordo *Chlamydiales* grundlegend neu zu definieren; dabei sollten die eng verwandten Organismen *C. pneumoniae* und *C. psittaci* dem neu definierten Genus *Chlamydophila* zugerechnet werden.[1] Diese Neueinteilung traf auf Widerstand bei einer großen Gruppe von Chlamydienforschern, die in einem Brief die neue Taxonomie als verfrüht und unbegründet ablehnten.[2] In dieser Arbeit werden die klassischen Bezeichnungen *Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia psittaci* verwendet.

Die erste Isolation dieses Bakteriums gelang 1965 aus dem Augenbindehautabstrich eines Kindes.[3] Der mit "TW-183" bezeichnete Erreger konnte damals keiner bekannten Art zugeordnet werden, und die damals noch unzureichenden Anzuchtmethoden verhinderten zunächst die weitere Untersuchung dieses Isolates.

Als dann 1971 der Erreger in HeLa-Zellen angezüchtet wurde, erkannte man, daß die von dem neuen Erreger gebildeten intrazellulären Einschlüsse denen von *C. psittaci* besonders ähnlich waren. Obwohl TW-183 aus einem Augenbindehautabstrich isoliert worden war, konnten serologische Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen dem neuen Isolat und Augenerkrankungen nachweisen.[4] Der erste Hinweis auf die klinische Bedeutung des Bakteriums ergab sich, als 1983 ein gleichartiger Erreger, AR-39, aus dem Rachenabstrich eines an akuter Pharyngitis erkrankten Studenten isoliert wurde.[5] Eine serologische Studie konnte zudem eine Verbindung zwischen TW-183 und Pneumonie nachweisen.[6]

Als klar wurde, daß TW-183 und AR-39 derselben Art zuzuordnen waren, bildete man aus den beiden Stammbezeichnungen den vorläufigen Namen "TWAR", der dann 1989 durch den Namen *Chlamydia pneumoniae* ersetzt wurde.[7] Mittlerweile

gibt es eine ganze Reihe Isolate von *C. pneumoniae*, die aus dem Respirationstrakt und aus Blutgefäßen gewonnen wurden. Diese gleichen sich untereinander aber so sehr, daß man bisher keine Serotypen innerhalb der Art unterscheiden kann.

Chlamydien besitzen nicht die Enzymausstattung, um lebensnotwendige energiereiche Verbindungen wie ATP selbst herzustellen. Sie sind daher auf eine eukaryonte Wirtszelle angewiesen, der sie alle nötigen Stoffe, wie ATP, Aminosäuren, Kofaktoren und Vitamine entziehen.[8]

1.2 Vermehrungszyklus

C. pneumoniae durchläuft einen komplizierten Vermehrungszyklus, der in Zellkultur etwa drei Tage dauert. Während dieses Vermehrungszyklus' nehmen die Bakterien zwei verschiedene Formen an, die "Elementarkörperchen" (EK) und "Retikularkörperchen" (RK) genannt werden. Das EK stellt die extrazelluläre, infektiöse Form des Bakteriums dar: die etwa 0,3 µm großen EK sind nur wenig stoffwechselaktiv, besitzen eine relativ starre Zellwand und sind gegenüber Umwelteinflüssen resistent. Das RK ist die intrazelluläre, stoffwechselaktive und sich teilende Form des Bakteriums: die etwa 1 µm großen RK besitzen eine zarte Zellwand, die den Zutritt von lebenswichtigen Stoffen aus dem umgebenden Zytoplasma erlaubt, sie reagieren sehr empfindlich auf Umwelteinflüsse.

Die Infektion der Wirtszelle beginnt mit der Adhäsion eines EK an die Wirtszelle, die durch verschiedene Oberflächenproteine der EK vermittelt wird.[9] Nach der Anheftung findet eine Phagozytose des EK statt, sodaß sich das Bakterium schließlich in einem membranumhüllten Phagosom intrazellulär befindet.[10] Auf noch unbekannte Weise wird die Verschmelzung dieses Phagosoms mit einem Lysosom verhindert. Das EK wandelt sich innerhalb des Phagosoms im Laufe von acht bis zwölf Stunden in die intrazelluläre Form, das RK, um;[11] diese Umwandlung beinhaltet unter anderem ein Wachstum auf die dreifache Größe (etwa 1 µm).

Das RK stellt die nichtinfektiöse Vermehrungsform des Erregers dar. In dieser Form teilt sich das Bakterium fortwährend und der intrazelluläre Einschluß nimmt an Größe zu. Zum Ende der Vermehrungsphase nehmen die neugebildeten Chlamydien wieder ihre EK-Form an. Das Signal, das die Umwandlung von RK zum EK auslöst,

ist nicht bekannt. Wenn die Zelle schließlich unter dem Druck der fortdauernden Vermehrung zerbirst, setzt sie dabei die infektiösen neugebildeten EK frei (Abb. 1.1).

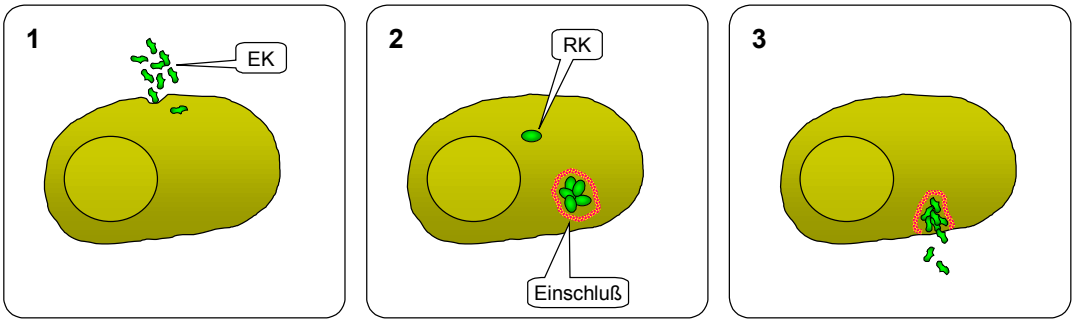


Abbildung 1.1: Vermehrungszyklus von *C. pneumoniae*. (1) Elementarkörperchen (EK) adhärieren an die Wirtszelle und werden phagozytiert. (2) Die EK wandeln sich zu Retikularkörperchen (RK) um, vermehren sich und bilden einen Einschluß. (3) Die Chlamydien redifferenzieren sich zu EK und werden beim Zerbersten der infizierten Zelle frei.

1.3 Persistenz in infizierten Zellen

Neben dem oben geschilderten Vermehrungszyklus gibt es noch eine andere wichtige Verlaufsform der Infektion mit *C. pneumoniae*. Wenn die Wirtszelle kurz nach der Infektion einem "Immunstreß" in Form von Cytokinen wie Interferon Gamma ausgesetzt ist, kommt es nach der Bildung des Einschlusses nicht zu einer Redifferenzierung der RK in EK und auch nicht zur Freisetzung von neugebildeten Chlamydien.

Die Einschlüsse nehmen vielmehr eine aberrante Form an und die Wirtszelle geht in diesen Fällen auch nicht zugrunde, man nennt diesen Infektionsverlauf Persistenz der Chlamydien (Abb1.2).[12]

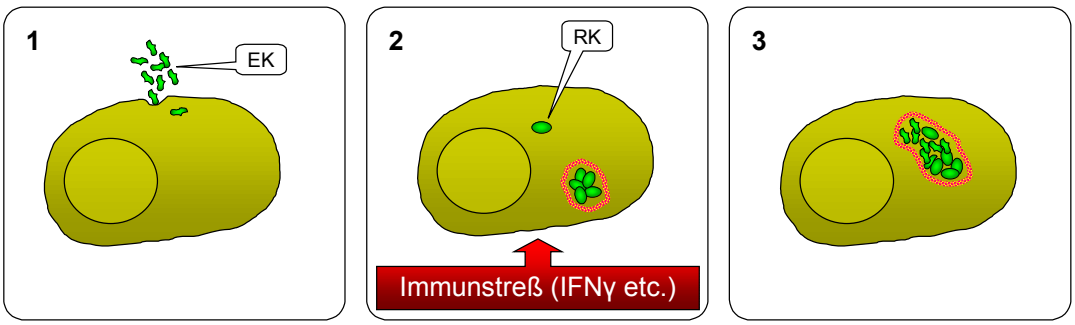


Abbildung 1.2: Persistente Infektion. Nach Adhäsion, Phagozytose und Umwandlung zum Retikularkörperchen (1 und 2) kommt es durch Einwirkung von "Immunstreß" zur Ausbildung eines aberranten Einschlusses mit nicht teilungsfähigen Organismen (3).

Die persistenten Chlamydien lassen sich nicht mehr anzüchten, sind aber noch vital und produzieren bakterientypische Stoffe wie das Chlamydien-Hitzeschockprotein 60 (cHSP 60) und Chlamydien-Lipopolysaccharid (cLPS).

Gerade diese von persistenten Chlamydien produzierten Stoffe könnten eine wichtige Rolle bei der Progression arteriosklerotischer Läsionen spielen.

1.4 Durch *Chlamydia pneumoniae* verursachte Erkrankungen

C. pneumoniae verursacht eine Reihe verschiedener Erkrankungen des oberen und unteren Respirationstraktes, am häufigsten Bronchitiden und interstitielle Pneumonien. Begleitend oder seltener auch als eigenständige Erkrankungen kommen Infektionen des Rachens, des Kehlkopfes, der Nasennebenhöhlen sowie des Mittelohres vor.[13-17] Junge Patienten sind vor allem von primären Infektionen betroffen, die im allgemeinen mild verlaufen. Die Erkrankungen älterer Patienten sind dagegen häufig Reinfektionen, die -insbesondere bei chronisch Lungenkranken- auch schwer verlaufen können und dann eine stationäre Behandlung bis hin zur Beatmung notwendig machen.[18;19]

Der interstitiellen Pneumonie gehen häufig Krankheitserscheinungen am oberen Respirationstrakt wie Halsschmerzen und Heiserkeit voraus. Im weiteren Krankheitsverlauf treten dann Fieber, ein hartnäckiger, nichtproduktiver Husten, sowie allgemeine Abgeschlagenheit und ein meist mildes Krankheitsgefül auf. Die allgemeine körperliche Untersuchung, vor allen die Auskultation der Lungen, ist oft unauffällig, auf der Thorax-Röntgenaufnahme finden sich eventuell kleine segmentale Infiltrate.[20]

Infektionen mit *C. pneumoniae* können nicht anhand von pathognomonischen klinischen Symptomen diagnostiziert werden; ein langsamer Beginn und prolongierter Verlauf der Infektionen gilt aber als typisch.[21]

1.5 Epidemiologie

Obwohl in der Literatur Fälle von Infektionen mit *Chlamydia pneumoniae* beim Pferd,[22] dem Koalabären[23] und sogar zweier Froscharten[24;25] bekannt sind, gibt es für diesen Erreger kein bedeutendes tierisches Reservoir. Vielmehr ist die Inhalation erregerhaltiger Aerosole und also die Übertragung von Mensch zu Mensch der

Hauptinfektionsweg. Infektionen mit *C. pneumoniae* kommen auf der ganzen Welt vor.

Der Vergleich von Untersuchungen aus verschiedenen Ländern[26-33] zeigte, daß die Durchseuchung der erwachsenen Bevölkerung überall mehr als 40% beträgt, dabei liegt sie aber in tropischen Ländern (z.B. Taiwan: 75%) deutlich höher als in klimatisch gemäßigten Zonen (z.B. Skandinavien: 45%).

Untersuchungen zur Inzidenz zeigen, daß die Infektion vor allem im Kindesalter erworben wird, und zwar in den USA und Skandinavien vor allem in der Gruppe der 5-14 Jährigen, in tropischen Ländern in der Gruppe der unter 5 Jährigen, im späteren Leben kommt es auch häufig zu Reinfektionen.[34]

Die Ausbreitung des Erregers erfolgt sowohl endemisch als auch epidemisch; so beschreibt eine Studie aus Seattle[35] etwa drei Jahre dauernde Zeiträume mit niedriger Inzidenz, die sich mit mehrmonatigen Perioden von epidemischem Inzidenzanstieg abwechseln.

1.6 Diagnostik

Da sich Infektionen mit *C. pneumoniae* weder klinisch noch radiologisch gut von ähnlichen, etwa durch Viren oder Mykoplasmen verursachten Infektionen abgrenzen lassen, muß zur Diagnosesicherung der Nachweis entweder des Erregers selbst oder spezifischer Antikörper gegen ihn erbracht werden. Die Erregeranzucht ist durch die obligat intrazelluläre Lebensweise und die große Empfindlichkeit von *C. pneumoniae* gegenüber Umwelteinflüssen nicht einfach und erfordert geeignete Zellkulturverfahren sowie besondere Vorkehrungen für Isolation und Transport.

Aus Rachenabstrichsmaterial lassen sich nur wenige Erreger gewinnen, zudem können Sputumverunreinigungen die Erregeranzucht unmöglich machen. Besser geeignet ist Material aus der bronchoalveolären Lavage. Das gewonnene Ausgangsmaterial sollte in einem speziellen Transportmedium auf 4°C gekühlt und innerhalb von 24 Stunden nach Gewinnung bearbeitet werden.[36] Im Gegensatz zu den anderen humanpathogenen Chlamydienarten benötigt *C. pneumoniae* HEp-2

oder HL-Zellen für ein ausreichendes Wachstum.[37] Die Anzucht der Erreger benötigt drei Tage. Die dann in den Kulturzellen gebildeten Einschlüsse werden mit FITC-markiertem genusspezifischen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. Insgesamt ist die Sensitivität dieses Anzuchtverfahrens gering.

Der serologische Erregernachweis gelingt durch den speziesspezifischen Mikroimmunfluoreszenztest (MIF) oder durch die nur genusspezifische Komplementbindungsreaktion (KBR).

Der MIF beruht auf der Reaktion von Antikörpern im Patientenserum gegen speziesspezifische Antigenpräparationen auf Objektträgern. Für den Nachweis dieser Antigen-Antikörperreaktion wird ein FITC-markierter Zweitantikörper benutzt. Dieses Verfahren erlaubt zudem die Differenzierung zwischen den Antikörpersubklassen IgM und IgG, also zwischen frischer oder länger zurückliegender Infektion. Dabei ist zu beachten, daß die Antikörper erst verzögert nachweisbar werden: IgM-Antikörper findet man drei, IgG-Antikörper erst sechs bis acht Wochen nach Auftreten der ersten Symptome. Beim MIF gelten ein vierfacher Titeranstieg im Verlauf, ein IgM-Titer von 1:16 oder höher oder ein IgG-Titer von 1:512 oder höher als Merkmale einer aktuellen Infektion. Als Merkmal für früher durchgemachte Infektionen wertet man niedrig positive IgG-Titer zwischen 1:8 und 1:256.

Die KBR beruht auf dem Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydien-Lipopolysaccharid und erlaubt keine Differenzierung nach Chlamydienspezies. Sie zeigt einen schnellen Titeranstieg nach Infektion. Ein vierfacher Titeranstieg im Verlauf oder Antikörpertiter von 1:64 oder höher gelten bei der KBR als Merkmale einer akuten Infektion. Wegen der mangelnden Speziesspezifität sollte die KBR immer durch andere diagnostische Verfahren ergänzt werden.

Bei Reinfektionen sind weder die KBR noch der MIF-IgM-Nachweis sicher positiv, sodaß der Erregernachweis allein auf dem ein bis zwei Wochen später möglichen MIF-IgG-Nachweis beruht.

Als neues diagnostisches Verfahren ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hinzugekommen. Sie weist mit hoher Sensitivität speziesspezifische DNA-

Sequenzen nach. Die PCR ist schneller und sensitiver als die zellkulturellen Verfahren und erfordert erheblich weniger Aufwand hinsichtlich des Probentransportes.[38-40] Der Nachteil dieser Methode ist die fehlende Aussage über die Lebendigkeit der nachgewiesenen Chlamydien.

