

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

Proliferative *in vitro* Stimulation des Endothelin-1-
Systems in vaskulären Zellen durch die Infektion
mit *Chlamydia pneumoniae*

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Jan Marco Kern
aus München

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Maaß
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Zabel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.2010
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 23.04.2010

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	4
1.1. <i>Chlamydia pneumoniae</i> – Klassifikation und Grundlagen	4
1.2. Entdeckung und Hintergründe	5
1.2.1. <i>Chlamydia trachomatis</i> und <i>Chlamydia psittaci</i>	6
1.3. Epidemiologie	7
1.4. <i>Chlamydia pneumoniae</i> als Pathogen	7
1.5. Diagnostik und Therapie	8
1.5.1. Diagnostik	8
1.5.2. Therapie	9
1.6. <i>Chlamydia pneumoniae</i> im Kontext der Arteriosklerose	10
1.7. Endothelin-1-System	11
1.8. Endothelin-1 im Kontext der Arteriosklerose	13
1.9. Zielsetzung	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Anzucht von <i>Chlamydia pneumoniae</i>	16
2.1.1. Bestimmung der IFU-Konzentration	17
2.2. Anzucht von koronararteriellen glatten Muskelzellen	18
2.3. Anzucht von venösen und koronararteriellen Endothelzellen	19
2.4. Infektionsversuche	20
2.5. Isolierung der mRNA	21
2.6. Reverse Transkription von isolierter mRNA in komplementäre DNA	22
2.7. Real Time PCR mit dem LightCycler® Instrument	24
2.8. Western Blot	26
2.9. Immunfluoreszenzfärbung	28
2.10. Proliferationsversuche mit HCAEC	29
2.11. Transfektion von siRNA in HCAEC	31
2.12. Erfassung der Proliferationskinetik mittels [³ H]Thymidin	32
2.13. Maßnahmen gegen Kontaminationen	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Stimulation von ET-1 in CASMC durch <i>Chlamydia pneumoniae</i>	33
3.2. Auswirkung der Infektion auf die Endothelin-Rezeptoren in CASMC	35
3.3. Stimulation von ET-1 in HCAEC durch <i>Chlamydia pneumoniae</i>	37
3.4. Auswirkung der Infektion auf die Endothelin-Rezeptoren in HCAEC	39

3.5. Immunhistochemische Darstellung der Rezeptorstimulation in HCAEC	41
3.6. Rezeptorreduktion durch Transfektion von siRNA in HCAEC	42
3.7. Proliferation vaskulärer Endothelzellen	44
4. Diskussion	47
4.1. Proliferative Eigenschaften von Endothelin-1 im Gefäßbett	47
4.2. Proliferation vaskulärer Zellen durch <i>Chlamydia pneumoniae</i>	49
4.3. Fehlfunktion des Endothels und dessen Folgen	51
4.4. Therapeutische Aspekte bei aktiviertem Endothelin-1 System	53
4.5. Relevanz von <i>Chlamydia pneumoniae</i> in der Atherogenese	58
4.6. Antibiotika in der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen	61
5. Zusammenfassung	66
6. Literaturverzeichnis	67
7. Veröffentlichungen	79
8. Danksagung	80
9. Lebenslauf	81

1. Einleitung

1.1 *Chlamydia pneumoniae* – Klassifikation und Grundlagen

Der Familie der *Chlamydiaceae* (Ordnung *Chlamydiales*) werden drei humanpathogene Spezies zugeordnet - *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pneumoniae*. Im Jahr 1999 wurde jedoch eine taxonomische Neueinteilung der Familie der *Chlamydiaceae* vorgeschlagen⁴². Demnach sollte aufgrund phylogenetischer Untersuchungen der 16S und der 23S rRNA-Gene die Gattung *Chlamydia* um die Gattung *Chlamydomphila* erweitert werden. Diese sollte nun die Organismen *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pneumoniae* enthalten. Innerhalb der Forschergemeinschaft konnte sich die angedachte Taxonomie allerdings nicht vollständig durchsetzen, da nach Ansicht führender Experten wesentliche biologische und funktionelle Aspekte unberücksichtigt bleiben und die 16S rRNA-Sequenzunterschiede zu gering sind. Die neue Einteilung wurde als unbegründet abgelehnt¹⁶⁴. Da keine endgültige Klärung vorliegt, werden in dieser Arbeit die klassischen Bezeichnungen verwendet.

Chlamydia pneumoniae ist ein gramnegatives, obligat intrazelluläres Bakterium, das einen, wie bei allen Chlamydien vorkommenden, stets wiederkehrenden und einzigartigen Vermehrungszyklus in seiner Wirtszelle durchläuft. Dieser beinhaltet zwei Entwicklungsformen, die sich sowohl morphologisch, als auch funktionell unterscheiden: Das Elementarkörperchen (EK) und das Initial- oder Retikularkörperchen (RK). Einzelne Elementar- oder Retikularkörperchen entziehen sich allerdings dem lichtmikroskopischen Nachweis. Daher hat sich als Mengeneinheit für chlamydiale Infektionen der Begriff der Inclusion Forming Unit (IFU) etabliert. Definitionsgemäß führt eine IFU während der Kultivierung zu einem intrazellulären Einschluß.

Das EK mit einem Durchmesser von ca. 0,38 µm stellt die metabolisch inaktive, aber infektiöse Form von *Chlamydia pneumoniae* dar²⁶. Es ist an ein Überleben außerhalb der Wirtszelle angepaßt und verhält sich in großem Maße widerstandsfähig gegenüber physikalischen und chemischen Reizen. Der Stoffwechsel des EK ist hierbei auf ein Minimum begrenzt. Dem Bakterium ist es in dieser Form möglich, von Phagen, aber auch von zahlreichen Zellarten ohne Freßzeleigenschaften, wie Endothelzellen oder glatten Muskelzellen, aufgenommen zu werden. Der genaue Mechanismus des Eindringens von EK in die Wirtszellen ist noch nicht geklärt. Er geschieht jedoch so effizient, daß von einer sogenannten „rezeptorvermittelten Endozytose“ ausgegangen wird¹³¹. Darunter versteht man eine Interaktion zwischen bisher unbekanntem rezeptorähnlichen Strukturen auf der Ziel-

zelle und der chlamydialen Zellmembran, die zur Internalisierung führt. Dieser Vorgang ist selbst bei inaktivierten Chlamydien noch funktionsfähig ¹⁷⁸.

Nach erfolgter Aufnahme in die Wirtszelle befinden sich die EK in einer clathrinassoziierten Vakuole, auch als Einschlußkörperchen oder Phagosom bezeichnet. In diesem vom Zytoplasma abgeschiedenen Raum beginnt unter komplexen Strukturveränderungen wenige Stunden später die Reorganisation in Retikularkörperchen. Die RK haben eine Größe von ca. 0,56 µm und stellen den metabolisch aktiven Zustand der Chlamydien dar ²⁶. Während der folgenden 18-24 Stunden vermehren sich die RK durch Querteilung und füllen das Phagosom mehr und mehr aus. Ungefähr 18 Stunden nach der Infektion beginnen erste RK wieder mit der Rückbildung in infektiöse EK, die ihren Metabolismus drosseln und sich nun nicht mehr teilen. Bereits 48 bis 72 Stunden nach Internalisierung hat sich der Großteil der Chlamydien wieder in die infektiöse Form umgewandelt. Die Lyse der Wirtszelle steht nun kurz bevor, und eine neue Generation Elementarkörperchen steht für die Infektion weiterer Wirtszellen bereit.

Durch diesen, an ein intrazelluläres Phagosom gebundenen Entwicklungszyklus ist es Chlamydien gelungen, sich phylogenetisch stark von anderen Mikroorganismen abzugrenzen und zu einer weitgehend unabhängigen evolutionären Entwicklung zu gelangen. Stark spezialisiert an einen intrazellulären Zyklus können sie jedoch bestimmte Aminosäuren, Nucleotide, Lipide und insbesondere die Energielieferanten ATP und NAD nicht, oder nur unzureichend produzieren. Aufgrund dieser Abhängigkeit haben Chlamydien eine Fülle an Möglichkeiten entwickelt, das Überleben ihrer Wirtszelle, zumindest für den Zeitraum des intrazellulären Zyklus zu sichern. Ergebnis dieser Gast-Wirtbeziehung ist eine erstaunlich geringe Störung der normalen Wirtszellfunktionen. Denn solange die Wirtszelle auf verhältnismäßig physiologischem Niveau arbeitet, kann ihr Stoffwechsel effektiv genutzt werden ¹⁷⁸.

Die Schlüsselfunktion, die das intrazelluläre Überleben der Chlamydien sichert, besteht darin, der zelleigenen Abwehr zu entgehen. Dies geschieht maßgeblich durch Inhibition der Wirtszell-Apoptose ⁴⁵. Außerdem wird die Fusion des EK-Phagosoms mit einem Wirtszell-Lysosom verhindert. Beide Wege sind noch nicht näher bekannt. Man nimmt jedoch an, daß Zellwandbestandteile der Chlamydien hier eine wichtige Rolle spielen ⁷⁷.

1.2 Entdeckung und Hintergründe

Chlamydia pneumoniae trat erstmals im Jahr 1965 in Taiwan in Erscheinung. Aus dem Konjunktivalabstrich eines Kindes, das an einer Trachomstudie teilnahm, konnte ein bis dahin unbekannter Organismus, genannt TW-183, isoliert werden ¹⁰⁰. Zu dieser Zeit ges-

taltete sich die Isolierung von Chlamydien als äußerst aufwendig. Erst mit der Etablierung der Zellkultur in HeLa-Zellen im Jahr 1971 war es möglich, den neu gewonnenen Organismus morphologisch zu beschreiben. Es zeigte sich, daß TW-183 seiner äußeren Erscheinung nach gewisse Ähnlichkeit zu *Chlamydia psittaci* aufwies. Man ging daher zunächst davon aus, daß es sich hierbei um einen neuen Stamm der Spezies *Chlamydia psittaci* handelte.

1983 wurde ein weiteres unbekanntes Pathogen, genannt AR-39, aus dem Rachenabstrich eines an Pharyngitis erkrankten Studenten in den USA isoliert⁶³. Schnell wurde klar, daß TW-183 sowie zahlreiche weitere Isolate der Bezeichnung AR, die mittlerweile aus Patientenmaterial gewonnen werden konnten, demselben Serotyp angehörten. Kurzzeitig wurde der zusammengesetzte Name TWAR verwendet, wobei man den Organismus weiterhin als neuen *Chlamydia psittaci* Stamm betrachtete. Erst 1989 konnte sich TWAR als dritte Chlamydienpezies neben *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia psittaci* etablieren. Es stellte sich heraus, daß sich TWAR sowohl morphologisch als auch immunologisch deutlich von *Chlamydia trachomatis* aber auch von *Chlamydia psittaci* unterschied. Mittlerweile sind zahlreiche Stämme von *Chlamydia pneumoniae* bekannt, deren DNA sich zwischen 94% und 100% ähnelt. Der Mensch stellt den einzigen natürlichen Wirt des Erregers dar^{26,100}.

1.2.1 *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia psittaci*

Chlamydia trachomatis stellt die am besten untersuchte Chlamydienpezies dar. Hier sind mehrere Serovare bekannt, die ihrerseits unterschiedliche okulogenitale Infektionen hervorrufen. So führen die Serovare A-C zur Entwicklung des Trachoms, einer chronisch-granulomatösen Entzündung der Bindehaut des Auges. Es stellt die weltweit häufigste Erblindungsursache dar. Des weiteren hat *Chlamydia trachomatis* als Erreger genitaler Infekte einen großen Anteil an unspezifischen, sogenannten Nicht-Gonokokken-Urethritiden (NGU). Auch Konjunktividen und Neugeborenenpneumonien (Serovar D-K), sowie das Lymphogranuloma venerum (Serovar L₁-L₃), eine meldepflichtige Geschlechtskrankheit, werden durch dieses Bakterium verursacht. Der Mensch stellt jeweils den einzigen natürlichen Wirt dar.

Das natürliche Reservoir von *Chlamydia psittaci* sind Vögel, insbesondere Papageien, Tauben und Wellensittiche. Eine Infektion mit dieser Chlamydienpezies führt zur Ornithose (Psittakose), einer meldepflichtigen Erkrankung mit schwerem grippeartigem oder pneumonischem Verlauf, hohem Fieber und Schüttelfrost. Prädisponiert für eine *Chlamydia psittaci* Infektion sind Vogelzüchter und verwandte Berufszweige.

1.3 Epidemiologie

Die gegenwärtigen Erkenntnisse hinsichtlich der Epidemiologie von *Chlamydia pneumoniae* basieren auf einer Vielzahl serologischer Studien, die in zahlreichen Ländern durchgeführt wurden¹⁰⁴. *Chlamydia pneumoniae* ist ein weltweit verbreiteter Keim, der in Entwicklungsländern jedoch vermehrt vorkommt⁴⁶. Die Gruppe mit der höchsten Inzidenz stellen Schulkinder im Alter von 5-9 Jahren (9%) dar, gefolgt von Kindern zwischen 10 und 14 Jahren (6%)³. Nach diesem Zeitraum kann lediglich eine Inzidenz von ca. 1-2% festgestellt werden, was bedeutet, daß sich etwa 75% aller Primärinfektionen mit *Chlamydia pneumoniae* im Alter zwischen 5 und 14 Jahren ereignen. Daher weisen ca. 50% der Menschen im Alter von 20 Jahren entsprechende Antikörper auf.

Mit zunehmendem Alter steigt die Seroprävalenz auf bis zu 75% im höheren Lebensalter an¹⁹⁵. Allerdings sinken die Antikörpertiter 3-5 Jahre nach einer Infektion auf ein nicht mehr nachzuweisendes Niveau. Daher ist anzunehmen, daß es im Laufe des Lebens zu Reinfektionen kommt^{146,104}.

1.4 *Chlamydia pneumoniae* als Pathogen

Durch Tröpfcheninfektion übertragen, verursacht *Chlamydia pneumoniae* Infektionen der oberen und unteren Atemwege durch Befall des respiratorischen Epithels. Atypische Pneumonien und Bronchitiden stellen hierbei die am häufigsten assoziierten Krankheiten dar. Doch treten auch Entzündungen der Nasennebenhöhlen, des Mittelohrs, sowie des Rachens und Kehlkopfes als Begleiterkrankung oder auch als eigenständige Krankheitsentitäten auf^{70,139,177}. Die Bedeutung von *Chlamydia pneumoniae* an der Epidemiologie ambulant erworbener Pneumonien (CAP) ist umstritten. Ging man bislang davon aus, daß der Erreger in Deutschland für ca. 10% der CAP verantwortlich ist, wird nun von einer geringeren Prävalenz ausgegangen. Dennoch muß bedacht werden, daß sich die Studien zur CAP hinsichtlich Design, untersuchtem Material und Protokoll der Untersuchungsmethoden zum Teil beträchtlich unterscheiden¹⁹⁷.

Eine atypische Pneumonie durch *Chlamydia pneumoniae* läßt sich nicht immer leicht erkennen, da Auskultationsbefund und Klinik des Patienten oft nur gering pathologisch sind. Auch Fieber oder eine Leukozytose bleiben meist aus. Jedoch ist in vielen Fällen eine erhöhte Senkungsgeschwindigkeit der Blutkörperchen (BSG) und ein erhöhtes C-reaktives Protein festzustellen. Im Röntgenbild finden sich subsegmentale, zentrale Infiltrate, wie sie für interstitielle Pneumonien typisch sind⁶².

Die meisten Fälle der *Chlamydia pneumoniae* assoziierten Pneumonien stellen sich als milde Formen dar. Nur im Falle einer bakteriellen oder viralen Superinfektion bedürfen sie der Hospitalisierung¹⁷¹. Darüber hinaus finden sich zahlreiche andere Erkrankungen wie Endokarditis, Myokarditis, Meningoradikulitis, Erythema nodosum oder auch Sarkoidose, die jedoch nicht immer sicher mit *Chlamydia pneumoniae* in Verbindung gebracht werden können⁶².

Obgleich bislang nur in unzureichendem Maße geklärt werden konnte, in welcher Tragweite und an welcher Stelle das Bakterium an der Pathogenese arteriosklerotischer Gefäßschädigungen beteiligt ist, gilt ein Zusammenhang zwischen einer systemischen Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* und arteriosklerotischen Prozessen im Gefäßbett als wahrscheinlich (s.a. Kapitel 1.6)

1.5 Diagnostik und Therapie

1.5.1 Diagnostik

Da es sich bei *Chlamydia pneumoniae* um ein intrazelluläres Pathogen handelt, werden für den direkten Nachweis des Erregers Zellkulturen benötigt. Diese ist bei Patienten indiziert, die, teils über Wochen, eine atypische Pneumonie aufweisen, jedoch auf Betalactam-Antibiotika nicht ansprechen. Wenn sich hier der DNA-Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus Patientenmaterial als positiv erweist, wird eine Rekultivierung des Erregers durchgeführt. Hierfür werden zumeist HL- und HEp-2-Zellen verwendet^{102,200}.

Als Probenmaterial für die chlamydiale Labordiagnostik eignet sich besonders die Bronchioalveolar-Lavage (BAL), bei der die Ausbeute an Keimen am größten ist. Jedoch kommen auch Rachenabstriche, EDTA-Blut, Liquor und Biopsiegewebe in Frage. Um aussagekräftige Resultate hinsichtlich der Rekultivierung zu erzielen, benötigt *Chlamydia pneumoniae* spezielle Transport- und Anzuchtmethoden^{115,116}.

Ein Meilenstein in der serologischen Chlamydiendiagnostik ist der von San-Ping Wang Ende der 1960er Jahre, ursprünglich für *Chlamydia trachomatis* entwickelte Mikroimmunfluoreszenz-Test (MIFT). Der MIFT erlaubt den Nachweis von Antikörpern der IgG- und IgM-Fraktion und läßt somit eine grobe Unterscheidung hinsichtlich akuter und zurückliegender oder auch chronischer Infektion zu. Für eine zuverlässige Diagnose einer *Chlamydia pneumoniae* Infektion ist es jedoch sinnvoll, auch die Immunglobulinklasse A zu untersuchen, der als ein Marker chronischer Infektionen diskutiert wird.

Es ist zu beachten, daß IgM-Antikörper erst nach ca. 3 Wochen post infectionem nachweisbar und nach ca. 2 Monaten wieder rückläufig sind. IgG-Antikörper treten nach ca. 6-8 Wochen auf und können mehrere Jahre persistieren.

Als Kriterium für eine positive akute Infektion gilt ein IgM-Antikörpertiter von mindestens 16, bzw. ein Titeranstieg um das Vierfache im weiteren Verlauf oder ein IgG-Titer von mindestens 512. Ein Hinweis auf eine zurückliegende Infektion liefert ein gleichbleibender IgG-Titer zwischen 8 und 256. Des weiteren können ein stabiler oder rückläufiger IgG-Titer, bzw. IgA-Titer bei negativer IgM-Antwort eine lange zurückliegende Infektion, eine kürzliche Infektion, einen Zustand nach Therapie oder auch eine persistierende Infektion bedeuten. Es wird hierbei deutlich, daß eine einzelne Titerbestimmung wenig sinnvoll ist, und bei begründetem Verdacht auf eine Chlamydieninfektion wiederholte Untersuchungen angestrebt und diese gegebenenfalls mit anderen Analysemethoden wie dem ELISA kombiniert werden sollten.

Bei einer Reinfektion kann die Produktion von IgM-Antikörper vermindert sein, oder auch gänzlich ausbleiben. Der IgG-Titer jedoch steigt in diesem Fall binnen 1-2 Wochen auf Werte von 512 oder mehr, was die Unterscheidung zwischen erneut aufgetretener und bereits zurückliegender Infektion erschweren kann ¹⁰⁴.

Eine weitere Nachweismethode bezüglich der serologischen Chlamydiendiagnostik stellt die Komplementbindungsreaktion (KBR) dar, bei der chlamydiales Lipopolysaccharid (LPS) nachgewiesen wird. Der Nachteil ist, daß somit lediglich die Anwesenheit von Chlamydien aufgezeigt, eine Unterscheidung zwischen den drei Chlamydienspezies jedoch nicht geleistet werden kann.

Als die Methode mit der inzwischen größten Sensitivität und Spezifität hat sich die sogenannte nested PCR etabliert ¹¹⁸. Diese erlaubt es, auch geringe Mengen chlamydialer DNA sowohl aus pharyngealen und nasopharyngealen Abstrichen, BAL und auch aus Sputumproben zeitnah nachzuweisen. Zielgene sind unter anderem Fragmente der bakteriellen 16S rRNA, *Chlamydia pneumoniae*-spezifische Sequenzen wie das *Pst1*-Fragment, das chlamydiale Major Outer Membrane Protein (MOMP) oder das chlamydiale 60kDa Heat Shock Protein (cHSP60) ¹¹⁷. Allerdings kann durch diesen Nachweis kein Rückschluß auf die Vitalität des Bakteriums gezogen werden, was klinische Konsequenzen hat. Hierzu wird ergänzend die Zellkultur eingesetzt, um eine etwaige Wiederanzucht aus Patientenmaterial zu erreichen.

1.5.2 Therapie

Die Schwierigkeit in der Behandlung einer durch Chlamydien verursachten Infektion beruht auf der intrazellulären Nische, in der sich das Bakterium während seines Entwick-

lungszyklus befindet. Sowohl klinische Studien ^{27,153}, als auch Untersuchungen an Zellkulturen ^{31,32,44} konnten jedoch zeigen, daß Chlamydien gegenüber Makrolid-Antibiotika, Tetracyklinen, Rifampicin und Chinolonen der neueren Generation empfindlich sind, auch wenn dies nicht immer mit einer Eradikation des Erregers verbunden ist. Da Chlamydien keine Peptidoglykane (Murein) in ihrer Zellwand besitzen, sind Mureinsynthese hemmende Antibiotika wie Beta-Laktame und Glykopeptide nicht wirksam ⁸. Zur Therapie respiratorischer Infektionen durch *Chlamydia pneumoniae* eignen sich besonders die neuen, hochpotenten Makrolide Clarithromycin und Azithromycin. Diese reichern sich gut im Intrazellularraum an und besitzen eine lange Halbwertszeit. Zudem ist eine gute Verträglichkeit für beide Medikamente beschrieben.

Anhand einiger Studien wird jedoch deutlich, daß eine gewisse Diskrepanz zwischen *in vivo* Ergebnissen auf der einen Seite und *in vitro* Untersuchungen auf der anderen Seite herrscht. So werden beispielsweise Azithromycin und das Chinolon Gemifloxacin im klinischen Alltag erfolgreich eingesetzt, beide zeigen aber in der Zellkultur keine vollständige Eradikation von *Chlamydia pneumoniae* ¹⁰⁶. Klinisch erlangt dies besondere Bedeutung in Anbetracht der potentiellen Persistenzneigung des Bakteriums. Untersuchungen an Zellkulturen konnten nämlich zeigen, daß bei bestimmten Konzentrationen etablierter Chemotherapeutika, wie Chinolone, Makrolide und Tetracycline, die Persistenz von *Chlamydia pneumoniae* regelrecht induziert wird und nach einer Rekonvaleszenzphase von 72h und mehr eine Wiederanzucht des Erregers möglich ist ⁵³. Die potente Wirkung von Rifampicin, besonders in Kombination mit konventionellen Makroliden, könnte eine neue Möglichkeit von therapierefraktären Infektionen darstellen ¹⁷⁶.

Aus Blutgefäßzellen isolierte *Chlamydia pneumoniae* Stämme weisen *in vitro* eine vergleichbare Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika auf wie respiratorische Isolate ^{55,56}. Dennoch ist bis heute trotz intensiver Studien in den vergangenen Jahren noch immer nicht zufriedenstellend geklärt, inwiefern eine anti-chlamydiale Therapie eine Prophylaxe hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen bedeutet (s.a. Kapitel 4.6).

1.6 *Chlamydia pneumoniae* im Kontext der Arteriosklerose

Bereits 1988 wurde ein erster Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* und der Arteriosklerose vermutet. Eine finnische Studie konnte damals zeigen, daß Patienten mit chronischer koronarer Herzkrankheit (KHK) und Myokardinfarkt signifikant häufiger erhöhte Antikörpertiter gegen *Chlamydia pneumoniae* besitzen, als eine Kontrollgruppe ¹⁶⁰. Bis dato lieferten über 50 weitere Studien unterschiedlichen Designs ähnliche Hinweise darauf, daß das Bakterium eine Rolle in der Atherogenese zu

spielen scheint ^{17,113,151,187}. Ergänzt durch serologische Analysen und PCR-Methoden konnten elektronenmikroskopische Untersuchungen, sowie immunhistochemische Färbungen ¹⁰¹ schließlich den Beweis für die tatsächliche Präsenz des Erregers in atheromatösen Läsionen von Koronararterien, Karotiden und Aorta ^{105,175} aufzeigen. *Chlamydia pneumoniae* wurde zudem gehäuft in stenosierten Karotiden ¹¹⁹ sowie restenosierten arteriosklerotischen Läsionen aufgespürt ¹⁸ und war auch in atheromatösen Plaques im Autopsiematerial junger Patienten zwischen 15 und 34 Jahren nachzuweisen ¹⁰³. In gesundem Gewebe fand sich jedoch kein Hinweis auf *Chlamydia pneumoniae*. Diese Tatsache spricht somit eher für eine Besiedelung bereits vorgeschädigter Gefäßabschnitte als für einen Befall intakten Gewebes.

Bei *Chlamydia pneumoniae* handelt es sich um ein primär respiratorisches Pathogen, das zunächst die Lunge befällt. Um jedoch Gewebe in der Peripherie zu erreichen, muß eine Dissemination des Erregers stattfinden. Da man bislang allerdings keine zirkulierenden Elementarkörperchen im Blut finden konnte, wird davon ausgegangen, daß Monozyten/Makrophagen hier als Vektoren fungieren. In mehreren Studien, die sich auf Zellversuche, Tierexperimente oder klinische Untersuchungen stützen, konnte dieser Zellpopulation eine potentielle Vehikelfunktion bezüglich der Aussaat von *Chlamydia pneumoniae* zugeschrieben werden ^{51,57,157}.

1.7 Endothelin-1-System

Endothelin-1 (ET-1) ist ein hochpotentes, vasokonstriktorisches Polypeptid, das an einer Vielzahl physiologischer Regulationsmechanismen innerhalb des Gefäßsystems beteiligt ist. Im Zusammenhang kardiovaskulärer Erkrankungen erlangt es eine zunehmende Bedeutung.

ET-1 wurde 1988 erstmals beschrieben, als man eine neue, stark vasoaktive Substanz aus dem Überstand aortaler Schweine-Endothelzellen isolieren konnte ²⁰⁵. Daneben existieren drei weitere Isoformen (ET-2, ET-3, ET-4) ^{73,159}, die im Menschen jedoch nur eine untergeordnete Rolle spielen ¹¹⁴. ET-1 wird vornehmlich in Gefäßendothelzellen gebildet und gespeichert. Aber auch vaskuläre glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Leukozyten und eine Vielzahl anderer Zellen und Gewebe haben die Möglichkeit, ET-1 zu synthetisieren ¹⁵⁰.

