Die approbierte Originalversion dieser Dissertation ist an der Hauptbibliothek der Technischen Universität Wien aufgestellt (http://www.ub.tuwien.ac.at).

The approved original version of this thesis is available at the main library of the Vienna University of Technology (http://www.ub.tuwien.ac.at/englweb/).

DISSERTATION

Beeinflussung der Genexpression eukaryontischer Zellen durch die Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* und Identifizierung möglicher Zusammenhänge mit der Entstehung von Atherosklerose.

ausgeführt zum Zwecke der Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

an der technischen Universität Wien

vorgelegt von

Mag. Wolfgang Barousch

Gutachter:

Univ. Prof. Dr. Christian P. Kubicek
Univ. Prof. Dr. Alexander M. Hirschl

Wien 2005

Inhaltsangabe

1. **Zusammenfassung** 5

2. **Einleitung** 7
   2.1. *Chlamydia pneumoniae* 7
   2.2. Atherosklerose 9
   2.3. Assoziation von *Chlamydia pneumoniae* und Atherosklerose 11

3. **Fragestellung und Ziele** 13

4. **Material und Methoden** 14
   4.1. Zellkulturen 14
      4.1.1. HEp-2 Zellen 14
      4.1.2. HCAEC 14
   4.2. Bakterien 15
      4.2.1. Chlamydia pneumoniae 15
         4.2.1.1. Präparation der Elementarkörperchen (EBs) 15
         4.2.1.2. Infektionskontrollen 15
         4.2.1.3. Ansatz für die Inaktivierung der EBs 16
         4.2.1.4. Infektion der Zellen mit *C. p.* für Expressionsanalysen 17
      4.2.2. Mycoplasmen 17
   4.3. RNA-Extraktion und Quantifizierung 18
   4.4. DNAse-Verdau 19
   4.5. cDNA-Synthese 19
   4.6. Analyse der cDNA 19
   4.7. Differential Display 22
   4.8. Gen-Array 23
   4.9. QPCR (realtime-PCR) 24
      4.9.1. Primer und Sonden 25
      β-Aktin 27
      Interleukin 8 (IL-8) 28
      Human heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) 30
      Galectin-1 (Gal-1) 31
      Endotheliale Lipase Gen (LIPG) 33
      Lysosomale saure Lipase (LAL) 35
      Cystathionin-β -Synthase (CBS) 37
      Profilin I (PFN1) 39
   4.10. Software 42
   4.11. Puffer, Lösungen und Nährmedien 43

5. **Ergebnisse** 45
   5.1. Ergebnisse der Vorversuche 45
   5.2. Ergebnisse der Expressionsversuche 48
   5.2.1. Ergebnisse des Gen-Array-Versuches 48
   5.2.2. Ergebnisse der QPCR (realtime-PCR) 52

Interleukin 8 (IL-8) 52

Human heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) 55

Galectin1 (Gal-1) 57

Endotheliale Lipase (LIPG) 59

Lysosomale saure Lipase (LAL) 61

Cystathionin-β-Synthase (CBS) 63

Profilin1 (PFN1) 64

6. **Interpretation** 65
6.1. Differential Display 65
6.2. Gen-Array 65
6.3. Expressionsversuche (QPCR) 66
10.3.1. Interleukin 8 (IL- 8) 66
10.3.2. Human heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) 68
10.3.3. Galectin1 (Gal-1) 71
10.3.4. Endotheliale Lipase (LIPG) 71
10.3.5. Lysosomale saure Lipase (LAL) 73
10.3.6. Cystathionin β- Synthase (CBS) 74
10.3.7. Profilin I (PFN1) 75

7. **Schlussfolgerungen** 77

8. **Literaturverzeichnis** 78

9. **Abkürzungen** 89

10. **Verwendete Reagentien** 90

11. **Danksagung** 91

12. **Anhang** 92
12.1. Publikationen 92
12.2. Vorträge und Posterpräsentationen 93

13. **Curriculum vitae** 94

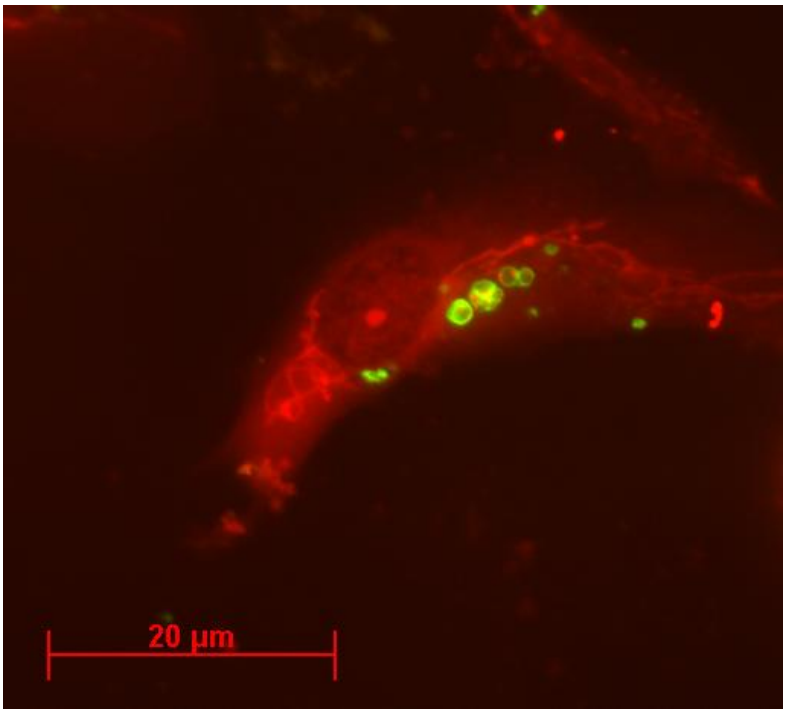

Abbildung 1: Aufnahme einer humanen, koronaren, arteriellen Endothelzelle (HCAEC) mit Einschlusskörperchen (grün) von *Chlamydia pneumoniae* AR-39.

1. Zusammenfassung

Zielsetzung

Ziel dieser Studie war es die Expression von Genen, die bei der Entstehung der Atherosklerose eine Rolle spielen könnten im Anschluss an eine *in vitro*-Infektion durch *Chlamydia pneumoniae* (*C. p.*) zu untersuchen. Der multifaktoriellen Genese der Atherosklerose wurde durch die Wahl der analysierten Gene Rechnung getragen, deren Regulation einerseits die Steuerung des Lipidmetabolismus (LIPG, LAL, PFN1), die Gefäßstruktur (Gal-1), die Apoptose (HB-EGF) , den Homocysteinstoffwechsel (CBS), aber auch eine Entzündungsreaktion (IL-8) beeinflussen kann.

Material und Methode

Die beiden Zellarten (human coronary arterial endothelial cells (HCAEC) und HEp-2) wurden sowohl mit vermehrungsfähigen, als auch UV-inaktivierten *C. p.* infiziert und die Expression der oben genannten Gene mittels real-time RT-PCR zu definierten Zeitpunkten nach der Infektion analysiert.

Ergebnisse

Abhängig von der Zellart konnten für die einzelnen Gene teils divergierende Expressionsmuster festgestellt werden. **LIPG**: in HCAEC nahm die Expression initial (2 hPI) bis auf 45 % ab, stieg dann wieder auf das Ausgangsniveau, um dann bis zum 90 Stunden-Wert nach der Infektion mit vermehrungsfähigen *C. p.* bis auf 66 % abzusinken. Im Gegensatz dazu stieg die Expression in HEp-2 Zellen 24 hPI stark an (18-fach), wobei dieser Effekt aber nur bei UV-inaktivierten Bakterien zu beobachten war. **LAL**: in HCAEC nahm die Expression um das 3-fache zu, fiel zu den späteren Zeitpunkten wieder ab. In den HEp-2 Zellen war kaum eine Reaktion zu registrieren . **PFN1**: die HCAEC zeigten keine Änderung der Expression. **Gal-1**: in HCAEC stieg die Expression nach Infektion mit vermehrungsfähigen EBs 2 hPI auf das 14-fache an. In den HEp-2 Zellen blieb die Expression unverändert . **HB-EGF:** nach einer anfänglichen (1 hPI) Expressionssteigerung sank diese in den HCAEC ab (stärkster Effekt 2 hPI mit vermehrungsfähigen *C. p.*). In den HEp-2 Zellen war die Expression uneinheitlich, z.B. konnte eine Expressionssteigerung nach Infektion mit UV-inaktivierten *C. p.* verzeichnet werden (am stärksten 12 hPI). **CBS**: in HCAEC fand keine signifikante Blockierung der Expression statt. **IL-8:** in beiden Zellarten kam es zu einer verstärkten mRNA Expression, wobei dieser Effekt bei der Infektion mit vermehrungsfähigen *C. p.* in HCAEC 24 hPI am stärksten war (17-fach).

Schlussfolgerungen

Eine proatherogene Aktivität nach Infektion durch *C. p.* konnte für HCAEC anhand einer Abnahme der HB-EGF mRNA und einer Zunahme der IL-8 mRNA und Gal-1 mRNA Expression gezeigt werden. Der Vergleich der Expressionsergebnisse in HCAEC und HEp-2 zeigt, dass bei derartigen Genexpressionsstudien die verwendeten Zellen besonders sorgfältig gewählt werden sollten, da davon abhängig völlig konträre Ergebnisse erzielt werden können.

2. Einleitung

2.1. Chlamydia pneumoniae

Chlamydia pneumoniae (*C. p.*) ist ein kleines, gramnegatives Bakterium mit einem obligat intrazellulären, diphasischen Entwicklungszyklus (Moulder, 1984). Es wurde 1989 von J.T. Grayston als eigene Art der Gattung *Chlamydia* beschrieben (vormals *Chlamydia psittaci* TWAR) (Grayston, 1989), welche weiters die Arten *Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pecorum* umfasste. Die Bezeichnung TWAR kommt von den Laborbezeichnungen der ersten konjunktivalen und respiratorischen Isolate (TW-183 und AR-39) (Kuo, 1995). Taxonomisch gehört *C. p.* innerhalb der Gattung *Chlamydia* zur Familie der *Chlamydiaceae* in der Ordnung der *Chlamydiales.* Ob *C. p.* der Gattung *Chlamydophila* zugeordnet werden soll, wie von Everett vorgeschlagen (Everett, 1999), ist zur Zeit Gegenstand zahlreicher Diskussionen.

C. p. gilt als häufiger Erreger einer Reihe respiratorischer Infektionen wie Pneumonie (Grayston, 1986; Kleemola, 1988; Grayston, 1990), Bronchitis (Grayston, 1986; Grayston, 1990), Pharyngitis (Grayston, 1990), Sinusitis (Grayston, 1990) und eventuell COPD (Blasi, 1993; Von Hertzen, 1996; Mogulkoc, 1999). So reihen die meisten Berichte *C. p.* unter die drei häufigsten Ursachen einer „community-acquired“ Pneumonie, mit einem Vorkommen von 6 % bis 20 % (Grayston, 1990; Almirall, 1993). Die Durchseuchung der Bevölkerung ist hoch. So zeigten Untersuchungen von verschiedenen Altersgruppen, dass ab einem Alter von ca. 6 Jahren eine starke Zunahme der IgG-Seroprävalenz erfolgt, welche in einer Prävalenz von etwa 70 % der Sechzig- bis Achtzigjährigen gipfelt (Grayston, 1990; Kanamoto, 1991; Marton, 1992; Montes, 1992; Grayston 2000)). Dabei kann jeder Mensch im Laufe des Lebens mehrfach mit dem Erreger infizieren (Aldous, 1992; Ekman, 1993). Die Antikörperprävalenz ist weltweit bei erwachsenen Männern um etwa 10 % bis 25 % höher als bei Frauen (Grayston, 1990; Kanamoto, 1991; Grayston 2000). Wie durch seroepidemiologische Untersuchungen gezeigt werden konnte, kommen die *C. p.*-Infektionen sowohl endemisch, als auch epidemisch vor (Grayston, 1990), obwohl die Infektiösität gering ist (Grayston, 1990; Blasi, 1998). Den Ergebnissen einer retrospektiven Studie zufolge führte nur 1 von 9 - 10 Infektionen zu einer Pneumonie (Kleemola, 1988). Dabei ist zu bemerken, dass eine

durch *C. p.* ausgelöste Pneumonie meist mild verläuft (Grayston, 1990), weshalb viele Infektionen nicht als solche erkannt werden.

Die Übertragungen finden primär von Mensch zu Mensch ohne tierischem Reservoir statt (Kleemola, 1988; Grayston, 1990), obwohl mehrere Tierarten infizierbar sind (Saikku, 1998). Primäres Zielorgan für *C. p.* dürfte, auf Grund der Häufigkeit der durch diese Bakterien hervorgerufenen respiratorischen Infektionen, das respiratorische Epithel sein. *In vitro* ist jedoch die Infektion sämtlicher atherogener relevanter Zelltypen wie Endothelzellen (Fryer, 1997; Coombes, 1999; Molestina, 1999; Quinn, 1999; Weiss, 2000; Coombes, 2001), Fibroblasten (Haralambieva, 2002), glatter Muskelzellen (Knoebel, 1997; Dechend, 1999) und Monozyten (Airenne, 1999; Coles, 2001) möglich. Die Replikation des Erregers folgt einem diphasischen Zyklus, der mit der Adhärenz eines infektiösen, sporenartig kompakten und metabolisch inaktiven Elementarkörperchens (EBs) an die eukaryontische Wirtszelle beginnt. Dieses birnenförmige EB hat einen Durchmesser von 250 - 350 nm. Vermutlich durch rezeptorvermittelte Endozytose, der genaue Mechanismus ist aber ungeklärt, gelangt der Erreger in ein Phagosom der Zielzelle. Im Phagosom verweilt das Bakterium während seines gesamten Entwicklungszyklus. Eine Fusion der Phagosomen mit den Lysosomen bleibt aus nicht geklärten Gründen aus. Das EB entwickelt sich im Phagosom zu einem metabolisch aktiven und vermehrungsfähigen Retikularkörperchen (RB). Die Faktoren, welche zur Differenzierung der EBs zu RBs führen sind unbekannt. Kontinuierliche Vermehrung führt zur ständigen Vergrößerung des ursprünglichen Phagosoms (Einschlusskörperchen, inclusion body, IB), wobei nach einigen Tagen die ganze Wirtszelle ausgefüllt wird (Abbildung 1). Der Zyklus schließt sich, indem die Retikularkörperchen wieder kondensieren und durch Zelllyse neu produzierte EBs freigesetzt werden (Schachter, 1988). Ob *C. p.* in Form einer weiteren, dritten Form möglicherweise längere Zeit inaktiv, intrazellulär persistieren kann und bei Bedarf wieder replikationsfähig wird, wäre, vor allem wegen der Fähigkeit des Erregers chronische, aktive Infektionen zu verursachen, denkbar, ist aber nicht bewiesen.

Die Einschlusskörperchen nehmen eine besondere Stellung ein. So kann *C. p.* in drei Einschlussformen vorkommen (Kutlin, 2001):

1) Typische Einschlüsse:
   Ca. 90 % der Einschlüsse; groß (5-12 µm) dichtgepackt mit EBs, wobei auch typische birnenförmige Strukturen beobachtet wurden. Alle enthalten einige RBs.
2) Veränderte Einschlüsse („altered inclusions“):
   Sie enthalten normale EBs und RBs, aber in geringerer Anzahl. Zusätzlich auftretende „Anomale Einschlusskörperchen“ (ABs) erscheinen pleomorph und sind bis zu 4-5 mal so groß wie normale RBs.
3) Anomale Einschlüsse („aberrant inclusions“):
   10 % kleiner (4 µm Durchmesser), als typische Einschlüsse und sind nur mit ABs gefüllt und sind in der Größe ähnlich den normalen RBs.

2.2. Atherosklerose

Die atherosklerotische Gefäßerkrankung mit all ihren kardialen und zerebralen Komplikationen wie Herz- und Hirninfarkt, ist in der westlichen Welt die häufigste Todesursache (Braunwald, 1997). Die häufigste letale Manifestation eines atheroskleroseinduzierten, akuten koronaren Syndroms kommt von Koronarthrombosen. Das sind Gefäßverschlüsse, welche zu 60-80 % der Fälle direkt an der Stelle einer Plaqueruptur und sonst in einem Areal einer oberflächlichen endothelialen Erosion lokalisiert sind (Shah, 1997). Solch eine Ruptur resultiert aus einer Verdünnung und Schwächung der fibrösen Kappe der atherosklerotischen Läsion. Die histologischen Charakteristika in Zusammenhang mit einer Plaqueruptur sind: (a) ein großer, weicher Lipidkern; (b) eine dünne fibröse Kappe; (c) Infiltration von inflammatorischen Zellen in den Plaque und in die fibröse Kappe; (d) gesteigerte Neovaskularisation im Plaque (Shah, 1997).

Die Entstehung der Atherosklerose beruht auf einer endothelialen Fehlfunktion (Braunwald, 1997). Mögliche Ursachen dafür sind erhöhte Serumkonzentrationen von low density Lipoproteine (LDL), freie Radikale durch Zigarettenrauch, Bluthochdruck, Diabetes melitus, Übergewicht, erhöhte Plasmahomocysteinkonzentrationen und infektiöse Mikroorganismen (Braunwald, 1997). Diese Einflüsse kommen in der „response to injury“-Hypothese als

proatherogene Faktoren zur Geltung (Ross, 1973). Die endotheliale Fehlfunktion führt zu kompensatorischen Reaktionen, welche die normalen homöostatischen Eigenschaften des Endothels verändern, indem die Adhäsionseigenschaften der Endothelzellen gegenüber Leukozyten (Mazzone, 1993) und roten Blutplättchen (Fryer, 1997), als auch deren Permeabilität gesteigert wird (Ross 1993; Braunwald, 1997). Die Beeinträchtigung induziert das Endothel zur Produktion von vasoaktiven Molekülen, wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren und steigert auch dessen prokoagulatorische Eigenschaften (Ross 1993; Braunwald, 1997). Wenn die inflammatorische Reaktion das induzierende Agens nicht eliminieren oder neutralisieren kann, könnte sich der entzündliche Prozess *ad infinitum* fortsetzen. Dabei wird die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen ausgelöst (Ross, 1973; Ross, 1993), es entsteht eine Läsion zwischen den Gefäßinnen- und Aussenwänden, die arterielle Gefäßwand verdickt sich und dehnt sich aus.

Die Atherosklerose ist somit als immunologisch mediierter Stimulus zu sehen (Ross, 1999). Dabei ist das entzündliche Geschehen der Atherosklerose nicht durch Granulozyten (Ross, 1999), sondern durch lipidreiche Makrophagen (Gerrity, 1981; Gown, 1986; Nakata, 1996; Felton, 1997; Sako, 2002) und T-Lymphozyten (Gown, 1986; Jonasson, 1986) charakterisiert, welche aus dem Blut in die Läsion eindringen. Sie bilden zusammen mit einer Anhäufung von glatten Muskelzellen (Ross, 1973) die ersten Anzeichen einer Atherosklerose als sogenannte „fatty streaks“ an der innersten Schicht der arteriellen Wand, der Intima (Ross, 1993). Die Entwicklung der Atherosklerose läßt sich in mehrere Stadien einteilen, welche sich an dem Grad der Läsion der arteriellen Gefäßwand, den beteiligten Zellen und der Gefäßwandzusammensetzung orientieren (Stary, 2000):

I. Isolierte Makrophagen-Schaumzellen
II. Multiple Schaumzellschichten
III. Isolierte extrazelluläre Lipidanhäufungen
IV. Konfluente extrazelluläre Lipid-Kernschicht
V. Fibromuskuläre Gewebeschicht
VI. Defekte Oberfläche, Hämatome, Thrombosen
VII. Kalzifikation herrscht vor
VIII. Fibröse Gewebsveränderungen herrschen vor

Die Erkrankungsstadien verlaufen sukzessive von I. bis VIII, wobei das Stadium I. das Anfangsstadium darstellt und das erste Anzeichen einer Atherosklerose

charakterisiert. Ab dem Stadium IV kann die Erkrankung in spätere Stadien übergehen und dabei histologische Merkmale überspringen (Stary, 2000).

2.3. Assoziation von *Chlamydia pneumoniae* und Atherosklerose

Die Entstehung der Atherosklerose läßt sich durch die vorhin erwähnten etablierten Risikofaktoren nicht völlig erklären. Auf der Suche nach anderen Auslösern analysierte man auch mögliche Interaktionen mit *C. p.*. Die ersten Zusammenhänge zwischen *C. p.*-Infektion und Atherosklerose wurden bei seroepidemiologischen Analysen gefunden, wobei gezeigt werden konnte, dass Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK) häufiger *C. p.*-Antikörper besaßen, als die Kontrollpopulation (Saikku, 1988). Bei dieser Studie hatten 68 % der Patienten mit Myokardinfarkt und 50 % der Patienten mit KHK gegenüber der Kontrollgruppe mit 17 % einen erhöhten IgG- und IgA-Titer (IgG ≥ 128; IgA ≥ 32) gegen *C. p.* (Saikku, 1988). Diese Beobachtung wurde auch in der „Helsinki Heart Study“ (Saikku, 1992) und weiteren Studien beschrieben (Danesh, 1997; Orfila, 1998). Mittlerweile existiert auch eine lange Liste von Publikationen, in denen der Erreger (oder Teile davon) in atherosklerotischen Gefäßwandläsionen nachgewiesen werden konnten. Diese Nachweise wurden vor allem mittels serologischer Tests (DIF), PCR, Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie erbracht (Kuo, 1993; Fong, 1997; Moazed, 1997; Blasi, 1998; Maass, 1998; Noll, 1998; Nadrchal, 1999; Farsak, 2000; Grayston 2000). In Gewebeproben konnte *C. p.* vor allem in kardiovaskulären Gefäßen nachgewiesen werden (47%; zu 5 - 13 % in anderen Organen) (Grayston, 2000). Zuletzt gelang es wenigen Arbeitsgruppen sogar, *C. p.* mittels Zellkultur aus derartigen Läsionen an unterschiedlichen Lokalisationen zu isolieren und *in vitro* weiter zu propagieren (Ramirez, 1996; Jackson, 1997; Maass, 1998; Apfalter, 2000).

In einem Tiermodell konnte anhand von Kaninchen gezeigt werden, dass *C. p.* direkt eine Atherosklerose der Aorta induzieren kann (Fong, 1997). Die infektiösen Partikel der Chlamydien werden dabei vom primären Infektionsgebiet, dem respiratorischen Epithel, im Körper verteilt (Fong, 1997; Moazed, 1997; Hu, 1999). Die Verteilung dürfte durch Makrophagen vermittelt werden, wie anhand eines Mausmodells *in vivo* gezeigt werden konnte (Moazed, 1998). Die mit *C. p.* infizierten

humanen Makrophagen können ihrerseits die Infektion *in vitro* auf Endothelzellen übertragen (Quinn, 1999).

Trotz sämtlicher bisher durchgeführter Untersuchungen blieb jedoch die Frage offen, ob die *C. p.* Infektion an der Entstehung der Atherosklerose ursächlich beteiligt ist („response to injury“-Hypothese) oder ob es erst zu einem späteren Stadium der Erkrankung zu einer sekundären „Besiedelung“ atherosklerotischer Läsionen durch den Erreger kommt (“innocent bystander“-Theorie). Es entwickelten auch nicht alle Patienten, welche eine *C. p.* Infektion hatten eine Atherosklerose und umgekehrt hatten nicht alle Atherosklerose-Patienten eine *C. p.* Infektion. Durch die langsame Progression der Erkrankung ist eine Verlaufskontrolle *in vivo* nicht realisierbar. Man kann daher nur untersuchen, ob *C. p.* durch die Interaktion mit den Wirtszellen das Potential hat die Entwicklung der Atherosklerose zu fördern.

3. Fragestellung und Ziele

Das Ziel dieser Dissertation war die Analyse der mRNA-Expression von humanen Herzendothelzellen nach einer Infektion durch *C. p.* Es sollte dabei untersucht werden, ob *C.p.* auf die Entstehung oder Progression der Atherosklerose einen Einfluss ausüben kann. Die Untersuchungen sollten *in vitro* in einem zeitabhängigen Modell durchgeführt werden, um das Geschehen während der Infektion zu charakterisieren. Um diese Charakterisierung zu ermöglichen waren mehrere Fragen zu klären:

- Können HCAEC infiziert werden?
- Welche Zusammensetzung der Infektionsmedien beeinflusst die Zellen am geringsten?
- Wie groß muss das Verhältnis zwischen EBs und Wirtszelle sein, um eine quantitativ gute Infektionsrate zu erreichen ohne die Zelle sofort zu töten?
- Wie lange müssen die EBs mindestens auf die Zellen zentrifugiert werden, um Zellen zu infizieren?
- Welche Behandlung der EBs ist geeignet um Rückschlüsse zu ziehen, dass die Zellantwort nur auf Grund der Oberflächenstrukturen der EBs bedingt ist und nicht durch deren metabolische Aktivität?
- Ab welchem Zeitpunkt nach der Infektion kommt es zu einer detektierbaren transkriptionellen Zellantwort?
- Welche eukaryotischen Gene könnten durch eine Infektion durch *C. p.* so verändert exprimiert werden, dass die Zellen oder das Gewebe sich dahingehend verändern, wie dies von der Atherosklerose her bekannt ist?

Die Antworten auf die ersten Fragen werden im Abschnitt „Ergebnisse der Vorversuche“ behandelt. Zur Feststellung ab welchem Zeitpunkt nach einer Infektion eine transkriptionelle Antwort der Zellen erfolgt, wurde mit HCAEC ein Differential-Display durchgeführt. Die Fragestellung nach den zu untersuchenden Genen der Wirtszellen wurde durch eine eingehende Literaturrecherche geklärt. Zusätzlich wurde mit HCAEC ein Gen-Array durchgeführt um das Spektrum der zu untersuchenden Gene zu erweitern.

4. Material und Methoden

4.1. Zellkulturbedingungen

Die Inkubation aller Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Cytoperm, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37 °C, in befeuchteter 5 % CO_2 - Atmosphäre. Für die Propagierung wurden die Zellen in 75 cm^2 Flaschen (Corning, NY, USA) kultiviert. Für die Infektionsversuche wurden die Zellen in einer Dichte von 4,5 e+4 Zellen / cm^2 in Platten mit 6 Vertiefungen (Corning) ausgesät.

4.1.1. HEp-2 Zellen

Für die Passagierung und anfänglichen Expressionstests wurde die immortalisierte, adhärente Epithelzelllinie HEp-2 (CCL-23; American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, Va.) gewählt. Sie wurde in der Literatur schon von anderen Autoren im Zusammenhang mit der Vermehrung von *C. p.* und für Expressionsanalysen nach einer *C. p.*-Infektion eingesetzt (Roblin, 1992; Meijer, 1996; Kutlin, 1999; Matsushima, 1999; Molestina, 1999; Quinn, 1999; Castilla, 2000; Gaydos, 2000; Krausse Opatz, 2000; Byrne, 2001; Coombes, 2001; Kutlin, 2001; Coombes, 2002; Molestina, 2002; Yamaguchi, 2002).

4.1.2. HCAEC

Endothelzellen arteriellen Ursprungs (HCAEC, CC-2585, Clonetics, Cellsystems; Deutschland) waren die primären Zielzellen für die Expressionstests. Diese Zellen wurden ausgewählt um die pathophysiologischen Gegebenheiten im Zusammenhang mit atherosklerotischen Veränderungen annähernd widerzuspiegeln. Sie sind die möglichen und wahrscheinlichen ersten Zielzellen der mittels Monozyten herantransportierten Chlamydien.

4.2. *Bakterien*

4.2.1. Chlamydia pneumoniae

Zur Massenanzucht von *C. p.* für nachfolgende Infektionsversuche wurde der respiratorische Typstamm *Chlamydia pneumoniae* AR-39 (ATCC: 53592; American Type Culture Collection, USA) verwendet. Die Chlamydien wurden in HEp-2 Zellen in einem Infektionsmedium mit Antibiotika vermehrt. Die Infektionen wurden wie beschrieben durchgeführt (Apfalter, 2000).

