

Aus der Medizinischen Klinik III  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. P. Zabel

---

Regulation pro-/antiinflammatorischer  
Faktoren in *Chlamydia pneumoniae*-  
infizierten Alveolarmakrophagen und  
Monozyten gesunder rauchender  
Probanden

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Sektion Medizin -

vorgelegt von  
**Petra Richter**  
aus Paderborn

Lübeck 2013

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jan Rupp

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Torsten Goldmann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.11.2013

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

# Inhaltsverzeichnis

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b>   |    |
| 1.1.      | <i>Chlamydia pneumoniae</i> ( <i>C. pneumoniae</i> )                | 9  |
| 1.2       | Immunologische Mechanismen der Lunge                                | 9  |
| 1.3       | Alveolarmakrophagen in der Abwehr respiratorischer Infektionen      | 10 |
| 1.4       | Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)                       | 11 |
| 1.5       | Nuklear Faktor kappa B (NF $\kappa$ B) in Inflammation und Apoptose | 15 |
| 1.6       | Proinflammatorische Faktoren in der Immunabwehr                     | 17 |
| 1.7       | Zielsetzung der Arbeit  | 19 |
| <br>      |   |    |
| <b>2.</b> | <b>Material</b>   |    |
| 2.1       | Geräte  | 20 |
| 2.2       | Chemikalien und sonstige Materialien                                | 21 |
| 2.2.1     | Kultivierung und Stimulation der Alveolarmakrophagen und Monozyten  | 21 |
| 2.2.2     | Pappenheim- und Trypanblau-Färbungen                                | 22 |
| 2.2.3     | Annexin-V-FITC-Färbungen  | 22 |
| 2.2.4     | Chlamydienfärbungen   | 22 |
| 2.2.5     | Life/Dead-Färbungen   | 22 |
| 2.2.6     | RNA-Isolierung  | 22 |
| 2.2.7     | Synthese der cDNA aus RNA   | 23 |
| 2.2.8     | Multiplex PCR: humanes TNF-Signaling                                | 23 |
| 2.2.9     | Gelelektrophorese   | 23 |
| 2.2.10    | ELISA   | 24 |
| <br>      |   |    |
| <b>3.</b> | <b>Methoden</b>   |    |
| 3.1       | Anzucht von <i>C. pneumoniae</i>                                    | 25 |
| 3.1.1     | Anzucht der HEp2-Zellen   | 25 |
| 3.1.2     | Infektion der HEp2-Zellen mit <i>C. pneumoniae</i>                  | 25 |
| 3.1.3     | Chlamydienfärbungen   | 26 |
| 3.2       | Bronchoskopie und Gewinnung der bronchoalveolären Lavage            | 26 |
| 3.3       | Aufarbeitung und Aufreinigung der bronchoalveolären Lavage          | 27 |
| 3.3.1     | Bestimmung der Gesamtzellzahl                                       | 27 |
| 3.3.2     | Differenzierung der Zellen  | 27 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 3.3.3     | Vitalitätstestung der Zellen mit Trypanblau-Färbung   | 28 |
| 3.4       | Isolierung der Blutmonozyten aus EDTA-Blut  | 28 |
| 3.5       | Stimulationsprotokolle  | 28 |
| 3.6       | Färbungen   | 29 |
| 3.6.1     | Trypanblau-Färbungen  | 30 |
| 3.6.2     | Life/Dead-Färbungen   | 30 |
| 3.6.3     | Pappenheim-Färbungen  | 30 |
| 3.6.4     | Annexin-V-FITC-Färbungen  | 30 |
| 3.7       | Molekulargenetische Untersuchungen  | 31 |
| 3.7.1     | Besondere Anforderungen bei der Arbeit mit RNA und DNA Material   | 31 |
| 3.7.2     | RNA-Isolierung  | 32 |
| 3.7.3     | cDNA-Synthese   | 32 |
| 3.7.4     | Multiplex PCR: humanes TNF-Signaling  | 33 |
| 3.7.5     | Gelelektrophorese   | 35 |
| 3.7.6     | Auswertung der Gelelektrophorese  | 36 |
| 3.8       | ELISA   | 36 |
| 3.9       | Statistik   | 36 |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse</b>   |    |
| 4.1       | Validierung der Multiplex PCR   | 38 |
| 4.2       | Vorstimulation der Alveolarmakrophagen mit LPS  | 39 |
| 4.3       | Infektionsraten humaner Monozyten nach Infektion mit <i>C. pneumoniae</i>   | 41 |
| 4.4       | Einfluss von <i>C. pneumoniae</i> auf die Genregulation signaltransduktori-<br>scher Faktoren humaner peripherer Blutmonozyten nach 30 min, 2 h<br>und 24 h | 42 |
| 4.5       | Sekretion von Zytokinen und Chemokinen nach Infektion humaner<br>Monozyten mit <i>C. pneumoniae</i>   | 45 |
| 4.5.1     | Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$ und dessen physio-<br>logischen Gegenspielers IL-1RA   | 45 |
| 4.5.2     | Sekretion des Chemokins MCP-1   | 47 |
| 4.6       | Apoptoseraten humaner Monozyten nach induzierter Apoptose in Ab-<br>hängigkeit einer Infektion mit <i>C. pneumoniae</i>                                     | 48 |
| 4.7       | Infektionsraten humaner Alveolarmakrophagen nach Infektion mit<br><i>C. pneumoniae</i>  | 50 |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 4.8       | Einfluss von <i>C. pneumoniae</i> auf die Genregulation signaltransduktori-<br>scher Faktoren humaner Alveolarmakrophagen nach 2 h und 24 h                                 | 50        |
| 4.9       | Sekretion von Zytokinen und Chemokinen nach Infektion humaner Al-<br>veolarmakrophagen mit <i>C. pneumoniae</i>   | 54        |
| 4.9.1     | Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$ und dessen physio-<br>logischen Gegenspielers IL-1RA   | 54        |
| 4.9.2     | Zytokinsekretion der proinflammatorischen Zytokine/Chemokine:TNF- $\alpha$ ,<br>IL-8 und MCP-1  | 55        |
| 4.10      | Apoptoseraten humaner Alveolarmakrophagen nach induzierter Apop-<br>tose in Abhängigkeit der Infektion mit <i>C. pneumoniae</i>   | 57        |
| 4.11      | COPD Patienten  | 58        |
| 4.11.1    | Das Patientenkollektiv  | 58        |
| 4.11.2    | Einfluss von <i>C. pneumoniae</i> auf die Genregulation signaltransduktori-<br>scher Faktoren humaner Alveolarmakrophagen der COPD-Patienten<br>nach 15 min, 30 min und 2 h | 60        |
| 4.11.3    | Vergleich COPD Patienten mit lungengesunden Probanden   | 62        |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>64</b> |
| <b>6.</b> | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>73</b> |
| <b>7.</b> | <b>Referenzen</b>   | <b>75</b> |
| <b>8.</b> | <b>Danksagungen</b>   | <b>84</b> |
| <b>9.</b> | <b>Lebenslauf</b>   | <b>85</b> |

## Abkürzungen

|                 |  |
|-----------------|--|
| °C              | Grad Celsius   |
| μ               | Mikroliter   |
| μm              | Mikrometer   |
| μmol/l          | Mikromol pro Liter   |
| AM              | Alveolarmakrophagen  |
| AP-1            | Activator Protein 1  |
| Aqua dest.      | destilliertes Wasser   |
| ATCC            | American Type Culture Collection                               |
| Bak             | Bcl-2 Homologous killer  |
| BAL             | bronchoalveolären Lavage                                       |
| BALF            | bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit                           |
| Bax             | Bcl-2 Associated X Protein                                     |
| Bcl-2           | B-Cell Lymphoma 2  |
| Bcl-xl          | Bcl-2 related Gene   |
| BGA             | Blutgasanalyse   |
| BH3             | Bcl-2 homolog Domain 3   |
| Bok             | Bcl-2 related Ovarian Killer                                   |
| bp              | Basenpaare   |
| ca.             | Circa  |
| CAP             | Community Acquired Pneumonia<br>(ambulant erworbene Pneumonie) |
| Caspase         | Cystein dependent aspartic directed proteases                  |
| CD4             | CD <sub>4</sub> positive T Helferzellen                        |
| CD8             | CD <sub>8</sub> positive T Helferzellen                        |
| cDNA            | Complementary DNA  |
| clAP1           | Cellular Inhibitor of Apoptosis 1                              |
| clAP2           | Cellular Inhibitor of Apoptosis 2                              |
| CO <sub>2</sub> | Kohlendioxid   |
| COPD            | Chronisch obstruktive Lungenerkrankung                         |
| Cpn             | <i>Chlamydia pneumoniae</i>                                    |
| CWL             | CWL-029 Stamm von <i>Chlamydia pneumoniae</i>                  |
| DD              | Death Domain   |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid   |
| DNA             | Deoxyribonucleid acid = Desoxyribonucleinsäure                 |
| dNTP            | Desoxyribonucleosidtrisphosphate                               |
| DTT             | Dithiothreitol   |
| EDTA            | Ethylene Diamine Tetraacetic Acid                              |
| EIA             | Enzym Immuno Assay   |
| ELISA           | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay                             |
| FCS             | Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)                         |
| FEV-1           | Forciertes expiratorisches Volumen in der 1. Sekunde           |
| FITCS           | Fluoresceinisothiocyanat                                       |
| GAPDH           | Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase                       |
| GOLD            | Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease         |
| h               | Stunden  |

|                   |   |
|-------------------|---|
| HEp-2             | Human Epidermoid Cancer Cells   |
| ICE               | Interleukin-1-Converting Enzyme   |
| IFN <sub>γ</sub>  | Interferon gamma  |
| IFU               | Inclusion Forming Units   |
| IgG               | Immunglobulin G   |
| IκB               | Inhibitor of κB   |
| IKK               | IκB Kinase Komplex  |
| IL                | Interleukin   |
| IL-1 <sub>α</sub> | Interleukin 1 alpha   |
| IL-1 <sub>β</sub> | Interleukin 1 beta  |
| IL-1RA            | Interleukin 1 Rezeptorantagonist  |
| inkl.             | Inklusive   |
| IOD               | Integrierte Optische Dichte   |
| IVC               | Inspiratorische Vitalkapazität  |
| Jun               | v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog   |
| Konz              | Konzentration   |
| LPS               | Lipopolysaccharid   |
| Lsg.              | Lösung  |
| MAP Kinase        | Mitogen Activating Protein Kinase   |
| MCP               | Monocyte Chemotactic Protein  |
| Med               | Medium  |
| MEM Automedium    | Minimum Essential Media Medium  |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnesiumchlorid  |
| MIF               | Mikroimmunfluoreszenz   |
| min               | Minuten   |
| ml                | Milliliter  |
| mmol/l            | Millimol pro Liter  |
| mm <sup>2</sup>   | Quadratmillimeter   |
| MNZ               | Monozyten   |
| MPCR              | Multiplex Polymerase Chain Reaction   |
| mRNA              | Messenger Ribon Nuclear Acid  |
| MT                | Mitochondrium   |
| MW                | Mittelwerte   |
| MyD88             | Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88                                  |
| N                 | Anzahl  |
| NFκB              | Nuklear Faktor kappa B  |
| NK Zellen         | Natürliche Killerzellen   |
| Nm                | Nanometer   |
| p50               | Untereinheit des NFκB Moleküls  |
| p55               | Tumornekrosefaktor Rezeptor 1   |
| p65               | RelA = Untereinheit des NFκB Moleküls   |
| PAMP              | pathogen associated molecular pattern   |
| PBMC              | Peripheral Blood Mononuclear Cells<br>(mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) |
| PBS               | Phosphat Buffered Saline  |
| pCO <sub>2</sub>  | Kohlendioxidpartialdruck  |
| PCR               | Polymerase chain reaction   |
| p.i.              | post infectionem  |

|                    |   |
|--------------------|---|
| pO <sub>2</sub>    | Sauerstoffpartialdruck                                    |
| pos.               | Positiv   |
| pro IL-1           | Vorläufer Enzym des Interleukin 1                         |
| PRR                | recognition receptor                                      |
| PT Pore            | Permeability Transition Pore                              |
| RelA               | p65: Untereinheit des NFκB Moleküls                       |
| RNA                | Ribonucleinsäure  |
| RPMI               | Roswell Park Memorial Institute                           |
| RT PCR             | reverse transcriptase polymerase Chain reaction           |
| sek                | Sekunde   |
| Stabw              | Standardabweichung  |
| Tab.               | Tabelle   |
| TAQ DNA Polymerase | DNA-Polymerase aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE                | Tris/Borat/EDTA Puffer                                    |
| TLR                | Toll-like Rezeptor  |
| TNF-α              | Tumornekrose Faktor alpha                                 |
| TNF-R1             | Tumornekrose Faktor alpha-Rezeptor 1                      |
| TNF-R2             | Tumornekrose Faktor alpha-Rezeptor 2                      |
| TRAF2              | TNF Receptor Associated Factor                            |
| Tris               | Tris(hydroxymethyl)aminomethane                           |
| U                  | Units (Einheiten)   |
| U/μl               | Units/μl  |
| U/min              | Umdrehungen pro Minute                                    |
| UV                 | Ultraviolett  |
| v.a.               | vor allem   |
| Verd.              | Verdünnung  |
| z. B.              | zum Beispiel  |

# **1. Einleitung**

## **1.1 Chlamydia pneumoniae (C. pneumoniae)**

*C. pneumoniae* ist ein gramnegatives, humanpathogenes, obligat intrazelluläres Bakterium, das erstmals 1965 aus dem Konjunktivalsekret eines Kindes in Taiwan und 1983 aus Rachenabstrichen eines Studenten mit Pharyngitis an der Universität zu Washington isoliert wurde. Nach der initialen Vermutung, einen Stamm des Bakteriums *Chlamydia trachomatis* isoliert zu haben, erbrachten genetische Homologie-Analysen jedoch den Nachweis einer neuen Chlamydienspezies (10, 40, 42).

In serologischen Studien konnte die weite Verbreitung einer Infektion mit *C. pneumoniae* aufgezeigt werden (12, 40, 41). Meist findet die primäre Infektion mit *C. pneumoniae* im Kindesalter (5-14 Jahre) statt, selten sind auch Antikörper vor dem 5. Lebensjahr nachzuweisen (41, 59). In der erwachsenen Bevölkerung ist eine positive Seroprävalenz von 50-80% mit IgG-Antikörpern für *C. pneumoniae* nachweisbar. Reinfektionen im Laufe des Lebens sind häufig und so ist auch bei älteren Menschen ein hoher Anteil an positiven serologischen Befunden zu erheben (10, 41, 59, 65). Meist verlaufen die Infektionen mit *C. pneumoniae* klinisch inapparent im Rahmen einer Infektion des oberen Respirationstraktes. Insbesondere bei älteren Menschen sind aber zum Teil auch schwerwiegende Pneumonien zu beobachten (25, 40, 41, 60). In 1- 10% der Fälle weltweit wird *C. pneumoniae* als Erreger ambulant erworbener Pneumonien (CAP) gefunden (40, 59). Eine besondere Bedeutung wird auch für chronische und rezidivierende Infektionen mit *C. pneumoniae* in der Entstehung chronisch obstruktiver Ventilationsstörungen, wie dem Asthma bronchiale und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), vermutet (10, 15, 55, 87, 98).

## **1.2 Immunologische Mechanismen der Lunge**

Der obere und untere Respirationstrakt stellen die flächenmäßig größte epitheliale Oberfläche zur Umwelt dar. Neben dem Gasaustausch kommt ihm somit auch eine wichtige Rolle in der Abwehr von Noxen, bakteriellen/viralen Erregern und Pilzen zu. Im Bereich der Atemwege und Bronchien übernehmen die Atemwegsepithelien, dendritische und lymphomatoide Zellen wichtige Funktionen der angeborenen und er-

worbenen Immunabwehr. Eingeatmete Partikel und Mikroorganismen, die der Abwehrfunktion der Atemwege entgehen konnten, gelangen in die Alveolen. Hier übernimmt v.a. die zellvermittelte Immunabwehr (Alveolarmakrophagen (AM), Lymphozyten und Granulozyten) die Elimination der Pathogene. Im pulmonalen Kompartiment bilden die AM mit über 90% die erste Verteidigungslinie gegen inhalierte Partikel, Mikroorganismen, Toxine (19, 50, 51) und Tumorzellen (92). Bei lungengesunden Personen stellen AM in den distalen Atemwegen die einzige Population phagozytischer Zellen dar (74, 92).

Im Rahmen bakterieller oder viraler Infekte werden vermehrt neutrophile Granulozyten, deren Anteil normalerweise <2% liegt, zur Bekämpfung der Infektion angelockt.

### **1.3 Alveolarmakrophagen in der Abwehr respiratorischer Infektionen**

In der Regulation unspezifischer Entzündungsreaktionen besitzen Makrophagen mit ihrer Aufgabe zur Phagozytose, Antigen-Prozessierung und -Präsentation, Zytokinsekretion und T-Zellaktivierung, eine bedeutende Funktion (97). Pulmonale Epithelzellen, neutrophile Granulozyten und AM stellen aber auch Wirtszellen bei respiratorischen Infektionen für *C. pneumoniae* dar (38, 54, 82,110). Für die Entwicklung systemischer und chronischer Infektionen mit *C. pneumoniae* scheint die Infektion der peripheren mononukleären Zellen von essentieller Bedeutung zu sein. So konnten Gieffers et al. an Kaninchen nach einer intratrachealen Inokulation mit *C. pneumoniae* eine systemische Dissemination über periphere mononukleäre Zellen aus der Lunge in das Gefäßsystem aufzeigen (38).

AM entstammen zirkulierenden Blutmonozyten, die aus dem Blutkreislauf durch das Lungengewebe in die Alveolen wandern. Die zirkulierenden Blutmonozyten werden über mehrere Vorstufen im Knochenmark gebildet (18). In der Gesamtheit stellen AM eine heterogene Population dar, wobei sich die Subpopulationen morphologisch und funktionell unterscheiden. Gemeinsame histologische Kennzeichen der AM sind ein gelappter Zellkern, vakuolisiertes Zytoplasma sowie viele sekundäre Lysosomen und Mitochondrien im Zytoplasma. Ihre Größe beträgt zwischen 12 und 42 µm, wohingegen Monozyten eine Größe von ca. 12 µm aufweisen (92).

Im Rahmen unspezifischer Immunreaktionen auf ein Pathogen erkennen die sog. Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) Pathogen-

assoziierte molekulare Muster (PAMPs). Zu den wichtigsten PRRs gehören die Toll-like Rezeptoren (TLR), von denen bislang 12 verschiedene Rezeptoren mit unterschiedlichen Liganden bekannt sind. TLR-2 erkennt hauptsächlich PAMPs grampositiver Bakterien, wie Lipoproteine, Lipopeptide und Peptidoglykane. TLR-4 interagiert v.a. mit dem Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien. Die Erkennung mikrobiologischer Komponenten durch TLRs führt über intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden zu einer Expression von Genen, die unspezifische Entzündungsreaktionen kontrollieren und die Bildung einer spezifischen Immunreaktion einleiten (6). Einen besonderen Stellenwert nehmen hier die proinflammatorischen Zytokine (u.a. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ ) ein. Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (Nuklear Faktor kappa B) übernimmt eine zentrale Rolle in der Regulation dieser immunologischen Prozesse (6).

#### **1.4 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)**

Die COPD ist weltweit eine der häufigsten Todesursachen mit zunehmender Tendenz. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes verstarben 2011 in Deutschland 29.324 Patienten an den Folgen der COPD, dies entsprach 3,4% aller Todesfälle ([www.destatis.de](http://www.destatis.de), Todesursachenstatistik Deutschland).

Die Definition nach der „Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease“ (GOLD) bezeichnet die COPD in der revidierten Leitlinie aus dem Dezember 2011 als eine vermeidbare und behandelbare Erkrankung mit einigen signifikanten extrapulmonalen Effekten, die zur Schwere der Erkrankung bei einzelnen Patienten beitragen. Die pulmonale Komponente ist durch eine zumeist nur teilreversible Atemwegsobstruktion gekennzeichnet, die eine Progression aufweist und mit einer ausgeprägten inflammatorischen Reaktion der Lunge und Atemwege auf inhalede Partikel oder Gase assoziiert ist (79).

Wie aus der Definition nach GOLD hervorgeht, stellt die chronische Entzündungsreaktion den wichtigsten pathogenetischen Faktor in der Krankheitsentstehung dar. In histopathologischen Untersuchungen aus Biopsien der kleinen Atemwege konnte eine direkte Korrelation zwischen dem Schweregrad der Entzündung und dem Krankheitsstadium aufgezeigt werden (52).

Das Rauchen, als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer COPD, beeinflusst die immunregulatorischen Funktionen der Lunge. So konnte bei gesunden Rauchern

gezeigt werden, dass sich die AM in Anzahl, Morphologie und Funktionen verändern. Bei gesunden Rauchern war im Vergleich zu Nichtrauchern eine insgesamt deutlich erhöhte Zellzahl mit einem signifikant vermehrten Anteil an AM in der bronchoalveolären Lavage (BAL) nachzuweisen (93). Morphologisch kennzeichnen sich die AM bei Rauchern durch einen vergrößerten Zelldurchmesser (50), eine vermehrte Pigmentierung, verstärkte Vakuolisierung und Vielkernigkeit. Es konnte weiter gezeigt werden, dass Zigarettenrauch biologisch aktives Endotoxin enthält (46), das bei chronischer Exposition zu einer veränderten Expression proinflammatorischer Zytokine führt. Nach Exposition auf Zigarettenrauch ist eine vermehrte mRNA Expression für TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 und MCP-1 in Zellen aus der BAL nachweisbar (44, 8).

Auf eine Stimulation humaner AM mit Endotoxin konnte in verschiedenen Studien in vitro eine verminderte Sekretion für die proinflammatorischen Zytokine und Chemokine IL-1 $\beta$  (107), TNF- $\alpha$  (36, 108), IL-6 (67, 36) und IL-8 (27) bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern aufgezeigt werden. Auch verändert eine chronische Exposition auf Zigarettenrauch das Oberflächenmarker-Profil der AM. Droemann et al. konnten für gesunde rauchende Probanden und COPD Patienten eine verminderte Expression von TLR-2 auf AM darstellen (29). Für TLR-4 konnten Sarir et al. eine verminderte Oberflächen-Expression auf AM bei jedoch gleichzeitig erhöhter transkriptioneller Aktivität und vermehrtem TLR-4 Protein intrazellulär nachweisen (86). Die beschriebenen proinflammatorischen Reaktionen werden mutmaßlich über TLR-4 vermittelt (28), wohingegen die Expression antiinflammatorischer Zytokine über TLRs weitgehend unverändert erhalten bleibt (66).

Der Krankheitsverlauf der COPD ist durch eine fortschreitende Verschlechterung der Lungenfunktion gekennzeichnet, die insbesondere durch rezidivierende Exazerbationen hervorgerufen wird (102). Exazerbationen sind bislang bei der COPD nicht einheitlich definiert. Nach der aktuellen Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin wird eine akute Exazerbation als Verschlechterung des Erkrankungsverlaufes definiert, welcher mit vermehrter Dyspnoe und Veränderung der Hustensymptomatik einschließlich der Expektorationen einhergeht (102). Als mögliche Auslöser- und Triggerfaktoren kommen bakterielle/virale Infektionserreger in Betracht. So weisen Patienten mit einer chronischen bakteriellen Kolonisation des Tracheobronchialsystems erhöhte Konzentrationen inflammatorischer Faktoren (z. B. TNF- $\alpha$  und IL-8) in der BAL auf (95). Patel et

al. konnten zeigen, dass eine chronische Kolonisation der unteren Atemwege mit Bakterien auch in Phasen einer stabilen Erkrankungssituation zu einer gehäuften Exazerbationsrate führen kann (77).

Das Erregerspektrum umfasst neben den klassischen Erregern einer ambulant erworbenen Pneumonie (z. B. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Moxarella catarrhalis*) (49) auch atypische Bakterien wie Mycoplasmen und Chlamydien (89).

*C. pneumoniae* scheint sowohl in der chronischen Kolonisation als auch als Erreger akuter Exazerbationen eine Rolle zu spielen. Mehrere Studien konnten in 4-34% einen Zusammenhang zwischen einer akuten Exazerbation einer COPD und einer *C. pneumoniae*-Infektion aufzeigen (14, 56, 76). Auch in stabilen Phasen einer COPD war ein positiver Nachweis von *C. pneumoniae* in 24-38% der COPD-Patienten möglich (88, 16). Interessanterweise konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die chronische Kolonisation mit *C. pneumoniae* in stabilen Erkrankungsphasen auch in Zusammenhang mit erhöhten Exazerbationsraten steht (17).