1.7 Therapie

Für die antibiotische Therapie der Infektionen durch *C. pneumoniae* sind Makrolide, Tetrazyklin, neuere Chinolone und Rifampicin geeignet. Die Erkenntnis über die Wirksamkeit dieser Medikamente stammt aus in vitro Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentration[41;42] und klinischen Studien.[43-45] Für die Therapie der respiratorischen Erkrankungen empfiehlt sich die Verwendung der neueren Makrolide Clarithromycin oder Azithromycin, als notwendige Behandlungsdauer gelten zwei bis drei Wochen. Trotz guter Wirksamkeit gegen *C. pneumoniae* ist Rifampicin wegen seiner Nebenwirkungen für die Standardtherapie nicht geeignet. *C. pneumoniae* Isolate, die aus arteriosklerotischen Läsionen isoliert wurden, unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika nicht von den respiratorischen Isolaten.[46]

Aufgrund der möglichen Assoziation von *C. pneumoniae* Infektion und Arteriosklerose sind eine Reihe klinischer Studien durchgeführt worden, die den Effekt von antibiotischer Therapie bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit untersuchten. Gupta und Mitarbeiter[47] untersuchten 1997 den Effekt einer kurzen Azithromycintherapie bei Patienten mit frischem Herzinfarkt und hohen Antikörpertitern gegen das Bakterium. Sie fanden für den beobachteten Zeitraum von 18 Monaten ein deutlich verringertes Risiko für das Neuauftreten kardiovaskulärer Ereignisse in der behandelten Gruppe gegenüber der Placebogruppe.

In späteren Studien wurden diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigt: Muhlestein und Mitarbeiter messen bei vergleichbarem Studienaufbau einen deutlich geringeren Effekt der Antibiotikatherapie und raten zu weiteren, größeren Studien.[48] Gurfinkel und Mitarbeiter stellen in einer weiteren ähnlichen Studie fest, daß sich der positive Effekt der Antibiotikatherapie, den sie nach einem Monat beobachten, bis zum sechsten Monat verliert.[49]

Die bisher durchgeführten Studien reichen noch nicht aus, den Effekt von Antibiose bei koronarer Herzkrankheit abschließend zu beurteilen,[50-52] weshalb diese Therapieoption bisher nicht empfohlen wird,[53] mehrere prospektive klinische Studien zum Thema laufen derzeit. Eine bereits abgeschlossene prospektive klinische Studie, die WIZARD-Studie, untersuchte den möglichen Wert einer dreimonatigen Gabe von Azithromycin an Patienten nach einem Myokardinfarkt und mit einem Antikörpertiter gegen *C. pneumoniae* von 1:16 oder höher. In dieser Studie zeigte sich kein Unterschied zwischen Verum- und Placebogruppe für die untersuchten Endpunkte Tod, erneuter Herzinfarkt, koronäre Revaskularisierung oder Krankenhausaufnahme wegen Angina pectoris.[54]

1.8 Assoziation von *Chlamydia pneumoniae* und Arteriosklerose

Seit Ende der Achtziger Jahre mehren sich die Hinweise darauf, daß die klinische Bedeutung von *C. pneumoniae* nicht auf respiratorische Infektionen begrenzt ist, sondern daß dieses Bakterium eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose, einer chronischen Entzündung der Gefäßwand, spielen könnte. Diese Verbindung wurde zunächst durch seroepidemiologische Studien hergestellt.

Eine seroepidemiologische Studie aus Finnland aus dem Jahr 1988 stellte erstmals den Zusammenhang zwischen *C. pneumoniae* Infektion und Arteriosklerose her. Saikku und Mitarbeiter stellten damals fest, daß die Antikörpertiter von Patienten mit koronarer Herzkrankheit signifikant gegenüber denen gesunder Probanden erhöht waren.[55] Weitere serologische Untersuchungen aus anderen Gruppen konnten diesen Befund bestätigen.[56;57] Neuere, sorgfältig durchgeführte und kontrollierte epidemiologische Studien stellen die früheren Untersuchungen in Frage.[58-60] Allgemein ist anzumerken, daß seroepidemiologische Studien zu diesem Thema schon allein deshalb schwierig sind, weil die Prävalenz der Chlamydieninfektionen in der allgemeinen Bevölkerung sehr hoch ist.[61]

Neben den seroepidemiologischen Hinweisen gelang es vielen Untersuchern, den Erreger bzw. seine Erbinformation mit den Techniken Immunhistochemie,[62;63] Elektronenmikroskopie[64] sowie Polymerasekettenreaktion[65;66] in arteriosklerotischen Plaques, nicht aber in gesunden Gefäßen, nachzuweisen. Die Zusammenfassung

dieser Untersuchungen ergab, daß sich etwa in der Hälfte aller arteriosklerotischen Läsionen *C. pneumoniae* Organismen oder -DNA befand.

Der wichtigste Hinweis auf die Rolle des Bakteriums bei der Arteriosklerose war dann aber die Anzüchtung von *C. pneumoniae* aus menschlichen Atheromen, die einigen verschiedenen Untersuchern gelang.[67;68] *C. pneumoniae* ist bis heute der einzige Krankheitserreger, bei dem dies gelang.

Die genannten Untersuchungen zeigen, daß lebendige *C. pneumoniae*-Organismen in menschlichen Atheromen, nicht aber in gesunden Gefäßen, vorkommen. Dieser Befund kann auf verschiedene Weisen erklärt werden. So könnten die Bakterien bereits lange Zeit bestehende Läsionen sekundär besiedeln und vollkommen unschuldig am Fortschreiten der Gefäßerkrankung sein. Andererseits könnten sie in einem frühen Stadium der Erkrankung in noch kleine Läsionen einwandern und durch das Ingangbringen einer chronischen Entzündung die Erkrankung unterhalten und befördern. Schließlich könnten sie auch am Beginn der Gefäßerkrankung stehen und durch die Infektion der gesunden Gefäßwand die Arteriosklerose verursachen.

Da *C. pneumoniae* sich nicht ausserhalb von Wirtszellen vermehren kann, muß sie auf ihrem Weg in die Gefäßwand eine Vektorzelle benutzen. Vieles spricht dafür, daß zirkulierende Monozyten als Vektorzelle für *C. pneumoniae* dienen. In mehreren tierexperimentellen Arbeiten[69;70] konnten die Erreger nach intranasaler Inokulation in zirkulierenden Blutmonozyten nachgewiesen werden. Menschliche Blutmonozyten sind mit *C. pneumoniae* infizierbar[71] und *C. pneumoniae* DNA kann leicht mittels PCR in zirkulierenden Blutmonozyten nachgewiesen werden;[72;73] zudem gelang es, *C. pneumoniae* mittels Immunhistochemie auch im Inneren von Makrophagen aus arteriosklerotischen Plaques nachzuweisen.[74]

Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß die Bakterien in der Lunge in Monozyten aufgenommen werden, im Inneren dieser Zellen systemisch disseminieren und schließlich in die Gefäßwand gelangen.

C. pneumoniae konnte auch in anderen Zellen der Gefäßwand, nämlich Gefäßendothelzellen und glatten Muskelzellen nachgewiesen werden.[75] Das legt die

Vermutung nahe, daß nach der Einwanderung von *C. pneumoniae* in die Gefäßwand sekundär eine Infektion dieser Zellen stattfindet.

1.9 Fragestellung

Der oben beschriebene vermutete Weg, auf dem *C. pneumoniae* in die Gefäßwand gelangt, ist experimentell schwer nachzuvollziehen. So ist bisher noch nicht bekannt, ob infizierte Monozyten transendothelial in die Gefäßwand einwandern können. Ebenso ungeklärt ist die Frage, ob sie nach ihrer Einwanderung in die Gefäßwand ihre Infektion an die dort vorhandenen Zellen übertragen können.

In dieser Arbeit wird ein in vitro Modell vorgestellt, in dem diese entscheidenden Schritte, nämlich die transendotheliale Migration infizierter Monozyten und die Weitergabe der Infektion an glatte Gefäßmuskelzellen, einfach untersucht werden können.

Auch darüber, was innerhalb des infizierten Monozyten, der Vektorzelle für das Bakterium, geschieht, ist wenig bekannt. In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob das Bakterium wichtige Veränderungen an seiner Vektorzelle bewirkt, die sein Überleben erleichtern. Hierfür wurde mittels FACS-Technik der Einfluß der Chlamydieninfektion auf die Expression immunologisch wichtiger Oberflächenmoleküle untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
cHSP-60	Chlamydien-Hitzeschockprotein 60
cLPS	Chlamydien-Lipopolysaccharid
CD	Cluster Of Differentiation
EK	Elementarkörperchen
EMEM	Eagle's Minimal Essential Medium
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
HCAEC	Human Coronary Artery Endothelial Cell
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IFNγ	Interferon Gamma
IFT	Immunfluoreszenztest
IFU	Inclusion Forming Unit
IL	Interleukin
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MHC	Major Histocompatibility Complex
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
PBS	Phosphate Buffered Saline
RK	Retikularkörperchen
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

2.2 Anzucht von *Chlamydia pneumoniae*

Die Anzucht von *C. pneumoniae* erfolgte nach dem von Maaß und Harig beschrieben Verfahren.[37] Als Wirtszelle wurde die aus einem humanen Larynxkarzinom stammende Zellinie HEp-2 (ATCC Nr. CCL 23) verwendet. Die HEp-2 Zellen wurden in Zellkulturflaschen angezüchtet und mittels Trypsinbehandlung (35°C, 10 min.) vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Anzuchtmedium suspendiert (2-5×10^5 Zellen/ml); je 2 ml der Zellsuspension wurden in jede Vertiefung von 6-Well-Zellkulturplatten pipettiert und zur Ausbildung eines Zellrasens für 24 Stunden bei 35°C und 5 % CO_2 inkubiert. Als Anzuchtmedium diente EMEM, dem einfach konzentrierte nichtessentielle Aminosäuren, 2 mM Glutamin (alle drei: Gibco/BRL, Eggenstein), sowie 10 % FKS (Biochrom, Berlin) zugesetzt waren.

Für die Infektion der HEp-2-Zellen mit *C. pneumoniae* wurde eine elementarkörperhaltige Suspension auf die entstandenen Zellrasen gegeben. Für die Gewinnung dieser Suspension wurden vorher infizierte und also chlamydienhaltige HEp-2 Zellen mit Glasschrot zerschlagen.

Die so behandelten 6-Well-Kulturplatten wurden zentrifugiert (45 min., 35°C, 2000×g), und in die Wells wurde je 2 ml Infektionsmedium gegeben (EMEM (Gibco/BRL, Eggenstein), 1 µg/ml Cycloheximid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)). Nach 48 Stunden wurde das Infektionsmedium sorgfältig von den Zellrasen abgesaugt und durch Monozytenmedium (RPMI 1640 (Gibco/BRL, Eggenstein), 2 mM Glutamin, 10% FKS, 1 mM Natriumpyruvat, 1 mM Oxalessigsäure (alle vier: Biochrom, Berlin) 10 µg/ml Rinderinsulin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)) ersetzt.

Nach weiteren 48 Stunden wurden die infizierten Zellen mit einem Gummizellschaber abgeschabt, mit dem Monozytenmedium, in dem sie sich befanden, aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Die so gewonnene Lösung wurde als Stammlösung für die Experimente verwendet.

2.3 Infektiositätsbestimmung

Die Infektiosität der geernteten chlamydienhaltigen Stammlösung wurde folgendermaßen bestimmt: in 24 Wells einer 48-Well-Platte wurden Glasplättchen eingelegt. Die mit Glasplättchen versehenen Wells wurden mit HEp-2-Zellen besät und bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens auf den Glasplättchen bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Drei Aliqouts der Stammlösung wurden aufgetaut und achtmal jeweils zehnfach in Infektionsmedium verdünnt, bis für jedes aufgetaute Aliqout eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-8} vorlag. Die Zellrasen der Zählplatte wurden dann entsprechend dem in Abschnitt 2.2 vorgestellten Verfahren mit den drei vorbereiteten Verdünnungsreihen infiziert.

72 Stunden nach Infektion wurde das Medium von den infizierten HEp-2-Monolayern abgesaugt und die Monolayer mit Methanol fixiert. Die Chlamydieneinschlüsse in den HEp-2-Zellen wurden dann im Immunfluoreszenzverfahren angefärbt und gezählt. Die Infektiosität der drei Aliqouts in IFU/ml ergab sich jeweils aus der Hochrechnung der Zählergebnisse für die verschiedenen Verdünnungsstufen. Als Wert für die Infektiosität der Stammlösung wurde der Mittelwert der Infektiositäten der drei Aliquots verwendet.

2.4 Für das Transmigrationsmodell verwendete Zellarten und Medien

Für das in vitro Gefäßwandmodell wurden humane Endothelzellen und humane glatte Gefäßmuskelzellen verwendet. Als Endothelzellen dienten humane Koronararterien-Endothelzellen (HCAEC) und humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC). Die HCAEC stammten von der Firma Clonetics, die HUVEC wurden aus humanen Nabelschnüren mittels Kollagenaseverdau isoliert. Die Endothelzellen wurden in geeigneten Medien (HCAEC: Endothelial Cell Growth Medium (EGM®) mit Zusätzen EGM®-MV-Bulletkit, Clonetics, St. Katharinen; HUVEC: Endothelial Cell Medium, Cell-Lining, Berlin) in Zellkulturflaschen propagiert und entsprechend den Empfehlungen der Lieferanten behandelt und umgesetzt.

Die glatten Gefäßmuskelzellen stammten ebenfalls von der Firma Clonetics. Auch sie wurden in geeigentem Medium (Smooth Muscle Cell Growth Medium (SmGM-2®) mit Zusätzen SmGM-2® Bulletkit, Clonetics, St. Katharinen) in Zellkulturflaschen

propagiert und entsprechend den Empfehlungen des Lieferanten behandelt und umgesetzt.

2.5 Isolation und Infektion von humanen Monozyten

Die in den Experimenten verwendeten monozytären Zellen wurden aus Buffy-coats von gesunden erwachsenen Blutspendern isoliert, die keine Medikamente einnahmen und nicht Allergiker waren (Angaben von der Blutspendezentrale der Universität Lübeck). Die Buffy-coats wurden mit PBS verdünnt, auf eine Ficollschicht (Histopaque® 1077, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) pipettiert und bei 500×g zentrifugiert. Die Zellschicht, die sich auf dem Ficoll gebildet hatte, wurde abpipettiert und mehrfach in PBS gewaschen.

Die gewaschene Zellsuspension wurde dann auf einen Percoll-Gradienten (Percoll®, Amersham, Freiburg) pipettiert und bei 500×g zentrifugiert. Die durch diese Behandlung gewonnenen Zellen wurden in Monozytenmedium suspendiert und in Zellkulturflaschen für 120 min. bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die in der Zellsuspension enthaltenen Monozyten adhärierten während dieser Zeit am Boden der Zellkulturflasche. Nach 120min. wurden die nichtadhärenten Zellen in den Kulturflaschen durch mehrfaches Waschen mit PBS entfernt. Die adhärenten Zellen wurden mit einem Plastik-Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgeschabt und in Monozytenmedium suspendiert.

Für die Infektion der Monozyten wurde zu dieser Zellsuspension eine so große Menge der vorbereiteten elementarkörperhaltigen Stammlösung gegeben, daß sich eine Infektionslast von 0,5 IFU Chlamydien pro Zelle ergab. Diese Suspension infizierter Zellen wurde bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Experimente wurden mit Zellen durchgeführt, deren Infektion zwischen 72 und 96 Stunden zurücklag.