Der wichtigste physiologische Stimulus für eine Sekretion von Endothelin-1 sind Scherkräfte an der Gefäßwand, hervorgerufen durch den steten Blutstrom. Darüber hinaus führt auch eine große Anzahl weiterer Faktoren zur Biosynthese von ET-1, die allesamt an Entstehungs- und Unterhaltungsprozessen kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sind:

LDL/oxLDL, Thrombin, TGF, Angiotensin II, IL-1 β , TNF- α , aber auch Endothelschäden^{114,155,166}. Der physiologische Plasmaspiegel von ET-1 liegt bei ca. 1-2 pg/ml, seine physiologische Halbwertszeit beträgt weniger als zwei Minuten^{22,172}. Dennoch halten die über ET-1 vermittelten Effekte aufgrund der sehr starken Bindung an seinen jeweiligen Rezeptor bis zu 60 Minuten an.

Endothelin-1 besteht in seiner aktiven Form aus 21 Aminosäuren und wird aus Vorläuferproteinen unter dem Einfluß des Endothelin-1-Konversionsenzym (ECE-1) und des Transkriptionsfaktors Ets-1 gebildet. Es wirkt über seine zwei G-Protein gekoppelten Rezeptoren Endothelin-A-Rezeptor (ETAR) und Endothelin-B-Rezeptor (ETBR). Es gibt Hinweise darauf, daß daneben noch drei weitere Endothelin-Rezeptortypen vorhanden sind, wobei man sich jedoch über deren Funktion und die tatsächliche Existenz uneins ist. ETAR und ETBR unterscheiden sich sowohl bezüglich ihrer Effekte, als auch hinsichtlich ihrer Distribution in verschiedenen Gewebetypen¹²⁸. Im Gefäßbett, dem zentralen Ort des Endothelin-1-Systems, zeigt sich durchweg folgende Verteilung: unter physiologischen Bedingungen ist ETAR der dominante Rezeptorsubtyp auf vaskulären glatten Muskelzellen³⁴, wohingegen ETBR vermehrt auf vaskulären Endothelzellen, und nur in geringem Ausmaß auf glatten Muskelzellen zu finden ist^{114,150}.

Die Bindung von ET-1 an den Endothelin-A-Rezeptor führt zu einer starken, lang anhaltenden Vasokonstriktion, die unter physiologischen Bedingungen maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus beteiligt ist^{11,158,205}. Zugrunde gelegt wird eine Phospholipase C-abhängige Signalkaskade, die unter Stimulation von Second-Messengern (DAG und IP₃) zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels führt^{58,150}.

In geschädigten Gefäßarealen aber führt eine Stimulation von ETAR zu Gefäßspasmen und einer Vielzahl proatherogener, also arteriosklerosefördernder Vorgänge. Versuche mit menschlichen Zellen und auch Tierexperimente konnte bereits mehrfach belegen, daß über ETAR die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen induziert wird^{85,95,140}. In Gegenwart mitogener Faktoren wie z.B. PDGF vermag ET-1 deren Wirkung zu potenzieren²⁰⁶. Darüber hinaus ist bekannt, daß ET-1 die Fähigkeit besitzt, über ETAR proatherogene und proinflammatorische Mediatoren, wie VCAM-1, ICAM-1, PAI-1 und TNF- α zu stimulieren^{71,109,114}. Auch Proteine, die zur Chemotaxis von Leukozyten oder Monozyten führen^{24,84}, werden ETAR-abhängig durch ET-1 induziert^{122,148}, desgleichen die Stimulation von Wachstumsfaktoren wie VEGF und FGF-2.

Die wichtigste Funktion, die ET-1 unter physiologischen Konditionen über den Endothelin-B-Rezeptor ausübt, ist die Dilatation von Blutgefäßen durch Freisetzen von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclinen^{78,170}. ETBR kann in weitere Subtypen unterteilt werden: ETBR-1 ist vorwiegend für die beschriebene Vasodilatation zuständig. Über ETBR-2 wird eine geringe Vasokonstriktion ausgeführt, wenngleich dieser Effekt nicht mit der Wirkung von ETAR verglichen werden kann¹⁷³. ETBR ist außerdem primär an der pulmonalen

Clearance von zirkulierendem Endothelin-1 beteiligt^{49,142,174}. Diskutiert wird auch eine Beteiligung des Endothelin-B-Rezeptors an der Apoptoseförderung glatter Gefäßmuskelzellen²⁰. Dieser Effekt, der zu vaskulärem Remodeling führen kann, wurde insbesondere an Patienten mit unphysiologischen Blutdruckzuständen beobachtet. Auch der Aktivierung von ETBR wird ein chemoattraktiver Effekt auf Makrophagen zugeschrieben, sowie die Fähigkeit, Interleukinen zu stimulieren^{73,74}.

1.8 Endothelin-1 im Kontext der Arteriosklerose

Das Gefäßbett stellt durch das Verteilungsmuster der Rezeptoren ETAR und ETBR das Hauptziel der ET-1 vermittelten Effekte dar. Unter physiologischen Konditionen ist Endothelin-1 ein wichtiges Regelglied bezüglich des Gefäßtonus und der Vasomotorik. Doch bei krankhaften Veränderungen der Blutgefäße wie sie bei der Arteriosklerose vorkommen, wandelt sich ET-1 rasch zu einem wichtigen Regulator pathologischer, atherogener Vorgänge. Durch die bereits erwähnte Rekrutierung proinflammatorischer und proatherogener Faktoren fördert Endothelin-1 die Progression arteriosklerotischer Läsionen und hält entzündliche Schlüsselprozesse aufrecht^{210,211}. Die mitogene Potenz und die starke vasokonstriktorische Potenz des Proteins tragen darüber hinaus dazu bei, daß ET-1 in beinahe jedem Schritt der Atherogenese eine zentrale Rolle einnimmt.

Untersuchungen konnten aufzeigen, daß arteriosklerotische Plaques eine deutliche Stimulation des ECE-1/ ET-1 Systems aufweisen⁸². Dies traf insbesondere im Stadium der frühen Plaque-Entwicklung, sowie zum Zeitpunkt der chronischen Inflammation zu, was auch im Tiermodell dargelegt werden konnte^{59,67}. Des weiteren kommt es in diesen Läsionen zu einer fulminanten Expression von ETAR und einer Verstärkung der über ihn vermittelten proinflammatorischen Effekte. Die Zahl der ECE-1/ET-1 produzierenden glatten Muskelzellen zeigt sich in solchen Läsionen als deutlich erhöht. Doch auch aktivierte Makrophagen im arteriosklerotischen Entzündungsgebiet gehen mit einer ausgeprägten Steigerung der ECE-1/ET-1 Sekretion einher^{7,82}.

Diese Kumulation von ET-1, sowie die vermehrte Expression von ETAR führen zu einer starken Vasokonstriktion in den betroffenen geschädigten Gefäßareale und unterhalten somit den Vasospasmus und das weitere Voranschreiten der Läsion⁹¹. Die Proliferation von vaskulären Zellen, ein bedeutsames Kennzeichen einer sich entwickelnden arteriosklerotischen Plaque wird durch ein Stimuliertes ET-1 System sogar in zweierlei Hinsicht gefördert. Einerseits besitzt ET-1 über ETAR eine ausgeprägte mitogene Dynamik. Andererseits verstärken Endothelin-1 und PDGF, einer der potentesten vaskulären Wachstumsfaktoren, gegenseitig ihre proliferativen Eigenschaften. Auch die Synthese von VEGF

wird durch ET-1 stimuliert. Die Folge ist zum einen die Vergrößerung der arteriosklerotischen Läsion, zum anderen deren Neovaskularisation durch Einsprossen von ECE-1/ET-1-positiven Mikrogefäßen^{7,76,188}. Diese können zur Destabilisierung der arteriosklerotischen Plaques führen, wie es in beinahe jeder Koronarsklerose vorkommt^{111,112}.

Neben diesen direkt im Gefäßbett ablaufenden Prozessen ist bekannt, daß auch wichtige übergeordnete endokrinologische Systemveränderungen, wie Diabetes mellitus^{1,138} oder Hypercholesterinämie¹²¹ mit einem erhöhtem ET-1 Plasmaspiegel einhergehen. Auch spielen diese Faktoren einander zu. So sind erhöhte Cholesterinwerte eng mit Fehlfunktionen des Endothels verknüpft. Diese sogenannte endotheliale Dysfunktion führt wiederum zu einer Erhöhung des ET-1 Blutspiegels. Andererseits stellt die mit Hypercholesterinämie einhergehende Erhöhung von LDL/oxLDL im Plasma selbst einen bekannten Stimulus für ET-1 dar, wie in zahlreichen Studien *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden konnte⁴³. Erhöhte ET-1 Spiegel führen in bereits geschädigten Gefäßabschnitten zur weiteren Chemotaxis proinflammatorischer und proatherogener Chemokine, fettbeladener Makrophagen oder Lymphozyten, die den entzündlichen Prozeß unterhalten und zu einem *Circulus vitiosus* führen. Die arteriosklerotische Läsion erhält sich somit selbst aufrecht.

Klinisch ist diese zentrale Rolle von Endothelin-1 von großer Bedeutung. Denn Arteriosklerose ist der Schlüsselprozeß einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen wie Hirninfarkt, arterielle Verschußkrankheiten, chronische Herzinsuffizienz, Koronarsklerose und Myokardinfarkt. Arteriosklerose mit ihren Folgekrankheiten stellt somit eine der Hauptursachen in der westlichen Welt dar.

Es konnte gezeigt werden, daß Patienten mit arteriellem Hypertonus²⁰⁷, chronischer Herzinsuffizienz¹⁸⁰ oder Myokardinfarkt^{80,90,179} erhöhte Plasmaspiegel von ET-1 aufweisen. An Koronararterien fördert es durch seine chemoattraktive Potenz die Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen. Darüber hinaus führt ET-1 besonders unter hypoxischen Bedingungen zu einem Wachstum kardialer Myozyten, wobei nach einem Myokardinfarkt ein stimuliertes ET-1-System die ohnehin beeinträchtigte Herzfunktion zusätzlich bedroht⁹⁰. So trägt Endothelin-1 zur postinfarziellen Narbenbildung bei, fördert linksventrikuläres Remodeling und ist mitverantwortlich an der Restenosierung von Blutgefäßen nach koronaren Interventionen¹⁶⁶. Zahlreiche Studien konnten ferner zeigen, daß ein stimuliertes ET-1-System eine bedeutende prognostische Rolle hinsichtlich der klinischen Folgen eines Myokardinfarktes spielt^{141,189}.

1.9 Zielsetzung

Endothelin-1 stellt das stärkste momentan bekannte Vasokonstriktivum dar und ist unter physiologischen Konditionen in großem Maße an der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus beteiligt. Über sein Rezeptorensystem, das eine charakteristische Verteilung im Gefäßbett aufweist, besitzt ET-1 starke wachstumsfördernde Eigenschaften und kann zahlreiche Entzündungsmediatoren wie ICAM-1, VCAM-1, TNF- α rekrutieren. In krankhaften, arteriosklerotisch veränderten Gefäßen wird ET-1 verstärkt exprimiert und fungiert als ein wichtiges Bindeglied zwischen zahlreichen proinflammatorischen und proatherogenen Mediatoren. ET-1 ist demnach in bedeutende Schlüsselprozesse sowohl der frühen Atherogenese, als auch der Aufrechterhaltung arteriosklerotischer Läsionen involviert.

Das intrazelluläre Bakterium *Chlamydia pneumoniae* kann nachweislich aus atherogenen Läsionen isoliert werden und scheint in noch unbekannter Funktion an der Pathogenese der Arteriosklerose beteiligt. Studien schreiben dem Bakterium eine proinflammatorische und proatherogene Potenz zu. So konnte in vaskulären Zellen bereits die Aktivierung wichtiger inflammatorischer Schlüsselproteine, wie des Transkriptionsfaktors NF- κ B mit einer *Chlamydia pneumoniae* Infektion in Zusammenhang gebracht werden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es daher, *in vitro*, die Dynamik des Endothelin-1-Systems unter Berücksichtigung seiner beiden Rezeptoren ETAR und ETBR in koronararteriellen Endothelzellen und glatten Muskelzellen unter dem Einfluß von *Chlamydia pneumoniae* zu eruieren. Im weiteren Verlauf soll außerdem ermittelt werden, ob das Bakterium es vermag, bei stimuliertem ET-1-System einen ETAR-vermittelten proliferativen Phänotyp zu induzieren.

2. Material und Methoden

2.1 Anzucht von *Chlamydia pneumoniae*

Da es sich bei *Chlamydia pneumoniae* um ein obligat intrazelluläres Pathogen handelt, erfolgte die Anzucht in Wirtszellen. Als solche wurden nach dem von Maaß et al. beschriebenen Verfahren HEp-2 Zellen verwendet, eine Zelllinie aus humanem Larynxkarzinom¹¹⁶. Eingesetzt wurde der *Chlamydia pneumoniae* Stamm CV-6, ein Isolat aus kardiovaskulären Läsionen von Patienten mit koronarer Herzkrankheit¹¹⁷.

Die HEp-2 Zellen wurden in der Vorbereitungsphase mit Anzuchtmedium versetzt und in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ angezüchtet bis mikroskopisch ein dichter Zellrasen vorhanden war. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Die Infektion der Zellen selbst geschah in 6-Loch-Zellkulturplatten, in welche sie zuvor umgesetzt wurden. Dazu war es nötig, die HEp-2 Zellen mittels PBS-Puffer zu waschen und anschließend unter Verwendung von Trypsin vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Man gewann somit eine Zellsuspension von 2-5 x 10⁵ Zellen/ml. Je 2 ml der Lösung wurden nun in jeweils eine Kammer einer 6-Loch-Zellkulturplatte pipettiert und die Platten bei 37°C und einer Spannung von 5% CO₂ für 24 Stunden inkubiert.

Nach Ausbildung eines Zellrasens konnte die Infektion der HEp-2-Zellen stattfinden. Dazu wurde eine Stammlösung aus mit *Chlamydia pneumoniae* infizierten HEp-2-Zellen aufgetaut und die Wirtszellen mittels Glasschrot zerschlagen, um freie Elementarkörperchen zu erhalten. Die Lösung wurde im Anschluß mit ausreichend Infektionsmedium versetzt. Dieses Medium enthielt im Gegensatz zum vorher verwendeten Anzuchtmedium zusätzlich Cycloheximid, mit dem Ziel, die neuen Wirtszellen zu schwächen und die Infektion zu erleichtern. Den vorbereiteten HEp-2-Zellen wurde nun das Anzuchtmedium entzogen und statt dessen die chlamydienhaltige Suspension zugeführt, wobei auf jede Vertiefung der 6-Loch-Zellkulturplatte 2 ml entfielen. Um die Infektion der HEp-2 Zellen zu forcieren, wurden die Zellkulturplatten anschließend für 45 Minuten bei 3500 U/min und 37°C zentrifugiert. Danach konnten die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet werden. Nach ca. 72 Stunden (3-4 Tage) wurden die infizierten HEp-2-Zellen mit einem Zellschaber mechanisch vom Boden ihrer 6-well-Platte entfernt. Es war möglich, die gesamte Zellsuspension zu aliquotieren und bei einer Temperatur von -70°C einzufrieren. Die so entstandene Stammlösung chlamydieninfizierter HEp-2-Zellen wurde für die Experimente verwendet.

Reagenzien und Material:

HEp-2 Zellen	American Type Culture Collection (ATCC) Nr. CCL 23
Zellkulturflaschen	175 cm ² , Cellstar [®] , Cat.No. 660175, Greiner Bio-One
Anzuchtmedium	Eagle's Minimal Essential Medium, Cat.No. E15-024, PAA Laboratories unter dem Zusatz von FKS Cat.No. S 0115 Biochrom AG und 1% Glutamin (200 mM) Cat.No. M11-004, PAA Laboratories, sowie Amphotericin B und Gentamicin (je 25 mg/500 ml)
NEAA	Non-essential Amino Acids, Cat.No. M11-003, PAA-Laboratories
6-Loch-Zellkulturplatten	Cellstar [®] , Cat.No. 657160, Greiner Bio-one
PBS	Phosphate Based Saline, 4g NaCl, 0.1g Kaliumhydrogenphosphat, 0.1g KCl, 0.575g di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O ad 500 ml Aqua dest.
Trypsin EDTA	Cat.No. L-11-004, PAA Laboratories
Infektionsmedium	Anzuchtmedium + Cycloheximid 1 µg/ml, Sigma-Aldrich Taufkirchen

2.1.1 Bestimmung der IFU-Konzentration

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist für Chlamydien die Mengeneinheit IFU (Inclusion Forming Unit) gebräuchlich. Die Konzentration der Chlamydienstammlösung wurde retrospektiv durch Kultivierung und anschließende Auszählung der entstandenen Einschlüsse bestimmt. Die Anzahl der entstandenen Einschlüsse entsprach demnach der Anzahl der IFU in der Ausgangslösung.

HEp-2 Zellen wurden in 48-Loch Zellkulturplatten, deren Vertiefungen Deckgläschen enthielten, zur Ausbildung eines Zellrasens angezüchtet. Aus einem Aliquot der Chlamydienstammlösung (CV-6-Stamm) wurde wie oben beschrieben durch Behandlung mit Glasschrot eine EK-Suspension gewonnen und daraus eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen hergestellt. Je 100 µl der unterschiedlich verdünnten Suspensionen konnte nun auf die angezüchteten Wirtszellen verteilt und über drei Tage kultiviert werden. Im Anschluß fand die Immunfluoreszenzfärbung der Deckgläser mit einem vorgefertigten Antikörper-Kit statt. Die absolute Anzahl der entstandenen Einschlußkörperchen wurde in einem zum Auszählen sinnvollen Zahlenbereich unter dem Mikroskop durchgeführt. Hierbei empfahl es sich, unter geeigneter Vergrößerung die

Deckgläser aus jenen beiden Verdünnungsstufen zu wählen, bei denen sich etwa 10-50 bzw. 100-500 Einschlüsse gebildet hatten. Dazu war ein meanderförmiges Mustern des gesamten Deckglases notwendig. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ergab sich über die Anzahl der Einschlusskörperchen schließlich die IFU-Konzentration des Ausgangsmaterials.

Reagenzien und Material:

48-Loch Zellkulturplatten	Cat.No. 150687, Nunc Products
Immunfluoreszenzfärbung	IMAGEN-Chlamydia Kit, Cat.No. K 6101, DakoCytomation

2.2 Anzucht von koronararteriellen glatten Muskelzellen

Die in den Experimenten eingesetzten koronararteriellen glatten Muskelzellen (*Coronary Artery Smooth Muscle Cells, CASMC*) entstammten einer menschlichen Zelllinie. Sie wurden, in Trockeneis verpackt, postalisch zugesandt. Laut Hersteller bestand eine Charge aus mehr als 500,000 Zellen, wobei 15 Zellpassagen zur Verbreiterung der Population garantiert wurden. Anzucht und Vermehrung der CASMC erfolgte in Zellkulturflaschen unter Verwendung eines speziellen Mediums.

War in der Zellkulturflasche ein Zellrasen von ca. 80% der möglichen Dichte gewachsen, konnten die glatten Muskelzellen im Verhältnis von nicht mehr als 1:3 umgesetzt werden, um die Population zu erhöhen. Dazu wurde der Boden der neuen Kulturflaschen zunächst mit einer 0.5%-igen Gelatinelösung benetzt, da die Zellen diese Schicht benötigten, um am Boden der Zellkulturflasche zu adhären. Den reifen CASMC wurde das bisherige Anzuchtmedium entzogen und einmalig mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurde der Zellrasen mit Accutase[®] beschichtet, deren enzymatische Wirkung die glatten Muskelzellen vom Boden der Kulturflasche löste. Daraufhin wurden der Zellsuspension ca. 10 ml CASMC-Anzuchtmedium zugeführt, um die Wirkung des Enzyms zu beenden und die gesamte Lösung für 10 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert. Anschließend konnte das entstandene Pellet in CASMC-Medium gelöst und die Zellsuspension auf die eingangs vorbereiteten Zellkulturflaschen verteilt werden. Alle 2-3 Tage war ein Mediumwechsel erforderlich.

Es bestand die Möglichkeit, die Zellen in einer frühen Passage einzufrieren, um sie zu einem passenden Zeitpunkt nach fortgeschrittener Planung für weitere Versuche zu

verwenden. Hierzu wurde das Pellet nicht wie oben beschrieben in CASMC-Medium, sondern in einer 10%-igen DMSO-Lösung suspendiert. Die Zellen konnten nun in spezielle Gefäße gefüllt und für 24 Stunden bei -70°C und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Erfahrungsgemäß war auch nach mehreren Monaten eine annähernd verlustfreie Wiederanzucht möglich.

Reagenzien und Material:

CASMC	Coronary Artery Smooth Muscle Cells, Cat.No. CC-2583, Clonetics, CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH
CASMC-Medium	Smooth Muscle Cell Basal Medium 2, Cat.No. C-22262, Promocell, sowie Zusätze des Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 Kit, Cat.No. C-39262, Promocell, ohne Zugabe von Antibiotika
Zellkulturflaschen	175 cm ² , Cellstar [®] , Cat.No. 660175, Greiner Bio-One
Gelatine 0.5%	Gelatine from bovine skin Typ B, Sigma-Aldrich verdünnt mit PBS
Accutase [®]	Accutase [®] Cat.No. L11-007, PAA Laboratories
DMSO 10%	Dimethylsulfoxid UVASOL [®] , Merck, gelöst in CASMC – Medium, steril filtriert

2.3 Anzucht von venösen und koronararteriellen Endothelzellen

Die Vorversuche an Endothelzellen wurden zunächst mit venösen Endothelzellen (*Human Umbilical Venous Endothelial Cells*, HUVEC) durchgeführt. Die Isolation der HUVEC erfolgte aus einer frischen menschlichen Nabelschnur durch die Medizinisch-Technische-Laborassistentin Tanja Lüdemann im Institut selbst. Die Anzucht geschah analog des CASMC-Protokolls. Als Nährlösung wurde ein spezielles Kulturmedium verwendet.

Nachdem die Vorversuche an HUVEC beendet waren, machte es die Fragestellung erforderlich, die wesentlichen Experimente an koronararteriellen Endothelzellen (*Human Coronary Artery Endothelial Cells*, HCAEC) zu etablieren. Die einer menschlichen Zelllinie entstammenden Endothelzellen wurden, in Trockeneis verpackt, postalisch zugesandt. Eine Charge enthielt laut Hersteller mehr als 500000 Zellen, wobei 15 Zellpassagen zur

Verbreiterung der Population garantiert wurden. Anzucht und Vermehrung gestaltete sich nach dem gleichen Protokoll wie schon für die CASMC beschrieben. Der einzige Unterschied bestand in der Verwendung eines speziellen Kulturmediums sowie von 0.1% Gelatine.

Reagenzien und Material:

HCAEC	Human Coronary Artery Endothelial Cells, Cat.No. CC-2583, CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH
HCAEC-Medium	Endothelial Cell Basal Medium MV 2, Cat.No. C-22221, Promocell, sowie Zusätze des Endothelial Cell Growth Medium MV 2 KIT, Cat.No. C-39221, Promocell, ohne Zugabe von Antibiotika
HUVEC-Medium	Endothelial Cell Basal Medium, Cat.No. C-22210, Promocell, sowie Zusätze des Endothelial Cell Growth medium KIT, Cat.No. C-39210, Promocell, ohne Zugabe von Antibiotika

2.4 Infektionsversuche

Für die Infektion glatter Muskelzellen und venöser Endothelzellen wurden je Probe 250000 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte eingesetzt. Versuche mit arteriellen Endothelzellen wurden mit einer Anzahl von 400000 Zellen je Vertiefung durchgeführt. Infektionen für Western Blot Experimente umfaßten je Probe 500000 Zellen, aufgeteilt auf zwei Vertiefungen einer 6-Loch-Zellkulturplatte. Für die Versuche kamen maßgeblich frühe Passagen (n= 4 - 6) der Zellreihen in Frage.

Die Zellen wurden in die zuvor mit Gelatine beschichteten Vertiefungen der Zellkulturplatten überbracht und für 24h in ihrem entsprechenden Anzuchtmedium unter den oben genannten Bedingungen im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte zunächst die einstündige Vorbehandlung der dafür vorgesehenen Proben mit Inhibitoren der verschiedenen mitogenaktivierenden Proteinkinasen (MAP-Kinasen, MAPK). Im Anschluß wurde die Infektion der Zellen mit ca. 10^5 IFU je Vertiefung durchgeführt und die Proben in ihrem jeweiligen Kulturmedium ohne Antibiotikazusätze für die je nach Versuch variierende Zeitspanne im Brutschrank inkubiert. Eine Zentrifugation der Platten fand zum

Schutz der empfindlichen Zellen nicht statt. Zu definierten Zeitpunkten schloß sich je nach Experiment die Isolierung der mRNA oder Western Blot Experimente an.

Das Ausmaß der Infektion wurde für jeden Versuch mikroskopisch kontrolliert. Dazu erfuhren Deckgläschen in den Vertiefungen der Zellkulturplatten eine entsprechende Beimpfung mit den jeweiligen Zellen und eine nachfolgende Infektion. Analog den Zeitpunkten im Hauptversuch folgte im Anschluß die schon oben erwähnte Immunfluoreszenzfärbung.

Inhibitoren der MAP-Kinasen:

MAP-Kinase	Inhibitor	Konzentration
phospho-p38	SB 203580 Calbiochem (Cat.No. 559389)	20 µmol
phospho-p44/42 (MEK 1/2)	UO 126 Calbiochem (Cat.No.662005)	10 µmol
c-Jun N-terminal Kinase (JNK)	JNK Inhibitor II Calbiochem (Cat.No. 420119)	10 µmol

2.5 Isolierung der mRNA

Die Isolierung der mRNA aus den jeweiligen Zellen erfolgte unter Verwendung des *Nucleo Spin RNA II Kit*.

Zunächst war es nötig, die Zellen aus den Infektionsversuchen zu definierten Zeitpunkten mittels einer Lösung aus einem mitgelieferten Lysispuffer und β -Mercaptoethanol (Verhältnis 100:1) zu fixieren. Dazu wurde je Vertiefung einer 6-Loch-Platte 350 µl der Lösung auf die Zellen pipettiert und diese durch den enthaltenen Lysispuffer gelöst. Die entstandene gallertartige Substanz konnte nun bei einer Temperatur von $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden. Unter diesen Umständen war es möglich, nach und nach alle Proben eines Versuches, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen wurden, zu sammeln und nach Erhalt der letzten Probe mit der eigentlichen RNA-Isolierung zu beginnen. Dazu wurde in Anlehnung an das vom Hersteller vorgeschlagene Protokoll verfahren. Um eventuell vorhandene DNA-Fragmente zu entfernen, wurde die extrahierte RNA mit einer DNase behandelt. Des weiteren folgte zum Schutz der Ribonucleinsäuren eine Inkubation mit einem RNase-Inhibitor. Nach erfolgter Extraktion lag die RNA in wäßriger Lösung vor.

Aufgrund ihrer Fragilität, empfahl es sich, im Anschluß an die RNA-Isolierung die reverse Transkription in die stabilere cDNA vorzunehmen.