4.2.1.1. Präparation der Elementarkörperchen (EBs)

Mit *C. p.*-AR-39 infizierte HEp-2 Zellen wurden von den 6er-Platten geerntet, mit dem Medium in 50 ml Röhrchen transferiert und resuspendiert. Zur Freisetzung der EBs aus den Zellen wurde die Suspension mit sterilen Glaskugeln für fünf Minuten gevortext. Die Zellreste wurden durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 200 g (1000 rpm, Labofuge 400R, Heraeus) als Pellet verworfen. Die EBs im Überstand wurden in 50 ml Röhrchen (Sorvall-Instruments, Bad Homburg, Deutschland) durch Zentrifugation für 1 Stunde bei 27600 g (13000 rpm; Zentrifuge: Sorvall; Rotor: HB-6) und 8 °C pelletiert. Die EBs wurden weiters nach Resuspendierung in PBS durch eine Gradientenzentrifugation von Zellfragmenten gereinigt. (Gradient: PBS mit EBs über 13 ml 30 % Urografin (oben, 15 ml 76 % Urografin + 23 ml TE-ph 7,5) und 13 ml 50 % Sucrose (unten); 1 Std. 11000 g (10180 rpm)). Das Pellet mit den EBs wurde in 10 ml PBS resuspendiert und durch Zentrifugation für 1 Stunde bei 27600 g und 4 °C konzentriert. Das konzentrierte Pellet wurde nach Resuspendierung in 2 ml SGP in 100 µl Aliquoten bei –80 °C gelagert. Die EBs in den Aliquoten wurden in einer Verdünnungreihe nach Färbung mittels DIF in einem Mikroskop (Zeiss-Axioplan 2, Carl Zeiss FITC filter set (450-490 nm Extinktionsfilter, FT510 Sperrfilter, 515-565 nm Emissionsfilter) Jena, Deutschland) durch Auszählen quantifiziert.

4.2.1.2. Infektionskontrollen

Bei allen Infektionsversuchen mit dem Ziel der Analyse der Genexpression wurden parallel Infektionskontrollen durchgeführt. Dabei wurden HEp-2 bzw. HCAEC in 6-well-Platten (Corning) separat infiziert und die Zellen nach 48 Stunden mittels DIF daraufhin überprüft, ob die Zellen mit *C. p.* infiziert wurden. Die Bildung von

intrazellulären, bakteriellen Einschlüssen (IBs) stellte die Bestätigung einer produktiven Infektion (Abbildung 1) dar.

Durchführung:

Methanolfixierung der Zellen, welche an Glasplättchen gebunden sind:

Methanol bei –20 °C vorkühlen und die Glasplättchen mit den Zellen in das Methanol für 15 min bei –20 °C einlegen. Danach die Glasplättchen mit PBS (+ 1 ml Tween20/l) abspülen.

Färbung: Glasplättchen mit 10 µl DIF-Reagens überschichten und für 15 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren. Danach die Glasplättchen 3 x mit PBS (pH 7,5 + 1 ml Tween20 / l) abspülen, dann Lufttrocknen und mit bewachsener Seite nach unten auf Objektträger auflegen.

Die visuelle Kontrolle erfolgte mit einem Mikroskop (Zeiss-Axioplan 2) im UV-Licht bei 630-facher Vergrößerung.

4.2.1.3. Ansatz für die Inaktivierung der EBs

Um feststellen zu können, ob die mRNA-Expressionsänderung der Zielzellen aktiv durch vermehrungsfähige *C. p.* oder durch deren Oberflächenstrukturen bewirkt wird, war es notwendig die EBs zu inaktivieren. Für diese Inaktivierung der *C. p.* AR-39 EBs wurden verschiedene Infektionsmedienzusätze und Expositionsmodi bei einem Verhältnis EBs:Zielzelle von 300:1 (multiplicity of infection, MOI) getestet:

Thermische Inaktivierung bei 56°C, 75°C und 90°C, UV-Licht, Tetracyclin und Chloramphenicol.

Ansätze:

1: 1 ml Infektionsmedium.

2: 1 ml Infektionsmedium + EBs.

3: 1 ml Infektionsmedium + EBs (für 10 min auf 65 °C erhitzt).

4: 1 ml Infektionsmedium + EBs (für 10 min auf 75 °C erhitzt).

5: 1 ml Infektionsmedium + EBs (für 10 min auf 90 °C erhitzt).

6: 1 ml Infektionsmedium + EBs (mit UV-Licht behandelt).

7: 1 ml Infektionsmedium + Tetracyclin 10 µg / ml + EBs.

8: 1 ml Infektionsmedium + Chloramphenicol 100 µg / ml (90 min vor Infektion) + EBs

Durchführung:

Zur UV-Inaktivierung der EBs wurden jeweils 50 µl der EB-Aliquote in einer Crosslink-Kammer (Biorad, Deutschland) einem UV-Licht von 2,4 Joule ausgesetzt (Programm „C-7“ (= 400 mJ, 1 min 40 sec) 6 x = 2,4 Joule). Der Abstand der UV-Lichtquelle zu den EBs betrug ca. 20 cm. Die EBs wurden in den Deckeln von 50 ml Röhrchen (Sorvall) mit dem UV-Licht direkt bestrahlt.

Die HEp-2 Zellen wurden in der Zwischenzeit in den Ansätzen mit Infektionsmedium (mit oder ohne Antibiotikum) überschichtet und für 90 min im Brutschrank inkubiert. Diese Medien wurden dann gegen neue Infektionsmedien (mit oder ohne Antibiotikum und mit behandelten oder unbehandelten EBs) gewechselt und mit 2000 g für 10 min auf die HEp-2 zentrifugiert. Nach 48 - stündiger Inkubation wurden die Zellen mittels DIF auf Einschlusskörperchen hin untersucht.

4.2.1.4. Infektion der Zellen mit *C. p.* für Expressionsanalysen

Um die gebildete mRNA der Zielzellen vergleichen zu können, wurden die Infektionen in Parallelansätzen durchgeführt. Für den Referenzwert wurden die Zellen mit SGP „infiziert“ (= Scheininfektion). Für die normale Infektion wurden die Zellen mit vermehrungsfähigen EBs mit einer Multiplizität von 300:1 infiziert. Zusätzlich wurde ein Ansatz mitgeführt, bei welchem die Zielzellen mit UV behandelten EBs (EB^{UV}) inkubiert wurden. Diese EBs waren in der Reproduktion inhibiert.

Die drei parallelen Ansätze wurden jeweils mit 14 ml Infektionsmedium und 150 µl SGP bzw. EBs in SGP durchgeführt. Die Ansätze wurden für 10 min bei 2000 g zentrifugiert, um die EBs an die Oberfläche der Zellen zu bringen. Dann wurde das Medium gewechselt, um die nicht gebundenen EBs zu entfernen. Nach entsprechender Zeit (2, 4, 8, 12 und 24 Stunden mit HEp-2 Zellen bzw. 1, 2, 4, 12, 48 und 90 Stunden mit HCAEC; post infektionem; hPI) wurde das Medium abgenommen und die Infektion durch Zugabe von TRI-Reagent gestoppt.

4.2.2. Mycoplasmen

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Mycoplasmenkontamination zu verhindern wurden regelmäßig Testungen der Zellkulturmedien durchgeführt:

- Mycoplasmen PCR ELISA (Roche; Cat.No. 1 663 925) nach Angaben des Herstellers.
- „EZ-PCR Mycoplasma Test Kit“ (Biological Industries Co., Israel; Kat.Nr.: 20-700-20) nach Angaben des Herstellers.
- Kulturplatten (Mycoplasmenagar, Biotest), welche 7 Tage in einer 5 % CO_2-Athmosphäre bebrütet wurden.

Die Ergebnisse der Infektionen wurden erst dann in die Berechnungen aufgenommen, wenn durch den ELISA, die PCR und die visuelle Kontrolle der Kulturplatten sichergestellt war, dass keine Mycoplasmenkontamination vorlag.

4.3. RNA-Extraktion und Quantifizierung

Nach Ablauf der vorgesehenen Zeit (1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 bzw. 90 hPI) wurde das Nährmedium von den Platten entfernt und je Vertiefung 0,5 ml TRI-Reagent zugesetzt. Die Zellen wurden nach 5 Minuten mit einem „rubberman“ abgeschabt und in 1,5 ml Eppendorfgefäße gefüllt. Je Ansatz waren 3 x 1,5 ml Eppendorfgefäße notwendig.

Je nach Verwendung der RNA wurde eine Phenol/CHCl3-Extraktion (A) für realtime PCR (QPCR) oder RNeasy-Reinigung (B) für den Gen-Array angeschlossen.

A) Zu den 0,5 ml TRI-Reagent in jeder Vertiefung 0,2 ml Chloroform zusetzen, für 15 sec schütteln und 10 min stehen lassen (RT). Dann für 15 min bei 27600 g / 4°C (= 13000 rpm; Sorvall) zentrifugieren. Die RNA in der wäßrigen oberen Phase der Zentrifugationsgefäße zusammengeben und auf 2 Eppendorfgefäße aufteilen. Je Gefäß 0,5 ml PCI zusetzen, mischen und dann 3 min bei 8.000 rpm (10460g) zentrifugieren. Den Überstand in ein neues Gefäß transferieren, 0,5 ml Isopropanol zugeben und nach mehrmaligem Kippen für 10 min bei RT stehen lassen. Dann für 8 min bei 12.000 g / 4 °C zentrifugieren, den Überstand abkippen, 200 µl 75% EtOH (-20°C) zusetzen, mischen und 5 min bei 7.500 g (8.500 rpm, ohne Bremse) bei 4°C zentrifugieren. Das EtOH abnehmen und das Pellet für 10 min bei RT auf Papier trocknen lassen. Dann 100 µl DEPC-H_2O pro Gefäß zusetzen und 10 min bei + 4 °C zum Lösen der RNA stehen lassen.

B) Reinigung der RNA mit RNeasy (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) für den Gen-Array nach den Angaben der Hersteller.

UV-Quantifizierung der RNA:

Die RNA wurde mit einem U-2000 Spektrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan) bei 260 nm (wobei $O.D._{260}$ von 1 mit 40 µg RNA / ml angenommen wurde) quantifiziert.

Quantifizierung der RNA mit Streifen:

Für den Gen-Array wurde die RNA-Menge mit Hilfe von Quantifizierungs-Streifen (RNA DipStick Kit, Invitrogen) gemessen.

4.4. DNAse-Verdau

Für den Differential-Display-Versuch musste die RNA durch einen DNAse-Verdau von DNA gereinigt werden. So wurde 1 µg RNA in wäßriger Lösung mit 2 µl DNAse (RQ1, Promega, Heidelberg) in einer Pufferlösung mit 5 µl RQ1-Puffer (Promega) in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Deaktivierung der DNAse wurde weiters eine Inkubation bei 65 °C für 5 min durchgeführt.

4.5. cDNA-Synthese

Die eukaryontische mRNA wurde mit M-MLV Reversetranskriptase (Promega) und $oligo(dT)_{15}$ (Roche) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für einen 100 µl-Ansatz wurde 4 µg totalRNA und $oligo(dT)_{15}$ für eine Endkonzentrationen von 0,5 µM und dNTPs für 0,5 mM eingesetzt. Die Aufspaltung der Sekundärstrukturen der mRNA erfolgte durch Inkubation bei 70 °C für 5 min. Die Transkription erfolgte mit 2 µl M-MLV RT (200 u / µl; Promega) für 1 Stunde bei 42 °C. Zur Deaktivieren der Transkriptase wurde der Ansatz bei 70 °C für 15 min inkubiert.

4.6. Analyse der cDNA

β–Aktin-PCR

Es wurde bei allen Proben eine β-Aktin-PCR zur Kontrolle des Vorhandenseins von kontaminierender gDNA in den mRNA- und cDNA-Proben durchgeführt. Die Bestätigung erfolgte nach Auftrennung der PCR-Produkte in einem 3 % TAE-Agarosegel und Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht. Das RT-PCR-Produkt der

mRNA (Genbank: HSAC07) hat eine Länge von 445 bp, das PCR-Produkt der gDNA (Genbank: E01094) hat eine Länge von 540 bp. Somit ließ sich durch ein Agarosegel überprüfen, ob die in der PCR amplifizierte Sequenz von der mRNA stammte.

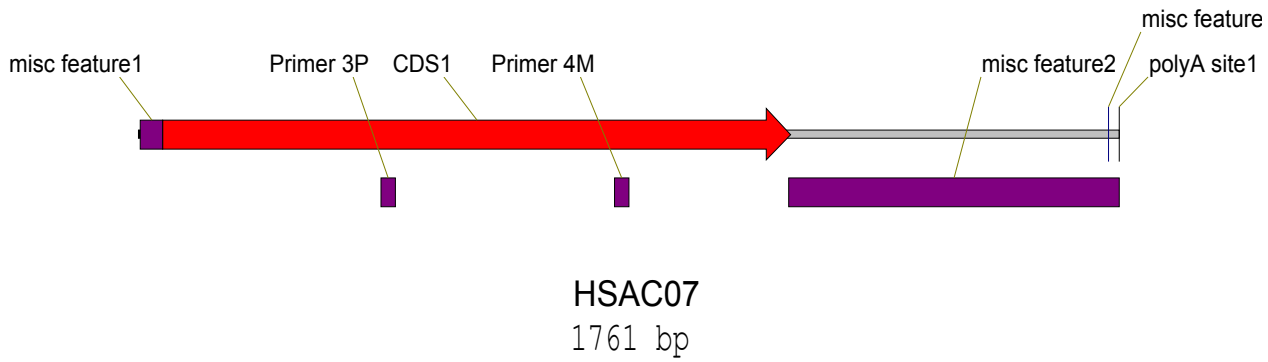

Abbildung 2: Schematische Darstellung der gDNA des Bereiches, welcher die β-Aktin-mRNA codiert. Eingezeichnet sind auch die Primerbindungsstellen an der cDNA der mRNA (Genbank: HSAC07).

Tabelle 1: Sequenz und Eigenschaften der β-aktin Primer.

β-aktin Primer	Länge (bp)	Tm	%GC	Sequenz 5'-3'
3P Fwd	25	59.5	52.0	CATGTACGTTGCTATCCAGGCTGTG
4M Rev	25	59.8	52.0	GAAGGTAGTTTCGTGGATGCCACAG

Tabelle 2: Reaktionsbedingungen für die QPCR.

Zusatz	Konz.	µl	Endkonz.
H_2O		28	
GibcoPuffer 10x o.MgCl2		5	
MgCl2 mM	50	1,5	1,5
Primer3P µM	5	2	0,2
Primer4M µM	5	2	0,2
dNTPs(mM)	10	4	0,8
GibcoTaq-Pol.U/µl	5	0,5	2,5
Template		5	
Summe= in µl		50	

Tabelle 3: Zyklen für die QPCR.

95°C	2 min	
95°C	1 min	40x
60°C	1 min	„
72°C	1,5 min	„
72°C	10 min	

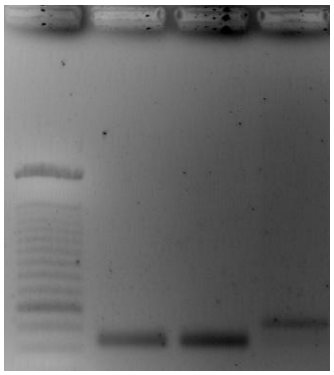

Abbildung 3: Referenzbild zum Vergleich der Laufweite der Banden der β-Aktin-PCR-Produkte: 100 bp Marker; cDNA (von HEp-2-RNA + *C. p.* AR-39); cDNA (von HEp-2-RNA o. *C. p.* AR-39); gDNA von HEp-2-Zellen.

4.7. Differential Display

Primer:

Folgende mit dem Farbstoff IRD41 und IRD800 markierte Primer wurden in unterschiedlichen Kombinationen verwendet (VBC-Genomics, Wien, Österreich):

Forward-Primer:

P1: 5‘-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA

P5: 5‘-ATTAACCCTCACTAAAGATCTGAC

P4: 5‘-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG

P7: 5‘-ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG

Reverse-Primer:

T9: 5‘-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGG

T5: 5‘-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCC

T2: 5‘-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAC

T8: 5‘-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGC

T1: 5‘-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAA

PCR-Ansätze:

Die PCR-Ansätze hatten ein Volumen von 20 µl mit folgender Zusammensetzung: 1 µl je Primer (1 µM), 1 µl cDNA (8 ng) 0,4 µl AdvantagePolymerase-Mix (Clontech, Heidelberg, Deutschland), 2 µl Advantage-Puffer(Clontech), 2 µl dNTPs (10 mM), 12,6 µl H_2O.

PCR-Programm:

94 °C 5 min, 40 °C 5 min, 68 °C 5 min; 2 x: 94 °C 2 min, 40 °C 5 min, 68 °C 5 min; 24 x: 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 68 °C 2 min; 68 °C 7 min. Thermocycler: TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen, Deutschland) mit Heizdeckel (TRIO Heated Lid, Biometra).

Differential Display-Gel:

Das Analysegel hatte folgende Zusammensetzung: 40 ml Polyacrylamid (Sequagel XR; national diagnostics, Atlanta, Georgia), 10 ml 5xPuffer (Sequagel Complete; national diagnostics), 250 µl 10 % APS.

Die PCR-Produkte wurden mit Säulen (Microcon 100, millipore corporation, Bedford, USA) von den überschüssigen Primern gereinigt. 5 µl Probenmaterial wurde

mit 5 µl Ladepuffer 5 min gekocht und 1 µl pro Spur in das Gel geladen. Die PCR-Produkte wurden im Gel aufgespalten und die entstandenen Banden während des Laufes vom Analysegerät „Li-Cor Long Redir 4200 automated DNA sequencer“ (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) detektiert.

4.8. Gen-Array

Um eine größere Anzahl an unterschiedlichen Genprodukten quantitativ vergleichen zu können, kam ein Atlas-Array-Kit (Atlas human Cardiovascular 7734-1H; Clontech, Palo Alto, CA) zum Einsatz. Die cDNA-Synthese, Aufreinigung der cDNA durch Säulenchromatografie, Prähybridisierung, Hybridisierung und Exposition der Nylonmembranen gegenüber einem Röntgenfilm erfolgte nach den Vorschriften der Firma Clontech. Die radioaktive Markierung der DNA wurde mit [alpha-32P]dATP (Amersham, Buckinghamshire, UK) mit einer spezifischen Aktivität von 110 Tbq / mmol entsprechend 3000 Ci / mmol durchgeführt. Für die RNA wurden die Proben einer Parallelinfektion von HCAEC (Scheininfektion und Infektion mit vermehrungsfähigen EBs) verwendet, die 24 hPI aufgereinigt wurde. Die Hybridisierungssonden waren auf der Nylonmembran punktartig nach einem Schema verteilt (Abbildung 4).

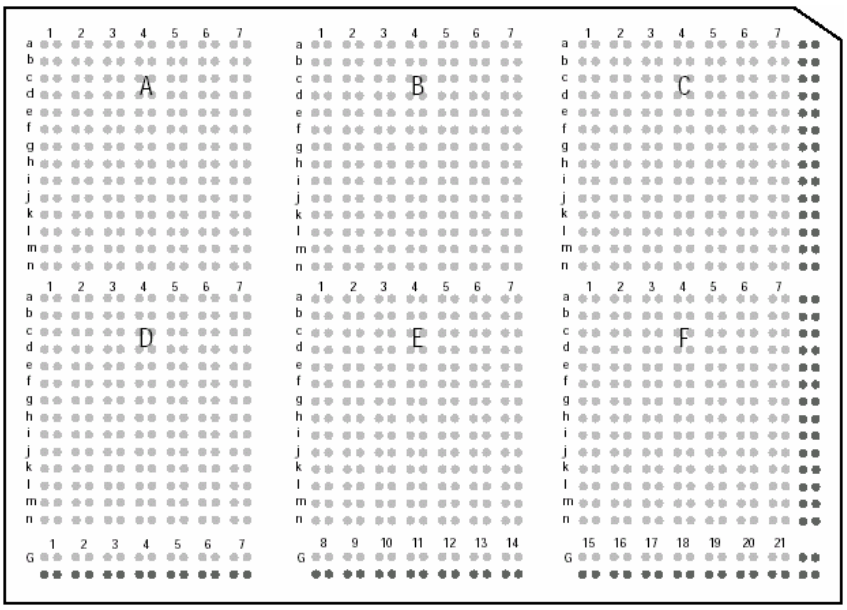

Abbildung 4: Schema der Anordnung der Sonden auf der Arraymembran, welches eine Identifizierung der exprimierten Gene ermöglichte.

4.9. QPCR (realtime-PCR)

Alle QPCR-Versuche wurden mindestens im Duplikat durchgeführt. Die jeweiligen Primer wurden in mehreren Konzentrationen miteinander getestet, welche bei einer vorgegebenen cDNA-Menge die niedrigsten C_T -Werte erbrachten, um die Primermengen für die QPCR-Quantifizierung der mRNA zu optimieren. Die verwendeten Primer und Sonden sind in der Tabelle 3 angegeben.

Die Sonden (= „Probes“) waren am 5’ -Ende mit dem Reporterfarbstoff FAM (6-carboxyfluorescein) oder VIC (Handelsname von Applied Biosystems; nur β-Aktin-Sonde) markiert und am 3’-Ende mit dem Quencherfarbstoff TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine) verbunden.

Die Reaktionen liefen in 50 µl Volumina in Mikrotiterplatten (96-well MicroAmp optical plates; Applied Biosystems) ab. Für den Mastermix wurden jeweils 25 µl des 2 x konzentrierten kommerziell erhältlichen „TaqMan-Universal PCR Mastermix“ mit folgender Zusammensetzung verwendet: 10 mM Tris (pH 8.3), 50 mM KCl, 5 mM MgCl2, 2,5 mM dNTP, 0,625 U von AmpliTaq Gold-Polymerase, 0,25 U AmpErase UNG und 6µl der 1:100 verdünnten cDNA. Die Konzentrationen der Primer und Sonden lagen zwischen 50 nM und 600 nM, die genauen Konzentrationen sind bei den jeweiligen untersuchten Genen angegeben. Die cDNA wurde nach einem anfänglichen Inkubationsschritt bei 50 °C für 2 min (UNG Aktivierung) einer Denaturierungsphase bei 95 °C für 10 min ausgesetzt. Die anschliessenden Amplifikationszyklen erfolgten in einem 2-Schrittmuster mit 95 °C für 15 s (Denaturierung) und 60 °C für 1 min (Annealing und Elongation) für 50 x.

Die Quantifizierung der cDNA erfolgte durch die Auswertung der Fluoreszenzunterschiede der Proben während der PCR mit einem ABI-PRISM 7700 Realtimecycler (Applied Biosystems, New Jersey, USA) mit Hilfe der von der Firma bereitgestellten Software „Sequence Detector“. Als Kalibrator wurde die cDNA der β-Aktin-mRNA der jeweiligen Probe herangezogen. Dieses Genprodukt wurde gewählt, da die Expression dieses Gens bei einer Infektion der Zellen durch *C. p.* nicht beeinflusst wird (Gerard, 1998; Martin, 2001). Die Berechnungen wurden nach der „comparativen C_T -Methode“ zur relativen Quantifizierung mit Hilfe von MS-Excel durchgeführt. Dabei wurden zuerst die C_T -Werte des Zielamplikons und die C_T -Werte der internen Kontrolle jeder Probe bestimmt. Um die Differenzen der Menge der eingesetzten RNA bei der reversen Transkription und der cDNA bei der PCR

auszugleichen, wurden die Unterschiede zwischen Zielamplikon und interner Kontrolle berechnet (ΔC_T). Der ΔC_T –Wert jeder Probe wurde dann vom ΔC_T –Wert des Kalibrators (der unstimulierten Probe) abgezogen ($\Delta\Delta C_T$). Schließlich wurde die relative Menge des Zielamplikons durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ –Methode berechnet. Somit wurden alle Proben als n-facher Unterschied relativ zum Kalibrator angegeben.

4.9.1. Primer und Sonden

Alle Primer und Sonden (ausser für β-Aktin, IL-8 und HB-EGF) wurden selbst konstruiert. Deren Sequenz wurde so gewählt, dass sie nur mit der cDNA der mRNA ein PCR-Produkt bilden können. Zur Verdeutlichung der Lage der Bindestellen sind diese grafisch in den Abbildungen 6 bis 18 angegeben. Zur besseren Charakterisierung der amplifizierten Sequenzen ist auch die gDNA der Gene schematisch dargestellt.

Um sicher zu stellen, dass die Primer und Sonden nur an die Zielsequenzen binden können, wurden sie mit „nblast“ (NCBI) überprüft. Die Sequenzen der Primer und Sonden sind in der Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: * PCR-Master-Mix Konzentration; † Sonden waren mit dem Fluoreszenz-farbstoff FAM (6-carboxyfluorescein) am 5'-Ende markiert und mit dem Quencher TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine) am 3'-Ende verbunden.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Konzentration *
IL-8 Fwd	CTG GCC GTG GCT CTC TTG	0,5 µM
IL-8 Rev	TTA GCA CTC CTT GGC AAA ACT G	0,5 µM
IL-8 Sonde †	CCT TCC TGA TTT CTG CAG CTC TGT GTG AA	0,4 µM
LIPG Fwd	CCG GAC GGG AGC TGA ATA T	0,3 µM
LIPG Rev	AAA TGT CAG TTT CCG CTG GGT	0,5 µM
LIPG Sonde †	CAG ACT TCA CCC GGA TGC GCC T	0,2 µM
HBEGF Fwd	AGA ATG CAA ATA TGT GAA GGA	0,3 µM
HBEGF Rev	GCC CAT GAC ACC TCT CTC CAT	0,3 µM
HBEGF Sonde †	CTC CTG CAT CTG CCA CCC GGG	0,2 µM
Gal-1Fwd	CAG CGG GAG GCT GTC TTT C	0,05 µM
Gal-1Rev	CCT GGT CGA AGG TGA TGC A	0,3 µM
Gal-1 Sonde †	CTT CCA GCC TGG AAG TGT TGC AGA GGT	0,2 µM
LAL Fwd	GAC ACT CTC AGT TTC TCA GGA TGA AT	0,6 µM
LAL Rev	TGA AGT TAA TGG AAG CTG GTA GGT C	0,6 µM
LAL Sonde †	TTG CCA TCT CAT CAT AAC TGA AAG CCC AG	0,4 µM
CBS Fwd	AGG TGC AGC CGT CAG ACC	0,5 µM
CBS Rev	CCT GCC CAG CGT GTC C	0,5 µM
CBS Sonde †	CAT CTA CAA GCA GTT CAA ACA GAT CCG CCT C	0,2 µM
PFN1 Fwd	TTC GTA CCA AGA GCA CCG G	0,3 µM
PFN1 Rev	CCA CCG TGG ACA CCT TCT TT	0,3 µM
PFN1 Sonde †	TGA CAA GAC GCT AGT CCT GCT GAT GG	0,2 µM

β-Aktin

Für die Quantifizierung der β-Aktin-mRNA durch QPCR wurde ein kommerzieller Kit (Applied Biosystems) (Human hu B-actin; Part. Nr.: 4310881E) (Sonde: VIC-markiert) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Sequenz der Primer und Sonde wurde von der Firma Applied Biosystems nicht bekannt gegeben. Die Reaktionseffizienz der PCR wurde analysiert (Abbildung 5).

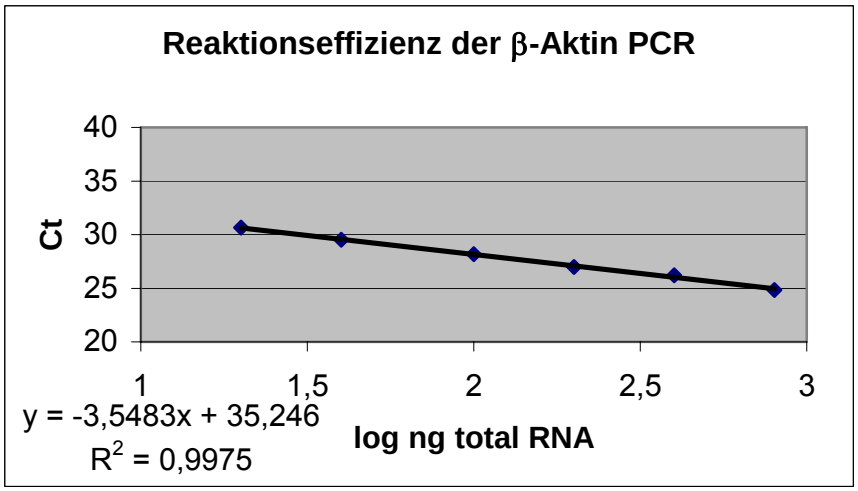

Abbildung 5: Die Abbildung zeigt die Reaktionseffizient der PCR-Reaktion für die β-Aktin-Sequenzen. Die Steigung der Geraden bei der beta-aktin-PCR entspricht : y = -3,5483x + 35,246 mit einer Übereinstimmung der Messpunkte und der Trendlinie von R^2 = 0,9975.

Interleukin 8 (IL-8)

Die Primer und Sonde wurden aus der Literatur übernommen (Faccenda, 2001). Die möglichen Bindungsstellen der Oligonukleotide an der gDNA und cDNA der mRNA wurden überprüft (Abbildung 6, Abbildung 7). Die Länge des Amplifikates des RT-PCR-Produktes der mRNA beträgt 77 bp (Abbildung 8). Durch die grosse Entfernung des Reverse-Primers zur Sonde könnte ein PCR-Produkt der gDNA das Ergebnis kaum beeinflussen.