Die Reinheit der isolierten Zellen wurde sowohl mikroskopisch als auch durch FACS-Analyse bestimmt. Für die mikroskopische Analyse wurden die Zellen in einem Cytospingerät auf einen Objektträger zentrifugiert und dann mit einem FITC-markierten monoklonalen Antikörper (IMAGEN®, DAKO, Hamburg) für Chlamydienantigene gefärbt. Unter einem Fluoreszenzmikroskop wurde bei 600×

Vergrößerung die Morphologie der Zellen beurteilt und das Verhältnis von infizierten zu nicht infizierten Zellen festgestellt (Abb. 3.1).

Für die FACS-Analyse wurde eine FACS-Färbetechnik etabliert,[76] die die gleichzeitige Anfärbung von zellmembranständigen Antigenen und intrazellulären Chlamydienantigenen ermöglicht. Eine sehr ähnliche Methode wurde später auch von einer anderen Arbeitsgruppe verwendet und veröffentlicht.[77]

Die FACS-Färbung verlief in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde CD14 als monozytenspezifisches zellmembranständiges Antigen mit einem monoklonalen phycoerythrinmarkierten Antikörper (Clone-Nr. TÜK4, DAKO, Hamburg) nach Standardtechnik angefärbt. Danach wurden die Zellen mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Cytofix/Cytoperm^{TM}, Pharmingen, San Diego) fixiert und permeabilisiert. Die intrazellulären Chlamydienantigene wurden dann mit einem FITC-markierten Antikörper (IMAGEN, DAKO, Hamburg) angefärbt. Diese Technik erlaubte es, in der FACS-Analyse sowohl zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen als auch zwischen Monozyten und nicht-Monozyten zu unterscheiden.

2.6 FACS-Experimente

In weiteren Experimenten wurde die in 2.5 beschriebene Doppelfärbetechnik verwendet, um über mehrere Tage hinweg die Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen bei infizierten und mock-infizierten Zellen zu vergleichen.
Da die Infektion der Monozyten nicht mit einer reinen Chlamydiensuspension, sondern mit einem Gemisch aus Chlamydien-EK und Hep-2-Zelltrümmern erfolgt, war es notwendig, für die Kontrollen eine Lösung herzustellen, die bis auf die Chlamydien-EK alle Bestandteile der Infektionslösung enthielt. Nur auf diese Weise kann man zwischen Effekten, die durch die Chlamydien verursacht sind, und Artefakten, die durch andere Bestandteile der Infektionslösung zustande kommen, unterscheiden. Zu diesem Zweck wurde bei der Herstellung der Infektionslösungen jedesmal unter exakt den gleichen Bedingungen und mit denselben Zellen wie in 2.2 beschrieben eine chlamydienfreie mock-Infektionslösung hergestellt. Die Kontrollzellen in den FACS-Experimenten wurden mit dieser Lösung mock-infiziert.

Für die FACS-Experimente wurden Monozyten wie in 2.5 beschrieben isoliert und mit 0,5 IFU pro Zelle Infektionslösung infiziert, beziehungsweise mit einem gleichgroßen Volumen mock-Infektionslösung mock-infiziert.

Die Zellen wurden wie in 2.5 beschrieben für intrazelluläre Chlamydien mit monoklonalen FITC-markierten Antikörpern (IMAGEN, DAKO, Hamburg) sowie für die Oberflächeneigenschaften CD 14, CD 16, HLA-A,B,C und HLA-DR mit monoklonalen phycoerythrinmarkierten Antikörpern (alle vier: DAKO, Hamburg) angefärbt. Die Färbungen fanden vor der Infektion an nicht infizierten Zellen und dann an den folgenden vier Tagen jeweils an infizierten und mock-infizierten Zellen statt.

2.7 Transmigrationsmodell

Das für die Transmigrationsexperimente benötigte in vitro Gefäßwandmodell sollte sowohl die Intima als auch die Muscularis einer Koronararterie nachbilden. Zu diesem Zweck wurde ein System aus Transwelleinsatz (oberes Kompartiment) und Zellkulturplatte (unteres Kompartiment) verwendet (Abb. 2.1).

Als Entsprechung der Gefäßintima wurden Endothelzellen auf der Polycarbonatmembran von Transwelleinsätzen (Transwell®, Costar, Bodenheim) bis zur Ausbildung eines Zellrasens angezüchtet. Als Muscularisentsprechung wurden CASMC-Zellen auf Glasplättchen auf dem Boden von Zellkulturplatten ebenfalls bis zur Ausbildung eines Zellrasens angezüchtet. Damit sich die Zellen besser anhefteten wurden sowohl die Transwellmembranen als auch die Glasplättchen auf dem Boden der Zellkulturplatten mit 0,5 prozentiger Gelatinelösung beschichtet.

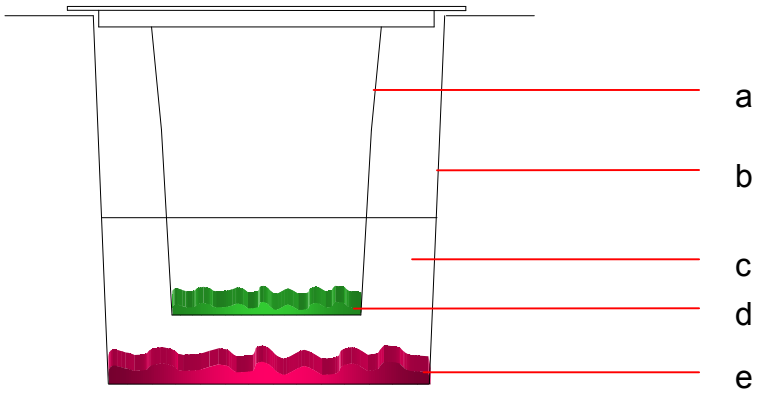


Abbildung 2.1: Aufbau des Transmigrationsmodells: ein Transwelleinsatz (a) wird in eine Vertiefung einer Zellkulturplatte (b) eingehängt. Auf der Polycarbonat-Bodenmembran des Transwelleinsatzes ist eine Ein-Zell-Schicht aus Endothelzellen gewachsen (d), eine Ein-Zell-Schicht aus glatten Muskelzellen (e) hat ein Glasplättchen auf dem Grund der Vertiefung überwachsen. Beide Zellrasen befinden sich in geeignetem Medium (c).

Die Endothelzellen wurden mittels Trypsinverdau (Reagent Pack^{TM}, Clonetics, St. Katharinen) aus den Zellkulturflaschen abgelöst und in Endothelzellmedium suspendiert. In jeden gelatine-behandelten Transwelleinsatz wurden 5×10^4 Endothelzellen gegeben. Am Tag nach der Zellaussaat und danach alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Nach sieben Tagen wurde die Ausbildung eines dichten Zellrasens durch FITC-BSA-Test[78;79] überprüft.

Für diesen Test wird eine FITC-BSA-haltige Stammlösung in den Transwelleinsatz pipettiert und dieser für eine Stunde in eine PBS gefüllte Vertiefung einer Zellkulturplatte eingehängt. Nach Ablauf einer Stunde wird die Menge des durch den Zellrasen diffundierten FITC-BSA bestimmt und im Verhältnis zur Stammlösung als Prozentzahl ausgedrückt. Diese Zahl repräsentiert die Durchmischung zwischen Transwellinhalt ('oberes Kompartiment') und der Vertiefung in der Kulturplatte ('unteres Kompartiment'). Die Transmigrationsexperimente wurden nur bei einem Ergebnis dieses Tests von unter 5 % durchgeführt.

In den Transmigrationsexperimenten wurde als Medium ausschließlich Endothelzellmedium eingesetzt. Als chemotaktischer Stimulus enthielt das Medium im unteren Kompartiment MCP-1 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), in einer Konzentration von 5 ng/ml.

Zu Beginn der Transmigrationsexperimente wurden die in 2.5 beschriebenen infizierten Leukozyten mit einem Plastikzellschaber von Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, in 50 ml Monozytenmedium suspendiert und für 5 min. bei 500×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet dann in 20 ml Endothelzellmedium resuspendiert und wieder für 5 min. bei 500×g zentrifugiert. Der Überstand aus diesem letzten Zentrifugationsschritt diente als Kontrolle in den Experimenten zur Infektionsübertragung durch transmigrierte Zellen.

Das Zellpellet wurde dann in Endothelzellmedium resuspendiert. Die Konzentration der Zellen wurde auf 10^6 Zellen pro Milliliter ingestellt. 100 µl dieser Zellsuspension (entsprechend 10^5 Zellen) wurden in das obere Kompartiment der Transwelleinsätze pipettiert. Die Transwelleinsätze wurden dann in die Vertiefungen der Zellkulturplatten eingehängt.

2.8 Quantifizierung der transmigrierten Zellen

Zu definierten Zeitpunkten (14, 24, 38 und 48 Stunden) sollte die Anzahl der transmigrierten Zellen sowie das Verhältnis von infizierten zu nicht infizierten transmigrierten Zellen bestimmt werden. Für die Quantifizierung der transmigrierten Zellen wurden die Transwelleinsätze in Zellkulturplatten ohne glatte Muskelzellen eingehängt. Für jeden Zeitpunkt wurden drei Ansätze vorbereitet. Bei der Quantifizierung der Transmigration in diesem Modell muß man aus methodischen Gründen zwischen zwei verschiedenen Fraktionen von transmigrierten Zellen unterscheiden. Die transmigrierten Zellen fanden sich nämlich einerseits auf dem Boden des unteren Kompartiments, andererseits adhärent an der Unterseite der Transwellmembran.

Nach der vorgesehenen Zeit wurden die Transwelleinsätze aus den Zellkulturplatten genommen. Die Unterseiten der Transwellmembranen wurden mit Methanol fixiert, getrocknet, mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit einem FITC-markierten monoklonalen Antikörper (IMAGEN®, DAKO, Hamburg) für Chlamydienantigene gefärbt. Die infizierten und nicht infizierten adhärenten Zellen wurden dann unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 1000× Vergrößerung in zehn Vergrößerungsfeldern gezählt, das Verhältnis von infizierten zu nicht infizierten Zellen konnte dabei

gleichzeitig ermittelt werden (Abb. 3.4). Die erhaltenen Zahlen wurden dann auf die Fläche der gesamten Transwellmembran hochgerechnet.

Für die Quantifizierung der Zellen am Boden des unteren Kompartiments wurde der Inhalt des unteren Kompartiments vorsichtig durch Pipettieren durchmischt. Die Zellkulturplatten wurden dann für 3 Minuten bei 500×g zentrifugiert, sodaß nach Zentrifugation alle im Medium treibenden Zellen auf dem Wellboden zu liegen kamen. Die Zellen wurden dann sofort unter einem invertierten Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Jena) bei 400× Vergrößerung in zehn Vergrößerungsfeldern gezählt. Die erhaltenen Zahlen wurden dann auf die Fläche des gesamten Wellbodens hochgerechnet.

Um auch für die Zellen im unteren Kompartiment das Verhältnis von infizierten zu nicht infizierten Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen anschließend in einem Cytospingerät auf einen Objektträger zentrifugiert, mit Methanol fixiert, getrocknet und mit einem einem FITC-markierten monoklonalen Antikörper (IMAGEN®, DAKO, Hamburg) für Chlamydienantigene gefärbt. Das Verhältnis von infizierten zu nicht infizierten transmigrierten Zellen wurde bestimmt und auf die Anzahl der Zellen vom Boden des unteren Kompartiments übertragen.

2.9 Infektionsübertragung durch transmigrierte Zellen

Für die Prüfung der Frage, ob transmigrierte infizierte Monozyten ihre Infektion an glatte Muskelzellen übertragen können, wurden die Transwelleinsätze in Zellkulturplatten eingehängt, in deren Vertiefungen sich auf Glasplättchen ein Zellrasen von CASMC-Zellen ausgebildet hatte.

In diesen Experimenten sollten Zellen im unteren Kompartiment ausschließlich durch intrazelluläre Chlamydien in den transmigrierten Leukozyten infiziert werden. Eine mögliche Infektion durch Chlamydien im Medium sollte deshalb ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurde für jeden Ansatz mit infizierten Leukozyten ein Kontrollansatz mit dem in 2.7 beschriebenen Zentrifugationsüberstand hergestellt. Die Zellkulturplatten wurden dann mit den Transwelleinsätzen für 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Transwelleinsätze entfernt und die Zellkulturplatten für weitere 48 Stunden inkubiert.

Die Infektion der glatten Muskelzellen wurde dann (Tag 4) und an den folgenden vier Tagen durch Immunfluoreszenzfärbung kontrolliert. Dabei kamen zwei verschiedene Färbetechniken zum Einsatz.

Für die Dokumentation der Ausbildung chlamydientypischer Einschlüsse in den glatten Muskelzellen wurden jeden Tag je ein Positivansatz und ein Kontrollansatz mit einem FITC-markierten monoklonalen Antikörper (IMAGEN®, DAKO, Hamburg) für Chlamydienantigene gefärbt. Um die intrazelluläre Lage dieser Einschlüsse zweifelsfrei zu dokumentieren, wurde jeden Tag ein weiterer Positivansatz mit einer neu etablierten Doppelfärbetechnik angefärbt.

Bei dieser Färbetechnik wurde zusätzlich zu den Chlamydienantigenen das Aktinskelett der Zellen mit Phalloidin-Rhodamin (TEBU, Frankfurt am Main) dargestellt. Die Anfärbung der Chlamydienantigene erfolgte in Sandwich Technik mit einem für cLPS spezifischen Erstantikörper (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. Helmut Brade vom Forschungszentrum Borstel) und einem FITC-markierten Zweitantikörper. Ein intrazellulärer Chlamydieneinschluß sollte dabei durch die Unterbrechung oder Verschiebung des Aktinskeletts der infizierten Zelle auffallen.

Trotz intensiver Bemühungen ist es bei den durchgeführten Experimenten nicht gelungen, auch den endothelialen Monolayer im oberen Kompartiment des Modells auf ähnliche Weise zu untersuchen: diese Arbeit gibt daher keine Antwort auf die Frage nach der Infektionsübertragung auf Endothelzellen.

3 Ergebnisse

3.1 Reinheit der in den Experimenten verwendeten Leukozyten

Die mikroskopische Beurteilung von Cytospins der in den Experimenten verwendeten Zellen ergab für alle Experimente jeweils mehr als 80 % infizierte Monozyten, der Rest der Zellen waren nicht infizierte Lymphozyten (Abb. 3.1).

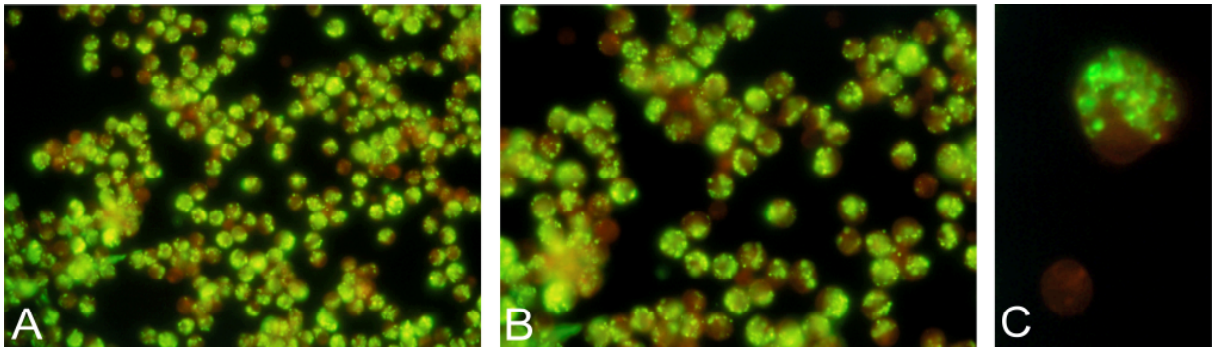


Abbildung 3.1: Mikroskopischer Aspekt der in den Experimenten verwendeten Zellen (Cytospins). (A) und (B) Übersicht, (C) Detail: die Chlamydieneinschlußkörper sind mit FITC markierten monoklonalen Antikörpern grün fluoreszierend angefärbt, in (C) sieht man einen mehrere Einschlüsse enthaltenden Monozyten (oben) sowie einen nicht infizierten Lymphozyten (unten)

Zur Bestätigung dieser mikroskopischen Beurteilung wurden die Zellen zusätzlich wie in 2.5 beschrieben mit FACS-Technik untersucht. Bei der FACS-Analyse wurden die Zellen zunächst nach ihrer Größe (forward scatter, FSC) und Granulierung (sideward scatter, SSC) dargestellt. In dieser Darstellung können Monozyten und Lymphozyten als charakteristische Populationen dargestellt und voneinander abgegrenzt werden. Die so erhaltenen Gruppen von Zellen wurden dann hinsichtlich ihrer Positivität für die Marker Chlamydien bzw. CD14 beurteilt. Dabei zeigte sich, daß die Monozytengruppe insgesamt deutlich positiv sowohl für Chlamydien als auch CD14 waren. Die Lymphozytengruppe dagegen war für beide Marker negativ. Auch in der FACS-Analyse machte die Monozytengruppe bei allen Experimenten mehr als 80 % der Zellen aus: so konnte das Ergebnis der mikroskopischen Beurteilung durch FACS-Technik bestätigt werden (Abb. 3.2).