Reagenzien und Material:

Nucleo Spin RNA II Kit	Cat.No. 740955.250 , Macherey-Nagel
β-Mercaptoethanol	2-Hydroxyethylmercaptan, Cat.No. M 7522, Sigma-Aldrich
RNAse-Inhibitor	Ribonuclease Inhibitor, Cat.No. R 2520, Sigma-Aldrich
DNase	DNase I, Cat.No. D 0418, Macherey-Nagel

2.6 Reverse Transkription von isolierter mRNA in komplementäre DNA

Das Konvertieren von zuvor isolierter mRNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* unter Verwendung einer AMV (Avian Myeloblast Virus) Reversen Transkriptase durchgeführt. Im folgenden ist die Zusammensetzung des Mastermix angegeben:

<u>Reagenz</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Je Probe</u>
10x Reaktionspuffer	100 mM Tris, 500 mM KCl, pH= 8.3	2.0 µl
MgCl ₂	25 mM	4.0 µl
Deoxynucleotide Mix	dATP, dCTP, dTTP, dGTP je 10 mM	2.0 µl
Random Primer p(dN) ₆	0.04 A ₂₆₀ units/µl (2 µg/µl)	2.0 µl
RNAse Inhibitor	50 Units/µl	1.0 µl
AMV Reverse Transkriptase	≥ 20 Units	0.8 µl
Steriles Wasser		3.2 µl

Je Probe wurden anschließend 5 µl isolierter mRNA eingesetzt, so daß sich ein Endvolumen von 20 µl ergab.

In Anlehnung an das vom Hersteller vorgesehene Protokoll folgte die Inkubation der Proben nach dem unten aufgeführten Schema:

<u>Vorgang</u>	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>
Annealing des Primers	10 Minuten	25 °C
cDNA-Synthese	60 Minuten	42 °C
Denaturierung der Reversen Transkriptase	5 Minuten	99 °C
Kühlung	∞	4 °C

Zur Konservierung der cDNA wurden die Proben bis zu ihrer weiteren Verwendung, der quantitativen Polymerase Kettenreaktion mittels LightCycler[®] Instrument, bei einer Temperatur von –20 °C gelagert.

Reagenzien und Material:

First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR

Cat.No. 1483188, Roche[®] Molecular Biochemicals

Thermocycler

Programmable Thermo Cycler PTC-100, MJ Research

2.7 Real Time PCR mit dem LightCycler® Instrument

Für die quantitative Bestimmung der mRNA Expression der zu untersuchenden Proteine aus den isolierten Proben wurde die Real Time PCR mit dem LightCycler® Instrument verwendet. Im folgenden ist die Zusammensetzung des verwendeten Mastermix wiedergegeben:

<u>Reagenz</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Je Probe</u>
Steriles Wasser		12.6 µl
MgCl ₂	25 mM	2.4 µl
SYBR Green®	FastStart® Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP incl. dUTP anstatt dTTP, SYBR Green® I Farbstoff, 10mM MgCl ₂	2.0 µl
Primer (upstream)	20 µmol	0.5 µl
Primer (downstream)	20 µmol	0.5 µl

Je Probe wurden anschließend 2.0 µl cDNA eingesetzt, so daß sich eine Gesamtmenge von 20 µl ergab. Die eingesetzten Primer sind der folgenden Tabelle zu entnehmen. Als endogene Kontrolle (house-keeping gene) fungierte die quantitative Bestimmung der menschlichen 18sRNA.

Zielsequenz	Primer	Sequenz upstream primer	Sequenz downstream primer
18s RNA	18s RNA	5'-TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG-3'	5'-GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA-3'
Endothelin-1	ET-1	5'-GAA TTT TTG CCA AGC AGG AA-3'	5'-TGA CGC TGT TTC TCA TGG TC-3'
Endothelin-A-Rezeptor	ETAR	5'-TTC TCA AGC TGC CAT TCC TT-3'	5'-TAT CCT GGC CAT TCC TGA AG-3'
Endothelin-B-Rezeptor	ETBR	5'-GTC TTA GTG GGT GGC GTC AT-3'	5'-GAC GCT TCT GGA GCA GGT AG-3'

Anschließend wurde die RT-PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<u>Vorgang</u>	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>
Denaturierung	10 Minuten	95 °C
45 Zyklen der Amplifikation:		
• Trennung der DNA-Doppelstränge (Denaturation)	10 Sekunden	95 °C
• Binden der Primer (Annealing)	5 Sekunden	60 °C
• DNA-Synthese (Extension)	10 Sekunden	72 °C

Die Bestimmung der mRNA Expression der jeweiligen Proteine auf den Wirtszellen erfolgte in Beziehung zur Menge der ermittelten 18sRNA. Als Grundlage diente die von Winer et al. dargelegte Formel zur Validierung von Real Time PCR Produkten ¹⁹⁹.

$$x = 2^{- (\Delta_1 - \Delta_2)}$$

x	= n-fache Stimulation der mRNA Expression
Δ_1	= (stimulierte Zellen) _{ET-1/ ETAR/ ETBR} - (stimulierte Zellen) _{18s}
Δ_2	= (unstimulierte Zellen) _{ET-1/ ETAR/ ETBR} - (unstimulierte Zellen) _{18s}

Reagenzien und Material:

LightCycler® Instrument	Roche®
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Cat.No. 3 003 230, Roche Molecular Biochemicals
18s, ET-1, ETAR, ETBR Oligo-Primer	MWG-BIOTECH GmbH

2.8 Western Blot

Für die Western Blot Untersuchungen wurden je Probe 500000 Zellen eingesetzt, bestehend aus 2 x 250000 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte. Sie hatten zuvor, abhängig vom Versuchsprotokoll, eine Behandlung mit Medium, eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* oder eine zusätzliche Behandlung mit Inhibitoren der MAP-Kinasen (Mitogen aktivierende Proteinkinasen) erfahren.

Zu definierten Zeitpunkten konnten die Zellen in insgesamt 600 µl Lysispuffer je Probe gelöst und bei einer Temperatur von -20 °C konserviert werden. Die Auftrennung der Proteinfraction erfolgte mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) unter Verwendung eines 12%-igen SDS-Gels (Lauf: 45 Minuten bei 200 V), wobei jeweils 30 µl Probenmaterial eingesetzt wurde. Anschließend konnten die Zellproteine bei einer Laufzeit von 90 Minuten und einer Spannung von 75 V auf eine Nitrocellulose-Membran (4 °C) transferiert werden. Im Anschluß daran folgten das Blocken unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran mit 5%-iger Trockenmilch für 60 Minuten und dreimaliges Waschen mit T-TBS à 15 Minuten. Im Anschluß konnte die Membran mit dem gewünschten Primärantikörper, verdünnt in 5% Trockenmilchlösung, bei einer Temperatur von 4 °C über Nacht inkubiert werden. Als quantitative Ladekontrolle der eingesetzten Proben wurde der Primärantikörper gegen humanes β-Actin verwendet, ein in eukaryotischen Zellen ubiquitär vorkommendes Protein des Zytoskeletts.

Am folgenden Tag wurde der dreimalige Waschvorgang mit T-TBS (je 15 Minuten) wiederholt und die Membran mit dem Sekundärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diesem Schritt folgte wiederum ein dreimaliges Waschen der Membran mit T-TBS (je 15 Minuten).

Für die Entwicklung der immunreaktiven Banden wurde ein chemilumineszentes Reagenz verwendet, dem die Membran 2 Minuten ausgesetzt war. Die Belichtung des sensitiven Filmes beanspruchte zwischen 5 Minuten und 21 Stunden, um je nach verwendetem Antikörper und Zelltyp eine adäquate Darstellung der Banden zu erzielen.

Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper:

Antikörper	Quelle	Verdünnung	Hersteller
Anti- β -Actin	Kaninchen	1:1000	Cat.No. 4967 Cell Signaling
Anti-phospho-SAPK/ JNK (Thr 183/ 185)	Kaninchen	1:1000	Cat.No 4671 Cell Signaling
Anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr 202/ 204)	Kaninchen	1:1000	Cat.No. 9101 Cell Signaling
Anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/ 182)	Kaninchen	1:1000	Cat.No. 9211 Cell Signaling
Anti-Endothelin-1 IgG	Maus	1:1000	Cat.No. CP 44 Calbiochem
Anti-Endothelin-A- Rezeptor	Kaninchen	1:1000	Cat.No. E 3651 Sigma-Aldrich
Anti-Endothelin-B- Rezeptor	Kaninchen	1:1000	Cat.No. ab 1921 Abcam
Anti-Maus IgG, HRP- konjugiert	Pferd	1:4000	Cat.No. 7076 Cell Signaling
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	Ziege	1:4000	Cat.No. 7074 Cell Signaling

Reagenzien und Material:

Lysispuffer	125 mM Tris HCl – pH = 7.80, 4% SDS, 20% Glycerol, 10% DTT 1 M, 0.05% Bromphenol Blau
Nitrocellulose Membran	Protran [®] B85, Cat.No. 10401196, Schleicher & Schuell
Sammelgel (5%)	0.5 M Tris/HCl 2.5 ml (pH=6.8), Acrylamid Bis 1.25 ml, 10% SDS 100 μ l, TEMED 10 μ l, 10% APS 50 μ l ad 10 ml Aqua dest.
Trenngel (12%)	1.5 M Tris/HCl 2.5 ml (pH=6.8), Acrylamid Bis 3 ml, 10% SDS 100 μ l, TEMED 5 μ l, 10% APS 50 μ l ad 10 ml Aqua dest.
APS	Ammoniumpersulfat, Cat.No. A 3678, Sigma-Aldrich
DTT	Dithiothitol, Cat.No. 708-984, Roche Diagnostics

Acrylamid Bis	Cat.No. 161-0144, Bio-Rad Laboratories
TEMED	4-Methylethylendiamin, Cat.No. T 9281, Sigma-Aldrich
Elektrophoresepuffer	Tris 3g/ L, Glycin 14.4g/ L, Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) 1g/ L ad 1L Aqua dest., pH= 8.3
Blotpuffer	Tris 3g/ L, Glycin 14.4g/ L, Methanol 200ml ad 1L Aqua dest.
Blockpuffer	Trockenmilch 5g, Tween 1ml ad 100ml TBS
TBS	Tris Base 2.42g/ L, NaCl 8g/ L ad 1L Aqua dest.
T-TBS	TBS + 1ml Tween
ECL Western Blotting Detection Reagent and Analysing System	Cat.No. RPN 2106/8/9, Amersham Biosciences
Hyperfilm ECL [®]	Cat.No. RPN 3114 K, Amersham Biosciences
Blottingpapier	Papier GB 003, Cat.No. 10426881, Schleicher & Schuell
Marker	Prestained Protein Marker, Broad Range 6.5-175 kDa, Cat.No. P7708S, New England Biolabs

2.9 Immunfluoreszenzfärbung

Um die Rezeptorexpression auf den verwendeten Zellen immunhistochemisch darzustellen, wurden Endothelzellen und glatte Muskelzellen zunächst in 48-Loch-Zellkulturplatten direkt auf einem darin befindlichen Deckgläschen angezüchtet. Auf jede Vertiefung entfielen 40000 CASMC, bzw. HCAEC. Im Anschluß erfolgte wie unter 2.4 beschrieben, die Infektion mit *Chlamydia pneumoniae*. Nach definierten Zeitpunkten wurde das Medium entfernt und die bewachsenen Deckgläschen 10 Minuten mit 1% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen zu fixieren. Im Anschluß erfolgte in einer feuchten Kammer die Behandlung der Zellen mittels 10% Rinderalbumin für 20 Minuten, um unspezifische Bindungsstellen auf der Zelloberfläche zu blockieren. Nach einem Waschschrift durch PBS konnte auf jedes zu färbende Deckgläschen der gewünschte 1. Antikörper aufpipettiert und für 60 Minuten in der feuchten Kammer bebrütet werden. Um die Antikörperlösung anschließend zu entfernen, wurde mit PBS gewaschen und der 2. Antikörper, der sich im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen ließ, aufgebracht.

Die Inkubation fand für 45 Minuten in der feuchten Kammer und in absoluter Dunkelheit statt. Nach diesem Schritt konnten die Zellen mittels PBS gewaschen, und nach einer kurzen Trocknungszeit auf einem Objektträger eingedeckt werden.

Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper:

Antikörper	Quelle	Verdünnung	Hersteller
Anti-Endothelin-A-Rezeptor	Kaninchen	1:1000	Cat.No. E 3651 Sigma-Aldrich
Anti-Endothelin-B-Rezeptor	Kaninchen	1:1000	Cat.No. ab 1921 Abcam
Anti-Kaninchen IgG, FITC-konjugiert	Ziege	1:300	Cat.No. F 9887 Sigma-Aldrich

Reagenzien und Material:

1% Paraformaldehyd	Paraformaldehyde, Sigma-Aldrich, Cat.No. P 6148, verdünnt in PBS
10% Rinderalbumin	Albumin, bovine Fraction V, Cat.No. A 7906, Sigma-Aldrich
48-Loch Zellkulturplatten	Cat.No. 150687, Nunc Products

2.10 Proliferationsversuche mit HCAEC

Dieser Versuch wurde gewählt, um die Effekte eines durch *Chlamydia pneumoniae* stimulierten Endothelin-1 Systems in einem größeren Zusammenhang zu betrachten. In einem Dreifachansatz in 12-Loch-Zellkulturplatten wurden zunächst je Probe und Vertiefung 40000 koronararterielle Endothelzellen (HCAEC) überbracht und für 24h in DMEM-Medium, versetzt mit 2% FBS bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Dieses Medium wurde auch für alle weiteren Abschnitte des Experiments verwendet. Am nächsten Tag erhielten alle sechs Proben neues Medium. Der Versuchsablauf gestaltete sich wie folgt:

- Probe 1** Lediglich Medium während des gesamten Experiments, einmaliger Mediumwechsel nach 24h
- Probe 2** Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* (2 IFU/Zelle) für 24h dann Medium für 24h, bzw. 48h
- Probe 3** Rekombinantes ET-1 in einer Konzentration von 2×10^{-7} M für 24h, dann erneut für 24h, bzw. 48h
- Probe 4** Infektion (2 IFU/Zelle) für 24h dann ET-1 (2×10^{-7} M) für 24h, bzw. 48h
- Probe 5** Präinkubation mit ETAR-Inhibitor BQ-123 (10^{-5} M) für 1h, dann Infektion (2 IFU/Zelle) für 24h, im Anschluß ET-1 (2×10^{-7} M) für 24h, bzw. 48h
- Probe 6** Präinkubation mit ETBR-Inhibitor BQ-788 (10^{-6} M) für 1h, dann Infektion (2 IFU/Zelle) für 24h, im Anschluß ET-1 (2×10^{-7} M) für 24h, bzw. 48h

Zum Zeitpunkt der Probennahme wurden die jeweiligen Zellen zunächst 10 Minuten mit PBS gewaschen. Danach konnte der Puffer entfernt und 100 µl Trypsin hinzugegeben werden. Nach ca. 5 Minuten waren alle Zellen vom Boden der Zellkulturplatte abgelöst und konnten in 150 µl HCAEC-Anzuchtmedium suspendiert werden. Die Lösung wurde nun 5 Minuten bei 13000 U/ min zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 50 µl PBS gelöst. Anschließend fand die Auszählung der Zellen unter dem Mikroskop unter Verwendung einer Neubauer[®]-Zählkammer statt. Die Auszählung der einzelnen Proben erfolgte einfach verblindet.

Reagenzien und Material:

Endothelin-1	Endothelin-1 human and porcine, Cat.No. 05-23-3800, Calbiochem
Endothelin-A-Rezeptor Antagonist	BQ-123 (Sodium Salt), Cat.No. E-1032, A.G. Scientific
Endothelin-B-Rezeptor Antagonist	BQ-788 (Sodium Salt), Cat.No. E-1034, A.G. Scientific
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Cat.No. E 15-843, PAA Laboratories

2.11 Transfektion von siRNA in HCAEC

Dieser Versuch wurde als wesentliche Ergänzung der Infektionsversuche an koronararteriellen Endothelzellen betrachtet. In HCAEC sollte die gezielte Ausschaltung der ETAR-Expression mittels Transfektion spezifischer siRNA erfolgen.

Diese erst seit wenigen Jahren etablierte Methode erlaubt es, kleine interferierende RNA (small/short interfering RNA, siRNA) in eukaryotische Zellen einzubringen und auf elegante Weise, je nach Nucleotidsequenz, gezielt Genprodukte zu inhibieren. Dabei interagiert die in die Zelle überführte, nur 20-25 Nucleotide umfassende siRNA mit dem Multi-Protein-Komplex RISC (RNA induced silencing complex), der die gewünschte Sequenz der mRNA erkennt und auftrennt. Die gespaltene mRNA wird degradiert und das Genprodukt kann nicht exprimiert werden.

In 6-Loch-Zellkulturplatten wurden je Probe 400000 HCAEC eingesetzt. Es war vorgesehen, die Zellen in die zuvor mit Gelatine beschichteten Vertiefungen der Platten zu überbringen und für 24h in ihrem entsprechenden Anzuchtmedium bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank zu inkubieren. Um die Einbringung der siRNA in die Zellen zu erleichtern, wurde das kationische Lipid Lipofectamine 2000 verwendet. Dies mußte zunächst in einer Konzentration von 10 µg/ml für 5 Minuten bei Raumtemperatur in DMEM-Medium verweilen.

Die spezifische siRNA für den Endothelin-A-Rezeptor mit der Sequenz 5' - AAG AAA UAC GCC AAA GUC AUU GUG A – 3' wurde gemäß dem beiliegenden Protokoll mit RNase-freiem Wasser resuspendiert, in einer Konzentration von 0.1 µM der Lipofectamine-Lösung beigegeben und anschließend auf Eis gekühlt. Als Negativ-Kontrolle fungierte RNA mit einem geringen Gehalt an Guanosin und Cytosin. Sie hatte eine entsprechende Nucleotid-Komposition wie die eingesetzte siRNA, jedoch nicht deren Sequenz und konnte somit nicht an der gewünschten Stelle der Ziel-mRNA binden. Sie wurde daher auch als scrambled RNA bezeichnet und erfuhr die gleiche Vorinkubation wie die siRNA. Nach 20 Minuten wurden die in Lipofectamine gelöste siRNA, bzw. scrambled RNA auf die jeweiligen Proben gegeben und die Zellen für 2h im Brutschrank belassen. Anschließend konnte die Lösung entfernt und die dafür vorgesehenen Zellproben mit *Chlamydia pneumoniae* infiziert werden (0.5 IFU/Zelle).

Zu definierten Zeitpunkten nach 24h, bzw. 48h wurden die jeweiligen Proben der Isolierung der RNA und der Transkription in cDNA zugeführt und anschließend mittels RT-PCR analysiert und quantifiziert.

Reagenzien und Material:

Lipofectamine [®] 2000	Cat. No. 11668-027, Invitrogen
Negativkontrolle/ Scrambled RNA	Stealth RNAi Negative Control Duplexes, Cat. No. 12935-200, Invitrogen
siRNA gegen ETAR	Cat. No. 10620312, Primer No. 102416 D05, Invitrogen

2.12 Erfassung der Proliferationskinetik mittels [³H]Thymidin

Um die proliferative Aktivität der HCAEC nach siRNA Transfektion zu erfassen, wurde die Aufnahme radioaktiv markierten [³H]Thymidins in die Zellen erfaßt. Die Zellen wurden dazu gemäß Punkt 2.11 mit spezifischer siRNA gegen den Endothelin-A-Rezeptor, sowie scRNA transfiziert und anschließend infiziert. Im Anschluß wurde ein zusätzlicher Inkubationsschritt mit 1µCi [methyl-³H]Thymidin für 48h durchgeführt und die Radioaktivität bestimmt.

2.13 Maßnahmen gegen Kontaminationen

Um Kontaminationen zu vermeiden, fanden die RNA-Isolation, die Herstellung der Mastermixes, und das Pipettieren von RNA und cDNA jeweils an getrennten Arbeitsplätzen und nach dem aktuellen Wissensstand statt.

Sowohl die Zellkulturen, als auch die Chlamydienstämme wurden durch die Medizinisch-Technische-Laborassistentin Anke Hellberg regelmäßig hinsichtlich einer Mykoplasmen-Kontamination getestet und nur bei negativem Ergebnis für die jeweiligen Experimente verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Stimulation von ET-1 in CASMC durch *Chlamydia pneumoniae*

Die Infektion der koronararteriellen glatten Gefäßmuskelzellen mit *Chlamydia pneumoniae* (0.5 IFU/ Zelle) führte bereits 1h sowie 4h post infectionem zu einer deutlichen Stimulation der Endothelin-1 mRNA (Abb. 1). Die Expression überstieg in zahlreichen Versuchen die im Diagramm dargestellten Werte um ein Vielfaches. Es wurde jedoch darauf verzichtet, diese extremen, aber reproduzierbaren Ergebnisse aufzuführen. Zu späteren Zeitpunkten einer Infektion (12h, 24h, 48h) stellte sich kein nennenswerter Effekt dar.

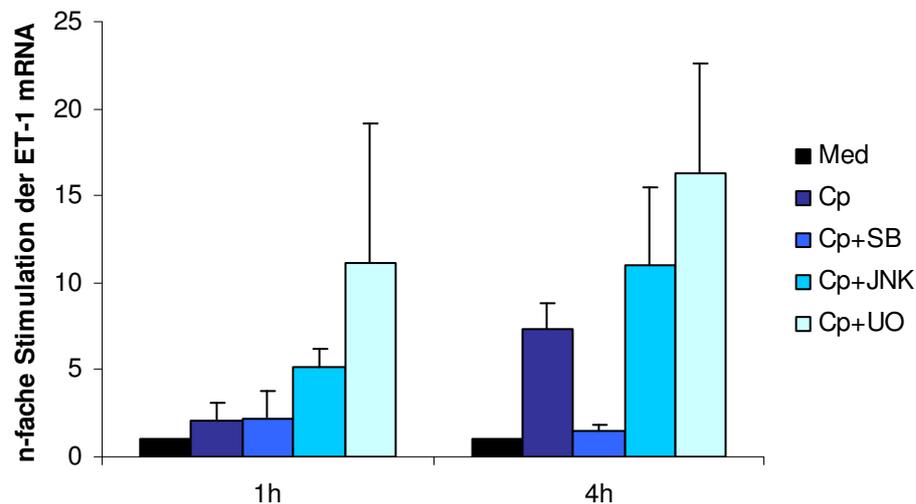


Abb. 1 **Deutliche Stimulation der ET-1 mRNA in CASMC.** Die Infektion vaskulärer glatter Muskelzellen durch *Chlamydia pneumoniae* führte 4h post infectionem zu einer 7.3-fachen Stimulation der ET-1 mRNA (*Cp*), n=4 Versuche. Die ET-1 Expression wurde durch Inhibition der p38-MAPK mittels SB 203580 beinahe vollständig verhindert (*Cp+SB*). Inhibitoren der cJun-Kinase (*Cp+JNK*) oder der p44/42 MAP-Kinase (*Cp+UO*) jedoch verstärkten die ET-1 mRNA Expression. Fehlerbalken stellen in diesem und allen folgenden Diagrammen die Streuung der Werte um ihren jeweiligen Mittelwert an (Standardabweichung).

Um die zugrunde liegende Signaltransduktion, die einer ET-1 Stimulierung vorangeht, zu ermitteln, wurde die Aktivität der drei wichtigen Mitogenaktivierenden Proteinkinasen (MAPK, MAP-Kinasen) p-p38, p-p44/42 und cJun-Kinase (JNK) analysiert. Es zeigte sich, daß *Chlamydia pneumoniae* in CASMC über den Weg der phosphorylierten, also aktivierten p38-MAPK zu einer Aktivierung von Endothelin-1 führt. Eine Blockierung der p-p38-MAPK durch den Inhibitor SB 203580 zog eine deutliche Depression der ET-1 mRNA Produktion nach sich, wie Abb. 1 verdeutlicht.

Die Signalkaskade über die p-p44/42-MAPK, die in zahlreichen intrazellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielt, war hier von untergeordneter Bedeutung. Sie zeigte sich im Western Blot Experiment bereits in der Medium-Kontrolle als stark vorstimuliert. Bei Inhibition der p-p44/42-Aktivität durch UO 126 kam es zu einer fulminanten Steigerung der ET-1 mRNA-Expression (Abb.1). Die cJun-Kinase konnte durch *Chlamydia pneumoniae* nicht angeregt werden. Eine Hemmung ihrer Aktivität durch JNK II-Inhibitor führte ebenfalls zu einer Erhöhung der ET-1 mRNA-Expression (Abb.1).

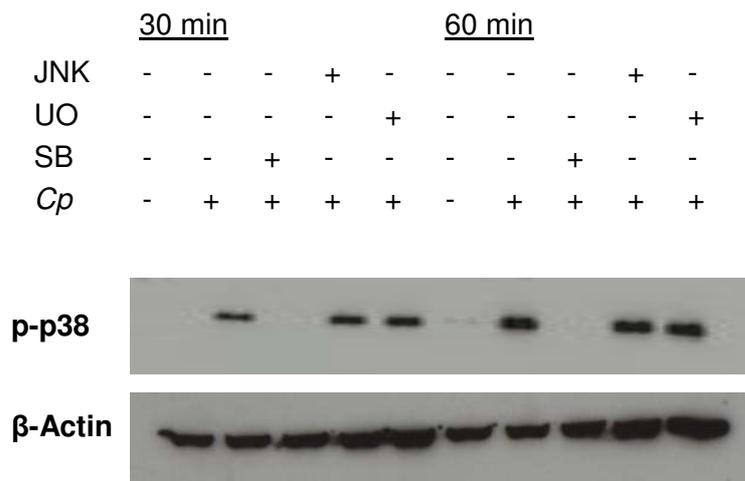


Abb. 2 **Aktivierung der p38-MAP-Kinase in CASMC.** Die Infektion glatter Muskelzellen mit *Chlamydia pneumoniae* führte bereits 30 min. post infectionem zu einer Aktivierung der p38-MAP-Kinase (phosphorylierte Form, p-p38), die auch nach 60 min. noch deutlich meßbar war (*Cp*). Die Aktivierung konnte durch Koinkubation mit dem p-p38-Inhibitor SB 203580 signifikant geblockt werden (SB), nicht jedoch durch Inhibitoren der p-p44/42-MAPK (UO) oder cJun-Kinase (JNK). β-Actin fungierte als Ladekontrolle.

Die Stimulierung der ET-1 mRNA Expression führte 24h, bzw. 48h nach erfolgter Infektion zur Bildung von Endothelin-1. Im Western Blot konnte diese Entwicklung auf der Proteinebene nachvollzogen werden.

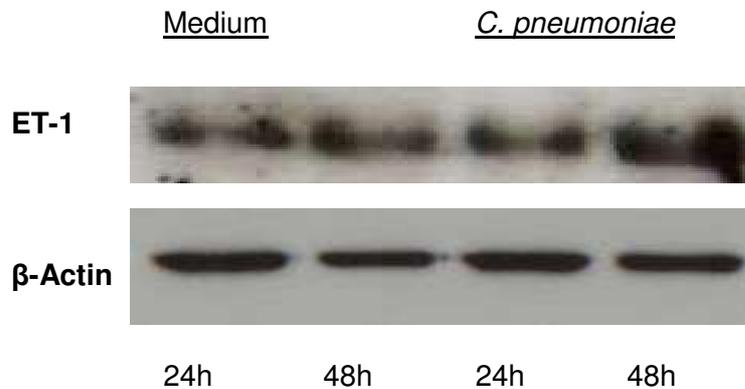


Abb. 3 **Expression von Endothelin-1 auf Proteinebene.** *Chlamydia pneumoniae* führte auf CSMC zu einer Stimulierung von Endothelin-1 auf der Proteinebene. Dies war 24h nach Infektion, bzw. 20h nach Aktivierung der mRNA (vergl. Abb.1) erstmals nachweisbar und 48h post infectionem maximal ausgeprägt. β-Actin fungierte als Ladekontrolle.