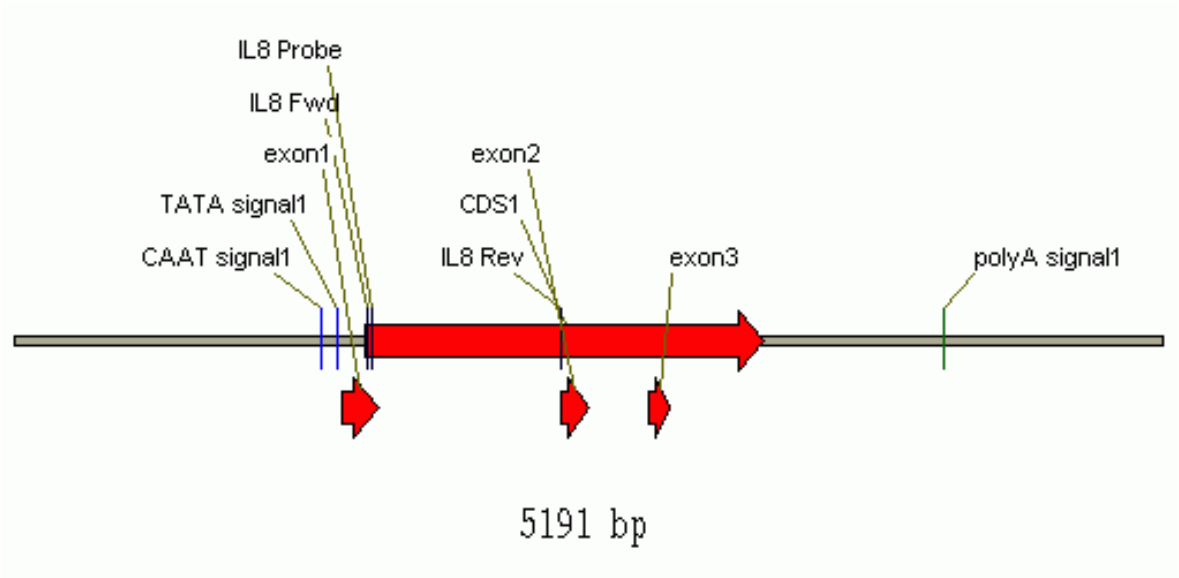

Abbildung 6: Schematische Darstellung der gDNA von IL-8 (Genbank: M28130) mit Exons, Introns und Bindestellen für Primer und Sonde.

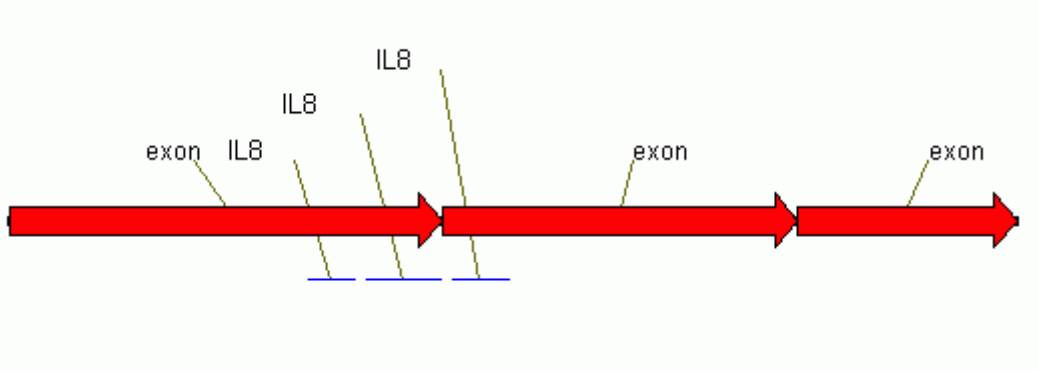

Abbildung 7: Exons und Bindestellen der Primer und Sonde an die cDNA der mRNA von IL-8.

Tabelle 5: Sequenzen und Eigenschaften der Primer und Sonde für IL-8.

Name	Start	Länge (bp)	Tm	%GC	Sequenz 5'-3'	Konz. im PCR-Mastermix
IL-8 Fwd	115	18	54,6	66,7	CTG GCC GTG GCT CTC TTG	0,5 µM
IL-8 Sonde	137	29	66	48,3	CCT TCC TGA TTT CTG CAG CTC TGT GTG AA	0,5 µM
IL-8 Rev	191	22	54,6	45,5	TTA GCA CTC CTT GGC AAA ACT G	0,4 µM

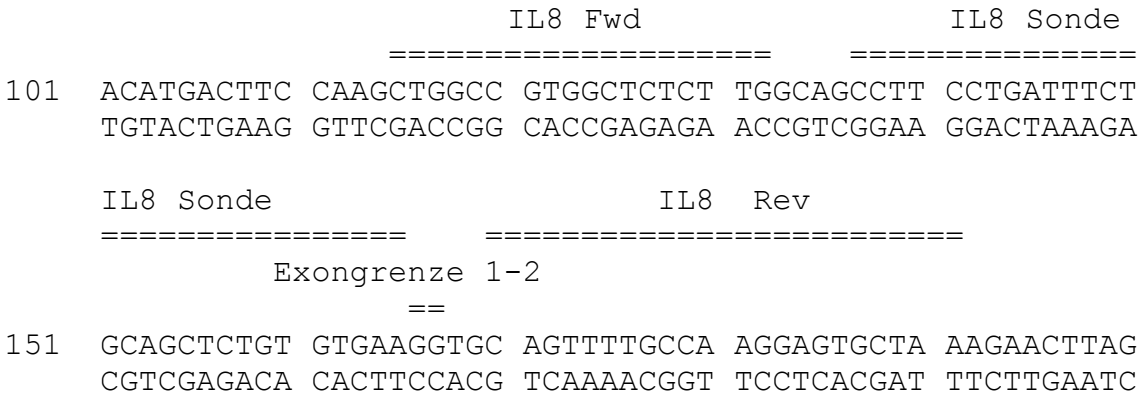

Abbildung 8: Darstellung der Basenbindung der cDNA (gi|30585004) und der entsprechenden Primer und Sonde.

Human heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)

Die Primer und die Sonde wurden von Dr. Pasching (Klinische Abteilung für Klinische Mikrobiologie des Klinischen Instituts für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Universität Wien) übernommen.

Tabelle 6: Sequenzen und Eigenschaften der Primer und Sonde für HB-EGF.

Name	Start	Länge (bp)	Tm	%GC	Sequenz 5'-3'	Konz. im PCR-Mastermix
HB-EGF Fwd	618	21	46,7	33,3	AGA ATG CAA ATA TGT GAA GGA	0,3 µM
HB-EGF Rev	677	21	55,2	57,1	GCC CAT GAC ACC TCT CTC CAT	0,3 µM
HB-EGF Sonde	651	21	65,3	71,4	CTC CTG CAT CTG CCA CCC GGG	0,2 µM

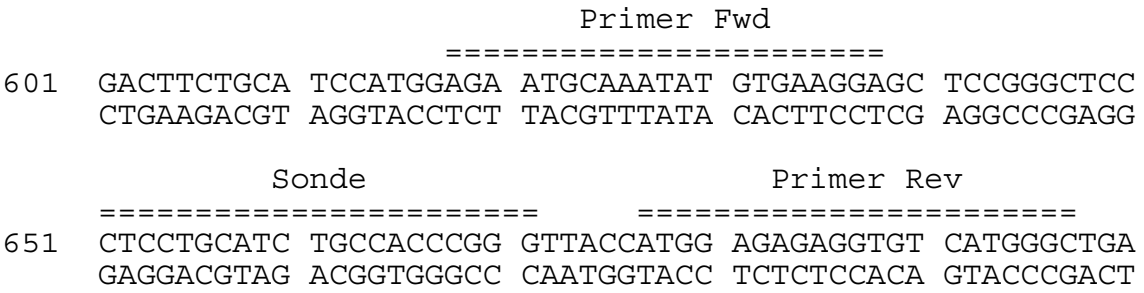

Abbildung 9: Sequenz der cDNA von der HB-EGF-mRNA (Genbank: M60278; HUMHB-EGF) mit Bindungsstellen der Primer und der Sonde.

Galectin-1 (Gal-1)

Das RT-PCR-Produkt hat eine Länge von 67 bp. Die Bindestelle der Sonde an der cDNA wurde so gewählt, dass sie über die Exongrenzen 3 und 4 liegt.

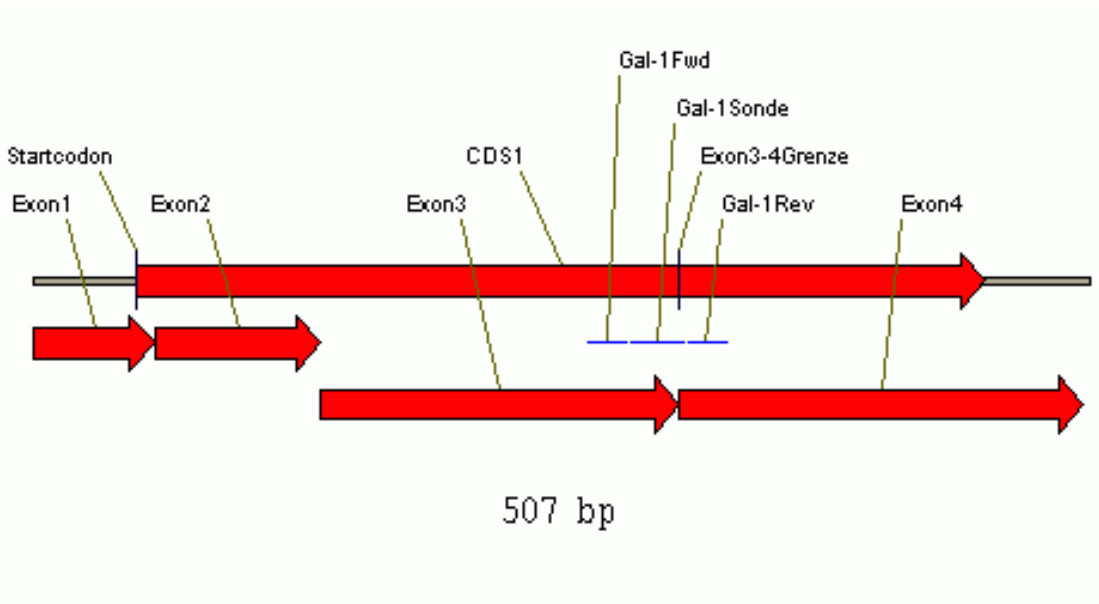

Abbildung 10: Exons der Gal-1 mRNA mit Lage der Primer und Sonde.

Tabelle 7: Sequenzen und Eigenschaften der Primer und Sonde für Gal-1.

Name	Start	Länge (bp)	Tm	%GC	Sequenz 5'-3'	Konz. Im PCR-Mastermix
Gal-1 Fwd	266	19	54.7	63.2	CAG CGG GAG GCT GTC TTT C	0,05 µM
Gal-1 Rev	314	19	54.0	57.9	CCT GGT CGA AGG TGA TGC A	0,3 µM
Gal-1 Sonde	286	27	65.3	55.6	CTT CCA GCC TGG AAG TGT TGC AGA GGT	0,2 µM

```
                          Gal-1Fwd              Gal-1Sonde
                    ===================== ================
     Exon3
     ==================================================
251  GCCTGGGGGA CCGAGCAGCG GGAGGCTGTC TTTCCCTTCC AGCCTGGAAG
     CGGACCCCCT GGCTCGTCGC CCTCCGACAG AAAGGGAAGG TCGGACCTTC

         Exon3-4Grenze
              ===
     Gal-1Sonde          Gal-1Rev
     ============= ====================
     Exon3                                              Exon4
     ==================================================
301  TGTTGCAGAG GTGTGCATCA CCTTCGACCA GGCCAACCTG ACCGTCAAGC
     ACAACGTCTC CACACGTAGT GGAAGCTGGT CCGGTTGGAC TGGCAGTTCG
```

Abbildung 11: Sequenz der cDNA der Galectin-mRNA (Genbank: HUMLEC, J04456, [gi:187109], Human 14 kd lectin mRNA) mit Bindungsstellen der Primer und der Sonde und den Exongrenzen.

Endotheliale Lipase Gen (LIPG)

Die endotheliale Lipase (EL) ist auch unter dem Synonym “endothelial cell-derived lipase“ (EDL) bekannt und wird durch das Gen LIPG codiert. Zur Konstruktion der Primer und der Sonde wurde die Genbanksequenz XM_008696 herangezogen. Die Primer und die Sonde wurden so gewählt, dass der reverse Primer die Exongrenze 8-9 der cDNA überlagert, damit nur die cDNA, welche von mRNA umgeschrieben wurde amplifiziert wird. Das Amplifikat der QPCR hat eine Länge von 68 bp. Der reverse Primer kann dabei nicht an die genomische DNA binden.

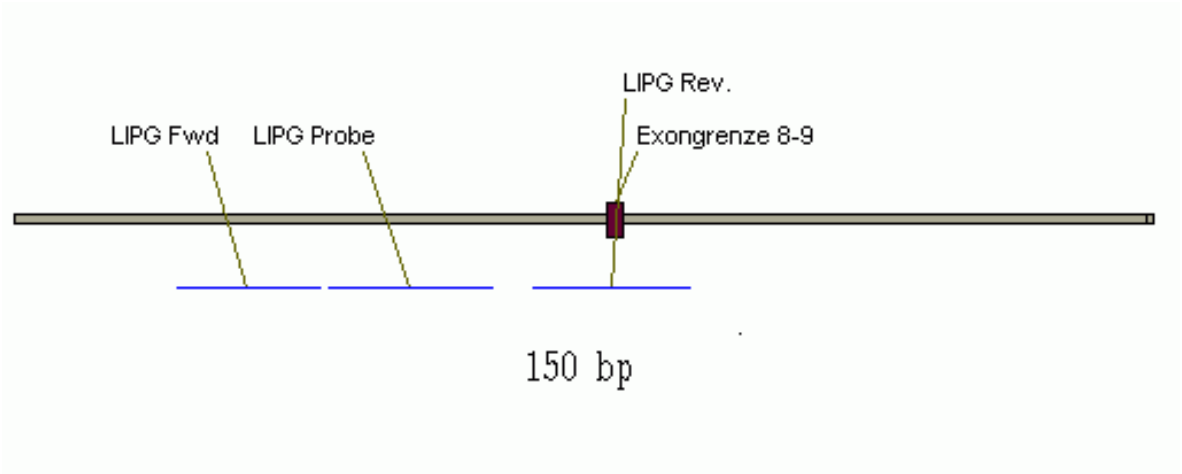

Abbildung 12: 150 bp Fragment der cDNA der mRNA von XM_008696, [gi:17482187] mit Angabe der Exongrenzen, der Lage der Primer und der Sonde.

Tabelle 8: Sequenzen und Eigenschaften der Primer und Sonde für LIPG.

Name	Start	Länge (bp)	Tm	%GC	Sequenz 5’-3’	Konz. im PCR-Mastermix
LIPG Fwd	1571	19	58,6	57,9	CCG GAC GGG AGC TGA ATA T	0,3 µM
LIPG Rev	1638	21	59,5	47,6	AAA TGT CAG TTT CCG CTG GGT	0,5 µM
LIPG Sonde	1591	22	68,3	63,6	CAG ACT TCA CCC GGA TGC GCC T	0,2 µM

```
                                    LIPG   Fwd     LIPG   Sonde
                                ====================  ==========
1551  CCTGTCTCAA CCCCGCAACC CCGGACGGGA GCTGAATATC AGGCGCATCC
      GGACAGAGTT GGGGCGTTGG GGCCTGCCCT CGACTTATAG TCCGCGTAGG

                                 LIPG  Rev.
                           ======================
      LIPG  Sonde             Exongrenze  8-9
      =============                 ==
1601  GGGTGAAGTC TGGGGAAACC CAGCGGAAAC TGACATTTTG TACAGAAGAC
      CCCACTTCAG ACCCCTTTGG GTCGCCTTTG ACTGTAAAAC ATGTCTTCTG
```

Abbildung 13: Sequenz der cDNA der LIPG-mRNA (Genbank: XM_008696) mit Bindungsstellen der Primer und der Sonde und den Exongrenzen.

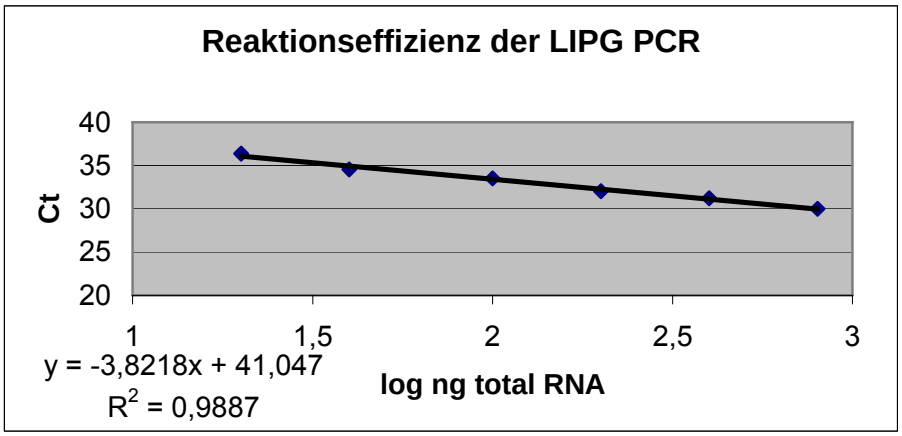

Abbildung 14: Die Abbildung zeigt die Reaktionseffizient der PCR-Reaktion für LIPG-Sequenzen. Die Steigung der Geraden bei der LIPG4-PCR entspricht : y = -3,8218x + 41,047 mit R2 = 0,9887. Die Steigung s beträgt -3,8218; nach $E=10^{1/s}-1$ beträgt die Reaktions-Effizienz der PCR: -0,4525516.

Lysosomale saure Lipase (LAL)

Lysosomale Saure Lipase (LAL) = Lysosomal acid cholesteryl esterase (EC 3.1.1.13). Das RT-PCR-Produkt hat eine Länge von 86 bp. Die Sonde ist komplementär zur gDNA der LAL (Genbank: 16156721) an Position 23565-23576 und Position 24769-24788, wodurch es bei der Annealingtemperatur zu keiner Bindung kommen kann.

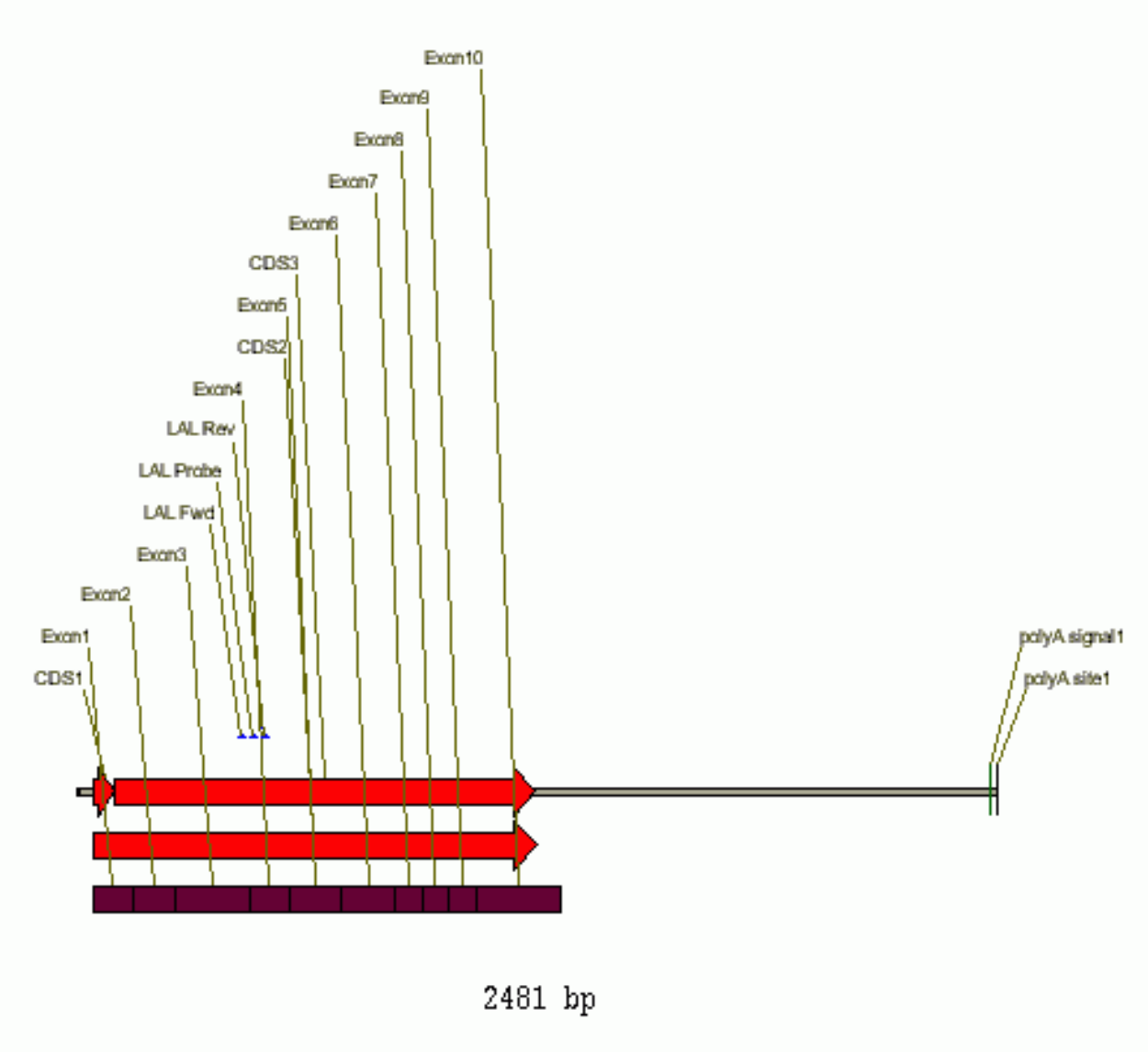

Abbildung 15: mRNA von LAL (Genbank: 16156721) mit Exons und Bindestellen der Primer und der Sonde.

Tabelle 9: Sequenzen und Eigenschaften der Primer und Sonde für LAL.

Name	Start	Länge (bp)	Tm	%GC	Sequenz 5'-3'	Konz. Im PCR-Mastermix
LAL Fwd	413	26	53,9	42,3	GAC ACT CTC AGT TTC TCA GGA TGA AT	0,6 µM
LAL Rev	508	25	54,9	44,0	TGA AGT TAA TGG AAG CTG GTA GGT C	0,6 µM
LAL Sonde	450	29	64,8	44,8	TTG CCA TCT CAT CAT AAC TGA AAG CCC AG	0,4 µM

```
                                          LAL  Fwd  LAL  Sonde
                                  ============================ =
401  ATACCTGGTC TCGGAAACAT AAGACACTCT CAGTTTCTCA GGATGAATTC
     TATGGACCAG AGCCTTTGTA TTCTGTGAGA GTCAAAGAGT CCTACTTAAG

              LAL   Sonde                              LAL  Rev
     ==============================      ==================
451  TGGGCTTTCA GTTATGATGA GATGGCAAAA TATGACCTAC CAGCTTCCAT
     ACCCGAAAGT CAATACTACT CTACCGTTTT ATACTGGATG GTCGAAGGTA

     LAL  Rev
     ========
501  TAACTTCATT CTGAATAAAA CTGGCCAAGA
     ATTGAAGTAA GACTTATTTT GACCGGTTCT
```

Abbildung 16: Bindungsstellen an cDNA der LAL mRNA (Genbank: HSLYACLY): Die LAL Sonde bindet nur an die cDNA (reverser Strang) der RT-PCR, da die Exongrenze zwischen Exon 3 und Exon 4 bei der Base 458 liegt.

Cystathionin-β -Synthase (CBS)

Von der gDNA werden 10 unterschiedliche mRNA-Produkte gebildet, welche sich in der ersten Teilsequenz und im Vorhandensein des Exons 15 unterscheiden. Das RT-PCR-Produkt hat eine Länge von 80 bp.

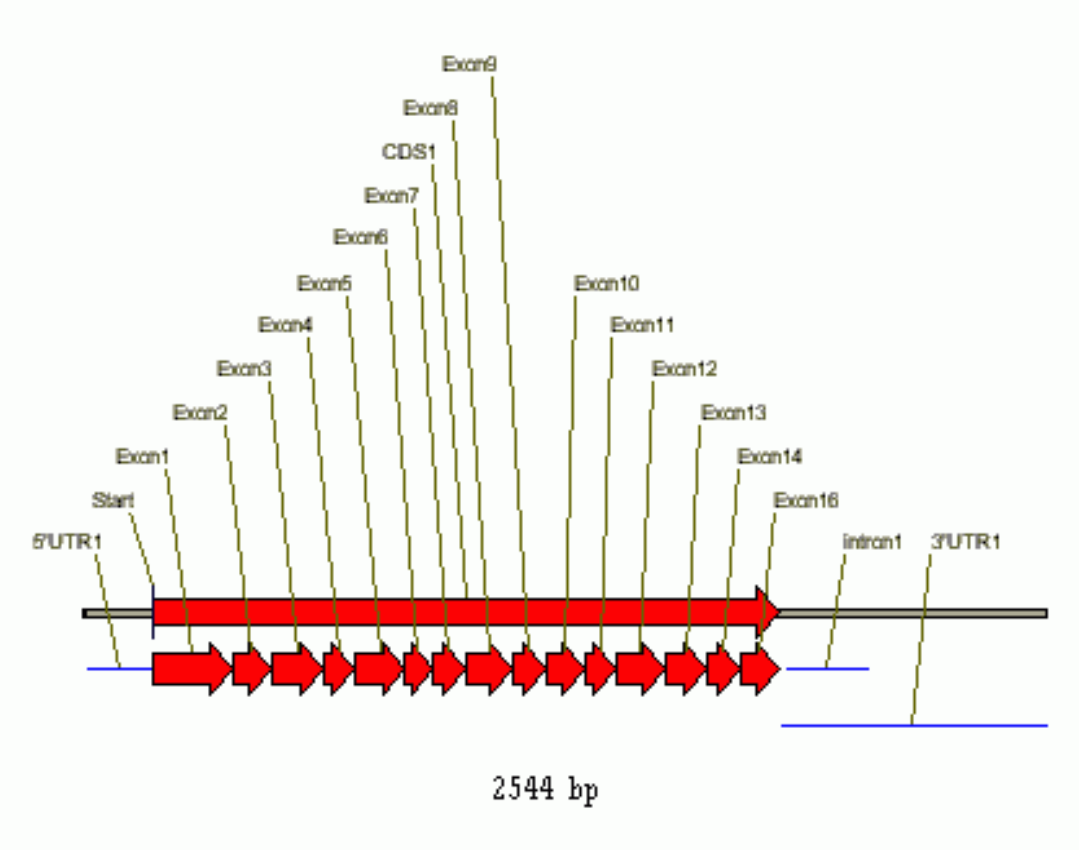

Abbildung 17: mRNA Sequenz für die Splicingvariante „major CBS“ ohne Exon15.

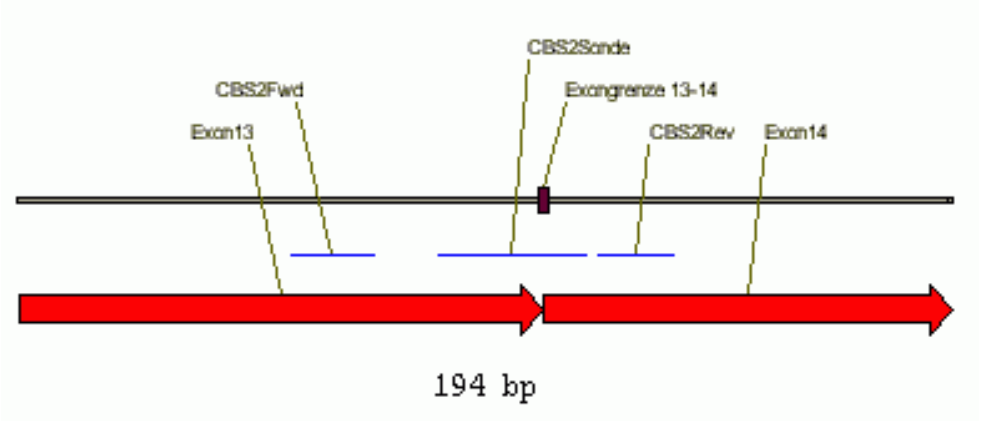

Abbildung 18: cDNA von CBS mit Exongrenzen und Lage der Primer- und Sondenbindungsstellen.

