

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen  
I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Untersuchungen zur Proteasenaktivierung bei einer Infektion  
von Monozyten mit *Chlamydia pneumoniae* –  
Implikationen für die Atherogenese**

Daniel Yoshimasa Breiffeld

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Schömig  
2. Priv.-Doz. Dr. I. Ott

Die Dissertation wurde am 06.12.2006 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.01.2007  
angenommen.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Schmidt R, Redecke V, Breitfeld Y, Miethke T, Zohlhofer D, Neumann FJ, May AE:  
*Chlamydia pneumoniae*-infected monocytes degrade extracellular matrix via the plasminogen  
and the EMMPRIN/MMP activation system.  
*Europ Heart*. 2002; (Supl.);

Schmidt R, Redecke V, Breitfeld Y, Miethke T, Zohlhofer D, Neumann FJ, May AE:  
Enhanced migration and matrix degradation by *Chlamydia pneumoniae*-infected monocytes  
via the plasminogen and the EMMPRIN/MMP activation system. Implications for plaque  
rupture.  
*Circulation*. 2002; 106 (Suppl.); 211

Schmidt R, Redecke V, Breitfeld Y, Wantia N, Miethke T, Massberg S, Fischel S, Neumann  
FJ, Schömig A, May AE:  
EMMPRIN (CD 147) is a Central Activator of Extracellular Matrix Degradation by  
*Chlamydia pneumoniae*-infected Monocytes. Implications for plaque rupture.  
*Thromb Haemost*. 2006; 95:151-159

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	1
<b>2. Zielsetzung</b>	4
<b>3. Wissenschaftliche Grundlagen</b>	5
<b>3.1 <i>Chlamydia pneumoniae</i></b>	5
3.1.1 Biologie der Chlamydien	5
3.1.2 Epidemiologie	6
3.1.3 <i>C. pneumoniae</i> -Infektion und Pathogenese der Atherosklerose	7
3.1.3.1 <i>Seroepidemiologische Studien</i>	7
3.1.3.2 <i>C. pneumoniae in atherosklerotischen Läsionen</i>	8
3.1.3.3 <i>C. pneumoniae in peripheren Monozyten – Hinweise auf eine Verbreitung des Erregers durch die Zellen des monozytären Phagozytensystems</i>	10
3.1.3.4 <i>Tierexperimentelle Studien</i>	11
<b>3.2 <i>Die Matrix Metalloproteinasen (MMPs)</i></b>	14
3.2.1 Strukturmerkmale der MMPs	15
3.2.2 Zelltyp-spezifische Verteilung der MMPs in Blut- und Gefäßwandzellen	16
3.2.3 MMPs und Plaqueprogression	17
3.2.4 MMPs und Plaqueruptur	18
3.2.5 Regulation der MMP-Aktivität	18
3.2.5.1 <i>Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)</i>	19
3.2.5.2 <i>Membrane-type MMPs (MT-MMPs)</i>	19
3.2.5.3 <i>Plasminogen-/Plasminsystem</i>	19
3.2.5.4 <i>Endogene MMP-Inhibitoren</i>	20

<b>4. Material und Methoden</b>	22
<b>4.1 Material</b>	22
4.1.1 Lösungen, Medien und Reagenzien	22
4.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial	24
4.1.3 Zelllinien	26
4.1.4 Antikörper	26
<b>4.2 Methoden</b>	27
4.2.1 Anzucht und Aufreinigung von Chlamydien	27
4.2.1.1 Anzucht von <i>C. pneumoniae</i>	27
4.2.1.2 Kontrolle des Infektionserfolges	28
4.2.1.3 Anzucht von <i>C. trachomatis</i>	30
4.2.1.4 Aufreinigung von <i>C. pneumoniae</i> und <i>C. trachomatis</i>	30
4.2.1.5 Überprüfung von Konzentration und Infektiösität gewonnener Chlamydien	31
4.2.1.6 Ausstrich aufgereinigter Chlamydien auf Schokoladenagar	31
4.2.1.7 Mykoplasmen-PCR	32
4.2.2 Monozytenisolierung aus Vollblut	33
4.2.3 Infektion von Monozyten mit Chlamydien	33
4.2.4 RNA-Extraktion aus Monozyten	34
4.2.5 cDNA-Synthese	35
4.2.6 Quantitative real-time PCR	35
4.2.6.1 Prinzip	35
4.2.6.2 Durchführung	36
4.2.7 Durchflußzytometrie (FACS)	37
4.2.7.1 Prinzip	37
4.2.7.2 Antikörperfärbung von Monozyten	38
4.2.8 Untersuchungen an Zellkulturüberständen	39
4.2.8.1 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)	39
4.2.8.2 SDS-Page Gelatinzymographie	40
4.2.9 Monozytentransmigration	41

<b>5. Ergebnisse</b>	43
<b>5.1</b> <i>C. pneumoniae</i> induziert die monozytäre Genexpression von <b>EMMPRIN und MT1-MMP</b>	43
<b>5.2</b> <i>C. pneumoniae</i> erhöht die Oberflächenexpression von <b>EMMPRIN und MT1-MMP auf Monozyten</b>	44
<b>5.3</b> <i>C. pneumoniae</i> induziert die Freisetzung von <b>MMP-7 und MMP-9</b>	45
<b>5.4</b> <i>C. pneumoniae</i> induziert eine Steigerung der proteolytischen Aktivität monozytärer Zellen durch Induktion von <b>MMP-2 und MMP-9</b>	45
<b>5.5</b> <i>C. pneumoniae</i> -spezifische Induktion der <b>MMP-9-Aktivität in Monozyten</b>	46
<b>5.6</b> <i>C. pneumoniae</i> induziert die Transmigration von Monozyten durch extrazelluläre Matrix	47
<b>5.7</b> <i>C. pneumoniae</i> -infizierte Monozyten induzieren die <b>MMP-2-Sekretion glatter Gefäßmuskelzellen durch Freisetzung inflammatorischer Zytokine</b>	49
<b>6. Diskussion</b>	52
<b>7. Zusammenfassung</b>	56
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	58
<b>9. Danksagung</b>	69

## Abkürzungen

A.	Arterie
APMA	p-aminophenylmercuric acetate
AP	Angina pectoris
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosintriphosphat
c	Konzentration
CA	Koronarangiographie
CCD	charge coupled device
CD	cluster of differentiation, Zelloberflächenmarker
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CPDA	Zitronensäure-Phosphat-Dextrose-Adenin
<i>C. pneumoniae/C. pn.</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
<i>C. trachomatis/C. tr.</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskopie
EMMPRIN	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
FACS	fluorescence-activated cell sorting, Durchflußzytometrie
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin
ifu	infectious unit
IgG-Ak	Antikörper der Immunglobulinklasse G
IgM-Ak	Antikörper der Immunglobulinklasse M
kD	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein

## Abkürzungen

---

LPS	Lipopolysaccharid, bakterielles Endotoxin
mAk	monoklonaler Antikörper
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MCSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MMP	Matrix Metalloproteinase
MonoMac6	immortalisierte humane monozytäre Zelllinie
MT-MMP	Membrane-type MMP
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren
NM	Nährmedium
NTP	Nukleotidtriphosphat
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Proteinkettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
pro-MMP	Vorstufe einer MMP, enzymatisch inaktiv
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
RPE	R-Phycoerythrin
RT	reverse Transkription
STD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMCs	Smooth Muscle Cells, glatte Gefäßmuskelzellen
SPG	Succrose-Phosphat-Glutamatlösung
SSC	Side Scatter, 90°-Seitwärtsstreulicht
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
t-PA	Tissue-Type Plasminogen Activator
TWAR	Taiwan acute respiratory
u-PA	Urokinase-Type Plasminogen Activator

### **1. Einleitung**

Die Atherosklerose ist eine progrediente, chronisch-entzündliche Erkrankung der Gefäßwände und betrifft vorwiegend große und mittelgroße Arterien. Ihre Komplikationen bilden in den westlichen Industrieländern mit einem Anteil von etwa 50% an der Gesamtmortalität die häufigste Todesursache (Libby, 1998, S. 225).

Im Verlauf der über Jahre fortschreitenden Erkrankung lassen sich die Stadien der Initiierung, der Progression zur komplexen fibrösen Plaque, und als akutes Ereignis deren Ruptur, voneinander abgrenzen (Ross, 1999, S. 120-121; Libby et al., 2002, S. 1136).

Die Initiierung einer atherosklerotischen Läsion erfolgt durch die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut. An Prädilektionsstellen im arteriellen System bildet das Gefäßendothel Oberflächenproteine aus, an denen Monozyten adhären können (Gimbrone, 1999, S. 2). Durch aktive, gerichtete Migrationsprozesse gelangen die Monozyten in die Gefäßintima. Hier entwickeln sie sich, durch „Scavengerrezeptor“-vermittelte Aufnahme modifizierter Lipoproteinpartikel, zu sogenannten Schaumzellen. Diese frühe Form der atherosklerotischen Läsion wird auch als „fatty streak“ bezeichnet (Lusis, 2000, S. 233).

Die Akkumulation von Schaumzellen in der Gefäßintima ist die Voraussetzung für die Ausbildung komplexer, fibröser Läsionen. Unter dem Einfluss leukozytärer Zytokine und Wachstumsfaktoren, migrieren glatte Muskelzellen aus tieferen Gefäßschichten in die Intima und proliferieren dort. Mit fortschreitendem Entzündungsprozess geben aktivierte Leukozyten (Monozyten/ Makrophagen, Schaumzellen) und ortsständige Zellen der arteriellen Gefäßwand eine Vielzahl fibrogener Mediatoren ab, die Replikation und Produktion einer dichten extrazellulären Matrix durch die glatten Muskelzellen bewirken (Libby, 2001, S. 365).

Die fortgeschrittene atherosklerotische Läsion ist durch die Ausbildung einer subendothelialen fibrösen Kappe, die die Plaque lumenwärts abgrenzt und ihr Stabilität verleiht, gekennzeichnet. Im Inneren der Läsion kann sich durch Zelluntergang und Freisetzung proteolytisch aktiven Zellmaterials ein lipidreicher nekrotischer Kern entwickeln (Ross, 1999, S. 122).

Die fibröse Kappe der Plaque unterliegt kontinuierlichen Umbauvorgängen („remodeling“). Ein beschleunigter Abbau kollagener und elastischer Fasern, vornehmlich durch die Wirkung monozytärer Proteasen, kann die Stabilität der Plaque gefährden (Nikkari et al., 1995, S. 1393; Sukhova et al., 1999, S. 2504).



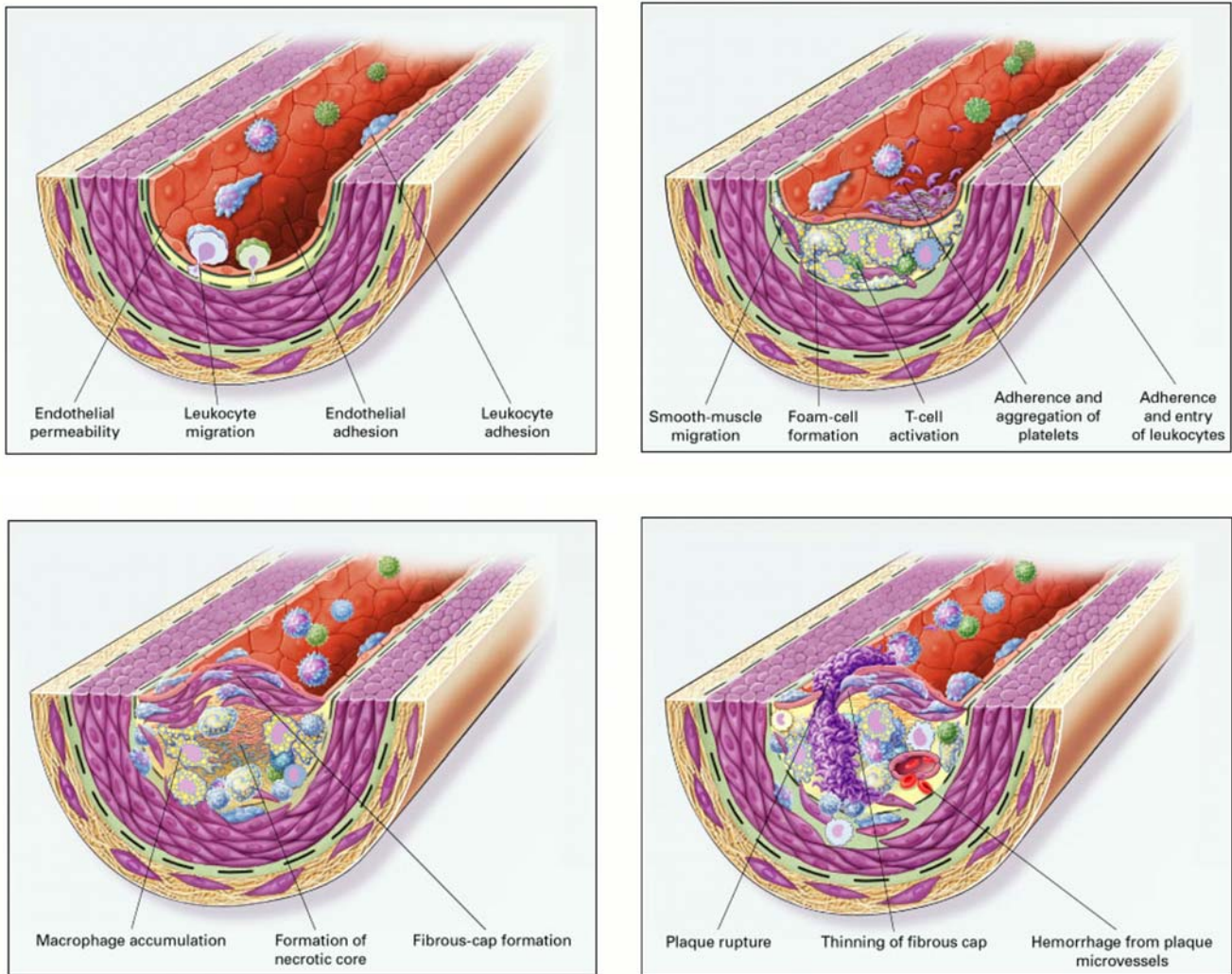
Die meisten koronaren Thrombosen resultieren aus dem Aufbrechen der protektiven fibrösen Kappe. Durch einen Einriss, vornehmlich an den Schulterregionen der fibrösen Kappe, treten die zellulären und plasmatischen Gerinnungsfaktoren des Blutes mit dem thrombogenen Inhalt der Plaque in Kontakt (Ross, 1999, S. 122; Lusis, 2000, S. 238).