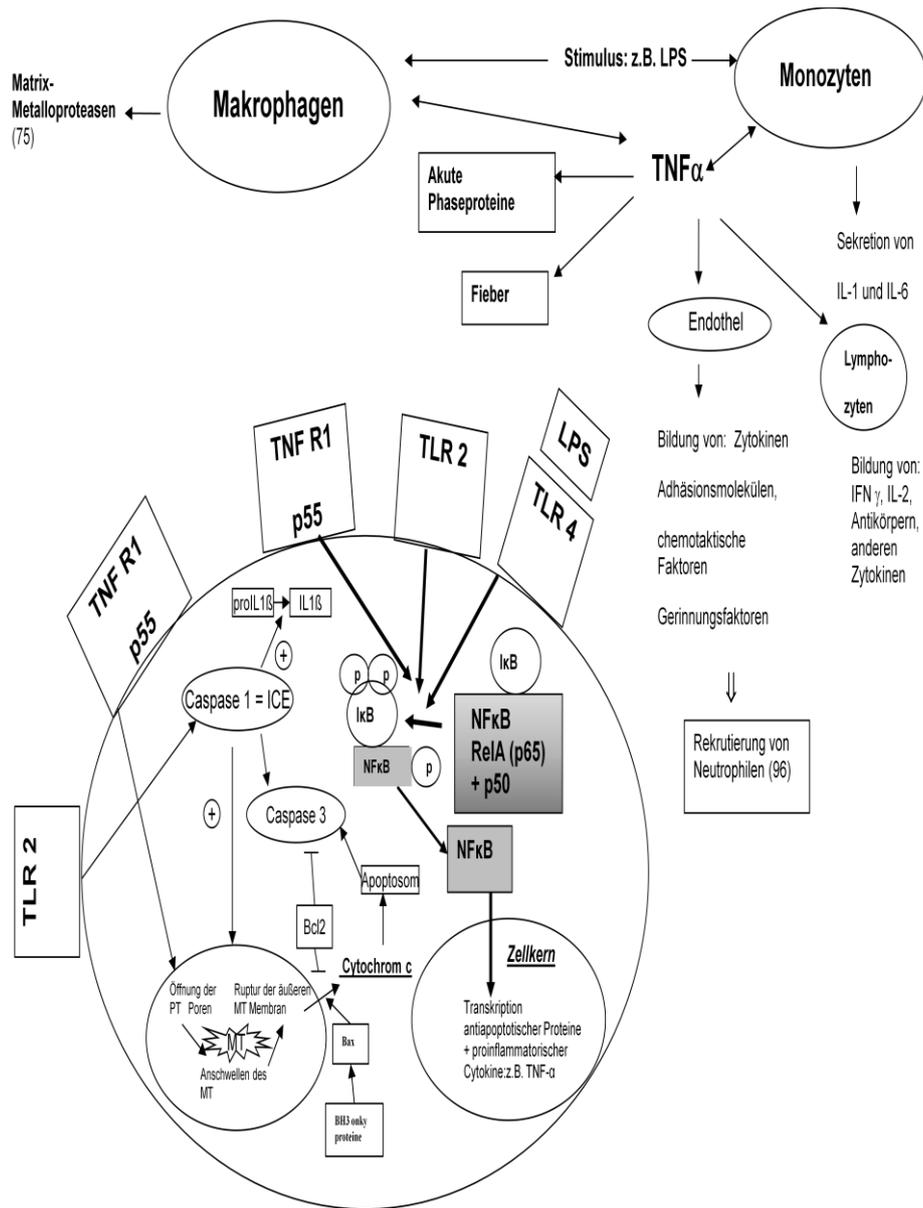


Abbildung 1 Darstellung des TNF- $\alpha$  und NF $\kappa$ B regulierten Signalweges (modifiziert nach 31)

## 1.5 Nuklear Faktor kappa B (NFκB) in Inflammation und Apoptose

In der Regulation immunologischer Prozesse kommt dem Transkriptionsfaktor NFκB eine bedeutende Funktion zu (siehe Abb. 1).

In unstimulierten Zellen liegt NFκB als inaktive Form, gebunden an IκB, im Zytoplasma vor. Durch rezeptorabhängige Stimuli wird der IKK-Komplex aktiviert. Der IKK-Komplex phosphoryliert IκB, wodurch eine Degradation des IκB erfolgt. Dies ermöglicht NFκB vom Zytoplasma in den Zellkern zu translozieren, dort an die κB-Promotersequenzen unterschiedlicher Gene zu binden und deren Transkription zu regulieren (20). So wird in Makrophagen und Monozyten, nach der Stimulation mit LPS, die Transkription einer Vielzahl an Genen u.a. IL-1, TNF-α und IL-8 (13, 24), zelldifferenzierender und chemotaktischer Faktoren über NFκB verstärkt. Weitere physiologische Stimuli sind TNF-α, Leukotrien-B4 und IL-2, die durch Bindung an ihre Rezeptoren NFκB in Makrophagen und Monozyten aktivieren (7, 73). Sowohl LPS als auch TNF-α sind Stimuli für die Expression von Chemokinen, die über NFκB reguliert werden. Die Expression einzelner Chemokine über die Regulation von NFκB scheint von dem jeweiligen Stimulus abhängig zu sein. TNF-α induziert die Expression von CC- und CXC-Chemokinen, während die Stimulation mit LPS allein zu einer gesteigerten Expression der CC-Chemokine führt (24).

Eine Vielzahl von Bakterien sind in der Lage NFκB in Makrophagen zu aktivieren. Dazu zählen unter anderem: *Mycobacterium tuberculosis*, *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria gonorrhoeae* (20) und *Yersinia enterocolitica* (84).

Neben der Modulation inflammatorischer Prozesse ist NFκB eng mit der Regulation antiapoptotischer Proteine (TRAF2, cIAP-1 und bcl<sub>xL</sub> ...) verknüpft (20).

Für Monozyten-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass in *C. pneumoniae* infizierten Zellen unter NFκB-Regulation das antiapoptotische Protein cIAP-2 vermehrt exprimiert wird (104). Ebenfalls konnte NFκB in einem akuten und chronischen Lungeninfektionsmodell mit *C. pneumoniae* in AM und alveolären Epithelzellen nachgewiesen werden (30).

In der Apoptoseregulation werden die extrinsischen Signaltransduktionswege (Aktivierung des Caspasen-Systems) von den intrinsischen Signaltransduktionswegen

(mitochondriale Apoptose) differenziert, die jedoch zahlreiche Verknüpfungspunkte untereinander aufweisen.

Die wichtigste Effektor-Caspase stellt die Caspase 3 dar. Sie schneidet Proteine des Zytoskeletts, nukleäre Matrixproteine, Regulatoren des DNA-Reparatursystems und Enzyme des RNA-Splicing (U1 assoziiertes 70 kDa Protein) (83).

Die mitochondriale Apoptose wird über Proteine der Bcl-2 Familie reguliert, die in Proteine mit pro- und antiapoptotischer Aktivität unterteilt werden können. Zu den Inhibitoren der Apoptose werden u.a. Bcl-2 und Bcl-x gezählt, zu den Triggern der Apoptose gehören die sog. „BH3-only Proteine“, Bax, Bak und Bok(5).

Sowohl die pro- als auch die antiapoptotischen Proteine fungieren als Membrankanäle, über die der Efflux von Cytochrom c aus dem intermembranösen Spalt der Mitochondrien ins Zytoplasma kanalisiert wird. Cytochrom c initiiert die Aktivierung der Effektor-Caspase 3. Bcl-2 wirkt aufgrund der Inhibition der Cytochrom c-Freisetzung durch die Sequestrierung der BH3-only-Proteine und der Inaktivierung der autokatalytischen Aktivität der intermembranös lokalisierten Caspase 3 antiapoptotisch (39).

Bei bakteriellen und viralen Infektionen kann die Apoptose der Wirtszellen einen positiven oder einen negativen Einfluss auf die Eradikation des Pathogens ausüben. Die Apoptose von Abwehrzellen bei extrazellulären Infektionen verursacht eine Schwächung des Wirtes (11).

Die Induktion der Apoptose stellt für Bakterien einen energetisch günstigen Weg dar, um den eukaryontischen Wirt ohne begleitende Entzündungsreaktion anzugreifen. Meist wird dabei in den professionellen Phagozyten (z. B. neutrophile Granulozyten und Makrophagen) Apoptose induziert, da diese für extrazelluläre Bakterien die größte Bedrohung darstellen (113). Auch Chlamydien, als obligat intrazelluläre Erreger, beeinflussen die Apoptoseregulation der Wirtszellen. So konnte gezeigt werden, dass *C. trachomatis* direkt die zelluläre Apoptose inhibieren kann, um den intrazellulären Entwicklungszyklus vollständig abschließen zu können. Die antiapoptotische Aktivität der Chlamydien ist abhängig von dem Wachstum des Pathogens, nicht jedoch von der metabolischen Funktion der Wirtszelle (32). Im Gegensatz dazu konnten bei der Spezies *C. psittacii* apoptoseinduzierende Mechanismen in Epithel- und Makrophagen-Zelllinien nachgewiesen werden (75).

Bei *C. pneumoniae* beobachtete man bei *in-vitro*-Untersuchungen, dass die Bakterien, abweichend vom normalen Entwicklungszyklus, bis zu mehreren Tagen in einer metabolisch inaktiven Form in humanen Monozyten überleben können (2). So konnte in mehreren Zelllinien eine Inhibition der Apoptose durch *C. pneumoniae* beobachtet werden, darunter Epithelzellen (4, 33, 80), Monozyten (37, 103), Makrophagen-Zelllinie U937 (4) und neutrophile Granulozyten (110). Die zur Apoptoseinhibition führenden Mechanismen konnten bislang nicht eindeutig geklärt werden und variieren in den Studien. Diskutiert wird der Einfluss der beiden zentralen Signalwege der Apoptoseregulation: der intrinsische Weg mit Zytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien (4, 33, 80) und der extrinsische Weg mit nachfolgender Aktivierung von NF $\kappa$ B (103).

## **1.6 Proinflammatorische Faktoren in der Immunabwehr**

TNF- $\alpha$ , der hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten gebildet wird, zählt zu den wichtigsten Zytokinen der Entzündungsreaktion. Seine Bedeutung wird dadurch unterstrichen, dass nahezu alle nukleären Zellen über funktionelle TNF-Rezeptoren verfügen (9, 91). Über den zellmembrangebundenen TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1, p55) werden intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt, die letztendlich v.a. in der Aktivierung der beiden Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und c-Jun, münden (21). Die Wirkungen von TNF- $\alpha$  unterscheiden sich in Abhängigkeit der freigesetzten Konzentration. Bei hohen systemischen Dosen kann ein Schockgeschehen ausgelöst werden. Im Rahmen chronisch entzündlicher Prozesse waren insgesamt niedrige systemische Konzentrationen nachweisbar (9).

Insbesondere in der Abwehr von Infektionen durch intrazelluläre Erreger (z. B. Chlamydien, Listerien und Mykobakterien) nimmt TNF- $\alpha$  einen besonderen Stellenwert ein (109). Frühere Studien konnten zeigen, dass die Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in AM- und Monozyten-Zelllinien durch die Infektion mit *C. pneumoniae* über 24 h signifikant erhöht wird (48, 82). Die funktionelle Relevanz dieser Ergebnisse wurde durch den Nachweis des Einflusses von TNF- $\alpha$  auf das Wachstum von *C. pneumoniae* in AM erbracht. Durch eine Neutralisierung von TNF- $\alpha$  mittels anti-TNF-

Antikörpern in Zellkulturen konnte eine signifikant erhöhte Anzahl an infizierten Zellen nachgewiesen werden (45).

TNF- $\alpha$  kommt in Ergänzung zu seiner inflammatorischen Funktion eine wichtige Rolle in der Apoptoseregulation zu. TNF- $\alpha$  besitzt die Funktion, Apoptose sowohl initiieren als auch inhibieren zu können. Der TNF- $\alpha$  Rezeptor-1 (p55) verfügt über eine sog. intrazelluläre Todesdomäne (47). Über verschiedene Adaptermoleküle kann über diese Todesdomäne die Caspasenkaskade aktiviert und die Apoptose induziert werden (21,91). Daneben kann TNF- $\alpha$  über Adaptermoleküle mit den antiapoptotischen Proteinen cIAP-1 und cIAP2 interagieren (21) und die Aktivierung von NF $\kappa$ B initiieren.

Gleichzeitig spielt IL-1 $\beta$  eine wichtige Rolle in der Verknüpfung von Apoptose und Inflammation. Eine Überexpression des Interleukin-1-Converting Enzyme (ICE) in Zellen führt über die Aktivierung von Caspase 3 (39) zu erhöhten Apoptoseraten. Zudem konnte eine vermehrte Freisetzung von IL-1 $\beta$  in apoptotischen Zellen nachgewiesen werden (35). IL-1 $\beta$  selbst wirkt über seinen Rezeptor antiapoptotisch auf Zellen. Die Signaltransduktion erfolgt über die Aktivierung von NF $\kappa$ B (72). In Zellkulturen isolierter humaner Monozyten konnte durch die Addition von rekombinantem IL-1 $\beta$  die Rate der Spontanapoptose signifikant reduziert werden (63).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung der Regulation pro- und antiinflammatorischer Faktoren in *C. pneumoniae*-infizierten Alveolarmakrophagen und Blut-Monozyten im Vergleich lungengesunder rauchender Probanden mit COPD Patienten.

Dabei ergaben sich folgende Fragstellungen:

1. Charakterisierung der Transkription proinflammatorischer Faktoren des TNF-Signalweges (ICE, TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B) bei einer Infektion von humanen Alveolarmakrophagen und Monozyten gesunder rauchender Probanden mit *C. pneumoniae*.
2. Charakterisierung der Zytokinsekretion proinflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-8 und TNF- $\alpha$ ) bei der Infektion von humanen Alveolarmakrophagen und Monozyten gesunder rauchender Probanden mit *C. pneumoniae*.
3. Charakterisierung *C. pneumoniae* induzierter Immunantworten in Alveolarmakrophagen und Monozyten von COPD Patienten.

## 2. Material

### 2.1 Geräte

- Brutschrank: Cell House 200 Heto
- Bunsenbrenner Gasi Schütt
- Combs for Mini Sub Cell Electrophoresis BIO RAD
- Counter AC 8 Assistant
- Cytofunnel Shandon
- Cytozentrifuge: Cytospin 2 Shandon
- Cytozentrifuge: Cytospin 3 Shandon
- Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 Kodak
- ELISA Reader SLT340 ATTC SLT Instruments
- Filtercards for Cytofunnel thick samples 0,5 ml Shandon
- Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20 Zeiss
- ISO Pack  $-21^{\circ}\text{C}$  für Isothermsystem Eppendorf
- Kühlzentrifuge: Rotina 3 Hettich
- Magnetrührer IKA MAO RCT IKA
- Microcomputer Electrophoresis Power Supply Consort E 702 und E 722 Fröbel
- Mikrowelle Panasonic
- Minifuge: Micro V Fisher Scientific
- Minishaker MS 1 IKA
- Neubauer Zählkammer Assistent
- Omifuge 2.0 RS Heraeus
- Peltier Thermocycler: PTC 200 Biozym
- pH Meter WTW
- Pipetten: Eppendorf Reference<sup>®</sup> Eppendorf
- Reine Werkbank: Class II A / B3 Nuair
- Reine Werkbank: Hera Safe Heraeus
- Rocky Fröbel
- Safe lock Tubes 2,0 ml Eppendorf

- sterile Filtereinheiten
  - Disc 0,2 µm FP 30/ 0,2 Schleicher und Schuell
  - Stericup 0,22 µm 250 ml SCGVUO2RE Milipore
- UV Haube: Cleane Cab Herolab
- Vibrofix VF1 Electronic Janke und Künkel
- Waage: AG 204 Delta Range® Mettler
- Auswertungs- und Dokumentationssoftware:
  - Adobe Photoshop 5.5
  - Kodak Digital Science 1D 2.0
  - TINA 2.0 (PCBAS20)
  - Microsoft Office Excel 2007

## 2.2 Chemikalien und sonstige Materialien

### 2.2.1 Kultivierung und Stimulation der Alveolarmakrophagen und Monozyten

Die Isolierung der Monozyten aus EDTA-Blut erfolgte mittels Histopaque 1119 der Firma Sigma zur Dichtegradientenzentrifugation. Um die Monozytenfraktion zu waschen, wurde RPMI-Medium 1640 der Firma Gibco verwendet, das mit 5% fetalem Kälberserum (FCS) versetzt war. Die Kultivierung und Stimulierung der Alveolarmakrophagen und Monozyten erfolgte mittels RPMI-Medium 1640 (Gibco), das mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin angereichert war.

Stimulationsreagenzien:

- *C. pneumoniae*: Stamm CWL-029 (ATCC VR-1310)
- Staurosporin 95% (HPLC) Sigma
- humanes rekombinantes TNF- $\alpha$  R&D Systems
- Lipopolysaccharid (E. coli Serotyp 026:B6) Sigma

Einwegmaterialien

- 6 Well Zellkultur Testplatte TPP
- 24 Well Zellkultur Testplatte TPP
- sterile Stabpipetten Greiner und Sarstedt

- autoklavierte Pipettenspitzen Greiner
- 2.2.2 Pappenheim- und Trypanblau-Färbungen
- Trypanblau 0,4% Sigma
  - Maywald Grünwald Reagenz Merck
  - Giemsa Reagenz Merck
  - Objektträger Superfrost 76 x 26 mm Menzel
  - Deckgläschen 20x20 mm Menzel
- 2.2.3 Annexin-V-FITCS-Färbungen
- eiskaltes 1x PBS Dulbecco´s Gibco
  - 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube 12x75 mm Falcon
  - blaue Pipettenspitzen Greiner
  - Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit II Pharmingen
  - Eindeckmedium IMAGEN™ DAKO
  - Objektträger Superfrost 76x26 mm Menzel
  - Deckgläschen 20x20 mm Menzel
- 2.2.4 Chlamydienfärbungen
- Immunfluoreszenz Test IMAGEN™ DAKO
- 2.2.5 Life/Dead-Färbungen Molecular Probes
- Ethidium Homodimer -2: 1 mmol/l Solution in DMSO
  - SYTO® 16 green fluorescent nucleic acid stain 1 mmol/l Solution in DMSO
- 2.2.6 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurde der kommerziell erhältlichen Kit: NucleoSpin® RNA II der Firma Macherey–Nagel verwendet

Zusätzliche Chemikalien und Materialien:

- steril filtriertes Ethanol (pro analysis) Merck
- β Mercaptoethanol for Molecular Biology Sigma



Als Ladepuffer wurde eine Bromphenolblau Lösung verwendet:

- Bromphenolblau 0,25%
- Saccharose 40%

- |  |              |
|--|--------------|
| • MetaPhor Agarose                               | Biozym       |
| • 100 bp DNA Ladder 1 µg/µl                      | Invitrogen   |
| • Aqua Spüllösung Steril und pyrogenfrei         | Delta Select |
| • SYBR®Green nucleic acid gel stain 10,000x      | MoBiTec      |
| • Mini Sub Cell GT System                        | BIO RAD      |
| • Mini Gel Tray 7x 10 cm und 7 x 7 cm            | BIO RAD      |
| • Gel Caster for Mini Sub Cell GT System         | BIO RAD      |
| • Safe seal Tipps premium 10 µl; 100 µl; 1000 µl | Biozym       |
| • PCR – Tubes 0,5 ml thin walled                 | Eppendorf    |

#### 2.2.10 ELISA

Für die Proteinbestimmung mittels der ELISA Methode wurden folgende Assays verwendet:

- |  |             |
|--|-------------|
| • CYTOscreen™ TNF.α ELISA Kit                  | Biosource   |
| • DuoSet® ELISA Development System human IL-8  | R&D Systems |
| • CYTOscreen™ IL-1 RA ELISA Kit                | Biosource   |
| • DuoSet® ELISA Development System human MCP-1 | R&D Systems |
| • CYTOscreen™ IL-10 ELISA Kit                  | Biosource   |

### **3. Methoden**

#### **3.1 Anzucht von *C. pneumoniae***

Zur Anzucht der *C. pneumoniae* wurden HEp2-Zellen als Wirtszellen mit dem Referenzstamm CWL-029 (ATCC VR-1310) infiziert.

##### **3.1.1 Anzucht der HEp2-Zellen**

HEp2-Zellen entstammen einer humanen Karzinomzelllinie (ATCC No.CCC23) des Larynx. Sie wurden in Zellkulturflaschen mit modifiziertem MEM-Automedium für 3-4 Tage in einem Brutschrank bei 37°C unter einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Nach der Kultivierung konnten die Zellen mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche gelöst und kurz bei 4000 U/min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml Medium aufgenommen. Zur Reinigung erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 1000 U/min, der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet in 5 ml Medium aufgenommen.

Die Zellzahl der Zellsuspension wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Suspension auf eine Zellzahl von  $3-4 \times 10^5$ /ml eingestellt. Für die Infektion mit *C. pneumoniae* wurden die HEp2-Zellen in einer 6-Well-Platte für 24 h bei 37°C bei 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

##### **3.1.2 Infektion der HEp2-Zellen mit *C. pneumoniae***

Der frisch ausgesäte Zellrasen aus HEp2-Zellen wurde mit *C. pneumoniae* für 3 Tage infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturplatte gelöst und in ein steriles Greiner Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit kleinen sterilen Glaskugeln versetzt und durch vortexen mechanisch zerstört. Die so freigesetzten Chlamydien wurden auf einen frischen HEp2-Zellrasen beimpft und für 45 min bei 3500 U/min bei 35°C zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Mediumüberstandes wurde frisches Infektionsmedium, das mit 1 mg/ml Cycloheximid versetzt war, zugegeben. Nach Bestimmung von Infektionsraten > 80% des Zellrasens wurden die infizierten Zellen aliquotiert und eingefroren bzw. zur weiteren Passagierung verwendet.

### 3.1.3 Chlamydienfärbungen

Die Infektionsraten der mit *C. pneumoniae*-infizierten Zellen wurden durch eine direkte Immunfluoreszenz-Färbung mit dem Test IMAGEN™ der Firma Dako ermittelt. Durch die Anfärbung des chlamydialen LPS werden intrazelluläre Elementar- und Retikularkörperchen hervorgehoben.

Die auf einem Deckgläschen adhären, infizierten Zellen wurden mit 70%iger kalter Methanollösung für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS-Puffer erfolgte die Anfärbung für 15 min bei 37°C unter Lichtausschluss. Dazu wurden 10 µl der Färbelösung, die einen monoklonalen, an Fluorescein-Isothiocyanat konjugierten Chlamydienantikörper enthält, auf das Deckgläschen aufgebracht. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS konnten die angefärbten Deckgläschen mit wenigen Tropfen Eindeckmedium auf Objektträger aufgetragen werden.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mikroskopisch unter Fluoreszenzlicht bei 450 nm. Für die Bestimmung der Infektionsraten wurden die intrazellulär gelegene hellgrünen Retikularkörperchen und Elementarkörperchen ausgezählt.

## 3.2 Bronchoskopie und Gewinnung der bronchoalveolären Lavage

Die Gewinnung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) erfolgte im Rahmen von Bronchoskopien, die während des stationären Aufenthaltes der Patienten (n=4) mit einer COPD in der Haupt- oder Nebendiagnose notwendig wurden, als auch von freiwilligen rauchenden Probanden ohne akute oder chronische Atemwegserkrankungen (n=7). Der Ethikantrag (Ethikkommission Universität Lübeck 01-084) wurde überprüft und akzeptiert. Die Bronchoskopie wurde mit einem flexiblen Fiberglas-bronchoskop durchgeführt. Die Patienten wurden mit Midazolam und Fentanyl i.v. sowie einer Lokalanästhesie mit 2%iger Lidocainlösung prämediziert. Für die Gewinnung der BALF wurde 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung fraktioniert in Wedgeposition in das Mittellappensegment instilliert und sofort wieder langsam aspiriert. Auf eine ausreichende Recovery wurde geachtet.

### **3.3 Aufarbeitung und Aufreinigung der bronchoalveolären Lavage**

Die in der bronchoalveolären Lavage gewonnene Flüssigkeit wurde zunächst über eine sterile Gaze filtriert, um grobe muköse Bestandteile zu separieren. Zur Aufreinigung der Zellen wurde das Filtrat für 10 min bei 900 U/min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abdekantiert. Die Aufnahme des Pellets erfolgte in RPMI-1640-Medium, welches mit 10% FCS und 1% Glutamin sowie 1% Penicillin/Streptomycin versetzt war.

Die homogene Zellsuspension wurde zur Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Zelldifferenzierung eingesetzt.

#### **3.3.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl**

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer mit 10 µl Zellsuspension beschickt. Unter einem Mikroskop wurde dann unter einer 400-fachen Vergrößerung im Phasenkontrast 1 Eckquadrat ausgezählt.

|  |
|--|
| <p style="text-align: center;"><b>Gesamtzellzahl / ml = n x 10000 x Vol. der Zellsuspension (in ml)</b><br/><b>n= Anzahl der in einem Eckquadrat ausgezählten Zellen</b></p> |
|--|

#### **3.3.2 Differenzierung der Zellen**

Aus der Zellsuspension wurde nach kurzem vortexen ein Zytoprin Präparat hergestellt. 100 µl der Zellsuspension wurden zur Gewinnung des Zytopräparates eingesetzt und für 5 min bei 700 U/min zentrifugiert. Nach Lufttrocknung der Objektträger erfolgte anschließend die Anfärbung der Zellen nach der Methode von Pappenheim:

- 3 min May Grünwald Konzentrat
- kurzes Wässern
- 15 min in 12%iger GiemsaLösung
- kurzes Wässern

Mikroskopisch wurden (Vergrößerungen: Okular 10x; Objektiv 63x unter Ölimmersionslösung) 400 Zellen nach Differenzierung der Zelltypen ausgezählt und der prozentuale Anteil der einzelnen Fraktionen ermittelt.

### 3.3.3 Vitalitätstestung der Zellen mit Trypanblau-Färbung

Um die Vitalität der Zellen zu ermitteln, wurden die Zellen mit 0,4%iger Trypanblau-Lösung angefärbt. Bei avitalen Zellen kann der Farbstoff durch die Zytoplasmamembran diffundieren und die Zellen blau anfärben, während die vitalen Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen. 10 µl Zellsuspension wurden auf einem Objektträger mit 10 µl Trypanblau vorsichtig mit einer Pipettenspitze gemischt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Im Phasenkontrast wurden bei einer 400-fachen Vergrößerung 400 Zellen mikroskopisch ausgezählt und der Anteil der vitalen Zellen berechnet.

$$\text{Anzahl der vitalen Alveolarmakrophagen in der Zellsuspension} \\ = n \text{ Ges.} \times (\text{Diff} / 100) \times (\text{Vit}/100)$$

- n Ges. : Gesamtzellzahl in der BAL  
Diff. : prozentualer Anteil der AM in der BAL  
Vit. : prozentualer Anteil der vitalen AM

### 3.4 Isolierung der Blutmonozyten aus EDTA Blut

Die Monozyten konnten aus 36 ml EDTA-Blut mittels der Dichtegradientenzentrifugation mit Histopaque<sup>®</sup> isoliert werden. Nach einem Waschschriff mit 1640-RPMI-Medium + 5% FCS wurden die Zellen in 10 ml RPMI Kulturmedium aufgenommen. Die Arbeitsanleitungen zur Bestimmung der Zellzahl, der Zelldifferenzierung und Vitalität entsprechen 3.3.1-3.3.3.

### 3.5 Stimulationsprotokolle

Die humanen AM und isolierten Blut-Monozyten wurden für die MPCR-Versuche in 6-Well-Zellkultur-Platten kultiviert, für die ELISA-Ansätze und immunhistochemischen Färbungen in 24-Well-Zellkultur-Platten.

Für die MPCR-Versuche wurden 500.000 Zellen pro Well eingesetzt, für die ELISA und Färbungen 200.000 Zellen pro Well. Zur Separierung der AM und Monozyten der nichtadhärenten Lymphozyten/Granulozyten wurde das Medium der Zellkulturen nach einer Adhärenzzeit von 2 h entfernt und die Zellen nachfolgend stimuliert.