Tabelle 10: Sequenzen und Eigenschaften der Primer und Sonde für CBS.

Name	Start	Länge (bp)	Tm	%GC	Sequenz 5'-3'	Konz. im PCR-Mastermix
CBS Fwd	1596	18	58	67	AGG TGC AGC CGT CAG ACC	0,5 µM
CBS Rev	1675	16	58	75	CCT GCC CAG CGT GTC C	0,5 µM
CBS Sonde	1627	31	70	48	CAT CTA CAA GCA GTT CAA ACA GAT CCG CCT C	0,2 µM

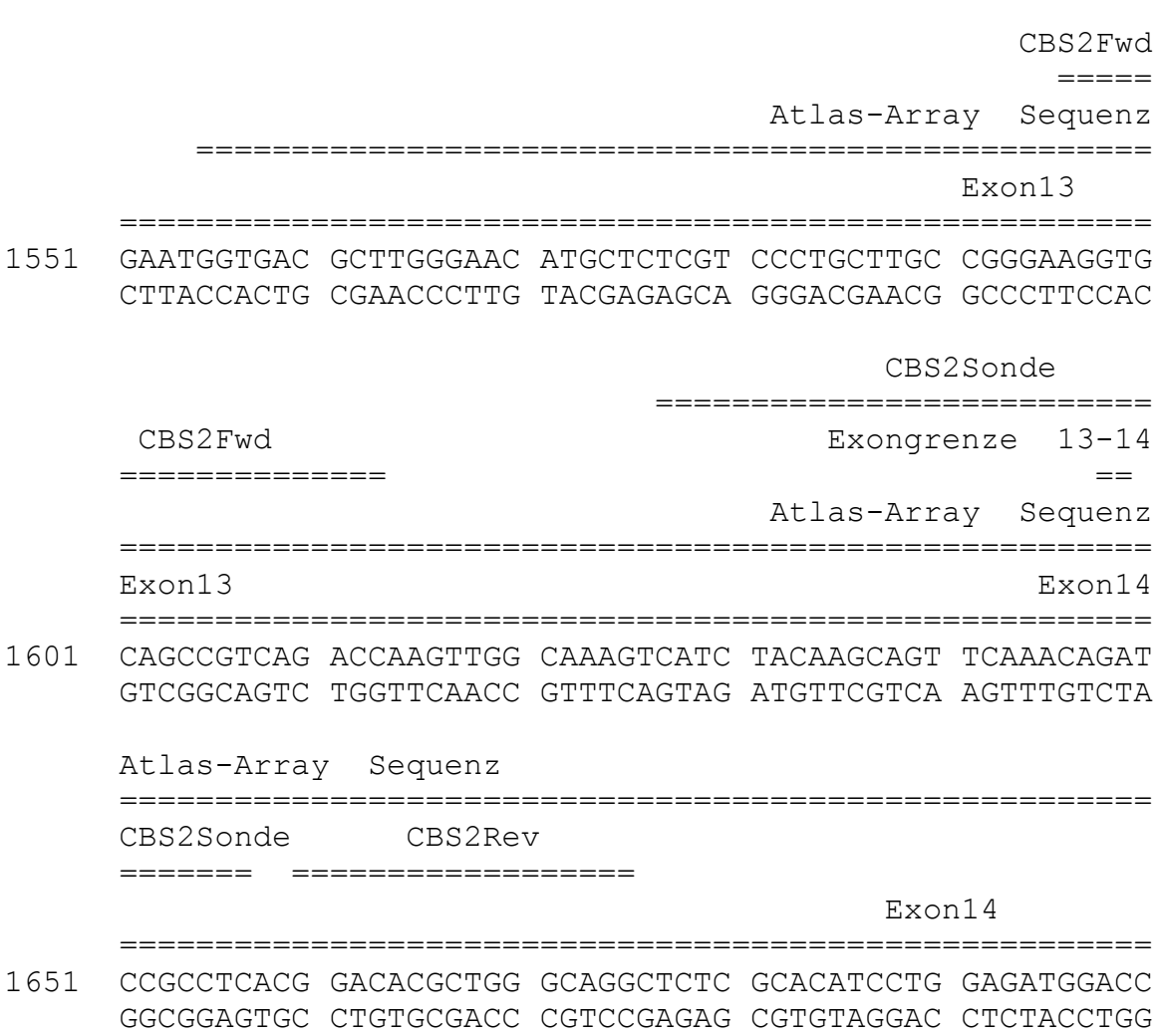

Abbildung 19: Bindestellen der Primer und Sonde an die cDNA der Cystathionin β-Synthase. Zusätzlich ist die Sequenz des Arrays angegeben.

Profilin I (PFN1)

Das RT-PCR-Produkt der mRNA von Profilin I hat eine Länge von 103 bp. Die mRNA-Sequenz, welche vom Gen „Profilinlike“ gebildet wird ist zur Verdeutlichung der Unterschiede mit angegeben.

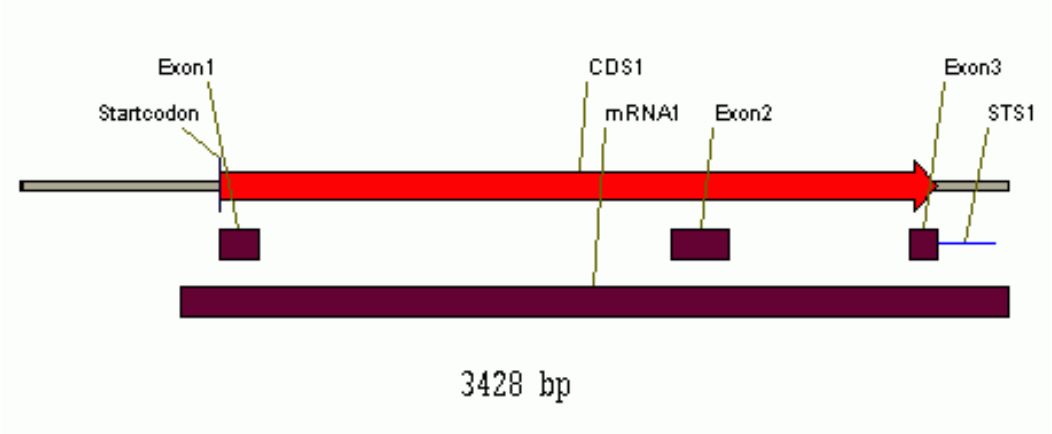

Abbildung 20: Exonanordnung auf der PFN1 gDNA (Genbank: NT033299) bzw. primären mRNA.

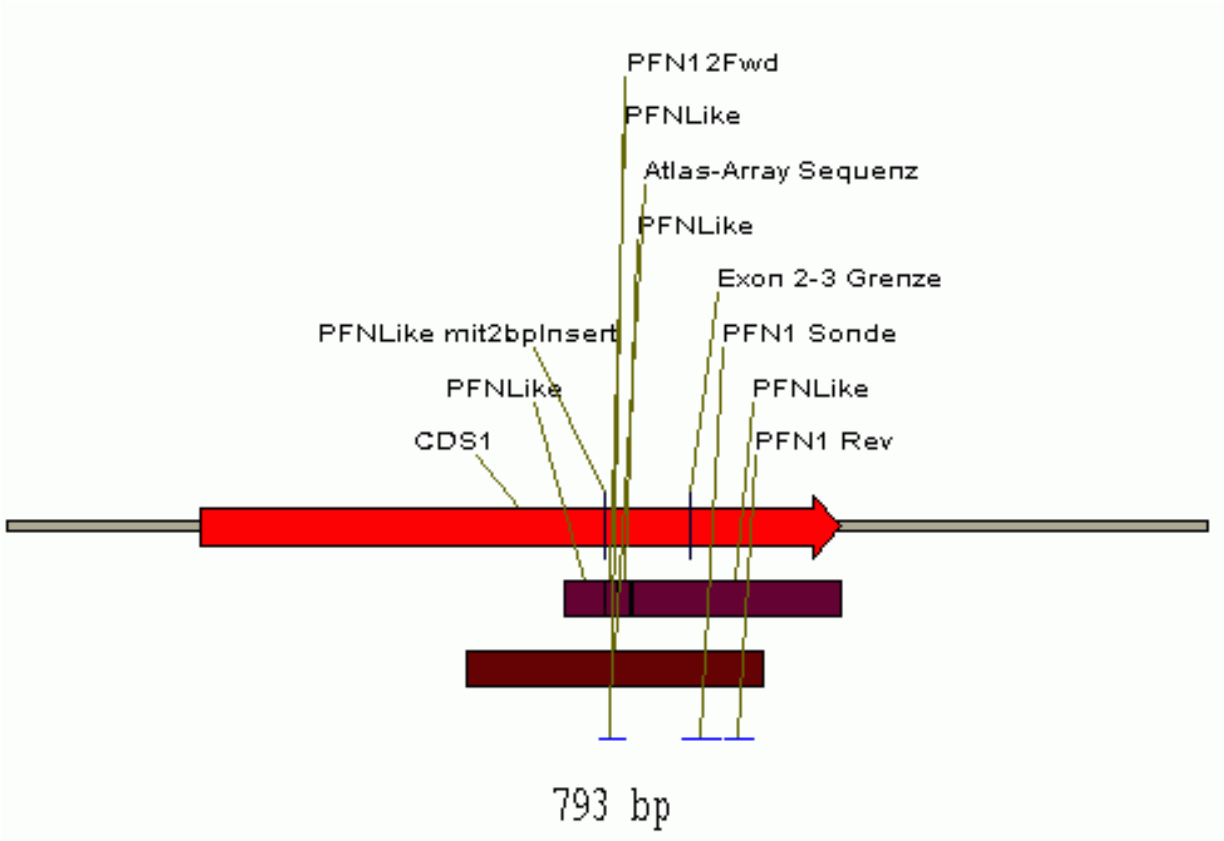

Abbildung 21: Primer- und Sondenbindungsstellen an PFN1 cDNA (Genbank: J03191.1) mit Profilinlike-cDNA.

Tabelle 11: Sequenzen und Eigenschaften der Primer und Sonde für PFN1.

Name	Start	Länge (bp)	Tm	%GC	Sequenz 5'-3'	Konz. im PCR-Mastermix
PFN1 Fwd	390	19	53.5	57.9	TTC GTA CCA AGA GCA CCG G	0,3 µM
PFN1 Rev	492	20	53.7	55.0	CCA CCG TGG ACA CCT TCT TT	0,3 µM
PFN1 Sonde	445	26	62.4	53.8	TGA CAA GAC GCT AGT CCT GCT GAT GG	0,2 µM

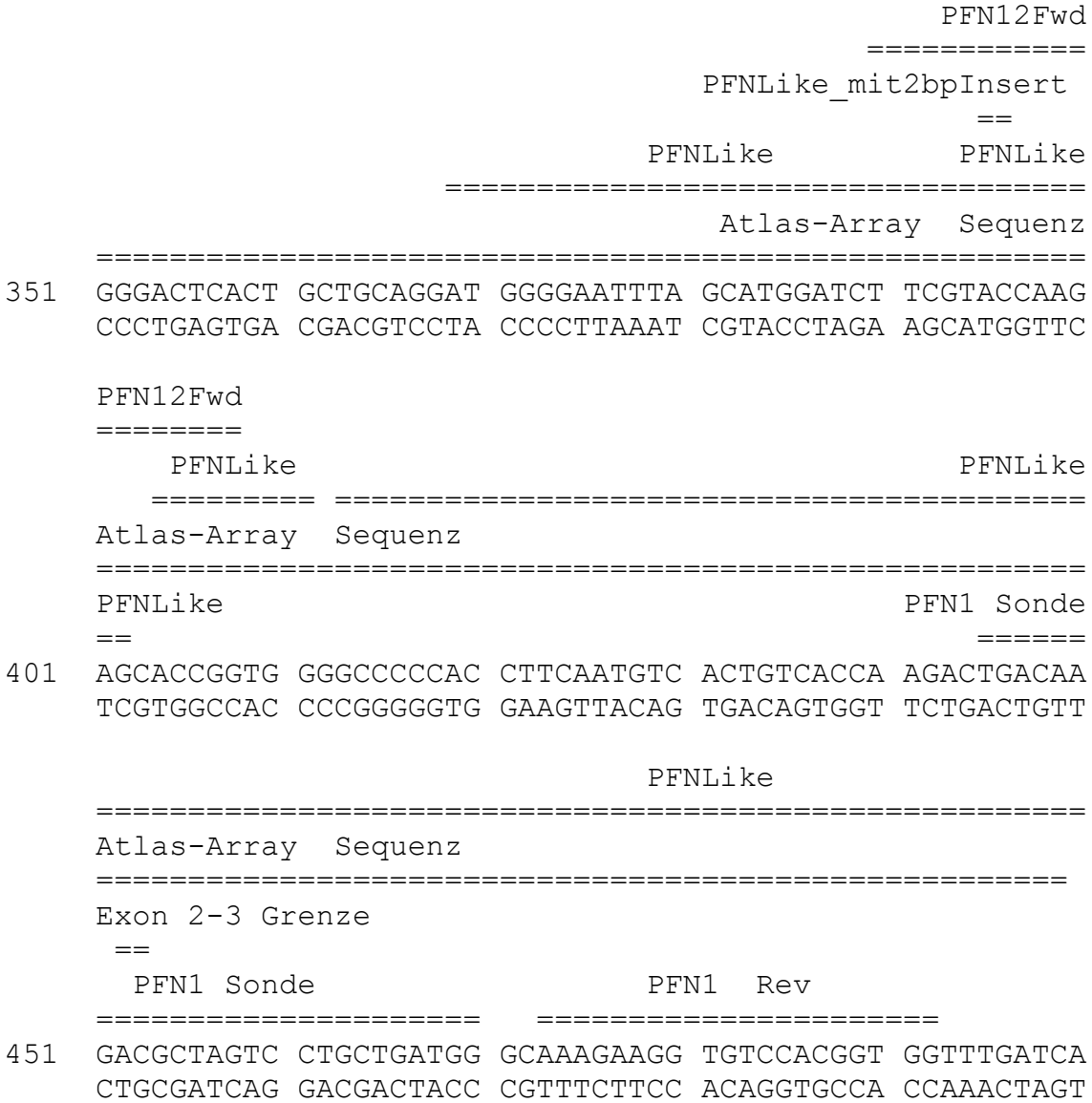

Abbildung 22: Primersequenzen für Profilin I (PFN1) über Exongrenze 2 und 3 zum Vergleich mt Profilinlike-Gen.

```
                                        PFN1  Fwd        PFN1 Sonde
                                  ==========================  ======
401  AGCACCGGTG GGGCCCCCAC CTTCAATGTC ACTGTCACCA AGACTGACAA
     TCGTGGCCAC CCCGGGGGTG GAAGTTACAG TGACAGTGGT TCTGACTGTT

     Exon 2-3 Grenze
      ==
       PFN1 Sonde                      PFN1  Rev
     ====================    ======================
451  GACGCTAGTC CTGCTGATGG GCAAAGAAGG TGTCCACGGT GGTTTGATCA
     CTGCGATCAG GACGACTACC CGTTTCTTCC ACAGGTGCCA CCAAACTAGT
```

Abbildung 23: Sequenz von „human Profilin I“ mRNA mit Primer- und Sonden-Bindestellen (Genbank: gi|190385|gb|J03191.1|).

```
1Profilin I  mRNA      GCTGCAGGATGGGGAATTTAGCATGGATCTTCGTACCAAGAGCACCGGTGGGGCCCCCAC 420
Profilin II  mRNA      ATACGTCGATGGTGACTGCACAATGGACATCCGGACAAAGAGTCAAGGTGGGGAGCCAAC 306
Profilin IIa mRNA      ATACGTCGATGGTGACTGCACAATGGACATCCGGACAAAGAGTCAAGGTGGGGAGCCAAC 293
                              ***** ** *  *  *****  * ** ** *****    *******  ** **

1Profilin I  mRNA       CTTCAATGTCACTGTCACCAAGACTGACAAGACGCTAGTCCTGCTGATGGGCAAAGAAGG 480
Profilin II  mRNA       ATACAATGTGGCTGTCGGCAGAGCTGGTAGAGCATTGGTTATAGTCATGGGAAAGGAAGG 366
Profilin IIa mRNA       ATACAATGTGGCTGTCGGCAGAGCTGGTAGAGTCTTGGTCTTTGTAATGGGAAAAGAAGG 353
                         * ******  *****  **   ***  *     * **  *  * ***** ** *****

1Profilin I  mRNA       TGTCCACGGTGGTTTGATCAACAAGAAATGTTATGAAATGGCCTCCCACCTTCGGCGTTC 540
Profilin II  mRNA       TGTCCACGGAGGCACACTTAACAAGAAAGCATATGAACTCGCTTTATACCTGAG------ 420
Profilin IIa mRNA       GGTCCATGGAGGCGGATTGAATAAGAAGGCATACTCAATGGCAAAATACTTGAGAGACTC 413
                         ***** ** **     * ** *****    **   * * **     ** *  *
```

Abbildung 24: Aneinanderlagerung der ähnlichen cDNA-Sequenzen von Profilin I mit Profilin II und Profilin IIa.

4.10. Software

- Für die Konstruktion der Primer wurde das Programm ABI-Prism (Version 1.7; Applied Biosystems) eingesetzt.
- Um die Spezifität der Primer und Sonden zu gewährleisten, erfolgte ein Sequenzvergleich mit der Genbank durch BLAST (Genbank); (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).
- Zum Vergleich ähnlicher Zielsequenzen diente „CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment“, welches über das Internet frei verfügbar ist (www.ebi.ac.uk/clustalw).
- Zur grafischen Darstellung der DNA-, mRNA- und cDNA-Sequenzen wurde das Programm „Vector NTI DeLuxe“ (InforMax, Inc., Gaithersburg, USA) verwendet.
- Die Banden des Differential Display wurden durch die Software „BASE IMAGEIR, Datacollection“ Version 02.31 (MWG-Biotech) detektiert.
- Die Messung der Intensität der Spots des Gen-Arrays erfolgte mit „Adobe Photoshop 6.0“ (Adobe Systems Incorporated, San Jose, Kalifornien, USA).
- Die Quantifizierung der realtime PCR Produkte erfolgte mit Hilfe der Software „Sequence Detector“ (Version 1.7; Applied Biosystems) und mit Hilfe von MS-Excel.

4.11. Puffer, Lösungen und Nährmedien

50 X E-Puffer / pro Liter (= RNA-Laufpuffer)
80,095 g Na_2HPO_4 x $2H_2O$, 6,8996 g NaH_2PO_4 x H_2O, ad 0,5 l H_2O, +0,5 ml DEPC, ÜN 37 °C, 2 x autoklavieren.

RNA-Sample Puffer (= RNA-Ladepuffer):
750 µl deionisiertes Formamid
150 µl 10 x MOPS (3-[N-Morpholino]propane-sulfonic acid)
240 µl Formaldehyd
100 µl DEPC
100 µl Glycerol
80 µl 10% Bromophenolblau Na-Salz

10 x MOPS/EDTA:
0,2 M MOPS
10 mM EDTA (pH 7.0)
50 mM Na-Acetat

SGP-Puffer
Für die Lagerung der EBs bei –80 °C und als Negativkontrolle bei der Infektion der Zellen:
0,76 g Na_2HPO_4 x $2H_2O$
36,25 g Sucrose
0,76 g KH_2PO_4
0,36 g L-Glutaminsäure
mit H_2O dest. auf einen halben Liter auffüllen.

Tryphanblau-Ausschlusstest
Die Vitalität der Zellen wurde mit dem Tryphanblau-Ausschlusstest (Current protocols, 1995) bei 72 hPI überprüft.

Anzuchtmedium für HEp-2

500 ml MEM, 1 mM NEAA, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin.

Infektionsmedium für HEp-2 zur Massenanzucht von *C. p.*

MEM supplementiert mit 1 mM NEAA, 2 mM L-Glutamin, 1 µg / ml Cycloheximid, 10 µg / ml Gentamycin, 50 µg / ml Vancomycin, 2 µg / ml AmphotericinB und 20 mM HEPES ohne FCS.

Infektionsmedium für HEp-2 Expressionsversuche

500 ml MEM; 1 mM NEAA; 2 mM L-Glutamin; ohne FCS und ohne Antibiotika.

Anzuchtmedium für HCAEC

0,5 l Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2 supplementiert mit EGM-2-MV Bullet Kit (CC-4147, Clonetics; 25 ml FBS; 0,2 ml Hydrokortison; , 2 ml hFGF-B; 0,5 ml VEGF; 0,5 ml R^3-IGF-1; 0,5 ml Ascorbinsäure; 0,5 ml hEGF; 0,5 ml GA-1000,)

Infektionsmedium für HCAEC Expressionsversuche

0,5 l “Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2” (Clonetics) + Einzelkomponenten des EGM-2-MV Bullet Kit (Clonetics) (FBS, 25 ml; hFGF-B, 2 ml; VEGF, 0,5 ml; R^3-IGF-1. 0,5 ml; Ascorbinsäure, 0,5 ml; hEGF, 0,5 ml).

ReagentPack (CC-5002) zum Spalten der HCAEC

HEPES gepufferte Salz Lösung (HEPES-BSS)(CC-5022), Trypsin/EDTA Lösung (CC-5012), Trypsin Neutralisationslösung (CC-5002).

5. Ergebnisse

5.1. Ergebnisse der Vorversuche

5.1.1. Infektionsversuch von HCAEC durch *C. p.*

Es wurden mehrere Infektionen mit unterschiedlichen MOI, Infektionsmedien und Zentrifugationszeiten durchgeführt. In mehreren Ansätzen konnten 72 Stunden nach der Infektion von HCAEC durch *C. p*. im Mikroskop Einschlusskörperchen beobachtet werden.

5.1.2. Infektionsmedien

Mit den HEp-2 Zellen wurde überprüft, ob das in der Literatur beschriebene Infektionsmedium (Apfalter, 2000) auch ohne Zusatz von Antibiotika eine entsprechende Infektionsrate ermöglicht.

Für die Infektionen der HCAEC wurden verschiedene Zusammensetzungen von Infektionsmedien mit unterschiedlichen Infektionsdosen von EBs (MOI 0:1, 100:1, 300:1, 500:1) getestet, um das Überleben der Zellen bei möglichst wenig Einfluß auf den Infektionsverlauf zu gewährleisten.

Tabelle 12: Ergebnis des Infektionsversuches von HCAEC mit verschiedenen MOI und verschiedenen Infektionsmedien.

Medienzusammensetzung	Zellen	Zellen	Zellen	Zellen
Anzuchtmedium für HCAEC ohne FCS, Hydrocortisone, Cycloheximid	MOI von 1:0	MOI von 1:100	MOI von 1:300	MOI von 1:500
.+FCS+Hydrocotisone-Cycloheximide	lebend	lebend	lebend	lebend
.+FCS-Hydrocotisone-Cycloheximide	lebend	lebend	lebend	lebend
.-FCS+Hydrocotisone-Cycloheximide	tot	tot	tot	tot
.-FCS-Hydrocotisone-Cycloheximide	tot	tot	tot	tot
.+FCS+Hydrocotisone+Cycloheximide	lebend	lebend	lebend	lebend
.+FCS-Hydrocotisone+Cycloheximide	lebend	lebend	lebend	lebend
.-FCS+Hydrocotisone+Cycloheximide	lebend	lebend	lebend	lebend
.-FCS-Hydrocotisone+Cycloheximide	lebend	lebend	lebend	lebend

Als Ergebnis der Infektionsversuche ergab sich bei den 8 möglichen Zusammensetzungen bez. Verwendung von FCS, Hydrokortison und Zykloheximid, dass die Kombinationen „ohne FCS, mit Hydrokortison ohne Zykloheximid“ und „ohne FCS, ohne Hydrokortison, ohne Zykloheximid“ auf die Zellen letal wirkten. Die Zellen wurden dabei sowohl bei der Infektion mit den EBs, als auch in der nicht

infizierten Probe abgetötet. Die Beurteilung der Vitalität der Zellen erfolgte durch eine mikroskopische Untersuchung nach dem Tryphanblau-Ausschlusstest bei 72 hPI. Als Infektionsmedium für HCAEC wurde somit Vollmedium ohne Hydrokortison und ohne GA-1000 (= Antibiotika-Mischung) aber mit FCS verwendet.

5.1.3. Verhältnis zwischen EBs und Wirtszelle

Durch Infektionsversuche mit unterschiedlichen Verhältnissen von EBs zu Wirtszellen (HEp-2 und HCAEC) konnte eine MOI von 300:1 (EBs: Zielzelle) ermittelt werden, bei welcher eine quantitativ gute Infektion erreicht wurde.

5.1.4. Zentrifugationsdauer bei der Infektion

Es wurden EBs im Infektionsmedium unterschiedlich lang auf HCAEC bzw. HEp-2 Zellen zentrifugiert, um die minimale Zentrifugationszeit zu eruieren, welche eine mengenmäßig gute Infektion ermöglicht. Bei dem Ansatz, bei welchem nicht zentrifugiert wurde, ergab sich nur eine geringe Infektionsrate. Bei den anderen Ansätzen mit Zentrifugationszeiten von 10, 30, 45 und 60 min konnte eine etwa 20-30-prozentigen Infektion festgestellt werden. Da die Zellen nur kurze Zeit außerhalb des Brutschrankes verbleiben sollen, die EBs jedoch für eine entsprechende Infektionsrate in die Nähe der Zelloberfläche gebracht werden sollen, wurde für die Infektionen für die mRNA Quantifizierung eine Zentrifugationsdauer von 10 Minuten bei 2000g für HCAEC und HEp-2 Zellen gewählt.

5.1.5. Methode um EBs zu inaktivieren

Dieser Vorversuch wurde mit HEp-2 durchgeführt und das Ergebnis mit HCAEC überprüft. Es wurden acht unterschiedliche Methoden bzw. Infektionsansätze miteinander verglichen um die EBs an der Reproduktion zu hindern. Dabei zeigte sich, dass durch eine Behandlung der EBs mit Tetracyclin, Chloramphenicol, UV-Licht, 75 °C und 90 °C die Bildung der Einschlusskörperchen vollkommen gehemmt werden konnte. Der Inaktivierung durch UV-Licht wurde wegen der Annahme, dass kaum Nebenreaktionen bezüglich der mRNA - Bildung der Zellen entstehen der Vorzug gegeben. In der Positivkontrolle konnten 87 IBs/Gesichtsfeld detektiert werden (=~50 % Infektion). Die HEp-2 Zellen waren in allen Ansätzen gut entwickelt (~200 Zellen / Gesichtsfeld).

Eine Probe mit UV-inaktivierten EBs wurde bei allen Expressionsversuchen als EB^{UV} mituntersucht.

5.1.6. Minimaler Zeitpunkt für Expressionsänderung

Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Infektion von HCAEC RNA-Proben gewonnen und durch ein Differential Display auf Expressionsunterschiede untersucht. Durch die Kombination der Primer T1 und P4, konnte ein Unterschied in der Expressionsintensität gezeigt werden (Abbildung 25), der bereits 2 Stunden nach einer Infektion von HCAEC mit *C. p.* erfolgte.

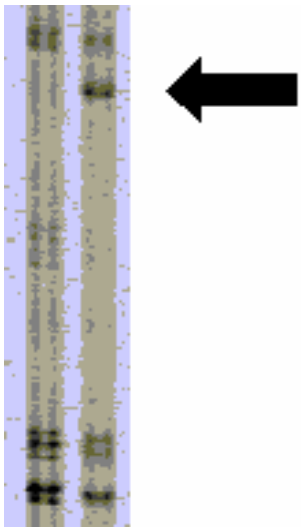

Abbildung 25: Ausschnitt aus dem Differential-Display-Gel. Die linke Gelspur zeigt die Expressionsmuster von unstimulierten Zellen, die rechte Spur zeigt das Expressionsmuster von infizierten Zellen. Der Pfeil zeigt jene Bande, welche in der Probe der *C. p.*-infizierten HCAEC bereits nach 2 hPI gebildet wurde.

5.2. Ergebnisse der Expressionsversuche

5.2.1. Ergebnisse des Gen-Array-Versuches

Die Intensität der Schwärzung der Punkte auf den Hybridisierungsmembranen (Abbildung 26 und Abbildung 27) spiegelt die Menge an gebundener cDNA wider. Die Auswertung der Intensität dieser Punkte erfolgte durch die Messung der Graustufenintensität mit dem Programm „Adobe Photoshop“. Für die Ergebnisdarstellung der Quantifizierung wurde die Schwärzungsintensität der Punkte des Gen-Array1 auf die X - Achse und analog dazu jene des Gen-Array2 auf die Y - Achse aufgetragen (Abbildung 28). Jene Punkte, welche von der Diagonalen (welche gleicher Intensität auf beiden Gen-Arrays entspricht) weiter entfernt sind, zeigen stärkere Expressionsunterschiede der zwei Proben als jene, welche näher an der Diagonalen liegen. Der graue Bereich markiert den Intensitätsbereich, welcher durch diese Quantifizierungsmethode nicht genau erfasst werden konnte.