Neben den bekannten Risikofaktoren wie etwa Hyperlipidämie, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, familiärer Disposition und Rauchen wird als weiterer möglicher Faktor dieser multifaktoriell bedingten Erkrankung eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) angenommen. Bei *C. pneumoniae* handelt es sich um ein obligat intrazelluläres Bakterium, das bevorzugt bei Jugendlichen atypische Pneumonien hervorruft.

Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Entstehung der Atherosklerose ergaben sich 1988 aus seroepidemiologischen Studien, die eine positive Korrelation zwischen einer abgelaufenen *C. pneumoniae*-Infektion und der koronaren Herzerkrankung aufwiesen (Saikku et al., 1988, S. 983). Dieser Verdacht konnte durch den Nachweis des Bakteriums in Biopsien atherosklerotisch veränderter Gefäße beim Menschen weiter erhärtet werden (Shor et al., 1992, S. 159). In tierexperimentellen Studien gelang es durch nasale Inokulation von *C. pneumoniae* atherosklerotische Gefäßveränderungen hervorzurufen, in denen die Erreger nachweisbar waren (Fong et al., 1997, S. 50; Moazed et al., 1998, S. 1322).

Neueste Forschungen beschäftigen sich mit der Klärung der Pathomechanismen, die nach einer Infektion mit *C. pneumoniae* die Ausbildung der Atherosklerose fördern könnten. Von zentralem Interesse ist dabei die Bedeutung der Monozyten, da sie zum einen als Vektor zwischen Alveolarraum und erkrankter Gefäßwand fungieren können, und zum anderen an allen Stadien der Atherosklerose maßgeblich beteiligt sind.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass *C. pneumoniae*-Infektionen die Monozytenrekrutierung an die (noch) gesunden Gefäßwände induzieren können (May et al., 2003, S.789). Einige Studien liefern erste Hinweise darauf, dass die Beschleunigung des atherosklerotischen Entzündungsgeschehens unter anderem mit einer vermehrten Aktivität monozytärer Proteasen in Zusammenhang steht (Major et al., 2002, S. 1203). Die Beteiligung monozytärer Proteasen an den Vorgängen der gerichteten Zellmigration, sowie deren Bedeutung für die Stabilität der atherosklerotischen Plaque, sind dabei hervorzuheben.



**Abbildung 1:** Stadien der Atherogenese. Initiation, Plaqueprogression und Plaqueruptur. Die frühe atherosklerotische Läsion entsteht durch Migration und Akkumulation von Entzündungszellen in der Gefäßintima. Eine fortgeschrittene, stabile Plaque ist durch die Ausbildung einer fibrösen Kappe (fibrous cap) gekennzeichnet, die ein Gemisch aus Entzündungszellen, Lipiden und untergegangenen Zellmaterial (necrotic core) gegen den Blutstrom abgrenzt. Unter dem Einfluß von Proteasen kommt es schließlich zur Ausdünnung der fibrösen Kappe und zur Ruptur der Plaque.

Abbildungen aus: Ross, R. Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. *NEJM* 340 (1999) 115-126 (S. 117-121).

### 2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob und wie eine Infektion von Monozyten mit *C. pneumoniae* Einfluß auf ihre proteolytischen Eigenschaften hat. Dabei soll der Schwerpunkt insbesondere auf der Regulation der durch Matrix Metalloproteinasen (MMPs) vermittelten Proteolyse liegen.

Um die Versuche durchführen zu können, müssen zunächst Chlamydien der Gattungen *pneumoniae* und *trachomatis* in ausreichender Menge gezüchtet und aufgereinigt werden. Mit den gewonnenen Chlamydien können dann humane Monozyten und humane monozytäre Zellen (MonoMac6) infiziert werden.

Um mögliche Auswirkungen der Infektion auf die zelluläre MMP-Aktivität zu untersuchen stehen in unserer Arbeitsgruppe die Verfahren der Durchflußzytometrie, der Real-Time PCR, der SDS-Page-Gelatinzymographie und des ELISA zur Verfügung. Mit Hilfe von Migrationsversuchen durch extrazelluläre Matrix können anschließend die möglichen funktionellen Konsequenzen einer monozytären *C. pneumoniae*-Infektion direkt beobachtet werden.

Ferner soll untersucht werden, in wieweit *C. pneumoniae*-infizierte Monozyten Einfluß auf benachbarte Zellen innerhalb der Gefäßwand nehmen. Modellhaft sollen gereinigte Zellüberstände infizierter Monozyten mit glatten Gefäßmuskelzellen inkubiert werden, und die möglichen Auswirkungen auf die MMP-Aktivität der Muskelzellen zymographisch analysiert werden.

### 3. Wissenschaftliche Grundlagen

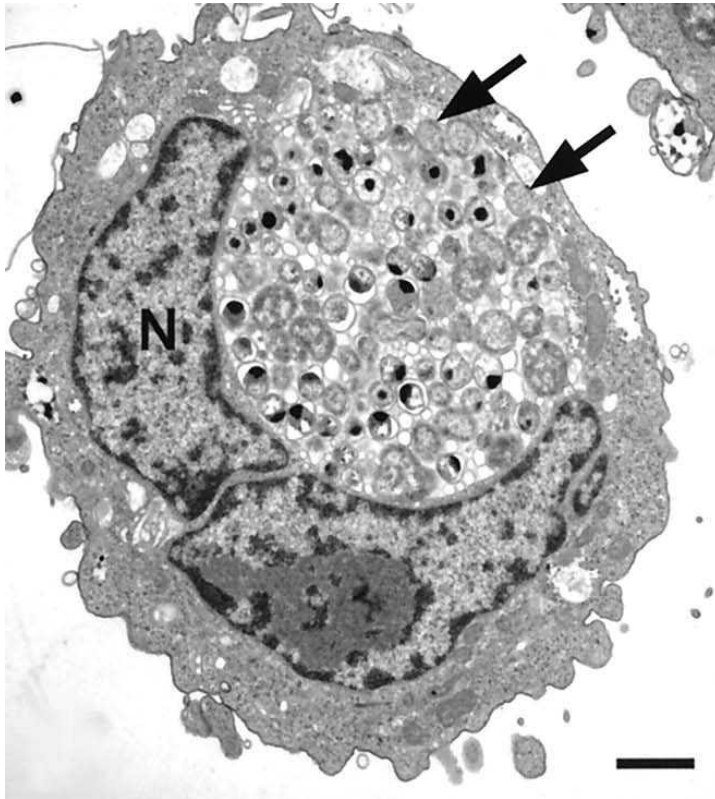
#### 3.1 *Chlamydia pneumoniae*

##### 3.1.1 Biologie der Chlamydien

Es sind drei humanpathogene Chlamydien-Spezies bekannt: *C. trachomatis*, *C. psittaci* und *C. pneumoniae*. *C. pneumoniae*, zunächst als TWAR (nach den ersten Isolaten Taiwan-183 und acute respiratory-39) bezeichnet, wurde erstmals 1986 beschrieben (Grayston et al., 1986, S. 161-168). *C. pneumoniae* kann Infektionen der oberen Atemwege, und sog. atypische Pneumonien verursachen. Eine Unterscheidung der Chlamydien-Spezies erfolgt anhand der DNA-Sequenz und anhand morphologischer Kriterien (Grayston et al., 1993, S. 66).

Chlamydien sind wegen eines Defektes der ATP-Synthese auf die Vermehrung in Wirtszellen angewiesen. Der Reproduktionszyklus beginnt mit der Adhäsion und der Endozytose eines infektiösen Elementarkörpers durch die Wirtszelle. Intrazellulär wandelt sich dieser Elementarkörper in den stoffwechselaktiven Retikularkörper um (primäre Differenzierung). Durch Zellteilung des Bakteriums innerhalb der Wirtszelle kommt es zur Vermehrung der Retikularkörper im Endosom (Einschlusskörper). Zuletzt werden die Retikularkörper wieder in infektiöse Elementarkörper umgewandelt (sekundäre Differenzierung) und durch Exozytose oder Lyse der Wirtszelle freigesetzt. Die Dauer eines Vermehrungszyklus beträgt 48 bis 72 Stunden und variiert mit den Eigenschaften der jeweiligen Chlamydien-Spezies sowie der Wirtszelle (Beatty et al., 1994, S. 687).

Für die Pathophysiologie der Chlamydieninfektionen ist die intrazelluläre Persistenz der Erreger von besonderer Bedeutung. Sie können in Epithelzellen und Fibrozyten der befallenen Schleimhäute sowie in Monozyten/Makrophagen langfristig überleben. Durch ihren intrazellulären Vermehrungszyklus entziehen sich die Chlamydien weitgehend der körpereigenen Abwehr. Dies erklärt auch den hohen Anteil chronischer Infektionen. Es wird ebenfalls angenommen, dass Chlamydien von Monozyten und Makrophagen transportiert werden und so Zellen anderer Gewebe erreichen und infizieren können (Kuo et al., 1993, S. 841; Maass et al., 1998, S. 30).



**Abbildung 2:** Großer chlamydialer Einschlußkörper im Zytoplasma einer Hep2-Zelle (Larynxkarzinom-Zelllinie). Elektronenmikroskopische Aufnahme nach 48 stündiger Infektion (N: Zellkern, Pfeile deuten auf Retikularkörper innerhalb des Endosoms, Elementarkörper sind etwas kleiner und elektronendichter, Balkenlänge: 1µm).

Abbildung aus: Byrne, G.I., Oullette, S.P., Wang, Z. et al. *Chlamydia pneumoniae* Expresses Genes Required for DNA Replication but not Cytokinesis during Persistent Infection of Hep-2-Cells. *Infection and Immunity* 69 (2001) 5423-5429 (S. 5426).

### 3.1.2 Epidemiologie

*C. pneumoniae* ist nur für den Menschen pathogen und wird durch Tröpfchen- und Kontaktinfektion übertragen. In serologischen Studien (Mikroimmunfluoreszenztest) konnte gezeigt werden, dass etwa 60% aller Erwachsenen Antikörper gegen *C. pneumoniae* aufweisen. Während in den ersten Lebensjahren die Antikörperprävalenz gering ist, kommt es zwischen dem 8. und 15. Lebensjahr zu einem raschen Anstieg der Antikörperprävalenz auf 40-50%. Dies entspricht auch dem Altersgipfel der durch Chlamydien verursachten apparent oder inapparent verlaufenden respiratorischen Infekte und atypischen Pneumonien. Mit zunehmendem Lebensalter nimmt die Antikörperprävalenz weiter zu und erreicht bis zu 75%. Bei erwachsenen Männern liegt sie aus bisher unbekanntem Gründen 5-10% höher als bei Frauen (Hyman et al., 1991, S. 2082).

Innerhalb von etwa 3 bis 5 Jahren nach Erstinfektion kommt es zum Titerabfall. Viele Patienten weisen aber auch chronische Verläufe auf. Während bei der Erstinfektion vor allem erhöhte IgM-Antikörpertiter beobachtet werden, finden sich bei älteren Patienten, als Zeichen der Reinfektion oder Reaktivierung, meist nur Anstiege der IgG-Antikörpertiter (Kleemola et al., 1988, S. 234).

### 3.1.3 *C. pneumoniae*-Infektion und Pathogenese der Atherosklerose

Die Korrelation zwischen einer abgelaufenen *C. pneumoniae*-Infektion und der Atheroskleroseentstehung ist durch zahlreiche Studien hinreichend gesichert. Erste Hinweise lieferten seroepidemiologische Studien, die zeigten, dass eine gute Korrelation von koronarer Herzerkrankung und anderen atherosklerotischen Manifestationen mit Antikörpern gegen *C. pneumoniae* besteht. In den folgenden Jahren gelang der Nachweis von *C. pneumoniae* in einem hohen Prozentsatz atherosklerotischer Plaques und die Isolierung und Anzucht des Erregers aus atherosklerotischem Plaquematerial. Im Tiermodell konnte bei Kaninchen und Mäusen durch nasale Inokulation des Erregers die Atherogenese beschleunigt werden. Ferner liegen erste, allerdings noch heterogene Ergebnisse von Interventionsstudien mit Makrolidantibiotika vor.

#### 3.1.3.1 Seroepidemiologische Studien

Eine signifikante Korrelation von koronarer Herzkrankheit (KHK) und dem Auftreten von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* wurde 1988 erstmals von Saikku et al. für ein finnisches Patientenkollektiv beschrieben (Saikku et al., 1988, S. 984). Hier fanden sich bei 68% der Patienten nach Myokardinfarkt und bei 50% der Patienten mit KHK Antikörpertiter gegen *C. pneumoniae*. Kontrollpersonen hatten nur zu 17% positive Antikörpertiter. Die Assoziation zwischen Chlamydienantikörpern und KHK konnte in Studien verschiedener Arbeitsgruppen für Industrieländer weltweit bestätigt werden.

Autor	Pat./ Kontr.	Kriterien	Relatives Risiko für koronare Herzerkrankung (± 95% Konfidenzintervall)
Saikku et al. (1988)	70/41	MI, AP	5.5 (2.1- 14.7)
Thom et al. (1991)	461/95	CA	2 (1- 4)
Thom et al. (1992)	171/120	CA	2.6 (1.4- 4.8)
Dahlen et al. (1995)	60/60	CA	3.56 (1- 16.1)
Mendall et al. (1995)	100/64	CA	7.4 (1.7- 33.1)
Blasi et al. (1997)	61/61	MI	3.2 (1.5- 6.8)
Thomas et al. (1997)	83/93	MI, AP	5.4 (2.7- 10.5)
Cook et al. (1998)	176/1518	Schlaganfall	4.4 (3- 6.5)

**Tabelle 1:** Assoziation von *C. pn.*-Antikörpern und der Atherosklerose (MI: Myokardinfarkt, AP: Angina pectoris, CA: Koronarangiographie).

modifiziert nach: Y.K. Wong, P.J. Gallagher, M.E. Ward; Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Heart* 81 (1999) 232-238 (S. 233) und Kähler, J., Köster, R., Bräser, J.-H. et al. Bedeutung von Chlamydia pneumoniae in der Pathogenese der Atherosklerose. *Z Kardiol.* 88 (1999) 885-895 (S. 888).

Die an einer Gesamtzahl von etwa 2000 Patienten durchgeführten Studien belegen, dass das relative Risiko für koronarvaskuläre Ereignisse bei Patienten mit erhöhten Antikörpertitern mindestens zweifach erhöht ist (Kähler et al., 1999, S. 887).