Schema für die 6 Well Zellkultur Platten:

|                               | Medium       | CWL         | TNF- $\alpha$ * <sup>1</sup> | LPS* <sup>2</sup> |
|-------------------------------|--------------|-------------|------------------------------|-------------------|
| Medium                        | 3000 $\mu$ l | -           | -                            | -                 |
| CWL 2 x10 <sup>7</sup> IFU/ml | 2700 $\mu$ l | 300 $\mu$ l | -                            | -                 |
| TNF- $\alpha$ 40 ng/ml        | 2940 $\mu$ l | -           | 120 $\mu$ l                  | -                 |
| LPS 1 $\mu$ g/ml              | 2970 $\mu$ l | -           | -                            | 30 $\mu$ l        |

Schema für die 24 Well Zellkultur Platten:

|                               | Medium      | CWL        | TNF- $\alpha$ * <sup>1</sup> | LPS* <sup>2</sup> |
|-------------------------------|-------------|------------|------------------------------|-------------------|
| Medium                        | 600 $\mu$ l | -          | -                            | -                 |
| CWL 2 x10 <sup>7</sup> IFU/ml | 540 $\mu$ l | 60 $\mu$ l | -                            | -                 |
| TNF- $\alpha$ 40 ng/ml        | 588 $\mu$ l | -          | 24 $\mu$ l                   | -                 |
| LPS 1 $\mu$ g/ml              | 594 $\mu$ l | -          | -                            | 6 $\mu$ l         |

\*<sup>1</sup> Volumen TNF- $\alpha$  Gebrauchslösung

\*<sup>2</sup> Volumen LPS Gebrauchslösung

Konzentrationen der Stimulationsreagenzien:

|               | Stammkonz.    | 1. Verd.<br>(Gebrauchslsg.) | 2. Verd.<br>(Platte) | Endkonz.<br>im Well |
|---------------|---------------|-----------------------------|----------------------|---------------------|
| TNF- $\alpha$ | 10 $\mu$ g/ml | 1:10                        | 1:25                 | 40 ng/ml            |
| LPS           | 500 mg/ml     | 1:5                         | 1:100                | 1 $\mu$ g/ml        |

Nach Anwärmen des Mediums auf 37°C im Wasserbad wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C unter einer CO<sub>2</sub> Atmosphäre von 5% inkubiert. Die Induktion der Apoptose mit Staurosporin (1  $\mu$ mol/l) erfolgte 3 h nach der Chlamydieninfektion.

### 3.6 Färbungen

Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die folgenden Färbungen zur Bestimmung der Vitalität, Kernmorphologie und dem Nachweis apoptotischer Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden dazu zunächst von den Zellkulturplatten gelöst und in 1x PBS aufgenommen.

### 3.6.1 Trypanblau-Färbungen

Die Färbungen erfolgten, wie unter 3.3.3 beschrieben.

### 3.6.2 Life/Dead-Färbungen

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen nach den Stimulationen wurde das zweifarbige Fluoreszenz-Kit: Life/Dead-Färbung (Molecular Probes®) mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO® green 16 nucleic acid stain und dem Ethidium-Homodimer 2 verwendet. SYTO® green 16 nucleic acid-Färbung besitzt eine hohe Affinität zur DNA in vitalen Zellen mit intakter Zellmembran, die sich nach Anfärbung unter einer UV-Fluoreszenz hellgrün darstellen. Im Gegensatz hierzu färbt das unter UV-Licht rot fluoreszierende Ethidium-Homodimer 2 nur avitale Zellen mit kompromittierter Zellmembran an.

Die Zellen wurden herunter zentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl PBS-Färbelösung, die mit jeweils 1 µl der Farbstoffe versetzt wurde, aufgenommen und für 1 h unter Lichtausschluss inkubiert. Nach der Färbung erfolgten zwei Waschschritte mit PBS-Pufferlösung und das gereinigte Zellpellet wurde in 200 µl Pufferlösung aufgenommen. Aus der gewonnenen Zellsuspension wurden Zytospin-Präparate hergestellt, die im Anschluss für 10 min mit 1%igem Paraformaldehyd fixiert wurden. Die Auswertung der Präparate wurde mikroskopisch unter UV-Fluoreszenz durchgeführt: vitale Zellen stellten sich in einer hellgrünen Fluoreszenz dar, avitale Zellen in einer leuchtend roten Fluoreszenz.

### 3.6.3 Pappenheim-Färbungen

Die Arbeitsabläufe wurden wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt.

### 3.6.4 Annexin-V-FITC-Färbungen

Die Färbung erfolgte mit dem Bindungsprotein Annexin, das an Fluoresceinthiocyanat (FITC) konjugiert ist. Annexin lagert sich in Anwesenheit von Calciumionen an das externalisierte Phosphatidylserin apoptotischer Zellen an. Es stellt eine frühe Phase der Apoptose dar, in der die Zytoplasmapermeabilität noch intakt ist und noch keine DNA-Fragmentierungen oder Chromatin-Kondensationen zu beobachten sind.

Unter UV-Fluoreszenz leuchten die Annexin-positiven Zellen hellgrün. Gleichzeitig erfolgte eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid, das in nekrotischen Zellen den Kern anfärbt. Die Propidiumiodid-positiven Zellen leuchten unter UV-Fluoreszenz hellrot auf. In spätapoptotischen Phasen kann neben der Propidiumiodid-Färbung eine Anfärbung des Zytoplasmas mit Annexin-V-FITC auftreten (57, 99).

Die in PBS aufgenommenen Zellen wurden für 5 min bei 1100 U/min zentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl Annexin-Bindungspuffer resuspendiert. Zur Anfärbung wurden 5 µl Annexin-Farbstoff und 3,5 µl Propidiumiodid-Farbstoff hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden weitere 100 µl Annexin-Bindungspuffer beigefügt. Aus der angefärbten Zellsuspension wurden Zytospinpräparate angefertigt. Mikroskopisch wurden unter einer 630-fachen Vergrößerung 400 Zellen nach Apoptose, Nekrose, spätapoptotischer Phase und lebenden Zellen (Zellen ohne Fluoreszenz) unter UV-Fluoreszenzlicht ausgezählt. Aus der so ermittelten Anzahl lebender, apoptotischer, spätapoptotischer und nekrotischer Zellen wurden die prozentualen Anteile der einzelnen Fraktionen aus der Gesamtzellzahl ermittelt.

### **3.7 Molekulargenetische Untersuchungen**

#### **3.7.1 Besondere Anforderungen bei der Arbeit mit RNA und DNA Material**

Wichtig bei dem Umgang mit RNA ist der Umstand, dass biologisches Material ubiquitär RNA-spaltende Ribonucleasen (RNasen) enthält. Neben der Beachtung der Sterilität wurden folgende Maßnahmen getroffen, um Kontaminationen zu vermindern bzw. die Aktivität der RNasen zu verringern:

- Räumliche Trennung der RNA-Aufbereitung
- Alle Materialien und Geräte wurden direkt vor Beginn der Versuche für 15-20 min unter einem PCR-Kabinett mit UV-Licht bestrahlt.
- Die einzelnen Versuchsschritte wurden unter dem PCR-Kabinett ausgeführt.
- Alle Reagenzien und Probenmaterialien wurden während der Versuche bei 4°C aufbewahrt und verwendet.

Außerdem wurde auf die Verwendung von Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern geachtet, um eine Kontamination der Proben mit DNA / RNA über die Pipetten zu vermeiden.

### 3.7.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung der totalen RNA erfolgte mit dem Kit NucleoSpin® RNA II der Firma Macherey–Nagel. Die RNA-Isolierung beruht auf dem Prinzip der Adhäsionschromatographie an Oligo dT Cellulose.

Nach der Inkubationszeit wurden 2 ml Überstand der stimulierten Zellkulturen mit einer Pipette abgenommen. Die Zellen wurden mittels Zellschaber vorsichtig vom Boden gelöst, mit einer Pipette resuspendiert und in Safe Lock-Tubes überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (2000 U/min für 5 min), bei dem die Zellen vom restlichen Medium getrennt wurden. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und verworfen. Das Zellpellet wurde in 350 µl RA-1 Puffer aus dem RNA-Kit gelöst und mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Die Zellen wurden bei -70°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Die weitere Isolierung der totalen RNA erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers und wurde im Folgenden bei -70°C aufbewahrt.

### 3.7.3 cDNA-Synthese

Aus der isolierten totalen RNA wird durch Anlagerung von Oligo dT<sub>12-18</sub> Nucleotidprimern an das Poly-A Ende der mRNA und nachfolgender Strangverlängerung zunächst ein mRNA-DNA-Hybrid synthetisiert. Durch die Reverse-Transkriptase RNaseH<sup>-</sup> wird die RNA-Komponente des Hybrides hydrolysiert und ein DNA-Doppelstrang hybridisiert. Dieser Doppelstrang stellt die komplementäre Kopie der mRNA dar (100).

Reaktionsmix je Probe:

- 4 µl 5x First Strand Puffer (250 mmol/l Tris-HCl, 375 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl<sub>2</sub>)
- 2 µl 0,1 mmol/l DTT
- 1 µl 10 mmol/l dNTP Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- 1 µl RNase OUT®

|  | Stammkonz. | Verd. | Endkonz.    |
|--|------------|-------|-------------|
| 5x First Strand Puffer                       |            | 1:5   |             |
| MgCl <sub>2</sub>                            | 15 mmol/l  |       | 3 mmol/l    |
| KCl  | 375 mmol/l |       | 75 mmol/l   |
| Oligo dT <sub>12-18</sub> Primer             | 0,5 µg/l   | 1:20  | 0,025 µg/µl |
| DTT  | 0,1 mmol/l | 1:10  | 0,01 mmol/l |
| dNTPs  | 10 mmol/l  | 1:20  | 0,5 mmol/l  |
| RNase Out <sup>®</sup>                       | 400 U/µl   | 1:20  | 10 U/µl     |
| RNase – H <sup>-</sup> Reverse Transkriptase | 200 U/µl   | 1:20  | 10 U/µl     |

Der Deckel des Thermocyclers wurde vorgeheizt, um eine Kondensation der geringen Probenmengen im Deckel der PCR-Gefäße zu vermeiden. 10 µl totale RNA wurden mit µl Oligo pdT<sub>12-18</sub> versetzt, kurz aufgeschüttelt und in einer Minifuge (10000 U/min für 30 Sekunden) herunter zentrifugiert, um eine optimale Durchmischung zu erreichen. Im Thermocycler wurden die Proben für 10 min bei 70°C inkubiert.

Nach der Inkubationszeit erfolgte die Reposition der Proben in einen Eisblock und die Applikation von 8 µl Reaktionsmix zu jeder Probe. Wiederum wurden die Proben aufgeschüttelt und zentrifugiert. Im Thermocycler wurden die Reaktionsgemische für 2 min bei 42°C inkubiert und danach zu den Ansätzen je 1 µl der Reversen Transkriptase hinzugefügt.

Es folgten weitere Inkubationsschritte im Thermocycler:

- 50 min bei 42°C
- 15 min bei 70°C

Die synthetisierte cDNA wurde mit 10 µl der Aquaspüllösung auf 30 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und zur Aufbewahrung bei -70°C gelagert.

### 3.7.4 Multiplex PCR: humanes TNF-Signaling

Die Besonderheit einer Multiplex-PCR liegt in der Verwendung mehrerer Primer-Paare innerhalb eines PCR-Ansatzes. Dadurch können Interaktionen der Primer untereinander entstehen, die zu unspezifischen Ergebnissen führen (64). Es erfolgte

die Verwendung des Multiplex-PCR-Kits der Firma Maxim Biotech für den Nachweis der humanen TNF-Signaling-Gene: ICE, NF $\kappa$ B, TNF $\alpha$ , Bcl-2 und I $\kappa$ B. Als Standard (House keeping Gen) waren Primer für das Gen der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), einem Enzym der Glykolyse, enthalten. Es katalysiert die Oxidation und Phosphorylierung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3 Bisphosphoglycerat (101).

| Gen                 | Accession Nr. | Größe des Genoms | Größe des Amplikons |
|---------------------|---------------|------------------|---------------------|
| Human GAPDH         | M 33197       | 3149 bp          | 921 bp              |
| Human ICE           | M 87507       | 718 bp           | 658 bp              |
| Human TNF- $\alpha$ | M 1098        | 1628 bp          | 535 bp              |
| Human NF $\kappa$ B | M 62399       | 409 bp           | 409 bp              |
| Human Bcl-2         | X 06487       | 235 bp           | 235 bp              |
| Human I $\kappa$ B  | X 77909       | 569 bp           | 158 bp              |

Tabelle 1: Genom der verwendeten Primer nach der Angabe der Herstellerfirma

Zur Vermeidung einer ungenauen Anlagerung der Primer (Annealing) in der MPCR wurde ein Hot Start: 3 min bei 95°C ausgeführt, dies war insbesondere hinsichtlich der gleichzeitigen Verwendung von mehreren Primerpaaren wichtig.

### **MPCR Programm:**

|           |              |      |
|-----------|--------------|------|
| 2 Zyklen  | 1 min        | 96°C |
|           | 4 min        | 60°C |
| 29 Zyklen | 1 min        | 94°C |
|           | 2 min 30 sek | 60°C |
| 1 Zyklus  | 10 min       | 70°C |

Der Deckel wurde vorgeheizt, um eine Kondensation der geringen Probenmengen im Deckel zu vermeiden.

#### Pipettierschema: (je Reaktion):

2,5 µl cDNA

20 µl PCR Mix

5 µl Aqua dest.

2,5 µl TAQ DNA-Polymerase (nach Hot Start)

Der PCR-Mix setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

12,5 µl Puffer-Gemisch (Puffer, dNTPs, Enhancer)

2,5 µl Primer Gemisch

Die verwendete Taq DNA-Polymerase (isoliert aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) der Firma Invitrogen wurde vor der Zugabe 1:5 mit Aquaspül-Lösung verdünnt. Daraus ergab sich eine Endkonzentration von 0,08 U/µl.

Bei jedem PCR-Ansatz wurde jeweils eine Positiv-Kontrolle (im Kit enthalten) und eine Negativ-Kontrolle (Aqua dest.) mitgeführt.

#### 3.7.5 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden die amplifizierten DNA-Stücke aus der RT-PCR ihrer Größe nach aufgetrennt.

Es wurden 7 x 10 cm große Gele aus 1,5%iger MetaPhor® Agarose gegossen. Die MetaPhor® Agarose ist dadurch gekennzeichnet, dass DNA-Fragmente von 20-800 Basenpaare (bp) aufgetrennt werden können.

Um eine größtmögliche Homogenität der Agarose im Gel zu erreichen, wurde beim Lösen des Gel-Pulvers im TBE-Puffer auf eine Temperierung aller Substanzen und Materialien geachtet. Das Gelkolloid wurde in den Gel-Caster gegossen und der Kamm zur Abtrennung der Geltaschen eingesetzt. Das Aushärten der Gele erfolgte zunächst bei Raumtemperatur und anschließend in einer mit TBE-Puffer gefüllten feuchten Kammer bei 4°C.

Zum Einsatz in die Elektrophorese wurden zunächst 5 µl der PCR-Amplifikate mit 1 µl Ladepuffer versetzt. Die Positiv-Kontrolle wurde zunächst mit 0,5 x TBE-Puffer 1:5 verdünnt. Von der Verdünnung konnten 5 µl mit 1 µl Ladepuffer versetzt, in die Elektrophorese eingesetzt werden. Als Längenstandard erfolgte die Verwendung der 100 bp DNA-Leiter, die von der Herstellerfirma des MPCR-Kits mitgeliefert wurde. Die

gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte erfolgte bei 50 Volt für ca. 3,5 h in einer Elektrophoresekammer, die mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllt war, durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer 1:5000 verdünnten SybrGreen® nucleic acid stain Lösung für 30 min angefärbt. Da der Fluoreszenzfarbstoff unter Lichteinfluss instabil ist, erfolgte die Färbung in einer lichtundurchlässigen Styroporbox.

### 3.7.6 Auswertung der Gelelektrophorese

Die angefärbten Banden im Agarose-Gel wurden unter UV-Fluoreszenz mit einer digitalen Kamera photographiert. Mithilfe des Computer-Programmes TINA 2.0 erfolgte die Ermittlung der Helligkeitsintensitäten der Banden als integrierte optische Dichte pro Flächeneinheit (IOD/mm<sup>2</sup>). Das Hintergrundrauschen wurde durch Subtraktion der IOD des Hintergrundes des Gels von der IOD der Elektrophoresebanden berücksichtigt.

## 3.8. ELISA

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10 und IL-1RA erfolgte mittels ELISA (Enzym Linked-Immuno-Sorbent Assay) aus den Medium-Überständen der stimulierten Zellkulturen. Die Überstände aus 3 Wells wurden zunächst „gepoolt“, herunter zentrifugiert (3000 U/min) um eventuelle Zellreste zu separieren und aliquotiert. Die Aliquote wurden bei -70°C aufbewahrt.

Die Bestimmungen mit kommerziellen Kits erfolgten gemäß den beigefügten Arbeitsvorschriften.

## 3.9 Statistik

Zum Ausgleich von Zellzahldifferenzen in der MPCR erfolgte die Division der IOD-Werte der Banden der humanen TNF-Signaling-Gene (ICE, NF $\kappa$ B, TNF-, Bcl-2 und I $\kappa$ B) von den IOD-Werten der Banden des House keeping-Gens GAPDH zur semi-quantitativen Auswertung und wurden als relative Genexpression angegeben.

Um zwei verschiedene Stimulationen miteinander zu vergleichen, ohne jeweils die Mediumwerte in einer graphischen Darstellung abzubilden, setzten wir die Werte der relativen Genexpression der Stimulation in das Verhältnis zum Medium. Dies wurde als Ratio Stimulation / Medium in (%) angegeben.

In der Darstellung des Zeitvergleiches als auch in der Verwendung des Stimulationsmodells mit LPS-Vorstimulation wurden die Stimulationswerte zum Medium normalisiert (Differenz Stimulation-Medium), um das erhöhte Stimulationsniveau auszugleichen, ausgehend von der relativen Genexpression.

Die Berechnung signifikanter Unterschiede der Messwerte erfolgte Mithilfe des Student t-Test und Berücksichtigung einer Signifikanz bei  $p < 0,05$ .

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Validierung der Multiplex PCR

Zur Validierung der RT-Multiplex-PCR wurden die Ergebnisse einer Probe nach dreimaliger Durchführung nach dem entsprechenden Protokoll untereinander verglichen.

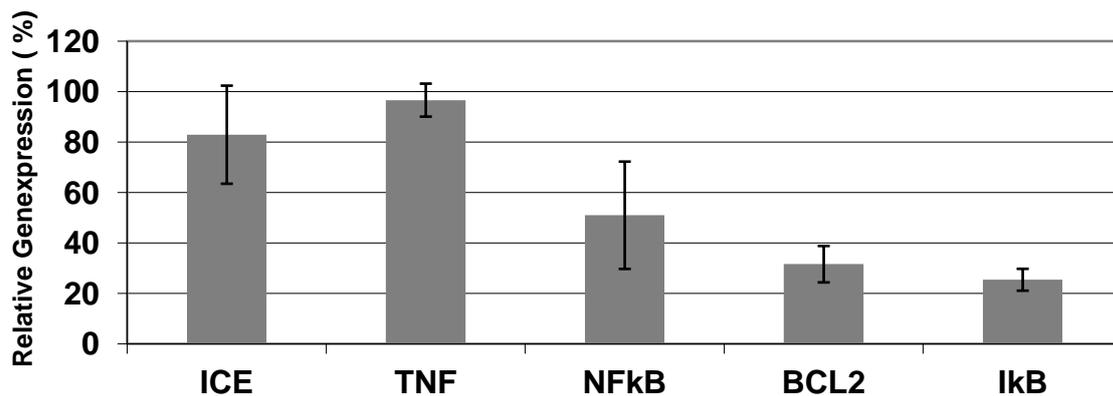


Abb. 2 Relative Genexpression: Validierung der MPCR für unstimulierte AM ( $10^7$  IFU/ml) (MW  $\pm$  Stabw; n=3)

Bei der Analyse für die mit *C. pneumoniae*-infizierten AM ( $10^7$  IFU/ml) 15 min p.i. ergaben sich folgende Standardabweichungen von den Mittelwerten:

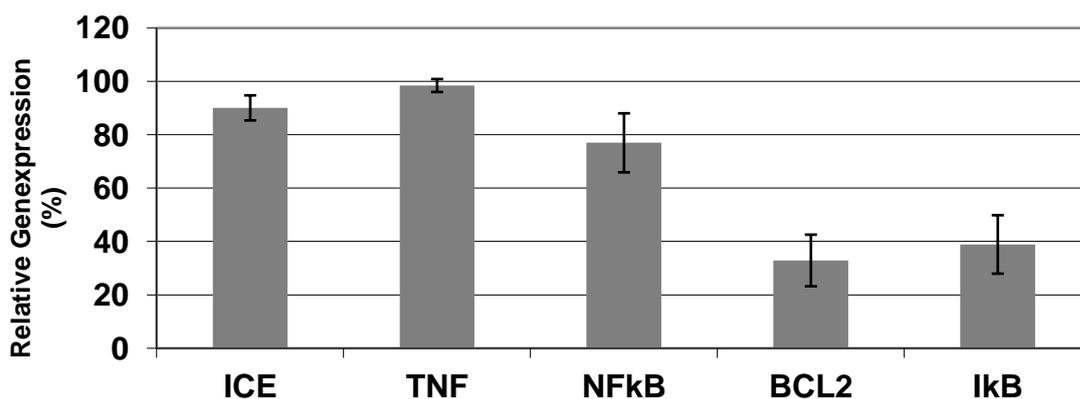


Abb. 3 Relative Genexpression: Validierung der MPCR für *C. pneumoniae* infizierte AM ( $10^7$  IFU/ml) 15 min p.i. (MW  $\pm$  Stabw; n=3)

## 4.2 Vorstimulation der Alveolarmakrophagen mit LPS

Um den Einfluss einer Endotoxin-Exposition auf die Induktion von Signalwegen durch *C. pneumoniae* zu untersuchen, wurden AM für 3 h mit LPS [1 µg/ml] vorstimuliert und dann für 15 bzw. 30 min mit *C. pneumoniae* ( $10^7$  IFU/ml) stimuliert. Nach einer Vorstimulation der AM mit LPS und anschließender Infektion mit *C. pneumoniae* für 15 min war eine deutlich verstärkte Expression der proinflammatorischen Marker ICE, TNF- $\alpha$  und NF $\kappa$ B im Vergleich zu AM ohne entsprechende Vorstimulation zu erheben.

I $\kappa$ B als physiologischer Gegenspieler zu NF $\kappa$ B zeigte keine Änderung zwischen den vorstimulierten und nicht vorstimulierten AM.

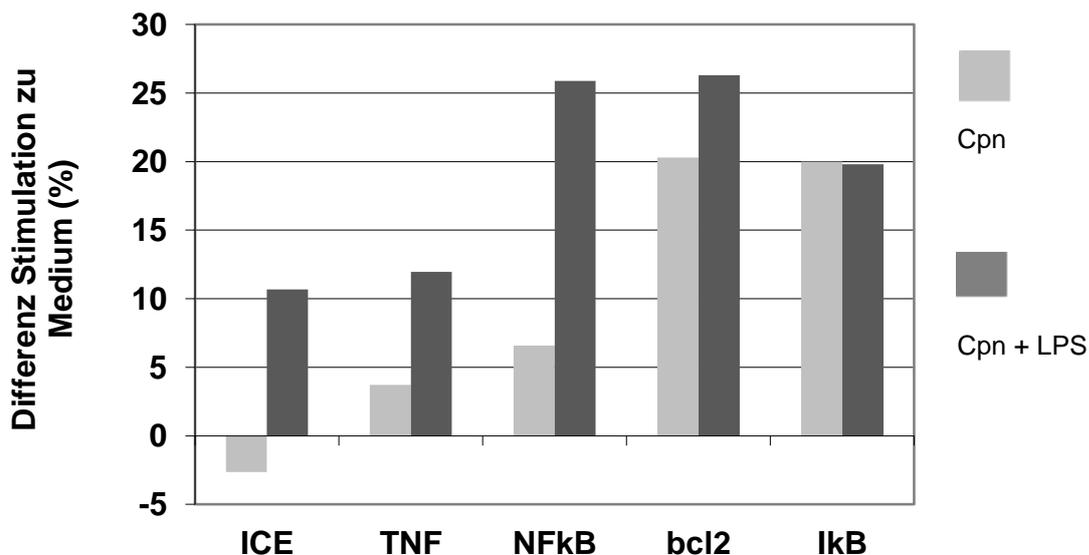
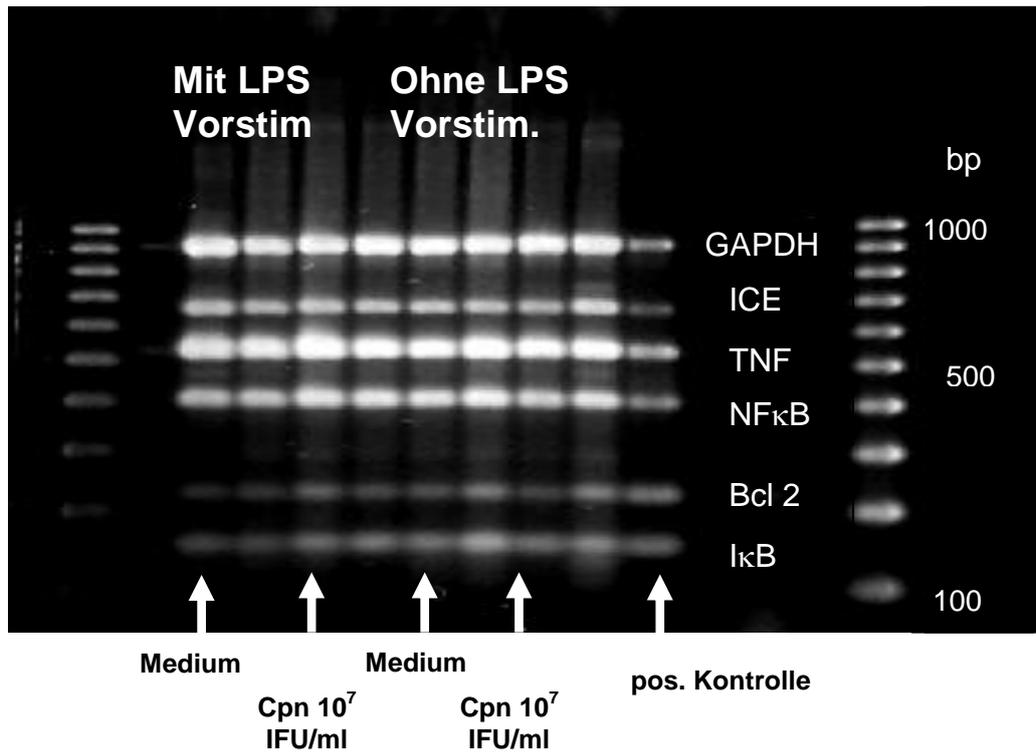


Abb. 4 Vergleich der Genexpression von ICE, TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B, Bcl-2 und I $\kappa$ B zwischen LPS vorstimulierten und nicht vorstimulierten humanen AM nach 15 min Stimulation mit *C. pneumoniae* ( $10^7$  IFU/ml). (relative Genexpression; n=1)

Nach Stimulation der AM mit *C. pneumoniae* über insgesamt 30 min zeigten die mit LPS vorstimulierten Zellen eine vermehrte Transkription von Bcl-2 und I $\kappa$ B. Die proinflammatorischen Marker ICE und NF $\kappa$ B zeigten nur geringgradig vermehrte transkriptionische Antworten bei den vorstimulierten Zellen. Für TNF- $\alpha$  konnte sogar ein Rückgang der Transkription im Vergleich zu den nicht vorstimulierten Zellen nachgewiesen werden.

a)



b)

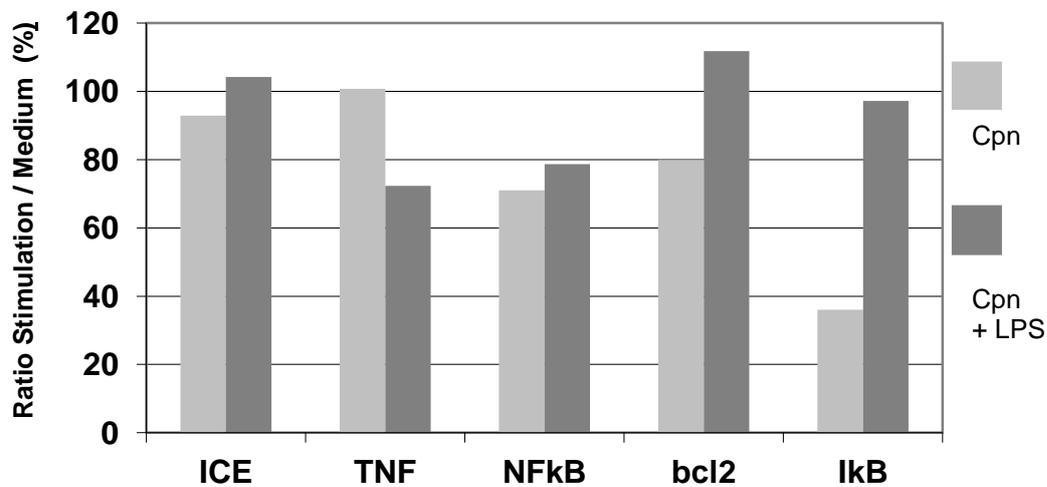


Abb. 5a/b Vergleich der Signaltransduktion zwischen LPS vorstimulierten und nicht vorstimulierten humanen AM nach 30 min Stimulation mit *C. pneumoniae*. a) Gel-Elektrophorese Blot der MPCR-Amplifikate (Größenangabe der Amplifikate in Basenpaaren (bp); repräsentatives Experiment), b) Ratio Stimulation/Medium (repräsentatives Experiment)

### 4.3 Infektionsraten humaner Monozyten nach Infektion mit *C. pneumoniae*

Die Bestimmung der Infektionsraten von Monozyten nach der Inkubation mit *C. pneumoniae* erfolgte nach 24 h.