In der Tabelle 13 sind die Gene angegeben, welche auf den zwei Hybridisierungsmembranen starke Intensitätsunterschiede zeigten.

Durch den Gen-Array konnten mehrere Gene identifiziert weren, welche in Abhängigkeit einer *C. p.*-Infektion unterschiedliche Expressionsintensitäten zeigten. Dazu gehörten folgende Gene, welche mit der Atherosklerose assoziert sein könnten: Galectin1, welches 24 hPI in den HCAEC durch die Infektion mit EBs schwächer exprimiert wurde (Abbildung 28). Die Position des Gens auf den Membranen ist B4j (Abbildung 26 und Abbildung 27). Ebenso konnte Cystathionin β Synthase identifiziert werden, welches bei der Infektion jedoch stärker exprimiert wurde (Position F1a). Auch “monocyte chemotactic protein 1“ (MCP1, Position A3i) wurde durch die Infektion stärker exprimiert.

Tabelle 13: Es sind jene Gene angegeben, welche auf den Hybridisierungsmembranen (Abbildung 26 bzw. Abbildung 27) einen starken Expressionsunterschied zeigten.

Genname	relative Intensität „Schein-infektion“	relative Intensität „Infektion mit *C. p.*“	Position auf der Membran	GenBank Accession #
monocyte chemotactic protein 1 (MCP1)	57	88	A3i	M24545
retinoic acid receptor gamma (RARG)	54	86	A7e	M24857
high-density lipoprotein-binding protein (HDL-binding protein; HBP)	84	75	B2n	M83789
galectin-1	89	58	B4j	J04456
junction plakoglobin (JUP); desmoplakin III (DP3)	76	92	C5c	M23410; Z68228
profilin I	73	85	D1j	J03191
cytochrome P450 IIB6 (CYP2B6); CYP2B3	54	73	E2e	M29874; J02864
alcohol dehydrogenase 6	54	71	E4n	M68895
cystathionine beta-synthase	56	89	F1a	L19501
Brain natriuretic peptide B (NPPB; BNP)	82	89	F5g	M25296
neutrophil-activating protein 3 (NAP3); growth-regulated protein (GRO)	54	72	F7j	J03561

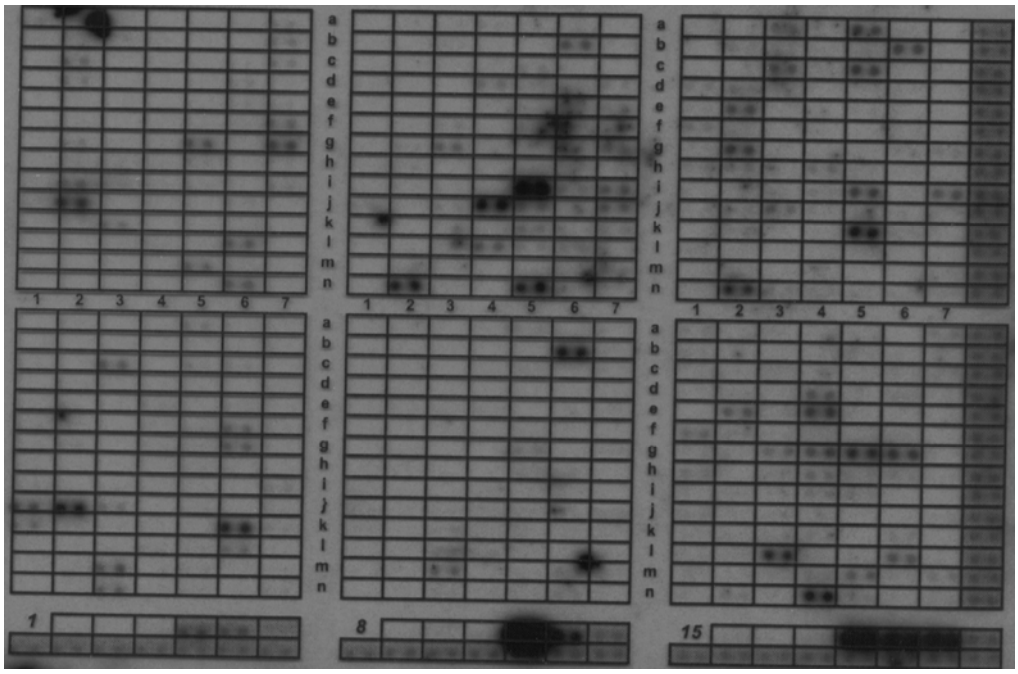

Abbildung 26: Abbildung des Gen-Arrays der Probe1 (scheininfizierte Zellen) 24 hPI nach einer Expositionsdauer von 4 Tagen mit Raster überlegt.

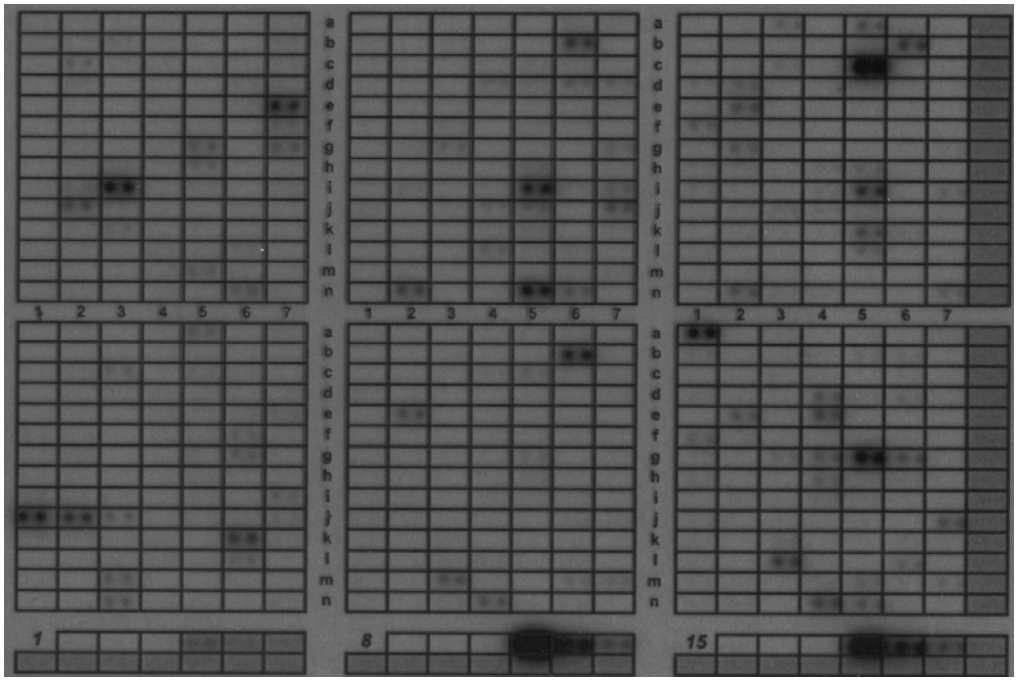

Abbildung 27: Abbildung des Gen-Arrays der Probe2 (mit vermehrungsfähigen EBs infizierte Zellen) 24 hPI nach einer Expositionsdauer von 3 Wochen mit Raster überlegt.

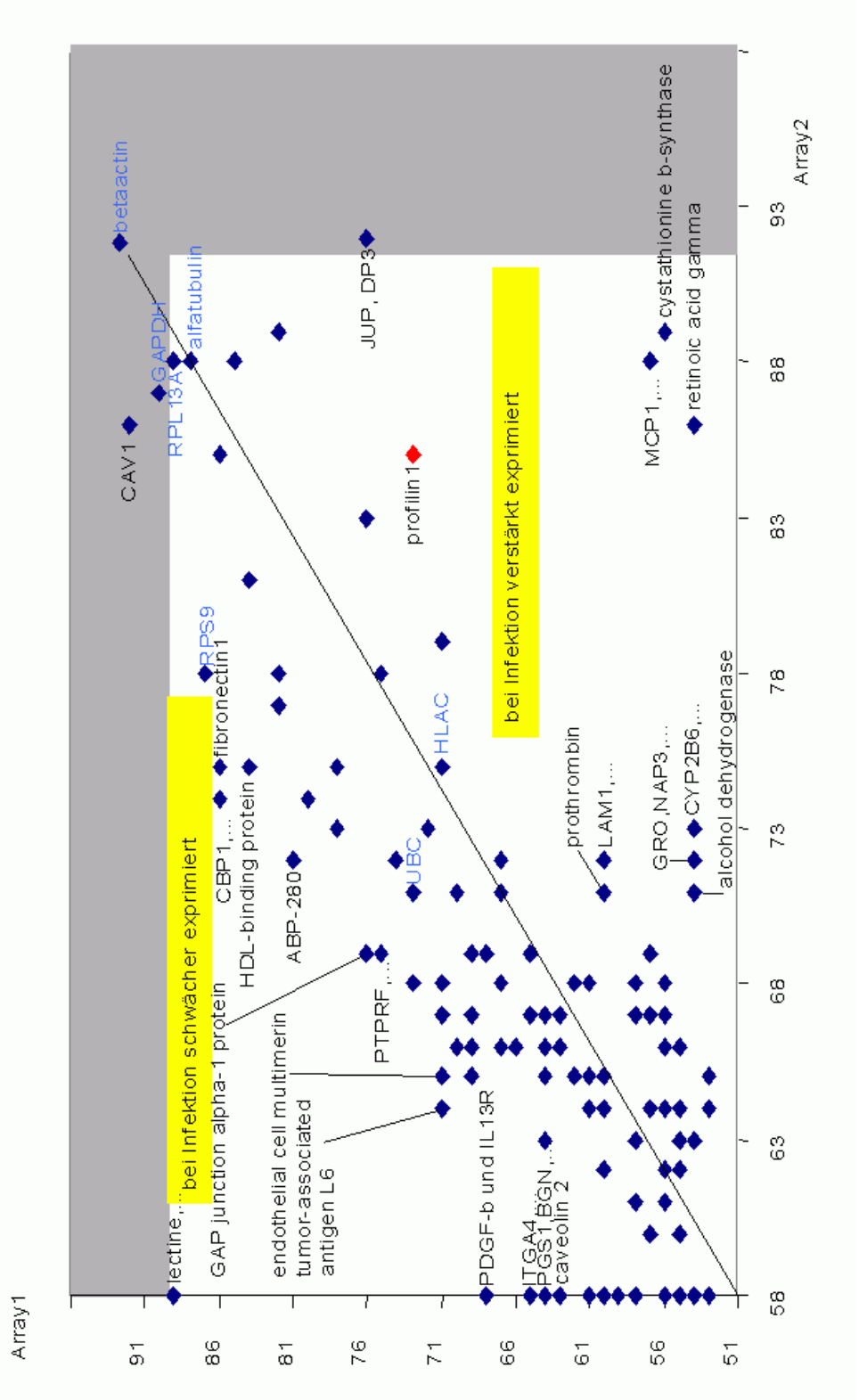

Abbildung 28: Grafische Darstellung der Quantifizierung der Schwärzungsgrade der Punkte auf den Hybridisierungsmebranen. Die Intensität der Punkte durch die cDNA der Kontrollzellen (Gen-Array1) sind auf der X - Achse gegenüber jenen der infizierten Zellen (Gen-Array2) auf die Y - Achse aufgetragen. Die Einheiten sind relative Intensitätseinheiten der Schwärzung.

5.2.2. Ergebnisse der QPCR (realtime-PCR)

Die Ergebnisse der Quantifizierung der mRNA der infizierten Zellen sind folgend nach untersuchtem Gen eingeteilt. Zur Berechnung der relativen Expression der Zielgene wurde als Referenz die Expression in scheininfizierten Proben der gleichen Zeit gewählt. Die mRNA Expression der scheininfizierten Zellen wurden somit mit 1 angenommen.

Interleukin 8 (IL-8)

Die Abbildung der Analyse der IL-8 mRNA-Expression (Abbildung 29 + Tabelle 14) zeigt, dass es zu einer zeitabhängig verstärkten Bildung von IL-8 mRNA bei den *C. p*. infizierten HCAE-Zellen kam, wohingegen bei jenen Zellen, welche mit EB^{UV} infiziert wurden kaum eine Reaktion eintrat. Die Infektion ergab bei 24 hPI eine 17-fache und bei 48 hPI eine 13-fache Expressionssteigerung im Vergleich zur nicht infizierten Probe der gleichen Zeit. Die Expression jener Charge, welche für den Gen-Array eingesetzt wurde (24 hPI), ergab bei der infizierten Probe eine 27 bis 38–fache Expression.

Zum Vergleich wurden auch HEp-2-Zellen infiziert. Die Infektion von HEp-2 Zellen ergab nur einen geringen Einfluß auf die IL-8-mRNA-Expression (Abbildung 30), unabhängig davon, ob die EBs leben oder UV-inaktiviert wurden. Lediglich bei 24 hPI stieg die Expression in den EB-infizierten Zellen auf das 2,2-Fache bzw. 1,6-Fache (EB^{UV}).

Tabelle 14: Relative Expression von Interleukin-8 mRNA in HCAEC bezogen auf die Scheininfektion der entsprechenden Zeit.

HCAEC	x-fache Expression (Φ)		Std.Dev.	Std.Dev.
HPI	EB-infiziert	EB^{UV}-infiziert	EB-infiziert	EB^{UV}-infiziert
1	1,38	1,08	0,19	0,14
2	3,22	2,79	2,61	0,53
4	1,61	2,97	0,18	3,55
24	17,08	1,21	19,16	0,12
48	13,36	0,67	1,22	0,20

Tabelle 15: Relative Expression von Interleukin-8 mRNA in HEp-2 Zellen bezogen auf die Scheininfektion der entsprechenden Zeit.

HEp-2	x-fache Expression (Φ)		Std.Dev.	Std.Dev.
hPI	EB-infiziert	EB^{UV}-infiziert	EB-infiziert	EB^{UV}-infiziert
2	0,52	0,39	0,44	0,22
4	1,00	0,97	0,04	0,35
8	1,15	0,73	0,14	0,22
12	0,76	1,06	0,41	0,14
24	2,15	1,62	0,61	0,01

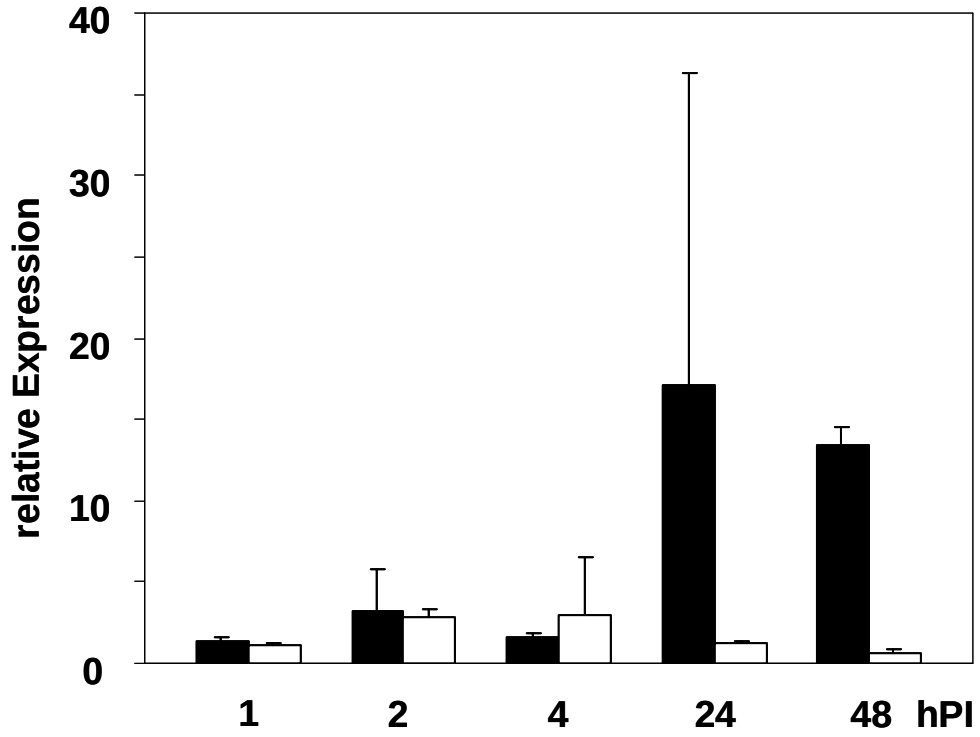

Abbildung 29: Expression der IL-8 mRNA relativ zu den scheininfizierten HCAEC der gleichen Zeit. Schwarze Balken (■) zeigen die Expression der mRNA der Zellen nach Infektion mit vermehrungsfähigen EBs, weiße Balken (□) zeigen die Expression nach Inkubation mit inaktivierten EBs (EB^{UV}) von *C. p.*. Die dünnen Balken geben die Standardabweichung wieder.

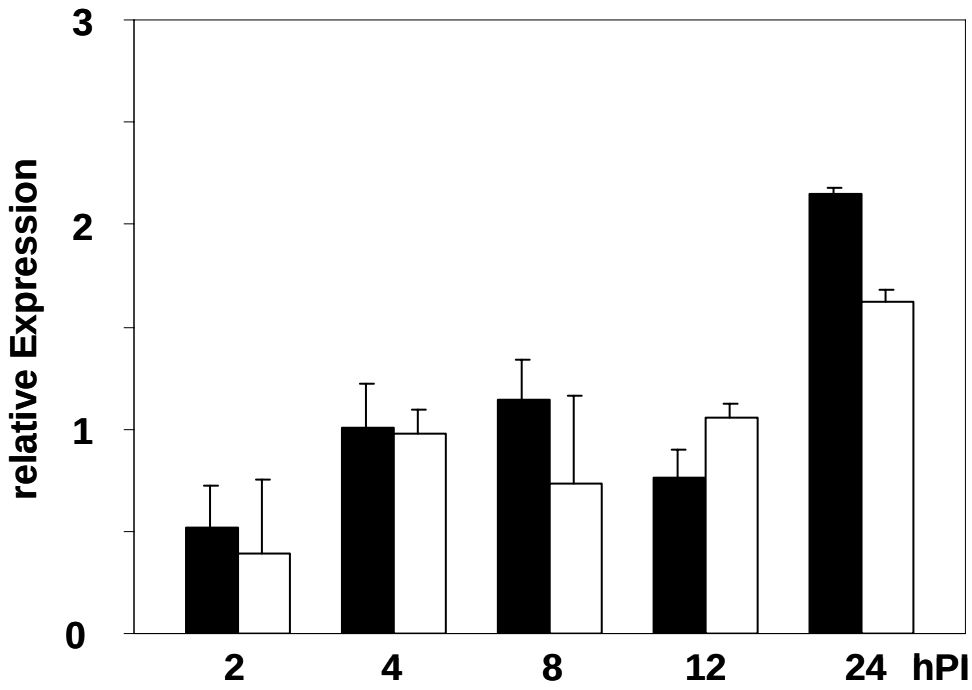

Abbildung 30: Expression der IL-8 mRNA relativ zu den scheininfizierten HEp-2 Zellen der gleichen Zeit. ■ = Infektion mit EB; □ = Infektion mit EB^{UV}.

Human heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)

Die Ergebnisse der Analysen mit HCAEC sind in der Tabelle 16 wiedergegeben, die Ergebnisse für die HEp-2-Zellen sind in der Tabelle 17 zusammengefasst.

Die Analyse der HB-EGF-mRNA von HCAEC zeigte bei den Proben, welche mit den vermehrungsfähigen EBs infiziert wurden, bereits nach 2 hPI eine starke Abnahme auf das durchschnittlich 0,14-fache (Tabelle 16 + Abbildung 31). Dies konnte in drei von einander unabhängigen Infektionen nachgewiesen werden. Die mRNA-Bildung stieg bei 4 hPI wieder an, fiel jedoch sukzessive bis auf die Hälfte nach 90 hPI. Die Infektionen mit EB^{UV} durchgeführt wurden, zeigten keine signifikante Abweichung von der Expression von scheininfizierten Zellen. Lediglich 90 Stunden nach Kontakt mit EB^{UV} zeigten die Zellen eine stark abgeschwächte Bildung von HB-EGF-mRNA.

Tabelle 16: Relative Expression von HB-EGF mRNA in HCAEC bezogen auf die Scheininfektion der entsprechenden Zeit.

HCAEC	x-fache Expression (Φ)		Std.Dev.	Std.Dev.
hPI	EB-infiziert	EB^{UV}-infiziert	EB-infiziert	EB^{UV}-infiziert
1	1,20	1,56	0,38	0,25
2	0,14	1,08	0,10	0,01
4	1,01	0,98	0,41	0,48
12	0,63	0,98	0,14	0,27
24	0,57	0,53	0,51	0,33
48	0,69	1,20	0,00	0,19
90	0,56	0,35	0,01	0,02

Tabelle 17: Relative Expression von HB-EGF mRNA in HEp-2 Zellen bezogen auf die Scheininfektion der entsprechenden Zeit.

HEp-2	x-fache Expression (Φ)		Std.Dev.	Std.Dev.
hPI	EB-infiziert	EB^{UV}-infiziert	EB-infiziert	EB^{UV}-infiziert
2	1,46	0,66	0,25	0,14
4	0,48	0,82	0,00	0,05
8	1,07	1,44	0,18	0,08
12	2,00	1,64	0,77	0,59
24	1,00	1,54	0,19	0,08

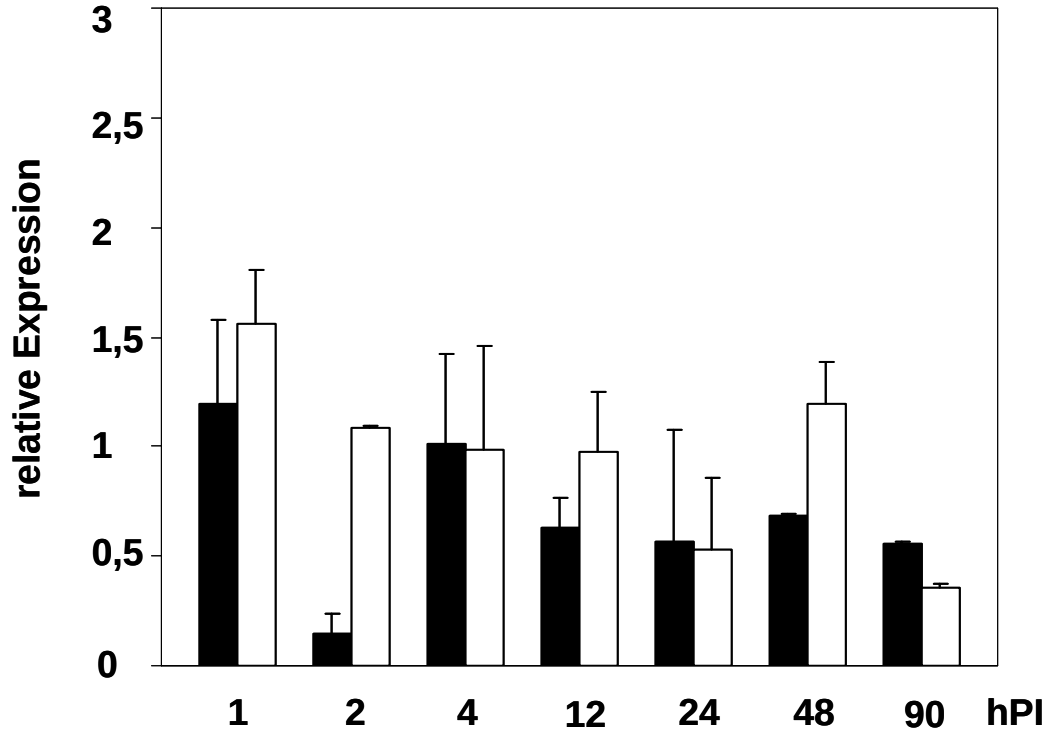

Abbildung 31: Expression der HB-EGF mRNA relativ zu scheininfizierten HCAEC der gleichen Zeit. ■ = Infektion mit EB; □ = Infektion mit EB^{UV}.

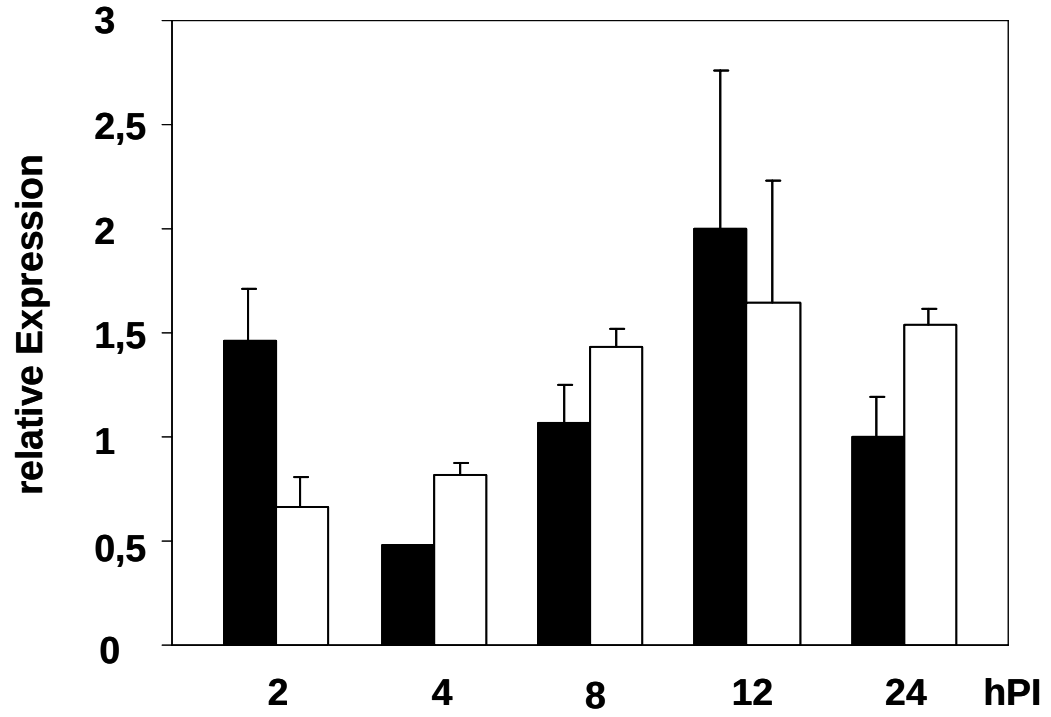

Abbildung 32: Expression der HB-EGF mRNA relativ zu den scheininfizierten HEp-2 Zellen der gleichen Zeit. ■ = Infektion mit EB; □ = Infektion mit EB^{UV}.

Galectin1 (Gal-1)

Die Infektion der HCAEC zeigte bei 2 hPI eine starke Expressionszunahme (Abbildung 33 und Tabelle 18). Dies war aber nur in einer von zwei unabhängigen Infektionen feststellbar. Zu allen anderen gemessenen Zeitpunkten blieb die Expression im Vergleich zur Scheininfektion unbeeinflusst. Die Expression war in den EB^{UV}-infizierten Zellen zum Zeitpunkt 2 hPI um das 3-Fache verstärkt.

Die Infektionen für HEp-2 wurden nur einmal durchgeführt. Es fanden sich kaum Abweichungen von der Expression der scheininfizierten Proben (Abbildung 34 und Tabelle 19).

Tabelle 18: Relative Expression von Galectin-1 mRNA in HCAEC bezogen auf die Scheininfektion der entsprechenden Zeit.

HCAEC	x-fache Expression (Φ)		Std.Dev.	Std.Dev.
hPI	EB-infiziert	EBUV-infiziert	EB-infiziert	EBUV-infiziert
1	0,70	0,76		
2	14,21	3,13	19,31	1,87
4	0,66	0,77	0,08	0,15
12	0,70	0,84		
24	0,93	0,72	0,40	0,34
48	1,67	1,39		
90	0,78	0,90		

Tabelle 19: Relative Expression von Galectin-1 mRNA in HEp-2 Zellen bezogen auf die Scheininfektion der entsprechenden Zeit.