3.2 Auswirkung der Infektion auf die Endothelin-Rezeptoren in CSMC

Obwohl die Infektion der glatten Muskelzellen eine deutliche Stimulation der Endothelin-1 mRNA-Expression bedeutete, hatte *Chlamydia pneumoniae* auf die beiden Rezeptoren ETAR und ETBR lediglich geringe Auswirkungen. Anhand der RT-PCR konnte die bekannte Dominanz von ETAR gegenüber ETBR auf glatten Muskelzellen beobachtet werden. Durch die Infektion erfuhr die mRNA Expression sowohl des Endothelin-A-, als auch des Endothelin-B-Rezeptors zwar eine Verdoppelung, doch blieben die Unterschiede dadurch sehr gering. Das Rezeptorprofil auf CSMC wurde durch *Chlamydia pneumoniae* also nur unbedeutend verändert. Die zugrundeliegende Signaltransduktion konnte in diesem Zusammenhang nur unzureichend geklärt werden. Wie schon erwähnt, zeigten sich in CSMC maßgeblich die p38- und die p44/42-MAPK als aktiviert. Es ist jedoch anzumerken, daß die Inhibierung aller drei untersuchten MAP-Kinasen zu einer Reduzierung der mRNA Expression sowohl von ETAR, als auch von ETBR bedeutete. Die Blockierung der p38-MAPK jedoch hatte diesbezüglich jedoch den größten Effekt (Abb.4-5).

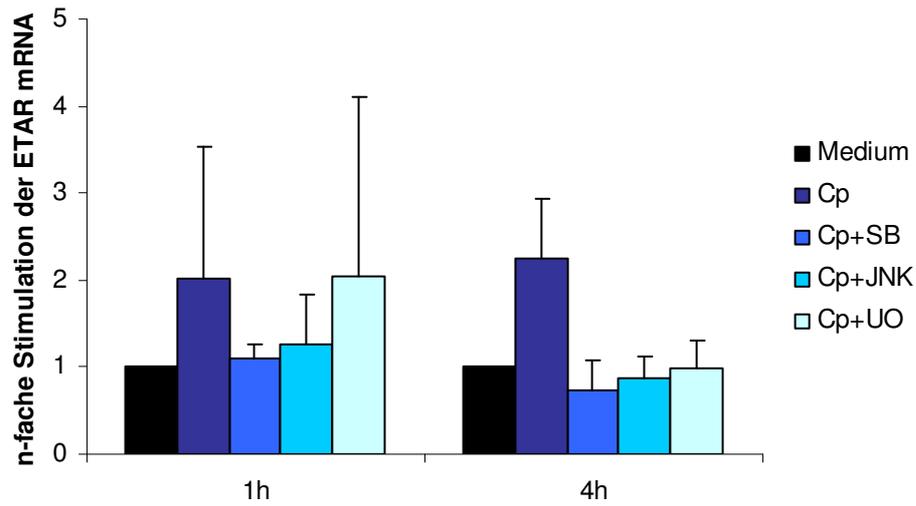


Abb. 4

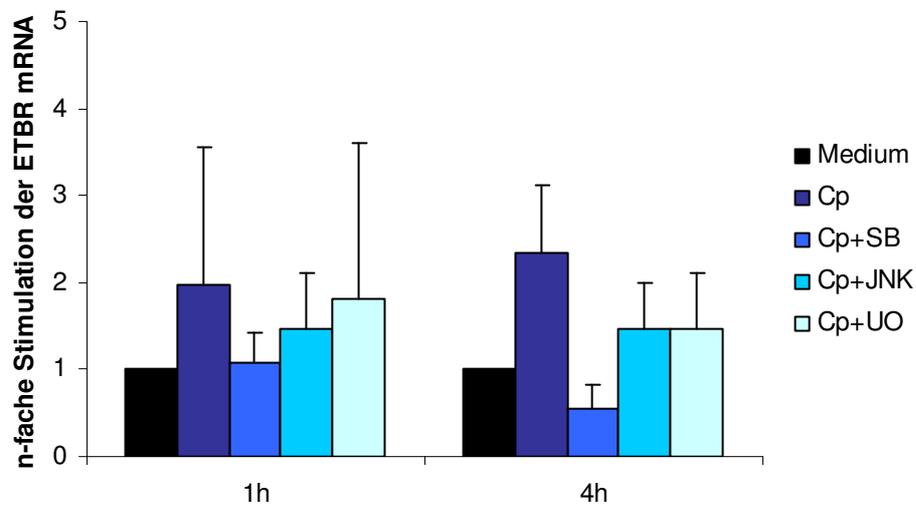


Abb. 5

Nahezu homogene Stimulation beider Rezeptorsubtypen in CASMC. Die Infektion führte in glatten Muskelzellen zu einer gleichförmigen, annähernd 2-fachen Stimulation sowohl des Endothelin-A- (Abb. 4), als auch des Endothelin-B-Rezeptors (Abb. 5) 1h, bzw. 4h post infectionem (*Cp*), *n*=4 Versuche. In beiden Subtypen zeigte sich eine Abhängigkeit der mRNA Expression von allen drei MAP-Kinasen. Der Inhibierung der p38-MAPK kam dabei jeweils die größte Bedeutung zu (*Cp*+SB).

3.3 Stimulation von ET-1 in HCAEC durch *Chlamydia pneumoniae*

Unter physiologischen Umständen stellen Endothelzellen den Hauptdonator von Endothelin-1 dar. Doch die Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* (0.5 IFU/ Zelle) führte in koronararteriellen Endothelzellen zu einer eher geringen Expression der Endothelin-1 mRNA, insbesondere im Vergleich mit dem Effekt auf CASMC (Abb.1). Sowohl zu frühen (1h, 4h), als auch zu späten (24h, 48h) Zeitpunkten einer Infektion stellte sich eine annähernd zweifache Aktivierung der mRNA dar (Abb.6).

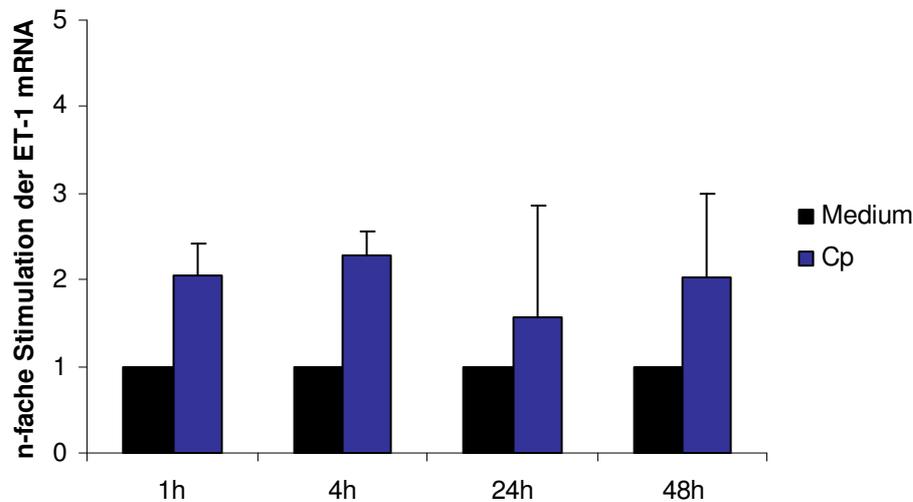


Abb. 6 **Geringe Stimulation von ET-1 in HCAEC.** Die Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* führte in koronararteriellen Endothelzellen zu einer nur mäßigen, annähernd 2-fachen Stimulation der ET-1 mRNA Expression (Cp), insbesondere im Vergleich zur ET-1 Aktivierung in glatten Muskelzellen, n=4 Versuche.

Wie bei den glatten Muskelzellen, lag auch hier der Aktivierung der ET-1 mRNA eine p-p38-MAPK abhängige Signaltransduktion zugrunde. Doch auch die cJun-Kinase spielt auf Endothelzellen anscheinend eine größere Rolle, als dies auf CASMC der Fall war. Zum einen war JNK durch *Chlamydia pneumoniae* in Endothelzellen klar stimulierbar. Andererseits führte ihre Antagonisierung durch den JNK II-Inhibitor besonders 48h post infectionem nachweislich zu einer Reduzierung der ET-1 mRNA (Abb.8).

Die p-p42/44-MAPK war, wie auch in den CASMC dauerhaft stimuliert, ein Bezug zum ET-1-System ließ sich jedoch nicht herstellen.

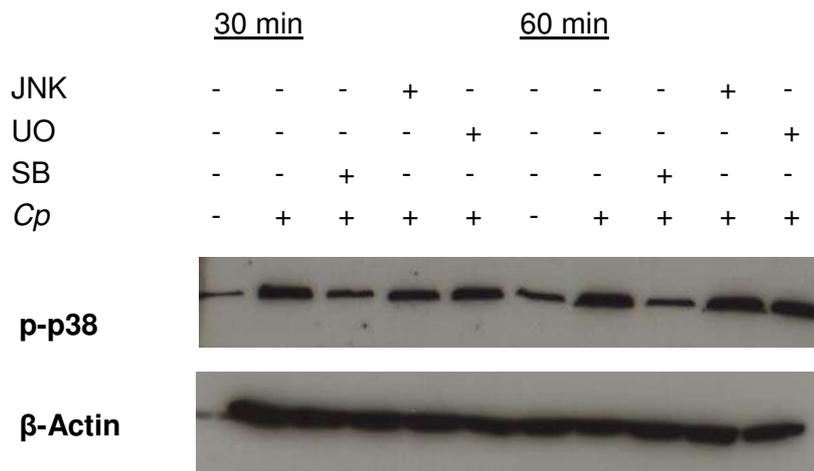


Abb. 7 **Aktivierung der p38-MAP-Kinase in HCAEC.** Die Infektion der Endothelzellen mit *Chlamydia pneumoniae* führte auch hier 30 min. post infectionem zu einer Aktivierung der p38-MAP-Kinase (phosphorylierte Form, p-p38), die auch nach 60 min. noch deutlich meßbar war (Cp). Die Aktivierung konnte durch Koinkubation mit dem p38-Inhibitor SB 203580 signifikant geblockt werden (SB), nicht jedoch durch Inhibitoren der p-p44/42-MAPK (UO) oder cJun-Kinase (JNK). β -Actin fungierte als Ladekontrolle.

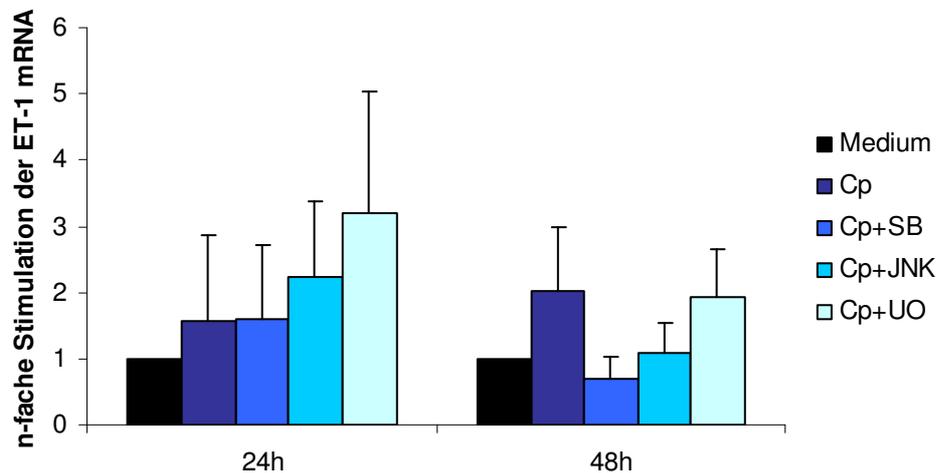


Abb. 8 **Beteiligung von cJun-Kinase und p38-MAPK an der ET-1 Stimulation in HCAEC.** Anders als in CSMC führte in HCAEC eine Blockierung der cJun-Kinase mittels JNK II-Inhibitor zur Verringerung der ET-1 mRNA Expression. Dieser Effekt war besonders 48h nach Infektion zu beobachten (Cp+JNK), n=4 Versuche. Daneben wie auch in CSMC Reduktion der ET-1 mRNA Expression durch Inhibition der p-p38-MAPK durch SB 203580 (Cp+SB). Jedoch erhaltene ET-1 Aktivierung bei Blockierung der p-p44/42-MAPK durch UO 126 (Cp+UO).

3.4 Auswirkung der Infektion auf die Endothelin-Rezeptoren in HCAEC

Wurden auf den glatten Muskelzellen die beiden Endothelin-Rezeptoren durch *Chlamydia pneumoniae* annähernd gleichförmig stimuliert (Abb.4-5), so führte die Infektion der Endothelzellen zu einer deutlichen Diskrepanz hinsichtlich des Stimulationsverhaltens. Die mRNA des Endothelin-A-Rezeptors erfuhr 24h, bzw. 48h post infectionem eine eindeutig vermehrte Expression mit durchschnittlichen Werten um das dreifache (Abb.9). Hingegen ließ die mRNA des Endothelin-B-Rezeptors, welcher der prädominante Subtyp auf Endothelzellen ist, nur eine geringe Stimulation erkennen (Abb.10). Zu früheren Zeitpunkten einer Infektion (1h, 4h, 12h) stellte sich jeweils kein nennenswerter Effekt dar.

Es zeigte sich durch Inhibition der jeweiligen MAP-Kinasen, daß die cJun-Kinase an diesem Prozeß regulatorisch eine gewisse Rolle spielt, denn allein ihre Antagonisierung führte zu einer Minderung der mRNA Expression des Endothelin-A-Rezeptors. Der nicht vollständig inhibitorische Effekt läßt darauf schließen, daß noch weitere, bislang unbekannte Signaltransduktionswege an der Regulierung von ETAR, möglicherweise auch ETBR in Endothelzellen beteiligt sind. Die p-p38-MAPK und die p-p44/42-MAPK spielten in der Regulation der Rezeptoren keine nennenswerte Rolle.

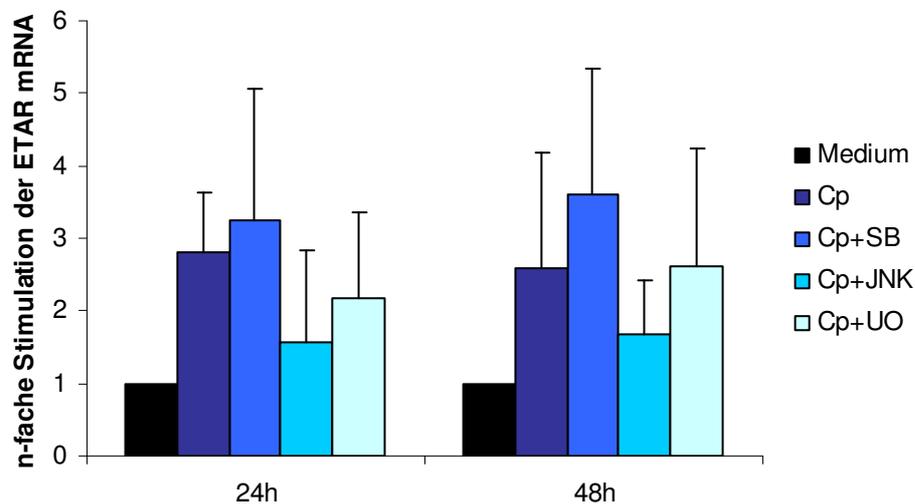


Abb. 9

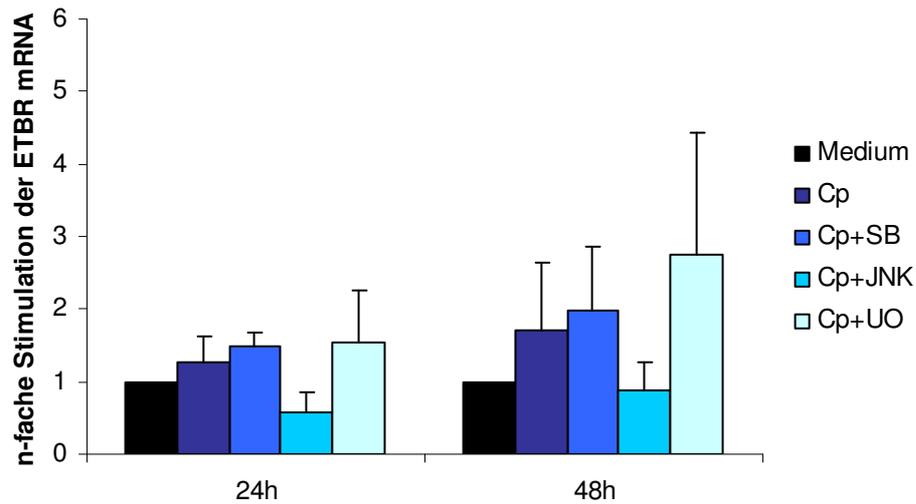


Abb. 10 **Deutliche Unterschiede in der Stimulation der Rezeptorsubtypen in HCAEC.** *Chlamydia pneumoniae* führte in koronararteriellen Endothelzellen 24h und 48h post infectionem zu einer deutlichen, 2.8-fachen, bzw. 2.5-fachen Stimulation der ETAR mRNA (Abb.9), während ETBR eine vergleichsweise geringe Aktivierung (1.2-1.5-fach) erfuhr (*Cp*) (Abb.10), n=4 Versuche. Die Hemmung der cJun-Kinase bedeutete in beiden Fällen eine Reduzierung der mRNA Expression (*Cp+JNK*), möglicherweise unter Berücksichtigung anderer Signaltransduktionswege. P-p38-MAPK und p-p44/42-MAPK spielten in der Regulation der Rezeptoren keine Rolle (*Cp+SB*, *Cp+UO*).

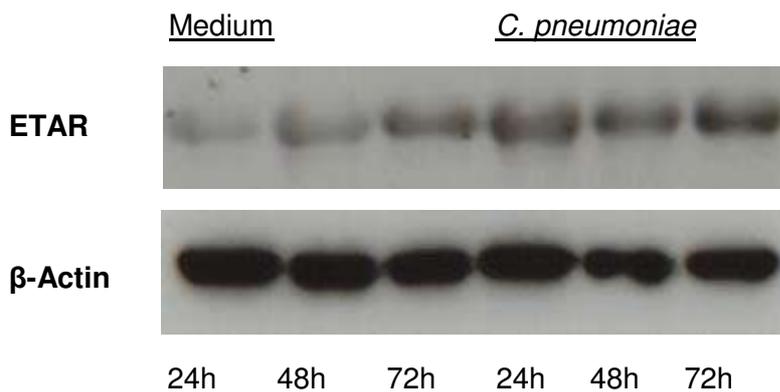


Abb. 11 **Stimulation des Endothelin-A-Rezeptors in HCAEC.** Auch im Western Blot Experiment ließ sich die Stimulation von ETAR durch *Chlamydia pneumoniae* darstellen. β -Actin fungierte als Ladekontrolle.

3.5 Immunhistochemische Darstellung der Rezeptorstimulation in HCAEC

Ergänzend zu den bereits erwähnten Methoden wurden die Unterschiede bezüglich der Rezeptorstimulation in koronararteriellen Endothelzellen zusätzlich färberisch dargestellt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte anschließend sehr anschaulich gezeigt werden, daß der Endothelin-A-Rezeptor 24h, bzw. 48h nach Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* eine deutliche Aktivierung erfuhr (Abb.12). Der Endothelin-B-Rezeptor hingegen verblieb zu diesen Zeitpunkten unbeeinflusst (Abb.13). ETBR liegt, wie auch anhand der Photographien erkennbar, sowohl in infizierten aber auch in nicht infizierten HCAEC als stimuliert vor. Dies läßt sich dadurch erklären, daß ETBR ohnehin den prädominanten Rezeptor-subtyp auf Endothelzellen darstellt.

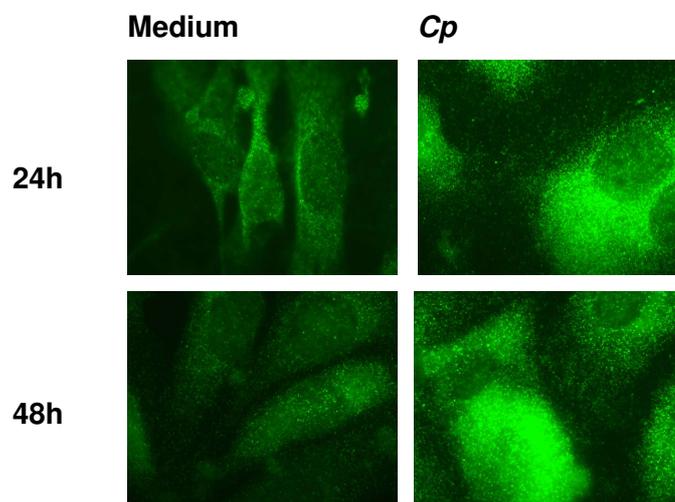


Abb. 12 **Stimulation des Endothelin-A-Rezeptors in HCAEC.** Der stimulatorische Effekt von *Chlamydia pneumoniae* auf ETAR läßt sich fluoreszenzmikroskopisch darstellen (Cp).

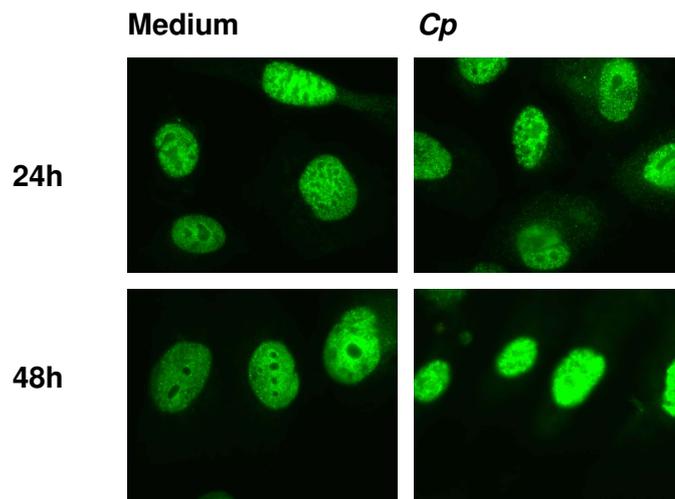


Abb. 13 **Keine Beeinflussung des Endothelin-B-Rezeptors in HCAEC.** Die Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* führte zu keiner nennenswerten Änderung des Fluoreszenzverhaltens von ETBR. Vielmehr stellte sich der Rezeptor bereits in der Kontrolle (Medium) deutlich dar, was mit der physiologischen Dominanz von ETBR auf Endothelzellen zu erklären ist.

3.6 Rezeptorreduktion durch Transfektion von siRNA in HCAEC

Wie aus Abschnitt 3.4 ersichtlich ist, zeigte sich das System des Endothelin-A-Rezeptors in Endothelzellen durch die Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* als deutlich stimulierbar. Um eine gezielte Ausschaltung der mRNA des Endothelin-A-Rezeptors zu erreichen, erfolgte die Transfektion spezifischer siRNA (small interfering RNA) in koronararterielle Endothelzellen (siehe auch Abschnitt 2.11). Es zeigte sich zunächst, daß die Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* in HCAEC 24h und besonders 48h post infectionem zur schon erwähnten Stimulation der mRNA Expression von ETAR führte. Transfizierte man jedoch vor der Infektion spezifische interferierende RNA, welche gegen die mRNA von ETAR gerichtet war, konnte man besonders 48h post infectionem einen deutlichen Rückgang der ETAR mRNA-Expression erkennen (Abb.14). Bei Infektion der Zellen unter Verwendung von RNA mit geringem Gehalt an Guanin und Cytosin, welche als Negativkontrolle galt (scrambled RNA, scrRNA), wurde die mRNA wieder exprimiert. Als weitere Negativkontrollen wurden Proben hinzugezogen, die lediglich Medium aber keine Chlamydien enthielten.

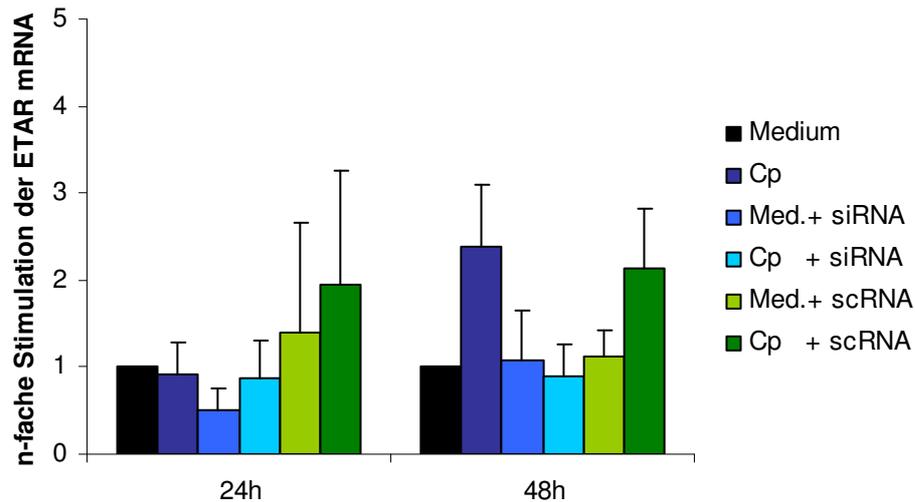


Abb. 14 **Verminderung der ETAR mRNA Expression durch spezifische siRNA.** Die Stimulation der ETAR mRNA durch *Chlamydia pneumoniae* (Cp) konnte durch spezifische inhibitorische RNA (small interfering RNA, siRNA) stark reduziert werden, was besonders 48h post infectionem deutlich wurde, n=4 Versuche. RNA mit geringem Anteil an Guanin und Cytosin (scrambled RNA, scRNA) galt als Negativkontrolle und hatte keine inhibitorischen Eigenschaften, weshalb eine Stimulation der ETAR mRNA erfolgte. Medium fungierte ebenfalls als Negativkontrolle.

Um zu demonstrieren, daß die verwendete siRNA spezifisch gegen bestimmte Sequenzen der mRNA des Endothelin-A-Rezeptors gerichtet war, wurde auch die mRNA-Expression des Endothelin-B-Rezeptors bestimmt. Hier konnte gezeigt werden, daß es durch die Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* in HCAEC, wie bereits oben beschrieben, zwar zu einer geringfügigen Stimulation der ETBR mRNA kam (Abb.10). Eine Transfektion mit für ETAR spezifischer siRNA besaß jedoch keinen hemmenden Einfluß auf deren Expression (Abb.15).