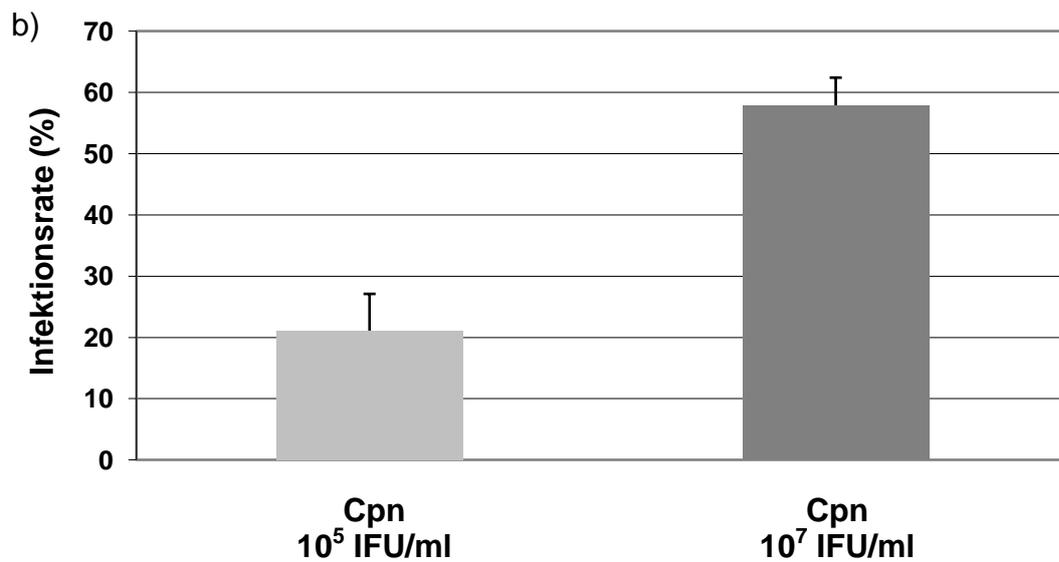
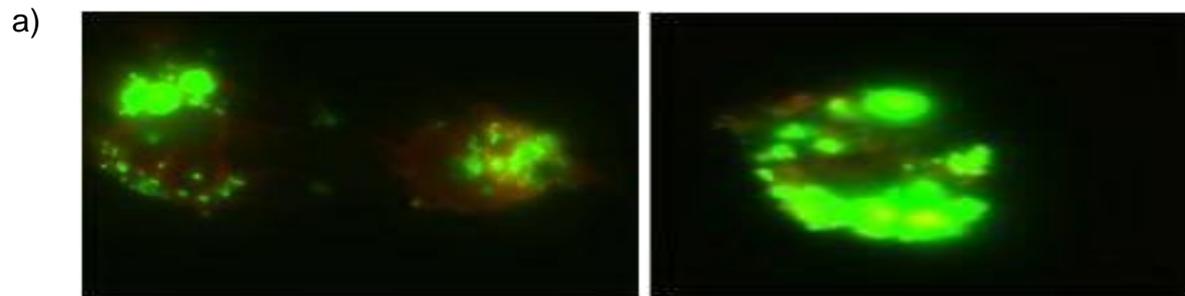


Abb. 6a/b Immunfluoreszenzfärbung und Quantifizierung der Infektionsraten humaner Monozyten nach Inkubation mit *C. pneumoniae* 24 h p.i. (MW  $\pm$  Stabw; n=8)

#### **4.4 Einfluss von *C. pneumoniae* auf die Genregulation signaltransduktorischer Faktoren humaner peripherer Blutmonozyten nach 30 min, 2 h und 24 h**

Zur Charakterisierung der pro- und antiinflammatorischer Signaltransduktion in peripheren Monozyten unter der Stimulation von *C. pneumoniae*, wurde die Transkription der Regulatorgene des TNF-Signaling Pathway ICE, TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B, Bcl-2 und I $\kappa$ B mittels einer Multiplex PCR zu 3 Zeitpunkten (30 min, 2 und 24 h) untersucht. Eine Stimulation mit LPS diente als Positiv-Kontrolle der Stimulation mit *C. pneumoniae* ( $10^7$  IFU/ml).

Nach einer Stimulations- bzw. Infektionszeit von 30 min mit *C. pneumoniae* konnte besonders für NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B und Bcl-2 eine verstärkte transkriptionelle Aktivität im Vergleich zu den unstimulierten Zellen dargestellt werden.

Für die proinflammatorischen Marker ICE und TNF- $\alpha$  zeigte sich im Vergleich zu den unstimulierten Zellen nur eine geringe Steigerung der Aktivität bei den *C. pneumoniae*-infizierten Zellen. Im Gegensatz hierzu war allerdings in der LPS-Stimulation eine vermehrte Genexpression von TNF- $\alpha$  zu beobachten.

Zusätzlich konnte im direkten Vergleich zwischen den Stimulationen mit *C. pneumoniae* und LPS eine leicht vermehrte transkriptionelle Aktivität für ICE und TNF- $\alpha$  bei den LPS-stimulierten Monozyten und eine deutlich gesteigerte Aktivität für NF $\kappa$ B und I $\kappa$ B bei den *C. pneumoniae*-stimulierten Zellen nachgewiesen werden.

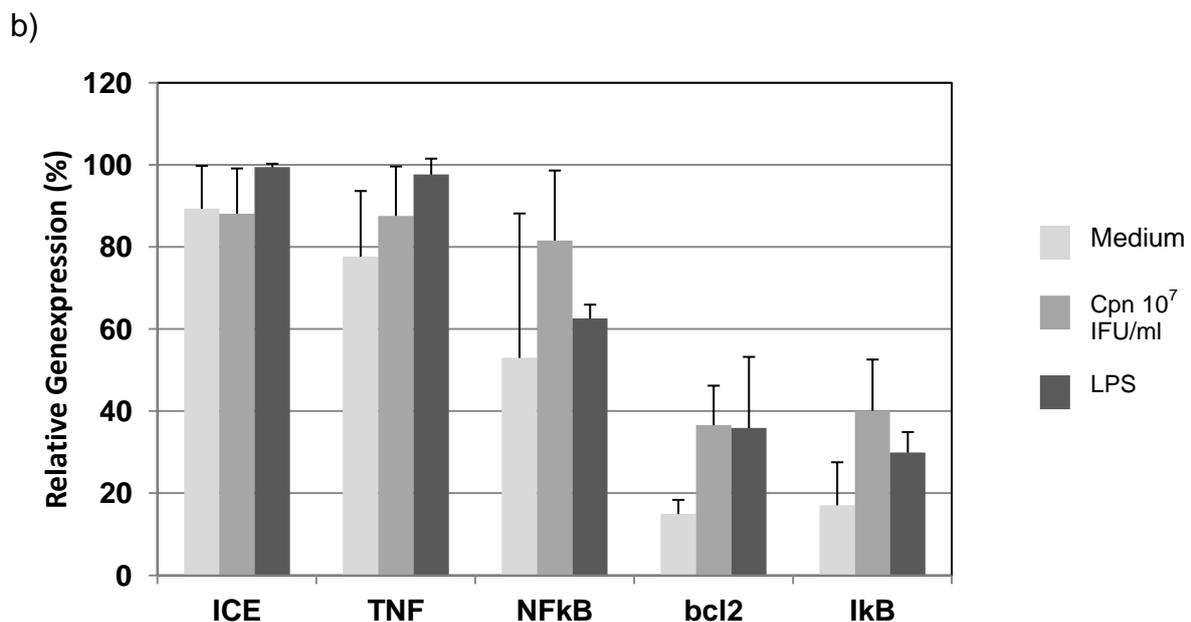
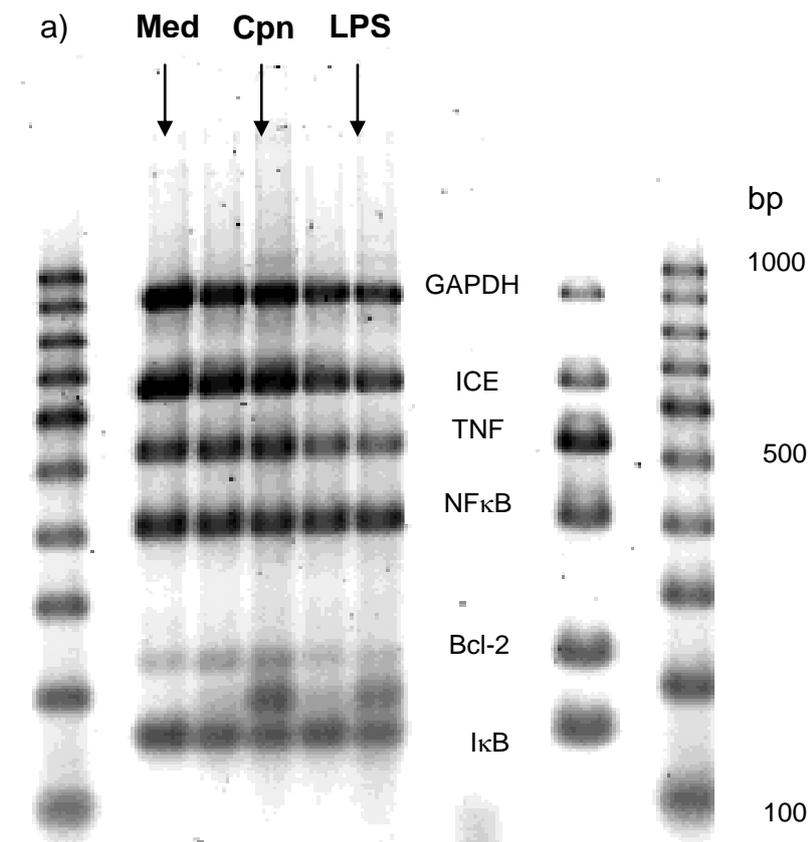


Abb. 7a/b Repräsentativer Blot der Gelelektrophorese der MPCR-Amplifikate und Quantifizierung der relativen Genexpression humaner Monozyten 30 min nach Infektion mit *C. pneumoniae* ( $10^7$  IFU/ml) und LPS im Vergleich zum Medium. (MW  $\pm$  Stabw; n=3)

Die Transkription nach 2 h Infektion bzw. Stimulation von humanen Monozyten zeigte nur geringe Unterschiede zwischen den infizierten/stimulierten Zellen und den unstimulierten Zellen. Eine Ausnahme stellten NF $\kappa$ B und Bcl-2 dar, die sowohl für die *C. pneumoniae*-infizierten als auch den LPS-stimulierten Monozyten eine Aktivitätser-

höhung gegenüber den unstimulierten Zellen aufwiesen. Signifikanzen bestanden nicht (Abb. 8).

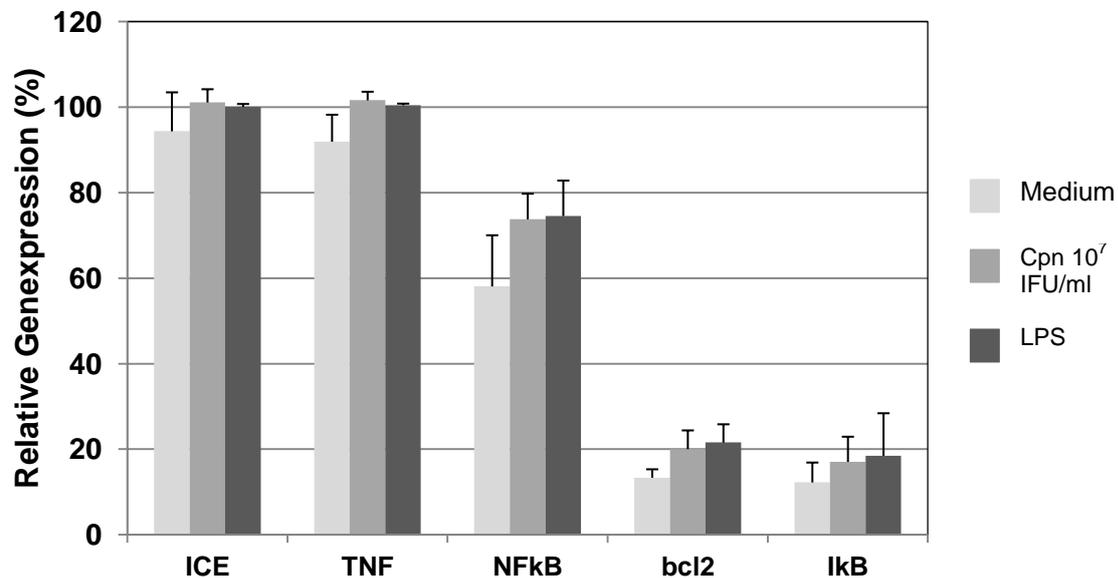


Abb. 8 Relative Genexpression humaner Monozyten 2 h nach Infektion mit *C. pneumoniae* ( $10^7$  IFU/ml) und LPS im Vergleich zum Medium (MW  $\pm$  Stabw; n=3)

In der Spätphase (24 h) der Infektion / Stimulation konnte eine leichte Aktivierung von ICE gegenüber den Medium-stimulierten Monozyten nachgewiesen werden. Diese Aktivierung war unter einer Stimulation mit LPS nicht zu beobachten. Die weiteren Stimulationsmarker zeigten nach 24 h unter der *C. pneumoniae*-Infektion keine wesentlichen Änderungen der transkriptionelle Aktivität (Abb. 9).

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich somit, in der Frühphase der Infektion eine verstärkte Transkriptionsaktivität von Bcl-2 und NFκB und in der Spätphase eine verstärkte Transkriptionsaktivität von ICE (Daten nicht graphisch dargestellt).

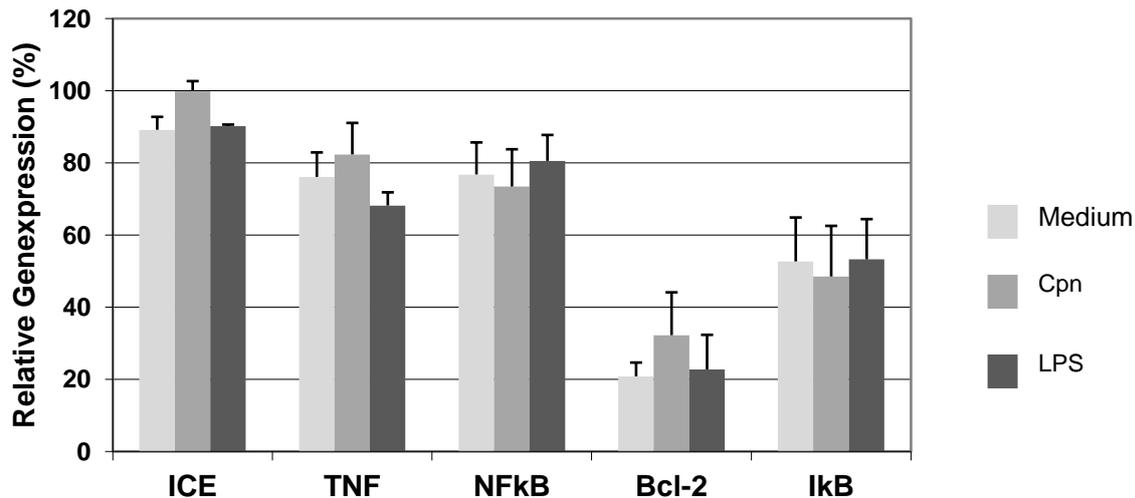


Abb. 9 Relative Genexpression humaner Monozyten 24 h nach Infektion mit *C. pneumoniae* ( $10^7$  IFU/ml) und LPS im Vergleich zum Medium. (MW  $\pm$  Stabw; n=3)

#### 4.5 Sekretion von Zytokinen und Chemokinen nach Infektion humaner Monozyten mit *C. pneumoniae*

Zur Charakterisierung der Immunantwort humaner Monozyten nach Infektion mit *C. pneumoniae* wurde die Freisetzung der proinflammatorischen Mediatoren IL-1 $\beta$  und IL-8 sowie dem antiinflammatorischen IL-1RA als Gegenspieler zu IL-1 $\beta$  bestimmt. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die maximale Sekretion nach einer Stimulationsdauer von 24 h mit *C. pneumoniae* erreicht wird.

##### 4.5.1 Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$ und dessen physiologischen Gegenspielers IL-1RA

Das proinflammatorisch wirkende Zytokin IL-1 $\beta$  zeigte 24 h nach Infektion humaner Blutmonozyten mit *C. pneumoniae* einen deutlichen Anstieg der Zytokinsekretion. So konnte eine dosisunabhängige Steigerung der IL-1 $\beta$ -Sekretion nach Infektion mit *C. pneumoniae* gegenüber den unstimulierten Zellen nachgewiesen werden.

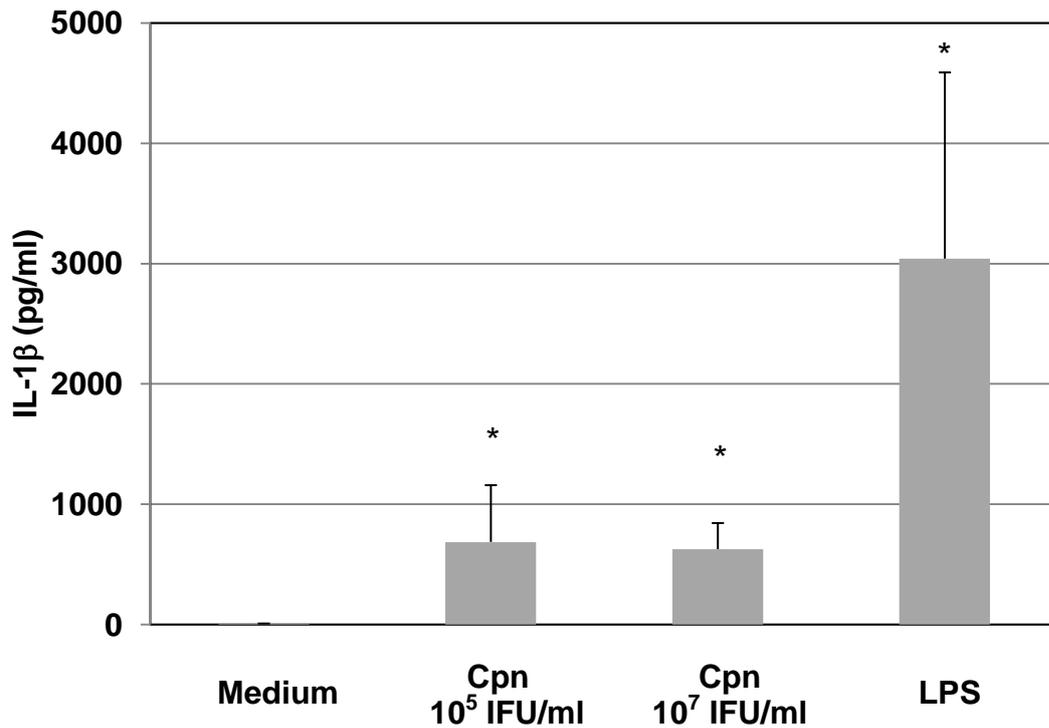


Abb. 10 IL-1 $\beta$  Sekretion (pg/ml) durch humane Monozyten 24 h nach Infektion mit *C. pneumoniae* ( $10^5$  bzw.  $10^7$  IFU/ml) und LPS. (MW  $\pm$  Stabw; n=10; \* p< 0,05)

Für den physiologischen Antagonisten IL-1Rezeptor- Antagonisten (IL-1RA) war eine Steigerung der Sekretion durch die Infektion mit *C. pneumoniae* in humanen Monozyten mittels ELISA nachweisbar, jedoch im Verhältnis deutlich geringer.

So kam es durch die Infektion mit *C. pneumoniae* ( $10^5$  IFU/ml) zu einer dosisunabhängigen Steigerung der Sekretion von IL-1 RA.

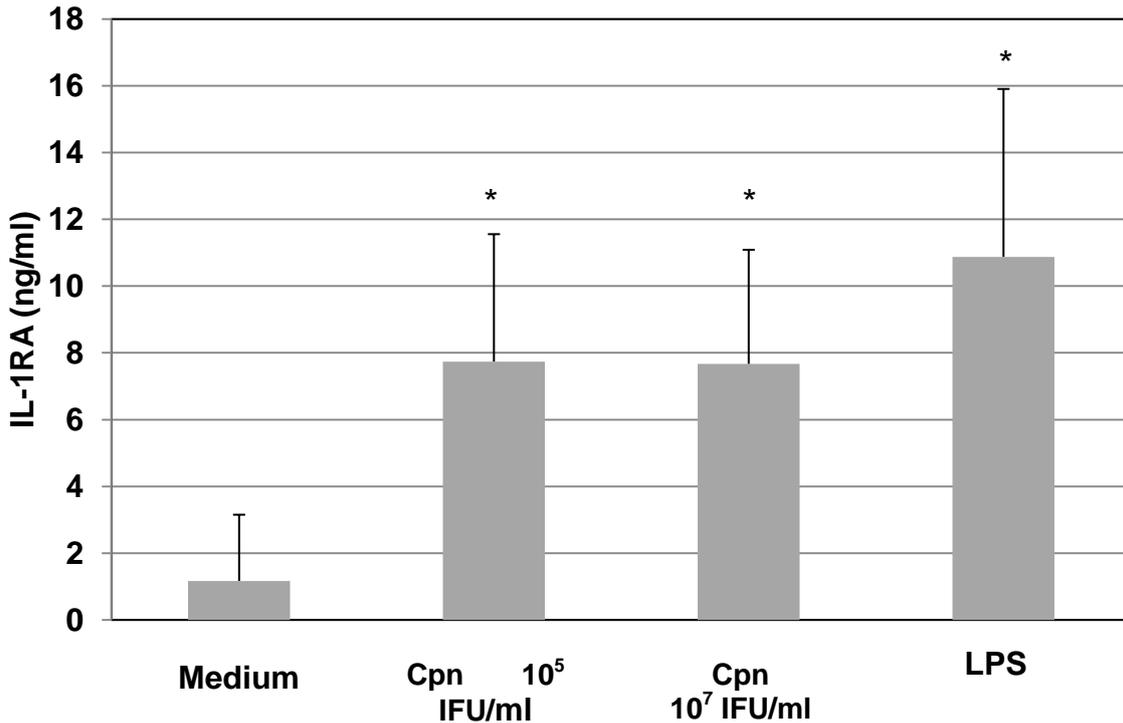


Abb. 11 IL-1RA-Sekretion durch humane Monozyten 24 h nach Infektion mit *C. pneumoniae* ( $10^5$  bzw.  $10^7$  IFU/ml) und LPS. (MW  $\pm$  Stabw; n=10; \*  $p < 0,05$ )

#### 4.5.2 Sekretion des Chemokins MCP-1

Für das Chemokin MCP-1 konnte durch humane Monozyten ebenfalls eine Steigerung nach *C. pneumoniae*-Infektion im Vergleich zu den unstimulierten Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich eine negative Abhängigkeit von der Infektionsdosis.

Die Freisetzung von MCP-1 in Monozyten durch die Infektion mit *C. pneumoniae* wies eine negative Abhängigkeit von der Infektionsdosis auf. Im Gegensatz zu den anderen proinflammatorischen Zytokinen zeigte sich unter der LPS Stimulation eine geringere Sekretion in den Zellüberständen im Vergleich zu den *C. pneumoniae*-infizierten Zellen.