In einer weiteren von Hayashida et al. durchgeführten Studie konnte ferner gezeigt werden, dass *C. pneumoniae*-Seropositivität mit erhöhten Restenoseraten nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) einhergeht (Hayashida et al., 2002, S. 140). Die Restenose wurde als eine mindestens 50%ige Stenose mit einem mindestens 15%igen Zuwachs definiert und sechs Monate nach erfolgter Angioplastie durch eine weitere Herzkatheteruntersuchung ermittelt. Hierbei wurde festgestellt, dass es bei 36 von 62 seropositiven Patienten zur Restenose gekommen war, aber nur bei 4 von 16 seronegativen Patienten (58 % vs. 25 %, P = 0.025).

### 3.1.3.2 *C. pneumoniae* in atherosklerotischen Läsionen

Der direkte Nachweis von Chlamydien in atherosklerotischen Gefäßläsionen gibt weitere Hinweise auf eine mögliche Kausalität zwischen *C. pneumoniae*-Infektion und der Atheroskleroseentstehung. Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten den Erreger in atherosklerotischem Material koronarer und peripherer Gefäße mittels Elektronenmikroskopie, Immunzytochemie, Immunfluoreszenz und PCR nachweisen.

Maass et al. gelang es erstmals, *C. pneumoniae* aus Atheromen der Koronarien zu einem hohen Prozentsatz zu isolieren und *ex vivo* anzuzüchten. Es konnten, trotz der technischen Schwierigkeiten bei der Isolierung und Anzucht obligat intrazellulärer Bakterien, bei 11 von 70 Patienten vitale Chlamydien aus Atheromen angezüchtet werden. Die Isolierung vitaler Chlamydien aus Atheromen unterstützt die Vorstellung, dass in der Plaque befindliche *C. pneumoniae* das Fortschreiten der Atherosklerose fördern können (Maass et al., 1998, S. 25).

Autor	Material	Probenzahl Pat./Kontr. (n)	Nachweisrate Pat./Kontr. (%)	Nachweismethode
Kuo et al. (1995)	Koronararterie	18/ 31	PCR: 17 %/ 0 % IZC: 39 %/ 0 %	PCR, IZC
Muhlestein et al. (1996)	Koronararterie	90/ 24	79 %/ 4.2 %	Immunfluoreszenz
Kuo et al. (1997)	A. femoralis/ A. poplitea	23/ 8	48 %/ 0 %	PCR
Maass et al. (1998)	Koronararterie	70/ 17	PCR: 30 %/ 0 % Kultur: 16 %/ n.d.	PCR, Kultur
Petersen et al. (1998)	abd. Aortenaneurysma	40/ 40	35 %/ 5 %	PCR
Wong et al. (1998)	Koronararterie	58/ 58	39 %/ 12 %	PCR
Kuo et al. (1993)	Koronararterie	36/ -	PCR: 43 % IZC: 42 % EM: 29 % (6/ 21)	PCR, IZC, EM
Campbell et al. (1995)	Koronararterie	37/ -	PCR: 32 % IZC: 45 % EM: 100 % (2/ 2)	PCR, IZC, EM
Blasi et al. (1996)	abd. Aortenaneurysma	51/ -	51 %	PCR
Saldeen et al. (1998)	Koronararterie	60/ -	62 %	IZC
Ouchi et al. (2000)	Endoarthrektomie: Koronararterie	29/ -	PCR: 55 % IZC: 46 %	PCR, IZC
	A. iliaca	10/ -	PCR: 30 % IZC: 40 %	
	obstr. Koronarart. (Autopsie)	8/ -	PCR: n.d. IZC: 75 %	
	Koronararterie (Endarthrektomie)	20/ -	PCR: n.d. IZC: 55 %	

**Tabelle 2:** Identifizierung von *C. pneumoniae* in atherosklerotischem Material (PCR: *polymerase chain reaction*, IZC: Immunzytochemie, EM: Elektronenmikroskopie, n.d.: nicht durchgeführt).

modifiziert nach: Wong, Y.K., Gallagher, P.J., Ward, M.E. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Heart* 81 (1999) 232-238 (S. 235).

Die Nachweisrate von *C. pneumoniae* durch Immunzytochemie und/oder PCR liegt mit Ausnahme weniger Studien, bei denen kein Nachweis gelang, im Bereich von 15 % bis 100 % (Wong et al., 1999, S. 235). Mögliche Ursachen für die hohe Streubreite sind die



unregelmäßige, lokalisierte Verteilung der Chlamydien im Atherom, sowie geographische (bezüglich der Herkunft des Patientenkollektivs) und methodische Unterschiede. Auffällig ist auch, dass die Nachweisraten der PCR in mehreren Studien niedriger sind als die der Immunzytochemie. Dies könnte durch die Probleme bei der DNA-Extraktion, insbesondere aus kalzifizierten Atheromen, und durch das Auftreten von PCR-Inhibitoren in den Läsionen erklärt werden (Kuo& Campbell, 2000, S. 434).

Fortgeschrittene Läsionen weisen im allgemeinen häufiger *C. pneumoniae* auf, als frühe oder weniger ausgeprägte Läsionen (Metha et al., 1998, S. 1220; Kuo& Campbell, 2000, S. 435).

Autor	Läsion	Status	positiver Nachweis/ Gesamtzahl der Proben
Kuo et al. (1995)/ Davidson et al. (1998)	Plaques	frühes Stadium fortgeschritten	16/ 50 (32 %) 102/ 184 (55 %)
Ong et al. (1996)	Läsion	minimal mittel bis ausgeprägt	5/ 16 (31 %) 13/ 23 (56 %)
Chiu et al. (1997)	Gefäßverschuß	nein ja	17/ 30 (57 %) 37/ 48 (80 %)
Bauriedel et al. (1999)	KHK	stabile AP instabile AP, MI	6/ 20 (30 %) 26/ 31 (84 %)

**Tabelle 3:** Nachweis von *C. pneumoniae* in Abhängigkeit von der Schwere der atherosklerotischen Läsion (KHK: koronare Herzerkrankung, AP: Angina pectoris, MI: Myokardinfarkt).

modifiziert nach: Kuo, C.C., Campbell, L.A. Detection of Chlamydia pneumoniae in Arterial Tissues. *J. Inf. Dis.* 181 (2000) 432-436 (S. 435).

Histopatologisch konnte *C. pneumoniae* in allen Zellen der atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden, insbesondere jedoch in Monozyten und Makrophagen.

### 3.1.3.3 *C. pneumoniae* in peripheren Monozyten - Hinweise auf eine Verbreitung des Erregers durch die Zellen des monozytären Phagozytensystems

Es wird angenommen, dass Monozyten für die Verbreitung von *C. pneumoniae* im menschlichen Organismus verantwortlich sind. Am respiratorischen Epithel treten Alveolarmakrophagen und in Kapillaren zirkulierende Monozyten mit dem Erreger in Kontakt und phagozytieren ihn. Die so infizierten Monozyten/Makrophagen verteilen sich mit dem Blutstrom. Durch die Beteiligung der Monozyten/Makrophagen am atherosklerotischen Entzündungsprozess gelangen so *C. pneumoniae* in die entstehende atherosklerotische Plaques. *C. pneumoniae*-DNA lässt sich regelmäßig bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen in zirkulierenden Monozyten des peripheren Blutes nachweisen (Blasi et al., 1999, S. 2074; Boman & Gaydos, 2000, S. 453; Boman et al., 1998, S. 275; Wong et al., 1999, S. 235; Maass

et al., 2000/1, S. 69). Hinweise darauf, dass sich Elementarkörperchen auch frei mit dem Blutstrom bewegen und verteilen könnten, bestehen hingegen nicht (Airenne et al., 1999, S. 1445). Es liegt bei PCR-positiven Patienten keine Infektion im Sinne einer systemischen Bakteriämie vor, vielmehr ist anzunehmen, dass eine Verteilung von *C. pneumoniae* mit dem Blut nur streng zellassoziiert erfolgt (Maass et al., 2000/2, S. 450).

Auch im Tierexperiment finden sich Hinweise auf diesen Verbreitungsmechanismus. So konnte an Mäusen gezeigt werden, dass Chlamydien nach nasaler oder intraperitonealer Applikation in Alveolarmakrophagen bzw. Peritonealmakrophagen und in Monozyten des peripheren Blutes nachweisbar waren (Moazed et al., 1996, S. 887; Moazed et al., 1997, S. 1322). Eine tierexperimentelle Studie unserer Arbeitsgruppe konnte schließlich *in vivo* nachweisen, dass *C. pneumoniae*-infizierte Monozyten eine gesteigerte Bindungsfähigkeit an das Gefäßendothel aufweisen. Im Bereich der A. carotis, einer Prädilektionsstelle für die Entstehung atherosklerotischer Plaques, zeigten *C. pneumoniae*-infizierte Monozyten unter physiologischen Strömungsbedingungen sowohl eine Zunahme des „rolling“, als auch eine verstärkte Adhäsionsfähigkeit an das Gefäßendothel (May et al., 2003, S. 791).

Vink et al. konnten zeigen, dass innerhalb des arteriellen Gefäßsystems *C. pneumoniae* am häufigsten in den großen abdominellen Gefäßen und in den Koronarien nachweisbar sind. Die Ergebnisse dieser postmortem-Studie an 24 Personen und 33 untersuchten Gefäßabschnitten korrelieren gut mit den Hauptmanifestationsorten der Atherosklerose (Vink et al., 2001, S. 1614).

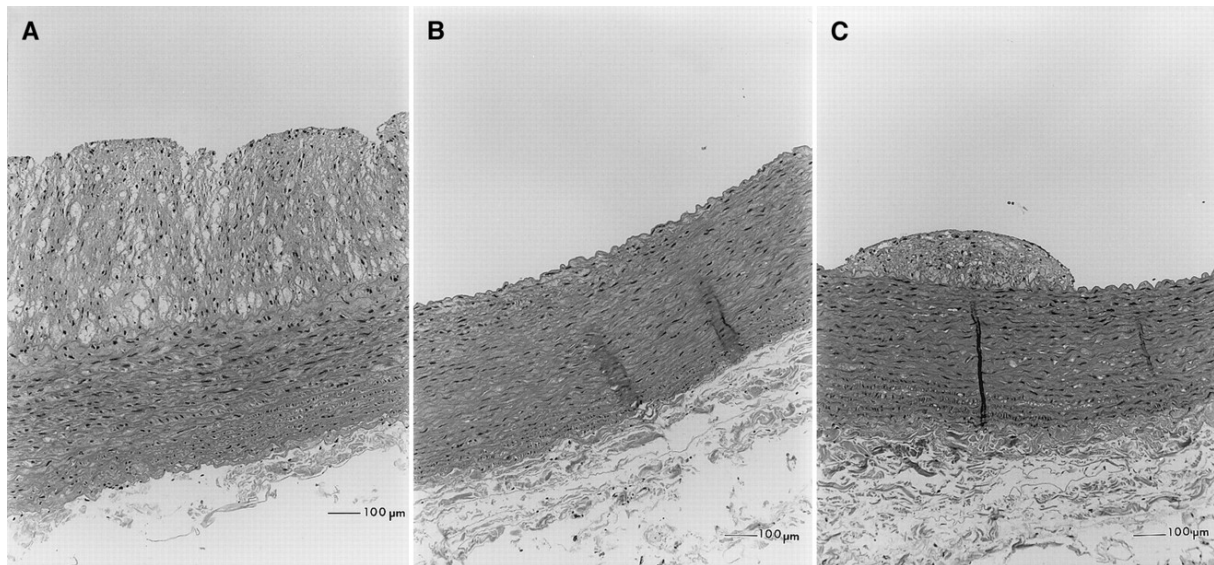
### 3.1.3.4 Tierexperimentelle Studien

Zur Überprüfung der zu vermutenden Kausalität zwischen chronischer *C. pneumoniae*-Infektion und der Atheroskleroseentstehung wurden Tiermodelle etabliert. So gelang es an Mäusen und Kaninchen, durch nasale Inokulation von *C. pneumoniae* atherosklerotische Gefäßprozesse zu beschleunigen (Fong et al., 2000, S. 514).

Campbell et al. verwendeten einen Mäusestamm (C57BL/6J), der nur eine Atherosklerose entwickelt, wenn gleichzeitig eine fett- und cholesterinreiche Diät verabreicht wird, sowie Apolipoprotein E-defiziente (ApoE -/-) Knockoutmäuse, die spontan und in zeitlicher Abfolge Hypercholesterinämien und atherosklerotische Läsionen entwickeln. An den ApoE -/- Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung einer atherosklerotischen Läsion unter *C. pneumoniae*-Infektion rascher erfolgt. Nach dreimaliger Inokulation des Erregers war die Läsionsgröße bei der Auswertung nach 6 Wochen um 140%, nach 10 Wochen um 64% größer

als bei nicht-infizierten ApoE  $-/-$  Mäusen. An den C57BL/6J- Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich nach mehrmaliger nasaler Inokulation und bei normaler, nicht cholesterinangereicherter Nahrung (also auch unabhängig von einer bestehenden Hyperlipidämie), eine protrahierte Atherosklerose der Aorta auslösen lässt. Ein vergleichbarer Effekt trat unter einer Infektion mit *C. trachomatis* nicht auf (Campbell et al., 2000, S. 509).

Muhlestein et al. randomisierten wiederholt intranasal mit *C. pneumoniae* infizierte Kaninchen und Tiere einer Kontrollgruppe, und führten mit den ausgewählten Tieren eine 7- wöchige Azithromycinbehandlung durch. In der ersten Woche wurden täglich 30 mg/kg Azithromycin i.m. verabreicht. In den verbleibenden 6 Wochen erhielten die Tiere wöchentlich je 2 Azithromycininjektionen (30 mg/kg). Die mikroskopische Auswertung nach drei Monaten ergab, dass die maximale Intimadicke der Aorta infizierter Kaninchen im Vergleich zu nicht-infizierten und infizierten, aber antibiotisch behandelten Kaninchen deutlich höher war. Qualitativ wiesen alle Läsionen charakteristische Merkmale atherosklerotischer Plaques mit Schaumzellbildung, Beteiligung glatter Muskelzellen und Bildung extrazellulärer Matrix auf (Muhlestein et al., 1998, S. 634).



**Abbildung 3:** Beschleunigung der Atherosklerose durch *C. pneumoniae* im Kaninchenmodell/ Auswirkungen einer Antibiotikatherapie mit Azithromycin. In den Abbildungen A-C sind repräsentative Aortenquerschnitte (HE-Färbung) dreier Versuchstiere dargestellt: Tier aus der *C. pn.*-infizierten, nicht (antibiotisch) behandelten Gruppe (A); Tier aus der Kontrollgruppe (nicht-infiziert, nicht behandelt) (B); Tier aus der *C. pn.*-infizierten, antibiotisch behandelten Gruppe (C).