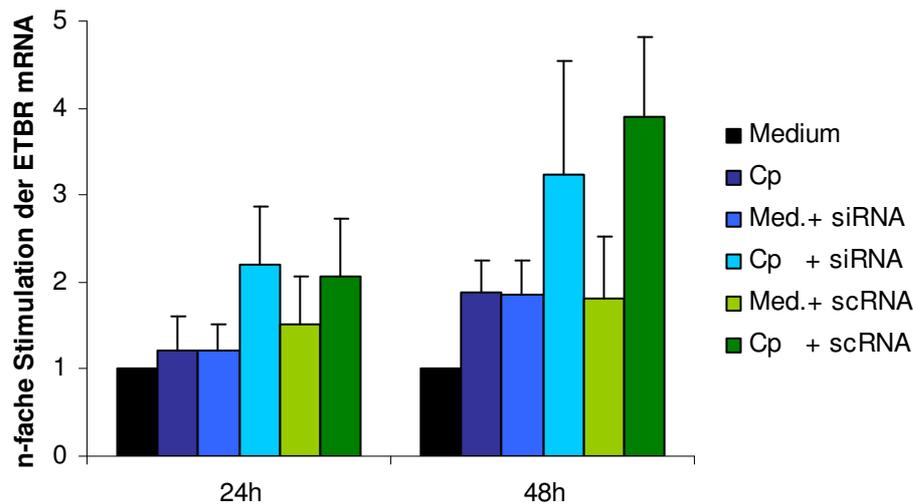


Abb. 15 **Kontrolle der Spezifität der siRNA.** Da sich die verwendete siRNA spezifisch an Regionen der ETAR mRNA band, konnte die mRNA des Endothelin-B-Rezeptors exprimiert werden. Es kam hierbei zu keiner Inhibition der ETBR mRNA, n=4 Versuche.

3.7 Proliferation vaskulärer Endothelzellen

Wie bereits in Punkt 1.7 beschrieben, werden über den Endothelin-A-Rezeptor mitogene Prozesse reguliert. Darüber hinaus konnte in den zuvor erwähnten Versuchen dargestellt werden, daß die Infektion vaskulärer Endothelzellen mit *Chlamydia pneumoniae* zur Ausbildung eines ETAR dominanten Phänotyps führt. Dieser Versuch sollte daher aufzeigen, inwiefern zuvor infizierte und damit ETAR exprimierende HCAEC unter Zugabe von rekombinantem Endothelin-1 mit einem Zellwachstum antworten.

Es zeigte sich, daß HCAEC mit einer deutlichen Proliferation reagierten, wenn sie einer Infektion durch *Chlamydia pneumoniae* über den Zeitraum von 24h ausgesetzt waren, und im Anschluß für 24h, bzw. 48h rekombinantes Endothelin-1 in physiologischer Konzentration erhielten (Abb.16).

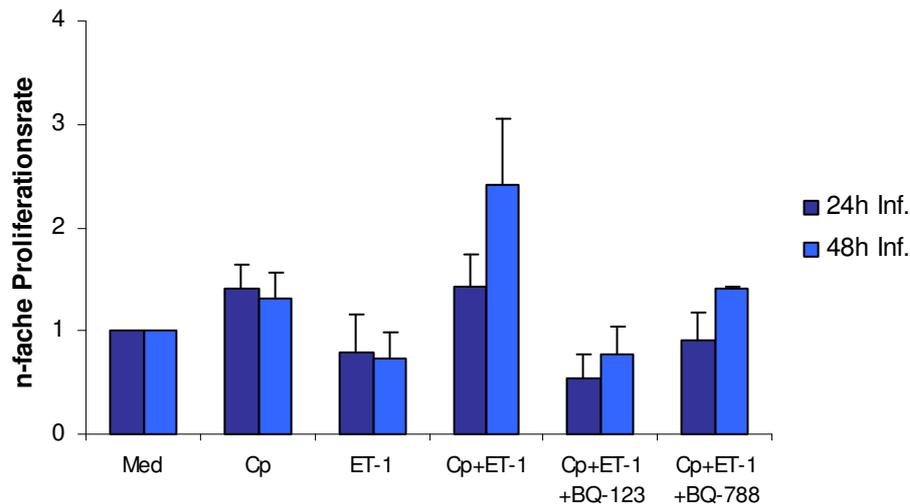


Abb. 16 **Proliferation von HCAEC durch ein verändertes Rezeptorprofil.** Vaskuläre Endothelzellen exprimieren durch die Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* vermehrt Endothelin-A-Rezeptor, über den mitogene Prozesse reguliert werden. Traf Endothelin-1 auf Endothelzellen, die ETAR infektionsbedingt verstärkt präsentierten, kam es zum Wachstum der HCAEC (Cp+ET-1) (1.4-2.4-fache Rate), n=3 Versuche. Der proliferative Effekt dieser Konstellation überstieg das bereits bekannte Zellwachstum unter Chlamydien allein (Cp) deutlich (1.4-fache Rate). Inhibition von ETAR durch BQ-123 schwächte die mitogene Potenz folglich ab (Cp+ET-1+BQ-123). Inhibition von ETBR durch BQ-788 hingegen ließ wiederum eine Proliferation erkennen (Cp+ET-1+BQ-788). Alleiniges Zuführen von Endothelin-1 (ET-1) oder Medium galten als Negativkontrolle.

Diese Tendenz zeichnete sich gegenüber allen Kontrollen ab. Es ist bekannt, daß die alleinige Infektion durch *Chlamydia pneumoniae* ein Zellwachstum induzieren kann^{28,147}, wie es auch in diesem Experiment zu erkennen ist. Dennoch überstieg die Konstellation aus vorab erfolgter Infektion und anschließender Inkubation mit ET-1 diesen Effekt eindeutig.

Die deutliche Stimulation ist demnach maßgeblich in einem Zusammenwirken aus vermehrter Expression von ETAR einerseits und zugeführtem Endothelin-1 andererseits begründet. Bei Inhibition des Endothelin-A-Rezeptors durch BQ-123 kam es zu einer klaren Abnahme der proliferativen Eigenschaften. Die Antagonisierung des Endothelin-B-Rezeptors durch BQ-788 ließ eine ungleich höhere Wachstumsrate erkennen, da über diesen Rezeptorsubtyp keine mitogenen Prozesse reguliert werden. Die nicht vollständig ausgeprägte Proliferation bei Koinkubation mit dem ETBR-Inhibitor ließ sich durch toxische Eigenschaften von BQ-788 erklären.

Um die Bedeutung des wachstumsregulierenden Endothelin-A-Rezeptors noch zu untermauern, wurde im Umkehrschluß die Auswirkungen einer spezifischen RNA-Interferenz an ETAR hinsichtlich des Proliferationsverhaltens in einem dynamischeren Modell untersucht. Unter Berücksichtigung der in Abbildungen 14 und 16 aufgezeigten Effekte, resultierte eine Blockierung von ETAR mittels spezifischer siRNA in einer verminderten Endothelzellproliferation. Dies wurde durch die verminderte zelluläre Aufnahme von Thymidin deutlich, das aufgrund seiner radioaktiven Markierung gemessen werden konnte (Abb. 17).

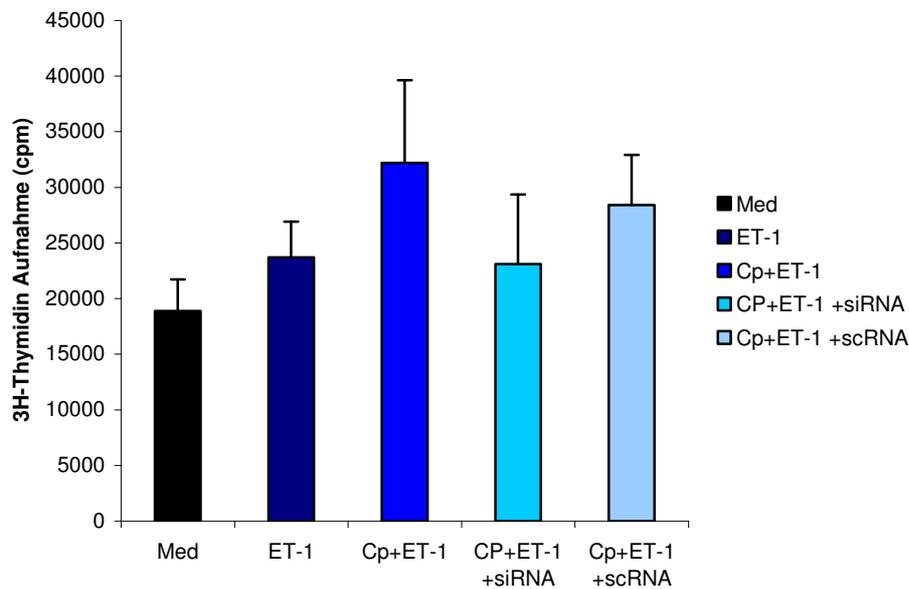


Abb. 17

Verminderte Endothelzellproliferation bei RNA-Interferenz am ETA-Rezeptor. Mit *Chlamydia pneumoniae* infizierte HCAEC, welche ein verstärktes Endothelin-A-Rezeptorprofil ausgebildet haben, bildeten bei gleichzeitiger Zufuhr von rekombinantem ET-1 eine verminderte Proliferation aus, wenn sie zuvor mit spezifisch gegen ETAR gerichteter siRNA behandelt wurden (48h post infectionem), n=3 Versuche. Dies wurde durch die reduzierte zelluläre Aufnahme an radioaktiv markiertem Thymidin deutlich (Cp + ET-1 + siRNA). RNA mit geringem Anteil an Guanin und Cytosin (scrambled RNA, scRNA) galt als Negativkontrolle und hatte keine inhibitorischen Eigenschaften auf ETAR (Cp+ET-1+scRNA), weswegen eine ähnlich starke [³H]Thymidin-Aufnahme erfolgte, wie in der Kontrolle (Cp+ET-1)

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vitro* Stimulation des Endothelin-1 (ET-1) Systems in vaskulären Zellen durch eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* beschrieben. Unter dem Einfluß des Bakteriums wandelten sich vaskuläre glatte Muskelzellen (CASMC) zu einer bedeutenden Quelle von Endothelin-1. Dieses besitzt eine mitogene Potenz über seinen Endothelin-A-Rezeptor (ETAR) und ist über die Rekrutierung von inflammatorischen Faktoren an zentralen Prozessen der Atherogenese beteiligt. Vormalig ruhende vaskuläre Endothelzellen (HCAEC) entwickelten durch eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* einen proliferativen Phänotyp, indem sie vermehrt ETAR auf ihrer Oberfläche präsentieren. Die so stimulierten HCAEC erwiesen sich als sehr sensibel für exogen zugeführtes Endothelin-1 und reagierten daraufhin mit einer Proliferation, welche die bekannten mitogenen Eigenschaften einer alleinigen *Chlamydia pneumoniae* Infektion deutlich überstieg. Mittels RNA-Interferenz am Endothelin-A-Rezeptor (siRNA) konnte das ETAR-abhängige Zellwachstum bewiesen werden. Dieser hier *in vitro* skizzierte Vorgang könnte beachtliche Auswirkungen auf infizierte Gefäßzellen *in vivo* bedeuten, stellt doch eine solche Zellproliferation eine massive Störung der endothelialen Integrität dar. Fehlfunktionen des Endothels, auch als endotheliale Dysfunktion bezeichnet, stellen neben Inflammation und Zellproliferation die drei wesentlichen Merkmale atherogenen Geschehens dar. *Chlamydia pneumoniae* infizierte vaskuläre Endothelzellen und glatte Muskelzellen sind über ein stimuliertes Endothelin-1-System demnach an allen drei Prozessen beteiligt.

4.1 Proliferative Eigenschaften von Endothelin-1 im Gefäßbett

Die im wesentlichen über den Endothelin-A-Rezeptor regulierten mitogenen Effekte von Endothelin-1 sind bereits seit längerem bekannt, allerdings wurden sie bisher hauptsächlich an glatten Muskelzellen beschrieben. Peíro et al. stellten schon in den 90er Jahren fest, daß exogen zugeführtes ET-1 glatte Gefäßmyozyten zum Wachstum anregt¹⁴⁹. Doch wurde bereits in dieser Studie deutlich, daß es sich beim Synergismus vaskulärer Endothelzellen und glatter Gefäßmyozyten um ein komplexes, und bis heute nicht ausreichend verstandenes System handelt. So regten in der beschriebenen Studie Mediumüberstände aus Endothelzellkulturen die glatten Muskelzellen noch zum Wachstum an. Die Kokultivierung beider Zellarten in einem gemeinsamen Model jedoch hatte einen proliferationshemmenden Einfluß auf die benachbarten Myozyten. Auf der anderen Seite konnte in früheren Studien gezeigt werden, daß ET-1 in Endothelzellen vermindert gebil-

det wurde, wenn diese Medium aus Myozytenkulturen ausgesetzt waren¹⁸¹. Doch auch der genau umgekehrte Fall scheint möglich, wie eine Studie von Matsuura et al. zeigt¹²². Unter physiologischen Umständen ist das Endothel demnach mitverantwortlich an einer gewissen Balance hinsichtlich wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Einflüssen vaskulärer Zellen. Geringe Alterationen innerhalb dieses komplexen Systems, wie z.B. Endothelschädigungen und übermäßiges Zellwachstum, können dieses Gleichgewicht leicht zerstören und somit zu endothelialer Dysfunktion führen. Folge einer solchen Fehlfunktion des Endothels kann die Entstehung früharteriosklerotischer Läsionen fördern (s.a. Kapitel 4.3) und trägt zu entzündlichem Geschehen innerhalb der Gefäßwand bei. Traditionell werden glatte Muskelzellen als ET-1 Empfänger verstanden. Unter bestimmten Umständen jedoch ist es möglich, daß diese auch selbst Endothelin-1 produzieren²⁰². Ein Phänomen, das auch in dieser Arbeit anschaulich demonstriert werden und erstmals auf das infektiöse Agens *Chlamydia pneumoniae* zurückgeführt werden konnte. Bislang stellte sich dieser Effekt nämlich hauptsächlich in Gegenwart entzündlich wirkender Zytokine wie TNF- α und IFN- γ dar, die ihrerseits an arteriosklerotischen Vorgängen beteiligt sind. Hierbei scheint auch der Transkriptionsfaktor NF-kappa B eine Rolle zu spielen²⁰¹.

Die genauen Mechanismen, die den mitogenen Effekt von Endothelin-1 regulieren, sind bisher nur unzureichend geklärt. Es wird angenommen, daß das Protein auf verschiedene Arten wachstumsfördernd auf die Zielzellen wirkt. Zum einen vermittelt seine G-Protein gekoppelten Rezeptoren, zumeist ETAR, einen proliferativen Effekt²⁰⁴. Zum anderen wirkt ET-1 direkt mitogen, etwa durch Stimulation der p44/42 MAP-Kinase oder des wichtigen Zellzyklusproteins Cyclin D1, welches Zellen vermehrt in ihre Synthesephase überführt²⁰⁸. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, daß ET-1 anscheinend andere, zunächst neutrale Stoffe rekrutieren kann, die anschließend eine mitogene Potenz entwickeln. So konnten Wedgwood et al. zeigen, daß ET-1 über eine Vermehrung sogenannter reaktiver oxidativer Spezies (ROS), wie z.B. Peroxidationen, proliferativ auf pulmonale glatte Muskelzellen wirkt¹⁹⁶. Außerdem ist ein Synergismus zwischen ET-1 und Wachstumsfaktoren wie PDGF bekannt, wobei sich beide Proteine hinsichtlich ihrer Wirkung sogar potenzieren^{66,186,204}.

Wie schon erwähnt, ist die mitogene Wirkung von Endothelin-1 hauptsächlich an glatten Muskelzellen demonstriert. Vereinzelt können Studien jedoch darlegen, daß sich auch vaskuläre Endothelzellen als äußerst proliferationsfreudig präsentieren, sofern sie durch ET-1 stimuliert werden. So zeigten Salani et al. *in vivo* und *in vitro*, daß Endothelin-1 nicht nur das Wachstum, sondern auch die Migration von venösen Endothelzellen stimuliert und somit an angiogenetischen Prozessen beteiligt ist. An diesen Vorgängen waren auch das proteolytische Enzym MMP-2 und der Wachstumsfaktor VEGF beteiligt^{33,122,127,161}.

Jedoch veranschaulicht auch dieses Beispiel, daß zahlreiche Mechanismen innerhalb des Endothelinsystems noch nicht ausreichend verstanden sind und ein starres Denkmuster in diesem Fall nicht angebracht scheint. So wird etwa die in nur wenigen Publikationen beobachtete Endothelzellproliferation durch ET-1 entgegen den Erwartungen jeweils über den Endothelin-B-Rezeptor reguliert ⁹⁸. Klassischerweise stellt jedoch der Endothelin-A-Rezeptor den proliferationsfördernden Rezeptortyp dar, was auch in der vorliegenden Arbeit klar demonstriert werden konnte.

Kritische Stimmen stellen darüber hinaus den proliferativen Effekt von ET-1 in seiner Gesamtheit in Frage. So weisen Panettiere et al. darauf hin, daß Endothelin-1 allein noch keine mitogenen Effekte auf tracheale glatte Muskelzellen besitzt. Erst in Kombination mit dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF würde sich ein ETAR-reguliertes Wachstum einstellen ¹⁴³. Auf der andern Seite zeigt eine Gruppe um Alberts et al., daß zwar endogenes, jedoch nicht exogen zugeführtes ET-1 zur Proliferation führt. Als Erklärung wird in dieser Untersuchung an murinen glatten Muskelzellen auf den raschen extrazellulären Zerfall des Proteins durch Proteasen aus glatten Muskelzellen geschlossen ². Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können diese Hypothesen jedoch nicht stützen.

4.2 Proliferation vaskulärer Zellen durch *Chlamydia pneumoniae*

Die in dieser Arbeit dargelegte Entwicklung eines proliferativen Phänotyps vaskulärer Zellen nach Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* kann mit Veränderungen im Endothelin-1 System beschrieben werden. Das Wachstum vaskulärer Zellen stellt ein klassisches Merkmal arteriosklerotischer Vorgänge dar. Der genaue Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* und der Atherogenese ist allerdings noch nicht abschließend geklärt. Definitiv läßt sich jedoch festhalten, daß das Bakterium infizierte vaskuläre Endothelzellen und glatte Muskelzellen zum Wachstum anregen kann und demnach eine eigene mitogene Potenz besitzt.

Der wachstumsfördernde Einfluß von *Chlamydia pneumoniae* konnte bereits mehrfach in Studien demonstriert werden. Es zeigte sich hierbei, daß das Bakterium die Fähigkeit besitzt, seine mitogenen Eigenschaften auf mannigfaltige Art und Weise auszuüben. Dabei werden unterschiedlichste Prozesse der Signaltransduktion beeinflusst und zahlreiche Mediatoren stimuliert. So konnten Rupp et al. belegen, daß *Chlamydia pneumoniae* den Wachstumsfaktor Egr-1 (Early Growth Response Gene 1) in Abhängigkeit der p44/42-MAP-Kinase aktiviert. Dies führte zur Proliferation koronararterieller glatter Muskelzellen (CASMC) *in vitro* und *in vivo* ¹⁵⁶. Des weiteren scheint *Chlamydia pneumoniae* über die Stimulierung des wirtszelleigenen HSP60 (Heat Shock Protein 60) ebenfalls wachstums-

fördernd auf vaskuläre glatte Muskelzellen zu wirken ⁷⁹. Aber auch chlamydiales HSP60 kann unter bestimmten Voraussetzungen im p42/44 abhängigen Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen resultieren ¹⁶². Ebenso ist der Transkriptionsfaktor NF-κB (Nuclear Factor Kappa B), der bekanntermaßen eine bedeutende Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt ²³, durch *Chlamydia pneumoniae* induzierbar und an proliferativen Vorgängen von Epithelzellen sowie Gefäßmyozyten beteiligt ^{51,124}. Eine andere Forschergruppe wiederum konnte mitogene Prozesse in chlamydieninfizierten Myozyten aufzeigen. Die Vorgänge wurden in diesem Fall über die direkte Hemmung des antiproliferativen Zellzyklusprotein p53 reguliert ¹⁶⁹.

Dennoch darf man annehmen, daß all diesen wachstumsfördernden Ereignissen eine komplexe dynamische Zell-Zell-Kommunikation zugrunde liegt, wie eine Untersuchung von Coombes et al. an vaskulären Endothelzellen und bronchialen glatten Muskelzellen demonstriert. Hierbei führte die Infektion von HUVEC (Human Umbilical Venous Endothelial Cells) durch sowohl potente, als auch inaktivierte *Chlamydia pneumoniae* Organismen zur Ausbildung eines nicht näher bekannten löslichen Faktors. Überstände aus infizierten HUVEC-Kulturen regten anschließend die Myozyten zur Proliferation an. Als mögliche mitogene Faktoren in dieser Studie wurden PDGF, FGF, MCP-1 und auch das Chemokin IP-10 angenommen ²⁹. Ihnen allen werden wesentliche chemoattraktive und mitogene Eigenschaften im Rahmen der Atherogenese zugeschrieben. Dieselbe Gruppe um Coombes et al. konnte auch im Kaninchenmodell Verdickungen der Aortenintima darstellen, wurden die Tiere mit *Chlamydia pneumoniae* infiziert. Hier bestand ebenfalls ein Zusammenhang mit dem Wachstumsfaktor PDGF, der durch das Bakterium in Endothelzellen aktiviert wurde ³⁰.

Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Untersuchung, daß die Infektion glatter Muskelzellen augenscheinlich zur Freisetzung von Mediatoren, insbesondere PGE₂, führt, die einer Proliferation entgegenwirken ¹⁵³. Es wurde daher angenommen, daß chlamydieninfizierte Gefäßmyozyten partiell das Wachstum ihrer Nachbarzellen inhibieren. Ähnliche Resultate erbrachte eine Studie an glatten Muskelzellen der menschlichen Aorta. Hier resultierte eine Infektion durch *Chlamydia pneumoniae* in der sogenannten Aponekrose, einem Zelltod, der sowohl apoptotische, als auch nekrotische Signalkaskaden in sich vereinte. Als Folge dieser destruirenden Vorgänge kann es zur Destabilisierung arteriosklerotischer Plaques kommen ³⁸.

4.3 Fehlfunktion des Endothels und dessen Folgen

Die Infektion vaskulärer Endothelzellen durch *Chlamydia pneumoniae* kann, wie auch in der vorliegenden Arbeit beschrieben zu Zellproliferation, darüber hinaus aber auch zu Zellmigration, sowie Dysfunktion innerhalb der Zellschicht führen.

Das Endothel stellt in seiner Gesamtheit eines der größten Organe des menschlichen Körpers dar und spielt eine wichtige Rolle hinsichtlich physiologischer und pathophysiologischer Regulationen in der Gefäßwand. Lokalisiert als einreihige Zellschicht zwischen dem steten Blutfluß im Blutgefäß und der Schicht der glatten Muskelzellen ist es in zweierlei Hinsicht tätig. Einerseits wirkt das Endothel als Sensor bezüglich verschiedenster gefäßaktiver und immunologischer Mediatoren, sowie mechanischer Stimuli, wie Blutdruck oder Scherkräfte. Auf der anderen Seite setzt es zahlreiche Mediatoren selbst frei und reguliert damit aktiv die mechanische Funktion der Blutgefäße, beteiligt sich an der Hämostase und vermittelt entzündliche Prozesse⁹³. Als die wichtigsten vasodilatatorischen Mediatoren werden Stickstoffmonoxid (NO), und Prostacycline betrachtet. Endothelin-1, Angiotensin II, Thromboxan A₂ und Reaktive Sauerstoffradikale (ROS) stellen die bedeutsamsten Vasokonstriktoren dar. Durch die Leukozyten-Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, den Transkriptionsfaktor NF-κB, aber auch NO werden im Endothel inflammatorische Prozesse gesteuert. Des weiteren ist die Zellschicht an mitogenen Prozessen, der Angiogenese und der Regulation der Gefäßpermeabilität beteiligt.

Bereits geringe Beschädigungen des Endothels beeinträchtigen seine physiologischen Funktionen enorm. So führen Stenosen oder arteriosklerotische Läsionen zu einem allgemeinen NO-Defizit im Organismus, da Stickstoffmonoxid nur aus einem intakten Endothelzellverband freigesetzt werden kann. Die Beeinträchtigung der Vasodilatation insbesondere der kleinen Widerstandsgefäße erhält hypertensive Zustände aufrecht, ein Zustand, der mehrfach in Studien dargelegt werden konnte^{144,145}. Auch koronare Herzkrankheiten (KHK) oder Arteriosklerose gehen mit einer reduzierten endothelialen Funktion einher¹²⁶. Teilweise ist dies sogar bei noch gesunden Kindern mit bereits bestehenden Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie beschrieben²¹.

Die Endotheliale Dysfunktion, also eine Fehlfunktion endothelialer Eigenschaften im weiteren Sinne, stellt ein sehr frühes Stadium in der Pathogenese der Arteriosklerose dar⁸¹. Sie ist bereits zu Zeitpunkten vorhanden, an denen noch keinerlei kardiovaskuläre Ereignisse aufgetreten sind¹⁸⁵, und spielt deshalb eine zentrale Rolle im komplexen Verständnis verwandter Krankheiten wie chronischem Hypertonus oder der koronaren Herzkrankheit (KHK). Daher zählt die endotheliale Dysfunktion zu den Risikofaktoren für später eintretende kardiovaskuläre Ereignisse^{69,163}.

Aus intaktem Endothel freigesetztes Stickstoffmonoxid fungiert in der Gefäßwand nicht nur als der wichtigste Vasodilatator. Es verhindert darüber hinaus in großem Maße ungezähmte Zellproliferation, hat antiinflammatorische Eigenschaften und reduziert übermäßiges Anhaften von Thrombozyten an die Gefäßwand. Auch stellt NO einen Antagonisten zu inflammatorisch und mitogen wirkendem Endothelin-1 und Angiotensin II dar ¹⁴⁷. Früh stellte man fest, daß eine Schädigung des Endothels und die damit verbundene Mindersekretion von NO zu schwerwiegenden und komplexen krankhaften Prozessen innerhalb des Gefäßbettes führen. So kommt es bei fehlendem Stickstoffmonoxid zu einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen, die teilweise durch die irritierte NO-Synthetase selbst induziert werden. Darüber hinaus vermag vermehrt anfallendes Endothelin-1, über einen ETAR-abhängigen Stoffwechselweg, die Bildung von Sauerstoffradikalen in Gefäßmyozyten und Endothelzellen zu verstärken ^{39,110,168}. Dieser oxidative Streß und der verminderte NO-Spiegel innerhalb der Gefäßwand führen durch Aktivierung von ICAM-1 und VCAM-1 zur vermehrten Leukozytenadhäsion und durch MCP-1 zur Chemotaxis von Makrophagen ^{97,210}. Dies sind zentrale Prozesse in der Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen. Es entsteht ein Teufelskreis innerhalb der Gefäßwand, da geschädigtes Endothel nur noch unzureichend Sauerstoffradikale und inflammatorische Mediatoren und Schlüsselenzyme wie ET-1 antagonisieren kann, was wiederum zu einer Störung des Endothels führt ^{25,72,147}. Ein bereits geschädigtes Gefäßareal unterhält somit eine eigene Destruktion.

Ein vermindertes NO-Angebot in der Gefäßwand und das Vorherrschen von ROS-Formationen fördert darüber hinaus die Aktivität von Proteasen, die in einem späteren Stadium zur Destabilisierung arteriosklerotischer, fibrinöser Läsionen beitragen ¹⁹³.

Die Dysfunktion des Endothels mit starker Mindersekretion von NO und den nachfolgenden Ereignissen ist demzufolge nicht nur an der Initiierung, sondern auch an der Aufrechterhaltung und Progression arteriosklerotischer Plaquebildung beteiligt. Sie stellt somit einen wichtigen Triggereffekt hinsichtlich kardiovaskulärer Ereignisse dar und manifestiert sich immer mehr zu einem bedeutsamen Marker späterer kardiovaskulärer Ereignisse ^{41,93}.