HEp-2	x-fache Expression	
hPI	EB-infiziert	EBUV-infiziert
2	0,91	0,89
4	1,54	1,23
8	0,98	0,98
12	0,83	0,97
24	1,22	1,21

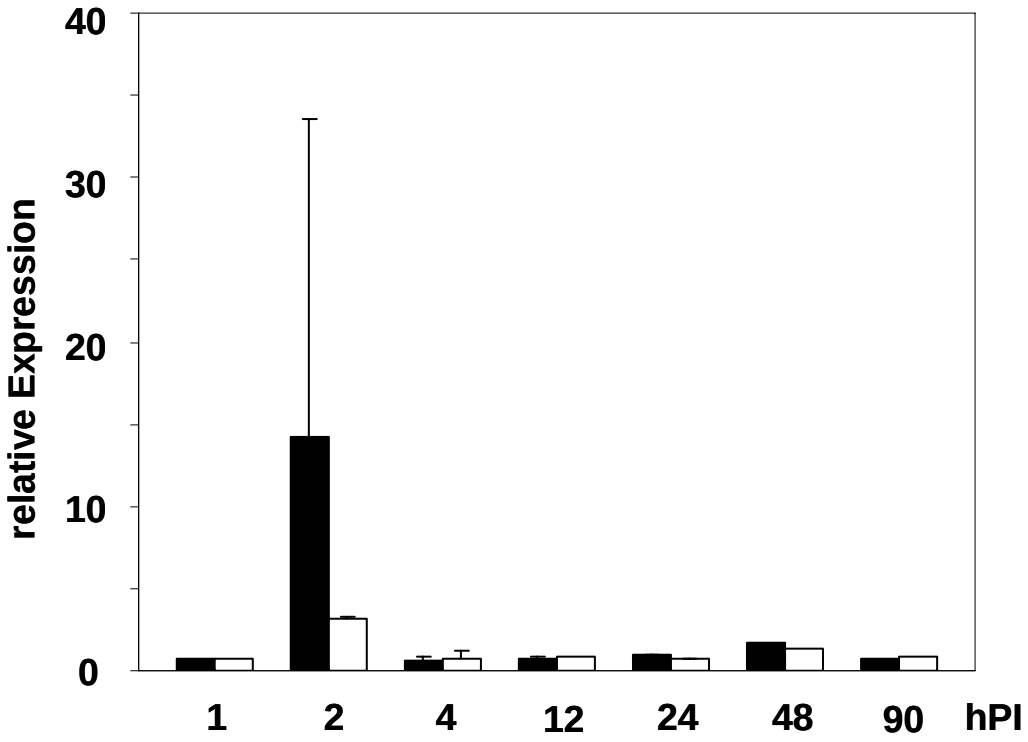

Abbildung 33: Expression der Galektin-1 mRNA relativ zu den scheininfizierten HCAEC der gleichen Zeit. ■ = Infektion mit EB; □ = Infektion mit EB^{UV}.

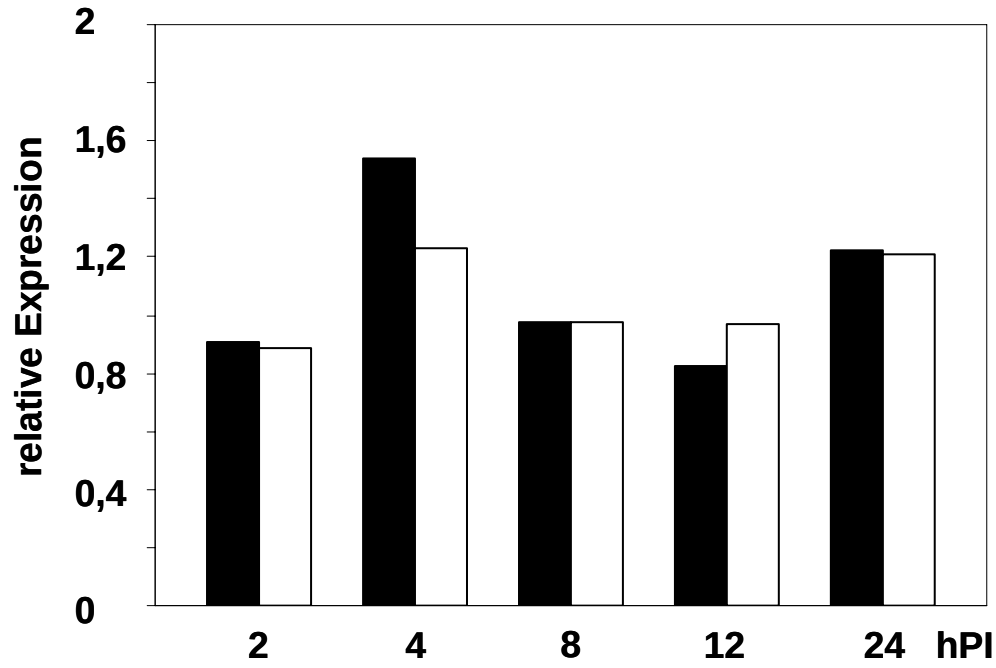

Abbildung 34: Expression der Galektin-1 mRNA relativ zu den scheininfizierten HEp-2 Zellen der gleichen Zeit. ■ = Infektion mit EB; □ = Infektion mit EB^{UV}.

Endotheliale Lipase (LIPG)

Die Ergebnisse der Analyse der LIPG-Expression in HCAEC sind in der Tabelle 20 angegeben und in Abbildung 35 grafisch veranschaulicht.

Bei den EB-infizierten Zellen sank die LIPG mRNA-Expression bei 2 hPI auf 45 % der Referenz-mRNA der scheininfizierten Zellen, stieg dann aber bereits bei 4 hPI wieder auf das Niveau der scheininfizierten Zellen an. Die Bildung der LIPG mRNA sank in den EB^{UV}-infizierten HCAEC kontinuierlich bis auf 60 % bei 90 hPI im Vergleich zur Scheininfektion; nur bei 2 hPI war eine kurzzeitige Abnahme auf 64 % zu verzeichnen (Tabelle 20, Abbildung 35).

Die Infektionen der HEp-2 Zellen resultierten in einer verstärkten Expression bei 4 hPI, welche aber bei darauffolgenden Zeitpunkten auf das Ausgangsniveau zurückging. Nur bei den mit EB^{UV} infizierten Zellen stieg die Expression bei 24 hPI auf das 18-Fache an.

Tabelle 20: Relative Expression von LIPG mRNA in HCAEC bezogen auf die Scheininfektion der entsprechenden Zeit.

HCAEC	x-fache Expression (Φ)		Std.Dev.	Std.Dev.
hPI	EB-infiziert	EB^{UV}-infiziert	EB-infiziert	EB^{UV}-infiziert
1	1,11	1,25	0,20	0,36
2	0,45	0,64	0,22	0,12
4	1,06	1,00	0,19	0,43
12	1,05	1,14	0,14	0,06
24	0,86	0,73	0,03	0,06
48	0,93	0,70	0,09	0,07
90	0,66	0,60	0,09	0,11

Tabelle 21: Relative Expression von LIPG mRNA in HEp-2 Zellen bezogen auf die Scheininfektion der entsprechenden Zeit.

HEP-2	x-fache Expression (Φ)		Std.Dev.	Std.Dev.
hPI	EB-infiziert	EB^{UV}-infiziert	EB-infiziert	EB^{UV}-infiziert
2	0,83	0,99	0,36	0,55
4	3,88	5,52	3,39	5,37
8	2,35	1,60	0,52	0,23
12	2,14	1,17	2,07	0,31
24	0,99	18,01	0,68	16,66

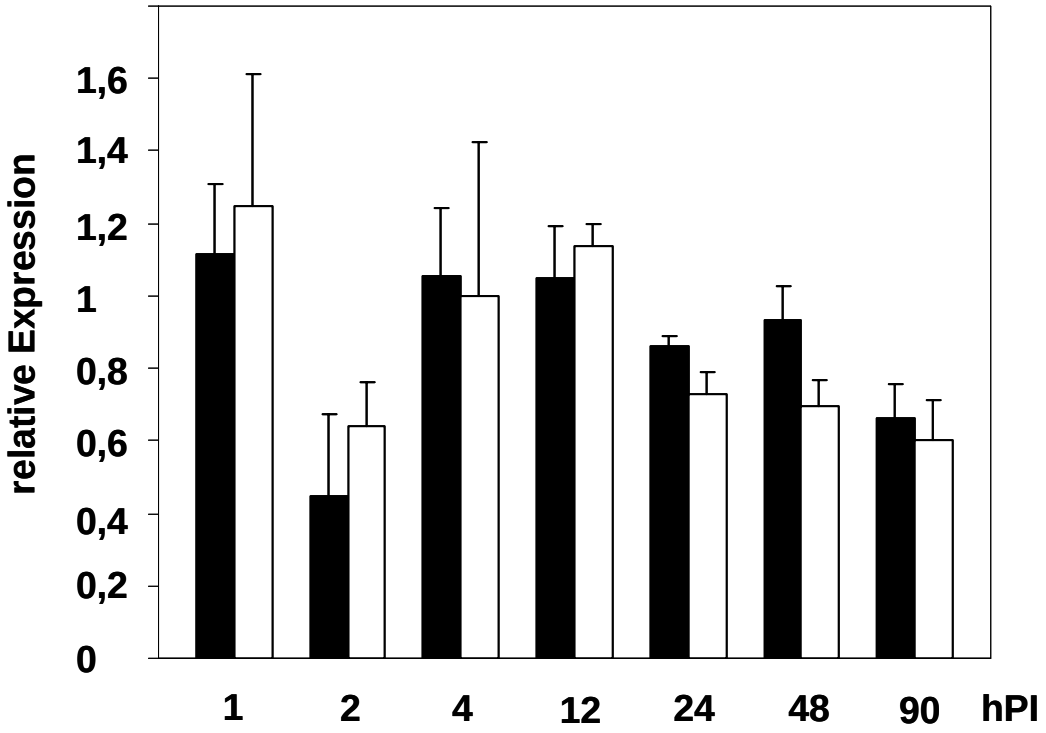

Abbildung 35: Expression der LIPG mRNA relativ zu den scheininfizierten HCAEC der gleichen Zeit. ■ = Infektion mit EB; □ = Infektion mit EB^{UV}.

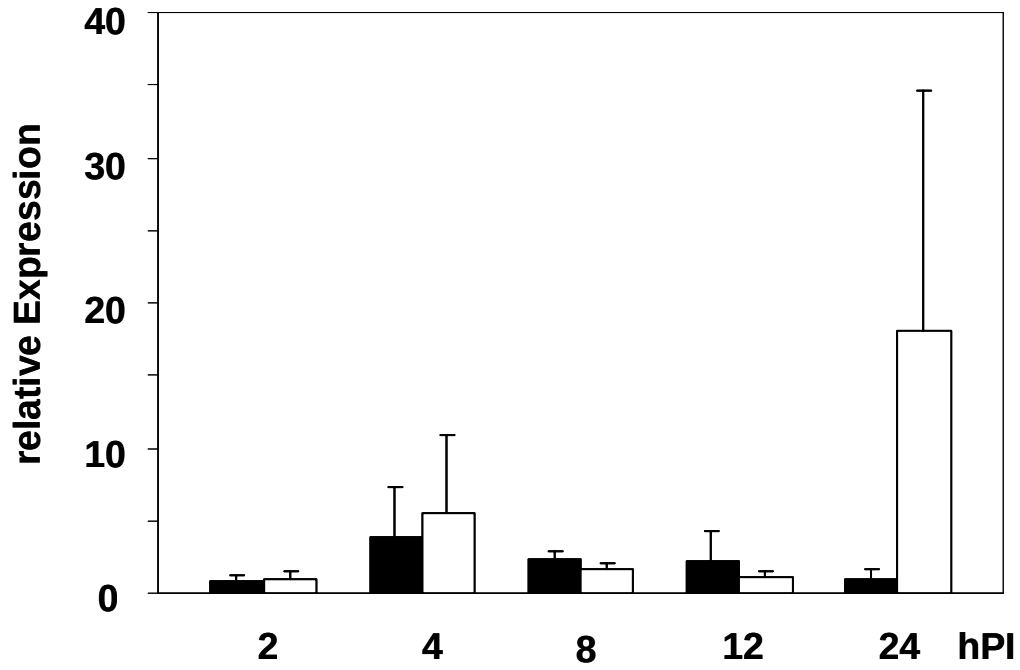

Abbildung 36: Expression der LIPG mRNA relativ zu den scheininfizierten HEP-2 Zellen der gleichen Zeit. ■ = Infektion mit EB; □ = Infektion mit EB^{UV}.

Lysosomale saure Lipase (LAL)

Die Analyse der LAL mRNA Expression zeigte in den HCAEC bei 2 hPI eine durchschnittliche Zunahme um das 3-Fache (EB) bzw. 2,3-Fache (EB^{UV}). Zu den anderen Zeitpunkten ergab sich nur eine geringe Expressionsänderung.

In den HEp-2 Zellen wurde die Expression von LAL mRNA durch die Infektion mit *C. p.* kaum beeinflusst.

Tabelle 22: Relative Expression von LAL mRNA in HCAEC bezogen auf die Scheininfektion der entsprechenden Zeit..

HCAEC	x-fache Expression (Φ)		Std.Dev.	Std.Dev.
hPI	EB-infiziert	EBUV-infiziert	EB-infiziert	EBUV-infiziert
2	3,24	2,30	4,09	0,18
4	0,84	1,54	0,55	0,58
12	1,52	0,95	0,67	0,13
24	1,37	1,67		

Tabelle 23: Relative Expression von LAL mRNA in HEP-2-Zellen bezogen auf die Scheininfektion der entsprechenden Zeit.

HEP-2	x-fache Expression (Φ)		Std.Dev.	Std.Dev.
hPI	EB-infiziert	EBUV-infiziert	EB-infiziert	EBUV-infiziert
2	0,74	1,22	0,11	0,47
4	1,15	1,29	0,45	1,20
8	1,07	1,32	0,12	0,83

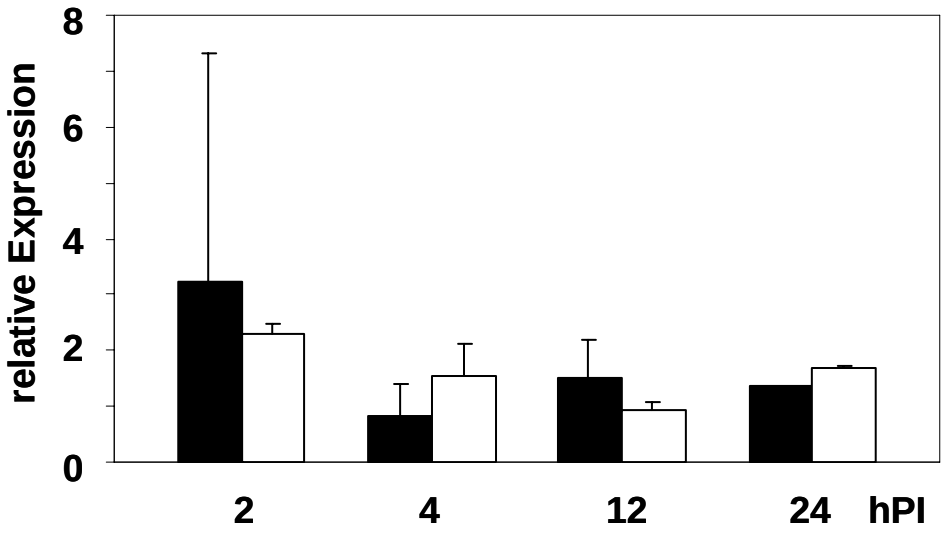

Abbildung 37: Expression der LAL mRNA relativ zu den scheininfizierten HCAEC der gleichen Zeit. ■ = Infektion mit EB; □ = Infektion mit EB^{UV}.

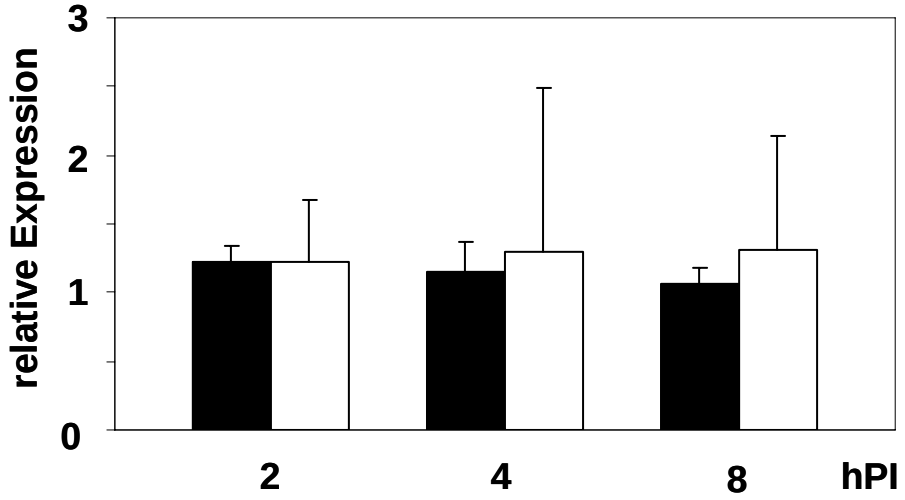

Abbildung 38: Expression der LAL mRNA relativ zu den scheininfizierten HEP-2 Zellen der gleichen Zeit. ■ = Infektion mit EB; □ = Infektion mit EB^{UV}.

Cystathionin-β-Synthase (CBS)

Die Infektion von HCAEC durch *C. p.* ist durch einen Anstieg der Menge gebildeter mRNA für CBS charakterisiert, der zum Zeitpunkt 4 hPI ein Maximum erreicht. Diese Expressionssteigerung ist sowohl bei einer Infektion durch vermehrungsfähige EBs, als auch durch EB^{UV} zu verzeichnen. Nach 4 Stunden fällt die Expression wieder auf das Ausgangsniveau ab.

Tabelle 24: Relative Expression von CBS mRNA in HCAEC bezogen auf die Scheininfektion der entsprechenden Zeit.

CBS	x-fache Expression (Φ)		Std.Dev.	Std.Dev.
hPI	EB-infiziert	EBUV-infiziert	EB-infiziert	EBUV-infiziert
1	1,00	1,17	0,17	0,33
2	1,41	1,18	1,50	0,71
4	2,38	1,50	2,53	1,13
12	1,08	0,80	0,00	0,00
24	0,72	0,29	0,06	0,01
48	0,53	0,60	0,00	0,00
90	0,68	0,60	0,00	0,00

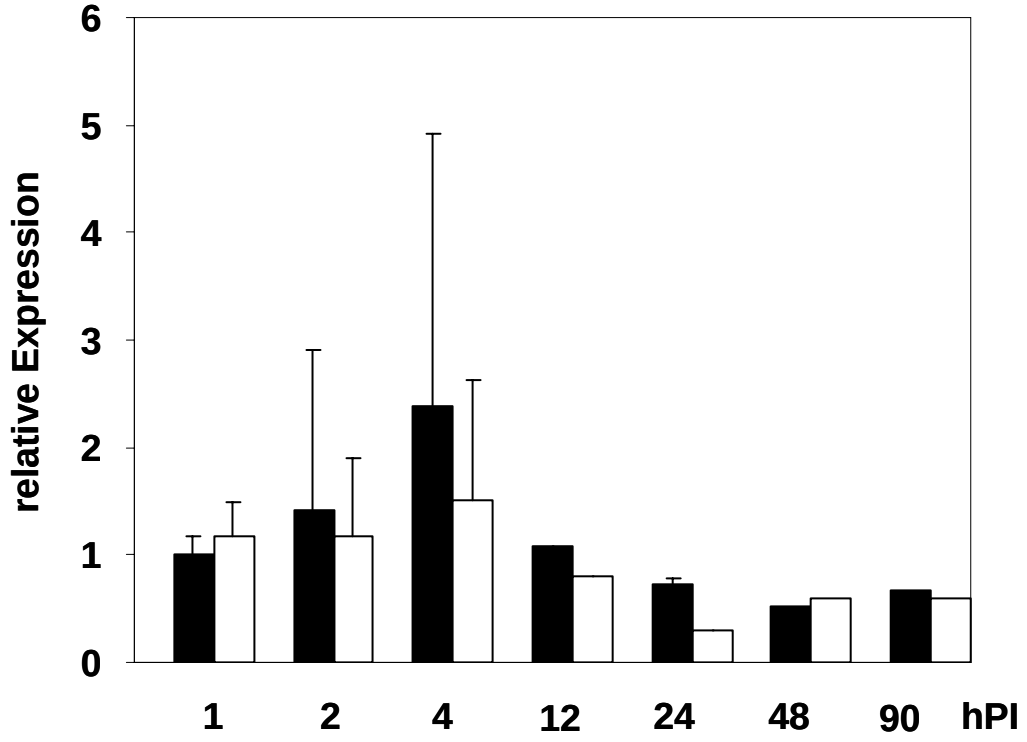

Abbildung 39: Expression der CBS mRNA relativ zu den scheininfizierten HCAEC der gleichen Zeit. ■ = Infektion mit EB; □ = Infektion mit EB^{UV}.

Profilin1 (PFN1)

Die Expression der mRNA blieb in den HCAEC über den gesamten analysierten Zeitraum zwischen 1 hPI bis 90 hPI von einer Infektion mit *C. p.* relativ unbeeinflusst. Dies gilt gleichermaßen für die Infektionen mit EBs und EB^{UV}. Die Expressionsanalysen für Profilin 1 (PFN1) wurden deshalb für jeden Zeitpunkt nur einmal durchgeführt.

Tabelle 25: Relative Expression von PFN mRNA in HCAEC bezogen auf die Scheininfektion der entsprechenden Zeit.

HCAEC	x-fache Expression (Φ)	
hPI	EB-infiziert	EBUV-infiziert
1	0,99	0,75
2	0,8	1,06
4	0,76	1,09
12	1,18	1,25
24	0,98	0,95
48	1,1	1,38
90	0,84	0,9

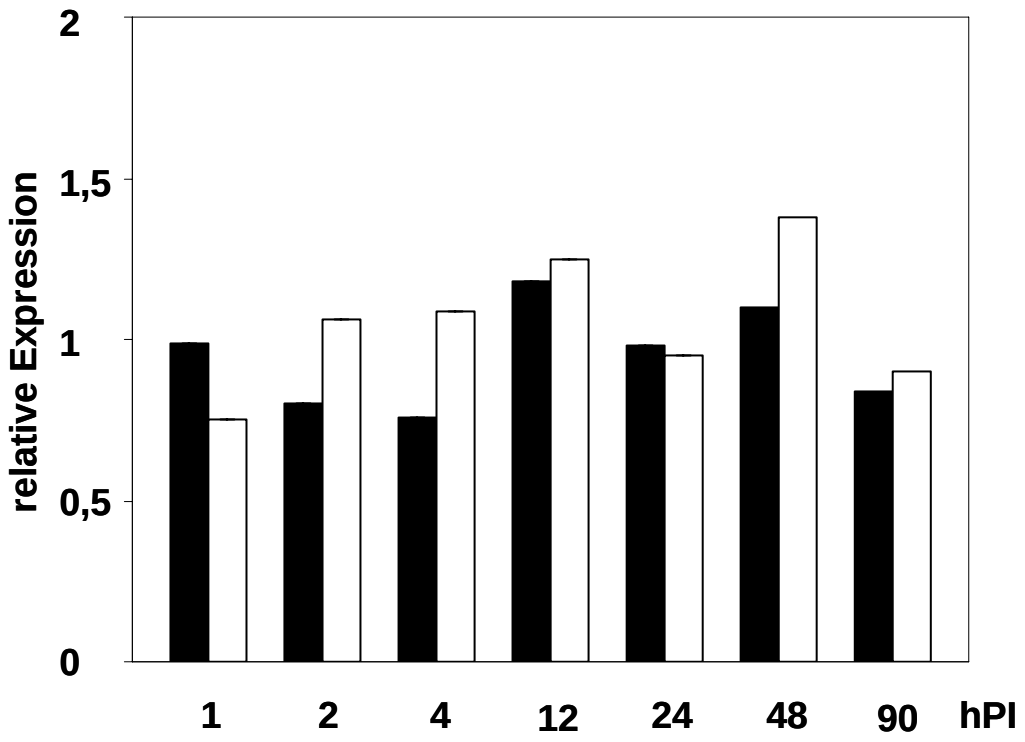

Abbildung 40: Expression der PFN mRNA relativ zu den scheininfizierten HCAEC der gleichen Zeit. ■ = Infektion mit EB; □ = Infektion mit EB^{UV}.

6. Interpretation

6.1. Differential Display

Zur Abklärung der Fragestellung, ob innerhalb von 2 hPI schon transkriptionelle Reaktionen der Wirtszelle hervorgerufen werden können, wurden Untersuchungen der mRNA mit Hilfe eines Differential Display durchgeführt. Durch die Verwendung von IRD41- und IRD800-markierten Primern konnten die PCR-Produkte ohne Verwendung von radioaktiven Substanzen sequenziert werden. Wie in Abbildung 25 gezeigt wird, erfolgte zu diesem Zeitpunkt bereits eine Reaktion der mit *C. p.* AR-39 infizierten HCAEC auf transkriptioneller Ebene.

Dies war eine wichtige Feststellung, da bisher unbekannt war, ab welchem Zeitpunkt eine Reaktion der infizierten Zellen erfolgt. Der Zeitpunkt 2 hPI diente daher als Ausgangswert für die Auswahl der weiteren Zeitpunkte (4, 8, 12,...hPI) im Rahmen von zeitkinetischen Untersuchungen.

6.2. Gen-Array

Als Gen-Array bezeichnet man eine Versuchsanordnung, durch welche eine größere Anzahl von verschiedenen Genen gleichzeitig durch Hybridisierung der cDNA analysiert werden kann. Verschiedene Firmen bieten unterschiedliche Zusammenstellungen von Genen auf den Arraymembranen an. Für diese Arbeit wurde ein Gen-Array gewählt, welcher 609 Gene abdeckt, die beim Menschen in einem Zusammenhang mit kardiovaskulären Ereignissen stehen.

Der Gen-Array diente zur Identifizierung von Genen, welche durch eine *C. p.* Infektion in HCAEC verändert exprimiert werden und sollte das Spektrum der zu untersuchenden Gene fokusieren.

So konnte das Protein MCP1 identifiziert werden, welches durch die Infektion durch *C. p.* stärker exprimiert wurde. Diese verstärkte Expression wurde schon von Coombes in HMEC-1 und HUVEC (Coombes, 2001) und Molestina in HUVEC (Molestina, 1999) gezeigt. Durch deren Ergebnisse war somit schon bekannt, dass *C. p.* eine entzündliche Reaktion einleiten kann, weshalb das Gen in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde.

Da eine stark verminderte Expression für Galectin-1 zu messen war, wurde das Gen durch QPCR weiter untersucht. Die durch den Gen-Array festgestellte verminderte Expression von Galectin-1 bei 24 hPI konnte durch die QPCR jedoch

nicht bestätigt werden. Die zum Zeitpunkt 24 hPI beobachtete verstärkte Expression der Gene für Profilin1 und Cystathionin-β-Synthase konnte in den zeitkinetischen Infektionsversuchen (QPCR) nicht bestätigt werden.

Die Anzahl der Gene, welche im Rahmen dieser Studie näher untersucht werden konnte, war jedoch begrenzt. Deshalb konnten die weiteren unterschiedlich exprimierten Gene (RARG, HDL-binding protein, JUP, CYP2B6, alcohol dehydrogenase 6, Brain natriuretic peptide B, neutrophil-activating protein 3) nicht näher untersucht werden. Diese weiteren Ergebnisse des Gen-Arrays (Tabelle 13) geben aber einen Aufschluss über jene Gene, welche in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden sollten.

6.3. Expressionsversuche (QPCR)

Die Zellen wurden parallel auf drei Arten infiziert (Scheininfektion, Infektion mit vermehrungsfähigen EBs und Infektion mit EB^{UV}). Die mRNA der infizierten Zellen wurde dann zu festgelegten Zeitpunkten nach der Infektion durch QPCR quantifiziert. Zur Berechnung der relativen Expression der jeweiligen mRNA wurde als Referenz die Expression in den scheininfizierten Proben der gleichen Zeit gewählt, um störende Einflüsse durch die unterschiedliche Zellzahl und somit mRNA-Menge und um Schwankungen bei der cDNA-Synthese auszuschalten.

Jene Gene, welche im Laufe dieser Arbeit untersucht wurden, werden nun im einzelnen angeführt und deren möglicher Einfluß auf das atherogene Geschehen beleuchtet.

10.3.1.Interleukin 8 (IL- 8)

Um sicher zu stellen, dass die Infektionen, welche in diese Arbeit beschrieben werden korrekt abliefen, bzw. in den Zellen eine Reaktion zu verursachen vermögen, wurden die Zielzellen bezüglich der Expression von IL-8 mRNA untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen (Abbildung 29 und Abbildung 30) zeigten eine zu der in der Literatur angegebene adäquate Steigerung der IL-8-mRNA-Expression in HCAEC und HEP-2 Zellen. Somit kann postuliert werden, dass die Infektionen korrekt durchgeführt wurden.