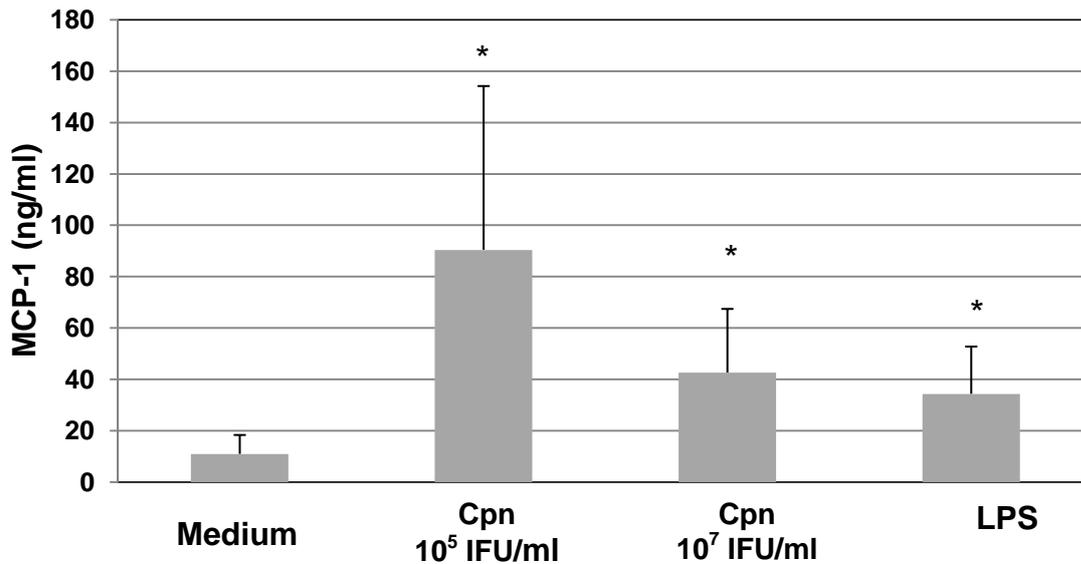


Abb. 12 MCP-1 Sekretion durch humane Monozyten 24 h nach Infektion mit *C. pneumoniae* ( $10^5$  bzw.  $10^7$  IFU/ml) und LPS (MW  $\pm$  Stabw; n=10; \* p< 0,05)

#### 4.6 Apoptoseraten humaner Monozyten nach induzierter Apoptose in Abhängigkeit einer Infektion mit *C. pneumoniae*

Die Apoptoseraten humaner Monozyten wurde nach Co-Anfärbung mit Annexin-V-FITC und Propidiumiodid mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. Die Bestimmung der Apoptoseraten wurde nach 24 h Infektion mit *C. pneumoniae* ( $10^7$  IFU/ml) durchgeführt. Mittels Proteinkinase C Inhibitor Staurosporin erfolgte eine Apoptoseinduktion in *C. pneumoniae*-infizierten Zellen.

Exemplarisch konnte an einem Experiment eine verminderte Apoptoserate unter *C. pneumoniae*-infizierten Zellen dargestellt werden. Die Apoptoseraten *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten zeigen gegenüber der Spontanapoptoserate eine gering abnehmende Tendenz. Die Induktion der Apoptose mittels Stimulation mit Staurosporin ergab eine Apoptoserate von 98%, unter Koinkubation mit *C. pneumoniae* verminderte sich Apoptoserate auf 51%.

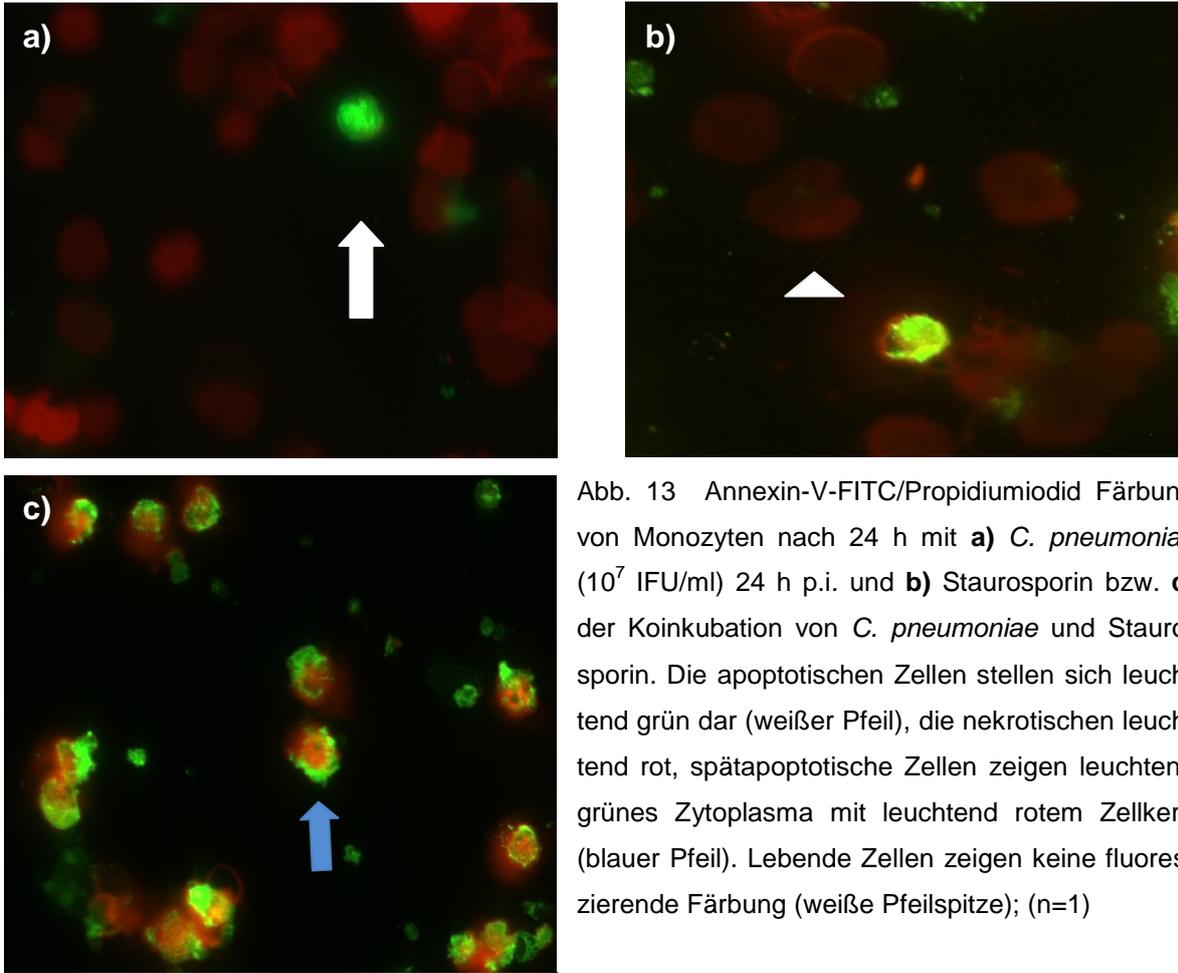


Abb. 13 Annexin-V-FITC/Propidiumiodid Färbung von Monozyten nach 24 h mit **a)** *C. pneumoniae* ( $10^7$  IFU/ml) 24 h p.i. und **b)** Staurosporin bzw. **c)** der Koinkubation von *C. pneumoniae* und Staurosporin. Die apoptotischen Zellen stellen sich leuchtend grün dar (weißer Pfeil), die nekrotischen leuchtend rot, spätapoptotische Zellen zeigen leuchtend grünes Zytoplasma mit leuchtend rotem Zellkern (blauer Pfeil). Lebende Zellen zeigen keine fluoreszierende Färbung (weiße Pfeilspitze); (n=1)

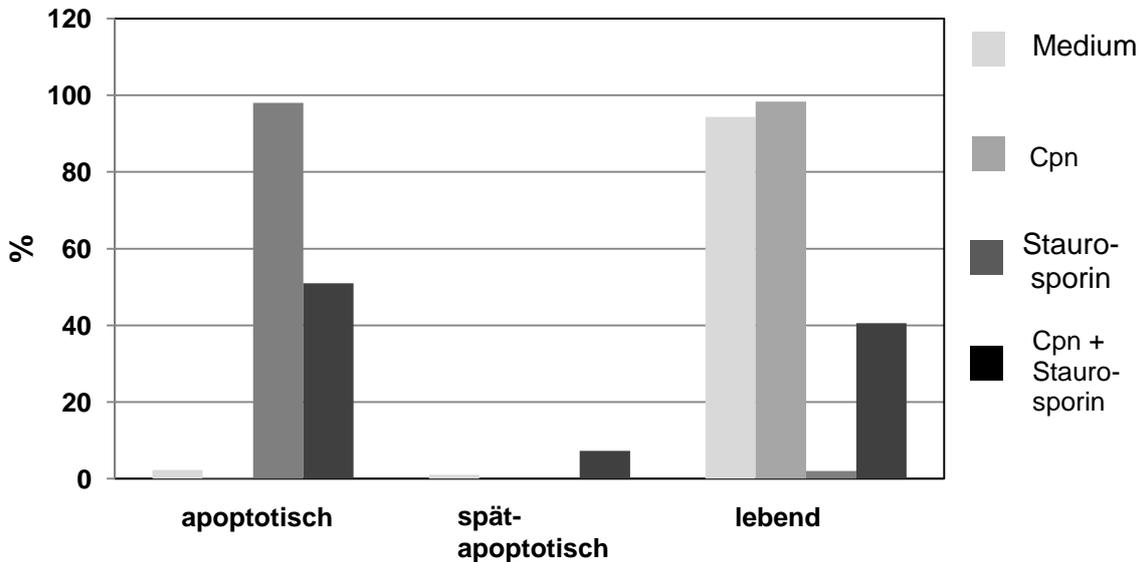


Abb. 14 Apoptoseraten humaner Monozyten 24 h nach Infektion mit *C. pneumoniae* ( $10^7$  IFU/ml) mit und ohne Stimulation mit Staurosporin (n=1)

#### 4.7 Infektionsraten humaner Alveolarmakrophagen nach Infektion mit *C. pneumoniae*

Die Bestimmung der Infektionsraten der humanen AM nach der Inkubation mit *C. pneumoniae* erfolgte nach 24 h. Der Messzeitpunkt 24 h wurde aufgrund unserer Vorergebnisse gewählt, die eine maximale Infektionsrate nach 24 h Infektion ergaben.

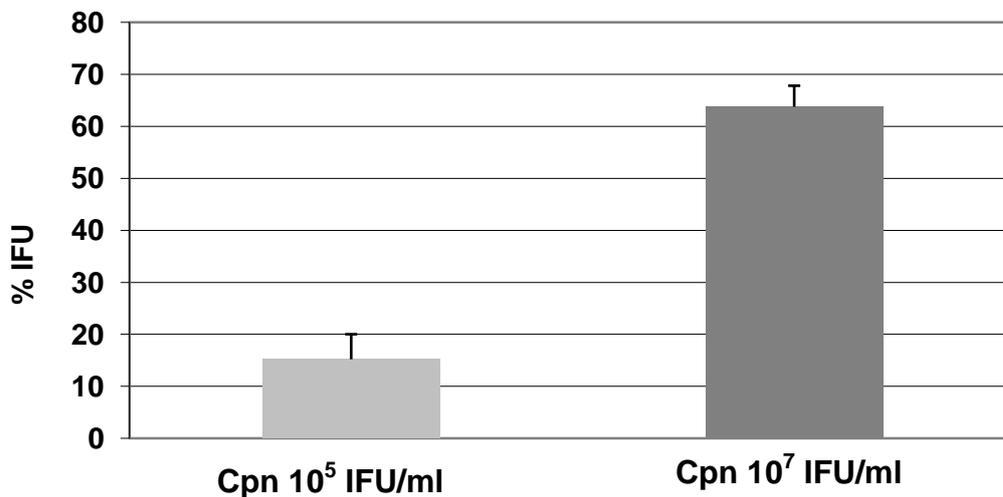


Abb. 15 Infektionsraten der humanen AM nach Inkubation mit *C. pneumoniae* ( $10^5$  bzw.  $10^7$  IFU/ml) 24 h p.i. (MW  $\pm$  Stabw; n=8)

#### 4.8 Einfluss von *C. pneumoniae* auf die Genregulation signaltransduktorischer Faktoren humaner Alveolarmakrophagen nach 2 h und 24 h

Zur Charakterisierung der Genexpression pro- und antiinflammatorischer Signalwege in AM unter der Stimulation mit *C. pneumoniae* wurde die Transkription der Faktoren ICE, TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B, Bcl-2 und I $\kappa$ B mittels einer Multiplex-PCR nach 2 h als Frühphase und 24 h als Spätphase einer *C. pneumoniae*-Infektion untersucht. Als Kontrolle diente eine Stimulation der AM mit LPS.

In AM gesunder Probanden zeigte sich in der frühen Phase einer *C. pneumoniae*-Infektion (2 h) eine verstärkte NF $\kappa$ B- und TNF- $\alpha$ -Antwort hinsichtlich der Transkription im Vergleich zu den unstimulierten Zellen, begleitet von einer vermehrten Regulation durch den physiologischen Inhibitor I $\kappa$ B, der ebenso in dieser frühen Phase

eine vermehrte Expression aufwies. Gleichzeitig zeigte sich eine Antwort von Bcl-2 in dieser Phase der *C. pneumoniae*-Infektion.

Im Vergleich zu *C. pneumoniae* 10<sup>7</sup> IFU/ml konnte für LPS nach 2 h gezeigt werden, dass die Stimulation mit LPS einen stärkeren Stimulus zur Transkription des TNF- $\alpha$  Gens darstellt, während die Stimulation für die Gene ICE, NF $\kappa$ B und I $\kappa$ B nur zu einer geringfügig erhöhten Transkription führte und für die Transkription von Bcl-2 keine Änderung aufgezeigt werden konnte.

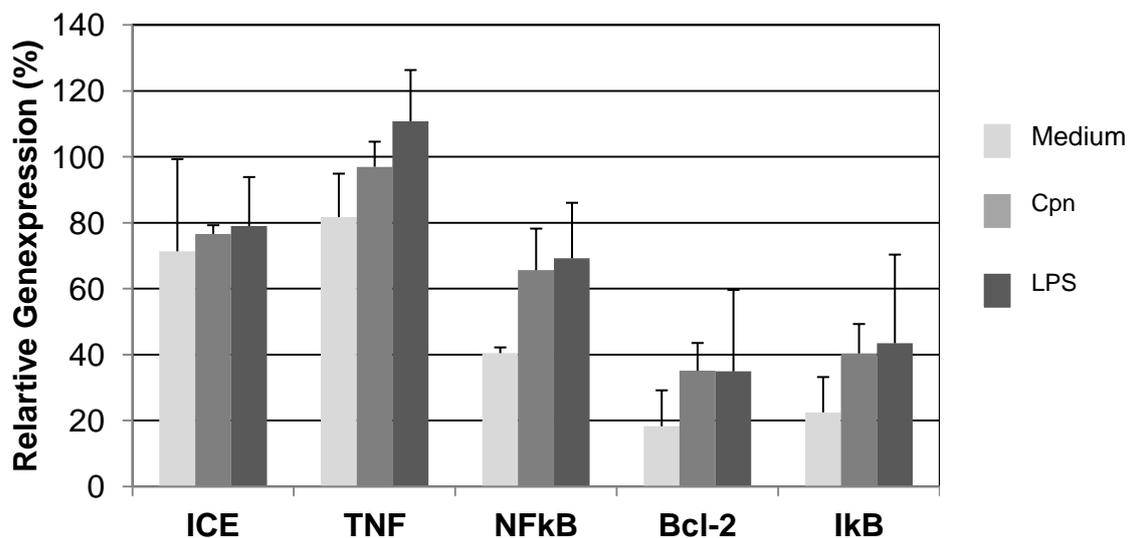
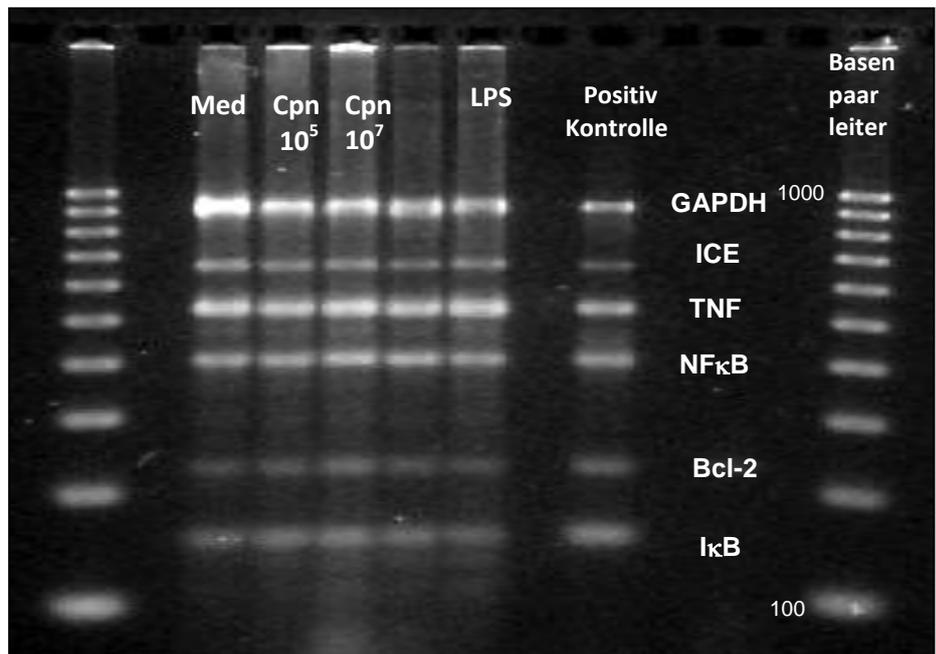


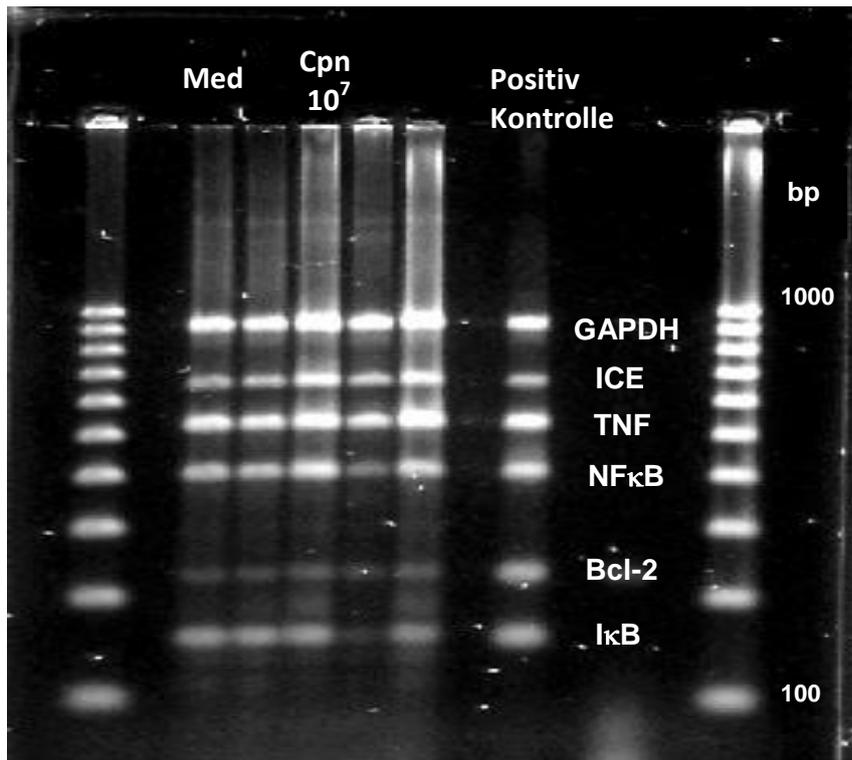
Abb. 16a/b Abbildung einer Metaphor Agarosegel-Elektrophorese mit Auftragung der MPCR-Amplifikate humaner AM mit *C. pneumoniae* (10<sup>5</sup> und 10<sup>7</sup> IFU/ml) und LPS 2 h p.i. im Vergleich zum Medium und Quantifizierung der relativen Genexpression (%) humaner AM mit *C. pneumoniae* (10<sup>7</sup> IFU/ml) und LPS 2 h p.i. im Vergleich zum Medium. (MW  $\pm$  Stabw; n=3)

Die Transkription der mRNA von NF $\kappa$ B und I $\kappa$ B für die mit *C. pneumoniae* stimulierten AM war gegenüber zum Medium deutlich erhöht. Weiterhin war eine deutliche Zunahme der Regulation von Bcl-2 der *C. pneumoniae*-stimulierten AM zu beobachten.

Nach einer Stimulationsdauer von 24 h ließ sich eine deutlich erhöhte Regulation hinsichtlich der Transkription der Caspase ICE in *C. pneumoniae*-infizierten AM im Vergleich zu den unstimulierten Zellen darstellen. Hierbei konnte eine Abhängigkeit von der Infektionsdosis aufgezeigt werden. Die Expression des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B zeigte eine gering gesteigerte Aktivität; eine Abhängigkeit von der Infektionsdosis bestand nicht. Gleichzeitig war eine verminderte Gegenexpression durch I $\kappa$ B zu verzeichnen. Es zeigte sich kein Nachweis einer veränderten Regulation des Signaltransduktionsfaktors Bcl-2 in der Spätphase einer Infektion von AM durch *C. pneumoniae*.

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich somit, in der Frühphase der Infektion eine verstärkte Transkriptionsaktivität von Bcl-2, NF $\kappa$ B und I $\kappa$ B und in der Spätphase eine verstärkte Transkriptionsaktivität von ICE bei gleichzeitig deutlich verminderter Transkriptionsaktivität von I $\kappa$ B (Daten nicht graphisch dargestellt).

a)



b)

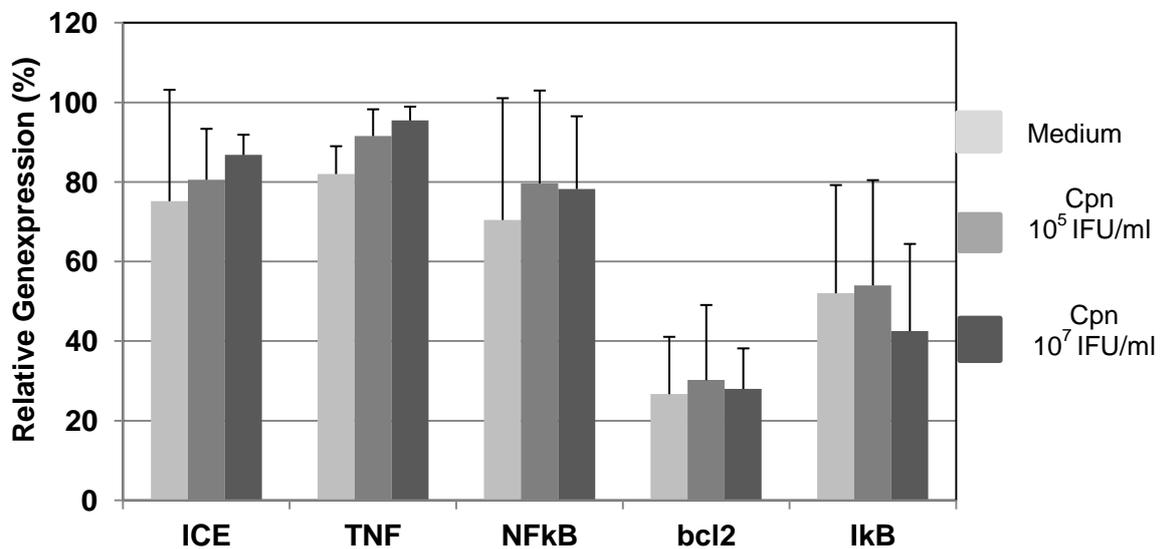


Abb. 17a/b Abbildung einer Metaphor Agarosegel-Elektrophorese mit Auftragung der MPCR-Amplifikate und Quantifizierung der relativen Genexpression (%) humaner AM mit *C. pneumoniae* (10<sup>7</sup> IFU/ml) und LPS 24 h p.i. im Vergleich zum Medium. (MW ± Stabw; n=6)

#### 4.9 Sekretion von Zytokinen und Chemokinen nach Infektion humaner Alveolarmakrophagen mit *C. pneumoniae*

Die humanen AM wurden zum Zeitpunkt 24 h nach Infektion mit *C. pneumoniae* untersucht, da unsere Vorergebnisse für diesen Zeitpunkt die maximale Zytokinsekretion ergaben. Aufgrund der begrenzten Anzahl von AM in der bronchoalveolären Lavage konnte kein mehrzeitiger Versuchsaufbau durchgeführt werden.

##### 4.9.1 Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$ und dessen physiologischen Gegenspielers IL-1RA

Die Sekretion des Zytokins IL-1 $\beta$  war in humanen AM durch die Infektion mit *C. pneumoniae* nach 24 h gesteigert, wobei lediglich eine Tendenz zur Dosisabhängigkeit aufzuzeigen war. Die Stimulation mit LPS erbrachte aber den Nachweis einer signifikanten Steigerung im Vergleich zu den unstimulierten Zellen.