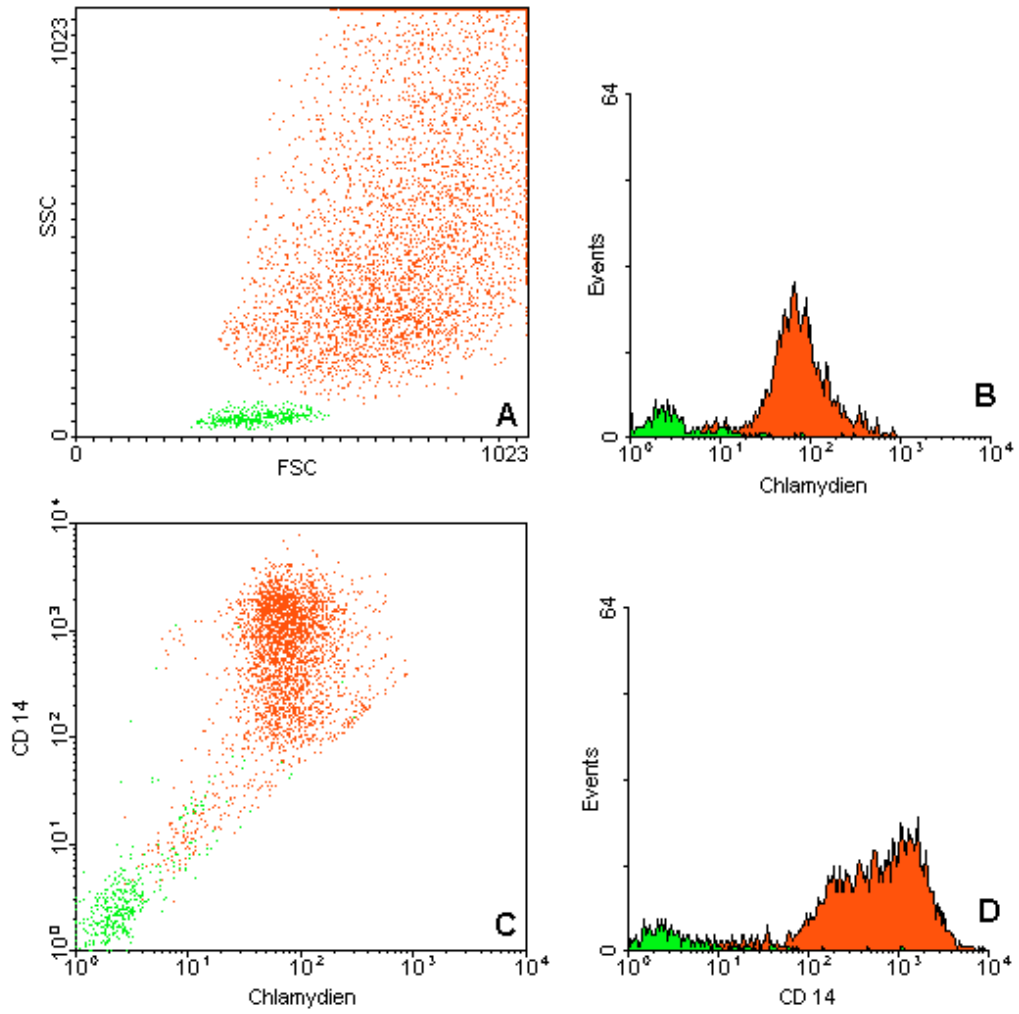


Abbildung 3.2: FACS-Analyse der verwendeten Zellen (A) Dotplot "forward scatter" und "sideward scatter": Monozyten- (rot) und Lymphozytengrupen (grün), (B) Histogramm für Chlamydienpositivität der beiden Gruppen, (C) Dotplot der Positivität für Chlamydien und CD 14, (D) Histogramm für CD 14-Positivität: (C) und (D) zeigen die Monozytengruppe (rot) deutlich positiv für beide Marker, die Lymphozytengruppe (grün) ist dagegen für beide Marker negativ.

3.2 FACS-Experimente

Bei der FACS-Analyse der infizierten und mock-infizierten Zellen zeigte sich bis zum vierten Tag nach Infektion allein ein deutlicher Unterschied in der Oberflächenexprimierung der MHC-Klasse-I Eigenschaften (HLA-A,B,C). Die mock-infizierten Zellen zeigten den normalen spontanen Anstieg der MHC-Klasse-I Expression, wie er in Monozytenkulturen üblicherweise auftritt (Abb 3.3). Die mit *C. pneumoniae* infizierten Monozyten dagegen zeigen keine Veränderung in der

Expression von MHC-Klasse-I Molekülen. Der in der Literatur beschriebene Anstieg von CD14[80] war unter diesen Bedingungen nicht zu beobachten, vielmehr zeigten infizierte und mock-infizierte Monozyten keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich ihrer CD14 Expression. Die Untersuchung der Marker MHC-Klasse-II (HLA-DR) und CD16 zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen infizierten und mock-infizieren Zellen.

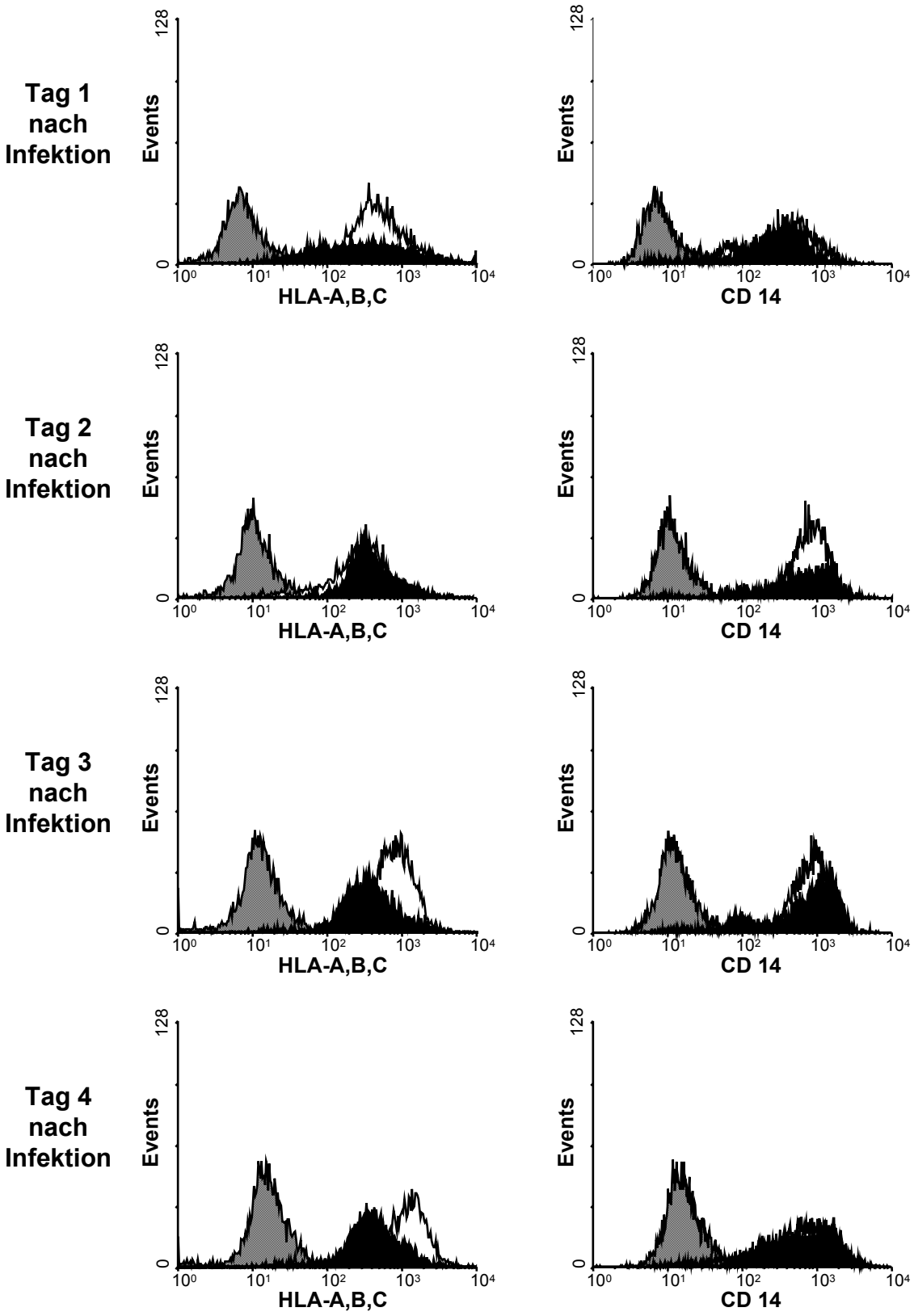


Abbildung 3.3: FACS-Analyse der Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen (HLA-A,B,C, links) sowie CD14 (rechts): Histogramm ohne Antikörpermarkierung (grau), infizierte Zellen (schwarz), mock-infizierte Zellen (weiß). Im Verlauf der ersten vier Tage nach Infektion nimmt die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen bei den mock-infizierten Zellen zu, während sie bei den infizierten Zellen auf dem Ausgangsniveau bleibt. Die Oberflächenexpression von CD14 zeigt keinen deutlichen Unterschied zwischen infizierten und mock-infizierten Zellen.

3.3 Transmigrationsmodell

3.3.1 Quantifizierung der transmigrierten Zellen

In den durchgeführten Experimenten nahm die Gesamtanzahl der transmigrierten Zellen über den beobachteten Zeitraum von 48 Stunden annähernd linear zu. Erwartungsgemäß stieg dabei die Anzahl der Zellen auf dem Grund der Zellkulturplatte ungehindert an, wohingegen die Anzahl der Zellen, die an der Unterseite der Transwellmembran adhärierten vor allem in den ersten 24 Stunden annähernd linear zunahm, um danach auf annähernd gleichem Niveau zu bleiben (Abb 3.4, 3.5).

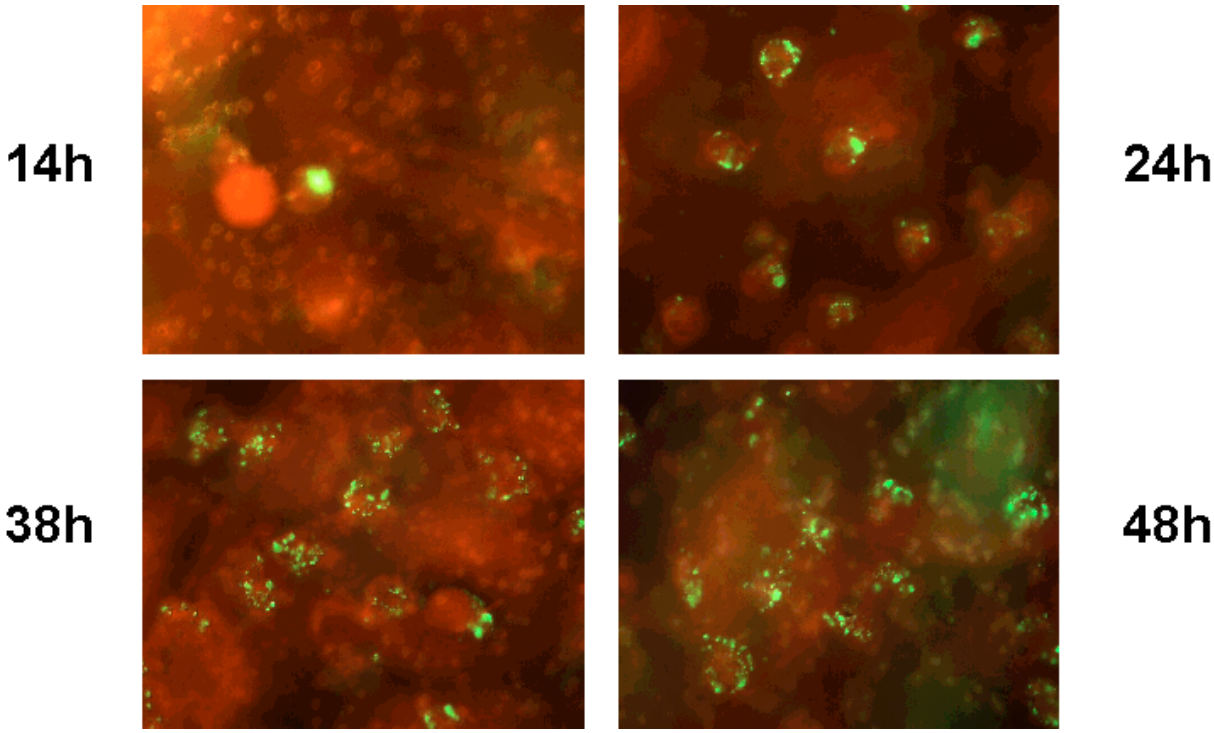


Abbildung 3.4: Immunfluoreszenzfärbung der Unterseite der Transwellmembran. Die Anzahl der transmigrierten Zellen nimmt bis zum Zeitpunkt 38 Stunden zu. Es finden sich vor allem infizierte Monozyten adhärent an der Membran.

Dies kam vermutlich dadurch zustande, daß sich an der Unterseite der Transwellmembran ein Gleichgewicht zwischen abwandernden und neu hinzukommenden Zellen ausbildete.

Die Gesamtanzahl der transmigrierten Zellen unterschied sich in den durchgeführten Experimenten recht deutlich: nach 48 Stunden waren zwischen 13% und 37% der eingesetzten Leukozyten transmigriert (Standardabweichung 8,7%).