Therapeutisch kommen verschiedene Aspekte in Betracht. Da die endotheliale Dysfunktion jedoch ein recht frühes Ereignis hinsichtlich der Pathogenese arteriosklerotischer Läsionen anzeigt, ist eine Diagnostik, und demzufolge eine zeitnahe Therapie nicht einfach zu realisieren. Es gibt Hinweise darauf, daß das Eingreifen in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) mittels ACE-Hemmern oder Angiotensin-1-Rezeptorantagonisten oxidative Exzesse eindämmen und inflammatorische Prozesse, sowie kardiovaskuläre Umbauprozesse (Remodeling) teilweise regulieren kann ¹⁶⁵. Es handelt sich in diesem Zusammenhang um komplexe endokrinologische Vorgänge. Interessanterweise konnten diesbezüglich auch Antidiabetika wie die Insulin-Sensitizer Pioglitazon oder Ro-

siglitazon und auch lipidsenkende Fibrate antiinflammatorische und antioxidative Eigenschaften aufweisen⁴⁰. Ebenso erhofft man sich von Hemmern der Cyclooxygenase wie ASS positive Effekte sowohl hinsichtlich der Eindämmung oxidativer Ereignisse, als auch der Reduzierung inflammatorischer Prozesse innerhalb der Gefäßwand²⁰³. Da außerdem mehrere Studien zeigen konnten, daß Hypercholesterinämie eine Fehlfunktion des Endothels fördert oder gar zu ihrer Entstehung beiträgt^{86,137}, stellen HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine), die auch in der Rezidivprophylaxe des Myokardinfarkts eingesetzt werden, eine weitere Therapieoption dar³⁶. Es wird hierbei angenommen, daß die positive Beeinflussung hinsichtlich kardiovaskulärer Ereignisse nicht nur in der lipidsenkenden Eigenschaft der Statine zu suchen ist.

Das stimulierte Endothelin-1-System, das zu einer vermehrten Bildung von endothelschädigenden Sauerstoffradikalen beiträgt und teilweise durch ROS-Formationen selbst ange-regt wird, kommt ebenfalls für therapeutische Ansätze in Frage¹⁰⁸. Untersuchungen im Tiermodell an hypertensiven Ratten konnten bereits die Verringerung des oxidativen Stresses durch den selektiven ETAR-Antagonismus mittels ABT 627 demonstrieren¹¹⁰. In einer Studie an Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurde außerdem deutlich, daß die Blockade des Endothelin-A-Rezeptors durch den selektiven Antagonisten BQ-123 eine signifikante Verbesserung der Vasodilatation bedeutet. Dieser Effekt war umso ausgeprägter, je größer sich die Beeinträchtigung der endothelialen Funktion darstellte⁶⁸. Darüber hinaus konnten Yao et al. zeigen, daß eine ET-1 abhängige Hypertension mit einer Erhöhung der AT II- und ROS-Spiegel einhergeht. Der Angiotensin II-Rezeptorantagonist Olmesartan konnte hier sowohl die ET-1 vermittelte Hypertension, als auch die Bildung von Sauerstoffradikalen verhindern²⁰⁷.

4.4 Therapeutische Aspekte bei aktiviertem Endothelin-1 System

Endothelin-1 spielt eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System und stellt das derzeit potenteste vasokonstriktorische Agens dar. Außerdem besitzt es mitogene Eigenschaften, ist an der Thrombogenese beteiligt und wirkt als Stimulus und chemoattraktives Protein für zahlreiche inflammatorische Faktoren. Darüber hinaus ist ET-1 in der Pathogenese einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankung involviert und trägt zur Aufrechterhaltung und Progression krankhafter Zustände maßgeblich bei. Erhöhte Gewebe- und Plasmaspiegel von ET-1 kommen in arteriosklerotischen Läsionen vor^{107,125,209} und können bei Patienten, die an Myokardinfarkt^{179,210}, arteriellem oder pulmonalem Hypertonus⁵², sowie Herzinsuffizienz¹²³ erkrankt sind, nachgewiesen werden. Bei all diesen Krankheitsbildern scheint der erhöhte ET-1 Spiegel mit der Schwere der hämodynamischen Beeinträchtigung ein-

herzuzugehen ¹⁷². Patienten mit multiplen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus oder Hypercholesterinämie sind aufgrund der engen Verknüpfung des ET-1 Systems mit anderen endokrinen Stoffwechselwegen besonders gefährdet. Aus diesem Grund stellt das Endothelin-1 System bezüglich der pharmakologischen Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen einen wichtigen neuen, aber bislang nur unzureichend untersuchten Ansatzpunkt dar.

Als therapeutische Option bei stimuliertem Endothelin-1-System stehen momentan selektive Antagonisten für sowohl den Endothelin-A-, als auch für den Endothelin-B-Rezeptor, kombinierte ETA-/ETB-Rezeptorantagonisten, sowie Inhibitoren des Endothelin-Conversions-Enzyms (ECE-1) zur Verfügung. Ein reiner Antagonismus am Endothelin-B-Rezeptor ist bei kardiovaskulären Erkrankungen aufgrund seines Wirkungsprofils nicht sinnvoll und über die Wirkung von ECE-1-Antagonisten ist bislang erst wenig bekannt. Durch das Vorhandensein von zahlreichen ECE-1-unabhängigen Endothelin-1 Synthesewegen wird der Effekt einer ECE-1 Blockade möglicherweise limitiert ¹¹⁴. Als potentielle Angriffspunkte im Endothelin-1-System verbleiben somit die selektive Blockade von ETAR und ein kombinierter ETAR-/ETBR-Antagonismus.

Da ETAR in arteriosklerotischen Läsionen verstärkt exprimiert wird und wesentliche mitogene und inflammatorische Prozesse über diesen reguliert werden, erscheint eine Blockade dieses Rezeptorsubtyps zunächst sinnvoll. In einem Tiermodell an hypercholesterinämischen Hamstern wurde deutlich, daß eine selektive Blockade des Endothelin-A-Rezeptors mit LU 135252 die Makrophageninfiltration in präarteriosklerotischen Läsionen, sogenannten „fatty streaks“, reduziert ⁹⁶. Eine weitere tierexperimentelle Studie wurde von Barton et al. an Apolipoprotein E-defizienten Mäusen durchgeführt. Bei diesen war ET-1 nachweislich an der Atherogenese beteiligt. Es zeigte sich, daß die Langzeitblockade von ETAR das Ausmaß der arteriosklerotischen Läsionen sogar im Nachhinein noch reduzieren konnte. Außerdem vermochte der selektive ETAR-Antagonismus die Wiederherstellung der NO-vermittelten Gefäßrelaxation durch das Endothel. Der stark vasokonstriktorischen Potenz von ETAR konnte somit begegnet und die endotheliale Dysfunktion reduziert werden ⁹.

In arteriosklerotischen Läsionen zeigt sich jedoch auch häufig der Endothelin-B-Rezeptor als verstärkt repräsentiert und kann hier sogar vasokonstriktorische Eigenschaften besitzen. Eine kombinierte ETAR-/ETBR-Blockade könnte demnach bei Patienten mit Arteriosklerose bezüglich der Vasodilatation einen größeren therapeutischen Effekt erzielen, als eine selektive ETAR-Blockade. Die ersten Studien im Hinblick auf eine Verbesserung der Hämodynamik bei nicht-selektiver Blockade der Endothelin-Rezeptoren waren vielversprechend ¹³. Der kombinierte ETA-/ETB-Rezeptorantagonist Bosentan konnte an Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz das kardiale Output erhöhen und den systemischen und

pulmonalen Gefäßwiderstand senken^{92,184}. Auch zwei Wochen nach Therapiebeginn mit Bosentan wurde ein steter Anstieg der kardialen Pumpfunktion festgestellt. Wenzel et al. konnten aufzeigen, daß Bosentan bei Patienten mit stabiler KHK den koronaren Blutfluß und dadurch die myokardiale Sauerstoffversorgung durch Erweiterung der Koronarien verbessert¹⁹⁸. Eine andere Studie wurde an Patienten mit systemischer chronischer Herzinsuffizienz (NYHA III) durchgeführt. Sie erhielten bereits eine Dreifachtherapie, bestehend aus einem Diuretikum, Digoxin und einem ACE-Hemmer. Bei zusätzlicher Gabe des kombinierten ETAR-/ETBR-Antagonisten zeigte sich eine deutliche Besserung der pulmonalen und systemischen Hämodynamik¹⁸⁴. Darüber hinaus reduzierte Bosentan die Proliferation glatter pulmonaler Muskelzellen bei Hypertension im kleinen Kreislauf⁹⁹.

Im Jahr 2005 konnten Böhm et al. in einer wichtigen Studie zeigen, daß der duale ETAR-/ETBR Antagonismus die endothelvermittelte Vasodilatation in Patienten mit Arteriosklerose signifikant verbessert und somit einer selektiven ETAR-Blockade deutlich überlegen ist¹². Als Erklärung dieses Effektes werden hier die bereits erwähnte Erhöhung der ETB-Rezeptordichte in arteriosklerotischen Läsionen und die darüber vermittelte Vasokonstriktion bemüht. Der Effekt einer kombinierten ETAR-/ETBR-Blockade ist zudem deutlich ausgeprägter, als eine additive Blockade zunächst des Endothelin-A- und darauffolgend des Endothelin-B-Rezeptors. Der genaue Hintergrund hierbei ist jedoch noch nicht geklärt. Eine Möglichkeit ist, daß bei gleichzeitiger Blockade beider Rezeptoren Endothelin-1 auch beide Rezeptoren geblockt vorfindet und somit seine Wirkung nicht am jeweils anderen Rezeptor vermehrt ausüben kann. Eine andere Möglichkeit stellen bisher noch unbekannte Kommunikationen zwischen beiden Rezeptorsubtypen des ET-1-Systems dar.

Allerdings darf nicht außer acht gelassen werden, daß der Endothelin-B-Rezeptor mit ca. 70% an der pulmonalen Clearance des zirkulierenden Endothelin-1 beteiligt ist^{49,142,174}. Ein kombinierter Endothelinrezeptor-Antagonismus kann daher zur Erhöhung der ET-1 Plasmakonzentration führen^{92,190}. Auch die anteilig über ETBR regulierte Vasodilatation des Endothels wird somit verringert und eine Erhöhung des Gefäßtonus vorangetrieben¹⁹⁴. Beides Vorgänge, die es im Kontext arteriosklerotischer Erkrankungen unbedingt zu vermeiden gilt. In zahlreichen experimentellen und klinischen Studien zeigte sich allerdings, daß die kombinierte Blockade beider Rezeptoren sowohl die kardiovaskuläre Funktion, als auch deren Struktur deutlich verbessert. Die negativen Effekte einer gleichzeitigen Antagonisierung des Endothelin-B-Rezeptors scheinen in diesem Zusammenhang demnach in den Hintergrund zu treten^{134,198}.

Mehrere kleine Studien, die den therapeutischen Nutzen eines Endothelin-Antagonismus im Kontext arteriosklerotischer Erkrankungen untersuchten, waren zunächst also vielversprechend. Sie konnten einen Trend hinsichtlich krankheitsverbessernder Resultate auf-

zeigen. Daraufhin folgte eine Vielzahl an aufwendigen Untersuchungen, deren Focus auf wichtige arteriosklerotische Folgeerkrankungen wie chronische Herzinsuffizienz oder pulmonaler Hypertonus gerichtet war. Doch blieb der erwartete Erfolg aus. Groß angelegte Studien wie ENCOR (*Enrasentan Clinical Outcomes Randomized*), ENABLE I/ II (*Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering Cardiac Events*), EARTH (*Endothelin Antagonist Receptor Trial in Heart Failure*) oder RITZ (*Randomized Intravenous Tezosentan*) konnten hinsichtlich chronischer Herzinsuffizienz, Remodeling und Hämodynamik keinen bedeutenden Nutzen eines Endothelin-Antagonismus für den Patienten herausarbeiten^{172,130}. Durch REACH-1 (*Research on Endothelin Antagonism in Chronic Heart Failure*) wurde sogar deutlich, daß Patienten unter Bosentantherapie eine Verschlechterung ihrer Herzinsuffizienz erfuhren¹³⁵. Problematisch waren hierbei besonders die hohe Dosierung des Endothelin-Antagonisten und das Zusammentreffen multipler kardiovaskulärer Risikofaktoren des Patienten.

Dennoch dürfen aus den Ergebnissen dieser Erhebungen keine voreiligen Schlüsse gezogen werden. Zum einen beschränkten sich die Untersuchungen weitestgehend auf die selektive ETAR-Blockade. Zum anderen wurden wesentliche Aspekte kardiovaskulärer Erkrankungen nur unzureichend oder gar nicht untersucht. So fand beispielsweise der Effekt eines ET-1-Antagonismus bezüglich arteriellem Hypertonus oder koronarer Herzkrankheit keine Erwähnung. Ebenso fehlen bislang klinische Untersuchungen, die Endothelin-1 als zentralen Regulator (frühen) arteriosklerotischen Geschehens betrachten. Gleichermäßen stehen Studien bezüglich endothelialer Dysfunktion, einem Prädiktor für arteriosklerotische Genese, aus, obwohl bekannt ist, daß ein aktiviertes ET-1-System, oxidativer Streß im Gefäßbett und Endothelzellschäden eng miteinander korrelieren.

Von besonderer Bedeutung ist jedoch auch, daß das Endothelin-1-System mit wichtigen endokrinologischen Stoffwechselprozessen direkt verbunden ist. Beispielsweise konnten *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bereits mehrfach demonstrieren, daß eine enge Verknüpfung zwischen dem Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem (RAAS) und dem Endothelin-1-System besteht, wobei die genauen Zusammenhänge noch weitergehender Untersuchungen bedürfen⁶⁰. Angiotensin II (AT II) besitzt eine starke vasokonstriktorische Potenz und fördert zudem die Synthese von Wachstumsfaktoren und extrazellulärer Matrixproteine sowie Fibroblasten und Myozyten. Darüber hinaus kann es die Transkription von Endothelin-1 und seinen Vorstufen aktivieren¹⁸². In diesem Zusammenhang konnten Sung et al. in einem Tiermodell an Ratten darlegen, daß eine dauerhafte Stimulation durch AT II zu einer gesteigerten ET-1 Produktion in vaskulären glatten Muskelzellen führt. Im umgekehrten Fall konnten Yao et al. zeigen, daß eine stete Infusion von Endothelin-1 im Tiermodell eine deutliche Erhöhung der Plasmarenin-Aktivität und einen signifikanten AT II-Anstieg zur Folge hat. Der neue Angiotensin II-Rezeptorantagonist Olme-

sartan vermochte es daraufhin, den hypertensiven Zustand, ausgelöst durch die permanente ET-1-Zufuhr, abzuwenden ²⁰⁷. Dieser Zusammenhang ist ein weiteres Indiz dafür, daß eine gegenseitige Abhängigkeit des RAAS und des ET-1 Systems besteht.

Es ist bekannt, daß ACE-Hemmer, welche die Bildung von Angiotensin II inhibieren, die gestörte endotheliale Funktion bei Patienten mit KHK positiv beeinflussen ¹²⁰. Böhm et al. konnten nun aufzeigen, daß eine zusätzliche Gabe von ETAR-/ETBR-Antagonisten bei Personen, die bereits mit einem ACE-Hemmer behandelt werden, zu einer Verbesserung der endothelialen Funktion und einer dauerhafter Vasodilatation führt ¹². Auch ist davon auszugehen, daß eine Kombination aus Endothelin-Antagonismus und konventioneller Therapie durch Angriff im RAAS die kardiale Hämodynamik verbessert ¹¹⁴.

Das Endothelinsystem ist komplex und bislang noch nicht ausreichend untersucht, so daß es einer weiteren Anzahl an Studien bedarf, um es als neuen Angriffspunkt einer Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen zu etablieren. Dennoch wird immer deutlicher, daß Endothelin-1 nicht nur ein lokal wirkendes Protein ist, sondern systemisch agiert und mit einer Vielzahl pathogenetischer Vorgänge im kardiovaskulären System verknüpft ist. Auch mehrten sich die Hinweise darauf, daß ET-1 in engem Zusammenhang mit komplexen Stoffwechselprozessen steht und direkt durch Statine oder ACE-Hemmer beeinflussbar ist ^{37,75,191}.

Durch seine Fähigkeit, zentrale inflammatorische und proatherogene Prozesse mitzuregulieren und durch die enge Verbindung von aktiviertem Endothelin-1 und endothelialer Dysfunktion als frühem Marker atherogenen Geschehens, ist darüber hinaus zu erwägen, ob ET-1 in den frühen Phasen arteriosklerotischer Veränderungen stärkere Bedeutung besitzt, als in den häufig untersuchten Folgeerkrankungen.

Der Schwerpunkt weiterer Studien sollte daher sein, die Rolle des Endothelin-1-Systems in frühen atherogenen Prozessen stärker zu berücksichtigen. Des weiteren sollte ein Endothelinrezeptor-Antagonismus in Kombination mit bereits etablierten Therapiestrategien im kardiovaskulären und besonders auch im endokrinologischen System untersucht werden.

4.5 Relevanz von *Chlamydia pneumoniae* in der Atherogenese

Arteriosklerose ist eine der meistverbreiteten Erkrankungen der westlichen Welt mit Folgen wie Gefäßverschuß, koronarer Herzkrankheit (KHK), Myokardinfarkt oder zerebralem Insult. Sie stellt in Deutschland die wichtigste Todesursache dar.

Das Verständnis der Entstehung dieser Gefäßerkrankung hat sich in den letzten fünfzehn Jahren stark verändert. Zu Anfang hatte man noch ein eher starres Bild vor Augen, das den klassischen Pathomechanismus der Atherogenese in der Ansammlung fettbeladener Gewebsmakrophagen und adhärrierender Thrombozyten in der Gefäßwand sah. Doch heutzutage betrachtet man die Atherogenese als ein Zusammenwirken zahlreicher dynamischer Vorgänge. Als die drei wesentlichen Pathomechanismen der Atherogenese können die Dysfunktion des Endothels, die Proliferation vaskulärer Zellen und Entzündungsreaktionen in der Gefäßwand betrachtet werden. Mehr und mehr wird deutlich, daß es sich bei den inflammatorischen Vorgängen zu einem großen Teil um Prozesse handelt, die sowohl im frühen Stadium einer arteriosklerotischen Läsion, aber auch in der Progression dieser Schädigung und schließlich in der thrombotischen Komplikation der Erkrankung vorherrschen ^{10,111,112,154}.

Als die maßgeblichen Zeichen der Entzündungsreaktionen gelten das Auftreten von Leukozyten bereits in frühesten Läsionen, sowie die Freisetzung von Mediatoren wie ICAM-1 und VCAM-1, sowie MCP-1. Sie führen zur Chemotaxis von Entzündungszellen und tragen somit zur Unterhaltung des Entzündungsprozesses bei. T-Lymphozyten wiederum vermögen IFN- γ und TNF- α zu stimulieren, die ihrerseits Makrophagen und vaskuläre Zellen anlocken. Die aktivierten Leukozyten und Gefäßzellen setzen Mediatoren der Gerinnungskaskade und Wachstumsfaktoren frei, die zur Proliferation von Gefäßzellen und der extrazellulären Matrixproteine führen. Das Wachstum der arteriosklerotischen Läsion, das die Hauptkonsequenz der chronischen Entzündungsreize darstellt, hat begonnen.

Ein wichtiger Trigger der Atherogenese ist LDL (Low Density Lipoprotein), wobei in den letzten Jahren eine komplexe Verknüpfung zwischen lokalem Lipidstoffwechsel und Gefäßwandinflammation aufgezeigt werden konnte. LDL fördert seinerseits die Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen in Makrophagen und vaskulären Zellen. Chronischer Hypertonus ist neben dem gestörten Lipidstoffwechsel der nächste wichtige Risikofaktor, der zur Entstehung der Arteriosklerose dispositioniert. Daneben können vasokonstriktische Proteine zu einer weiteren Schädigung der Gefäßwand beitragen. Wie bereits erwähnt, ist insbesondere Endothelin-1 dazu fähig, eine Vielzahl chemotaktischer und inflammatorischer Proteine zu aktivieren und somit entzündliche Vorgänge aufrechtzuerhalten.

Die Vorstellung, daß eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* zur Ausbildung von arteriosklerotischen Gefäßkrankheiten führt, ist nicht neu. Allerdings stellte sich in den vergangenen 15-20 Jahren heraus, daß der genaue Zusammenhang zwischen dem Bakterium und der Arteriosklerose schwer zu klären ist. In mehr als 40 Studien konnte zwar die Präsenz von *Chlamydia pneumoniae* in arteriosklerotischen Läsionen durch Immunhistochemie, Elektronenmikroskopie oder DNA-Amplifizierung mittels PCR-Methoden nachgewiesen werden. Doch bleibt bislang ungeklärt, an welcher Stelle und zu welchem Zeitpunkt der Erreger an der Atherogenese beteiligt ist.

Chlamydia pneumoniae besitzt die Möglichkeit, in seinen vaskulären Zielzellen inflammatorische Vorgänge hervorzurufen, die sowohl an der Initiierung, als auch an der Aufrechterhaltung arteriosklerotischer Prozesse beteiligt sind. Es wird angenommen, daß der zunächst primär respiratorische Erreger über Monozyten^{57,117,157} und T-Lymphozyten (CD3⁺)⁸⁷ über die Blutbahn in die Peripherie disseminiert. Dort besteht anscheinend ein Tropismus für Gefäßzellen⁵⁰, wobei es *Chlamydia pneumoniae* grundsätzlich möglich ist, alle an der Atherogenese beteiligten Zellen problemlos zu infizieren und sich darin auch zu vermehren. Der Mechanismus und die genauen Hintergründe der bevorzugten Ansammlung des Bakteriums in vaskulären Zellen sind bislang nicht bekannt.

Kurz nach der Internalisierung des Erregers beginnen infizierte Zellen der Gefäßwand beinahe ausnahmslos mit der Produktion inflammatorischer Zytokine. Vaskuläre Endothelzellen erhöhen die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1¹⁸³ und Chemokinen wie IL-8, IL-6 und PAI-1^{35,48}. Diese führen zur Migration von weiteren Entzündungszellen, moderieren entzündliche Vorgänge, bzw. fördern die intravasale Koagulation. Des weiteren tragen infizierte Endothelzellen zur Transmigration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten durch die Gefäßwand bei, die ihrerseits inflammatorische Geschehen fördern. Wie bereits erwähnt, verursachen infizierte Endothelzellen die Proliferation von Gefäßmyozyten^{29,124,183}. Doch werden glatte Gefäßmuskelzellen durch *Chlamydia pneumoniae* auch direkt zum Wachstum angeregt, wie Rupp et al. demonstrierten¹⁵⁶. Ein Befall glatter Muskelzellen führt außerdem zur Stimulation von inflammatorischen und atherogenen Zytokinen wie IL-6 und FGF-2²⁹.

Der Aufnahme des Bakteriums in Monozyten folgt ebenfalls die Produktion einer Vielzahl an Zytokinen und Chemokinen wie TNF- α , IL-1 β , MCP-1 und den Interleukinen IL-6 und IL-12. Sie alle spielen in der Pathogenese der Arteriosklerose eine maßgebliche Rolle^{124,136}. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, daß infizierte Monozyten vermehrt Lipoproteine aufnehmen und oxidieren. Die Folge ist eine Transformation der Monozyten in fettbeladene Schaumzellen^{88,89}. Dieses schon lange bekannte, klassische Kennzeichen einer frühen arteriosklerotischen Läsion wird durch *Chlamydia pneumoniae* also zusätzlich gefördert. Infizierte Makrophagen produzieren ferner Metalloproteinasen, die zur Degradierung und Ruptur von arteriosklerotischen Plaques führen können^{17,94}. Darüber hin-

aus gibt es Hinweise darauf, daß *Chlamydia pneumoniae* T-Zell (CD4+)-vermittelte Immunreaktionen innerhalb arteriosklerotischer Läsionen triggert und auf diese Weise durch Zytokinproduktion ebenso zu ihrer Destabilisierung beiträgt^{14,129}.

Wie bereits angedeutet, ist die genaue Rolle von *Chlamydia pneumoniae* im Kontext der Atherogenese noch nicht vollständig geklärt und bleibt bislang umstritten. Tierversuche an Mäusen und Kaninchen bieten jedoch die Möglichkeit, den Einfluß der Infektion auf das Gefäßbett genauer zu untersuchen.

Campbell et al. untersuchten die Auswirkungen einer *Chlamydia pneumoniae* Infektion an Mäusen, die aufgrund eines Defizits an Apolipoprotein E (apoE^{-/-}) oder eines Defizits an LDL-Rezeptoren (LDL^{-/-}) eine Hypercholesterinämie aufwiesen, ein bedeutender Risikofaktor für Arteriosklerose. Nach zweimaliger intranasaler Infektion zeigte sich, daß bei jenen Kontrolltieren, die keine Hypercholesterinämie entwickelten, die Gefäßwand zwar infiziert wurde, und auch entzündliche Prozesse in der Aorta hervorgerufen werden konnten. Doch entwickelten sich hierbei keine typischen arteriosklerotischen Veränderungen. Tiere jedoch, die eine Hypercholesterinämie ausgebildet hatten, wiesen signifikant vergrößerte arteriosklerotische Läsionen auf¹⁵. Diese Untersuchungen legen den Schluß nahe, daß *Chlamydia pneumoniae* maßgeblich vorgeschädigte Gefäßareale befällt und dabei den Prozeß der Arteriosklerose vorantreibt und beschleunigt. Doch darf nicht außer acht gelassen werden, daß auch in zuvor gesunden Gefäßen eine Entzündungsreaktion hervorgerufen wird.

In ähnlicher Weise wurden von verschiedenen Gruppen auch Studien am Kaninchenmodell durchgeführt. Nach intranasaler Infektion waren auch hier früharteriosklerotische Gefäßveränderungen festzustellen^{47,132}.

Obwohl die Experimente an Mäuse- und Kaninchenmodellen darauf hindeuten, daß eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* in engem Zusammenhang mit der Ausbildung, bzw. Progression arteriosklerotischer Läsionen steht, kann dies derzeit noch nicht abschließend bewiesen werden. Die pathogenetischen Vorgänge im Kontext der Atherogenese gewinnen in den letzten Jahren zwar mehr und mehr an Kontur. Es sind jedoch weitere, klar definierte Studien *in vitro* und *in vivo* nötig, um diese ungewöhnliche Beziehung zwischen dem Bakterium einerseits und der Volkskrankheit andererseits näher zu beleuchten.

4.6 Antibiotika in der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen

Die Möglichkeit, daß ein Bakterium für eine chronisch-entzündliche, degenerative Erkrankung verantwortlich sein soll, klingt zunächst verblüffend. Doch zeigte schon die Entdeckung von *Helicobacter pylori*, der maßgebliche ätiologische Faktor in der Entstehung peptischer Magengeschwüre, daß mikrobiologische Erreger an der Pathogenese von Erkrankungen beteiligt sind, die gemeinhin als nicht-infektiös galten.

Neue Einsichten in die Pathogenese der Arteriosklerose, verbunden mit der wachsenden Bedeutung des Bakteriums *Chlamydia pneumoniae* als ein relevantes ätiologisches Agens lassen nun in eine ähnliche Richtung denken. In der jüngeren Vergangenheit wurden daher zahlreiche Studien unterschiedlichen Umfangs durchgeführt, die die Auswirkungen einer antibiotischen (Sekundär-) Prävention bei kardiovaskulären Erkrankungen betrachten.