Abbildung aus: Muhlestein, J.B., Anderson, J.L., Hammond E.H. et al. Infection With *Chlamydia pneumoniae* Accelerates the Development of Atherosclerosis and Treatment With Azithromycin Prevents It in a Rabbit Model. *Circulation* 97 (1998) 633-636 (S. 635).

In einer weiteren Studie an cholesterinarm ernährten Kaninchen, erreichten Fong et al. eine Beschleunigung der Atherosklerose durch einmalige Inokulation von *C. pneumoniae* bei 26,1%, und durch dreimalige Inokulation bei 34,8% der Versuchstiere (Fong et al., 1999, S. 892).

Eine von Hu et al. durchgeführte Studie an Mäusen hingegen zeigte, dass eine Infektion mit *C. pneumoniae* nur bei gleichzeitiger, experimentell induzierter Hypercholesterinämie eine Zunahme atherosklerotischer Läsionen an der Aorta bewirkt (Hu et al., 1999, S. 750).

### 3.2 Die Matrix Metalloproteinasen (MMPs)

Die humanen MMPs bilden eine Gruppe von mindestens 20 zinkabhängigen Endopeptidasen, die zusammengenommen den Abbau aller Bestandteile der extrazellulären Matrix ermöglichen. Sie sind an vielen physiologischen Prozessen wie etwa der Entwicklung, dem Wachstum und der Erneuerung von Geweben beteiligt. Die MMPs können entsprechend ihrer Substratspezifität und Struktur in Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen und membranassoziierte MMPs unterteilt werden (Westermarck & Kähäri, 1999, S. 781).

Gruppe	Name	MMP	MW(kD)	Substrate
Kollagenasen	Kollagenase-1	1	55	Kollagentyp III, I, II, VII, VIII und X; Gelatin, Proteoglykane
	Kollagenase-2	8	75	Kollagentyp I, III, II, V; Proteoglykane
	Kollagenase-3	13	65	Kollagentyp I, II, III, XI, IV, X, IX; Gelatin, Laminin, Fibronectin
Gelatinasen	Gelatinase A	2	72	Kollagentyp I, IV, V, VII, und X; Gelatin, Laminin; ferner: proteolytische Aktivierung von MMP-9 und MMP-13
	Gelatinase B	9	92	Kollagentyp IV, V, VII, und X; Gelatin, Laminin
Stromelysine	Stromelysin 1	3	57	Kollagentyp III, IV, V, IX; Laminin, Fibronectin, Elastin, Gelatin, Proteoglykane; Progelatinase B, Prokollagenase
	Stromelysin 2	10	57	wie Stromelysin 1
	Matrilysin	7	28	Elastin, Gelatin, Fibronectin, Laminin; Kollagentyp IV, Prokollagenase, proteoglykanes Kernprotein
	Metalloelastase	12	57	Elastin
membran- assoziierte MMPs	MT1-MMP	14	66	Kollagentyp I, II, II; Gelatin, Laminin, Fibronectin; ferner: Zellmembranrezeptor für proMMP- 2/TIMP-2 –Komplex; Aktivierung von proMMP-2
	MT2-MMP	15		Kollagentyp I, II, II; Gelatin, Laminin, Fibronectin; ferner: Aktivierung von proMMP-2
	MT3-MMP	16		
	MT4-MMP	17		
Andere MMPs	Stromelysin-3	11	51	
		19	57	
	Enamelysin	20		

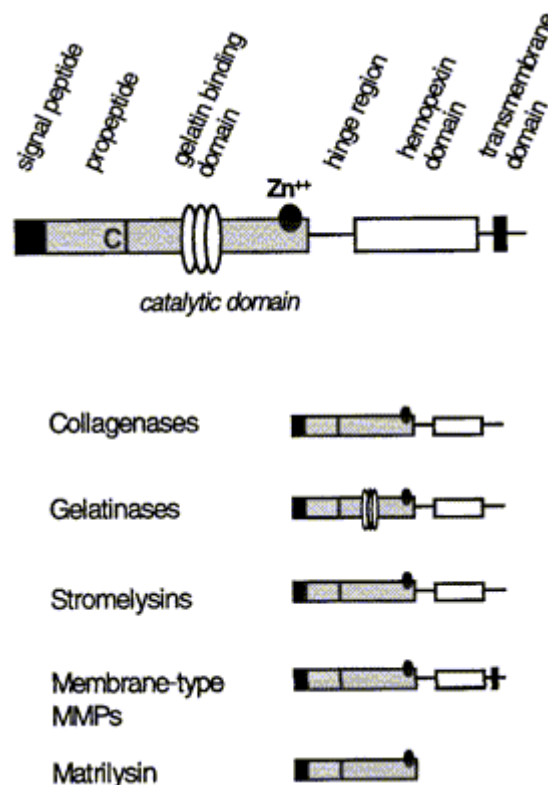
**Tabelle 4:** Einteilung und Substratspezifität der MMPs.

modifiziert nach: Dollery, C.M., McEwan, J.R., Henney, A.M. Matrix Metalloproteinases and Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 77 (1995) 863-868 (S. 834) und Westermarck, J., Kähäri, V. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB Journal* 13 (1999) 781-792 (S. 782).

### 3.2.1 Strukturmerkmale der MMPs

MMPs setzen sich aus mindestens drei Proteindomänen zusammen. Auf ein Signalpeptid am N-terminalen Ende folgt ein Propeptid, dessen Abtrennung die Protease aktiviert. Die katalytische Domäne enthält die Zink-Bindungsregion und ist für die proteolytische Aktivität des Enzyms verantwortlich.

Die Proteinstruktur der katalytischen Domäne ist abhängig vom jeweiligen Substrat. Gelatinasen (MMP-2, MMP-9) besitzen eine weitere Proteindomäne zur Bindung von Gelatin. Eine Hemopexin-Domäne ist an der Substratbindung und an der Interaktion mit MMP-spezifischen Gewebsinhibitoren, sogenannten Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs) beteiligt. Membrane-type MMPs (MT-MMPs) besitzen zusätzlich am C-terminalen Ende eine Abfolge hydrophober Aminosäuren, die als Transmembran-Domäne fungiert (Sato et al., 1997, S. 497; Creemers et al., 2001, S. 203; Lijnen, 2002, S. 164).



**Abbildung 4:** Proteinstruktur der Matrix Metalloproteinasen. Die proteolytische Abtrennung der Propeptiddomäne bewirkt eine Konformationsänderung und Aktivierung der MMPs. Die Bindungsregion der katalytischen Domäne ist strukturell dem jeweiligen Substrat angepasst. Die Hämopexindomäne ist an der Substratbindung und an der Inaktivierung des Enzyms beteiligt.

Abbildung aus: Creemers, E., Cleutjens, J., Smits, J. et al. Matrix Metalloproteinase Inhibition After Myocardial Infarction – A New Approach to Prevent Heart Failure? *Circ. Res.* 89 (2001) 201-210 (S. 203).

### 3.2.2 Zelltyp-spezifische Verteilung der MMPs in Blut- und Gefäßwandzellen

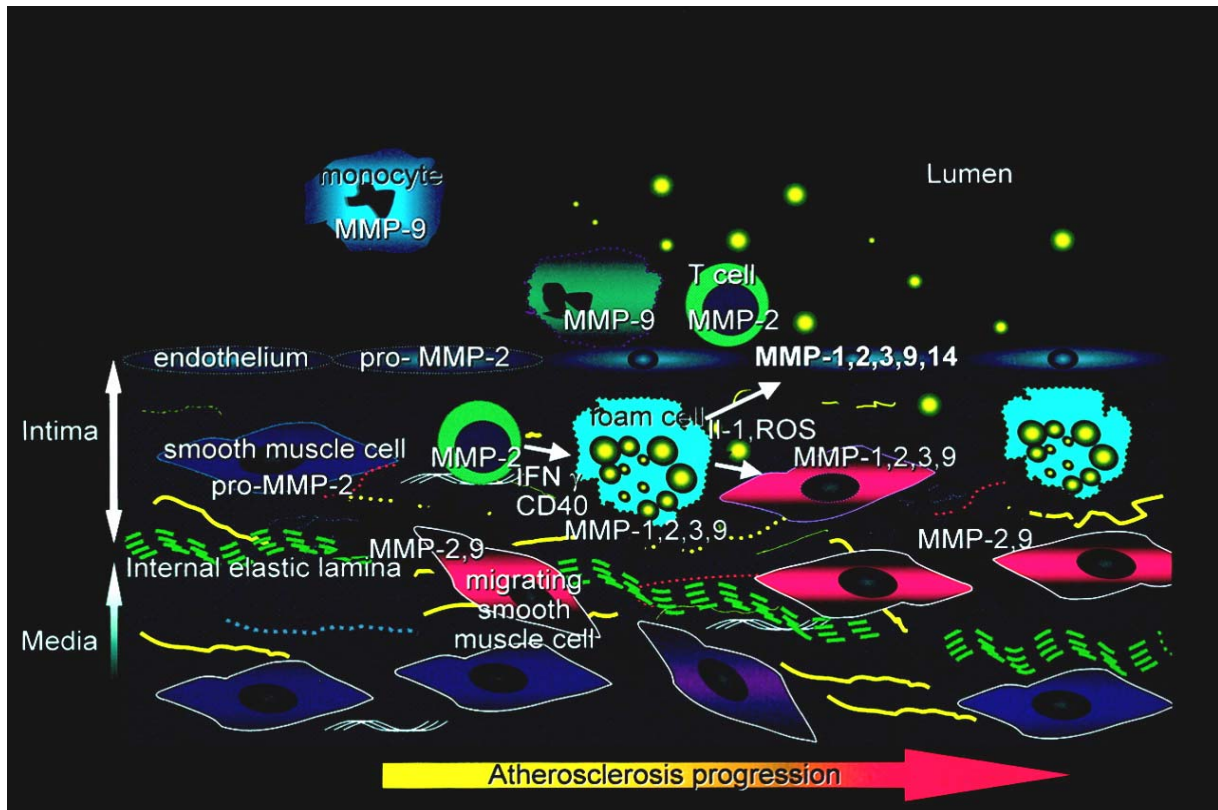
Alle an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligten Zellen (Monozyten/Makrophagen, Schaumzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten) besitzen durch den Einsatz von MMPs die Fähigkeit, extrazelluläre Matrix in ihrer Umgebung abzubauen oder gezielt zu verändern.

Die für die einzelnen Zelltypen charakteristische Verteilung der MMPs ist für ihre Rolle während der Atherogenese von Bedeutung.

Zelltyp	MMP
Makrophagen	MMP 1 (Kollagenase-1) MMP 2 (Gelatinase A) MMP 3 (Stromelysin-1) MMP 7 (Matrilysin) MMP 9 (Gelatinase B) MMP 12 (Metalloelastase) MMP 13 (Kollagenase-3) MMP 14 (MT1-MMP)
glatte Muskelzellen	MMP 1 (Kollagenase-1) MMP 2 (Gelatinase A) MMP 3 (Stromelysin-1) MMP 9 (Gelatinase B) MMP 14 (MT1MMP)
Fibroblasten der Adventitia	MMP 2 (Gelatinase A) MMP 3 (Stromelysin 1) MMP 10 (Stromelysin 2)
Extrazellulärraum	MMP 1 (Kollagenase-1) MMP 14 (MT1-MMP)

**Tabelle 5: Zelltyp-spezifische Expression der MMPs.**

modifiziert nach: Lijnen, H.R., Lupu, F., Moons, L. et al. Temporal and Topographic Matrix Metalloproteinase Expression after Vascular Injury in Mice. *Thromb Haem.* 81 (1999) 799-807 (S. 802-804) und Westermarck, J., Kähäri, V. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB Journal* 13 (1999) 781-792 (S. 783).



**Abbildung 5:** An der Atherogenese beteiligte Zelltypen und Matrix Metalloproteinasen. Innerhalb atherosklerotischer Läsionen ist die Produktion und Sekretion von MMPs durch ortsständige und eingewanderte Zellen erhöht. Das erweiterte Spektrum und die erhöhten Konzentrationen aktivierter MMPs beruhen auf der Anwesenheit von Entzündungszellen (insbesondere Makrophagen/Schaumzellen), der Stimulation durch Entzündungsfaktoren und auf Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen. Es wird angenommen, dass die MMP-vermittelte Matrixdegeneration für Zellmigrationsvorgänge und die generelle Reorganisation der Gefäßwand verantwortlich ist. Durch die Degeneration der fibrösen Schutzkappe tragen MMPs möglicherweise zur Destabilisierung und Ruptur der atherosklerotischen Plaque bei. Abbildung aus: Galis, Z.S., Khatri, J.J. Matrix Metalloproteinasen in Vascular Remodeling and Atherogenesis-The Good, the Bad, and the Ugly. *Circ. Res.* 90 (2002) 251-262 (S. 255).

### 3.2.3 MMPs und Plaqueprogression

MMPs ermöglichen den Monozyten die gerichtete Migration in die Gefäßintima. Chemotaktische Faktoren wie z.B. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) geben die Migrationsrichtung vor. Durch Abgabe von MMPs am intimawärts gerichteten Zellpol kann sich der Monozyt durch die dichte extrazelluläre Matrix bewegen (Matias-Roman et al., 2005, S. 3957).

In der Gefäßintima setzen zytokin-vermittelte Proliferationsprozesse ein. Der für die Zellproliferation der Monozyten notwendige Raum wird ebenfalls durch proteolytisch vermittelten Matrixabbau geschaffen (Lusis, 2000, S. 236).



Glatte Muskelzellen müssen während ihrer Migration in die Subintima die kollagenreiche *Lamina elastica interna* überwinden. Auch dies geschieht durch den spezifischen proteolytischen Einsatz von Proteasen. Die Proliferation glatter Muskelzellen wird ebenfalls durch MMPs ermöglicht (Glass& Witztum, 2001, S. 508).

### 3.2.4 MMPs und Plaqueruptur

Pathologische Studien zeigen, dass für die Entstehung einer akuten koronaren Thrombose die qualitative Zusammensetzung der Plaque von weit höherer Bedeutung ist als die quantitative Ausdehnung der Stenose.

Ein hoher Anteil an glatten Muskelzellen scheint sich dabei positiv auf die Plaquestabilität auszuwirken. Aus tieferen Wandschichten eingewanderte glatte Muskelzellen proliferieren im subendothelialen Raum, und sind durch die Abgabe stabilisierender Matrixkomponenten am Aufbau und Erhalt der fibrösen Kappe beteiligt (Libby, 2001, S.365).