Bezüglich des Zusammenhanges mit Atherosklerose ist zu bemerken, dass IL-8 neben MCP-1 (macrophage chemotactic protein-1) die Hauptursache der

transendothelialen Migration von Neutrophilen und Monozyten sein dürfte (Molestina, 1999). Diese Migration von Blutzellen stellt, wie in der Einleitung erläutert wurde, ein Charakteristikum bei der Entstehung der Atherosklerose dar und diese Zellen wurden gehäuft in den atherosklerotischen Plaques gefunden wurden (Jonasson, 1986). Diese Interaktion könnte durch die in den Ergebnissen gezeigte Expressionsteigerung auch mit HCAEC durch Infektion mit vermehrungsfähigen *C. p.* eintreten. *C. p.* hat somit das Potential durch gesteigerte IL-8 Expression chemotaktisch Blutzellen anzulocken, welche an der Progression der Atherosklerose beteiligt sind. Zusätzlich wird durch die vorliegenden Versuchsergebnisse belegt, dass nicht die Oberflächenstrukturen der Chlamydien, sondern deren direkte Interaktion mit den Zellen die IL-8 mRNA-Expression induziert (Abbildung 29, EB bzw. EB^{UV}).

Eine um das 50-fache gesteigerte Bildung von IL-8-mRNA wurde bereits für Infektionen von HeLa-Zellen durch *Chlamydia trachomatis* beschrieben und ein Expressionsmaximum bei 72 hPI festgestellt (Rasmussen, 1997). Später konnte die um das 20-fache (24 hPI) gesteigerte Expression von IL-8 auch durch Infektionen mit *C. p.* nachgewiesen werden (Molestina, 1999; Gaydos 2000).

10.3.2. Human heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)

„Human heparin-binding epithelial growth factor-like growth factor“ (HB-EGF; HbEGF) gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren und kann an den EGF-Rezeptor binden und diesen aktivieren (Higashiyama, 1991). Das Protein wurde mit einer Anzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen in Zusammenhang gebracht. Diese umfassen Wundheilung (Marikovsky, 1993; Ellis, 2001), endotheliale Zellmigration und Proliferation (Abramovitch, 1998), Neovaskularisierung (Abramovitch, 1998), druckinduzierte Atherosklerose (Tanaka, 2002), Herzhypertrophie (Asakura, 2002) und die Herzfunktion (Iwamoto, 2003).

Die Signalwege um HB-EGF sind komplex. So wird HB-EGF als transmembrane Vorstufe synthetisiert, welche später in die fertige 86-Aminosäure-Form umgewandelt wird. Diese Spaltung der HB-EGF-Vorstufe, also die Aktivierung von HB-EGF wird durch den Cytochrom P450 Epoxygenasemetaboliten 14,15-EET bewirkt und ist ein essentieller Schritt im mitogenen MAPK-Signalweg (Chen, 2002). Fertiges HB-EGF ist ein 20-22 kDa Glykoprotein, das mit hoher Affinität an den EGF-Rezeptor (EGFR; ErbB1) bindet und dessen Phosphorylierung bewirkt (Higashiyama, 1991). Es vermag weiters die Tyrosinreste der Rezeptoren ErbB2 und ErbB4 in Herzzellen zu phosphorylieren (Iwamoto, 2003). HB-EGF ist ein starkes Mitogen für Fibroblasten, glatte Muskelzellen (Higashiyama, 1991) und Keratinozyten (Marikovsky, 1993), aber nicht für Endothelzellen (Higashiyama, 1991). Es kann jedoch endotheliale Zellmigration auslösen und vermittelt endotheliale Zellproliferation indem es in kokultivierten SMCs die VEGF-Expression induziert (Abramovitch, 1998). Es induziert so die Neovaskularisation *in vivo* in der Hasenkornea und kann daher als angiogener Faktor angesehen werden (Abramovitch, 1998).

Weiters sind folgende Fakten bekannt:

- Die durch HB-EGF herbeigeführte Dimerisierung und somit Aktivierung von EGFR (=ErbB1) hat über den MAP-Kinase-Mechanismus einen starken Einfluss auf die Expression von Genen (MAPK-Weg) (Schlessinger, 2000).
- Die Infektion von epithelialen Zellen (HEp-2) durch *C. p.* ist von einer schnellen und nachhaltigen Phosphorylierung von MEK und Aktivierung von ERK gekennzeichnet (Komponenten des MAPK-Weges)(Coombes, 2002).
- Einer verletzungsbedingten Expression von HB-EGF-mRNA geht eine MAPK-Aktivierung voran (Ellis, 2001).

- Es läßt sich die Expression von HB-EGF-mRNA durch PD098059 und U0126, welche MAPK spezifisch inhibieren, blockieren (Ellis, 2001).
- HB-EGF wurde als Raf-reguliertes Gen entdeckt (McCarthy, 1995).

Aufgrund dieser Daten wäre zu erwarten gewesen, dass die HB-EGF-mRNA durch eine *C. p.*-Infektion verstärkt exprimiert wird. Wie jedoch in den Experimenten gezeigt wurde, kam es zu keiner verstärkten Expression, sondern der gegenteilige Effekt trat ein. Wie in Abbildung 31 zu sehen ist nahm die HB-EGF-mRNA-Expression mit Ausnahme zum Zeitpunkt 2 hPI kontinuierlich bis auf 56 % bei 90 Stunden nach der Infektion von HCAE-Zellen ab. Bemerkenswert war dabei die kurzzeitige, starke Abnahme der Expression zum Zeitpunkt 2 hPI auf durchschnittlich 12 %. Dies wurde aber nur durch replikationsfähige *C. p.* hervorgerufen, wie das Kontrollexperiment mit EB^{UV} zeigte (Abbildung 31).

Da bei diesen Untersuchungen die Expression von HB-EGF-mRNA in HCAEC zwei Stunden nach der Infektion mit *C. p.* stark inhibiert wurde, kann geschlossen werden, dass die Reduktion der Expression von HB-EGF-mRNA nicht auf eine Blockierung der MAPK-Kaskade zurückzuführen ist, welche ja durch eine *C. p.*-Infektion aktiviert wird (Coombes, 2002). Eventuell ist die HB-EGF-Inhibierung auf erhöhtes cAMP in der Zelle zurückzuführen, da cAMP die Expression von HB-EGF unterdrücken kann (Ellis, 2000). Der Zusammenhang zwischen einer *C. p.*-Infektion und der cAMP-Konzentration ist aber in der Literatur nicht behandelt worden.

Weiters hat die durch HB-EGF aktivierte Phospholipidkinase (Pl3K) (Fang, 2001) einen starken Einfluss auf den Zelltod. Es wurde gezeigt, dass die Pl3K-abhängige Phosphorylierung der Serin/Threonin Kinase PKB zur Phosphorylierung und Inaktivierung des Proteins BAD führt, welches hierauf keinen Komplex mit den apoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-xl eingehen kann. Dieser Komplex würde die Apoptose der Zellen inhibieren (Datta, 1999). Dieser Komplex würde durch die verringerte Expression von HB-EGF nicht gebildet werden und möglicherweise zur Apoptose von Endothelzellen führen, was einen direkten Einfluss auf die Stabilität eines fortgeschrittenen atheromatösen Plaques haben könnte.

Dem entgegenzuhalten wäre, dass bei druckinduzierter Atherosklerose in Rattenherzen eine gesteigerte Expression von HB-EGF-mRNA zu finden war (Tanaka, 2002). Da diese gesteigerte Bildung von HB-EGF-mRNA aber auch allein durch Verletzungen herbeigeführt werden kann (Ellis, 2001), ist nicht unbedingt HB-EGF als auslösender Faktor der Atherosklerose anzusehen.

HB-EGF aktiviert das Protein Akt durch PI3K (Fang, 2001). Wenn die Aktivität von Akt blockiert wird kommt es zu einem erhöhten Absterben von Zellen bei einer Zellschädigung (Fang, 2001). Analog dazu kann angenommen werden, dass eine verminderte Expression von HB-EGF zu einer geringeren Aktivierung von Akt führen könnte und eine Zellschädigung, wie sie bei der Atherosklerose ja vorliegt, zu einer Desintegrität des Plaques führt.

In Koronararterien mit milder bis alters-typischer Atherosklerose war die Anzahl der HB-EGF-produzierenden glatten Muskelzellen (SMCs) gesteigert, in den Läsionen von fortgeschrittener oder Spätstadium-Atherosklerose war die Färbung von medialen SMCs mit markierten Antikörpern gegen HB-EGF jedoch markant herabgesetzt (Nakata, 1996). Somit scheint die Produktion von HB-EGF für die strukturelle Integrität der Koronararterien essentiell zu sein.

Die Bildung von HB-EGF-mRNA wird durch das Protein p53 verstärkt (Fang, 2001). Die Expression der Cyclooxygenase2 (Cox2) dürfte durch die p53-> HB-EGF-> Ras/Raf/MAPK-> Cox2- Kaskade induziert werden (Han, 2002). Da Cox2 einen hemmenden Einfluß auf die p53 induzierte Apoptose ausübt, ist dessen Expression für das Überleben der Zelle notwendig (Han, 2002). Wenn nun diese Kaskade unterbrochen wird, wie mit Hilfe des selektiven Cox2-Inhibitors NS-398 gezeigt wurde, so wird die genotoxische, stressinduzierte Apoptose signifikant verstärkt (Han, 2002). Die abgeschwächte Expression von HB-EGF, welche in den Versuchen bei 2 hPI in HCAEC zu messen war, könnte nun über die unterbrochene Ras/Raf/MAPK- Kaskade den gleichen apoptotischen Effekt ausüben; dies muss aber noch in weiteren Experimenten bestätigt werden.

10.3.3.Galectin1 (Gal-1)

Galectin-1, das zur Gruppe der 14-kDa Lektine gehört, wurde erstmals 1989 von Couraud beschrieben und ist ein 134 Aminosäuren langes Protein (Couraud, 1989). Es kann an spezifische Glycoproteinrezeptoren von T-Zellen binden und deren Apoptose induzieren. Galektin-1 kann somit bei der Entstehung einer akuten Entzündung eine aktive Rolle übernehmen (Rabinovich, 2000). Es wurde weiters gezeigt, dass es Schlüsselrollen in der Zellwachstumsregulation (Moiseeva, 2000) und Zelladhäsion (Moiseeva, 1999) einnimmt.

Aufgrund dieser Funktionen von Galectin-1 wurde die mRNA-Expression des Gal-1-Gens in Abhängigkeit einer Infektion der Zellen durch *C. p.* untersucht. Ein Zusammenhang zwischen Atherosklerose und *C. p.* könnte darin bestehen, dass durch eine Infektion mit *C. p.* verstärkt Gal-1 gebildet wird, was zu vermehrter Bindung von T-Zellen führen kann (Gown, 1986; Jonasson, 1986), welche das entzündliche Geschehen der Atherosklerose charakterisieren.

Wie im Ergebnisteil zu sehen ist, bewirkt eine Infektion von HCAEC durch EBs zum Zeitpunkt 2 hPI eine um das durchschnittlich 14-fache gesteigerte Expression der Gal-1 mRNA (Abbildung 33). Es besteht daher die Möglichkeit, dass diese kurze Expressionssteigerung der Gal-1 mRNA einen proatherogenen Effekt auslösen kann. Dieser Effekt dürfte wie bei IL-8 auf einer direkten Interaktion der Bakterien mit den Wirtszellen beruhen, weil die EB^{UV} nur eine geringe Expressionsänderung bewirkten.

10.3.4.Endotheliale Lipase (LIPG)

Die Atherosklerose ist nicht nur eine immunologisch mediierte Erkrankung der Arterien, sie wird auch durch veränderte Metabolismen des Lipidhaushaltes beeinflusst. Endotheliale Lipoproteininteraktionen stellen sogar eine Schlüsselrolle in der frühen Entwicklung der atherosklerotischen Veränderungen dar und dürften in alle Stadien der Erkrankung involviert sein (Rader, 2000). Die verschiedenen Lipoproteine wie Chylomikronen, VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) und HDL (high density lipoprotein) werden nach deren Dichte differenziert und haben zum Teil entgegengesetzte Einflüsse auf das arterielle Zellgeschehen. So zählt HDL zu den sogenannten „guten Lipoproteinen“, da es in mehreren Studien (ECAT (Bolibar, 2000), Helsinky Heart Study (Manninen, 1992), VA-HIT (Rubins, 1999), „cooperative lipoprotein phenotyping study” (Castelli, 1977))

mit reduzierter Häufigkeit einer Atherosklerose und koronarer Herzerkrankung assoziiert wurde (Gordon, 1977; Von Eckardstein, 2001). Dem gegenüber stehen die proatherogenen Lipoproteine beziehungsweise deren Abbauprodukte, wie Chylomikronen, VLDL und LDL (Rader, 2000). So zählt ein erhöhter LDL-Spiegel zu den etablierten Risikofaktoren der Atherosklerose (Gordon, 1977), wobei modifiziertes LDL einen stärkeren proatherogenen Effekt hat (Steinberg, 1997).

Als Indikator der Progression der Atherosklerose fließt die in der Einleitung erwähnte Gegenwart von lipidreichen Makrophagen in Form von Schaumzellen ein (Stary, 2000). Das Vorhandensein dieser Makrophagen wurde in mehreren Studien bestätigt (Gerrity, 1981; Gown, 1986; Nakata, 1996; Felton, 1997; Sako, 2002). Da aber die Hypothese des Ursprunges der extrazellulären Lipidablagerungen innerhalb eines atherosklerotischen Plaques von abgestorbenen Makrophagen nicht standhielt (Guyton, 1996), stellte sich die Frage nach dem Ursprung der Lipide. Zumal die Lipidablagerungen reich an freiem Cholesterol sind, das Cholesterol in den Schaumzellen aber verestertes Cholesterol enthält (Guyton, 1996). Die Fettsäuren, welche in der Kernregion der atherosklerotischen Plaques gefunden werden, setzen sich hauptsächlich aus Linoleat zusammen, ähnlich den Plasmalipoproteinen und unähnlich der Oleatstruktur der Cholesterylesterfettsäuren, wie sie in Schaumzellen gefunden wurden (Guyton, 1996). Daher stammen die Lipide in der atherosklerotischen Kernregion möglicherweise aus dem Plasma.

Da die endotheliale Lipase in CHO-K1 Zellen VLDL und LDL verstärkt binden kann (Fuki, 2003), und eine hohe LDL Konzentration die endozytotische Aktivität von Endothelzellen steigert (Holland, 1992), könnten Lipoproteine vermehrt durch hyperpermeable Regionen (Verweis in (Holland, 1992)) oder Transzytose (Vasile, 1983) in die Kernregion des atherosklerotischen Plaques eindringen. Eine verstärkte Expression von *LIP*G könnte über eine erhöhte Endotheliale Lipase-Aktivität die Lipoprotein-Partikel verändern und über eine Modifizierung der Aufnahme/Abgabe von Lipoproteinen durch die Zelle selbst die Entstehung von Atherosklerose begünstigen.

In dieser Studie wurde deshalb auch die Zellantwort bezüglich eines veränderten Lipidmetabolismus in Abhängigkeit einer *C. p.*-Infektion untersucht. Zu diesem Zweck wurde die mRNA-Expression des vor kurzem beschriebene Genes der „Endothelialen Lipase“ (LIPG) analysiert, welche neben der Lipoproteinlipase (LPL) und „Hepatischen Lipase“ (HL) aktiv den Lipoproteinhaushalt der Zellen steuern kann

(Jaye, 1999; Rader, 2000). Wie an Hand eines Mausmodells gezeigt werden konnte, moduliert (reduziert) die endotheliale Lipase (EL=EDL) die Serumkonzentration von HDL, wenn es überexprimiert wird (Jaye, 1999). Im Gegensatz zu LPL und HL wird EL jedoch von endothelialen Zellen selbst gebildet, was dazu führen könnte, dass EL direkt an der Stelle des atherosklerotischen Plaques wirken kann (Rader, 2000; Azumi, 2003). EL hat neben einer Triglyceridlipaseaktivität (Glick Jane, 2000) eine stärkere Phospholipaseaktivität als LPL (Jaye, 1999), welche zu einer verstärkten Aufnahme von teilweise abgebauten Lipoproteinen in die endothelialen Zellen führen kann und somit zum Fortschritt der Atherosklerose führen könnte.

Mit den HCAEC konnte jedoch keine durch *C. p.*-Infektion bedingte verstärkte LIPG-Expression nachgewiesen werden. Im Gegenteil - die Expression der LIPG mRNA nahm in infizierten HCAEC bei 2 hPI um die Hälfte ab, stieg dann aber zu den späteren Analysezeitpunkten auf das ursprüngliche Maß der scheininfizierten Zellen an (Abbildung 35). Bei den mit EB^{UV} infizierten Zellen ist eine allmähliche Abnahme der LIPG mRNA auf bis zu 60 % bei 90 hPI zu sehen. Die Assoziation mit einer Verstärkung der Atherosklerose durch gesteigerte LIPG-Expression konnte somit in diesen Experimenten mit HCAEC nicht erbracht werden.

Eine interessante Reaktion war jene der immortalisierten HEp-2 Zellen auf eine *C. p.* Infektion. So war die Expression der LIPG mRNA 4 hPI in den EB-infizierten Zellen um 3,9-Fache gesteigert. Die Expression der Zellen der EB^{UV} Infektion war zu einem späteren Zeitpunkt sogar um das 18-Fache gesteigert. Eine Erklärung dafür kann zur Zeit nicht gegeben werden.

10.3.5. Lysosomale saure Lipase (LAL)

Die durch Endozytose aufgenommenen Low-density-Lipoproteine (LDL) und Very-low-density-Lipoproteine (VLDL) werden in den Zellen in Lysosomen metabolisiert. Zu den Bestandteilen von LDL und VLDL gehören Cholesterolester und Triglyzeride welche ausschließlich durch Lysosomale Saure Lipase (LAL) hydrolysiert werden. Das lysosomal freigesetzte Cholesterol wird in den zytoplasmatischen Cholesterolvorrat transferiert. Diesem Enzym kommt dementsprechend eine zentrale Rolle beim intrazellulären Metabolismus von Cholesterol zu.

Durch eine reduzierte Aktivität von LAL könnten der Cholesterolester- und Triglycerid-Katabolismus abgeschwächt werden, die neu in die Zelle

aufgenommenen LDL und VLDL-Partikel nicht abgebaut werden und in Folge die Plasmakonzentration der Lipoproteine (LDL, VLDL) erhöht werden, welche einen proatherogenen Effekt ausüben (Rader, 2000). Die stark reduzierte Aktivität führt zu einer progressiven Akkumulation von Cholesterolestern und Triglyceriden in den Lysosomen, was sich klinisch in der Cholesterol-Speicherkrankheit (CESD) und Wolman'schen Erkrankung zeigt (Assmann, 1995). Im umgekehrten Fall könnte durch eine gesteigerte Aktivität mehr intrazellulär verfügbares Cholesterol gebildet werden, welches in größeren Mengen ebenfalls proatherogen wirken kann (Ablagerung von Cholesterol). Ob LAL nun durch eine Infektion gesteigert oder abgeschwächt gebildet wird, stellt dies einen Eingriff in die Homöostase des Lipoproteinmetabolismus dar, welcher sich proatherogen auswirken könnte.

In den Experimenten konnte in den HCAEC eine um das 3-fache (EB) bzw. 2-fache (EB^{UV}) gesteigerte Bildung von LAL mRNA festgestellt werden (Abbildung 37). Dies könnte somit einen entsprechenden Einfluss auf den Lipoproteinmetabolismus und daher proatherogenen Effekt auf die Zellen ausüben, jedoch ist diese Steigerung nur auf den Zeitpunkt 2 hPI beschränkt. Um eine atherosklerotische Cholesterolablagerung zu bewirken, müßte die Expressionssteigerung wahrscheinlich über einen längeren Zeitraum anhalten. Es ist daher nicht anzunehmen, dass die geänderte LAL mRNA Expression einen direkten Einfluss auf das atherosklerotische Geschehen hat.

10.3.6. Cystathionin β- Synthase (CBS)

Das Enzym Cystathionin β – Synthase (CBS; L-Serin Hydrolase; EC 4.2.22) katalysiert die irreversible Kondensation von Serin und Homocystein zu Cystathionin, dem Zwischenprodukt bei der Bildung von Cystein (Kraus 1987; Kery, 1998; Ge, 2001; Janosik, 2001). Es hat somit eine zentrale Rolle beim Homocysteinstoffwechsel (Abbildung 41). Erhöhte Homocystein-Serumkonzentrationen wurden mit der Entstehung von Atherosklerose in Verbindung gebracht (Welch, 1998; Bostom, 1999; Eikelboom, 1999). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die CBS-Aktivität bei atherosklerotischen Patienten signifikant niedriger war als in der Kontrollgruppe (Nordstrom, 1992).

Daher war es von Interesse, ob eine Infektion durch *C. p.* eine Änderung der Expression von CBS-mRNA bewirken kann, welche einen proatherosklerotischen

Effekt haben könnte. Von den 10 unterschiedliche mRNA-Vorstufen, welche vom CBS-Gen kodiert werden, wurde die Expression der „major CBS“ - Variante untersucht.

In den Experimenten konnte durch eine *C. p.*- Infektion keine entsprechende Blockierung der CBS-Expression in HCAEC feststellt werden, welche zu einer Anhäufung von Homocystein und somit zur Atherosklerose führen könnte (Abbildung 39). Die Infektion von HCAEC mit *C p.* dürfte daher über die CBS mRNA Expression keinen direkten Einfluss auf das atherosklerotische Geschehen haben.

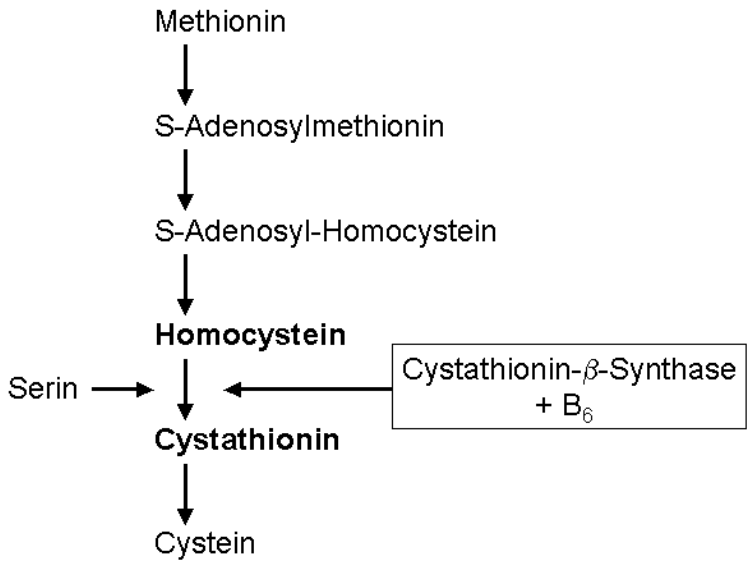

Abbildung 41: Stoffwechsel von Homocystein.

10.3.7.Profilin I (PFN1)

Aktin wurde bisher in fast allen untersuchten eukaryontischen Zellen nachgewiesen. Die Grundlage der zellulären Funktion von Aktin liegt in der Polymerisation des monomeren Aktins (G-Aktin) zu Filamenten (F-Aktin). Die Aktivität des Aktins wird durch andere Proteine gesteuert, welche an Aktin binden können (bisher sind über 60 Aktin-bindende Proteine bekannt). So zählt Profilin I (12 – 15 kDa) zu den G-Aktin-bindenden Proteinen, welches einen 1:1 Komplex mit Aktin bilden kann (Carlsson, 1977). Im Vergleich zu Profilin II, welches vor allem im Gehirn, Skelettmuskeln und in der Milz exprimiert gefunden wurde, wird Profilin I in allen Geweben gebildet (Honore, 1993) und hat eine fünfmal höhere Affinität zu Aktin (Gieselmann, 1995).

Verschiedene Experimente lassen den Schluss zu, daß Profilin in der Zelle unter bestimmten Umständen das Gleichgewicht vom filamentösem F-Aktin zum monomeren G-Aktin verschiebt. So zeigten Experimente an Rattenfibroblasten , dass die Mikroinjektion von Profilin eine Abnahme an F-Aktin und F-Aktinstrukturen wie Streßfasern bewirkte (Cao, 1992). Auch führte die Überexpression von Profilin in *Schizosaccharomyces pombe* dazu, daß keine F-Aktinstrukturen mehr nachweisbar waren (Balasubramanian, 1994).

Aufgrund dieser Untersuchungen war die Möglichkeit in Erwägung zu ziehen, daß Profilin I durch die Infektion mit *C. p.* verstärkt gebildet wird, was zur Degradierung der F-Aktinfilamente führen könnte. Das Fehlen der F-Aktinfilamente könnte einen negativen Einfluss auf den Metabolismus der Zellen ausüben, was einen proatherogenen Effekt auf das Gewebe ausüben könnte. Weiters würde die verminderte Menge an F-Aktin auch erklären, weshalb die Endosomen, in welchen sich die *C. p.* EBs nach der Infektion befinden, nicht mit den Lysosomen der Zellen fusionieren können.

In den Experimenten konnte jedoch keine infektionsbedingte Zunahme der Profilin I - mRNA Expression in HCAEC festgestellt werden (Abbildung 40). Somit dürfte eine veränderte Expression von Profilin I bei der Infektion der HCAEC keine Rolle spielen. Ob Profilin I bei der Infektion der Zellen beteiligt ist, konnte nicht bestätigt werden, ist aber durchaus möglich, da die intrazelluläre Mobilität anderer intrazellulärer Bakterien auch von der Aktinpolymerisation abhängt (Kocks, 1994).

7. Schlussfolgerungen

Durch die vorliegenden Ergebnisse wurde erstmals belegt, dass Endothelzellen arteriellen Ursprungs (HCAEC) durch Elementarkörperchen von *Chlamydia pneumoniae* infiziert werden können. Eine Reaktion der Zellen auf eine Infektion ist schon nach 2 Stunden durch eine veränderte mRNA-Expression nachweisbar. Durch die gesteigerte Expression der mRNA für Interleukin 8 und Galectin 1 beziehungsweise abgeschwächte Expression der mRNA für HB-EGF ist ein Zusammenhang mit der Entstehung/Progression der Atherosklerose möglich.

Diese Expressionsänderungen werden nicht spezifisch durch *C. p.* hervorgerufen, *C. p.* erfüllt jedoch im Gegensatz zu anderen Bakterien die Voraussetzungen an der Atherosklerose beteiligt zu sein:

- Die Verbreitung in der Bevölkerung ist, wie seroepidemiologische Untersuchungen belegt haben groß.
- *C. p.* verursacht im Gegensatz zu den meisten anderen Bakterien keine Sepsis, wodurch die Infektion unbemerkt erfolgen und über einen langen Zeitraum persistieren kann.
- Makrophagen können *C. p.* zu den Endothelzellen transportieren und könnten weiters die Bakterien durch transendotheliale Migration in den Bereich eines atherosklerotischen Plaques bringen.

Die zum Teil konträren Ergebnisse für die Expression in HEp-2 Zellen zeigen, dass diese Zellen für Expressionsstudien im Zusammenhang mit Infektionen durch *C. p.* nicht geeignet sind. Diese Zelllinie wurde ursprünglich als pharyngeale Epithelzelllinie von ATCC verkauft. In der Zwischenzeit konnte man jedoch feststellen, dass diese Zellen von HeLa-Zellen (Epithelzellen des Urogenitaltraktes) abstammen, welche *in vivo* bei einer *C. p.*-Infektion keine Rolle spielen dürften. Dies sollte in weiteren Studien berücksichtigt werden.

8. Literaturverzeichnis

Current protocols in Molecular Biology. Massachusets, Wiley; (1995).

Abramovitch, R., M. Neeman, et al. (1998). “Intercellular communication between vascular smooth muscle and endothelial cells mediated by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and vascular endothelial growth factor.” FEBS Lett 425(3): 441-7.

Airenne, S., H. M. Surcel, et al. (1999). “Chlamydia pneumoniae infection in human monocytes.” Infect Immun 67(3): 1445-1449.

Aldous, M. B., J. T. Grayston, et al. (1992). “Seroepidemiology of Chlamydia pneumoniae TWAR infection in Seattle families, 1966-1979.” J Infect Dis 166(3): 646-9.

Almirall, J., I. Morato, et al. (1993). “Incidence of community-acquired pneumonia and Chlamydia pneumoniae infection: a prospective multicentre study.” Eur Respir J 6(1): 14-8.

Apfalter, P., M. Loidl, et al. (2000). “Isolation and continuous growth of Chlamydia pneumoniae from arterectomy specimens.” Eur J Clin Microbiol Infect Dis 19(4): 305-8.

Asakura, M., M. Kitakaze, et al. (2002). “Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy.” Nat Med 8(1): 35-40.

Assmann, G. and U. Seedorfer (1995). “Acid lipase deficiency: Wolman Disease and Cholesteryl Ester Storage Disease, in: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (Sciver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle, D. eds).”: 2563-2587.