Wie bereits in Kapitel 1.5.2 erwähnt, gelten Makrolide, Tetracykline und Fluorochinolone als Antibiotika, die gegen *Chlamydia pneumoniae* eingesetzt werden können. Das Makrolid Azithromycin ist die im Zusammenhang mit der koronaren Herzkrankheit am besten untersuchte Substanz, nicht zuletzt aufgrund der schnellen Resorption in arteriosklerotische Plaques¹⁶⁷. Azithromycin wird, oral verabreicht, rasch resorbiert und besitzt eine Gewebshalbwertszeit von ca. 72 h. Es ist gut verträglich und besitzt nur in seltenen Fällen gastrointestinale Nebenwirkungen. Roxithromycin, ein weiteres Makrolid, sowie Chinolone kommen aufgrund ihrer größeren zytotoxischen Effekte weniger in Frage.

Eine frühe Studie von Gupta et al. aus dem Jahr 1997 befaßte sich mit der Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse an Patienten, die bereits einen akuten Myokardinfarkt (AMI) erlitten hatten. Alle Patienten wiesen erhöhte Antikörpertiter bezüglich *Chlamydia pneumoniae* auf und erhielten daraufhin für drei Tage Azithromycin (500 mg/dies). Die anti-*Chlamydia pneumoniae*-Titer fielen nach sechs Monaten auf weniger als 16 ab, so daß hier von keiner akuten Infektion mehr ausgegangen werden konnte. Darüber hinaus kam es bei diesen Patienten zu einer Reduktion weiterer kardiovaskulärer Folgeereignisse⁶⁴.

Zur Untersuchung des Akuten Koronarsyndroms wurde 1997 die ROXIS-Studie (*Roxithromycin in Ischemic Syndromes*) durchgeführt. Hier wurden Patienten mit instabiler Angina pectoris oder non-Q-wave Myokardinfarkt für 30 Tage mit Roxithromycin (150 mg/2x pro dies) behandelt. Am Ende der Untersuchung stellte sich heraus, daß die Empfänger des Antibiotikums eine Verringerung des Auftretens wiederkehrender Ischämien, Akuten Myokardinfarkts oder plötzlichen Herztods aufwiesen. Auch nach sechs Monaten war dieser Effekt noch vorhanden, jedoch waren die Unterschiede hierbei nicht signifikant, was auf Fehler im Studiendesign zurückgeführt werden kann⁶⁵.

Im Jahr 2000 folgte die ACADEMIC-Studie (*Azithromycin in Coronary Artery Disease: Elimination of Myocardial Infection with Chlamydia*) mit einer Fallzahl von 302 Personen. In dieser Erhebung wurden Entzündungsmarker und kardiovaskuläre Ereignisse an Patienten untersucht, die für drei Monate Azithromycin (500 mg/dies für 3 Tage dann wöchentlich) erhielten. Sechs Monate nach Studienbeginn waren die zuvor definierten Entzündungsparameter (CRP, TNF- α , IL-1 und IL-6) reduziert, teils signifikant (CRP, IL-6). Allerdings waren die Antikörpertiter im Vergleich zur Placebogruppe nur unwesentlich verändert. Die klinischen Ereignisse wurden während der folgenden zwei Jahre erfaßt. Hierbei stellte sich heraus, daß spätere kardiovaskuläre Ereignisse nicht signifikant verhindert werden konnten. Es zeigte sich lediglich ein Trend in Richtung einer Reduzierung sekundär auftretender koronarer Herzkrankheiten bei den behandelten Patienten ^{4,5,133}.

In der Folgezeit wurden weitere Untersuchungen, wie die ISAR-3-Studie (*Third Intracoronary-Stenting and Antibiotic Regimen*) oder die CLARIFY-Studie (*Clarithromycin in Acute Coronary Syndrome Patients in Finland*) durchgeführt. Auch sie befaßten sich mit der antibiotischen Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse. Allerdings waren die Resultate durchweg enttäuschend. Oft zeichnete sich zwar eine Tendenz hinsichtlich einer Verringerung arteriosklerotisch bedingter Erkrankungen und ihrer Folgen ab. Doch waren die Unterschiede zwischen den Patienten, die ein Antibiotikum erhalten hatten, und den Patienten aus den Kontrollgruppen in keiner der Untersuchungen signifikant ^{5,6}.

Die Ergebnisse der oben erwähnten ACADEMIC-Studie, verbunden mit den Erfahrungen aus nachfolgenden Untersuchungen waren daher wenig zufriedenstellend. Es war ersichtlich, daß ein gewisser Zusammenhang besteht zwischen der gegen *Chlamydia pneumoniae* gerichteten antibiotischen Behandlung einerseits und der Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse auf der anderen Seite. Doch lieferten diese Studien lediglich eine Tendenz und lieferten keinen substantiellen Fortschritt. Schnell wurde daher deutlich, daß größer angelegte Studien mit hohen Fallzahlen und einem länger gewähltem Follow-up gewählt werden mußten, um weiterreichende Erkenntnisse zu erlangen:

Die WIZARD-Studie (*Weekly Intervention with Zithromax for Atherosclerosis and its Related Disorders*) aus dem Jahr 2003 untersuchte 7724 Patienten, die in ihrer Vergangenheit einen akuten Myokardinfarkt erlitten hatten und serologisch eine *Chlamydia pneumoniae* Infektion aufwiesen. Die Verumgruppe erhielt wöchentlich Azithromycin (600 mg) für insgesamt drei Monate. Diese Studie sah ein Follow-up von drei Jahren vor. Doch auch hier konnte letztendlich nicht sicher gezeigt, daß eine antibiotische Behandlung das Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses verhindert. Die Studie vermochte es jedoch, eine Reduzierung des Auftretens eines Myokardinfarkts zu verzeichnen. Dies warf die Frage auf,

ob eine längere antimikrobielle Therapie einen stärkeren klinischen Effekt hervorrufen würde²⁸.

Ebenso konnte die neue PROVE IT-TIMI-Studie (*Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy – Thrombolysis in Myocardial Infarction*), die im Jahr 2005 startete und ein 4162 Personen umfassendes Patientenkollektiv untersuchte, nur unbefriedigende Ergebnisse feststellen. Patienten, die zuvor ein akutes Koronarsyndrom entwickelt hatten, erhielten hier eine Kombination aus einem lipidsenkenden HMG-CoA-Reduktasehemmer (Pravastatin oder Atorvastatin), sowie intermittierende Kurse mit einem Fluorochinolon. In diesem Fall wurde Gatifloxacin (400 mg/dies für 2 Wochen, danach für jeweils 10 Tage während 2 Jahren) gewählt.

Anders als bei den zuvor durchgeführten Erhebungen wurde bei dieser Studie eine große Anzahl an Hochrisikopatienten ausgewählt und die Behandlung über einen bedeutend längeren Zeitraum durchgeführt. Dennoch konnte auch hier keine Reduktion der primären Endpunkte (Tod, Akuter Myokardinfarkt, Instabile Angina pectoris, oder zerebrale Ischämie) dargelegt werden. Des Weiteren wurde weder eine signifikante Reduktion des unspezifischen Entzündungsmarkers CRP, noch eine Reduktion chlamydialer Antikörpertiter festgestellt. Auch die Anwesenheit von *Chlamydia pneumoniae* innerhalb peripherer Blutmonozyten wurde durch eine Antibiotikabehandlung nicht beeinflusst¹⁹. Es muß allerdings angemerkt werden, daß es sich hierbei um ein durchaus bekanntes Phänomen handelt (s.u.).

Ähnlich große Studien wie ACES aus dem Jahr 2005 oder AZACS aus dem Jahr 2003 lieferten ebenfalls nur negative Resultate. Die AZACS-Studie (*Azithromycin in Acute Coronary Syndromes Study*) mit einer Fallzahl von 1439 Patienten konnte keinen Nutzen der Antibiotikatherapie hinsichtlich des Akuten Koronarsyndroms darlegen. Allerdings stand hier eine nur fünftägige Behandlungsdauer im Vordergrund, was in Reflexion auf die eben erwähnten Studien sicherlich zu kurz sein dürfte.

Bei der ACES-Studie (*Azithromycin and Coronary Events Study*) bestand das Kollektiv aus 4012 Patienten mit stabiler KHK. Die Patienten erhielten wöchentlich Azithromycin für insgesamt ein Jahr mit einem Follow-up von vier Jahren. Diese Studie beinhaltet somit die längste antibiotische Behandlungsdauer und den größten Zeitraum der Nachuntersuchungen aller bislang durchgeführten Erhebungen. Allerdings spielte die *Chlamydia pneumoniae* Serologie hierbei keine Rolle, was die Untersuchung als wenig gewinnbringend erscheinen läßt. Auch diese Untersuchung lieferte bisher noch keine signifikanten Vorteile einer antibiotischen Therapie bezüglich des Auftretens kardiovaskulärer Ereignisse, obgleich die Daten erst im Jahr 2009 abschließend beurteilt werden können⁶¹.

Zusammenfassend läßt sich verdeutlichen, daß einzig die 1997 durchgeführte ROXIS-Studie und die Untersuchungen von Gupta et al. aus dem Jahr 1997 bislang einen positi-

ven Effekt antimikrobieller Substanzen hinsichtlich der Verbesserung *Chlamydia pneumoniae* assoziierter kardiovaskulärer Erkrankungen darlegen konnten. Alle anderen Untersuchungen, die zum Teil große Patientenpopulationen einschlossen und diverse Antibiotika (Makrolide, Chinolone) in verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlicher Verabreichungsdauer berücksichtigten, konnten einen wirklichen Nutzen einer antimikrobiellen Therapie nicht aufzeigen ⁶.

Inadäquates Studiendesign oder geringe Patientenzahlen können nur teilweise als Erklärung für die fast durchweg negativen Ergebnisse herangezogen werden. Denn große Erhebungen wie PROVE IT-TIMI, WIZARD und ACES haben die meisten Probleme der Vorstudien erkannt und wurde mit großen Kollektiven durchgeführt.

Viel wichtiger dürfte die Bedeutung des intrazellulären Persistenzstatus sein, den *Chlamydia pneumoniae* einzunehmen vermag. Gieffers et al. konnten nachweisen, daß das Bakterium sobald es sich in Monozyten befindet, nicht durch Makrolidantibiotika oder Rifampicin inhibiert werden kann, und eine Anzucht nach Entfernen des Antibiotikums wieder möglich ist ⁵⁵. Das Bakterium kann nach Reaktivierung möglicherweise chronisch-entzündliche Prozesse im Gefäßbett unterhalten, obwohl zuvor eine antimikrobielle Behandlung erfolgte.

Hinzu kommt, daß es sich in den erwähnten Studien zumeist um Patienten mittleren Alters mit bereits fortgeschrittener koronarer Herzkrankheit, bzw. Arteriosklerose handelte. Nur bei den wenigsten Testpersonen war ein erhöhter chlamydialer Antikörpertiter nachweisbar. Auch wurde der Erreger nur bei einem kleinen Teil der Patienten in peripheren Monozyten gefunden. Dies läßt den Schluß zu, daß es sich in den meisten Fällen um keine akute Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* gehandelt hat.

Das Vorhandensein des Bakteriums in zahlreichen arteriosklerotischen Plaques aber, sowie sein Nachweis mittels serologischer Marker und die Zirkulation von *Chlamydia pneumoniae* in Monozyten lassen sich nicht von der Hand weisen. Es muß daher in Erwägung gezogen werden, daß *Chlamydia pneumoniae* eher an der Initiation arteriosklerotischer Läsionen beteiligt ist, oder die Progression früher Plaques fördert, jedoch in der Unterhaltung später Läsionen keine große Rolle mehr spielt. Der Zeitpunkt also, an dem die Patienten bereits eine fortgeschrittene Arteriosklerose oder eine der Folgeerkrankungen entwickelt haben, und das Bakterium unter Umständen in einen Persistenzstatus verfallen ist, ist im Zusammenhang einer antimikrobiellen Sekundärprophylaxe möglicherweise nicht mehr relevant.

Diese Konstellation weist gewisse Ähnlichkeit zu anderen mikrobiell bedingten Erkrankungen auf und würde somit kein Novum darstellen. So ist das Epstein-Barr-Virus (EBV) aller Wahrscheinlichkeit nach der Hauptauslöser des sogenannten Burkitt-Lymphoms. Dieses kann jedoch nicht mehr mit antiviralen Medikamenten behandelt werden, sondern

muß, da es sich um ein fortgeschrittenes Tumorleiden handelt, einer onkologischen Chemotherapie zugeführt werden.

Nach heutiger Erkenntnis sind Standardantibiotika nicht für die Sekundärprävention *Chlamydia pneumoniae*-assoziierter kardiovaskulärer Erkrankungen geeignet. Dies stellt jedoch keinen Schlußstrich unter das Thema antimikrobielle (Sekundär-) Prophylaxe arteriosklerotischer Erkrankungen dar. Besonders hinsichtlich des bekannten intrazellulären Persistenzstatus, den das Bakterium einzunehmen vermag und dem es dadurch eine gewisse Resistenzneigung verdankt, könnten in näherer Zukunft besser wirksame Antibiotika entwickelt werden.

Die Anzahl der Untersuchungen, die den Zusammenhang einer Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* und der Pathogenese arteriosklerotischer Erkrankungen erkennen lassen, steigt. Es sollte sich demnach keine Resignation vor der Fragestellung einstellen, sondern vielmehr dazu animieren, Forschungsstrategien zu überdenken und die Hypothese nicht fallenzulassen, sondern im Gegenteil, neu zu überdenken. Vorklinische Modelle müssen erweitert und neu konzipiert werden, was besonders die Selektion des Patientenkollektivs betrifft. Der Fokus sollte auf Personen gerichtet werden, die sich in einem frühen oder frühesten Stadium einer arteriosklerotischen Erkrankung befinden.

5. Zusammenfassung

Das gramnegative, obligat intrazelluläre Bakterium *Chlamydia pneumoniae* ruft beim Menschen respiratorische Erkrankungen hervor. Bereits seit längerem läßt sich aber auch ein Zusammenhang zwischen dem Bakterium und der Arteriosklerose nicht mehr von der Hand weisen. Allerdings ist bislang unklar, an welcher Stelle und zu welchem Zeitpunkt der Erreger an der Atherogenese beteiligt ist. Auch ist nur wenig darüber bekannt, inwiefern *Chlamydia pneumoniae* proatherogene und proinflammatorische Mediatoren im Gefäßbett modifizieren kann. Das stark vasokonstriktive Protein Endothelin-1 (ET-1) ist durch seine mitogene Potenz und die Fähigkeit, zahlreiche Entzündungsfaktoren zu rekrutieren, an bedeutenden Schlüsselprozessen der Atherogenese beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher *in vitro* die Auswirkung einer *Chlamydia pneumoniae* Infektion auf Endothelin-1 (ET-1) und seine Rezeptoren in vaskulären Zellen untersucht.

Koronararterielle glatte Muskelzellen (CASMC) reagierten bereits 4h nach Infektion mit einer starken, p38-MAP-Kinase abhängigen Expression der ET-1 mRNA und 24h post infectionem mit der Freisetzung von ET-1 auf der Proteinebene. Ein auffälliges Phänomen, da klassischerweise Endothelzellen als maßgeblicher Syntheseort von ET-1 gelten. In diesen jedoch kam es infektionsbedingt nur zu einer gering bedeutenden ET-1 Expression. Bezogen auf die Endothelin-Rezeptoren hatte *Chlamydia pneumoniae* in CASMC kaum Auswirkungen. Dahingegen reagierten koronararterielle Endothelzellen (HCAEC) 24-48h nach Infektion mit einer deutlich verstärkten Expression des Endothelin-A-Rezeptors (ETAR), über den nachweislich mitogene Prozesse reguliert werden. Die post-infektiöse Ausbildung eines ETAR dominanten Phänotyps der HCAEC prädestinierte für eine proliferative Potenz der befallenen Zellen. Nach Zufügen von exogenem Endothelin-1 kam es zu einem klaren, ETAR-abhängigen Wachstum der Endothelzellen. Dieses überstieg deutlich die bekannten mitogenen Eigenschaften einer alleinigen *Chlamydia pneumoniae* Infektion. Mittels RNA-Interferenz (siRNA gegen ETAR) konnte die Proliferation deutlich reduziert werden.

Anhand dieser Arbeit konnte erstmals ein möglicher Schleifenmechanismus skizziert werden, der zum besseren Verständnis der Rolle von *Chlamydia pneumoniae* in der Atherogenese beiträgt: Unter dem Einfluß des Bakteriums wandelten sich vaskuläre glatte Muskelzellen zur bedeutenden Quelle mitogenen und proinflammatorischen Endothelin-1. Vormals ruhende Endothelzellen entwickeln einen proliferativen Phänotyp und reagieren auf im Überschuss vorhandenes ET-1 mit Zellwachstum. *In vivo* könnte dies eine massive Störung der endothelialen Integrität darstellen. Endotheliale Dysfunktion, eines der drei wesentlichen Merkmale arteriosklerotischer Veränderungen könnte demnach durch *Chlamydia pneumoniae* induziert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Ak G, Buyukberber S, Sevince A, Turk HM, Ates M, Sari R, Savli H, Cigli A. The relation between plasma endothelin-1 levels and metabolic control, risk factors, treatment modalities, and diabetic microangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2001; 15: 150-157
2. Alberts GF, Peifley KA, Johns A, Kleha JF, Winkles JA. Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem* 1994; 269: 10112-118
3. Aldous MB, Grayston JT, Wang SP, Foy HM. Seroepidemiology of Chlamydia pneumoniae TWAR infection in Seattle families 1966-1979, *J Infect Dis* 1992; 166:646-649
4. Anderson JL, Muhlestein JB, Carlquist J, Allen A, Trehan S, Nielson C. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease and serological evidence for Chlamydia pneumoniae infection: The ACAD-EMIC study. *Circulation* 1999; 99: 1540-1547
5. Anderson JL, Muhlestein JB. Antibiotic trials for coronary artery disease. *Tex Heart Inst J* 2004; 31: 33-38
6. Anderson JL. Infection, Antibiotics, and Atherothrombosis – End of the road or new beginnings?. *N Engl J Med* 2005; 352: 1706-1709
7. Bacon CR, Cary NRB, Davenport AP. Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery and aorta. *Circ Res* 1996; 79: 794-801
8. Barbour AG, Amano KI, Hackstadt T, Perry L, Caldwell HD. Chlamydia trachomatis has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. *J Bacteriol* 151: 420-428, 1982
9. Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14367-14372
10. Belland RJ, Ouellette SP, Gieffers J, Byrne GI. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Cell Microbiol* 2004; 6: 117-127
11. Berger R, Pacher R. The role of the endothelin system in myocardial infarction – new therapeutics targets. *Eur Heart J* 2003; 24: 294-296
12. Böhm F, Beltran E, Pernow J. Endothelin receptor blockade improves endothelial function in atherosclerotic patients on angiotensin converting enzyme inhibition. *J Int Med* 2005; 257: 263-271
13. Böhm F, Ahlborg G, Johansson BL, Hansson LO, Pernow J. Combined endothelin receptor blockade evokes enhanced vasodilatation in patients with atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 674-679
14. de Boer OJ, van der Wal AC, Houtkamp MA, Ossewaarde JM, Teeling P, Becker AE. Unstable atherosclerotic plaques contain T-cells that respond to Chlamydia pneumoniae. *Cardiovasc Res* 2000; 48: 402-408
15. Campbell LA, Blessing E, Rosenfeld M, Lin T, Kuo CC. Mouse models of C.pneumoniae infection and atherosclerosis. *J Infect Dis* 2000; 181: 508-513
16. Campbell LA, Melgosa MP, Hamilton DJ, Kuo CC, Grayston JT. Detection of Chlamydia pneumoniae by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 434-439
17. Campbell LA, Kuo CC. Chlamydia pneumoniae – an infectious risk factor for atherosclerosis. *Nature Reviews* 2004; 2: 23-32

18. Campbell LA, O'Brien ER, Cappucio AL, Kuo CC, Wang SP, Stewart D, Patton DL, Cummings PK, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in human coronary atherectomy tissues. *J Infect Dis* 1995; 172: 585-588
19. Cannon CP, Braunwald E, McCabe C, Grayston JT, Muhlestein JB, Giugliano RP, Cairns R, Skene AM. Antibiotic treatment of *Chlamydia pneumoniae* after acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352: 1646-1654
20. Cattaruzza M, Dimigen C, Ehrenreich H, Hecker M. Stretch-induced endothelin B receptor-mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells. *The FASEB Journal* 2000; 14: 991-998
21. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelthaler DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340: 1111-1115
22. Cesari M, Pavan E, Sacchetto A, Rossi GP. Endothelin-1: A scientist's curiosity, or a real player in ischemic heart disease?. *Am Heart J* 1996; 132: 1236-43
23. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor- kappa B in cell growth regulation. *Am J Path* 2001; 159: 387-397
24. Chen P, Shibata M, Zidovetzki R, Fisher M, Zlokovic BV, Hofman FM. Endothelin-1 and MCP-1 modulation in ischemia and human brain derived endothelial cell cultures. *J Neuroimmunol.* 2001; 116(1): 062-073
25. Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxid dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* 2001; 38: 606-611
26. Chi EY, Kuo CC, Grayston JT. Unique Ultrastructure in the Elementary Body of *Chlamydia* sp. Strain TWAR. *J Bacteriol*, Aug 1987: 3757-63
27. Chien SM, Pichotta P, Chan CK. Treatment of community-acquired pneumonia. A multicenter, double-blind, randomized study comparing clarithromycin with erythromycin. *Chest* 1993; 103: 697-701
28. O'Connor CM, Dunne MW, Pfeffer MA, Muhlestein JB, Yao L, Gupta S. Azithromycin for the secondary prevention of coronary heart disease events: the WIZARD study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290: 1459-1466
29. Coombes BK, Mahony JB. *Chlamydia pneumoniae* infection of human endothelial cells induces proliferation of smooth muscle cells via endothelial cell-derived soluble factor(s). *Inf Imm* 1999; 67: 2909-2915
30. Coombes BK, Chiu B, Fong IW, Mahony JB. *Chlamydia pneumoniae* infection of endothelial cells induces transcriptional activation of platelet-derived growth factor-B: A potential link to intimal thickening in a rabbit model of atherosclerosis. *J Inf Med* 2002; 185: 1621-30
31. 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: 407-413
32. Critchley IA, Jones ME, Heinze PD, Hubbard D, Engler HD, Evangelista AT, Thornsberry C, Karlowsky JA, Sahn DF. In vitro activity of levofloxacin against contemporary clinical isolates of *Legionella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* from North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 214-221
33. Dashwood MR, Timm M, Muddle JR, Ong AC, Tippins JR, Parker R, McManus D, Murday AJ, Madden BP, Kaski JC. Regional variations in endothelin-1 and its receptor subtypes in human coronary artery vasculature: pathophysiological implications in coronary disease. *Endothelium* 1998; 6: 61-70 (Abstract)
34. Davenport AP, O'Reilly G, Kuc RE. Endothelin ETA and ETB mRNA and receptors expressed by smooth muscle in the human vasculature: majority of the ETA subtype. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 1110-1116
35. Dechend R, Maass M, Gieffers J, Dietz R, Schneidereit C, Lentz A, Gulba DC. *Chlamydia pneumoniae* infection of vascular smooth muscle and endothelial cells

- activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI-1 expression: a potential link to accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1999; 100: 1369-1373
36. Dogra GK, Watts GF, Herrmann S, Thomas MA, Irish AB. Statin therapy improves brachial artery endothelial dysfunction in nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2002; 62: 550-557
 37. Donckier JE, Massart PE, Hodeige D, van Mechelen H, Clozel JP, Laloux O, Ketelslegers JM, Charlier AA, Heyndrickx GR. Additional hypotensive effect of endothelin-1 receptor antagonism in hypertensive dogs under angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation* 1997; 19: 1250-1256
 38. Dumrese C, Maurus CF, Gygi D, Schneider MKJ, Walch M, Groscurth P, Ziegler U. Chlamydia pneumoniae induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *BMC Microbiology* 2005; 5: 1-15
 39. Duerrs Schmidt N, Wippich N, Goetsch W, Broemme HJ, Morawietz H. Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2000; 269: 713-717
 40. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1983-1992
 41. Erzen B, Sabovic M, Sebestjen M, Poredos P. Endothelial dysfunction, intima-media thickness, ankle-brachial pressure index, and pulse pressure in young post-myocardial infarction patients with various expressions of classical risk factors. *Heart Vessels* 2007; 22: 215-222
 42. Everett KDE, 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 species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 415-440
 43. Fan J, Unoki H, Iwasa S, Watanabe T. Role of endothelin-1 in atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 2000; 902: 84-94
 44. Fenelon LE, Mumtaz G, Ridgway GL. The in vitro susceptibility of Chlamydia pneumoniae. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26: 763-767
 45. Fischer SF, Vier J, Kirschnek S, Klos A, Hess S, Ying S, Häcker G. Chlamydia inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3-only proteins. *J Exp Med* 2004; 200 (7): 905-916
 46. Forsey T, Darougar S, Treharne JD. Prevalence in human beings of antibodies to Chlamydia IOL-207, an atypical strain of Chlamydia.
 47. Fong IW, Chiu B, Viira E, Fong MW, Jang D, Mahoney JB. Rabbit model for Chlamydia pneumoniae infection. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 48-52
 48. Fryer RH, Schobe EP, Woods ML, Rodgers GM. Chlamydia species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. *J Invest Med* 1997; 45: 168-174
 49. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Comm* 1994; 199: 1461-1465
 50. Gaydos CA. Growth in vascular cells and cytokine production by Chlamydia pneumoniae. *J Infect Dis* 2000; 181: 473-478
 51. Gencay MMC, Tamm M, Glanville A, Perruchoud AP, Roth M. Chlamydia pneumoniae activates epithelial cell proliferation via NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Infect Imm* 2003; 71: 5814-5822
 52. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328: 1732-1739
 53. Gieffers J, Rupp J, Gebert A, Solbach W, Klinger M. First-choice antibiotics at subinhibitory concentrations induce persistence of Chlamydia pneumoniae. *Antimicrob Agents and Chemotherapy* 2004; 48 (4): 1402-05