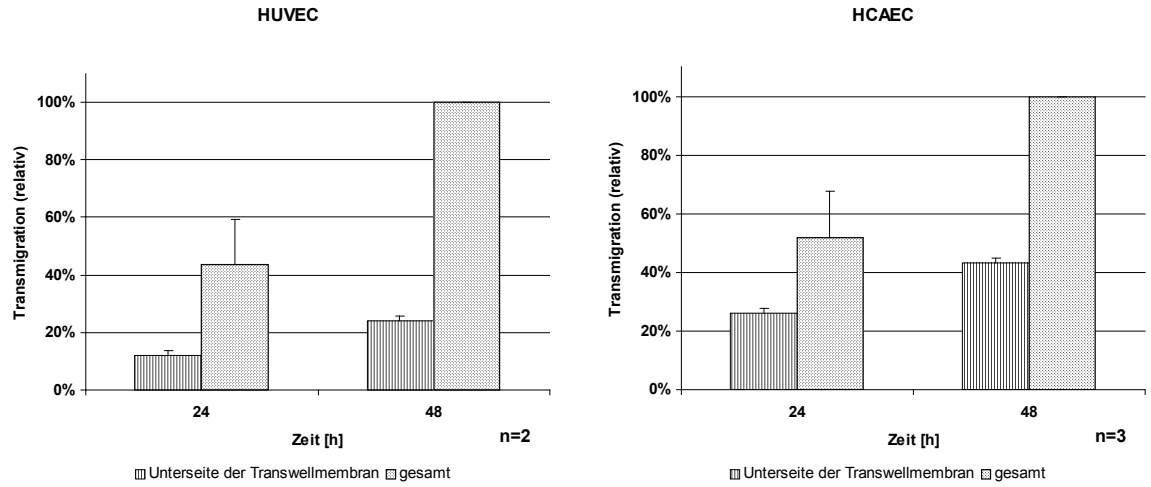


Abbildung 3.5: Verlauf der Transmigrationsexperimente. Sowohl bei Vorexperimenten mit HUVEC als Endothel (links) als bei den Experimenten mit HCAEC als Endothel (rechts) stieg die Gesamtzahl der transmigrierten Zellen ungefähr linear an. (Fehlerbalken entspricht Standardabweichung)

3.3.2 Infektionsstatus der transmigrierten Zellen

Bei der Betrachtung des Verhältnisses von infizierten und nicht infizierten transmigrierten Zellen fiel zunächst auf, daß zu Beginn vor allem die nicht infizierten Lymphozyten transmigrierten. Dieses Verhältnis verschob sich aber im Verlauf des Experimentes deutlich zugunsten der infizierten Monozyten (Abb. 3.6). Nach 48 Stunden betrug ihr Anteil 84% (Standardabweichung 8%).

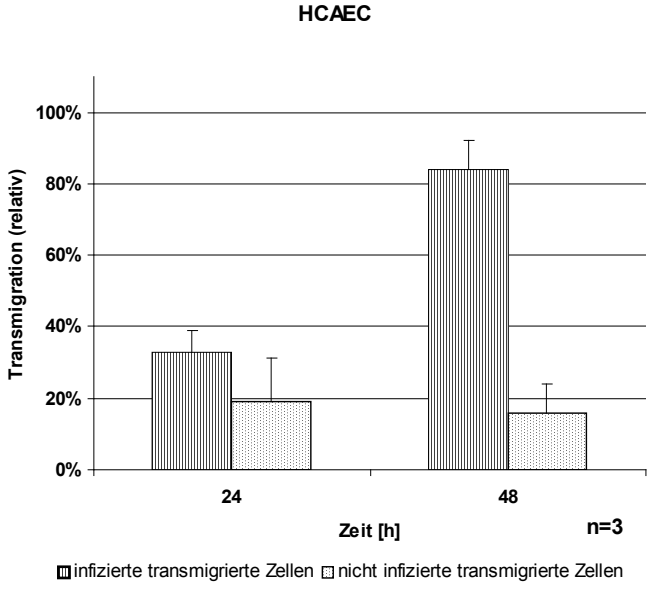


Abbildung 3.6: Transmigrationsexperiment mit HCAEC als Endothel: im Verlauf des Experiments nimmt der Anteil der infizierten Zellen stetig zu. (Fehlerbalken entspricht Standardabweichung)

3.3.3 Infektionsübertragung durch transmigrierte Zellen

Bei der Immunfluoreszenzfärbung der CASMC-Zellrasen vom Boden des unteren Kompartiments zeigten sich ab dem fünften Tag des Experimentes chlamydientypische Einschlüsse (Abb. 3.7).

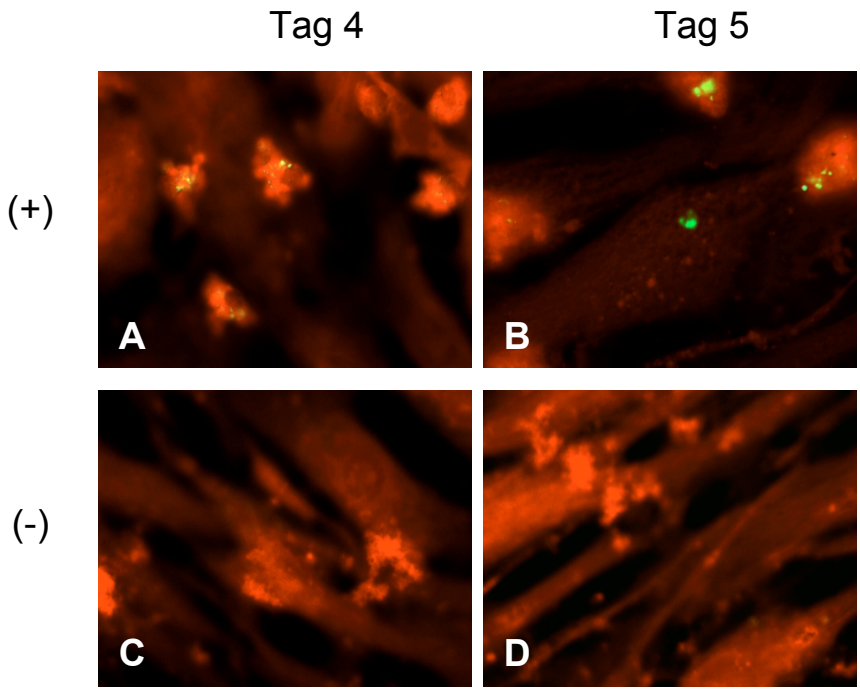
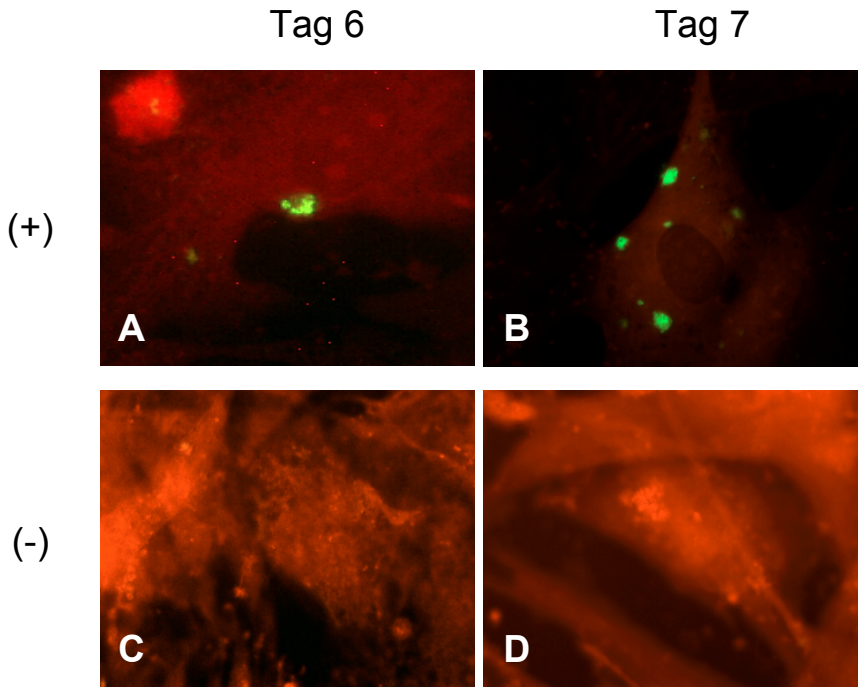


Abbildung 3.7: Immunfluoreszenzfärbungen der glattem Gefäßmuskelzellschicht von Tag 4 und Tag 5, (+) mit infizierten transmigrierten Leukozyten, (-) Negativkontrolle. (A) An Tag 4 erkennt man infizierte Monozyten auf den CASMC-Zellen, (B) an Tag 5 fanden sich erste Einschlüsse in den CASMC-Zellen, (C und D) in den Negativkontrollen fanden sich keine Immunfluoreszenz-positiven Strukturen.

Die Kontrollen an den beiden darauffolgenden Tagen zeigten eine Zunahme der Einschlüsse an Zahl und Größe (Abb. 3.8). Diese Einschlüsse hatten oft eine untypische Form. Statt typisch kreisrund waren die in diesen Experimenten beobachteten Einschlüsse oft oval bis länglich-oval.



Abbildng 3.8: Immunfluoreszenzfärbungen der glatten Gefäßmuskelzellschicht von Tag 6 und Tag 7, (+) mit infizierten transmigrierten Leukozyten, (-) Negativkontrolle. (A) Tag 6: die Einschlüsse haben im Vergleich zum Vortag an Größe zugenommen, (B) Tag 7: eine glatte Muskelzelle mit mehreren Einschlüssen, (C und D) in den Negativkontrollen fanden sich keine Immunfluoreszenz-positiven Strukturen.

In der Doppelfärbung zeigte sich, daß die Einschlüsse das Aktinskellett der CASMC-Zellen verdrängten und unterbrachen. Die beobachteten Einschlüsse lagen also intrazellulär (Abb. 3.9 und 3.10). In den Negativkontrollen konnte im Verlauf der Experimente kein Einschluß gefunden werden.

Die Effektivität dieser Infektionsübertragung war gering: nur etwa auf jede tausendste infizierte und transmigrierte Zelle auf dem Wellboden kam eine Einschlußbildung in einer glatten Muskelzelle.

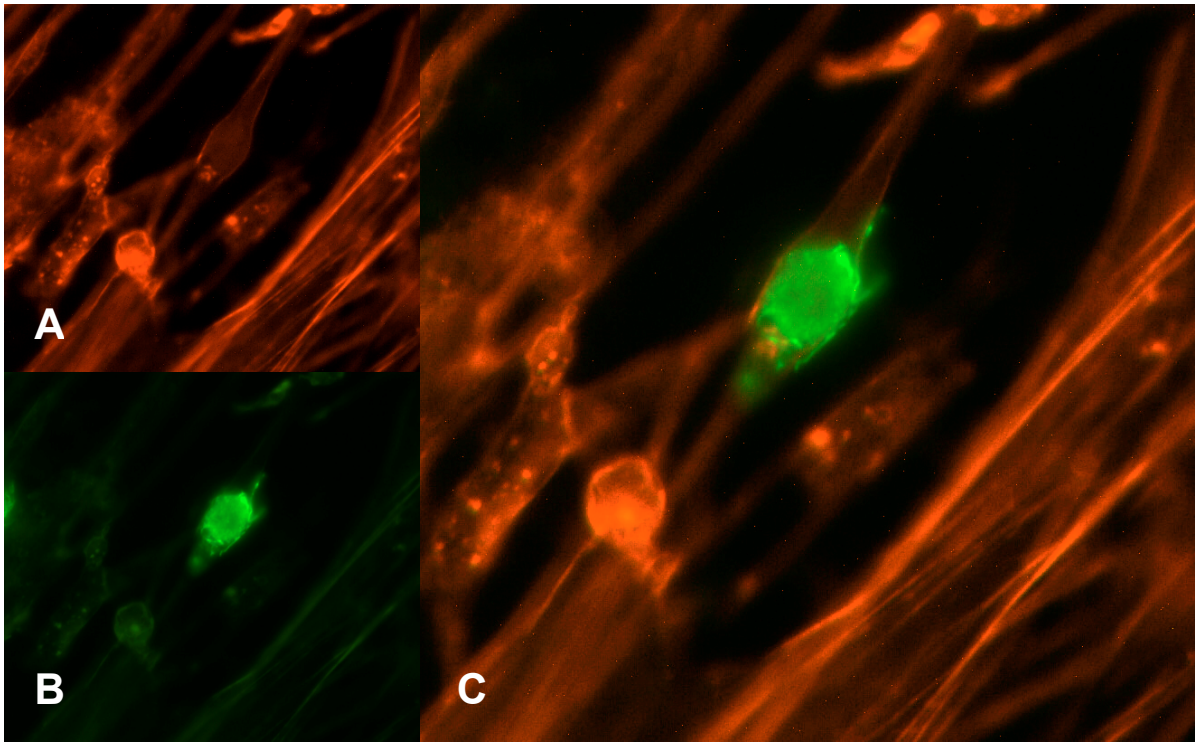


Abbildung 3.9: Doppelfärbung der infizierten CASMC-Zellen von Tag 7. (A) Färbung des Aktinskeletts: die Zelle in der Bildmitte ist aufgetrieben, die am Rande der Auftreibung verlaufenden Aktinfilamente scheinen zur Seite gedrängt. (B) An der Stelle der Auftreibung findet sich ein chlamydienpositiver Einschluß. (C) Überlagerung der Aufnahmen A und B

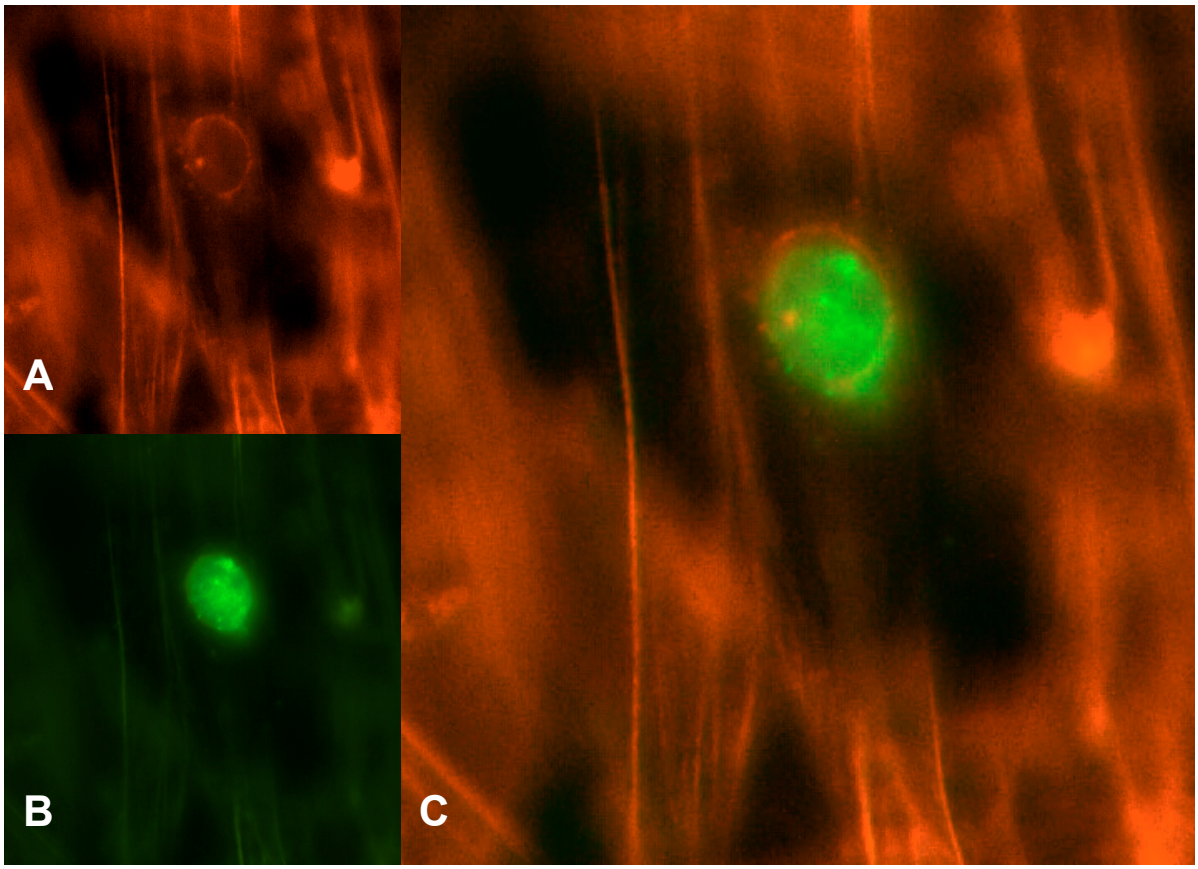


Abbildung 3.10: Doppelfärbung der infizierten CASMC-Zellen von Tag 7. (A) Färbung des Aktinskeletts: in der Zelle in der Bildmitte sieht man eine runde, aktinpositive Struktur. (B) An derselben Stelle findet sich ein die runde Struktur ausfüllender chlamydienpositiver Einschluß. (C) Überlagerung der Aufnahmen A und B

4 Diskussion

4.1 Übersicht

Mit den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimenten wird der Versuch unternommen, die Infektion der arteriellen Gefäßwand durch infizierte Blutmonozyten als Vektorzellen nachzustellen.