Vulnerable Plaques sind durch eine dünne fibröse Kappe, und erhöhte Anteile inflammatorischer Zellen gekennzeichnet. Es wird vermutet, dass Makrophagen bzw. Schaumzellen durch Abgabe ihrer Kollagenasen, Gelatinasen und Stromelysine für die Matrixdegeneration und die Schwächung der Plaque hauptverantwortlich sind (Libby, 2001, S. 365). Deutlich wird dies auch daran, dass die Ruptur der Plaque häufig an den Schulterbereichen der fibrösen Kappe erfolgt, an der die Anzahl der Schaumzellen besonders hoch ist (Lusis, 2000, S. 238).

### 3.2.5 Regulation der MMP-Aktivität

Um den kontrollierten Abbau der extrazellulären Matrix zu gewährleisten, sind Mechanismen zur Regulation der Aktivität einzelner MMPs notwendig. Die MMP-Aktivität wird hauptsächlich auf drei Ebenen reguliert: Eine Zunahme der Aktivität einzelner MMPs wird durch vermehrte *de novo* Synthese und durch Aktivierung von pro-MMPs erreicht. Gewebsinhibitoren, sogenannte Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs) bewirken eine spezifische Hemmung aktivierter MMPs.

### 3.2.5.1 Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)

Die *de novo* Synthese von Matrix Metalloproteinasen kann auf Transkriptionsebene durch den Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN; CD147) stimuliert werden. Das 58kDa große Glykoprotein gehört der Immunoglobulin-Familie an und wurde zuerst an der Zelloberfläche von Tumorzellen nachgewiesen. EMMPRIN kann Bindegewebszellen in der Nachbarschaft von Tumorzellen zur Produktion verschiedener MMPs (u.a. pro-MMP-2 und MT1-MMP) anregen (Biswas et al., 1995, S. 436; Lim et al., 1998, S. 88). Es wird vermutet, dass die lokal erhöhte Konzentration der MMPs einen möglichen Mechanismus zur Ausbreitung von Tumorzellen darstellt (Basbaum& Werb, 1996, S. 734; Werb, 1997, S. 439). Major et al. konnten zeigen, dass EMMPRIN auch an der Oberfläche ausdifferenzierter Makrophagen exprimiert wird und in Makrophagen-reichen atherosklerotischen Läsionen beim Menschen vorliegt (Major et al., 2002, S. 1202).

### 3.2.5.2 Membrane-type MMPs (MT-MMPs)

Es sind derzeit fünf membranständige Matrix Metalloproteinasen (MT-MMPs) bekannt. Sie sind durch eine hydrophobe Proteindomäne am C-terminalen Ende mit der Zellmembran verbunden. MT1- MMP (MMP-14) aktiviert pro-MMP-2 (Progelatinase A) und pro-MMP-13 (Prokollagenase-3) und ist darüber hinaus selbst in der Lage, Kollagen, Fibronectin, Laminin, Vitronectin und Proteoglykane abzubauen (Ouchi et al., 1997, S. 2446). Für MT2-MMP, MT3-MMP und MT5-MMP ist die Fähigkeit beschrieben, pro-MMP2 zu aktivieren (Pei, 1999, S. 8925).

Sato et al. konnten für die ersten drei membranständigen MMPs mittels Gelatin-Zymographie zeigen, dass die MT-MMPs Progelatinase A (68 kDa) über eine 64kDa Intermediärform zu aktivem MMP2 (62kDa) umbauen können (Sato et al., 1997, S. 498). In einem anderen Experiment mit Jod-125-markiertem pro-MMP-2 konnte gezeigt werden, dass MT-MMPs pro-MMPs nicht nur aktivieren, sondern auch an der Zelloberfläche binden können (Sato et al., 1996, S. 239).

### 3.2.5.3 Plasminogen-/Plasminsystem

Das fibrinolytische System besitzt ein inaktives Proenzym (Plasminogen), das durch den Gewebe-Typ (t-PA) bzw. Urokinase-Typ (u-PA) Plasminogenaktivator in das aktive Enzym

Plasmin umgewandelt wird. Während die t-PA-vermittelte Plasminogenaktivierung hauptsächlich bei der Auflösung von Fibrin in der Blutbahn von Bedeutung ist, bindet u-PA an einen spezifischen zellulären Rezeptor (u-PAR), der an der Zelloberfläche von Leukozyten, glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, sowie verschiedenen invasiven Zelltypen wie etwa Fibroblasten oder Trophoblasten vorkommt (Collen & Lijnen, 1991, S. 3114; May et al., 1998, S. 205). Die Hauptaufgaben u-PAs scheinen dabei in der Proteolyse umgebender Matrix sowie in der Aktivierung von pro-MMPs und Wachstumsfaktoren zu liegen (Birkedal-Hansen, 1995, S. 731; Behrendt, 2004, S. 103).

Die direkte, u-PA-vermittelte Aktivierung von pro-MMPs ist für pro-MMP1, pro-MMP3, pro-MMP9, pro-MMP10 und pro-MMP13 beschrieben (Nagase, 1997, S. 155). Bei einem Aktivierungsweg für pro-MMP2 ist Plasmin ebenfalls beteiligt (Lijnen et al., 1998, S. 1039).

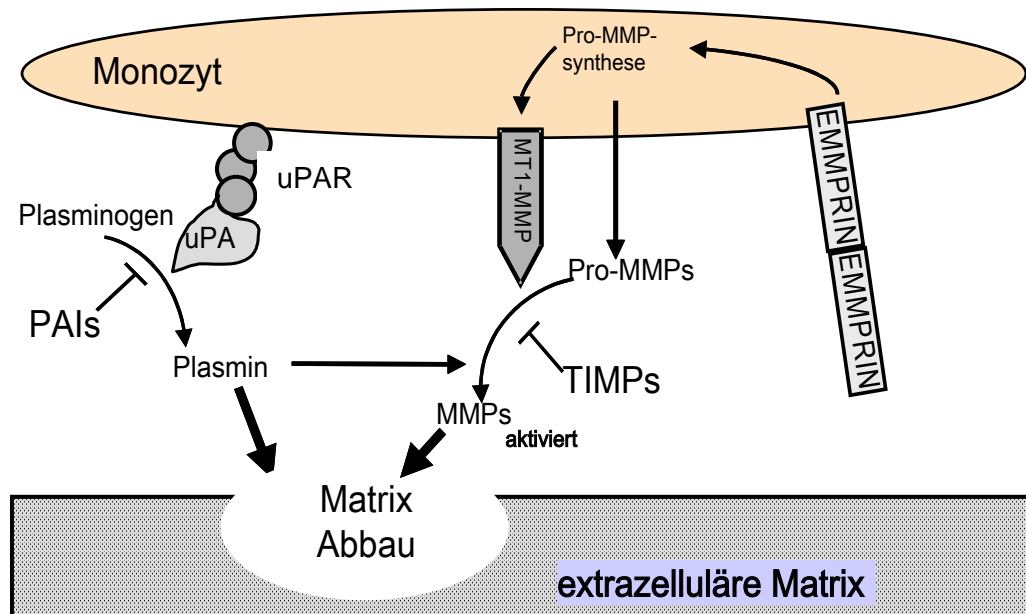
Das fibrinolytische System kann auf der Ebene der Plasminogenaktivierung durch sog. PAIs (Plasminogen Activator Inhibitor) inhibiert werden (Lijnen & Collen, 1995, S. 277; May et al., 1998, S. 207-208).

### 3.2.5.4 Endogene MMP-Inhibitoren

Aktiviert Matrix Metalloproteinasen können durch Interaktion mit spezifischen Gewebsinhibitoren (TIMPs: Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen) gehemmt werden. Derzeit sind vier strukturverwandte Gewebsinhibitoren bekannt: TIMP-1, -2, -3 und -4. TIMPs inhibieren aktivierte MMPs durch nicht-kovalente Interaktion mit der Zinkbindungsstelle der katalytischen Domäne des Enzyms (Brew et al., 2000, S. 270). TIMP-1 wird von Bindegewebszellen und von Makrophagen gebildet und ist ein potenter Inhibitor der meisten MMPs, außer MMP-2 und MT1-MMP. TIMP-2 inhibiert zahlreiche MMPs, mit Ausnahme von MMP-9 (Creemers et al., 2001, S. 204).

In Tierversuchen konnte bestätigt werden, daß TIMPs der MMP-Aktivität entgegenwirken und die Plaquestabilität beeinflussen. Es konnte unter anderem gezeigt werden, daß eine Überexpression von TIMP-1 das Auftreten atherosklerotischer Läsionen bei ApoE-defizienten Mäusen reduziert (Rouis et al., 1999, S. 536). Bei kombinierter ApoE- und TIMP-1-Defizienz kommt es zur beschleunigten Bildung von atherosklerotischen Gefäßaneurysmen. Neben der erhöhten MMP-Aktivität fiel in dieser Studie auch auf, daß in den Läsionen kombiniert ApoE/TIMP-1 defizienter Mäuse Makrophagen und Schaumzellen besonders zahlreich vorhanden sind. Möglicherweise behindert TIMP-1 die Migration der

Monozyten/Makrophagen in die Gefäßwand (Silence et al., 2002, S. 901; Lijnen, 2002, S. 165). Diese Vermutung konnte für die Migration glatter Muskelzellen bei Mäusen bereits bestätigt werden (Lijnen et al., 1999, S. 1187). An Ratten konnte ebenfalls gezeigt werden, daß TIMP-1 eine verminderte Aortenaneurysma-Bildung und -Ruptur bewirken kann (Allaire et al., 1998, S. 1413).



**Abbildung 6:** Aktivierungskaskade der zellassozierten Matrixdegeneration (Modell). EMMPRIN induziert die *de novo* Synthese von pro-MMPs. Die Aktivierung kann über die Membranständige MT-1MMP, andere bereits aktivierte MMPs, oder über das Plasminogen-/Plasminsystem erfolgen. Rezeptorgebundener uPA (Urokinase-Type Plasminogen Activator) induziert die Plasminbildung. Plasmin degradiert selbst Bestandteile der extrazellulären Matrix, überführt aber auch latente Matrix Metalloproteinasen in enzymatisch aktive Formen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Lösungen, Medien und Reagenzien

Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aprotinin	DAKO, Glostrup, Dänemark
Coomassie-blau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1% (v/v) Diehydropyrocyanin 12 Stunden bei 37°C inkubieren, autoklavieren
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DNA-Leiter	pUC19 DNA/ <i>Msp</i> I (M23), MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
FACS-Puffer/-Spüllösung	Beckton-Dickinson GmbH, Heidelberg
Fixierlösung für gefärbte Zellen (FACS)	0,5g Paraformaldehyd in 45ml PBS, bei 65°C lösen und pH auf 7,4 einstellen, steril filtrieren (0,2µm)
Formaldehyd 4%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ficoll-Lösung	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Galardin (GM6001)/Galardin-Kontrolle	Chemicon International Ltd., Hofheim
Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS)	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
IL-6 Rezeptorantagonist (rekombinant)	R&D Systems, Wiesbaden
Infektionsmedium	500ml MEM Alpha Medium 5ml NEAA (nicht-essentielle Aminosäuren) 5ml Natrium Pyruvat 100mM

	50µl Cycloheximid-Stammlösung (10mg/ml Ethanol abs.)
Kristallviolett	ICN Biomedicals Gmbh, Eschwege
Lipopolysaccharid ( <i>E. coli</i> -LPS)	Gibco Invitrogen Gmbh, Karlsruhe
Matrigel	Cell Invasion Assay Kit, Chemicon International Ltd., Hofheim
MCP-1 (rekombinant, human)	Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), R&D Systems, Wiesbaden
MEM Alpha Medium	Gibco Invitrogen Gmbh, Karlsruhe
B-Mercaptoethanol	Carl Roth Gmbh, Karlsruhe
Message Clean Kit	Gene Hunter Corporation, Brookline (MA), U.S.A.
Methanol	Carl Roth Gmbh, Karlsruhe
NEAA (nicht-essentielle Aminosäuren) 100x	Seromed Gmbh, Wien, Österreich
Omniscript Reverse Transkriptase Kit	Quiagen Gmbh, Köln
Paraformaldehyd 4%	Serva Electrophoresis Gmbh, Heidelberg
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Gibco Invitrogen Gmbh, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
QIAmp DNA Mini-Kit	Quiagen Gmbh, Köln
RNeasy Mini-Kit	Quiagen Gmbh, Köln
Saponin 0,5%	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
SDS Page Gelatin Zymography-Kit	Invitrogen Gmbh, Karlsruhe
SMC basal medium	Clonetics, Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Sodium Pyruvat 100mM	Seromed Gmbh, Wien, Österreich
Succrose-Lösung 50%	50g Succrose mit Aqua dest. ad 100ml, steril filtrieren (0,20µm)
Succrose-Phosphat-Glutamat-Lösung (SPG)	37,5g Succrose 0,26g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,61g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,36g Glutaminsäure; Aqua dest. ad 500ml
SYBR Green PCR Core Reagents Kit	Applied Biosystems, Foster City (CA), U.S.A.