54. Gieffers J, Solbach W, Maass M. In vitro susceptibility and eradication of *Chlamydia pneumoniae* cardiovascular strains from coronary artery endothelium and smooth muscle cells. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001; 15(3): 259-262
55. Gieffers J, Füllgraf H, Jahn J, Klinger M, Dalhoff K, Katus HA, Solbach W, Maass M. *Chlamydia pneumoniae* infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation* 2001; 103: 351-356
56. Gieffers J, Solbach W, Maass M. In vitro susceptibility of *Chlamydia pneumoniae* strains recovered from atherosclerotic coronary arteries. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 27:62-64
57. Gieffers J, van Zandbergen G, Rupp J, Sayk F, Krüger S, Ehlers S, Solbach W, Maass M. Phagocytes transmit *Chlamydia pneumoniae* from the lungs to the vasculature. *Eur Respir J* 2004; 23: 506-510
58. Goto K, Kasuya Y, Matsuki N, Takuwa Y, Kurihara H, Ishikawa T, Kimura S, Yanagisawa M, Masaki T. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive voltage dependent Ca^{2+} channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 3915-18
59. Grantham JA, Schirger JA, Williamson EE, Heublein DM, Wennberger PW, Kirchengast M, Muentner K, Subkowski T, Burnett JC. Enhanced endothelin-converting-enzyme immunoreactivity in early atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 22-26
60. Gray MO, Long CS, Kalinyak JE. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF- β 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1998; 40: 352-363
61. Grayston JT, Kronmal RA, Jackson LA, Parisi AF, Muhlestein JB, Cohen JD, et al. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events. *N Engl J Med* 2005; 352: 1637-1645
62. Grayston JT. Current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *J Infect Dis* 2000; 181: 402-410
63. Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infection. *N Engl J Med* 1986; 315: 161-168
64. Gupta S, Camm AJ. Chronic infection in the etiology of atherosclerosis – the case for *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Cardiol* 1997; 20: 829-836
65. Gurfinkel E, Bozovich G, Beck E, Testa E, Livellara B, Mautner B. Treatment with the antibiotic roxithromycin in patients with acute non-Q-wave coronary syndromes. The final report of the ROXIS study. *Eur Heart J* 1999; 20: 121-127
66. Hafizi S, Allen SP, Goodwin AT, Chester AH, Yacoub MH. Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via ETA receptor and is mitogenic with growth factors. *Atherosclerosis* 1999; 146: 351-359 (Abstract)
67. Hai E, Ikura Y, Naruko T, Ueda M. Alterations of endothelin-converting-enzyme expression in early and advanced stages of human coronary atherosclerosis. *Int J Mol Med* 2004; 13: 649-654
68. Halcox JP, Nour KRA, Zalos G, Quyyumi AA. Coronary vasodilatation and improvement in endothelial dysfunction with endothelin ETA receptor blockade. *Circ Res* 2001; 89: 969-976
69. Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; 106: 653-658
70. Hashigucci K, Ogawa H, Suzuki T, Kazuyama Y. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the maxillary sinus of a patient with purulent sinusitis. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 570-571
71. Hayasaki Y, Nakajima M, Kitano Y, Iwasaki T, Shimamura T, Iwaki K. ICAM-1 expression on cardiac myocytes and aortic endothelial cells via their specific endothelin receptor subtype. *Biochem Biophys Res Comm* 1996; 229: 817-824

72. Heitzer T, Schlitzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 2673-2678
73. Helset E, Sildnes T, Konopski ZS. Endothelin-1 stimulates monocytes in vitro to release chemotactic activity identified as interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1. *Mediat Inflammation* 1994; 3: 155-160
74. Helset E, Sildnes T, Seljelid R, Konopski ZS. Endothelin-1 stimulates human monocytes in vitro to release TNF alpha, IL-1beta and IL-6. *Mediat Inflammation* 1993; 2: 417-422
75. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pescuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S. Effects of the 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998; 101: 2711-2719
76. Herrmann J, Best PJ, Ritman EL, Holmes DR, Lerman LO, Lerman A. Chronic endothelin receptor antagonism prevents coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 1555-1561
77. Hesham M A-Y, Rudel T, Meyer TF. Characterization and intracellular trafficking pattern of vacuoles containing *Chlamydia pneumoniae* in human epithelial cells. *Cell Microbiol* 1999, 1(3): 237-247
78. Hirata Y, Emori T, Eguchi S. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 91: 1367-73
79. Hirono S, Dibrov E, Hurtado C, Kostenuk A, Ducas R, Pierce GN. *Chlamydia pneumoniae* stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells through induction of endogenous heat shock protein 60. *Circ Res* 2003; 93: 710-728
80. Hohnemeier H, Pinto YM, Horkay F, Toth M, Juhasz-Nagy A, Orzechowski HD, Paul M. Endothelin-converting-enzyme-1 mRNA expression in human cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 52-54
81. Hurairah H, Ferro A. The role of the endothelium in the control of vascular function. *Int J Clin Pract* 2004; 58: 173-183
82. Ihling C, Szombathy T, Bohrmann B, Brockhaus M, Schaefer HE, Loeffler BM. Co-expression of endothelin-converting-enzyme-1 and endothelin-1 in different stages of human atherosclerosis. *Circulation* 2001; 104: 864-869
83. Inoue A, Yanagisawa MH, Kimura S. The endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 2863-67
84. Ishizawa K, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Houchi H, Tamaki T. Dual effect of Endothelin-1: induction of mesangial cell migration and facilitation of monocyte recruitment through MCP-1 production by mesangial cells. *Hypertension Research* 2004; 27(6): 433-440
85. Janakidevi K, Fisher MA, Del Vecchio PJ, Tiruppathi C, Figge J, Malik AB. Endothelin-1 stimulates DNA synthesis and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992; 263: 1295-1301
86. John S, Schlaich M, Langenfeld M. increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Circulation* 1998; 98: 211-216
87. Kaul R, Uphoff J, Widemann J, Yadlapalli S, Wenman WM. Detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in CD3+ lymphocytes from healthy blood donors and patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102: 2341-2346
88. Kalayoglu MV, Byrne GI. Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 1998; 177: 725-729
89. Kalayoglu MV, Hoerneman B, LaVerda D, Morrison SG, Morrison RP, Byrne GI. Cellular oxidation of low-density lipoprotein by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 1999; 180: 780-790

90. Khan IA. Role of endothelin-1 in myocardial infarction. *Chest* 2005; 127: 1474-76
91. Kinlay S, Behrendt D, Wainstein M, Beltrame J, Fang JC, Creager MA, Selwyn AP, Ganz P. Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronar arteries. *Circulation* 2001; 104: 1114-1118
92. Kiowski W, Sütsch G, Hunziker P, Muller P, Kim J, Oechslin E, Schmitt R, Jones R, Bertel O. Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* 1995; 346: 732-736
93. Kirma C, Akcakoyun M, Esen AM, Barutcu I, Karakaya O, Sonmez K, et al. Relationship between endothelial function and coronary risk factors in patients with stable coronary artery disease. *Circ J* 2007; 71: 698-702
94. 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: 300-307
95. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1988; 238: 249-252
96. Kowala MC, Rose PM, Stein PD. Selective blockade of the endothelin subtype A receptor decreases early atherosclerosis in hamster fed cholesterol. *Am J Pathol* 1995; 146: 819-826
97. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4651-4655
98. Kuhlmann CRW, Most AK, Li F, Münz BM, Schäfer CA, Walther S, Raedle-Hurst T, Waldecker B, Piper HM, Tillmanns H, Wiecha J. Endothelin-1-induced proliferation of human endothelial cells depends on activation of K⁺ channels and Ca²⁺ influx. *Acta Physiol Scand* 2005; 183: 161-169
99. Kunichika N, Landsber JW, Yu Y, Kunichika H, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JXJ. Bosentan inhibits transient receptor potential channel expression in pulmonary vascular myocytes. *Am J Resp Crit Care Med* 2004; 171: 1101-1107
100. Kuo CC, Chen HH, Wang SP, Grayston JT. Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 1043-37
101. Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Atheroscler Thromb* 1993; 13: 1501-1504
102. Kuo CC, Grayston JT. A sensitive cell line, HL cells, for isolation and propagation of *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *J Infect Dis* 1990, 162: 755-758
103. Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA, Goo YA, Wissler RW, Benditt EP. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in coronary arteries of young adults. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 6911-6914
104. Kuo CC, Jackson LA, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995, p.451-461
105. 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: 841-849
106. Kutlin A, Roblin PM, Hammerschlag MR. Effect of gemifloxacin on viability of *Chlamydia pneumoniae* in an in vitro continuous infection model. *J Antimicrob Chem* 2002; 49: 763-767
107. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991; 325: 997-1001
108. Li L, Watts SW, Banes AK, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced venoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 2003; 42: 316-321

109. Li L, Fink GD, Engelhardt JF, Heistad DD, Chen AF. Endothelin-1 stimulates arterial VCAM-1 expression via NADPH oxidase-derived superoxide in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 2003; 42: 997-1003
110. Li L, Fink GD, Watts SW, Northcott CA, Galligan JJ, Pagano PJ, Chen AF. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation* 2003; 107: 1053-1058
111. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143
112. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005; 111: 3481-88
113. Linnanmäki 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: 1130-1134
114. Lüscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists, therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circ* 2000; 102: 2434-40
115. Maass M, Dalhoff K. Transport and storage conditions for cultural recovery of Chlamydia pneumoniae. *J Clin Microbiol* July 1995, p. 1793-96
116. Maass M, Harig U. Evaluation of culture conditions used for isolation of Chlamydia pneumoniae. *Am J Clin Path* 1995; 103: 141-148
117. Maass M, Jahn J, Gieffers J, Dalhoff K, Katus HA, Solbach W. Detection of Chlamydia pneumoniae within peripheral blood monocytes of patients with unstable angina or myocardial infarction. *J Inf Dis* 2000; 181: 449-451
118. 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; 187: 103-106
119. Maass M, Krause E, Engel PM, Krüger S. Endovascular presence of Chlamydia pneumoniae in patients with hemodynamically effective carotid artery stenosis. *Angiology* 1997; 48: 699-706
120. Mancini GB. Long-term use of angiotensin-converting enzyme inhibitors to modify endothelial dysfunction: a review of clinical investigations. *Clin Invest Med* 2000; 23: 144-161
121. Mangiafico RA, Malatino LS, Santonocito M, Spada RS, Polizzi G, Tamburino G. Raised plasma endothelin-1 concentrations in patients with primary hypercholesterolemia without evidence of atherosclerosis. *Int Angiol* 1996; 15: 240-244
122. Matsuura A, Yamochi W, Hirata KI, Kawashima S, Yokoyama M. Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. *Hypertension* 1998; 32: 89-95
123. McMurray JJ, Ray SG, Abdullah I. Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation* 1992; 85: 1374-1379
124. Miller SA, Selzman CH, Shames BD, Barton HA, Johnson SM, Harken AH. Chlamydia pneumoniae activates nuclear factor kappa B and activator protein 1 in human vascular smooth muscle and induces cellular proliferation. *J Surg Res* 2000; 90: 76-81
125. Minamino T, Kurihara H, Takahashi M. Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation* 1997; 95: 221-230
126. Monnick SH, van Haelst PL, van Boven AJ, Stroes ES, Tio RA, Plokker TW, Smit AJ, Veeger NJ, Crijin HJ, van Gilst WH. Endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: A comparison of three frequently reported tests. *J Investig Med* 2002; 50: 19-24
127. Morbidelli L, Orlando C, Maggi CA, Ledda F, Ziche M. Proliferation and migration of endothelial cells is promoted by endothelins via activation of ET_B receptors. *Am J Physiol* 1995; 269:4686-4695

128. Moreland S, McMullen D, Abboa-Offei B, Seymour A. Evidence for a different location of vasoconstrictor endothelin receptors in the vasculature. *Br J Pharm* 1994; 112: 704-708
129. Mosorin M, Surcel HM, Laurila A. detection of *Chlamydia pneumoniae*-reactive T lymphocytes in human atherosclerotic plaques of carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1061-1067
130. Motte S, McEntee K, Naeije R. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol Ther* 2006; 110: 386-414
131. Moulder JW. Interaction of *chlamydiae* and host cell in vitro. *Microbiol Rev* 1991; 55: 143-190
132. Muhlestein JB. *Chlamydia pneumoniae*-induced atherosclerosis in a rabbit model. *J Infect Dis* 2000; 181: 505-507
133. Muhlestein JB, Anderson JL, Carlquist JF, Salunkhe K, Horne BD, Pearson RR. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease: primary clinical results of the ACADEMIC study. *Circulation* 2000; 102: 1755-1760
134. Mulder P, Richard V, Derumeaux G, Hogie M, Henry JP, Lallemand F, Compagnon P, mace B, Comoy E, Letac B, Thuillez C. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation* 1997; 96: 1976-1982
135. Mylona P, Cleland JG. Update of REACH-1 and MERIT-HF clinical trials in heart failure. *Eur J Heart Fail* 1999; 1: 197-200
136. Netea MG, Selzmann CH, Kullberg BJ. Acellular components of *Chlamydia pneumoniae* stimulate cytokine production in human blood mononuclear cells. *Eur J Immunol* 2000; 30: 541-549
137. Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, Negre-Aminou P, Lankelma J, Emeis JJ, van Hinsbergh VW. Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation* 2000; 102: 2803-2809
138. Nohria A, Garrett L, Johnson W, Kinlay S, Ganz P, Creager MA. Endothelin-1 and vascular tone in subjects with atherogenic risk factors. *Hypertension* 2003; 42: 43-48
139. Ogawa H, Hashigucci K, Kazuyama Y. Recovery of *Chlamydia pneumoniae* in six patients with otitis media and effusion. *J Laryngol Otol* 1992; 106: 490-492
140. Ohlstein EH, Arleth A, Bryan H. The selective endothelin ETA receptor antagonist BQ 123 antagonizes endothelin-1 mediated mitogenesis. *Eur J Pharmacol* 1992; 13: 85-88
141. Omland T, Lie RT, Aakvaag A, Dickstein K. Plasma endothelin determinations as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* 1994; 89: 1573-79
142. Ozaki S, Ohwaki K, Ihara M. ETB-mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 209: 483-489
143. Panettieri RA, Goldie RG, Rigby PJ, Eszterhas AJ, Hay DW. Endothelin-1 induced potentiation of human airway smooth muscle proliferation: an ETA receptor-mediated phenomenon. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 191-197 (Abstract)
144. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323: 22-27
145. Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *J Hypertens* 2001; 19: 415-420

146. Patnode D, Wang SP, Grayston JT. Persistence of *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR micro-immunofluorescence antibody. In: Bowie WR, Caldwell HD, Jones RP, et al., Eds. *Chlamydial Infections*. Cambridge University Press, 1990: 406 – 409
147. Pechánová O, Simko F. The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance. *Physiol Res* 2007; 56
148. Peifley KA, Winkles JA. Angiotensin II and endothelin-1 increase fibroblast growth factor-2 mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; 242(1): 202-208
149. Peíro C, Redondo J, Rodríguez-Martínez MA, Angulo J, Marín J, Sánchez-Ferrer CF. Influence of endothelin on cultured vascular smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 1995; 25: 748-751
150. Pollock DM, Keith TL, Highsmith RF. Endothelin receptors and calcium signaling. *The FASEB Journal* 1994; 9: 1196-1204
151. Puolakkainen M, Kuo CC, Shor A, Wang SP, Grayston JT, Campbell LA. Serological response to *Chlamydia pneumoniae* in adults with coronary arterial fatty streaks and fibrolipid plaques. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2212-2214
152. Roblin PM, Hammerschlag MR. Microbiologic efficacy of azithromycin and susceptibilities to azithromycin of *Chlamydia pneumoniae* isolates from adults and children with community-acquired pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 194-196
153. Rödel J, Prochnau D, Prager K, Baumert J, Schmidt KH, Straube E. *Chlamydia pneumoniae* decreases smooth muscle cell proliferation through induction of prostaglandin E₂ synthesis. *Inf Imm* 2004; 72: 4900-4904
154. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126
155. Rubanyi G. Potential physiological and pathological significance of endothelin. *Drugs Future* 1992; 17: 915-936
156. Rupp J, Hellwig-Bürgel T, Wobbe V, Seitzer U, Brandt E, Maass M. *Chlamydia pneumoniae* infection promotes a proliferative phenotype in the vasculature through Egr-1 activation in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3447-3452
157. 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: 203-208
158. Russel FD, Davenport AP. Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 391-398
159. Saida K, Mitsui Y, Ishida N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new endothelin peptide family: molecular cloning, expression and biological activity. *J Biol Chem* 1989; 264: 14613-16
160. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, Huttunen JK, Valtonen V. Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988; 2: 983-986
161. Salani D, Taraboletti G, Rosanò L, DiCastro V, Borsotti P, Giavazzi R, Bagnato A. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol* 2000; 157: 1703-1711
162. Sasu S, LaVerda D, Qureshi N, Golenbock DT, Beasley D. *Chlamydia pneumoniae* and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p42/44 mitogene-activated protein kinase activation. *Circ Res* 2001; 89: 244-250
163. Schachinger V, Britten MB, Zeither AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 1899-1906

164. Schachter J, Stevens RS, et al. Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 249
165. Schiffrin EL, Touyz RM. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: Benefits of AT 1 receptor blockade. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 911-913
166. Schmitz-Spanke S, Schipke JD. Potential role of endothelin-1 and endothelin antagonists in cardiovascular diseases. *Basics Res Cardiol* 2000; 95: 290-298
167. Schneider CA, Diedrichs H, Riedel KD, Zimmermann T, Hopp HW. In vivo uptake of azithromycin in human coronary plaques. *Am J Cardiol* 2000; 86: 789-791
168. Sedeek MH, Llinas MT, Drummond H. Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension. *Hypertension* 2003; 42: 806-810
169. Selzman CH, Netea MG, Zimmermann MA, Weinberg A, Reznikov LL, Grover FL, Dinarello CA. Atherogenic effects of *Chlamydia pneumoniae*: Refuting the innocent bystander hypothesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126: 688-693
170. Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, v Segesser L, Lüscher TF. Both ETAR and ETBR receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circ* 1994; 89: 1203-1208
171. Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 336-363
172. Shah R. Endothelins in health and disease. *Eur J Int Med* 2007; 18: 272-282
173. Sharifi AM, Schiffrin EL. Endothelin receptors mediating vasoconstriction in rat pressurized small arteries. *Can J Phys Pharmacol* 1996; 74: 934-939
174. Shiba R, Yanagisawa M, Miyauchi T, Ishii Y, Kimura S, Uchiyama Y. Elimination of intravenously injected endothelin-1 from the circulation of the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13(5): 98-101
175. Shor A, Kuo CC, Patton DL. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in the coronary artery atheroma plaque. *South Afr Med J* 1992; 82: 158-161
176. Siewert K, Rupp J, Klinger M, Solbach W, Gieffers J. Growth cycle dependent pharmacodynamics of antichlamydial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49 (5): 1852-56
177. Soler N, Torres A, Ewig S. Bronchial microbial patterns in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) requiring mechanical ventilation. *Am J Resp Crit Care Med* 1998; 157: 1498-1505
178. Stevens RS. *Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity*. Am Soc Microbiol, 1999
179. Stewart DJ, Kubac G, Costello KB. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *Am Coll Cardiol* 1991; 18: 38-43
180. Stewart DJ, Cernacek P, Costello KB, Rouleau JL. Elevated endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change. *Circulation* 1992; 85: 510-517
181. Stewart DJ, Langleben D, Cernacek P, Cianflone K. Endothelin release is inhibited by coculture of endothelial cells with cells of vascular media. *Am J Physiol* 1990; 259: 1928-1932
182. Sung CP, Arleth AJ, Storer BL, Ohlstein EH. Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271: 429-437
183. Summersgill JT, Molestina RE, Miller RD, Ramirez JA. Interactions of *Chlamydia pneumoniae* with human endothelial cells. *J Infect Dis* 2000; 181: 479-482
184. Süttsch G, Kiowski W, Yan XW, Hunziker P, Christen S, Strobel W, Kim JH, Rickembacher P, Bertel O. Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation* 1998; 98: 2262-2268

185. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000; 101: 948-954
186. Tanaka Y, Makiyama Y, Mitsui Y. Endothelin-1 is involved in the growth promotion of vascular smooth muscle cells by hyaluronic acid. *Int J Cardiol* 2000; 76: 39-47
187. 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
188. Timm M, Kaski JC, Dashwood MR. Endothelin-like immunoreactivity in atherosclerotic human coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26: 442-444
189. Tomoda H. Plasma endothelin-1 in acute myocardial infarction with congestive heart failure. *Am Heart J* 1993; 125: 667-672
190. d'Uscio L, Moreau P, Shaw SG, Takase H, Barton M, Lüscher TF. Effects of chronic ETA-receptor blockade in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 1997; 29: 435-441
191. d'Uscio LV, Shaw S, Barton M, Lüscher TF. Losartan but not verapamil inhibits angiotensin II-induced tissue endothelin-1 increase: role of blood pressure and endothelial function. *Hypertension* 1998; 31: 1305-1310
192. Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, Harrison DG, Tsao PS. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloprotease activity: Role of oxidative stress. *Circ Res* 2001; 88: 1291-1298
193. Vielma SA, Krings G, Lopes-Virella MF. *Chlamydia pneumoniae* induces ICAM-1 expression in human aortic endothelial cells via protein kinase C-dependent activation of nuclear factor kappa-B. *Circulation* 2003; 92: 1130-1137
194. Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, Cruden NL, Koomans HA, Rabelink TJ, Webb DJ. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* 1998; 97: 752-756
195. Wang SP, Grayston JT. Population prevalence antibody to *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, In: Bowie WR, Caldwell HD, Jones RP, et al., eds. *Chlamydial Infections*. Cambridge University Press, 1990: 402-405
196. Wedgwood S, Dettman RW, Black SM. ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: 1058-1067
197. Wellinghausen N, Straube E, Freidank H, von Baum H, Marre R, Essig A. Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia. *Int J Microbiol* 2006; 296: 485-491
198. Wenzel RR, Fleisch M, Shaw S, Noll G, Kaufmann U, Schmitt R, Jones CR, Clozel M, Meier B, Lüscher TF. Hemodynamic and coronary effects of the endothelin antagonist bosentan in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1998; 98: 2235-2240
199. Winer J, Jung CS, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring of gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 1999; 270: 41-49
200. Wong KH, Skelton SK, Chan YK. Efficient culture of *Chlamydia pneumoniae* with cell lines derived from the human respiratory tract. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1625-30
201. Woods M, Wood EG, Bardswell SC, Bishop-Bailey D, Barker S, Wort SJ, Mitchell JA, Warner TD. Role for nuclear factor-kappa B and signal transducer and activator of transcription 1/interferon regulatory factor-1 in cytokine-induced endothelin-1 release in human vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 923-931
202. Woods M, Mitchell JA, Wood EG, Barker S, Walcot NR, Rees GM, Warner TD. Endothelin-1 is induced by cytokines in human vascular smooth muscle cells: evidence for intracellular endothelin-converting enzyme. *Mol Pharm* 1999; 902-909

203. Wu R, Lamontagne D, de Champlain J. Antioxidative properties of acetylsalicylic acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2002; 150: 387-392
204. Yahiaoui L, Villeneuve A, Valderrama-Carvajal H, Burke F, Fixman ED. Endothelin-1 regulates proliferative responses, both alone and synergistically with PDGF, in rat tracheal smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 2006; 17: 37-46
205. Yanagisawa MH, Kurihara H, Kimura S, et al. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells, *Nature* 332: 411-415
206. Yang Z, Kasich N, Lüscher TF. Endothelin-1 potentiate's human smooth muscle cell growth to PDGF. Effects of ETA and ETB receptor blockade, *Circulation* 1999; 100: 005-008
207. Yao L, Kobori H, Rahman M, Seth DM, Shokoji T, Fan Y, Zhang GX, Kimura S, Abe Y, Nishiyama A. Olmesartan improves endothelin-induced hypertension and oxidative stress in rats. *Hypertens Res* 2004; 27: 493-500
208. Zhang YM, Wang KQ, Zhou GM, Zuo J, Ge, JB. Endothelin-1-promoted proliferation of vascular smooth muscle cell through pathway of extracellular signal-regulated kinase and cyclin D1. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24: 563-568
209. Zeither AM, Goebel H, Schachinger V, Ihling C. Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation* 1995; 91: 941-947
210. Zeither AM, Ihling C, Pistorius K, Schachinger V, Schaefer HE. Increased tissue endothelin immunoreactivity in atherosclerotic lesions associated with acute coronary syndromes. *Lancet* 1994; 344: 1405-1406
211. Zeither AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 1995; 76: 980-986

7. Veröffentlichungen

Artikel:

Kern JM, Maass V, Rupp J, Maass M. Proliferative stimulation of the vascular Endothelin-1 axis *in vitro* and *ex vivo* by infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Thromb Haemost* 2009; 102: 743-753

Vorträge:

Kern JM, Rupp J, Maass M. Proliferative Stimulation des Endothelin-1 Systems in vaskulären Zellen durch Infektion mit *Chlamydia pneumoniae*. 3. Deutscher Chlamydien Workshop, Jena, 09.-11. März 2005

Rupp J, Luedemann T, Wobbe V, **Kern JM**, Maass M. Persistent monocyte infection with *Chlamydia pneumoniae*: predisposition and implications for atherosclerotic disease. 2. Deutscher Chlamydien Workshop, Berlin, 03.- 05. März 2004.

Poster:

Rupp J, **Kern JM**, Wobbe V, Maass M. *Chlamydia pneumoniae* infection induces a pro-atherosclerotic phenotype in vascular cells through upregulation of Endothelin-1 and Endothelin-A receptor. International Union of Microbiological Societies, IUMS 2005, San Francisco, USA, 23.-28. Juli 2005.

Kern JM, Rupp J, Maass M. Dysregulation of the vascular Endothelin-1 system by *Chlamydia pneumoniae*. 2. Gemeinsamer Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Göttingen, 25.-28. September 2005

8. Danksagung

Mein großer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Matthias Maaß, der diese Arbeit ermöglicht hat und mich durch seine offene Art stets zu fordern und zu fördern wußte. Seiner großen fachlichen und sozialen Kompetenz ist es zu verdanken, daß ich in meiner Arbeit ein hohes Maß an Selbstständigkeit entfalten konnte.

Des weiteren danke ich PD Dr. med. Jan Rupp, der mich mit großem Sachverstand bei der Planung der Experimente beraten und Ergebnisse zielgerichtet mit mir diskutiert hat.

Mein weiterer Dank geht an Dr. rer. nat Viola Maaß, sowie an die drei Medizinisch-Technischen-Laborassistentinnen Angela Gravenhorst, Anke Hellberg und Tanja Lüdemann. Sie haben mich in zahlreiche Methoden engagiert eingearbeitet und sorgten für eine großartige Atmosphäre im Labor.

Eigens erwähnen möchte ich meine Familie, die mich während der Arbeit sehr unterstützt hat. Ein besonderer Dank gilt hierbei Benjamin Heemeier und meiner Mutter, Helga Kern, die mich während der gesamten Zeit begleitet haben.

9. Lebenslauf

Name: Jan Marco Kern
Geburtstag: 07. Oktober 1980
Geburtsort: München
Vater: Günter Otto Kern, Dipl.-Wirtschaftsingenieur
*14. August 1943, Saaz (Böhmen)
Mutter: Helga Kern, geb. Lodwitz, Übersetzerin
*17. Juni 1949, Markt Indersdorf
Geschwister: René Alexander Kern, Student (Rechtswissenschaften)
*19. Mai 1983, München

Ausbildung:

1987-1991 Volksschule Weichs
1991-1992 Josef-Effner-Gymnasium, Dachau
1992-2000 Theodor-Mommsen-Schule, Bad Oldesloe
05. 2000 Abitur
09. 2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin
Universität zu Lübeck

Famulaturen: Anästhesie (Furth i.Wald), Innere Notfallaufnahme/
Endoskopie (Bad Oldesloe), Med. Mikrobiologie,
Pädiatrie, Radiologie (Lübeck)

09. 2002 Ärztliche Vorprüfung
05. 2003-
09. 2005 Experimenteller Teil der Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mi-
krobiologie, Universität zu Lübeck
09. 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03. 2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04. 2006 Beginn des Praktischen Jahres (Lübeck und Zürich), Wahlfach: Anäs-
thesie
05. 2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt
ab 06. 2007 Mitarbeiter im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Hygiene und
Infektiologie (Universitätsklinikum Salzburg)