Zu diesem Zweck wurden zunächst die infizierten Blutmonozyten selbst näher betrachtet: mittels FACS-Technik wurde der Einfluß der Chlamydieninfektion auf die Oberflächenexpression immunologisch wichtiger Oberflächenmoleküle untersucht (Kapitel 4.2). Der folgende Teil der Untersuchung behandelte die Frage der transendothelialen Migration dieser infizierten Monozyten: für die Untersuchung dieser Frage wurde ein in vitro Modell der Gefäßwand entwickelt (Kapitel 4.3). Im letzten Teil der Experimente schließlich wurde im selben in vitro Modell die Weitergabe der Infektion von transmigrierten, infizierten Blutmonozyten an glatte Muskelzellen der Gefäßwand untersucht (Kapitel 4.4).

4.2 Expression von MHC-Klasse-I Molekülen in infizierten Monozyten

Im Laufe ihrer Evolution haben intrazelluläre Krankheitserreger vielfältige Wege gefunden, der Immunantwort ihres Wirtes zu entgehen und so ihr Überleben zu sichern. Eine mögliche Strategie ist es, die Expression der MHC-Klasse-I Moleküle zu beeinflussen, um so der Kontrolle durch CD8-positive T-Lymphozyten zu entgehen.

Die Präsentation von Antigenen von phagozytierten Bakterien erfolgt nach der klassischen Vorstellung mit MHC-Klasse-II Molekülen: nach der Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom werden MHC-Klasse-II Moleküle mit Antigenen der lysierten Bakterien beladen, gelangen an die Zelloberfläche und präsentieren dort die bakteriellen Antigene an CD4-positive T-Lymphozyten.[81] Die Funktion der MHC-Klasse-I Moleküle ist nach klassischer Vorstellung die Präsentation cytosolischer, durch das Proteasom abgebauter Antigene an CD8-positive T-Lymphozyten.

Mehrere neuere Untersuchungen weisen den MHC-Klasse-I Molekülen eine erweiterte Funktion zu.[82-84] Über einen "alternate pathway" können auch Antigene von phagozytierten Bakterien prozessiert und über MHC-Klasse-I präsentiert werden. Eine Arbeit aus dem Jahr 1999 zeigt, daß dieser neuentdeckte Mechanismus eine Rolle bei der Immunantwort gegen *Mycobacterium tuberculosis* spielt.[85]

Wie schon in der Einleitung erwähnt, verhindert *C. pneumoniae* auf bisher noch unbekanntem Weg die Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom,[86] die Präsentation von Chlamydienantigenen über MHC-Klasse-II Moleküle ist damit wahrscheinlich nicht hinreichend für die Immunantwort des Wirtes. Da *C. pneumoniae* nicht in das Cytosol der Wirtszelle eindringt und also auch nicht über den klassischen MHC-Klasse-I Weg verarbeitet wird, könnte der neuentdeckte "alternate pathway" entscheidend für die Immunantwort gegen *C. pneumoniae* sein. Die Einflußnahme auf die MHC-Klasse-I Expression der Wirtszellen würde dann eine wichtige Überlebensstrategie für *C. pneumoniae* darstellen.

Eine derartige Überlebensstrategie ist für das verwandte Bakterium *Chlamydia trachomatis* bereits ausführlich untersucht und bis auf molekulare Ebene beschrieben. Hierbei wird ein für die Expression von MHC-Klasse-I Molekülen notwendiger Transkriptionsfaktor (RFX5) unter Vermittlung bakterieller Proteine abgebaut, sodaß die MHC-Klasse-I Expression und damit die Präsentation bakterieller Epitope vermindert wird.[87] Darüberhinaus nimmt *Chlamydia trachomatis* auch Einfluß auf die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen.[88]

Die für diese Arbeit durchgeführten FACS-Experimente zeigen nun auch eine Einflußnahme auf die MHC-Klasse-I Expression von Makrophagen durch *C. pneumoniae*. Wenn Blutmonozyten in Zellkultur gehalten werden, so differenzieren sie sich im Laufe einiger Tage zu Makrophagen. Dieser Prozeß wird in der experimentellen Forschung zur Erzeugung von Makrophagen genutzt.[89-92] Makrophagen unterscheiden sich von Monozyten auch durch eine vermehrte Oberflächenexpression des MHC-Klasse-I Proteins, die Expression dieses Proteins nimmt im Laufe der Differenzierung zu Makrophagen zu. In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten war der Anstieg der Oberflächenexpression des MHC-Klasse-I Proteins bei den mock-infizierten Zellen deutlich nachzuweisen. Bei den mit

C. pneumoniae infizierten Zellen dagegen blieb sie ungefähr auf dem Ausgangsniveau. Offenbar verhindert die Anwesenheit von *C. pneumoniae* diesen Anstieg (Abb. 4.1).

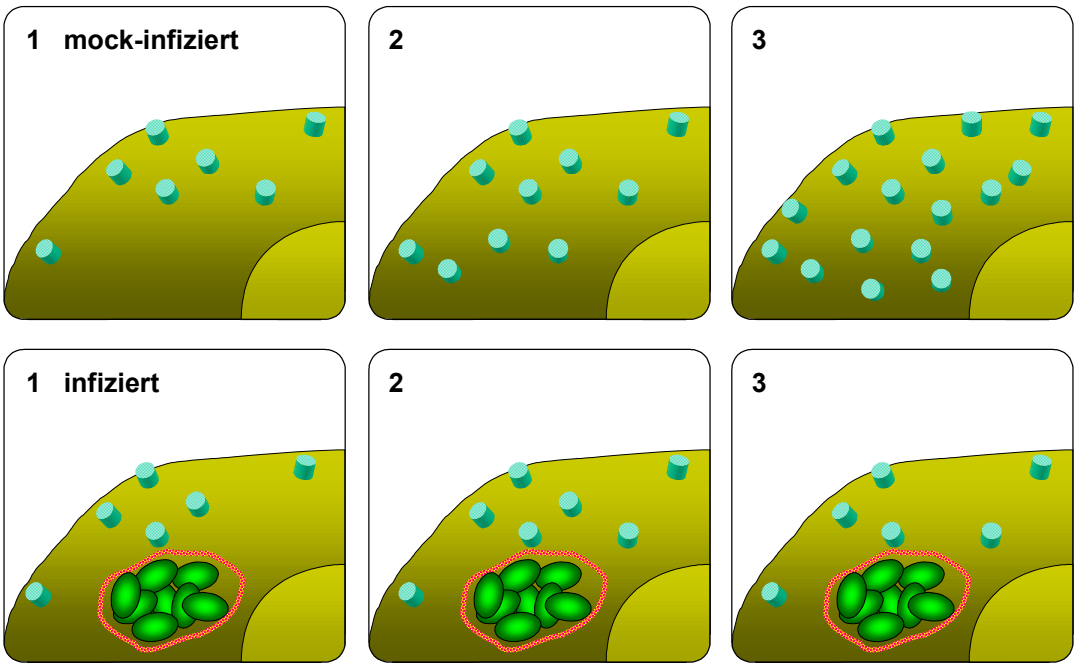


Abbildung 4.1: In den durchgeführten Experimenten zeigten die mock-infizierten Zellen (obere Reihe 1-3) den erwarteten Anstieg von MHC-Klasse-I (türkise Zylinder). Bei den infizierten Zellen (untere Reihe 1-3) bleibt dieser Anstieg aus.

In der Literatur gibt es bisher wenig beschriebene FACS-Experimente, die infizierte und nicht infizierte Zellen vergleichen. Eine Arbeit aus dem Jahr 2000[93] beschreibt die Herunterregulation von MHC-Klasse-I Molekülen in infizierten Zellen und führt diesen Effekt auf die vermehrte Produktion von Interleukin-10 zurück. Bei dieser Untersuchung zeigten sich keine bedeutenden Unterschiede in der Expression von MHC-Klasse-II Molekülen. Eine Untersuchung von Heinemann und Mitarbeitern aus dem Jahr 1996[80] beschreibt die Hochregulation von CD14 Molekülen in infizierten Zellen, ohne jedoch die molekularen Mechanismen dahinter zu untersuchen.

In den beiden genannten Arbeiten wurden Monozytenzellinien eingesetzt, als Negativkontrolle wurden nichtinfizierte Zellen verwendet. In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten wurden dagegen primäre humane Monozyten verwendet, die Negativkontrolle bestand aus mock-infizierten Zellen. Die Wahl der mock-Infektion für die Kontrollzellen ist vor allem bei Experimenten mit intrazellulären Krankheitserregern wichtig, da nur so unspezifische Effekte, die durch eine Reaktion

der Zellen auf das Anzuchtmedium, auf Zelltrümmer der Wirtszellen etc. zustande kommen, kontrolliert werden können. Beide immuncytometrischen Arbeiten beachten diese mögliche Fehlerquelle nicht. Die von Heinemann und Mitarbeitern postulierte Hochregulation von CD14 Molekülen durch *C. pneumoniae*[80] könnte auf unspezifischen Effekten beruhen, die durch die gewählte Negativkontrolle nicht ausreichend kontrolliert waren.

In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte die Expression der Oberflächenmarker CD14, CD16 und MHC-Klasse-II keine deutlichen Unterschiede zwischen infizierten und mock-infizierten Zellen.

Die Zusammenschau eigener und fremder Ergebnisse zeigt, daß *C. pneumoniae* einen spezifischen Einfluß auf die Expression von MHC-Klasse-I Molekülen, nicht aber auf die Expression anderer Oberflächenmarker, ausübt. Im Hinblick auf die in den letzten Jahren aufgekommene Vorstellung vom "alternate pathway" der Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I Moleküle, könnte diese Einflußnahme entscheidend zum intrazellulären Überleben von *C. pneumoniae* beitragen.

4.3 Transmigration im in vitro Gefäßwandmodell

Das in dieser Arbeit vorgestellte in vitro Modell erlaubt es, unter kontrollierten Bedingungen einige Mechanismen zu betrachten, die bei einer Infektion der Gefäßwand durch *C. pneumoniae* wahrscheinlich bedeutend sind. Den ersten Schritt zur Infektion der arteriellen Gefäßwand stellt dabei die transendotheliale Migration der infizierten Monozyten, also die Überwindung der Endothelzellschicht, dar.

Bei der Untersuchung der Infektion der Gefäßwand auf dem postulierten Weg mußte zunächst bewiesen werden, daß die infizierten Makrophagen überhaupt zur Transmigration fähig sind. Gleichzeitig sollten die Experimente eine Vorstellung davon vermitteln, wie viele der eingesetzten Zellen über die Zeit transmigrieren.

Das dazu notwendige in vitro Modell sollte die Bedingungen in vivo so gut wie möglich nachstellen, darum wurden als Endothel die anspruchsvollen HCAEC-Zellen verwandt, die aus menschlichen Koronararterien isoliert wurden. Als

Gefäßmuskelzellen im unteren Kompartiment des Transwellsystems dienten in allen Experimenten CASMC-Zellen, die ebenfalls aus menschlichen Koronararterien stammen. Durch die Verwendung dieser primären Zellen sollte das Modell den Bedingungen in vivo möglichst nahekommen. Als Porengröße der Transwelleinsätze wurden 3 µm gewählt, so sollte sicher gestellt werden, daß die Zellen bei ihrer Transmigration eine schwierige Barriere überwinden müssen, die dem subendothelialen Bindegewebe in vivo vergleichbar ist. Die meisten anderen Arbeiten zur Leukozytentransmigration verwenden ausschließlich das venöse HUVEC-Endothel[94] sowie oft Transwell-Einsätze mit Porengrößen zwischen 5 und 8 µm.[78;95;96]

Das Chemokin MCP-1 wurde in diesem Modell als Chemoattractant eingesetzt, weil es für die Entstehung der Arteriosklerose von entscheidender Bedeutung ist,[97] was in mehreren tierexperimentellen Arbeiten gezeigt werden konnte. Die lokale Überexpression dieses Chemokins initiiert die Bildung von Atheromen in einem Kaninchenmodell,[98] in Apo-E defizienten Mäusen beschleunigt die Expression von MCP-1 die Bildung von Atheromen,[99] während das Fehlen des MCP-1 Rezeptors CCR-2 in dieser Mäuseart eine deutlich verminderte Bildung von Atheromen zur Folge hat.[100] Eine andere Mauszüchtung, nämlich Tiere, die das menschliche Apolipoprotein B überexprimieren, werden durch das Fehlen des Gens für MCP-1 vor Arteriosklerose geschützt.[101] Alle diese tierexperimentellen Befunde weisen auf die Bedeutung dieses Chemokins in der Entstehung der Arteriosklerose. Beim Menschen finden sich bereits im "fatty-streak"-Stadium der Arteriosklerose MCP-1 produzierende Zellen in der Gefäßwand,[102] wahrscheinlich ist auch beim Menschen dieses Chemokin der entscheidende Faktor, der Leukozyten in die Gefäßwand leitet.

Die bisher einzige Veröffentlichung, in der die Leukozytentransmigration im Zusammenhang mit *C. pneumoniae* untersucht wurde, verwendet Transwelleinsätze mit einer Porengröße von 6,5 µm und HUVEC als Endothelzellen. In der Studie wird allein die Transmigration nicht infizierter Monozyten und neutrophiler Granulozyten durch bereits infiziertes Gefäßendothel untersucht, eine Nachstellung des postulierten Infektionsweges in die Gefäßwand findet also nicht statt.[103]

Die Ergebnisse, die mit dem vorgestellten in vitro-Modell gewonnen wurden, zeigen, daß ein erheblicher Teil der infizierten Monozyten nach 48 Stunden transmigriert ist, die von *Chlamydia pneumoniae* infizierten Monozyten sind also dazu fähig, die endotheliale Barriere zu überwinden. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß auch in vivo ein Eindringen zirkulierender infizierter Zellen in die Gefäßwand möglich ist.

4.4 Infektionsübertragung durch transmigrierte Zellen

In der Frage nach der Rolle von *C. pneumoniae* bei der Arteriosklerose wird in letzter Zeit der persistenten Infektion mit diesem Erreger immer mehr Aufmerksamkeit gewidmet. Die beiden humanpathogenen Chlamydienarten *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* können langwierige und oft wiederkehrende Krankheiten verursachen: so verursacht *C. trachomatis* eine chronische sexuell übertragbare genitourinäre Infektion, die schleichend verläuft und bei Frauen eine häufige Ursache der Unfruchtbarkeit ist,[104] sowie eine Form der chronischen Arthritis.[105] Die durch *C. pneumoniae* verursachte Pneumonie kann sehr lange Verläufe haben und ist manchmal auch unter normalerweise ausreichender antibiotischer Therapie nicht zur Ausheilung zu bringen.[106;107] Obwohl es im Einzelfall schwierig sein kann, zwischen Reinfektion und chronisch persistierender Infektion zu unterscheiden, geht man heute davon aus, daß es in einem großen Teil solcher Fälle zu einer persistenten Infektion mit dem Bakterium gekommen ist.

Als Persistenz der Chlamydien bezeichnet man das intrazelluläre Vorkommen lebendiger Chlamydien in Wirtszellen, wobei sich die Bakterien nicht oder nur in sehr geringem Maß[71] aus diesen Zellen anzüchten lassen. Bei der persistierenden Infektion bilden die Chlamydien atypische Einschlüsse, sie sind weniger stoffwechselaktiv (und daher resistenter gegen Antibiotika) und zeigen eine veränderte Genexpression.