## Material und Methoden

---

Taq PCR Core Kit	Quiagen Gmbh, Köln
TIMP-1/TIMP-2 (rekombinant, human)	Calbiochem, San Diego (CA), U.S.A.
Trypsin-Lösung 0,25%	Gibco Invitrogen Gmbh, Karlsruhe
Urografin-Lösung 30%	Schering AG, Berlin (als 76%ige Lösung); Verdünnung 20:31 mit 10mmol Tris/HCL 1mmol EDTA-Puffer (pH 7,3)
VLE-RPMI 1640	Gibco Invitrogen Gmbh, Karlsruhe
Zuchtmedium	500ml MEM Alpha Medium 5ml NEAA (nicht-essentielle Aminosäuren) 5ml Natrium Pyruvat 100mM 10ml hitzeinaktiviertes FCS
Zufällige Hexamere	Gibco Invitrogen Gmbh, Karlsruhe

### 4.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Begasungsbrutschrank	R5060 EK/CO <sub>2</sub> , Hereaus, Kendro Laboratory Products Gmbh, Hanau
Schokoladen-Agar	Institut für Mikrobiologie und Infektiologie, Klinikum rechts der Isar, München
Deckgläschen Ø 1cm, rund	Menzel Gmbh, Braunschweig, autoklaviert
Einweg-Pipetten (5ml, 10ml)	Sarstedt Ag&Co, Nümbrecht
FACS-Gerät	FACSCalibur, Beckton-Dickinson Gmbh, Heidelberg
Falcon-Zentrifugenröhrchen (50ml)	Sarstedt Ag&Co, Nümbrecht
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan, Carl Zeiss Gmbh, Jena
Gefäße 2ml, Typ Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg
Glasperlen Ø 1mm	Menzel Gmbh, Braunschweig, autoklaviert
Lochplatten (6-Loch, 12-Loch)	Greiner Bio-One Gmbh, Frickenhausen
Lichtmikroskop (invers)	Axiovert, Carl Zeiss Gmbh, Jena
Novex-Mini-Zellkammer	Invitrogen Gmbh, Karlsruhe
Objektträger	Menzel Gmbh, Braunschweig
PCR-Cycler	Mastercycler, Eppendorf AG, Hamburg

## Material und Methoden

---

PCR-Reaktionsgefäße 50µl	Eppendorf AG, Hamburg
Polycarbonateinsätze für Transmigrationsassays (Porengröße: 8µm)	Costar Gmbh, Bodenheim
Pipettierhilfen (1µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (steril)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße/-platten für die quantitative real-time PCR	MicroAmp, Applied Biosystems, Foster City (CA), U.S.A.
Real-time PCR-Cycler	Abi Prism 7700, Applied Biosystems, Foster City (CA), U.S.A.
Sterilfilter (0,20µm)	Amicon-Millipore, Schwalbach
Sterilbank	Herasafe, Heraeus, Kendro Laboratory Products Gmbh, Hanau
Tischzentrifuge	Multifuge 3SR (Ausschwenkrotor: TT750, Rechteckbecher mit Adaptern, Mikrottestplattenträger) Hereaus, Kendro Laboratory Products Gmbh, Hanau
Ultrazentrifugen	Sorwall RC26Plus (Rotor: SLA1500), Kendro Laboratory Products Gmbh, Hanau Beckman L-8M (Rotor: SW41), Beckman Coulter Gmbh, München
Vortex-Gerät	Vortex-Genie1, Scientific Industries, Bohemia (NY), U.S.A.
Zellkulturflaschen (250ml)	Greiner Bio-One Gmbh, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt Ag&Co, Nümbrecht
Zellkulturschalen (Ø 10cm, Ø 15cm)	Greiner Bio-One Gmbh, Frickenhausen
Zentrifuge für 2ml Gefäße	Biofuge fresco, Hereaus, Kendro Laboratory Products Gmbh, Hanau
Zentrifugenröhrchen (12ml)	Beckman Coulter Gmbh, München
Zentrifugenbecher (200ml)	Beckman Coulter Gmbh, München
Zitrat-Blutentnahmeröhrchen	Sarstedt Ag&Co, Nümbrecht



### 4.1.3 Zelllinien

<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Referenzstamm CM-1, VR-1360, American True Type Culture Collection (ATCC), Manassas (VA), U.S.A.
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Referenzstamm L2, VR-902B, American True Tissue Type Culture Collection (ATCC), Manassas (VA), U.S.A.
Hep2	CCL-23, American True Tissue Type Culture Collection (ATCC), Manassas, (VA), U.S.A.
MonoMac6	Human acute monocytic leukemia, DSM ACC 124, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
Humane, glatte Gefäßmuskelzellen (SMCs)	Clonetics, Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien

### 4.1.4 Antikörper

FITC-konj. mAk (Maus) gg. Chlamydien	ACI-FITC2 und ACI-FITC (enthält Evans-Blau zur Gegenfärbung), Progen, Heidelberg
RPE-konj. mAk (Maus) gg. humanes CD14	R0864, DAKO, Glostrup, Dänemark
mAk (Maus) gg. humanes MT1-MMP	IM39L, Oncogene, Boston (MA), U.S.A.
mAk (Maus) gg. humanes EMMPRIN	MAB1353, Chemicon, Temecula (CA), U.S.A.
RPE-konj. Fab2-Fragment vom (Kaninchen) anti-Maus-Immunglobulin	DAKO, Glostrup, Dänemark
blockierender mAk gg. humanes TNF- $\alpha$	Klon 28401, R&D Systems, Wiesbaden
blockierender mAk gg. humanes IL-6	Klon 6708, R&D Systems, Wiesbaden

### 4.2 Methoden

#### 4.2.1 Anzucht und Aufreinigung von Chlamydien

*C. pneumoniae* (Referenzstamm CM-1, VR-1360, American True Type Culture Collection, Manassas, U.S.A.) wie auch *C. trachomatis* (Referenzstamm L2, VR-902B, American True Type Culture Collection) wurden in der humanen Laryngxkarzinom-Zelllinie Hep2 vermehrt. In mehreren Zyklen konnte dabei die Chlamydienanzahl durch wiederholtes Infizieren einer expandierenden Hep2-Zellpopulation gesteigert werden.

##### 4.2.1.1 Anzucht von *C. pneumoniae*

Aufgrund der Eigenschaft der Chlamydien, sich nur intrazellulär zu vermehren, müssen vor der ersten Infektion sowie während der nachfolgenden Infektionszyklen Hep2-Zellen kultiviert und vorrätig gehalten werden. Die Zellen lassen sich im oben beschriebenen Zuchtmedium (12ml am Boden einer 250ml fassenden Zellkulturflasche) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt vermehren. Die Generationsdauer liegt bei ca. 12 Stunden. Ein durchgängiger Zellrasen (3 x 10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>) bildet sich innerhalb von 24 Stunden nach Einsatz von 250000 Zellen/ml Medium.

Die Dauer des Vermehrungszyklus von *C. pneumoniae* nach erfolgter Infektion beträgt 60-72 Stunden. Für die Anzucht von *C. pneumoniae* wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

Tag 1 (Vorbereiten eines Hep2-Zellrasens):

Nach dem Absaugen des Hep2-Zuchtmediums aus der Zellkulturflasche werden die Zellen durch Bedecken des Bodens mit 0,25%igem Trypsin (Einwirkzeit: 5min bei 37°C) abgelöst. Anschließend wird das Gemisch in 50ml Falcon-Röhrchen aufgenommen und mit frischem Medium (12ml) gewaschen. Durch Zentrifugieren bei 1200U/min (306xg) über 5min entsteht ein Zellpaket (Pellet). Nach dem Absaugen des Überstandes wird das Pellet in Zuchtmedium resuspendiert. Dabei kann zur weiteren Vermehrung der Zellen die 3 bis 4 fache Menge des ursprünglichen Zuchtmediums eingesetzt werden.

Das Hep2-Zellgemisch wird dann auf 6-Loch-Zellkulturplatten ausplattiert (ca. 400000 Zellen in 2ml Medium pro Loch). In eines der Löcher wird ein Deckgläschen eingelegt. Die Zellkulturplatten werden über weitere 24 Stunden bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert.

Tag 2 (Infektion):

Nach der Überprüfung des Zellrasens im Umkehrmikroskop (Kontamination, Durchgängigkeit des Zellrasens) wird das Zuchtmedium abgesaugt und die Hep2-Zellen mit 2ml Chlamydien suspension (2ml Infektionsmedium und Chlamydien (10µl)) pro Loch beimpft. Anschließend wird die Zellkulturplatte, zur Verbesserung der Infektion zentrifugiert (60min bei 3000U/min, 1601xg und 35°C). Dann folgt die Inkubation (72 Stunden) bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>.

Tag 5 ("Ernte" der Chlamydien):

Das Infektionsmedium wird abgesaugt und das Deckgläschen (s. Kontrolle des Infektionserfolges) entnommen und fixiert (Methanol/Aceton 1:1). Anschließend werden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und das Chlamydien-Zellgemisch in 50ml Falcon-Röhrchen aufgenommen. Durch die Zugabe von 7-9 Löffelchen Glasperlen und dreiminütigem Schütteln können auch Chlamydien aus verbliebenen intakten Hep2-Zellen gewonnen werden. Nach dem Abzentrifugieren der Hep2-Zellreste (5min, 1200U/min, 306xg, 37°C) wird der die Chlamydien enthaltende Überstand in ein weiteres Falcon-Röhrchen überführt. Zur Reinfektion wird der Überstand mit Infektionsmedium aufgefüllt. Je nach Stärke der Ausgangsinfektion können mit den Chlamydien einer Lochplatte 4-6 neue Hep2-Zellen tragende Lochplatten infiziert werden.

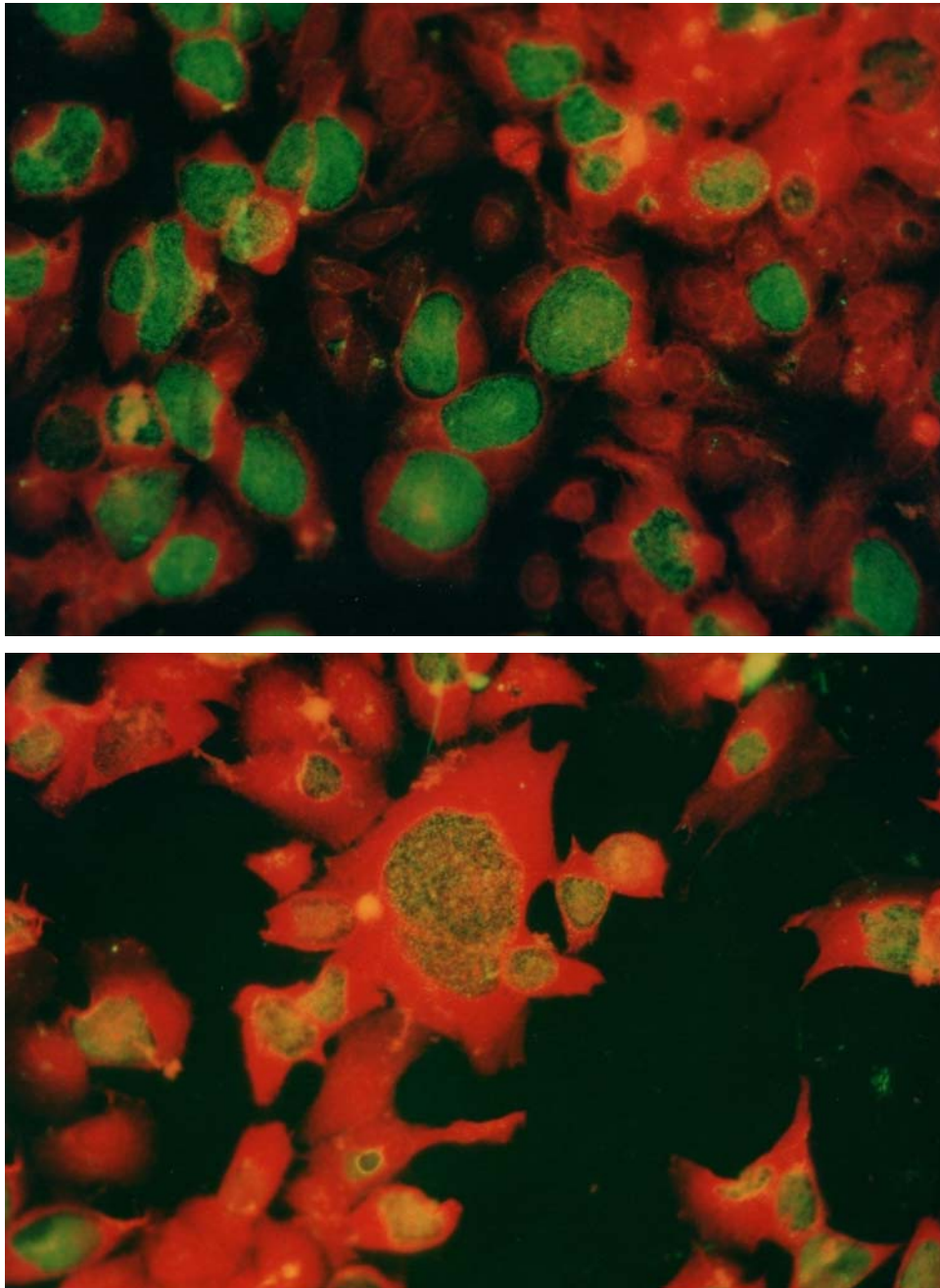
### *4.2.1.2 Kontrolle des Infektionserfolges*

Zur Kontrolle des Infektionserfolges wurde vor jedem Infektionszyklus in einem der Löcher einer 6-Loch-Zellkulturplatte ein Deckgläschen plaziert. An der Oberfläche des Deckgläschens bildet sich derselbe durchgängige Zellrasen wie auf dem Rest der Lochplatte. Zum direkten fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Infektion wurde das Deckgläschen mit einem FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper (MAK ACI, Progen, Heidelberg, Kat. Nr.: ACI-FITC) gefärbt.

Der Antikörper ist gegen ein genusspezifisches Epitop des Chlamydien-Lipopolysaccharid-Antigens gerichtet und identifiziert intrazelluläre Einschlüsse, extrazelluläre Organismen sowie freies zellassoziertes Chlamydia-Lipopolysaccharid-Antigen. Zur Gegenfärbung enthält die Pufferlösung Evans Blau.

Das Deckgläschen wird vorsichtig entnommen, in Methanol/Aceton (1:1) fixiert und auf einen Objektträger gegeben. Nach dem Trocknen werden 10µl des Antikörperfarbstoffes aufgetragen und das Präparat 30min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Anschließend wird überschüssiger Farbstoff mit destilliertem Wasser abgespült und das Präparat nach erneutem Trocknen im Fluoreszenzmikroskop (440nm) beurteilt.



**Abbildung 7:** Kultivierung von Chlamydien in Hep2-Zellen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen chlamydialer Einschlusskörper 48 Stunden nach Infektion von Hep2-Zellen mit *C. trachomatis*. Die Färbung erfolgte mit einem gegen Chlamydienbestandteile gerichteten FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper. Dargestellt sind Aufnahmen in 40-facher (oben) und 100-facher (unten) Vergrößerung in Öl-Immersion (Mikroskop: Axiovert, Carl Zeiss, Jena).

### 4.2.1.3 Anzucht von *C. trachomatis*

Die Anzucht von *C. trachomatis* gelingt ebenfalls in Hep2-Zellen unter Verwendung derselben Materialien. Unterschiede ergeben sich aus dem kürzeren Vermehrungszyklus von 48-60 Stunden, einer höheren und zuverlässigeren Infektionsrate und damit der Möglichkeit, *C. trachomatis* effizienter zu vermehren. Im Zytoplasma der Hep2-Zellen akkumulieren die Elementarkörperchen, bis sie etwa zwei Drittel des Zellvolumens ausfüllen. Im Fall von *C. trachomatis* gelingt die Beurteilung der Infektion häufig bereits im Umkehrmikroskop, obgleich wie oben beschrieben zusätzlich eine Antikörperfärbung durchgeführt wurde.