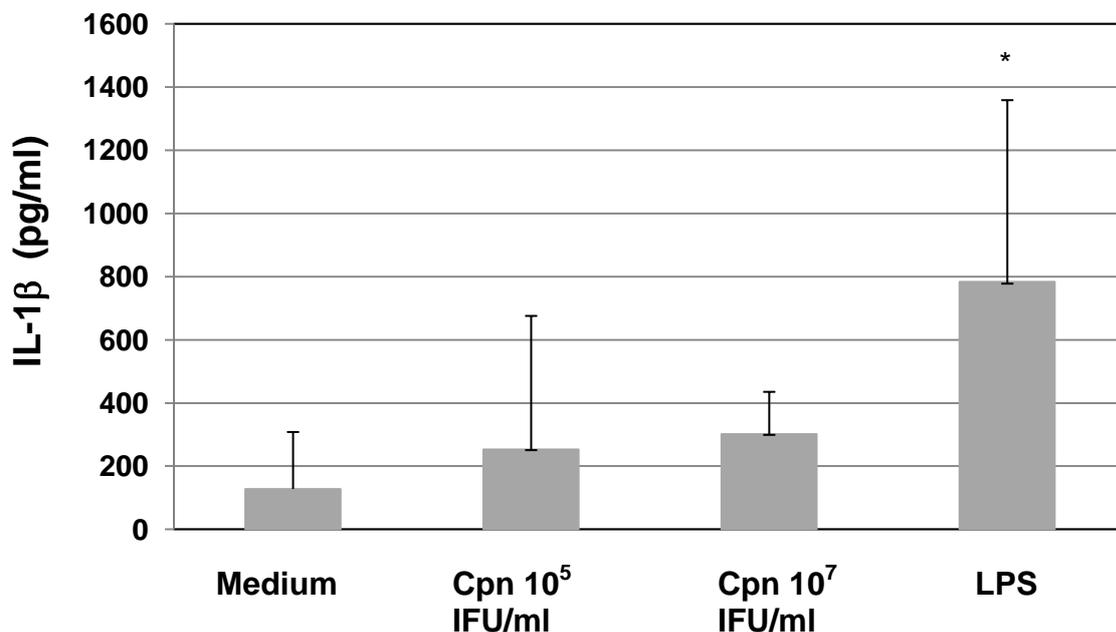


Abb. 18 IL-1 $\beta$ -Sekretion durch humane AM mit *C. pneumoniae* ( $10^5$  bzw.  $10^7$  IFU/ml) und LPS 24 h p.i. (MW  $\pm$  Stabw; n=7, \*p < 0,05)

Im Vergleich zu IL-1 $\beta$  konnte für IL-1RA keine gesteigerte Freisetzung durch chlamydieninfizierte AM gemessen werden. Bei einer basalen IL-1RA-Sekretion in der Mediumkontrolle verzeichneten wir 24 h nach Infektion mit *C. pneumoniae* mit einer Infektionsdosis von  $10^5$  IFU/ml bzw.  $10^7$  IFU/ml keinen Anstieg der Sekretionsraten

für IL-1RA. Auch die LPS-Stimulation konnte keine signifikante Steigerung nachweisen.

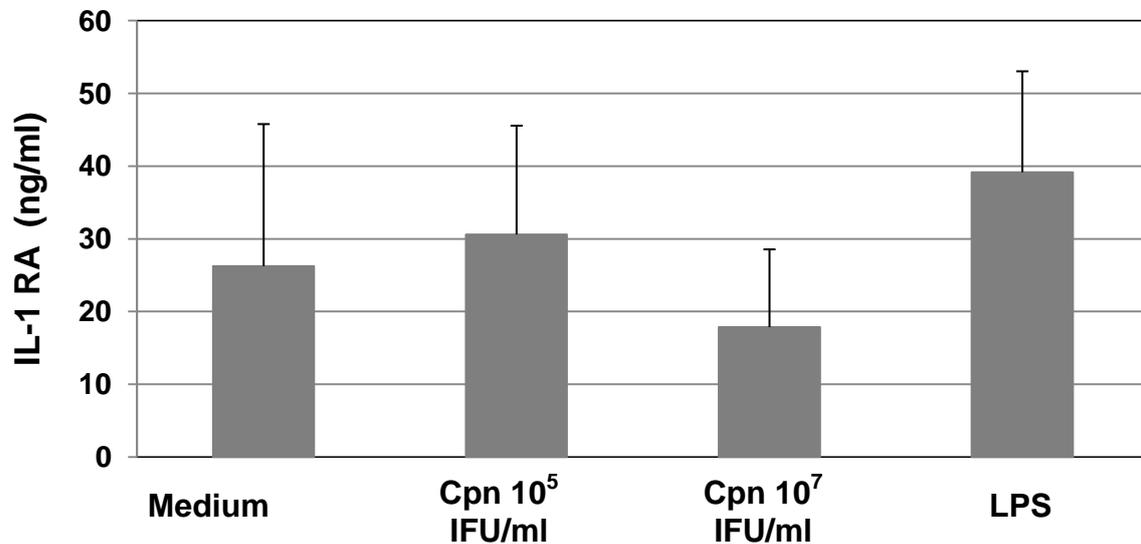


Abb. 19 IL-1RA-Sekretion durch humane AM mit *C. pneumoniae* ( $10^5$  bzw.  $10^7$  IFU/ml) und LPS 24 h p.i (MW  $\pm$  Stabw; n=7)

#### 4.9.2 Zytokinsekretion der proinflammatorischen Zytokine / Chemokine: TNF- $\alpha$ , IL-8 und MCP-1

Bei einer basalen TNF- $\alpha$ -Sekretion, der unstimulierten humanen AM konnte nach der Infektion mit *C. pneumoniae* ( $10^7$  IFU/ml) über 24 h ein Anstieg der Sekretion dargestellt werden. Diese Erhöhung der Sekretionsrate zeigte eine Tendenz abhängig von der gewählten Infektionsdosis für *C. pneumoniae*, eine Signifikanz war jedoch nicht nachweisbar. Die Freisetzung von TNF- $\alpha$  nach der Stimulation mit LPS führte zu einem signifikanten Anstieg.

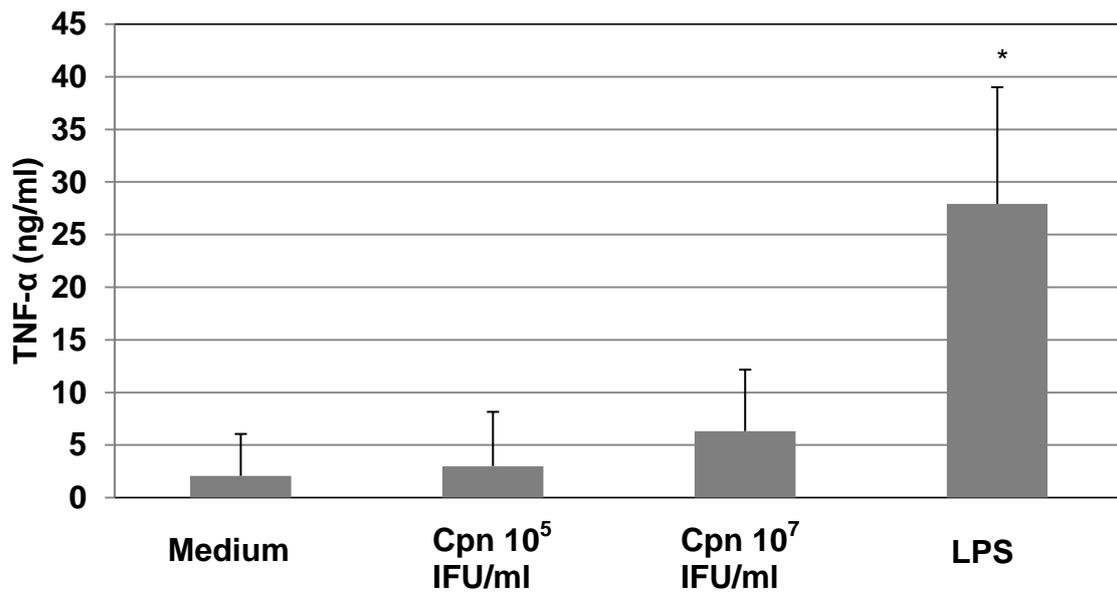


Abb. 20 TNF- $\alpha$ -Sekretion durch humane AM mit *C. pneumoniae* ( $10^5$  bzw.  $10^7$  IFU/ml) und LPS 2 h p.i. (MW  $\pm$  Stabw; n=7, \*p<0,05)

Für das proinflammatorische IL-8 zeigte sich eine Steigerung der Zytokinsekretion unter der Stimulation mit *C. pneumoniae*, wobei hier eine negative Abhängigkeit von der Infektionsdosis darstellbar war. Eine Signifikanz bestand nicht.

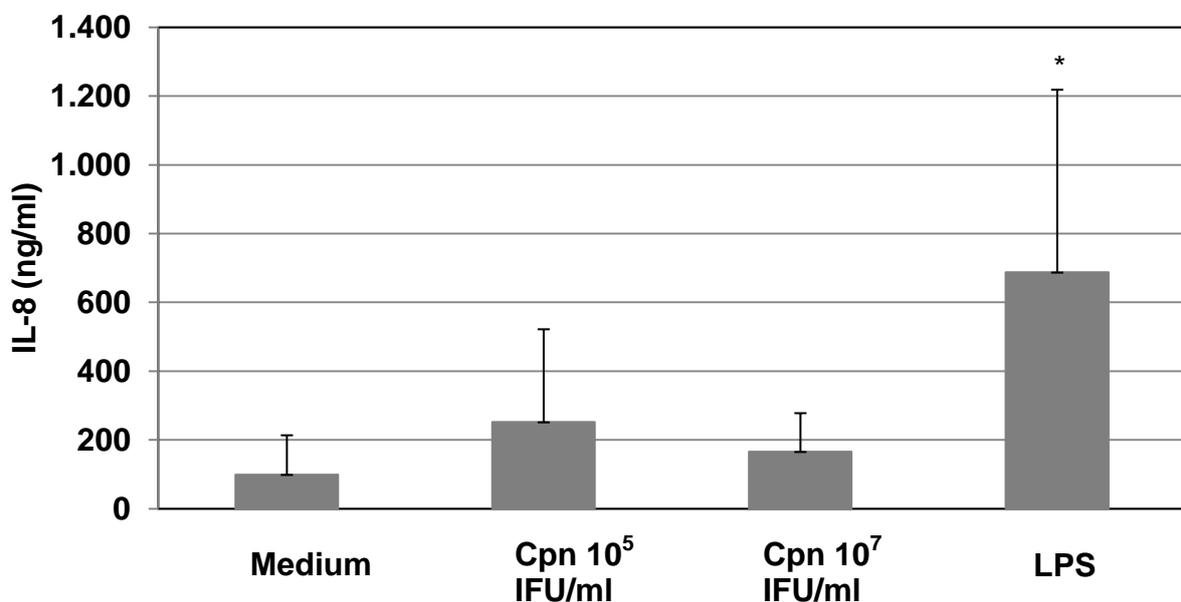


Abb. 21 IL-8-Sekretion durch humane AM mit *C. pneumoniae* ( $10^5$  bzw.  $10^7$  IFU/ml) und LPS 24 h p.i. (MW  $\pm$  Stabw; n=8, \* p<0,05)

Für das Chemokin MCP-1 konnte bei den AM keine Steigerung der Zytokinsekretion unter der Infektion mit *C. pneumoniae* beobachtet werden. Die Stimulation mit LPS (1 µg/ml) führte zu einer 6,5-fachen Erhöhung der Zytokinsekretion ( $52,6 \pm 61,5$  ng/ml) im Vergleich zu der spontanen Sekretion der Mediumkontrolle (Daten graphisch nicht dargestellt).

#### 4.10 Apoptoseraten humaner Alveolarmakrophagen nach induzierter Apoptose in Abhängigkeit einer Infektion mit *C. pneumoniae*

Die Bestimmung der Apoptoseraten humaner AM wurde, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Schwierigkeiten der Auswertung ergaben sich aus der Eigenfluoreszenz der AM und den sich gelblich anfärbenden anthrakotischen Einlagerungen der Zellen. Die Bestimmung der Apoptoseraten erfolgte 48 h nach Infektion mit *C. pneumoniae* oder Stimulation mit Staurosporin bzw. einer Kostimulation. Exemplarisch zeigte sich in einem Experiment eine verminderte Apoptoserate unter den *C. pneumoniae*-infizierten AM. Die Induktion der Apoptose mittels Stimulation mit Staurosporin ergab eine gesteigerte Apoptoserate, unter Koinkubation mit *C. pneumoniae* verminderte sich die Apoptoserate.

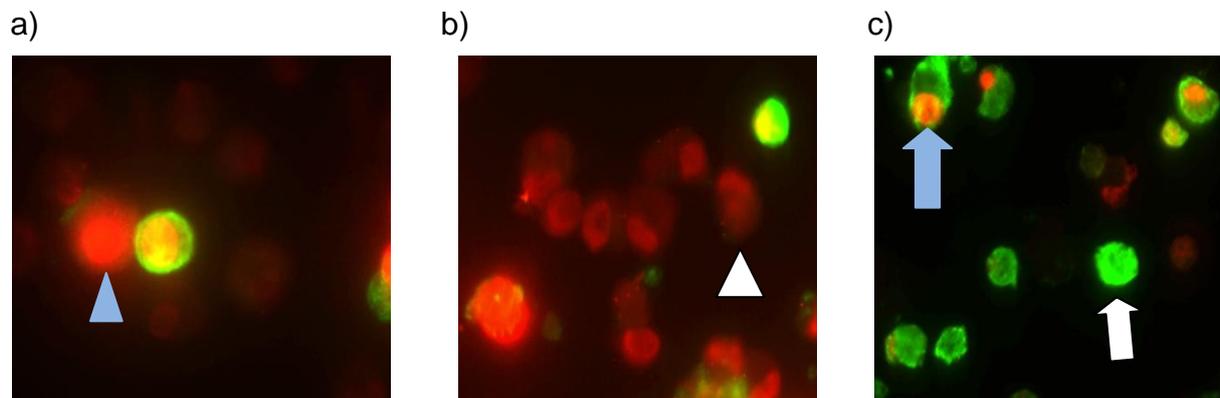


Abb.22 Annexin-V-FITC / Propidiumiodid Färbung von AM mit **a)** *C. pneumoniae* ( $10^7$  IFU/ml) 24 h p.i. und **b)** Staurosporin bzw. **c)** der Koinkubation von *C. pneumoniae* und Staurosporin. Die apoptotischen Zellen stellen sich leuchtend grün (weißer Pfeil) dar, die nekrotischen leuchtend rot (blaue Pfeilspitze), spätapoptotische mit grünem Zytoplasma und rotem Zellkern (blauer Pfeil). Lebende Zellen zeigen keine fluoreszierende Färbung (weiße Pfeilspitze)

| %                                  | Apoptotisch | Spätapoptotisch | Lebend |
|------------------------------------|-------------|-----------------|--------|
| Medium                             | 2,3         | 13,1            | 81,6   |
| Cpn (10 <sup>7</sup> IFU/ml)       | 3,0         | 9,3             | 84,6   |
| Staurosporin                       | 9,0         | 77,0            | 1,6    |
| Koinkubation<br>Cpn + Staurosporin | 4,4         | 85,4            | 5,3    |

## 4.11 COPD Patienten

### 4.11. 1. Das Patientenkollektiv

Um eine mögliche klinische Relevanz der zuvor erhobenen Daten zu evaluieren, wurde zusätzlich ein kleines Patientenkollektiv untersucht, das sich aus Patienten zusammensetzte, die sich zum Studienzeitpunkt in stationärer bzw. ambulanter Behandlung des Universitätsklinikums Schleswig Holstein Campus Lübeck befanden. Bei den Patienten lag als Haupt- oder Nebendiagnose eine COPD nach den GOLD-Kriterien (79) vor. Bei der im Rahmen der diagnostischen Abklärung pulmonaler Erkrankungen durchgeführten flexiblen Bronchoskopie wurde zur zytologischen Routinediagnostik eine BAL durchgeführt.

Als Ausschlusskriterien galten Hinweise auf eine akute bakterielle oder virale Infektion sowie eine akute Exazerbation der COPD. Des Weiteren wurden nur Patienten eingeschlossen, die zum Studienzeitpunkt keine systemische Medikation mit Glucocorticoiden oder Antibiotika erhielten.

Nach der zytologischen Auswertung der Präparate wurden folgende Kriterien zum Einschluss gefordert:

- negative Gramfärbung
- Anteil der AM an der Gesamtzellzahl > 90%
- Vitalität der AM > 90%

| <b>Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF)</b> |                 |                 |
|--|-----------------|-----------------|
|  | Probanden (n=7) | Patienten (n=4) |
| Volumen (ml)                                     | 166 ± 28        | 50,0 ± 14       |
| Gesamtzellzahl (10 <sup>6</sup> /ml)             | 32,5 ± 20,8     | 11,9 ± 5,1      |
| AM (%)   | 95,1 ± 4,0      | 95,0 ± 3,2      |
| Lymphozyten (%)                                  | 3,8 ± 4,2       | 2,8 ± 3,6       |
| Granulozyten (%)                                 | 1,1 ± 0,9       | 1,8 ± 1,4       |
| Vitalität (%)                                    | 94 ± 4          | 91 ± 6          |
| Anthrakose                                       | ++              | ++              |

Tab. 4: Zelldifferenzierung BALF von Probanden und Patienten mit COPD  
(MW ± Stabw)

Die COPD-Patienten zeigten in den Bronchoskopien makroskopisch eine atrophische endobronchiale Mucosa im Sinne einer chronisch entzündlichen Alteration. Das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei 68 Jahren ± 11,8 Jahren.

Die durchschnittliche Anzahl an Packyears konnte anamnestisch mit 30,0 ± 12,3 erfragt werden. Entsprechend der Schweregradeinteilung nach der aktuellen GOLD-Klassifikation lag bei den Patienten eine mäßiggradige COPD (Schweregrad II) vor (FEV-1: 66% ± 36,4).

| <b>Lungenfunktionsparameter</b> |                      |
|---------------------------------|----------------------|
|                                 | COPD Patienten (n=4) |
| IVC (% Soll)                    | 59,4 ± 21,1          |
| FEV-1 (% Soll)                  | 50,7 ± 19,6          |
| Tiffeneau Index (%)             | 54,8 ± 3,8           |
| <b>BGA</b>                      |                      |
| pO <sub>2</sub> (mm Hg)         | 65,8 ± 15,1          |
| pCO <sub>2</sub> (mm Hg)        | 40,4 ± 4,5           |
| O <sub>2</sub> Sättigung (%)    | 93,1 ± 4,1           |
| pH                              | 7,459 ± 0,005        |

Tab. 5:  
Darstellung Lungenfunktionsparameter der COPD Patienten inkl. der Blutgasanalyse (MW ± Stabw)

Aufgrund der begrenzten Zellanzahl im Rahmen des Versuchsaufbaus beschränkten wir uns im Vergleich zu den Probanden bei den Patienten auf die Untersuchungszeitpunkte von 15 min, 30 min und 2 h, insbesondere da bei den Ergebnissen der Probanden nach 24 h nur noch geringe Regulationsunterschiede bezüglich der Signaltransduktion zu beobachten waren.

#### 4.11.2 Einfluss von *C. pneumoniae* auf die Genregulation signaltransduktorischer-Faktoren humaner Alveolarmakrophagen der COPD-Patienten nach 15 min, 30 min und 2 h

In einer sehr frühen Phase der Infektion mit *C. pneumoniae* (15 min) konnte in der MPCR in den durch uns untersuchten Signaltransduktionsfaktoren des humanen TNF- $\alpha$  Signalings (ICE, TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B, Bcl-2 und I $\kappa$ B) eine Tendenz der gesteigerten Genexpression des I $\kappa$ B ohne begleitende NF $\kappa$ B Antwort dargestellt werden. Eine Signifikanz bestand jedoch nicht.

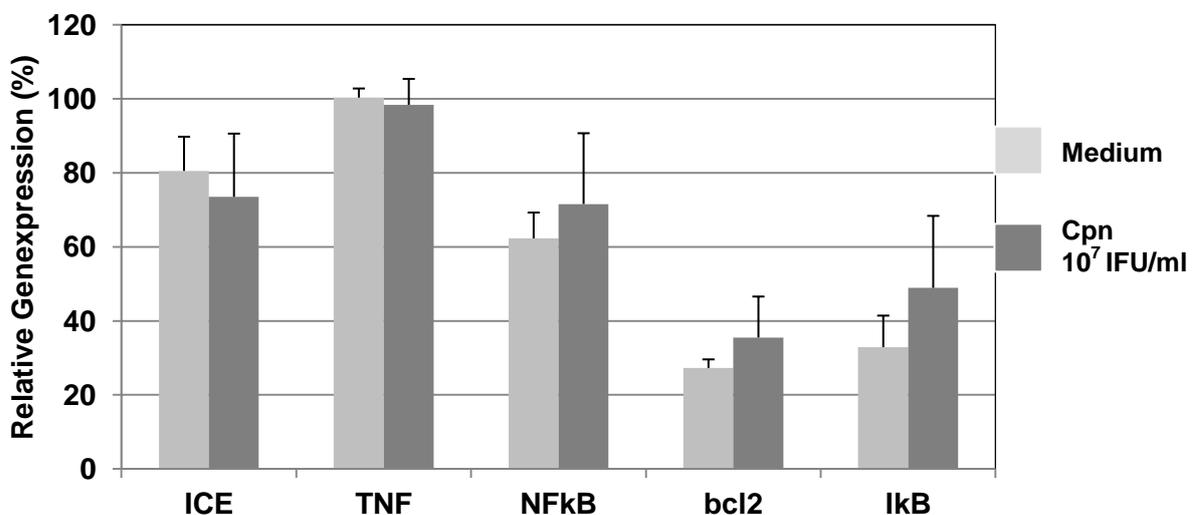


Abb. 23 Relative Genexpression humaner AM von COPD Patienten mit *C. pneumoniae* (10<sup>7</sup> IFU/ml) 15 min p.i. im Vergleich zum Medium (MW  $\pm$  Stabw; n=4)

Nach 30 min Infektion der AM durch *C. pneumoniae* waren keine Unterschiede in Signaltransduktionsfaktoren im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Medium) nachweisbar.

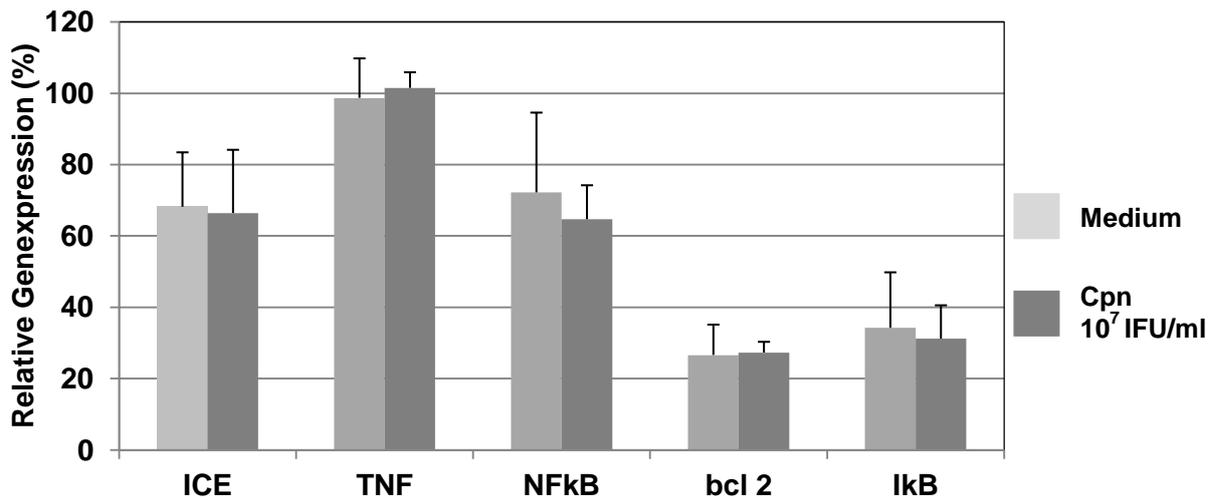


Abb. 24 Relative Genexpression humaner AM von COPD Patienten mit *C. pneumoniae* ( $10^7$  IFU/ml) 30 min p.i. im Vergleich zum Medium (MW  $\pm$  Stabw; n=4)

Auch nach 2 h Infektion mit *C. pneumoniae* waren keine Unterschiede in der Signaltransduktion im Vergleich zu den unstimulierten Zellen zu erfassen (Abb. 25 und 26).

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich somit, lediglich in einer sehr frühen Infektionsphase eine vermehrte transkriptionelle Aktivität von I $\kappa$ B. Im weiteren Verlauf waren keine Unterschiede in der Transkription nachweisbar (Daten nicht graphisch dargestellt).

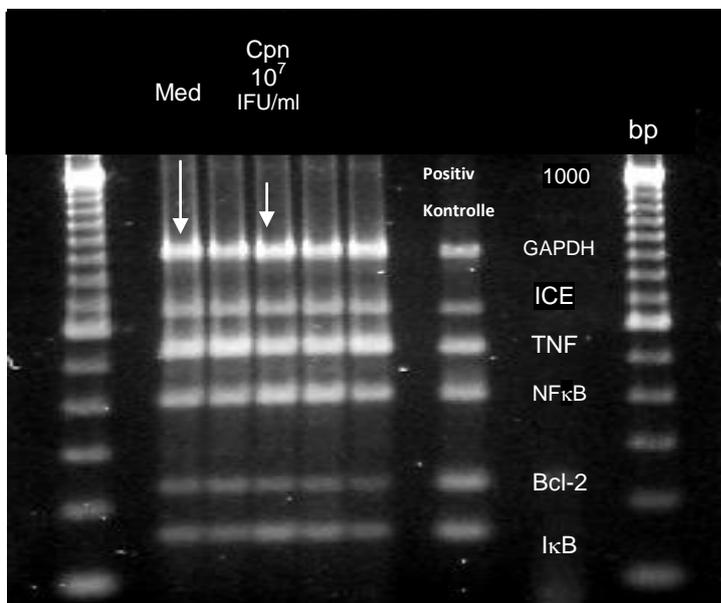


Abb.25 Repräsentativer Blot einer Gel-Elektrophorese mit Auftragung der MPCR-Amplifikate AM COPD-Patient mit *C. pneumoniae* ( $10^7$  IFU/ml) 2h p.i. (Größenangabe der Amplifikate in 100-1000 bp)

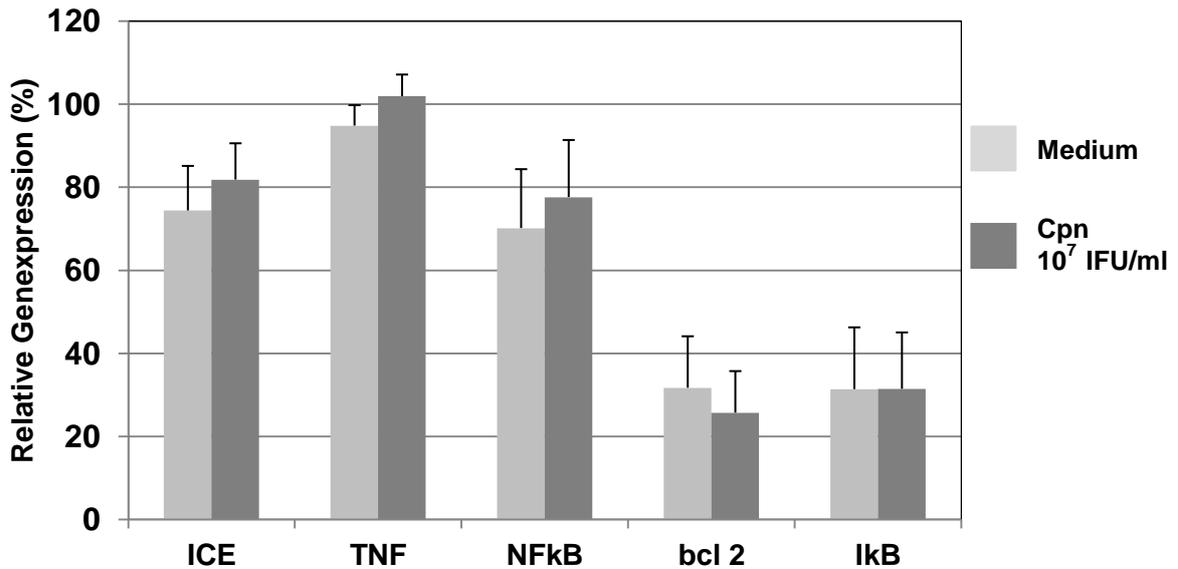


Abb. 26 Relative Genexpression humaner AM von COPD Patienten mit *C. pneumoniae* (10<sup>7</sup> IFU/ml) 2 h p.i. im Vergleich zum Medium (MW ± Stabw; n=4)

#### 4.11.3 Vergleich COPD Patienten mit lungengesunden Probanden

Im Vergleich mit AM von gesunden Rauchern zeigten bereits die unstimulierten Zellen der COPD-Patienten die Tendenz eines höheren basalen Stimulations-Niveaus bezüglich der untersuchten Faktoren der Signaltransduktion des TNF-Signalweges. Besonders deutlich war dies für den Signaltransduktionsfaktor NFκB.