Unter Laborbedingungen kann man die Entwicklung der Persistenz durch Entzug von Nährstoffen oder durch Zugabe des Cytokins IFNγ erzeugen, beides bewirkt einen Mangel an Tryptophan in den Chlamydien: der Nährstoffentzug direkt, IFNγ über die Induktion des tryptophanverbrauchenden Enzyms Indolamin-2,3-Dioxigenase.[108;109]

Die veränderte Einschlußmorphologie wurde mit der Lichtmikroskopie vor allem an IFNγ-behandelten infizierten Epithelzellen untersucht, als atypisch werden hierbei in einer Studie kleinere, nicht gleichmäßig angefärbte Einschlüsse bezeichnet,[110] der bessere Nachweis von atypischen Einschlüssen gelingt mittels Elektronenmikroskopie, hierbei gelten vergrößerte, unregelmäßig geformte und weniger dichte Retikularkörper als atypisch.[12] Bei genetischen Untersuchungen an IFNγ-behandelten infizierten Epithelzellen konnte mit der RT-PCR gezeigt werden, daß in den persistierenden Chlamydien -anders als in Chlamydien, die dem normalen Vermehrungszyklus folgen- für die DNA-Replikation wichtige Gene hochreguliert, für die bakterielle Teilung zuständige Gene dagegen herunterreguliert werden.[111] Weitere Studien ergaben, daß *C. pneumoniae* auch menschliche Monozyten infizieren und in ihnen persistieren kann.[71;112] Nach stattgehabter Monozyteninfektion ist sie ausserdem gegenüber Antibiotika resistent.[113]

Durch Kol und Mitarbeiter wurde das Hitzeschockprotein-60 von *C. pneumoniae* (cHsp60) innerhalb von Makrophagen aus menschlichen Atheromen nachgewiesen.[114] Dieses Protein bewirkt die LDL-Oxidierung von Makrophagen, das Chlamydien-Lipopolysaccharid (cLPS) bewirkt die Umwandlung von Makrophagen zu Schaumzellen durch LDL-Aufnahme, diese beiden Mechanismen gelten als wichtige Schritte der Atheromentstehung.[115] Zusammenfassend scheint es *C. pneumoniae* möglich zu sein, durch ihren veränderten Zustand als persistenter Krankheitserreger nicht nur innerhalb einer mobilen Vektorzelle zu überleben, sondern durch ihre Pathogenitätsfaktoren cHSP-60 und cLPS auch indirekt Einfluß auf die Atheromenstehung zu nehmen.

Mit der Immunfluoreszenzmikroskopie von menschlichen arteriosklerotischen Läsionen wurden Einschlußkörper von *C. pneumoniae* nicht nur in Makrophagen, sondern auch in glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen.[75] Es ist jedoch unklar, wie diese Infektion der Gefäßmuskelzellen zustande kommt. Mit dem vorgestellten Modell sollte auch der Frage nachgegangen werden, ob die transmigrierten Monozyten ihre Chlamydieninfektion an glatte Gefäßmuskelzellen weitergeben können. Aus der Literatur war bisher lediglich bekannt, daß sich *C. pneumoniae* in diesen Zellen vermehren kann.[71]

In den vorgestellten Experimenten kam es zu einer Weitergabe der Infektion an die glatten Gefäßmuskelzellen im unteren Kompartiment des Transwellsystems. Eine Parallele zu den vermuteten Vorgängen in vivo ist dabei, daß die Infektion der Gefäßmuskelzellen durch transmigrierte Monozyten zustande kam. Dabei beweisen die mitgeführten Kontrollen, daß die infektiösen Chlamydien aus den transmigrierten Monozyten und nicht etwa aus dem Medium stammten. Zudem ist wichtig, daß für diese Infektion keine der sonst üblichen Hilfsmittel wie Zentrifugation oder die Zugabe von Cycloheximid zum Versuchsmedium notwendig waren. Mit der eigens für diese Arbeit etablierten Immunfluoreszenzdoppelfärbung konnte die intrazelluläre Lage der Chlamydieneinschlüsse bewiesen werden. Die Effektivität dieser Übertragung durch transmigrierte Zellen war dabei mit einer Übertragungsrate um 1:1000 deutlich geringer als die Übertragungsraten um 1:10, wie sie bei Cokultur von infizierten Monozyten und glatten Gefäßmuskelzellen beobachtet werden.[116]

Die Morphologie der in den Experimenten auftretenden Einschlüsse in den glatten Gefäßmuskelzellen scheint atypisch zu sein: die gefundenen Einschlüsse sind selten kreisrund und sie färben sich auch nicht so intensiv an wie typische Einschlüsse in Epithelzellen. Damit ähnelt die hier beobachtete Einschlußmorphologie derjenigen, die Pantoja und Mitarbeiter in ihrer Arbeit über persistente Infektion in Epithelzellen beschrieben haben.[110] Diese Befunde legen die Vermutung nahe, bei der hier beobachteten Infektion könnte es sich um eine persistente Infektion handeln. Um diese Vermutung zu beweisen wären allerdings weitere, beispielsweise auch elektronenmikroskopische Experimente nötig.

4.5 Ausblick

Die durch diese in vitro Untersuchung gewonnenen Ergebnisse tragen zum Verständnis der Vorgänge in vivo bei. Das neu etablierte Transmigrationsmodell steht für anschließende Untersuchungen zur Verfügung. Dabei ist sein Einsatz nicht auf die Untersuchung der Transmigration selbst -wie zum Beispiel bei der der Untersuchung der Frage, welchen Einfluß bestimmte Bedingungen auf die Effizient von Transmigration und Infektionsübertragung haben- beschränkt.
Durch die Trennung in Kompartimente können die unterschiedlichen Zellarten getrennt voneinander untersucht werden. So könnte etwa die Genexpression in

Endothel- und Gefäßmuskelschicht im Verlauf der Transmigration mittels RT-PCR getrennt voneinander betrachtet werden.

5 Zusammenfassung (Abstract)

Das obligat intrazelluläre Bakterium *Chlamydia pneumoniae* ist als Erreger von Infektionen des Respirationstraktes bekannt. Darüberhinaus besteht ein Zusammenhang zwischen *C. pneumoniae* Infektion und der Arteriosklerose, einer chronisch entzündlichen Erkrankung der Gefäßwand.

Der Vorstellung folgend, daß *C. pneumoniae* in infizierten Monozyten persistiert und im Inneren dieser Zellen in die Gefäßwand einwandert, wurde in einem neu etablierten in vitro Gefäßwandmodell die transendotheliale Migration infizierter Monozyten untersucht. Daneben wurde mittels FACS-Technik der Einfluß der Infektion auf die Expression der wichtigen Oberflächenmarker MHC-I, MHC-II, CD14 und CD16 auf infizierten und mock-infizierten humanen Monozyten untersucht.

Die FACS-Untersuchungen ergaben, daß die Expression von MHC-Klasse-I Molekülen bei infizierten Zellen deutlich geringer anstieg als bei mock-infizierten Zellen. Diese Beobachtung weist auf eine Einflußnahme von *C. pneumoniae* auf die Antigenpräsentation der befallenen Zellen, die wahrscheinlich wesentlich zum intrazellulären Überleben des Bakteriums beiträgt.

In den Transmigrationsexperimenten konnte gezeigt werden, daß zwischen 13% und 37% der eingesetzten Monozyten transmigrierten. Nach ihrer Transmigration übertrugen die infizierten Monozyten ihre Infektion an glatte Gefäßmuskelzellen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstützen die Vorstellungen zur Infektion der Gefäßwand durch transendothelial migrierende infizierte Zellen. Das relativ einfache in vitro Gefäßwandmodell steht für anschließende molekular- und zellbiologische Untersuchungen zur Verfügung.

6 Literaturverzeichnis

1. Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae fam. nov.* and *Simkaniaceae fam. nov.*, each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the indentification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1999;**49**:415-40.

2. Schachter J, Stephens RS, Timms P, Kuo CC, Bavoil PM, Birkelund S et al. Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;**51**:249.

3. Kuo CC, Chen HH, Wang SP, Grayston JT. Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR. *J Clin Microbiol* 1986;**24**:1034-7.

4. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995;**8**:451-61.

5. Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N Engl J Med* 1986;**315**:161-8.

6. Saikku P, Wang SP, Kleemola M, Rusanen E, Brander E, Grayston JT. An epidemic of mild pneumonia due to an unusual strain of *Chlamydia psittaci. J Infect Dis* 1985;**151**:832-9.

7. Grayston JT, Kuo CC, Campbell LA, Wang SP. *Chlamydia pneumoniae sp. nov*. for *Chlamydia sp.* strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol* 1989;**39**:88-90.

8. McClarty G. Chlamydial metabolism as inferred from the complete genome sequence. In: Stephenson RS, ed.: *Chlamydia*: intracellular biology, pathogenesis and immunity. 1. Aufl., 69-100, ASM Press, Washington DC, 1999.

9. Hackstadt T. Cell biology. In: Stephenson RS, ed.: *Chlamydia*: intracellular biology, pathogenesis and immunity. 1. Aufl., 101-138, ASM Press, Washington DC, 1999.

10. Kuo CC, Chi EY, Grayston JT. Ultrastructural study of entry of *Chlamydia* strain TWAR into HeLa cells. *Infect Immun* 1988;**56**:1668-72.

11. Hatch TP. Developmental biology. In: Stephenson RS, ed.: *Chlamydia*: intracellular biology, pathogenesis and immunity. 1. Aufl., 29-68, ASM Press, Washington DC, 1999.

12. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent *Chlamydiae*: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 1994;**58**:686-99.

13. Kalayoglu MV, Hahn D, Byrne GI. *Chlamydia* infection and pneumonia. In: Paradise L, Friedman H, eds.: Opportunistic intracellular bacteria and immunity. 1. Aufl., 233-53, Plenum Publishing, New York, 1998.

14. Block SL, Hammerschlag MR, Hedrick J, Tyler R, Smith A, Roblin P et al. *Chlamydia pneumoniae* in acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1997;**16**:858-62.

15. Block SL. Causative pathogens, antibiotic resistance and therapeutic considerations in acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1997;**16**:449-56.

16. Hammerschlag MR. The Role of *Chlamydia* in upper respiratory tract infections. *Curr Infect Dis Rep* 2000;**2**:115-20.

17. Soldatski IL, Vinogradova TV, Semyonov AV, Onufrieva EK, Konno VI. *Chlamydia* infection in children with acquired subglottic stenosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003;**67**:177-9.

18. Cosentini R, Blasi F, Raccanelli R, Rossi S, Arosio C, Tarsia P et al. Severe community-acquired pneumonia: a possible role for *Chlamydia pneumoniae*. *Respiration* 1996;**63**:61-5.

19. Balis E, Boufas A, Iliopoulos I, Legakis NJ, Zerva L. Severe community-acquired pneumonia with acute hypoxemic respiratory failure due to primary infection with *Chlamydia pneumoniae* in a previously healthy adult. *Clin Infect Dis* 2003;**36**:e155-7.

20. Stamm WE. Chlamydial infections. In: Braunwald E, Hauser SE, Fauci AS, Longo DL, Jameson JL, Kasper DL, eds.: Harrison's principles of internal medicine. 15. Aufl., 1075-84, McGraw-Hill, New York, 2001.

21. Grayston JT. Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *Clin Infect Dis* 1992;**15**:757-61.

22. Storey C, Lusher M, Yates P, Richmond S. Evidence for *Chlamydia pneumoniae* of non-human origin. *J Gen Microbiol* 1993;**139**:2621-6.

23. Jackson M, White N, Giffard P, Timms P. Epizootiology of *Chlamydia* infections in two free-range koala populations. *Vet Microbiol* 1999;**65**:255-64.

24. Reed KD, Ruth GR, Meyer JA, Shukla SK. *Chlamydia pneumoniae* infection in a breeding colony of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Emerg Infect Dis* 2000;**6**:196-9.

25. Berger L, Volp K, Mathews S, Speare R, Timms P. *Chlamydia pneumoniae* in a free-ranging giant barred frog (*Mixophyes iteratus*) from Australia. *J Clin Microbiol* 1999;**37**:2378-80.

26. Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH et al. A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *J Infect Dis* 1990;**161**:618-25.

27. Wang JH, Liu YC, Cheng DL, Yeng MY, Chen YS, Chen BC. Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* in Taiwan. *Scand J Infect Dis* 1993;**25**:565-8.

28. Vetter KM, Barnes RC, Oberle MW, Rosero-Bixby L, Schachter J. Seroepidemiology of *Chlamydia* in Costa Rica. *Genitourin Med* 1990;**66**:182-8.

29. Marton A, Karolyi A, Szalka A. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;**11**:139-42.

30. Einarsson S, Sigurdsson HK, Magnusdottir SD, Erlendsdottir H, Briem H, Gudmundsson S. Age specific prevalence of antibodies against *Chlamydia pneumoniae* in Iceland. *Scand J Infect Dis* 1994;**26**:393-7.

31. Paltiel O, Kark JD, Leinonen M, Saikku P. High prevalence of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*; determinants of IgG and IgA seropositivity among Jerusalem residents. *Epidemiol Infect* 1995;**114**:465-73.

32. Martinez MA, Kogan R, Silva JJ, Pinto ME, Vidal C, Huppo H. Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* in Chile. *Scand J Infect Dis* 1999;**31**:103-4.

33. Ikezawa S. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in acute respiratory tract infection and detection of anti-*Chlamydia pneumoniae*-specific IgE in Japanese children with reactive airway disease. *Kurume Med J* 2001;**48**:165-70.

34. Kauppinen M,.Saikku P. Pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae*: prevalence, clinical features, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis* 1995;**21 Suppl 3**:S244-52.

35. Aldous MB, Grayston JT, Wang SP, Foy HM. Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* TWAR infection in Seattle families, 1966-1979. *J Infect Dis* 1992;**166**:646-9.

36. Maass M, Dalhoff K. Transport and storage conditions for cultural recovery of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995;**33**:1793-6.

37. Maass M, Harig U. Evaluation of culture conditions used for isolation of *Chlamydia pneumoniae*. *Am J Clin Pathol* 1995;**103**:141-8.

38. Campbell LA, Perez MM, Hamilton DJ, Kuo CC, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;**30**:434-9.

39. Gaydos CA, Eiden JJ, Oldach D, Mundy LM, Auwaerter P, Warner ML et al. Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with community-acquired pneumonia by polymerase chain reaction enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 1994;**19**:157-60.

40. Corsaro D, Valassina M, Venditti D, Venard V, Le Faou A, Valensin PE. Multiplex PCR for rapid and differential diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in respiratory infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;**35**:105-8.

41. Fenelon LE, Mumtaz G, Ridgway GL. The in-vitro antibiotic susceptibility of *Chlamydia pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1990;**26**:763-7.

42. Cooper MA, Baldwin D, Matthews RS, Andrews JM, Wise R. In-vitro susceptibility of *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) to seven antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1991;**28**:407-13.

43. Chien SM, Pichotta P, Chan CK. Treatment of community-aqcuired pneumonia. A multicenter, double-blind, randomized study comparing clarithromycin with erythromycin. *Chest* 1993;**103**:697-701.

44. Roblin PM, Hammerschlag MR. In vitro activity of a new 8-methoxyquinolone, BAY 12-8039, against *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;**42**:951-2.

45. Roblin PM, Hammerschlag MR. Microbiologic efficacy of azithromycin and susceptibilities to azithromycin of isolates of *Chlamydia pneumoniae* from adults and children with community-acquired pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;**42**:194-6.

46. Gieffers J, Solbach W, Maass M. In vitro susceptibilities *of Chlamydia pneumoniae* strains recovered from atherosclerotic coronary arteries. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;**42**:2762-4.