Zunächst wird analog zur Anzucht von *C. pneumoniae* ein Hep2-Zellrasen vorbereitet. 24 Stunden später kann die Erstinfektion mit 2ml Chlamydien suspension (2ml Infektionsmedium und Chlamydien (2µl)) pro Loch erfolgen. Nach dem Zentrifugieren (30min, 3000U/min, 1601xg, 35°C) der beimpften Zellkulturplatten werden diese 60 Stunden inkubiert (37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Die Ernte der Chlamydien erfolgt nach Kontrolle der Infektion durch fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Einschlußkörperchen. Nach der Ernte können mit den gewonnenen *C. trachomatis* einer Lochplatte etwa 6-10 neue Lochplatten infiziert werden.

### 4.2.1.4 Aufreinigung von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis*

Die Aufreinigung von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* gelingt durch Ultrazentrifugation einer konzentrierten Chlamydien suspension über einem Succrose-Urografen-Gradienten. Wenn nach dem letzten Infektionszyklus Chlamydien in 20 oder mehr 6-Lochplatten vermehrt und geerntet werden konnten, wurde die Aufreinigung der Chlamydien wie folgt durchgeführt:

In das Chlamydien/Hep2-Zellgemisch werden Glasperlen gegeben (ca. 7-9 Löffelchen pro 50ml Falcon-Röhrchen). Durch Schütteln (10min bei maximaler Intensität im Vortex-Gerät) werden noch intakte chlamydienhaltige Hep2-Zellen eröffnet. Die Zellreste werden für 5min bei 1200U/min (306xg) abzentrifugiert. Der die Chlamydien enthaltende Überstand wird dann in zwei Beckmann Zentrifugenbecher (200ml) überführt. Die austarierten Becher werden in einer Ultrazentrifuge (Sorvall RC26Plus, Rotor: SLA 1500) 60min bei 12000U/min (21900xg) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das entstandene Zellpellet in Medium resuspendiert. Für die anschließende Aufreinigung im Succrose-Urografen-Gradienten werden in einem 12ml fassenden Zentrifugenröhrchen von

unten nach oben überschichtet: 3,5ml Succroselösung (50%), 3,5 ml Urografinlösung (30%), 4ml Chlamydiensuspension. Als Gegengewicht für die Zentrifugation wird ein zweites Röhrchen mit denselben Bestandteilen vorbereitet. Anstelle der Chlamydiensuspension werden 4ml Medium verwendet. Anschließend wird 60min bei 12500U/min (26770xg) und 4°C zentrifugiert (Beckman L-8M, Rotor: SW41). Nach dem Zentrifugieren bildet sich am Fuß des Röhrchens (Succrose-Phase) ein Chlamydien-Pellet. Der Überstand wird verworfen und das Pellet zum Waschen in 10ml Medium resuspendiert. Anschließend wird die Lösung auf 10 Eppendorf-Gefäße (je 2ml) verteilt. Die Eppendorf-Gefäße werden dann mit Medium auf 2ml aufgefüllt und 60min bei 13000U/min (16075xg) und 4°C zentrifugiert. Im letzten Arbeitsschritt werden die entstandenen Pellets in je 1,5ml SPG resuspendiert. Die Lagerung der Chlamydien erfolgt am ersten Tag bei -20°C, dann bei -80°C.

### *4.2.1.5 Überprüfung von Konzentration und Infektiösität gewonnener Chlamydien*

Zur Überprüfung der Infektiösität aufgereinigter Chlamydien werden aus einem Aliquot in absteigender Konzentration erneut Hep2-Zellen infiziert. Dazu wird eine 12-Loch-Zellkulturplatte mit Hep2-Zellen vorbereitet. In jedes der Löcher wird zusätzlich ein autoklaviertes Deckgläschen gegeben. Nach 24 Stunden werden die Hep2-Zellen mit der Chlamydiensuspension in den Konzentrationen 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000 (pro ml Infektionsmedium) infiziert.

Die Infektiösität der Chlamydien wurde für gut befunden, wenn nach 72-stündiger Inkubation und anschließender Antikörperfärbung in mindestens 50% der im Verhältnis 1:1000 infizierten Hep2-Zellen Einschlußkörperchen nachweisbar waren.

### *4.2.1.6 Ausstrich aufgereinigter Chlamydien auf Schokoladen-Agar*

Um eine Kontamination der aufgereinigten Chlamydien durch Bakterien oder Pilzsporen mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen, wurden Ausstriche auf Schokoladen-Agar angelegt. Der Nährboden bietet den als Kontaminationsquelle in Frage kommenden Bakterien- und Pilzarten optimale Wachstumsbedingungen. Konnte nach dreitägiger bzw. fünftägiger Bebrütung (37°C) keine Besiedlung des Nährbodens nachgewiesen werden, galt eine Kontamination als unwahrscheinlich.

### 4.2.1.7 Mykoplasmen-PCR

Zum Ausschluß einer Kontamination durch *Mykoplasma*, einem sich ebenfalls intrazellulär vermehrenden Bakterium, wurde vor der weiteren Verwendung der Chlamydien eine PCR-Reaktion durchgeführt. Zur Isolierung der DNA wurde ein QIAmp DNA Mini- Kit (Quiagen) verwendet und nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen.

Verwendete Primer:

Forward Primer: 5'- GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T -3'

Reverse Primer: 5'- TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC -3'

Reaktionsansatz:

H <sub>2</sub> O (DNAse-frei)	31,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	5µl
dNTP-Mix (25mM)	5µl
Primer (50pmol/µl)	je 0,5µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,5µl
DNA- Template	5µl

Die PCR wurde in einem PCR-Cycler mit heizbarem Deckel (Fa. Eppendorf, Typ: Mastercycler) unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

1. Start der Reaktion: 6 min bei 95°C
2. Denaturieren: 45 sec bei 95°C
3. "Annealing": 45 sec bei 63°C
4. Extension: 45 sec bei 72°C  
(die Schritte 2 bis 4 werden 34 mal ausgeführt)
5. Finale Extension: 5 min bei 72°C
6. Abbruch der Reaktion und Aufbewahrung des PCR-Produktes bei 4 °C.

Die Auswertung erfolgte nach Gelelektrophorese (120 Volt, 40min) im 2%igen Agarosegel mit Ethidiumbromidzusatz (10µl, 10mg/ml). In die Gel-Taschen wurden je 2 x 15µl PCR-Produkt, Positivkontrolle, Negativkontrolle, sowie 5µl einer DNA-Leiter (M23) geladen.

### 4.2.2 Monozytenisolierung aus Vollblut

Die Isolierung vitaler Monozyten aus Vollblut erfolgte durch Zentrifugation über einem sogenannten Ficollgradienten mit anschließender Selektion durch Zelladhäsion.

Zunächst werden je 20ml Ficoll-Lösung in 6 Falcon-Röhrchen vorgelegt. Anschließend werden die Gradienten mit insgesamt 200ml, von gesunden Zellspendern entnommenem "Zitratblut" (2,5g Dextrose, 2,2g Natriumcitrat, 0,73g Zitronensäure pro 100ml Blut), überschichtet. Es folgt eine 17-minütige Zentrifugation (2100U/min, 938xg) bei Raumtemperatur. Die Zentrifugation muss ohne Bremse erfolgen, um die über dem Gradienten entstehenden Schichten zu erhalten. Unmittelbar oberhalb der Ficollösung bildet sich eine Leukozytenbande, die als Intermediärschicht monozytäre Zellen und Lymphozyten enthält. Diese Intermediärschicht wird vorsichtig in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und durch Zugabe von Monozytenmedium (VLE-RPMI 1640) und Zentrifugation (1600U/min, 544xg, 8 min) gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift wird das Pellet in 6ml Medium resuspendiert. Um die vitalen Monozyten zu selektieren, wird deren Eigenschaft, unter Ausbildung von Pseudopodien an Plastikoberflächen zu adhären, genutzt. Lymphozyten besitzen diese Eigenschaft nicht. Dazu werden alle gewonnenen mononukleären Zellen auf 6 Zellkulturschalen verteilt und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgt eine Kontrolle im Umkehrmikroskop. Danach wird das Medium entnommen und vorsichtig mit PBS gespült, um die nicht adhärenen Lymphozyten zu entfernen. Das Lösen der adhärenen Monozyten erfolgt mit 5%iger EDTA-Lösung. Die Zellen werden erneut gewaschen und anschließend in Medium aufgenommen. Für diese Methode ergab die durchflußzytometrische Kontrolle einen > 90%igen Gehalt an CD14 positiven Monozyten.

Neben den aus Vollblut isolierten Monozyten wurden auch humane MonoMac6-Zellen verwendet. MonoMac6-Zellen exprimieren als immortalisierte humane monozytäre Zelllinie phänotypisch und funktionell die Eigenschaften von reifen Monozyten (Löms Ziegler-Heitbrock, et al., 1988, S. 456 und 1994, S. 73-80).

### 4.2.3 Infektion von Monozyten mit Chlamydien

Die Monozyten oder MonoMac6-Zellen werden zweimal mit Medium gewaschen und bei einer Konzentration von 250000 Zellen/ml resuspendiert. Je 10ml der Zellösung werden auf Zellkulturflaschen (250ml) verteilt. Die Infektion erfolgt durch Zugabe von Chlamydien in



einer Konzentration von  $10^5$  und  $10^8$  ifu (infectious units)/ml und Inkubation über 48 Stunden ( $37^\circ\text{C}$ , 5 % $\text{CO}_2$ ).

Die erfolgreiche Infektion wurde nach Antikörperfärbung mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflußzytometrie nachgewiesen.

### 4.2.4 RNA-Extraktion aus Monozyten

Für die Extraktion der RNA aus infizierten bzw. nicht-infizierten Monozyten wurde ein RNeasy Mini Kit der Firma Quiagen verwendet. Es wurde nach den Herstellerangaben vorgegangen. Die Zellen werden geerntet und in Eppendorf-Gefäße (2ml) überführt. Überschüssiges Medium wird abzentrifugiert (5min bei 1200U/min, 137xg). Anschließend werden die Zellen durch Zugabe eines Guanosin-Isothiocyant-haltigen Puffers lysiert. Das Lysat wird dann durch wiederholtes Aufziehen und Auspressen durch eine 23G-Spritzenkanüle homogenisiert. Das homogenisierte Lysat wird mit 600 $\mu\text{l}$  70%igem Ethanol gut durchmischt und auf die RNeasy-Säulen aufgetragen. Durch Zentrifugation (15sec, 13000U/min, 16075xg) werden Flüssigkeit und Zellrückstände abgepresst. Die RNA geht dabei Wechselwirkungen mit der Säulenmembran ein und verbleibt dort. Nach zwei Reinigungsschritten kann die RNA durch Zugabe von 50 $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser ( $37^\circ\text{C}$ ) und einminütiger Zentrifugation bei 13000U/min (16075xg) aus der Membran eluiert werden.

Um die so gewonnene RNA auch von geringen Mengen kontaminierender chromosomaler DNA zu befreien, wurde mit DNase (Message Clean Kit, Fa. Gene Hunter) nachbehandelt.

### 4.2.5 cDNA-Synthese

Da die Polymerasen nur DNA vervielfältigen können, muss die aus den Monozyten gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben werden. Die Reverse-Transkription wurde mit einem Omniscript Reverse Transkriptase Kit (Fa. Quiagen) unter Verwendung von zufälligen Hexameren (Fa. Gibco Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Reaktionsansatz:

10-fach Reverse Transkriptase-Puffer	2µl
dNTP Mix (25mM)	2µl
Hexamere (10µM)	2µl
RNase Inhibitor (10U/µl)	1µl
Omniscript Reverse Transkriptase (4U/µl)	1µl
RNA Template	2µl
H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	10µl

Der Reaktionsansatz wird bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Das cDNA-Produkt kann anschließend bei 4°C aufbewahrt werden (bzw. für die längere Lagerung bei -20°C).

### 4.2.6 Quantitative Real-time PCR

#### 4.2.6.1 Prinzip

Die quantitative Real-time PCR ermöglicht es, die exponentielle Zunahme der durch eine Polymerasekettenreaktion generierten Kopien eines DNA-Abschnittes in Echtzeit zu verfolgen. Die Geschwindigkeit, mit der die Zunahme der Kopien erfolgt, erlaubt auch Rückschlüsse auf die vor Beginn der Reaktion vorhandene Konzentration des zu untersuchenden DNA-Abschnittes (Template).

Es wurde ein quantitatives PCR-Verfahren mit dem Farbstoff SYBR Green (Fa. Applied Biosystems) gewählt. Der Farbstoff geht Bindungen mit doppelsträngiger DNA ein und fluoresziert in seiner gebundenen Form (Fluoreszenzmaximum bei 521nm). Die Intensität des emittierten Lichts ist dabei direkt proportional zur Konzentration vorhandener doppelsträngiger DNA. Während der Extensionsphase jedes PCR-Zyklus wird die Lichtemission erneut bestimmt. Die graphische Auswertung der Einzelmessungen zeigt die für die PCR charakteristische exponentielle Zunahme der Kopien.

Technische Voraussetzung für die quantitative Real-time PCR ist die Zusammenführung eines PCR-Cyclers und einer Fluoreszenz-Detektionseinheit in einem Gerät. Verwendet wurde das System Abi Prism 7700 (Fa. Applied Biosystems), das die zeitgleiche Fluoreszenzmessung von maximal 96 PCR-Ansätzen ermöglicht. Zur Aufnahme der PCR-Ansätze dient eine 96-Lochplatte, die mittels einer speziellen Folie versiegelt wird. Die PCR-Reaktion erfolgt unter den vorgewählten Bedingungen in dieser Lochplatte. Die wechselnden Temperaturen werden über einen Metallblock, analog zu herkömmlichen PCR-Cyclern auf die Lochplatte übertragen. Alternativ können bei diesem System auch PCR-Einzelgefäße (50µl) mit definierten optischen Eigenschaften verwendet werden.

Die Anregung der Fluoreszenzmoleküle und die optische Messung des emittierten Lichts erfolgt über eine Glasfaser. Als Lichtquelle dient ein Laser mit definierter Wellenlänge. Die Glasfaser tastet in vorgegebener Reihenfolge die Löcher der Reaktionsplatte (bzw. die Einzelgefäße) ab. Die Registrierung der Lichtemission erfolgt mittels einer CCD-Kamera. Die Verarbeitung der gewonnenen Daten übernimmt eine Computersoftware.