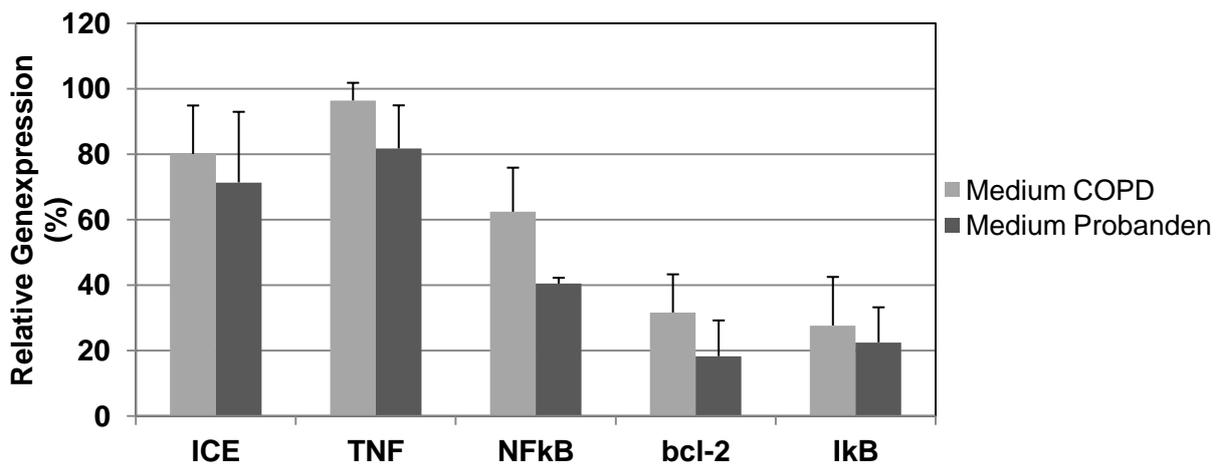


Abb. 27 Vergleich der relativen Genexpression humaner AM (unstimulierte Zellen) COPD Patienten mit Probanden nach 2 h; (MW ± Stabw; COPD Patienten n=4, Probanden n=3).

| <b>Ratio<br/>Stimulation/Medium (%)</b> | <b>ICE</b> | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | <b>NF<math>\kappa</math>B</b> | <b>Bcl-2</b> | <b>I<math>\kappa</math>B</b> |
|---|------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------|------------------------------|
| <b>Cpn 107 IFU/ml Patienten</b>         | 110,7      | 107,6                          | 111,3                         | 111,6        | 102,8                        |
| <b>Cpn 107 IFU/ml Probanden</b>         | 109,5      | 121,4                          | 163,5                         | 212,4        | 178,4                        |

Hinsichtlich der Genexpression, der chlamydieninfizierten AM war im Vergleich zum Medium bei den Probanden eine deutlich stärkere Signaltransduktion der Faktoren NF $\kappa$ B, Bcl-2 und I $\kappa$ B als bei den Patienten zu beobachten. Die Faktoren ICE und TNF- $\alpha$  zeigten in der Genexpression keine Unterschiede zwischen den chlamydieninfizierten AM der Probanden und COPD Patienten.

## 5. Diskussion

Ziel dieser Studie war die Untersuchung einzelner Faktoren (ICE, TNF-, NF $\kappa$ B, Bcl-2, I $\kappa$ B) der TNF-Signalwege. Dies erfolgte hinsichtlich pro-/antiinflammatorischer als auch pro-/antiapoptotischer Prozesse in humanen Monozyten und AM nach Infektion mit *C. pneumoniae* mittels einer Multiplex-PCR lungengesunder rauchender Probanden.

### Regulationswege pro- und antiinflammatorischer Faktoren humaner primärer Alveolarmakrophagen und Monozyten nach der Infektion mit *C. pneumoniae*

*C. pneumoniae* ist ein obligat intrazellulärer Erreger respiratorischer Infektionen, wobei auch AM als Wirtszellen fungieren (70). In der aktuellen Studie war eine Infektionsrate der isolierten humanen AM nach 24 h mit Daten aus vorausgegangenen Studien z. B. Rupp et al. (85) vergleichbar.

In peripheren Blutmonozyten (PBMC), die eine wichtige Rolle in der Entwicklung chronisch persistierender Infektionen mit *C. pneumoniae* zu spielen scheinen (38), standen die Infektionsrate ebenfalls in einer Linie mit den vorhergehenden Studienergebnissen (85).

NF $\kappa$ B übernimmt als Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle in der Regulation immunologischer Prozesse v.a. in der Transkription proinflammatorischer Zytokine (wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) und antiapoptotischer Proteine. Eine Infektion mit *C. pneumoniae* führt über NF $\kappa$ B zu einer Induktion von proinflammatorischen Mediatoren (20).

Redecke et al. konnten bereits in einer vorhergehenden Studie eine infektionsdosisabhängige gesteigerte Sekretion von TNF- $\alpha$  in AM und Monozyten nach der Infektion mit *C. pneumoniae* nachweisen (82).

In der vorliegenden Arbeit war nicht nur eine gesteigerte Sekretion, sondern auch eine vermehrte Transkription von TNF- $\alpha$  bei AM nach einer Infektion mit *C. pneumoniae* aufzuzeigen.

Dagegen demonstrierten Zeidel et al. (111) bei im Blut zirkulierenden Monozyten jedoch konträr hierzu eine erhöhte Sekretion proinflammatorischer Zytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ ) ohne begleitenden Anstieg der regulatorischen antiinflammatori-

schen Zytokine (IL-1 $\beta$  und IL-10) bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern. Zuvor konnten Mamata et al. aufzeigen, dass eine Nikotinbehandlung der *C. pneumoniae*-infizierten PBMC zu keiner veränderten TNF- $\alpha$  Sekretion führt (61).

Weiterhin fand sich eine gesteigerte Transkription für NF $\kappa$ B als auch seinem physiologischen Gegenspieler I $\kappa$ B. Hierbei schien initial die Gegenregulation durch I $\kappa$ B zu überwiegen. In der Frühphase einer Infektion mit *C. pneumoniae* in AM gesunder Probanden war das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren erstaunlicherweise zunächst auf der Seite der Antiinflammation zu verzeichnen. In dem weiteren zeitlichen Verlauf der Infektion war eine persistierende NF $\kappa$ B-Antwort bei regredienter Transkription von I $\kappa$ B nachweisbar, sodass letztendlich die proinflammatorische Immunantwort überwog, wie aus den Vorergebnissen zu erwarten war. In einer späten Infektionsphase (24 h) war das proinflammatorische Übergewicht anhand der vermehrten Aktivität des proinflammatorischen ICE, das das pro-Interleukin-1 und 18 zu den biologisch aktiven Formen spaltet, darstellbar.

Die zeitlich versetzte vermehrte Transkription von NF $\kappa$ B und ICE ist sicherlich mit der Komplexität der intrazellulären Prozessen nach vermehrter TNF- $\alpha$ -Bildung über die intrazellulären Signaltransduktionskaskaden nach vermehrter TNF- $\alpha$ -Bildung bis hin zur Aktivierung der genannten Faktoren zu erklären.

Im Vergleich hierzu war bei den humanen Blutmonozyten eine differente Regulation zu beobachten. Nach dem initialen Übergewicht der I $\kappa$ B Antwort fehlte bei den PBMC im weiteren zeitlichen Verlauf der Infektion mit *C. pneumoniae* die vermehrte NF $\kappa$ B-Antwort im Sinne der Proinflammation. Für TNF- $\alpha$  selbst war keine veränderte Regulation auf mRNA-Ebene darstellbar.

Dies mag in Zusammenhang mit der von Wolf et al. nachgewiesenen graduellen Degradation von *C. pneumoniae* in kultivierten Monozyten stehen (106). Wobei die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  nur bei den PBMC im Vergleich zu den AM nach Infektion mit *C. pneumoniae* infektionsdosisunabhängig signifikant erhöht war. Gleichzeitig war die Sekretion des kompetitiven Rezeptorantagonisten IL-1RA bei jedoch deutlich erhöhter Ratio für IL-1/IL-1RA vermehrt. Im quantitativen Vergleich der Zytokinsekretion bezüglich IL-1 $\beta$  waren die aktuellen Ergebnisse deutlich geringer als bei Redecke et al. (82). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass in der vorliegenden Arbeit AM lungengesunder rauchender Probanden verwendet wurden.

Auch war auffällig, dass die Ergebnisse der Infektion mit *C. pneumoniae* und der Stimulation mit LPS hinsichtlich der IL-1 $\beta$  und IL-1RA-Sekretion nicht im Einklang standen. So war das Gleichgewicht bei einer Stimulation durch LPS deutlich auf der Seite des proinflammatorischen IL-1 $\beta$ .

Obwohl *C. pneumoniae* ein obligat gramnegatives Bakterium mit einer LPS-Komponente ist, konnten Netea et al. zeigen, dass die Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach der Infektion mit *C. pneumoniae* in mononukleären Zellen über den TLR-2 erfolgt und TLR-4 nur eine untergeordnete Rolle spielt (73). Prebeck et al. demonstrierten ebenso, dass die Pathogen-Erkennung in vitro hauptsächlich über den TLR-2 und nicht wie zu erwarten über den TLR-4 erfolgt (78). Dies mag eine Erklärung der differentiellen Zytokinantworten bei einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Stimulation mit LPS in den aktuellen Daten sein.

Die Regulation antiinflammatorischer Zytokine zeigte in AM im Vergleich zwischen Rauchern und Nichtrauchern nach einer Stimulation durch LPS bislang inkonstante Ergebnisse. So war in der Studie von Mikuniya et al. eine signifikant geringere Sekretion von IL-1RA bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern nachweisbar (67), während Chen et al. keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sekretionsraten als auch der Expression der mRNA belegen konnte (22). Für die Infektion von AM rauchender Probanden mit *C. pneumoniae* war keine Affektion der Balance zwischen dem proinflammatorischen IL-1 $\beta$  und seinem antiinflammatorischen Gegenspieler IL-1RA darstellbar (85).

Insgesamt ist bei den Daten immer zu berücksichtigen, dass eine vermehrte Expression bestimmter Gene nicht automatisch zu einer vermehrten Zytokinsekretion führt, da die dazwischenliegenden Signaltransduktionswege unberücksichtigt bleiben.

So konnten zwischenzeitlich Christian et al. (23) aufzeigen, dass der von *C. pneumoniae* gebildete CPAF (chlamydial Protease-like Activity Factor) den p65 Anteil des NF $\kappa$ B nach der Translation spalten kann.

## **Vergleich der antiapoptotischen Regulation humaner primärer Alveolarmakrophagen und Blutmonozyten nach der Infektion mit *C. pneumoniae***

In der Eradikation viraler und bakterieller Pathogene kann die Apoptose einen positiven oder negativen Effekt ausüben. Bei Infektionen mit intrazellulären Erregern, in denen das Pathogen die Wirtszelle als Lebensgrundlage benötigt, stellt die Apoptose einen effektiven Mechanismus der Wirtszelle gegen das Pathogen dar.

So wird die Induktion der Apoptose der Wirtszelle als bakteriell induzierter Mechanismus sowohl für eine Vielzahl intra- als auch extrazelluläre Bakterien wie zum Beispiel bei *Shigella flexneri* (112), *Neisseria meningitidis* (71) und *Yersinia enterocolitica* (68) beschrieben. In respiratorischen Infektionen mit intrazellulären Bakterien, in denen der Erreger die Wirtszellen als Lebensgrundlage benötigt, wie zum Beispiel *Mycobacterium tuberculosis* oder *C. pneumoniae*, kann die Induktion der Apoptose einen Abwehrmechanismus der Wirtszelle gegen das Pathogen darstellen (11).

Für die Infektion mit *C. pneumoniae* konnte in den vorhergehenden Studien in vitro eine Inhibition der Apoptose verschiedener Wirtszellen (Epithelzellen (34, 80), AM (4), neutrophiler Granulozyten (110) und primärer Blutmonozyten (3, 103) aufgezeigt werden. Die apoptotischen Signaltransduktionsmechanismen unterscheiden sich in Abhängigkeit von der Wirtszelle. So konnte für alveoläre Epithelzellen dargelegt werden, dass eine Überexpression des zum mitochondrialen Apoptosemechanismus zählenden Bcl-2 eine Inhibition der Apoptose induziert.

Exemplarisch konnte in unserer Studie an einem Experiment mittels Immunfluoreszenzmikroskopie in *C. pneumoniae*-infizierten Alveolarmakrophagen eine verminderte Apoptoserate ermittelt werden. Auffällig war jedoch der sehr hohe Anteil an den sog. spätapoptotischen Zellen, die fluoreszenzmikroskopisch in einem Übergang zur Nekrose zu befunden waren. Dies kann darin begründet liegen, dass die AM direkt aus der Lunge entstammten und somit im Rahmen des Versuchsaufbaus vulnerabler waren, als die Zellkulturlinie U-937, die in den vorhergehenden Studien verwendet wurden.

Natürlich ist dieser einzelne Versuch nicht als Beweis einer Inhibition der Apoptose durch *C. pneumoniae* zu werten. Dies konnte jedoch durch Fischer et al. (34) zwischenzeitlich nachgewiesen werden. Der antiapoptotische Mechanismus wird als

Degradation der proapoptischen BH3 Proteine und eine daraus entstehende konsekutive Inhibition der Zytochrom c-Freisetzung beschrieben. In der Literatur konnte zwischenzeitlich auch gezeigt werden, dass das antiapoptische Bcl-2 Familienmitglied MCL-1 einen entscheidenden Regulator in der Inhibition der Apoptose durch *C. trachomatis* darstellt (81).

In der Betrachtung der transkriptionellen Ergebnisse zeigte sich für Bcl-2 nach einer Infektionszeit von 2 h mit *C. pneumoniae* eine verstärkte Expression der mRNA im Vergleich zu den unstimulierten primären AM und Monozyten, was als Hinweis auf eine Inhibition der Apoptose zu werten ist (39).

Bislang war ein extrinsischer antiapoptischer Regulationsmechanismus nur durch Wahl et al. über eine NF $\kappa$ B-Aktivierung mit *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten-Zelllinie (Mono Mac 6) dargestellt worden (104). Über eine vermehrte Transkription von TNF- $\alpha$  ist über die Interaktion mit dem TNF-Rezeptor II eine vermehrte Aktivierung von IKK $\alpha\beta$  zu postulieren, die zu einer Phosphorylierung des I $\kappa$ B führt, sodass im Folgenden NF $\kappa$ B die Zellmembran passieren kann.

Zu berücksichtigen ist jedoch, dass sowohl in den aktuellen, als auch in den Ergebnissen von Wahl et al. (104), die Induktion der verschiedenen Typen der TNF-Rezeptoren (I und II) als auch die folgende Signaltransduktionskaskaden via MAP-Kinasen keine näheren Betrachtungen fand. Hier sind sicherlich weitere Studien notwendig, um die diffizilen Regulationsmechanismen weiter auszuleuchten.

### **LPS Stimulation als Modell der chronischen Inflammation der COPD**

Hoogerwerf et al. konnten in vivo nach der Instillation von LPS in die Lunge bei humanen AM eine vermehrte Entzündungsreaktionen nachweisen (53). LPS als Komponente gramnegativer Bakterien ist ein bekannter Induktor des TLR-4, der auf humanen AM als obligate Wirtszellen bei respiratorischen Infektionen mit dem gramnegativen Bakterium *C. pneumoniae* exprimiert wird.

Die COPD ist, als eine der wichtigsten obstruktiven Atemwegserkrankung mit zunehmender Inzidenz, im klinischen Verlauf v.a. durch rezidivierende Exazerbationen gekennzeichnet. Die Exazerbationsrate ist abhängig von der chronisch systemischen Entzündung als auch von der Anzahl der Exazerbationen in der Vorgeschichte sowie

der Limitation der Einsekundenkapazität (43). Akute Infektionen als auch chronische Kolonisationen mit bakteriellen und viralen Pathogenen scheinen in diesem Zusammenhang von Bedeutung zu sein. Die genauen Mechanismen der pulmonalen Entzündungsmechanismen der COPD v.a. während der Exazerbationen sind bislang aber nicht ausreichend erklärt.

Vor diesem Hintergrund war in dem in dieser Arbeit vorgestellten Infektionsmodell, in dem die humanen AM und peripheren Blutmonozyten in vitro zunächst mit LPS vorstimuliert wurden nach der Infektion mit *C. pneumoniae* eine deutlich verstärkte Expression proinflammatorischer Faktoren (ICE, NF $\kappa$ B und TNF- $\alpha$ ) in einer sehr frühen Infektionsphase (15 min) im Vergleich zu den nicht vorstimulierten Zellen nachzuweisen. Dies erfolgte unter der Vorstellung einer Simulation der chronisch entzündlichen Situation bei COPD. Im weiteren zeitlichen Verlauf war jedoch zum Infektionszeitpunkt von 30 min eine vermehrte Expression von Bcl-2 und I $\kappa$ B bei gleichzeitig unbeeinflusster Expression von ICE, TNF- $\alpha$  und NF $\kappa$ B aufzuzeigen. Es scheint daher, dass insgesamt die vorstimulierten Zellen nicht in der Lage sind eine persistierende inflammatorische Reaktion auf eine Infektion mit *C. pneumoniae* aufrechtzuerhalten bzw. aufzubauen. Übertragen auf das COPD-Modell lässt sich daher postulieren, dass sich durch die chronische Entzündung im Rahmen der Erkrankung AM keine ausreichende Entzündungsreaktion auf eine Infektion mit *C. pneumoniae* im Rahmen der Immunabwehr entwickeln kann und somit eine Eradikation des Pathogens vermindert ist. In der Folge kann so die Entwicklung chronischer Infektionen diskutiert werden.

### **Vergleich pro- und antiinflammatorischer als auch pro- und antiapoptotischer Faktoren bei rauchenden Probanden und COPD Patienten**

Die Mechanismen der pulmonalen Entzündung der COPD vor allem während der Exazerbationen sind wie oben bereits erwähnt bisher nicht vollständig geklärt.

So sind akute Infektionen als auch chronische Kolonisationen mit den klassischen pyogenen Erregern (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Moxarella catarrhalis*) (49) als auch den atypischen Bakterien *Mycoplasma pneumoniae* und *Chlamydia pneumoniae* (56, 70, 90, 94) im Rahmen der Unterhaltung einer pulmonalen Entzündung zu betrachten. Eine Assoziation von *C. pneumoniae* und aku-

ten Exazerbationen einer COPD konnte mit 4 bis 34% in mehreren Studien dargelegt werden (14, 56, 69, 76).

Auch in stabilen Erkrankungsintervallen war der Nachweis von *C. pneumoniae* in 24-38% im Sinne einer chronischen Kolonisation möglich (16, 88). Die Spannweite der Ergebnisse ist sicherlich neben den Differenzen in den Zellpopulationen und epidemiologischen Unterschieden auch auf die verwendeten indirekten serologischen Nachweisverfahren zur Detektion einer *C. pneumoniae*-Infektion (ELISA, MIF, EIA) in den einzelnen Studien sowie den hohen Seroprävalenzraten (bis zu 80% in der erwachsenen Bevölkerung) zurückzuführen (30, 40).

Die aktuellen Ergebnisse der CAP-Netz-Studie konnten die Bedeutung von *C. pneumoniae* in der Genese der ambulant erworbenen Pneumonie im Vergleich zu vorhergehenden Studien nicht bestätigen (105), sodass auch für die COPD die Daten bezüglich Infektion und Kolonisation weiter beobachtend zu werten sind. Die Studie von Diederer et al. (26) konnte an Sputumproben mittels Real-time-PCR sowohl in stabilen Erkrankungsphasen als auch in einer akuten Exazerbation bei COPD Patienten (Schweregrad I und II nach GOLD Klassifikation) keinen Nachweis von *C. pneumoniae* als auch *Mycoplasma pneumoniae* erbringen. Es scheinen jedoch epidemiologische Wellen hinsichtlich der Infektionsraten mit *C. pneumoniae* zu existieren, die in den einzelnen Studien keine Berücksichtigung fanden (58).

Die nachfolgenden Daten der vorliegenden Studie können sicherlich, aufgrund der nur kleinen Fallzahl, kein Kollektiv an COPD Patienten repräsentieren. Vielmehr stellen diese einen Versuch da, die Daten aus dem zuvor vorgestellten in vitro Infektionsmodell zu unterstützen und in den wissenschaftlichen Kontext einer COPD-Erkrankung zu übertragen.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die Infektion von AM der COPD-Patienten mit *C. pneumoniae* in der sehr frühen Phase einer Infektion (15 min) zu einer Tendenz der gesteigerten Aktivierung von I $\kappa$ B ohne begleitende gegenregulatorische NF $\kappa$ B-Antwort führt.

In der Studie von Aaron (1) konnte gezeigt werden, dass bei nachgewiesener Infektion im Rahmen der Exazerbation der Anstieg für TNF- $\alpha$  im Sputum signifikant geringer war als bei den Patienten ohne Infektion. Es konnte weiter dargestellt werden, dass der TLR-2 als hauptsächlicher Interaktionspartner für *C. pneumoniae* in vitro dient (73, 78). Im Vergleich von COPD Patienten, gesunden rauchenden und nicht-rauchenden Probanden, konnte für die COPD-Patienten und Raucher eine vermin-

derte Expression von TLR-2 Rezeptoren auch nach Exposition von LPS nachgewiesen werden (29). Da wie zuvor dargestellt, die TLR-2 Expression und damit die NF $\kappa$ B-Aktivierung bei COPD Patienten vermindert ist, ist zu vermuten, dass, im Rahmen des Modells des TNF- $\alpha$ -Signalings, die Infektion von AM mit *C. pneumoniae* in einer frühen Phase der Infektion zu einer Hemmung der proinflammatorischen regulativen Antwort über NF $\kappa$ B führt. Konsekutiv ergibt sich so der Verdacht, dass die Infektion mit *C. pneumoniae* zunächst zu einer Hemmung der systemischen Entzündung bei COPD Patienten führt und somit eine Abwehrreaktion des Organismus kurzfristig inhibiert.

Jedoch war dieser antiinflammatorische Regulationsmechanismus bereits nach 30 min vollständig aufgehoben. Es waren auch im weiteren zeitlichen Verlauf (nach 30 min und 2 h) keine Unterschiede in der Signaltransduktion bezüglich der untersuchten Faktoren des TNF-Signalings nach Infektion der humanen AM mit *C. pneumoniae* nachweisbar.

Im Vergleich zwischen den COPD-Patienten und den gesunden rauchenden Probanden zeigten die unstimulierten AM die Tendenz eines erhöhten basalen Stimulationsniveaus bezüglich aller untersuchten Faktoren des TNF-Pathways. Insbesondere verdeutlichte sich dies am Beispiel von NF $\kappa$ B. Insgesamt spiegelt sich hierin die bekannte insgesamt erhöhte systemische Entzündung bei COPD Patienten wider. Die zur Eingrenzung der Entzündung im Rahmen pulmonaler Infektionen notwendigen ausgeglichenen pro – und antiinflammatorische Mechanismen werden dadurch aus dem Gleichgewicht gebracht.

Unterstützt wird dies durch die Ergebnisse einer vorangegangenen Studie, die aufzeigen konnte, dass die Infektion von humanen mononukleären Zellen mit *C. pneumoniae* in vitro zu einer unausgeglichenen Sekretion von IL-1 $\beta$  und seinem physiologischen Gegenspieler IL-1RA führt. Durch die verminderte Sekretion von IL-1 $\beta$  besteht somit bei den COPD-Patienten eine verminderte Möglichkeit die Balance zwischen Proinflammation und Antiinflammation aufrechtzuerhalten. Es entsteht ein proinflammatorisches Übergewicht (85).

Daher sind die Daten eines kurzfristigen Übergewichtes bezüglich I $\kappa$ B als noch vorhandene mögliche Gegenregulation im Rahmen der frühen Infektionsphase zu interpretieren, die im Verlauf der Infektion mit *C. pneumoniae* aufgehoben wird.

In der aktuellen Studie konnten wir die Bedeutung der untersuchten Faktoren der TNF- $\alpha$ -Signalwege -insbesondere des NF $\kappa$ B- in der immunologischen Antwort humaner AM und peripherer Blutmonozyten auf eine *C. pneumoniae*-Infektion darstellen. Die genauen Signaltransduktionsmechanismen über das MAP-Kinasen-System blieben jedoch unberücksichtigt. Weitere Studien zur Klärung dieser Aspekte können nach den vorliegenden Daten auch an einem Infektionsmodell erfolgen, das in einer Vorstimulation mit LPS die chronische Entzündungssituation der COPD simuliert.

## 6. Zusammenfassung

Die Bedeutung von *C. pneumoniae* in der Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) wird kontrovers diskutiert. Proinflammatorische und antiapoptotische Prozesse stehen im Fokus der aktuellen pathogenetischen Modelle der Erkrankungsentstehung und -progression der COPD.