Azumi, H., K. Hirata, et al. (2003). “Immunohistochemical localization of endothelial cell-derived lipase in atherosclerotic human coronary arteries.” Cardiovasc Res 58(3): 647-54.

Balasubramanian, M. K., B. R. Hirani, et al. (1994). “The Schizosaccharomyces pombe cdc3+ gene encodes a profilin essential for cytokinesis.” J Cell Biol 125(6): 1289-301.

Blasi, F., D. Legnani, et al. (1993). “Chlamydia pneumoniae infection in acute exacerbations of COPD.” Eur Respir J 6(1): 19-22.

Blasi, F., P. Tarsia, et al. (1998). “Epidemiology of Chlamydia pneumoniae.” Clinical microbiology and infection 4(Sup4): 4s1-4s6.

Bolibar, I., A. von Eckardstein, et al. (2000). “Short-term prognostic value of lipid measurements in patients with angina pectoris. The ECAT Angina Pectoris Study Group: European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities.” Thromb Haemost 84(6): 955-60.

Bostom, A. G., H. Silbershatz, et al. (1999). “Nonfasting plasma total homocysteine levels and all-cause and cardiovascular disease mortality in elderly Framingham men and women.” Arch Intern Med 159(10): 1077-80.

Braunwald, E. (1997). “Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities.” N Engl J Med 337(19): 1360-9.

Byrne, G. I., S. P. Ouellette, et al. (2001). “Chlamydia pneumoniae expresses genes required for DNA replication but not cytokinesis during persistent infection of HEp-2 cells.” Infect Immun 69(9): 5423-9.

Cao, L. G., G. G. Babcock, et al. (1992). “Effects of profilin and profilactin on actin structure and function in living cells.” J Cell Biol 117(5): 1023-9.

Carlsson, L., L. E. Nystrom, et al. (1977). “Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells.” J Mol Biol 115(3): 465-83.

Castelli, W. P., J. T. Doyle, et al. (1977). “HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study.” Circulation 55(5): 767-72.

Castilla, E. A. and R. M. Wadowsky (2000). “Effect of a Mycoplasma hominis-like mycoplasma on the infection of HEp-2 cells by the TW-183 strain of Chlamydia pneumoniae.” Journal of clinical microbiology 38(2): 861-862.

Chen, J. K., J. Capdevila, et al. (2002). “Heparin-binding EGF-like growth factor mediates the biological effects of P450 arachidonate epoxygenase metabolites in epithelial cells.” Proc Natl Acad Sci U S A 99(9): 6029-34.

Coles, K. A., P. Timms, et al. (2001). “Koala biovar of Chlamydia pneumoniae infects human and koala monocytes and induces increased uptake of lipids in vitro.” Infect Immun 69(12): 7894-7.

Coombes, B. K. and J. B. Mahony (1999). “Chlamydia pneumoniae infection of human endothelial cells induces proliferation of smooth muscle cells via an endothelial cell-derived soluble factor(s).” Infect Immun 67(6): 2909-2915.

Coombes, B. K. and J. B. Mahony (2001). “cDNA array analysis of altered gene expression in human endothelial cells in response to Chlamydia pneumoniae infection.” Infect Immun 69(3): 1420-7.

Coombes, B. K. and J. B. Mahony (2002). “Identification of MEK- and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling as essential events during Chlamydia pneumoniae invasion of HEp2 cells.” Cell Microbiol 4(7): 447-60.

Couraud, P. O., D. Casentini-Borocz, et al. (1989). “Molecular cloning, characterization, and expression of a human 14-kDa lectin.” J Biol Chem 264(2): 1310-6.

Danesh, J., R. Collins, et al. (1997). “Chronic infections and coronary heart disease: is there a link?” Lancet 350(9075): 430-436.

Datta, S. R., A. Brunet, et al. (1999). “Cellular survival: a play in three Akts.” Genes Dev 13(22): 2905-27.

Dechend, R., M. Maass, et al. (1999). “Chlamydia pneumoniae infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF- kappa b and induces tissue factor and PAI-1 expression: A potential link to accelerated arteriosclerosis.” CIRCULATION. Circulation. 100(13): 1369-1373.

Eikelboom, J. W., E. Lonn, et al. (1999). “Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence.” Ann Intern Med 131(5): 363-75.

Ekman, M. R., J. T. Grayston, et al. (1993). “An epidemic of infections due to Chlamydia pneumoniae in military conscripts.” Clin Infect Dis 17(3): 420-5.

Ellis, P. D., K. M. Hadfield, et al. (2000). “Cyclic AMP inhibits agonist-induced heparin-binding EGF gene expression independently of effects on p42/p44 MAPK activation.” Biochem Biophys Res Commun 277(3): 558-61.

Ellis, P. D., K. M. Hadfield, et al. (2001). “Heparin-binding epidermal-growth-factor-like growth factor gene expression is induced by scrape-wounding epithelial cell monolayers: involvement of mitogen-activated protein kinase cascades.” Biochem J 354(Pt 1): 99-106.

Everett, K. D. E., R. M. Bush, et al. (1999). “Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for

the identification of organisms.” International Journal of Systematic Bacteriology 49 Part 2: 415-440.

Faccenda (2001). "Evaluation of Quantitative PCR Master MixSensitivity." Insights 12 (Applied Biosystems).

Fang, L., G. Li, et al. (2001). “p53 induction of heparin-binding EGF-like growth factor counteracts p53 growth suppression through activation of MAPK and PI3K/Akt signaling cascades.” Embo J 20(8): 1931-9.

Farsak, B., A. Yildirir, et al. (2000). “Detection of Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori DNA in human atherosclerotic plaques by PCR.” J Clin Microbiol 38(12): 4408-11.

Felton, C. V., D. Crook, et al. (1997). “Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques.” Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(7): 1337-45.

Fong, I. W., B. Chiu, et al. (1997). “Rabbit model for Chlamydia pneumoniae infection.” Journal of clinical microbiology 35(1): 48-52.

Fryer, R. H., E. P. Schwobe, et al. (1997). “Chlamydia species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity.” Journal of investigative medicine 45(4): 168-174.

Fuki, I. V., N. Blanchard, et al. (2003). “Endogenously produced endothelial lipase enhances binding and cellular processing of plasma lipoproteins via HSPG-mediated pathway.” J Biol Chem 16: 16.

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

Ge, Y., M. A. Konrad, et al. (2001). “Transcriptional regulation of the human cystathionine beta-synthase -1b basal promoter: synergistic transactivation by transcription factors NF-Y and Sp1/Sp3.” Biochem J 357(Pt 1): 97-105.

Gerard, H. C., P. J. Branigan, et al. (1998). “Synovial Chlamydia trachomatis in patients with reactive arthritis/Reiter's syndrome are viable but show aberrant gene expression.” J Rheumatol 25(4): 734-42.

Gerrity, R. G. (1981). “The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions.” Am J Pathol 103(2): 181-90.

Gieselmann, R., D. J. Kwiatkowski, et al. (1995). “Distinct biochemical characteristics of the two human profilin isoforms.” Eur J Biochem 229(3): 621-8.

Glick Jane, M., G. McCoy Mary, et al. (2000). “Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase.” Circulation 102(18 Supplement): Ii.242.

Gordon, T., W. P. Castelli, et al. (1977). “High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study.” Am J Med 62(5): 707-14.

Gown, A. M., T. Tsukada, et al. (1986). “Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions.” Am J Pathol 125(1): 191-207.

Grayston, J. T. (2000). “Background and current knowledge of Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis.” J Infect Dis. 181(6): S402-S410.

Grayston, J. T., L. A. Campbell, et al. (1990). “A new respiratory tract pathogen: Chlamydia pneumoniae strain TWAR.” J Infect Dis 161(4): 618-25.

Grayston, J. T., C. C. Kuo, et al. (1989). “Chlamydia pneumoniae sp. nov. for Chlamydia sp. strain TWAR.” Int J Syst Bacteriol. 39(1): 88-90.

Grayston, J. T., C. C. Kuo, et al. (1986). “A new Chlamydia psittaci strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections.” N Engl J Med 315(3): 161-8.

Gurfinkel, E., G. Bozovich, et al. (1997). “Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS Pilot Study. ROXIS Study Group.” Lancet 350(9075): 404-7.

Guyton, J. R. and K. F. Klemp (1996). “Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis.” Arterioscler Thromb Vasc Biol 16(1): 4-11.

Han, J. A., J. I. Kim, et al. (2002). “P53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53- or genotoxic stress-induced apoptosis.” Embo J 21(21): 5635-44.

Haralambieva, I. H., I. D. Iankov, et al. (2002). “Monoclonal antibody of IgG isotype against a cross-reactive lipopolysaccharide epitope of Chlamydia and Salmonella Re chemotype enhances infectivity in L-929 fibroblast cells.” FEMS Immunol Med Microbiol 33(2): 71-6.

Higashiyama, S., J. A. Abraham, et al. (1991). “A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF.” Science 251(4996): 936-9.

Holland, J. A., K. A. Pritchard, et al. (1992). “Atherogenic levels of low-density lipoprotein increase endocytotic activity in cultured human endothelial cells.” Am J Pathol 140(3): 551-8.

Honore, B., P. Madsen, et al. (1993). “Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II.” FEBS Lett 330(2): 151-5.

Hu, H., G. N. Pierce, et al. (1999). “The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to Chlamydia pneumoniae.” J Clinical Invest 103(5): 747-753.

Iwamoto, R., S. Yamazaki, et al. (2003). “Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function.” Proc Natl Acad Sci U S A 100(6): 3221-6.

Jackson, L. A., L. A. Campbell, et al. (1997). “Isolation of Chlamydia pneumoniae from a carotid endarterectomy specimen.” The Journal of infectious diseases 176(1): 292-295.

Janosik, M., V. Kery, et al. (2001). “Regulation of human cystathionine beta-synthase by S-adenosyl-L-methionine: evidence for two catalytically active conformations involving an autoinhibitory domain in the C-terminal region.” Biochemistry 40(35): 10625-33.

Jaye, M., K. J. Lynch, et al. (1999). “A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism.” Nat Genet 21(4): 424-8.

Jonasson, L., J. Holm, et al. (1986). “Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque.” Arteriosclerosis 6(2): 131-8.

Kanamoto, Y., K. Ouchi, et al. (1991). “Prevalence of antibody to Chlamydia pneumoniae TWAR in Japan.” J Clin Microbiol. 29(4): 816-818.

Kery, V., L. Poneleit, et al. (1998). “Trypsin cleavage of human cystathionine beta-synthase into an evolutionarily conserved active core: structural and functional consequences.” Arch Biochem Biophys 355(2): 222-32.

Kleemola, M., P. Saikku, et al. (1988). “Epidemics of pneumonia caused by TWAR, a new Chlamydia organism, in military trainees in Finland.” J Infect Dis 157(2): 230-6.

Knoebel, E., P. Vijayagopal, et al. (1997). “In vitro infection of smooth muscle cells by Chlamydia pneumoniae.” Infect Immun 65(2): 503-506.

Kocks, C. (1994). “Intracellular motility. Profilin puts pathogens on the actin drive.” Curr Biol 4(5): 465-8.

Kraus, J. P. (1987). “Cystathionine beta-synthase (human).” Methods Enzymol 143: 388-94.

Krausse Opatz, B., P. Dollmann, et al. (2000). “Mycoplasma fermentans, M. hominis, and M. hyorhinis inhibit infectivity and growth of Chlamydia trachomatis and C. pneumoniae in HEp-2 cells. ” J Clin Mivrobiol. 38(10): 3910-3911.

Kuo, C. C., L. A. Jackson, et al. (1995). “Chlamydia pneumoniae (TWAR).” Clin Microbiol Rev 8(4): 451-61.

Kuo, C. C., A. Shor, et al. (1993). “Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries.” J Infect Dis 167(4): 841-9.

Kutlin, A., C. Flegg, et al. (2001). “Ultrastructural study of Chlamydia pneumoniae in a continuous-infection model.” J Clin Microbiol 39(10): 3721-3.

Kutlin, A., P. M. Roblin, et al. (1999). “In vitro activities of azithromycin and ofloxacin against Chlamydia pneumoniae in a continuous-infection model.” Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43(9): 2268-2272.

Maass, M., C. Bartels, et al. (1998). “Endovascular presence of viable Chlamydia pneumoniae is a common phenomenon in coronary artery disease.” Journal of the American College of Cardiology 31(4): 827-832.

Maass, M., C. Bartels, et al. (1998). “Endovascular presence of Chlamydia pneumoniae DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease. Chlamydia pneumoniae in the cardiovascular system.” Atherosclerosis 140(Sup1): S25-S30.

Manninen, V., L. Tenkanen, et al. (1992). “Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. Implications for treatment.” Circulation 85(1): 37-45.

Marikovsky, M., K. Breuing, et al. (1993). “Appearance of heparin-binding EGF-like growth factor in wound fluid as a response to injury.” Proc Natl Acad Sci U S A 90(9): 3889-93.

Martin, R. J., H. W. Chu, et al. (2001). “Airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness after Mycoplasma pneumoniae infection in a murine model.” Am J Respir Cell Mol Biol 24(5): 577-82.

Marton, A., A. Karolyi, et al. (1992). “Prevalence of Chlamydia pneumoniae antibodies in Hungary.” European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 11(2): 139-142.

Matsushima, H., M. Shirai, et al. (1999). “Lymphotoxin inhibits Chlamydia pneumoniae growth in HEp-2 cells.” Infect Immun 67(6): 3175-3179.

Mazzone, A., S. De Servi, et al. (1993). “Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease.” Circulation 88(2): 358-63.

McCarthy, S. A., M. L. Samuels, et al. (1995). “Rapid induction of heparin-binding epidermal growth factor/diphtheria toxin receptor expression by Raf and Ras oncogenes.” Genes Dev 9(16): 1953-64.

Meijer, A., C. E. Vallinga, et al. (1996). “A microcarrier culture method for the production of large quantities of viable Chlamydia pneumoniae.” Applied microbiology and biotechnology 46(2): 132-137.

Moazed, T. C., C. Kuo, et al. (1997). “Murine models of Chlamydia pneumoniae infection and atherosclerosis.” J Infect Dis 175(4): 883-90.

Moazed, T. C., C. C. Kuo, et al. (1998). “Evidence of systemic dissemination of Chlamydia pneumoniae via macrophages in the mouse.” The Journal of infectious diseases 177(5): 1322-1325.

Mogulkoc, N., S. Karakurt, et al. (1999). “Acute purulent exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease and Chlamydia pneumoniae infection.” American journal of respiratory and critical care medicine 160(1): 349-353.

Moiseeva, E. P., Q. Javed, et al. (2000). “Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation.” Cardiovasc Res 45(2): 493-502.

Moiseeva, E. P., E. L. Spring, et al. (1999). “Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix.” J Vasc Res 36(1): 47-58.

Molestina, R. E., J. B. Klein, et al. (2002). “Proteomic analysis of differentially expressed Chlamydia pneumoniae genes during persistent infection of HEp-2 cells.” Infect Immun 70(6): 2976-81.

Molestina, R. E., R. D. Miller, et al. (1999). “Infection of human endothelial cells with Chlamydia pneumoniae stimulates transendothelial migration of neutrophils and monocytes.” Infect Immun 67(3): 1323-1330.

Montes, M., G. Cilla, et al. (1992). “High prevalence of Chlamydia pneumoniae infection in children and young adults in Spain. ” Pediatr Infect Dis J 11(11): 972-3.

Moulder, J. W., T. Hatch, et al. (1984). Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams and Wilkins.

Nadrchal, R., A. Makristathis, et al. (1999). “Detection of Chlamydia pneumoniae DNA in atheromatous tissues by polymerase chain reaction.” Wiener klinische Wochenschrift 111(4): 153-156.

Nakata, A., J. Miyagawa, et al. (1996). “Localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human coronary arteries. Possible roles of HB-EGF in the formation of coronary atherosclerosis.” Circulation 94(11): 2778-86.

Noll, G., e. Camm A J, et al. (1998). “Pathogenesis of atherosclerosis : a possible relation to infection. Chlamydia pneumoniae in the cardiovascular system.” Atherosclerosis 140(Sup1): S3-S9.

Nordstrom, M. and T. Kjellstrom (1992). “Age dependency of cystathionine beta-synthase activity in human fibroblasts in homocyst(e)inemia and atherosclerotic vascular disease.” Atherosclerosis 94(2-3): 213-21.

O'Connor, S. (1999). “Fulfillment of Koch's postulates and the causes of atherosclerosis.” American Heart Journal 138(5): S550-S551.

Orfila, J. J., e. Camm A J, et al. (1998). “Seroepidemiological evidence for an association between Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. Chlamydia pneumoniae in the cardiovascular system.” Atherosclerosis 140(Sup1): S11-S15.

Quinn, T. C. and C. A. Gaydos (1999). “In vitro infection and pathogenesis of Chlamydia pneumoniae in endovascular cells.” American heart joirnal 138(5) Part 2 Suppl. S): S507-S511.

Rabinovich, G. A., C. E. Sotomayor, et al. (2000). “Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation.” Eur J Immunol 30(5): 1331-9.

Rader, D. J. and K. A. Dugi (2000). “The endothelium and lipoproteins: insights from recent cell biology and animal studies.” Semin Thromb Hemost 26(5): 521-8.

Rader, D. J. and C. Maugeais (2000). “Genes influencing HDL metabolism: new perspectives and implications for atherosclerosis prevention.” Mol Med Today 6(4): 170-5.

Ramirez, J. A. (1996). “Isolation of Chlamydia pneumoniae from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis.” Annals of internal medicine 125(12): 979-982.

Rasmussen, S. J., L. Eckmann, et al. (1997). “Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis.” Journal of cinical investigation 99(1): 77-87.

Roblin, P. M., W. Dumornay, et al. (1992). “Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of Chlamydia pneumoniae.” J Clin Microbiol 30(8): 1968-71.

Ross, R. (1993). “The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s.” Nature. 362(6423): 801-809.

Ross, R. (1999). “Atherosclerosis - An inflammatory disease.” New England Journal of Medicine 340(2): 115-126.

Ross, R. and J. A. Glomset (1973). “Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis.” Science 180(93): 1332-9.

Rubins, H. B., S. J. Robins, et al. (1999). “Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group.” New England Journal of Medicine 341(6): 410-8.

Saikku, P., K. Laitinen, et al. (1998). “Animal models for Chlamydia pneumoniae infection. Chlamydia pneumoniae in the cardiovascular system.” Atherosclerosis 140(Sup1): S17-S19.

Saikku, P., M. Leinonen, et al. (1988). “Serological evidence of an association of a novel chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction.” Lancet 2: 983-985.

Saikku, P., M. Leinonen, et al. (1992). “Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study.” Annals of Internal Medicine 116(4): 273-278.

Sako, T., T. Takahashi, et al. (2002). “Chlamydial infection in canine atherosclerotic lesions.” Atherosclerosis 162(2): 253-9.

Schachter, J. (1988). “The intracellular life of Chlamydia.” Curr Top Microbiol Immunol 138: 109-39.

Schlessinger, J. (2000). “Cell signaling by receptor tyrosine kinases.” Cell 103(2): 211-25.

Shah, P. K. (1997). “Plaque disruption and coronary thrombosis: new insight into pathogenesis and prevention.” Clin Cardiol 20(11 Suppl 2): II-38-44.

Stary, H. C. (2000). “Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update.” Arterioscler Thromb Vasc Biol 20(5): 1177-8.

Steinberg, D. (1997). “Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis.” Circulation 95(4): 1062-71.

Tanaka, N., K. Masamura, et al. (2002). “A role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in cardiac remodeling after myocardial infarction.” Biochem Biophys Res Commun 297(2): 375-81.

Vasile, E., M. Simionescu, et al. (1983). “Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ.” J Cell Biol 96(6): 1677-89.

Von Eckardstein, A., J. R. Nofer, et al. (2001). “High density lipoproteins and arteriosclerosis role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport.” Artterioscler Thromb Vasc Biol 21(1): 13-27.

Von Hertzen, L., R. Isoaho, et al. (1996). “Chlamydia pneomoniae antibodies in chronic obstructive pulmonary disease.” International Journal of Epidemiology 25(3): 658-664.

Vyakarnam, A., S. F. Dagher, et al. (1997). “Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing.” Mol Cell Biol 17(8): 4730-7.

Weiss, B., F. N. Wuppermann, et al. (2000). “Chlamydia pneumoniae infection alters gene expression in endothelial cells.” Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology 32(3): 480.

Welch, G. N. and J. Loscalzo (1998). “Homocysteine and atherothrombosis.” New England Journal of Medicine 338(15): 1042-50.

Yamaguchi, H., S. Haranaga, et al. (2002). “A Chlamydia pneumoniae infection model using established human lymphocyte cell lines.” FEMS Microbiol Lett 216(2): 229-34.

9. Abkürzungen

14,15-EET	14,15-epoxyeicosatrienoic acid
AB	Aberrantes Einschlusskörperchen (aberrant body)
bp	Basenpaare
CBS	Cystathionin β-Syntase
CDS	Codierende Sequenz (coding sequence)
C. p.	*Chlamydia pneumoniae*
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
C_T	threshold cycle
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EB	Elementarkörperchen (elementary body); infektiöse Form der Chlamydien
EB^{UV}	Elementarkörperchen, welche mit UV-Licht behandelt wurden, um sie zu inaktivieren
FCS	Fötales Kälberserum
Gal-1	Galectin 1
HB-EGF	Human heparin-binding EGF-like growth factor
HCAEC	humane, koronare, arterielle Endothelzellen
hPI	Stunden nach der Infektion (hours post infection)
IB	Einschlusskörperchen (inclusion body)
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL-8	Interleukin 8
KHK	koronare Herzerkrankung
LAL	Lysosomale Saure Lipase
LIPG	Endotheliale Lipase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	macrophage chemotactic protein-1
MOI	multiplicity of infection (Anzahl der EBs zu den Zellen)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nih.gov
ng	Nanogramm
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFN1	Profilin 1
QPCR	quantitative realtime Polymerasekettenreaktion
RB	Retikularkörperchen (reticular body)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SMC	glatte Muskelzellen (smooth muscle cells)
Std.Dev.	Standard Deviation (Standardabweichung)
Tm	Mittlere Schmelztemperatur
ÜN	Über Nacht
UNG	Uracyl-N-Glycosylase
VEGF	vasoendothelialer Wachstumsfaktor

10. Verwendete Reagentien

Reagens	Hersteller/Vertreiber
AmphotericinB	Bristol-Myers Squibb, Österreich
Bromophenolblau Na-Salz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chloroform	Anstaltsapotheke, AKH-Wien, Österreich
Cycloheximid	Sigma-Aldrich
deionisiertes Formamid	Sigma chemical, St.Louis, USA
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich
DIF-Reagens	genusspecifischer „Imagen Chlamydia monoclonal antibody“; Daco Diagnostika, Hamburg, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich
EGM-2-MV Bullet Kit	Clonetics, Cellsystems; Deutschland; (CC-4147)
EtOH (Ethanol)	Merck, Darmstadt, Deutschland
FCS	Gibco-BRL, England
Formaldehyd	Amresco, Solon, Ohio, USA
Gentamycin	Gibco-BRL
Glycerol	Merck
HEPES	Gibco–BRL
KH_2PO_4	Merck
L-Glutamin	Gibco
MEM (“minimal essential medium with earle’s salts without L-glutamine”	Gibco-BRL
Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2	Clonetics
MOPS (3-[N-Morpholino] propane-sulfonic acid)	Sigma-Aldrich
Na_2HPO_4 Dibasic	Merck
Na-Acetat	Merck
NaH_2PO_4 Monobasic	Merck
NEAA (“non essential aminoacids”	Gibco-BRL
PBS (Phosphat gepufferte Saline, pH 7,5; Dulbecco’ s)	GibcoBRL, UK
PCI (Phenol-Chloroform-isoamylalkohol)	Sigma-Aldrich
Sucrose	Merck
TaqMan-Universal PCR Mastermix“	PE Biosystems, Foster City, CA
TRI-Reagent	molecular research center, Inc., Cincinnati, OH
Tryphanblaulösung	Gibco-BRL
Vancomycin	Abbott, Österreich
Wasser dest.	Fresenius, Graz, Österreich

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meiner Familie für deren beständige Unterstützung bedanken.

Weiters möchte ich den beiden Betreuern dieser Dissertation, Prof. Dr. A. M. Hirschl und Prof. Dr. P. C. Kubicek, meinen Dank für Ihre Kooperation bei der Fertigstellung dieser Arbeit aussprechen. Vielen Dank an Prof. M. Rotter für die Finanzierung des Projektes.

Mein besonderer Dank gebührt Doz. Dr. Petra Apfalter, welche dieses Projekt initiiert hat und mich ständig unterstützt hat.

Vielen Dank auch an Marion Nehr, welche mich in die Handhabung der Zellkulturen instruiert hat.

12. Anhang

12.1. Publikationen

- Makristathis A, Barousch W, Pasching E, Binder K, Kuderna K, Apfalter P, Rotter ML and Hirschl AM (2000). “Two enzyme immunoassays and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens from pediatric patients before and after eradication therapy.” J Clin Microbiol 38(10): 3710-4.
- Stauffer F, Makristathis A, Klein JP, Barousch W (2000). “Drug resistance rates of Mycobacterium tuberculosis strains in Austria between 1995 and 1998 and molecular typing of multidrug-resistant isolates. The Austrian Drug Resistant Tuberculosis Study Group.” Epidemiol Infect 124(3): 523-8.
- Stauffer F, Makristathis A, Rumetshofer R, Barousch W, Hasenberger W, Wewalka G, Rotter M, Wolf K. I (2000). “Implementation of a molecular typing system to support epidemiological investigations in the tuberculosis health care system in Vienna.” Wien Klin Wochenschr 112(18): 791-7.
- Apfalter P, Barousch W, Nehr, M., Makristathis, A., Willinger, B., Rotter, M., Hirschl, A. M.. (2003). “Comparison of a New Quantitative *ompA*-Based Real-Time PCR TaqMan Assay for Detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in Respiratory Specimens with Four Conventional PCR Assays.” J Clin Microbiol 41(2): 592-600.
- Apfalter P, Barousch W, Nehr M, Willinger B, Rotter M, Hirschl AM. (2004). ”No evidence of involvement of *Chlamydia pneumoniae* in severe cerebrovascular atherosclerosis by means of quantitative real-time PCR.” Stroke 35: 2024-2028.

12.2. Vorträge und Posterpräsentationen

- Apfalter P, Barousch W, Rotter M, Hirschl A. M. (2000). “Typing of *H. pylori* directly from stool by seminested-PCR-RFLP of the ure-C gene.” Posterpräsentation; Helsinky, Finnland
- Makristathis A, Barousch W, Rotter M, Hirschl A. M. (2000). “Stool PCR and Antigen EIA in Follow-up of Treated *Helicobacter pylori* Infected Pediatric Patients.” Posterpräsentation; Stockholm
- Willinger B, Obradovic A, Barousch W, Rotter M, Hirschl A. M. (2000) „Nachweis von Kieferhöhlenaspergillosen mit molekularbiologischen Identifizierungs-verfahren,“ Posterpräsentation; MYK’ 2000-Presentations; S. 265.
- Willinger B, Obradovic A, Barousch W, Rotter M, Hirschl A. M. (2000). “Detection of aspergillosis of the maxillary sinus with molecular techniques.” Rev Iberoam Micol 2000; 17; Posterpräsentation
- Barousch W, Apfalter P, Rotter M, Hirschl A. M. (2002). “mRNA expression of LIPG in human endothelial cells after contact with *Chlamydia pneumoniae*.” Posterpräsentation; Antalya,Türkei
- Barousch W, Apfalter P, Rotter M, Hirschl A. M. (2002). „mRNA-Expression von LIPG in humanen Zellen nach Infektion mit *Chlamydia pneumoniae*.” Vortrag; Meran, Italien
- Barousch W, Apfalter P, Rotter M, Hirschl A. M. (2004). „Genexpressionsänderung eukaryontischer Zellen nach Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* und mögliche Zusammenhänge mit der Entstehung von Atherosklerose“ Posterpräsentation; Bad Ischl

13. Curriculum vitae

19.11.1965	geboren in Wien
1985	Beginn des Studiums Biologie an der Universität Wien
1996	Diplomprüfung für das Studium Mikrobiologie/Nebenfach Genetik mit Diplomarbeitsthema: „N-terminaler Einfluss des Lysegens E von PhiX174 auf den Lysemechanismus von Escherichia coli.“
1995-1996	Mitarbeiter im medizinisch-analytischen Labor Dr. Schön, Wien
1997	Mitarbeiter im medizinisch-analytischen Labor Margareten, Wien
1998	Mitarbeiter im Labor Klinische Abteilung für Klinische Mikrobiologie des Klinischen Instituts für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Universität Wien
Okt. 1999	Beginn der experimentellen Arbeit zur vorliegenden Dissertation