47. Gupta S, Leatham EW, Carrington D, Mendall MA, Kaski JC, Camm AJ. Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation* 1997;**96**:404-7.

48. Muhlestein JB, Anderson JL, Carlquist JF, Salunkhe K, Horne BD, Pearson RR et al. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease: primary clinical results of the ACADEMIC study. *Circulation* 2000;**102**:1755-60.

49. Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A, Beck E, Mautner B. Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS Pilot Study. ROXIS Study Group. *Lancet* 1997;**350**:404-7.

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

51. Gupta S, Camm AJ. *Chlamydia pneumoniae*, antimicrobial therapy and coronary heart disease: a critical overview. *Coron Artery Dis* 1998;**9**:339-43.

52. Anand V, Gupta S. Antibiotic therapy in coronary heart disease--where do we currently stand? *Cardiovasc Drugs Ther* 2001;**15**:209-10.

53. Muhlestein JB. Antibiotic treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003;**14**:605-14.

54. O'Connor CM, Dunne MW, Pfeffer MA, Muhlestein JB, Yao L, Gupta S et al. Azithromycin for the secondary prevention of coronary heart disease events. *JAMA* 2003;**290**:1459-66.

55. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH et al. Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988;**2**:983-6.

56. Thom DH, Grayston JT, Siscovick DS, Wang SP, Weiss NS, Daling JR. Association of prior infection with *Chlamydia pneumoniae* and angiographically demonstrated coronary artery disease. *JAMA* 1992;**268**:68-72.

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

58. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ* 2000;**321**:199-204.

59. Wald NJ, Law MR, Morris JK, Zhou X, Wong Y, Ward ME. *Chlamydia pneumoniae* infection and mortality from ischaemic heart disease: large prospective study. *BMJ* 2000;**321**:204-7.

60. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P et al. *Chlamydia pneumoniae* IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *BMJ* 2000;**321**:208-13.

61. Kalayoglu MV, Libby P, Byrne GI. *Chlamydia pneumoniae* as an emerging risk factor in cardiovascular disease. *JAMA* 2002;**288**:2724-31.

62. Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection *of Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb* 1993;**13**:1501-4.

63. Neureiter D, Heuschmann P, Stintzing S, Kolominsky-Rabas P, Barbera L, Jung A et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not *of Helicobacter pylori* in symptomatic atherosclerotic carotids associated with enhanced serum antibodies, inflammation and apoptosis rate. *Atherosclerosis* 2003;**168**:153-62.

64. Kuo CC, Shor A, Campbell LA, Fukushi H, Patton DL, Grayston JT. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis* 1993;**167**:841-9.

65. Kuo CC, Coulson AS, Campbell LA, Cappuccio AL, Lawrence RD, Wang SP et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques in the walls of arteries of lower extremities from patients undergoing bypass operation for arterial obstruction. *J Vasc Surg* 1997;**26**:29-31.

66. Blasi F, Denti F, Erba M, Cosentini R, Raccanelli R, Rinaldi A et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques of aortic aneurysms. *J Clin Microbiol* 1996;**34**:2766-9.

67. Ramirez JA. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. The *Chlamydia pneumoniae*/Atherosclerosis Study Group. *Ann Intern Med* 1996;**125**:979-82.

68. Maass M, Bartels C, Engel PM, Mamat U, Sievers HH. Endovascular presence of viable *Chlamydia pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;**31**:827-32.

69. Yang ZP, Kuo CC, Grayston JT. Systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* following intranasal inoculation in mice. *J Infect Dis* 1995;**171**:736-8.

70. Moazed TC, Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA. Evidence of systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* via macrophages in the mouse. *J Infect Dis* 1998;**177**:1322-5.

71. Gaydos CA, Summersgill JT, Sahney NN, Ramirez JA, Quinn TC. Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infect Immun* 1996;**64**:1614-20.

72. Wong YK, Dawkins KD, Ward ME. Circulating *Chlamydia pneumoniae* DNA as a predictor of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1999;**34**:1435-9.

73. Boman J, Gaydos CA. Polymerase chain reaction detection of *Chlamydia pneumoniae* in circulating white blood cells. *J Infect Dis* 2000;**181 Suppl 3**:S452-4.

74. Campbell LA, O'Brien ER, Cappuccio AL, Kuo CC, Wang SP, Stewart D et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* TWAR in human coronary atherectomy tissues. *J Infect Dis* 1995;**172**:585-8.

75. Ouchi K, Fujii B, Kudo S, Shirai M, Yamashita K, Gondo T et al. *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic and nonatherosclerotic tissue. *J Infect Dis* 2000;**181 Suppl 3**:S441-3.

76. Koch M, van Zandbergen G, Laskay T, Solbach W, Maass M. Flow cytometric analysis of *Chlamydia pneumoniae* infected monocytes. *Int J Med Microbiol* 2001;**291 Suppl 32**:V22 (Abstract)

77. Young JL, Smith L, Matyszak MK, Gaydos CA. HLA-B27 Expression Does Not Modulate Intracellular *Chlamydia Trachomatis* Infection of Cell Lines. *Infect Immun* 2001;**69**:6670-5.

78. Dunzendorfer S, Rothbucher D, Schratzberger P, Reinisch N, Kahler CM, Wiedermann CJ. Mevalonate-dependent inhibition of transendothelial migration and chemotaxis of human peripheral blood neutrophils by pravastatin. *Circ Res* 1997;**81**:963-9.

79. Ludwig A, Petersen F, Zahn O, Schröder JM, Flad HD, Brandt E. The CXC-chemokine neutrophil-activating peptide-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with interleukin-8 receptors CXCR-1 and CXCR-2. *Blood* 1997;**90**:4588-97.

80. Heinemann M, Susa M, Simnacher U, Marre R, Essig A. Growth of *Chlamydia pneumoniae* induces cytokine production and expression of CD14 in a human monocytic cell line. *Infect Immun* 1996;**64**:4872-5.

81. Anonymus. Peptides presented by MHC class II molecules are generated in acidified endocytic vesicles. In: Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra D, eds.: Immunobiology, 4. Aufl., 128-9, Garland Publishing, New York, 1999.

82. Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 1993;**361**:359-62.

83. Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 1995;**267**:243-6.

84. Campbell DJ, Serwold T, Shastri N. Bacterial proteins can be processed by macrophages in a transporter associated with antigen processing-independent, cysteine protease-dependent manner for presentation by MHC class I molecules. *J Immunol* 2000;**164**:168-75.

85. Canaday DH, Ziebold C, Noss EH, Chervenak KA, Harding CV, Boom WH. Activation of human CD8+ abTCR+ cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. *J Immunol* 1999;**162**:372-9.

86. Al Younes HM, Rudel T, Meyer TF. Characterization and intracellular trafficking pattern of vacuoles containing *Chlamydia pneumoniae* in human epithelial cells. *Cell Microbiol* 1999;**1**:237-47.

87. Zhong G, Liu L, Fan T, Fan P, Ji H. Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon-gamma-inducible major histocompatibility complex I expression in *Chlamydia*-infected cells. *J Exp Med* 2000;**191**:1525-34.

88. Zhong G, Fan T, Liu L. *Chlamydia* inhibits interferon-gamma-inducible major histocompatibility complex II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *J Exp Med* 1999;**189**:1931-7.

89. Maxeiner H, Husemann J, Thomas CA, Loike JD, El Koury J, Silverstein S. Complementary roles for scavenger receptor A and CD36 of human monocyte-derived macrophages in adhesion to surfaces coated with oxidized low-density lipoproteins an in secretion of H2O2. *J Exp Med* 1998;**188**:2257-65.

90. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 2001;**103**:1057-63.

91. Kacani L, Bánki Z, Zwirner J, Schennach H, Bajtay Z, Erdei A et al. C5a and C5a(desArg) enhance the susceptibility of monocyte-derived macrophages to HIV infection. *J Immunol* 2001;**166**:3410-5.

92. Strizki JM, Albright AV, Sheng H, O'Connor M, Perrin L, Gonzáles-Scarano F. Infection of primary human microglia and monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus Type 1 isolates: evidence of differential tropism. *J Virol* 1996;**70**:7654-62.

93. Caspar-Bauguil S, Puissant B, Nazzal D, Lefevre JC, Thomsen M, Salvayre R et al. *Chlamydia pneumoniae* induces interleukin-10 production that down-regulates major histocompatibility complex class I expression. *J Infect Dis* 2000;**182**:1394-401.

94. Shen Y, Rattan V, Sultana C, Kalra VK. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes. *Am J Physiol* 1996; **271**:E711-7.

95. Hauzenberger E, Hauzenberger D, Hultenby K, Holgersson J. Porcine endothelium supports transendothelial migration of human leukocyte subpopulations: anti-porcine vascular cell adhesion molecule antibodies as species-specific blockers of transendothelial monocyte and natural killer cell migration. *Transplantation* 2000;**69**:1837-49.

96. Wiedermann CJ, Schratzberger P, Dunzendorfer S, Kiechl S, Reinisch N, Kahler CM et al. Human and bovine endothelial cell monolayers are differentially activated for neutrophil transmigration by human plasma. *Ann N Y Acad Sci* 1997;**832**:135-46.

97. Ikeda U, Matsui K, Murakami Y, Shimada K. Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. *Clin Cardiol* 2002;**25**:143-7.

98. Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T et al. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**:115-20.

99. Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ et al. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;**19**:1518-25.

100. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;**394**:894-7.

101. Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG et al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 1999;**103**:773-8.

102. Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Takahashi K. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum Pathol* 1993;**24**:534-9.

103. Molestina RE, Miller RD, Ramirez JA, Summersgill JT. Infection of human endothelial cells with *Chlamydia pneumoniae* stimulates transendothelial migration of neutrophils and monocytes. *Infect Immun* 1999;**67**:1323-30.

104. Cates W, Wasserheit JN. Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol* 1991;**164**:1771-81.

105. Villareal C, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. Persistent *Chlamydiae* and chronic arthritis. *Arthritis Res* 2002;**4**:5-9.

106. Hammerschlag MR, Chirgwin K, Roblin PM, Gelling M, Dumornay W, Mandel L et al. Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. *Clin Infect Dis* 1992;**14**:178-82.

107. Grayston JT. Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *J Infect Dis* 2000;**181 Suppl 3**:S402-10.

108. Summersgill JT, Sahney NN, Gaydos CA, Quinn TC, Ramirez JA. Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* growth in HEp-2 cells pretreated with gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 1995;**63**:2801-3.

109. Mehta SJ, Miller RD, Ramirez JA, Summersgill JT. Inhibition *of Chlamydia pneumoniae* replication in HEp-2 cells by interferon-gamma: role of tryptophan catabolism. *J Infect Dis* 1998;**177**:1326-31.

110. Pantoja LG, Miller RD, Ramirez JA, Molestina RE, Summersgill JT. Characterization of *Chlamydia pneumoniae* persistence in HEp-2 cells treated with gamma interferon. *Infect Immun* 2001;**69**:7927-32.

111. Byrne GI, Ouellette SP, Wang Z, Rao JP, Lu L, Beatty WL et al. *Chlamydia pneumoniae* expresses genes required for DNA replication but not cytokinesis during persistent infection of HEp-2 cells. *Infect Immun* 2001;**69**:5423-9.

112. Airenne S, Surcel HM, Alakarppa H, Laitinen K, Paavonen J, Saikku P et al. *Chlamydia pneumoniae* infection in human monocytes. *Infect Immun* 1999;**67**:1445-9.

113. Gieffers J, Füllgraf H, Jahn J, Klinger M, Dalhoff K, Katus HA et al*. Chlamydia pneumoniae* infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation* 2001;**103**:351-6.

114. Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation* 1998;**98**:300-7.

115. Kalayoglu MV, Indrawati, Morrison RP, Morrison SG, Yuan Y, Byrne GI. Chlamydial virulence determinants in atherogenesis: the role of chlamydial lipopolysaccharide and heat shock protein 60 in macrophage-lipoprotein interactions. *J Infect Dis* 2000;**181 Suppl 3**:S483-9.

116. Dechend R, Gieffers J, Dietz R, Joerres A, Rupp J, Luft FC et al. Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibition reduces *Chlamydia pneumoniae*-induced cell interaction and activation. *Circulation* 2003;**108**:261-5.

7 Publikationen

7.1 Publikation

Rupp J, Koch M, van Zandbergen G, Solbach W, Brandt E, Maass M. Transmission of *Chlamydia pneumoniae* infection from blood monocytes to vascular cells in a novel transendothelial migration model. *FEMS Microbiol Lett*: 2005;**242**:203-8.

7.2 Kongreßbeiträge

- Koch M, van Zandbergen G, Gieffers J, Laskay T, Solbach W, Maass M. Transendothelial migration of *Chlamydia pneumoniae* infected monocytes in an in vitro vessel model. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) 2001* Vortrag V50
- Koch M, van Zandbergen G, Laskay T, Solbach W, Maass M. Flow-cytometric analysis of *Chlaymdia pneumoniae* infected monocytes. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) 2001* Vortrag V22
- Koch M, van Zandbergen G, Laskay T, Solbach W, Maass M. Transendothelial migration of *Chlamydia pneumoniae* infected monocytes. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) 2001* Poster Präsentation J20
- van Zandbergen G, Hermann N, Koch M, Maass M, Solbach W, Laskay T. *Chlamydia pneumoniae* invades granulocytes and delays apoptosis. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) 2001* Vortrag V51
- Rupp J, Koch M, van Zandbergen G, Gieffers J, Maass M. Chlamydia pneumoniae infected blood monocytes induce angioproliferative signal transduction in a transendothelial migration model. *Euroconference „Interactions between innate and adaptive immunity in mammalian defense against bacterial infections“ 2002* Poster Präsentation

8 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Prof. Dr. Maaß, für die Überlassung dieses Themas und für die hervorragende und geduldige Betreuung.

Für die Einarbeitung in allgemeine und chlamydientypische Arbeitstechniken im Laboratorium danke ich den technischen Assistentinnen Frau Gravenhorst, Frau Hellberg und Frau Lüdemann.

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund Dr. Ger van Zandbergen, der mich nicht nur in die Geheimnisse von FACS-Apparat und Monozytenisolation sondern außerdem auch noch in die Mysterien der niederländischen Sprache einweihte.

9 Lebenslauf

Name:	Marcus Werner Koch
geboren am:	21.2.1977
in:	Lübeck
Eltern:	Petra Koch, geb. Mueller-Waegener, *15.11.1949
	Dr. med. Werner Koch, *19.11.1915, †7.11.2000
Schwester:	Caroline Koch, *22.06.1972

1983-1987	Grundschule am Stadtpark, Lübeck
1987-1996	Gymnasium Ernestinenschule, Lübeck
1996	Abitur: Note 1,5
1996-1997	Zivildienst, Krankenhaus "Rotes Kreuz", Lübeck
1997-1999	Studium der Humanmedizin (Vorklinik) an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
Sept. 1999	Physikum: Note: befriedigend (2,66)
1999-2002	Studium der Humanmedizin (Klinik) an der Medizinischen Universität Lübeck, Famulaturen: Gastroenterologie, Pathologie (Freiburg), Lungenheilkunde (Newcastle, GB), Innere Medizin (Edinburgh, GB), Chirurgie, Hämatologie (Lübeck)
April 2000	Beginn der Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, die experimentellen Untersuchungen waren im April 2002 abgeschlossen
Sept. 2000	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: gut (2)
Sept. 2002	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: gut (1,66)
2002-2003	Praktisches Jahr an der Universität Groningen (Martiniziekenhuis, Rijksuniversiteit Groningen, Niederlande)
Oktober 2003	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: sehr gut (1), Gesamtnote der ärztlichen Prüfung: sehr gut (1,49)
seit April 2004	Assistenzarzt in Facharztausbildung im Fach Neurologie am Universitair Medisch Centrum Groningen, Niederlande