Ziel dieser Studie war die Evaluation der Bedeutung einzelner Faktoren (ICE, TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B, Bcl-2, I $\kappa$ B) der TNF-Signalwege. Hinsichtlich pro-/antiinflammatorischer als auch pro-/antiapoptotischer Prozesse wurden humanen Monozyten und AM nach Infektion mit *C. pneumoniae* mittels einer Multiplex PCR bei gesunden rauchenden Probanden untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte für AM gesunder rauchender Probanden bereits in einer frühen Phase einer *C. pneumoniae*-Infektion eine verstärkte Transkription des proinflammatorischen Regulators NF $\kappa$ B, welcher über I $\kappa$ B reguliert ist, nachgewiesen werden. Begleitend war eine vermehrte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8 zu dokumentieren.

Ebenfalls in dieser frühen Infektionsphase konnte eine vermehrte Expression von Bcl-2 aufgezeigt werden. Eine vermehrte Bcl-2 Expression inhibiert die Wirtszelle-Apoptose über die intrinsischen Signaltransduktionskaskaden. Die Hochregulation des NF $\kappa$ B, welcher auch antiapoptotische Eigenschaften über die extrinsischen Signaltransduktionskaskaden besitzt, spricht ebenfalls für eine antiapoptotische Immunantwort.

In der Spätphase der Infektion in *C. pneumoniae*-infizierten AM war eine proinflammatorische Immunantwort über die vermehrte Transkription von ICE und der Sekretion von IL-1 $\beta$ , abhängig von der Infektionsdosis, zu erkennen. In der Apoptoseregulation besitzt ICE sowohl pro- als auch antiapoptotische Funktionen. ICE aktiviert auf der einen Seite Caspase 3 (proapoptotisch), auf der anderen Seite wirkt es durch die Aktivierung von IL-1 $\beta$  und nachfolgend NF $\kappa$ B, antiapoptotisch. Die initiale NF $\kappa$ B-Antwort der AM war in dieser Phase nicht mehr nachzuweisen, wobei jedoch gleichzeitig eine verminderte Expression von I $\kappa$ B aufzuzeigen war, welches NF $\kappa$ B inhibieren kann.

Im Vergleich hierzu war bei den humanen Monozyten eine veränderte Regulation zu beobachten. So zeigte sich nach einer Überexpression von I $\kappa$ B keine vermehrte NF $\kappa$ B Antwort im zeitlichen Verlauf. Die Sekretion der Zytokine wies jedoch eine höhere IL-1 $\beta$  /IL-1RA Ratio bei den Monozyten im Vergleich zu den AM auf. Dies war insbesondere vor dem Hintergrund der fehlenden unterschiedlichen Expression von ICE bei AM und Monozyten auffällig. Die Daten unterstreichen die zentrale Bedeutung der immunregulatorischen Funktionen von AM.

Die AM der COPD-Patienten sind durch die chronische Vorstimulation nicht in der Lage, reguliert über den NF $\kappa$ B-Weg, auf eine Infektion von *C. pneumoniae* zu reagieren. Dies war auch in dem Infektions-Modell mit einer Vorstimulation mit LPS zur Simulation der chronischen Entzündung im Rahmen der COPD nachweisbar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass AM gesunder Probanden auf eine Infektion mit *C. pneumoniae* mit einer proinflammatorischen und antiapoptotischen Antwort reagieren, die über den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B als auch über Bcl-2 reguliert wird.

## 7. Referenzen

- 1 Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Fex C, Le Saux N, Dales RE. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 349-55
- 2 Airene S, Surcel HM, Alakärppä H, Laitinen K, Paavonen J, Saikku P, Laurila A. *Chlamydia pneumoniae* infection in human monocytes. *Infect Immun* 1999; 67: 1445-9
- 3 Airene S, Surcel HM, Bloigu A, Laitinen K, Saikku P, Laurila A. The resistance of human monocyte derived macrophages to *Chlamydia pneumoniae* infection is enhanced by interferon-gamma. *APMIS* 2000; 108: 139-44
- 4 Airene S, Surcel HM, Tuukkanen J, Leinonen M, Saikku P. *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cell lines. *Scand J Immunol* 2002; 55: 390-8
- 5 Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell and Tissue Research* 2001; 306: 347-61
- 6 Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 2007; 40: 97-112
- 7 Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappaB in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-79
- 8 Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22: 672-88
- 9 Bazzoni F, Beutler B. The Tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Eng J Med* 1996; 334: 1717-25
- 10 Beaty CD, Graystone JT., Wang SP., Kuo CC., Reto CS., Martin TR. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, infection in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1408-10
- 11 Behnia M, Robertson KA, Martin WJ 2<sup>nd</sup>. Lung infection: Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *CHEST* 2000; 117: 1771-7
- 12 Birkebaek NH, Jensen JS, Seefeldt T, Degn J, Huniche B, Andersen PL, Ostergaard L. *Chlamydia pneumoniae* infection in adults with chronic cough compared with healthy blood donors. *Eur Respir J* 2000; 16: 108-11
- 13 Blackwell TS, Christman JW. The Role of nuclear factor kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell and Mol Biol* 1997; 17: 3-9

- 14** Blasi F, Legnani D, Lombardo VM, Negretto GG, Magliano E, Pozzoli R, Chiodo F, Fasoli A, Allegra L. *Chlamydia pneumoniae* infection in acute exacerbations of COPD. *Eur Respir J* 1993; 6: 19-22
- 15** Blasi F, Allegra L, Centanni S, Cosentini R, Denti F, Raccanelli R, Tarsia P, Valenti V. Acute exacerbations of asthma in adults: role of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Eur Respir J* 1994; 7: 2165-8
- 16** Blasi F, Cosentini R, Tarsia P. *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. *Curr Opin Infect Dis* 2000; 13: 161-4
- 17** Blasi F, Damato S, Cosentini R, Tarsia P, Raccanelli R, Centanni S, Allegra L. Chlamydia InterAction with COPD (CIAC) Study Group. *Chlamydia pneumoniae* and chronic bronchitis: association with severity and bacterial clearance following treatment. *Thorax* 2002; 57: 672-6
- 18** Blusse van Oud Alblas A, van Furth R. The origin of pulmonary macrophages. *Immunobiol* 1982; 161: 186-92
- 19** Brannen AL, Chandler DB. Alveolar macrophage subpopulation's responsiveness to chemotactic stimuli. *Am J Pathol* 1988; 132: 161-6
- 20** Caamaño J, Hunter CA. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 414-29
- 21** Chen G, Goeddel DV. TNF-R1: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296: 1634-5
- 22** Chen H, Cowan MJ, Hasday JD, Vogel SN, Medvedev AE. Tobacco smoking inhibits expression of proinflammatory cytokines and activation of IL-1R-associated kinase, p38, and NF-kappaB in alveolar macrophages stimulated with TLR2 and TLR4 agonists. *J Immunol* 2007; 179: 6097-106
- 23** Christian J, Vier J, Paschen S.A, Häcker G. Cleavage of the NFκB Family Protein p65/RelA by the Chlamydial Protease-like Activity Factor (CPAF) impairs Proinflammatory Signaling in Cells Infected with Chlamydiae. *J Biol Chem* 2010; 285: 41320-41327
- 24** Ciesielski CJ, Andreakos E, Foxwell BM, Feldmann M. TNFalpha induced macrophage chemokine secretion is more dependent on NFκB than Lipopolysaccharides induced macrophage chemokine secretion. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2037-45
- 25** Dalhoff K, Maas M. *Chlamydia pneumoniae* Pneumonia in hospitalized patients clinical characteristics and diagnostic value of polymerase chain reaction detection in BAL. *CHEST* 1996; 110: 351-6
- 26** Diederens BM, van der Valk PD, Kluytmans JA, Peeters MF, Hendrix R. The role of atypical respiratory pathogens in exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur Respir J* 2007; 30: 240-4

- 27** Domagala-Kulawik J. Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59: Suppl 6 19-34
- 28** Doz E, Noulin N, Boichot E, Guénon I, Fick L, Le Bert M, Lagente V, Ryffel B, Schnyder B, Quesniaux VF, Couillin I. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J Immunol* 2008; 180: 1169-78
- 29** Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B. Toll like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. *Respir Res* 2005; 6: 68
- 30** Droemann D, Rupp J, Goldmann T, Uhlig U, Branscheid D, Vollmer E, Kujath P, Zabel P, Dalhoff K. Disparate innate immune responses to persistent and acute *Chlamydia pneumoniae* infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 791-7
- 31** Eigler A, Loher F, Endres S. Suppression der Synthese des TNF. *Der Internist* 2001; 42: 28-34
- 32** Fan T, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty GA, Nance DM, Greenberg AH, Zhong G. Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med* 1998; 187: 487-96
- 33** Fischer SF, Schwarz C, Vier J, Häcker G. Characterization of Antiapoptotic Activities of *Chlamydia pneumoniae* in Human Cells. *Infect Immun* 2001; 69: 7121-9
- 34** 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: 905-16
- 35** Friedlander RM, Gagliardini V, Rotello RJ, Yuan J. Functional role of interleukin 1 beta (IL-1 beta) in IL-1 beta-converting enzyme-mediated apoptosis. *J Exp Med* 1996; 184: 717-24
- 36** Gaschler GJ, Zavitz CC, Bauer CM, Skrtic M, Lindahl M, Robbins CS, Chen B, Stämpfli MR. Cigarette smoke exposure attenuates cytokine production by mouse alveolarmacrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 38: 218-26
- 37** Geng Y, Shane RB, Berencsi K, Gonczol E, Zaki MH, Margolis DJ, Trinchieri G, Rook AH. *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells through induction of IL-10. *J Immunol* 2000; 164: 5522-9
- 38** 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: 506-10
- 39** Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, McManus BM. Apoptosis: Molecular aspects of cell Death and disease. *Lab Invest* 1998; 78: 893-913

- 40** Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH, Wang SP. A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. J Infect Dis 1990; 161: 618-25
- 41** Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR pneumonia. Ann Rev Med 1992; 43: 317-23
- 42** Grayston JT, Aldous MB, Easton A, Wang SP, Kuo CC, Campbell LA, Altman J. Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. J Infect Dis 1993; 168: 1231-5
- 43** Groenewegen KH, Postma DS, Hop WC, Wielders PL, Schlösser NJ, Wouters EF. COSMIC Study Group. Increased Systemic Inflammation Is a Risk Factor for COPD Exacerbations. CHEST 2008; 133: 350-7
- 44** Gunella G, Bardelli C, Amoruso A, Viano I, Balbo P, Brunelleschi S. Macrophage-stimulating protein differently affects human alveolar macrophages from smoker and non-smoker patients: evaluation of respiratory burst, cytokine release and NF-kappaB pathway. Br J Pharmacol 2006; 148: 478-89
- 45** Haranaga S, Yamaguchi H, Ikejima H, Friedman H, Yamamoto Y. *Chlamydia pneumoniae* infection of alveolar macrophages: a model. J Infect Dis 2003; 187: 1107-15
- 46** Hasday JD, Bascom R, Costa JJ, Fitzgerald T, Dubin W. Bacterial Endotoxin is an Active Component of Cigarette Smoke. CHEST 1999; 115: 829-35
- 47** Hehlhans T, Männel DN. The TNF-TNF receptor system. Biol Chem 2002; 383: 1581-5
- 48** Heinemann M, Susa M, Simnacher U, Marre R, Essig A. Growth of *Chlamydia pneumoniae* induces cytokine production and expression of CD14 in a human monocytic cell line. Infect Immun 1996; 64: 4872-5
- 49** Hirschmann JV. Do Bacteria Cause Exacerbations of COPD? CHEST 2000; 118: 1
- 50** Hocking WG, Golde DW. The pulmonary alveolar macrophage (First of two parts). N Engl J Med 1979; 301: 580-7
- 51** Hocking WG, Golde DW. The pulmonary alveolar macrophage (Second of two parts). N Engl J Med 1979; 301: 639-45
- 52** Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The Nature of small airway obstruction in COPD. N Engl J Med 2004; 350: 2645-53
- 53** Hoogerwerf JJ, de Vos AF, Bresser P, van der Zee JS, Pater JM, de Boer A, Tanck M, Lundell DL, Her-Jenh C, Draing C, von Aulock S, van der Poll T. Lung Inflammation Induced by Lipoteichoic Acid or Lipopolysaccharide in Humans. Am J Respir Crit Care Med 2008; 178: 34-41

- 54** Jahn HU, Krüll M, Wuppermann FN, Klucken AC, Rosseau S, Seybold J, Hegemann JH, Jantos CA, Suttorp N. Infection and activation of airway epithelial cells by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 2000; 182: 1678-87
- 55** Johnston SL, Martin RJ. *Chlamydothila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*: A Role in Asthma Pathogenesis? *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1078-89
- 56** Karnak D, Beng-sun S, Beder S, Kayacan O. *Chlamydia pneumoniae* infection and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respir Med* 2001; 95: 811-6
- 57** Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84: 1415-20
- 58** Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 568-76
- 59** Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 451-61
- 60** La Verda D, Byrne GI. Interactions between macrophages and chlamydiae. *Immunology Series* 1994; 60: 381-99
- 61** Mamata Y, Hakki A, Yamamoto Y, Newton C, Klein TW, Pross S, Friedman H. Nicotine modulates cytokine production by *Chlamydia pneumoniae* infected human peripheral blood cells. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 749-56
- 62** Mamata Y, Hakki A, Newton C, Burdash N, Klein TW, Friedman H. Differential effects of *chlamydia pneumoniae* infection on cytokine levels in human T-lymphocyte and monocyte derived cell cultures. *Int J Med Microbiol* 2007; 297: 109-15
- 63** Mangan DF, Welch GR, Wahl SM. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1991; 146: 1541-6
- 64** Markoulatos P, Sifakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal* 2002; 16: 47-51
- 65** Marrie TJ. *Chlamydia pneumoniae*. *Thorax* 1993; 48: 1-4
- 66** McCrea KA, Ensor JE, Nall K, Bleecker ER, Hasday JD. Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 696-703
- 67** Mikuniya T, Nagai S, Tsutsumi T, Morita K, Mio T, Satake N, Izumi T. Proinflammatory or Regulatory Cytokines Released from BALF Macrophages of Healthy Smokers. *Respiration* 1999; 66:419-26

- 68** Mills SD, Boland A, Sory MP, van der Smissen P, Kerbouch C, Finlay BB, Cornelis GR. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. Proc Nat Acad Sci USA 1997; 94: 12638-43
- 69** Miyashita N, Niki Y, Nakajima M, Kawane H, Matsushima T. *Chlamydia pneumoniae* Infection in Patients With Diffuse Panbronchiolitis and COPD. CHEST 1998; 114: 969-71
- 70** Mogulkoc N, Karakurt S, Isalska B, Bayindir U, Celikel T, Korten V, Colpan N. Acute Purulent Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and *Chlamydia pneumoniae* Infection. Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 349-53
- 71** Müller A, Günther D, Dux F, Naumann M, Meyer TF, Rudel T. Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. EMBO J 1999; 18: 339-52
- 72** Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, Manoj Kumar PP, Mantovani A. Toll-like receptor family and signalling pathway. Biochem Soc Trans 2000; 28: 563-6
- 73** Netea MG, Kullberg BJ, Galama JM, Stalenhoef AF, Dinarello CA, Van der Meer JW. Non LPS components of *Chlamydia pneumoniae* stimulate cytokine production through Toll-like Receptor 2 dependent pathways. Eur J Immunol 2002; 32: 1188-95
- 74** Nicod LP. Pulmonary Defence Mechanisms. Respir 1999; 66: 2-11
- 75** Ojcius DM, Souque P, Perfettini JL, Dautry-Varsat A. Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia psittaci*. J Immunol 1998; 161: 4220-6
- 76** Park SJ, Lee YC, Rhee YK, Lee HB. Seroprevalence of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in stable asthma and COPD. J Korean med Sci 2005; 20: 225-8
- 77** Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character and severity of COPD exacerbation. Thorax 2002; 57: 759-64
- 78** Prebeck S, Kirschning C, Dürr S, da Costa C, Donath B, Brand K, Redecke V, Wagner H, Miethke T. Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in *Chlamydia pneumoniae*-induced activation of dendritic cells. J Immunol 2001; 167: 3316-23
- 79** Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary. Am J Respir Crit Care Med 2007; 176: 532-55

- 80** Rajalingam K, Al-Younes H, Müller A, Meyer TF, Szczepek AJ, Rudel T. Epithelial cells infected with *Chlamydia pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*) are resistant to apoptosis. *Infect Immun* 2001; 69:7880-8
- 81** Rajalingam K., Sharma M, Lohmann C, Oswald M, Thieck O, Froelich CJ, Rudel T. MCL-1 is a key regulator of apoptosis resistance in *Chlamydia trachomatis* - infected cells; *PLoS ONE* 2008; 3(9): e3102
- 82** Redecke V, Dalhoff K, Bohnet S, Braun J, Maass M. Interaction of *Chlamydia pneumoniae* and human alveolar macrophages: infection and inflammatory response; *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19:721-7
- 83** Reed JC. Mechanism of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1415-30
- 84** Ruckdeschel K, Harb S, Roggenkamp A, Hornef M, Zumbihl R, Köhler S, Heesemann J, Rouot B. *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 1998; 187: 1069-79
- 85** Rupp J, Kothe H, Mueller A, Maass M, Dalhoff K. Imbalanced secretion of IL-1 $\beta$  and IL-1RA in *Chlamydia pneumoniae*-infected mononuclear cells from COPD patients. *Eur Respir J* 2003; 22: 274-9
- 86** Sarir H, Mortaz E, Karimi K, Kraneveld AD, Rahman I, Caldenhoven E, Nijkamp FP, Folkerts G. Cigarette smoke regulates the expression of TLR4 and IL-8 production by human macrophages. *J Inflammation (London)* 2009; 6: 12
- 87** Sävykoski T, Harju T, Paldanius M, Kuitunen H, Bloigu A, Wahlström E, Ryttilä P, Kinnula V, Saikku P, Leinonen M. *Chlamydia pneumoniae* infection and inflammation in adults with asthma. *Respiration* 2004; 71: 120-5
- 88** Seemungal TA, Wedzicha JA, MacCallum PK, Johnston SL, Lambert PA. *Chlamydia pneumoniae* and COPD exacerbation. *Thorax* 2002; 57: 1087-89
- 89** Sethi S. Infectious Etiology of Acute Exacerbations of Chronic Bronchitis. *CHEST* 2000; 117: 380-5S
- 90** Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in COPD in 2000: a state of the art review. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 336-63
- 91** Shu HB, Takeuchi M, Goeddel DV. The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13973-78
- 92** Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 471-501
- 93** Sköld CM, Lundahl J, Halldén G, Hallgren M, Eklund A. Chronic smoke exposure alters the phenotype pattern and the metabolic response in human alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 1996; 106: 108-13

- 94** Soler N, Torres A, Ewig S, Gonzalez J, Celis R, El-Ebiary M, Hernandez C, Rodriguez-Roisin R. Bronchial microbial patterns in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) requiring mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1498-05
- 95** Soler N, Ewig S, Torres A, Filella X, Gonzalez J, Zaubet A. Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive disease. *Eur Respir J* 1999; 14: 1015-22
- 96** Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest* 2002; 109: 699-05
- 97** Tak PP, Firestein GS. NFkappa B: a key role in inflammatory disease. *J Clin Invest* 2001; 107: 7-11
- 98** Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Yamamoto K, Fujimoto K, Satoh K, Okamura K. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J* 1999; 14: 309-14
- 99** Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Meth* 1995; 184: 39-51
- 100** Voet D/ Voet J.G./ Pratt C.W. Lehrbuch für Biochemie. 2002: 2.Auflage, Seite:826-7 Exkurs 24-2, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim
- 101** Voet D /Voet J.G./ Pratt C.W. Lehrbuch für Biochemie. 2002; 2.Auflage, Seite: 416-7, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim
- 102** Vogelmeier C, Buhl R, Criée CP, Gillissen A, Kardos P, Köhler D, Magnussen H, Morr H, Nowak D, Pfeiffer-Kascha D, Petro W, Rabe K, Schultz K, Sitter H, Teschler H, Welte T, Wettengel R, Worth H. Deutsche Atemwegsliga; Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. zur Diagnostik u. Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis u. Lungenemphysem (COPD). *Pneumologie* 2007; 61: e1-40
- 103** Wahl C, Oswald F, Simnacher U, Weiss S, Marre R, Essig A. Survival of *Chlamydia pneumoniae*-Infected Mono Mac 6 Cells Is Dependent on NF-B Binding Activity. *Infect Immun* 2001; 69: 7039-45
- 104** Wahl C, Maier S, Marre R, Essig A. *Chlamydia pneumoniae* induces the expression of inhibitor of apoptosis 2 (c-IAP2) in a human monocytic cell line by an NF-kappaB dependent pathway. *Int J Med Microbiol* 2003; 293: 377-81
- 105** Wellinghausen N, Straube E, Freidank H, von Baum H, Marre R, Essig A. Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in adults with community acquired pneumoniae. *Int J Med Microbiol* 2006; 296: 485-91

- 106** Wolf K, Fischer E, Hackstadt T. Degradation of *Chlamydia pneumoniae* by peripheral blood monocytic cells. *Infect Immun* 2005; 73: 4560-70
- 107** Yamaguchi E, Okazaki N, Itoh A, Abe S, Kawakami Y, Okuyama H. Interleukin 1 production by alveolar macrophages is decreased in smokers. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 397-402
- 108** Yamaguchi E, Itoh A, Furuya K, Miyamoto H, Abe S, Kawakami Y. Release of tumor necrosis factor-alpha from human alveolar macrophages is decreased in smokers. *CHEST* 1993; 103: 479-83
- 109** Zabel P. Tumor Nekrose Faktor alpha: Freund und Feind. *Pneumologie* 1996; 50: 293-302
- 110** Zandbergen G, Gieffers J, Kothe H, Rupp J, Bollinger A, Aga E, Klinger M, Brade H, Dalhoff K, Maass M, Solbach W, Laskay T. *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *J Immunol* 2004; 172: 1768-76
- 111** Zeidel A, Beilin B, Yardeni I, Mayburd E, Smirnov G, Bessler H. Immune response in asymptomatic smokers. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002; 46: 959-64
- 112** Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexnerii* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 1992; 358: 167-9
- 113** Zychlinsky A, Sansonetti P. Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis. *J Clin Invest* 1997; 100: 493-5

## **8. Danksagungen**

Bedanken möchte ich mich bei allen die mich während dieser Arbeit mit praktischer Unterstützung und theoretischen Diskussionen unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. med. J.Rupp für die gesamte Unterstützung, die diese Arbeit erst ermöglicht hat. Insbesondere für unzählige Stunden Diskussionen über den praktischen Versuchsaufbau als auch die theoretischen Zusammenhänge und die hilfreichen Korrekturlesungen. Vor allem jedoch für den steten Glauben an diese Arbeit. Danke!

Herr Prof. Dr. med. Klaus Dalhoff für die Ermöglichung der Arbeit und die Hilfe in klinischen Fragestellungen.

Frau Ute Wegener und Barbara Gogoll für die praktischen fachkundigen Hilfen im Labor.

Herrn Prof. Dr. med. Solbach und dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene für die Möglichkeit der Nutzung der Laborräumlichkeiten.

Einen besonderen Dank auch an meine Familie und Freunde für die Mithilfe, Geduld und moralische Unterstützung während der gesamten Zeit ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## 9. Lebenslauf

---

### **Persönliche Angabe**

- |                       |                    |
|-----------------------|--------------------|
| ▪ Name                | Petra Richter      |
| ▪ Geburtsdatum        | 30.07.1974         |
| ▪ Geburtsort          | Paderborn          |
| ▪ Staatszugehörigkeit | deutsch            |
| ▪ Konfession          | römisch-katholisch |

### **Schulische Ausbildung**

---

1991 Fachoberschulreife Realschule Schloss Neuhaus

### **Berufsausbildung**

---

1991- 1994 abgeschlossene Ausbildung zur Chemielaborantin  
Chemisches Untersuchungsamt, Kreis Paderborn

### **Weitere Schulbildung**

---

1994 – 1997 Allgemeine Hochschulreife; Westfalen Kolleg Paderborn

### **Universitäre Ausbildung**

---

WS 1997 Studium der Humanmedizin: Medizinische Universität zu Lübeck

03/ 2000 Ärztliche Vorprüfung

03/ 2001 1. Staatsexamen

10/ 2003 2. Staatsexamen

05/ 2005 3. Staatsexamen

### **Klinische Ausbildung**

---

**Praktisches Jahr** alle Tertiale am Westküstenklinikum Heide

02 – 05/ 2004 Radiologie; Dr.med. Jagalla

05 – 09/ 2004 Chirurgie; Prof. Dr. med. Kallinowski und Dr. med.  
Lütjens

09/ 2004 – 01/2005 Innere Medizin; Prof. Dr. med. Keck

## Klinische Ausbildung

---

### Weiterbildung zur Fachärztin Innere Medizin/Pneumologie

1.8.2005-31.07.2012 Brüderkrankenhaus St. Josef Paderborn,  
Prof. Dr. med. W. Petermann  
Seit April 2012 Fachärztin für Innere Medizin

Seit dem 1.8.2012 Schön Klinikum Berchtesgadener Land  
Dr. med. K. Kenn  
Weiterbildung Pneumologie

### Ausgewählte Fortbildungen/Qualifikationen:

Einführungskurs Bronchoskopie (Lüdenscheid) 2006  
Einführungskurs Intensivmedizin (Arbeitsgemeinschaft Intensivmedizin e.V., Arn-  
berg) 2007  
Train the Trainer Seminare nach dem NASA und COBRA Schulungsprogramm 2009  
Spiroergometrie Kurs (Arbeitsgemeinschaft Spiroergometrie), Lüneburg 2011

### Veröffentlichungen: Abstracts/Poster

- H.C. Buschmann, P. Richter, R. Kröning, A. Zaruchas, W. Petermann  
EBUS-TBNA in der Diagnostik einer Sarkoidose. 51. Kongress der Deutschen Ge-  
sellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Hannover 2010, P 304
- P. Richter, H.C. Buschmann, E. Jordan, A. Zaruchas, W. Petermann  
Akute Heiserkeit als einziges klinisches Leitsymptom einer Sarkoidose. 52. Kongress  
der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Dresden  
2011, P 40
- P. Richter, H.C. Buschmann, A. Zaruchas, W. Petermann  
Entwicklung einer Sarkoidose nach Interferontherapie bei chronischer Hepatitis B. 52.  
Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.  
Dresden 2011, P 41
- P. Richter, H.C. Buschmann, W. Petermann  
Stellenwert der Spiroergometrie in der primären Funktionsdiagnostik einer Sarkoido-  
se. 53. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedi-  
zin e.V., Nürnberg 2012 P 168

### Mitgliedschaften:

Bund Deutscher Internisten (BDI)  
Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. (DGP)