### 4.2.6.2 Durchführung

Zur Durchführung der Versuche wurde ein SYBR Green PCR Core Reagents Kit der Firma Applied Biosystems (P/N 4304886) verwendet. In dieser Zusammenstellung ist der Farbstoff im PCR-Puffer gelöst. Die Polymerase AmpliTaq-Gold (5U/µl) erlaubt den „hot-start“ der Reaktion. Durch diese Methode kann das Auftreten unspezifischer Amplifikationen verringert werden.

Es wurden EMMPRIN, MT1-MMP, sowie zur Kontrolle GAPDH (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase) jeweils zweifach bestimmt. Dies erfolgte für *C. pneumoniae*-infizierte und nicht-infizierte Monozyten nach je 24 und 48 Stunden, sowie unter maximaler Stimulation mit 1ng/ml PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Fa. Gibco Invitrogen).

Verwendete Primer:

<b>Produkt</b>	<b>Forward primer (5`-3`)</b>	<b>Reverse primer (5`-3`)</b>
EMMPRIN	GCTGGTCACCATCATCTTCATCT	CGCTCGTTCATCATCCAGGA
MT1-MMP	GAGGAAGGATGGCAAATTCGT	AGGGACGCCTCATCAAACAC
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC

### Reaktionsansatz:

10 x PCR-Puffer	5µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	6µl
dNTP Mix (25mM)	4µl
AmpliTaq-Gold (5U/µl)	0,25µl
AmpErase (1U/µl)	0,5µl
cDNA Template	1,5µl
forward primer	1,5µl
reverse primer	1,5µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	32,25µl

Die quantitative Real-time PCR-Reaktion wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

1. Start der Reaktion 2 min bei 50°C
2. Denaturieren 10 min bei 95°C
3. "Melting" 15 sec bei 95°C
4. "Annealing"/Extension 1 min bei 62°C

(die Schritte 3 und 4 werden 40 mal ausgeführt)

5. Abbruch der Reaktion und Aufbewahrung des PCR-Produktes bei 4°C.

### 4.2.7 Durchflußzytometrie (FACS)

#### 4.2.8.1 Prinzip

Die FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorting) ist ein Verfahren, das eine schnelle und objektive Charakterisierung und Zählung von Zellen verschiedener Zelltypen ermöglicht.

Die Charakterisierung kann anhand folgender Parameter erfolgen:

- Relative Größe der Zellen im Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Scatter)
- Relative Granularität oder Oberflächenbeschaffenheit der Zellen im Seitwärtsstreulicht (SSC, Side Scatter)
- Relative Fluoreszenzintensität (vier verfügbare Fluoreszenzen)

Das Gerät (FACSCalibur, Beckton-Dickinson) saugt über einen definierten Zeitraum mit einer definierten Fließgeschwindigkeit Zellsuspensionen an. Die Zellen werden mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit einzeln durch ein im 90°-Winkel auftreffendes Argonlicht geführt.

Dabei entsteht ein Streulicht, das von verschiedenen Detektoren registriert wird. So wird das von der Zelle in Richtung Laserstrahl gestreute Licht vom sogenannten FSC-Detektor (Forward Scatter), das 90°-Seitwärtsstreulicht vom SSC-Detektor (Side Scatter) aufgenommen. Diese optischen Signale werden dann in elektronische Signale (Spannungsimpulse) umgewandelt und digitalisiert. Die gewonnenen Daten können mit einem Computerprogramm ausgewertet und graphisch dargestellt werden.

Durch Färbung der zu analysierenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern (FITC: Fluorescein-Isothiocyanat, PE: Phycoerythrin konjugiert) lassen sich im selben Messvorgang auch einzelne Antigene und Oberflächenstrukturen spezifisch nachweisen und quantifizieren. So wurde in dieser Arbeit z.B. mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen Chlamydienantigene gefärbt (ACI-FITC-2, Fa. Progen), um die Infektionsrate der Monozyten zu bestimmen. Gleichzeitig konnte mittels PE-konjugierter Antikörper die Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren bei infizierten und nicht-infizierten Monozyten beurteilt werden.

### *4.2.7.2 Antikörperfärbung von Monozyten*

Zunächst werden 500000 Zellen pro FACS-Röhrchen vorgelegt und das Arbeitsmedium abzentrifugiert (300xg, 5min). Die Markierung monozytärer Oberflächenproteine erfolgt durch Zugabe spezifischer, unmarkierter Antikörper (5µg/ml in 45µl PBS) und Inkubation bei Raumtemperatur (30min). Nach einem Waschschrift werden die Zellen dann mit einem PE-konjugierten Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper (5µg/ml in 45µl PBS, 30min, 4°C) unter Lichtschutz inkubiert. Danach werden die markierten Zellen mit PBS gespült und sedimentiert (300xg, 5min). Anschließend werden die Zellen zur Fixierung in 1ml 4%igem Formaldehyd resuspendiert und unter Lichtschutz bei 4°C über 20min inkubiert.

Zur Färbung der Einschlußkörperchen werden die Zellen nach einem weiteren Waschschrift in 0,5%igem Saponin/PBS aufgenommen und mit dem FITC-konjugierten Chlamydien-Antikörper (6µg/ml) 30min bei 4°C unter Lichtschutz inkubiert.

Nach einem weiteren Waschschrift werden die Zellen in 200µl einer 1%igen Paraformaldehydlösung fixiert, und können dann durchflußzytometrisch analysiert werden.

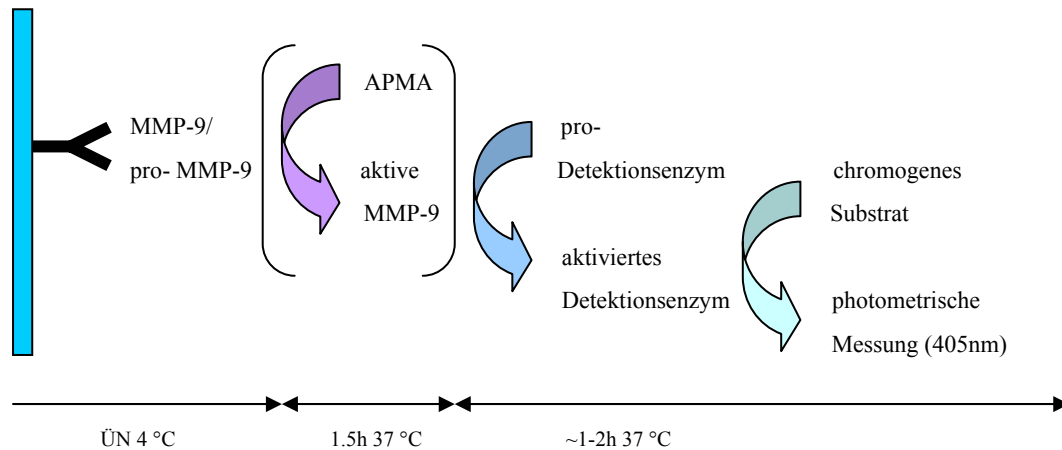
### 4.2.8 Untersuchungen an Zellüberständen

#### 4.2.8.1 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Die Konzentration von MMP-9 im Kulturüberstand *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten wurde mittels ELISA (MMP-9 activity assay system, RPN2634, Fa. Amersham, Freiburg) bestimmt. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Mit dem verwendeten System können MMP-9 Konzentrationen im Bereich von 0.125-16 ng/ml bestimmt werden. Der Meßbereich entspricht normalen bis zu niedrig-normalen endogenen MMP-9-Konzentrationen.

Auf eine mit anti-MMP-9-Antikörpern beschichtete Polykarbonat-Lochplatte werden eine Verdünnungsreihe pro-MMP-9 (0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0ng/ml) für eine Standardkurve sowie die zu untersuchenden Monozytenüberstände (je 100µl) pipettiert. Nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht werden alle Flüssigkeiten aus der Lochplatte abpipettiert und jedes Loch viermal mit Waschpuffer gespült. Durch die anschließende Zugabe von 50µl APMA (p-aminophenylmercuric acetate) wird pro-MMP-9 zu aktivem MMP-9 umgewandelt. Soll nicht die Gesamtkonzentration an MMP-9, sondern nur die in der Probe bereits aktiviert vorliegende Fraktion bestimmt werden, wird anstelle des APMA „Assaypuffer“ eingebracht. Der Ansatz wird auf einem Plattenmischer gut durchmischt (ca. 20sec) und dann 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach werden 50µl Detektionsreagenz (enthält pro-Detektionsenzym und Substrat) hinzugefügt. Das pro-Detektionsenzym (QuickZyme) besitzt eine artifizielle Aktivierungssequenz, die für MMPs spezifisch ist. Nach Bindung des MMP-9 an diese Sequenz erfolgt die proteolytische Aktivierung des Detektionsenzym.

Photometrische (405nm) Messungen des Substratabbaus in den Proben und der Vergleich mit der erhobenen Standardkurve ermöglichen die Bestimmung der Ausgangskonzentration an MMP-9.



**Abbildung 8:** Prinzip des MMP-9 Aktivitätsassays. Durch die Zugabe von APMA (p-aminophenylmercuric acetate) wird pro-MMP-9 in aktives MMP-9 überführt. Der Vergleich der photometrisch ermittelten Werte mit und ohne APMA-Zugabe ermöglicht eine Aussage über die Ausgangskonzentration von pro-MMP-9.

#### 4.2.8.2 SDS-Page-Gelatinzymographie

Verwendet wurde der "SDS Page Gelatin Zymography-Kit" der Fa. Invitrogen. Auf das Gel aufgetragene Gelatin-abbauende Enzyme (Gelatinasen) wandern zunächst entlang eines angelegten elektrischen Gradienten in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes (MMP-2: ~72kD, MMP-9: ~92kD), um dann während einer 12-stündigen Inkubation bei 37°C das Substrat (Gelatin) in ihrer Umgebung abzubauen. Eine quantitative Aussage ist aus dem Umfang des abgebauten Substrates ableitbar. Zur Negativ-Darstellung kommen abgebaute Gelareale nach Färbung mit Coomassie-Blau (Gelatine-Färbung).

Eine Novex-Mini-Zellkammer wird mit einem (maximal zwei) 10%igen Gelatingel bestückt. Die Kammer wird dann mit gekühltem (4°C) Laufpuffer gefüllt. Die Zellkulturüberstände (10µl) werden im Verhältnis 1:1 mit 10µl SDS-Probenpuffer verdünnt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur sind die Proteasen reversibel inaktiviert und die Proben können in die Gel-Taschen pipettiert werden.

Die Kammer wird anschließend verschlossen und bei 4°C eine Spannung von 125 Volt für 2 Stunden angelegt. Nach dem Überführen des Gels in eine Gelschale und nach 30-minütiger Inkubation unter permanentem Schwenken bei Raumtemperatur im Renaturierungspuffer (1:10 mit Aqua dest. verdünnt) kehren die Proteasen in ihre ursprüngliche aktive Form zurück (Effekt einer pH-Wert Änderung). Danach wird der Renaturierungspuffer abgegossen, der Entwicklungspuffer hinzugegeben und das Gel über Nacht unter permanentem Schwenken bei

37°C inkubiert. Am folgenden Tag wird der Entwicklungspuffer vorsichtig abgegossen und das Gel 20-30min in verdünnter Coomassie-Blau-Lösung auf einer Schüttelplatte gefärbt. Das Gelatingel kann anschließend sofort ausgewertet, oder in Frischhaltefolie verpackt getrocknet und aufbewahrt werden.

Neben der direkten zymographischen Analyse der Überstände *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten, wurde dieses Verfahren auch eingesetzt um mögliche Auswirkungen der Monozyteninfektion auf benachbarte glatte Gefäßmuskelzellen (SMCs) zu untersuchen.

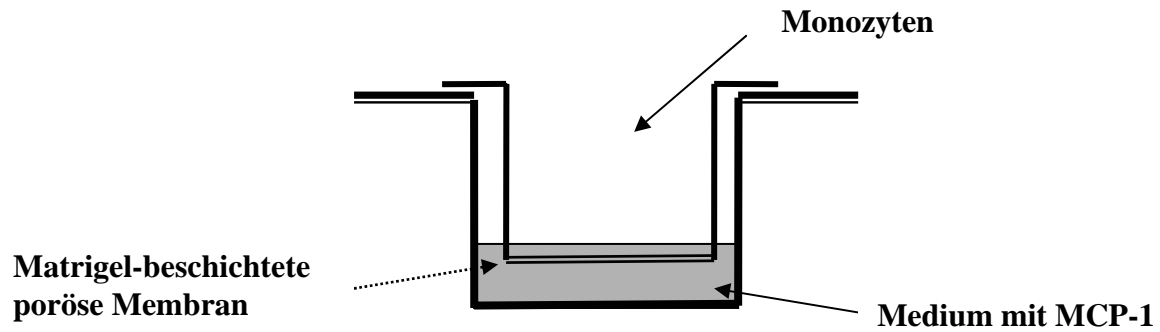
Zu diesem Zweck werden kultivierte Gefäßmuskelzellen (2-5 Vermehrungszyklen in "SMC basal medium" (Fa. Clonetics) bei 37°C) über 1 Stunde mit gereinigten Zellüberständen infizierter und nicht-infizierter Monozyten inkubiert. Anschließend werden die Monozytenüberstände abgenommen, die SMCs gewaschen, und nach Zugabe von Kulturmedium weitere 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag können die SMC-Überstände gewonnen und zymographisch untersucht werden.

### 4.2.9 Monozytentransmigration

Um die pathophysiologische Relevanz der *C. pneumoniae*-vermittelten Proteolyse näher zu untersuchen, wurde die Migration der Zellen durch extrazelluläre Matrix (Matrigel, Fa. Chemicon, Hofheim) simuliert. Die Migrationsversuche erfolgten in einer 12-Loch-Zellkulturplatte mit 12 Einsätzen. Am Boden der Einsätze befinden sich Polycarbonatmembranen mit einer Porengröße von 8µm, auf die eine dünne Schicht Matrigel aufgebracht ist. Diese Schicht verschließt die Poren komplett, und ermöglicht so die Migration der Monozyten aufgründ ihrer proteolytischen Aktivität.

Unter dem Filter wurde Monozytenmedium (VLE-RPMI 1640) eingebracht, das 10µg/ml rekombinantes MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1; Fa. R&D, Wiesbaden) enthält. In das obere Kompartiment wurden nicht-infizierte, mit Phorbol 12-myristate 13-acetate, (PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate, Fa. Gibco Invitrogen) stimulierte (10ng/ml), oder mit *C. pneumoniae* infizierte MonoMac6 Zellen in einer Konzentration von 500000 Zellen/ml gegeben. Zusätzlich wurde das Migrationsverhalten der Zellen bei An- bzw. Abwesenheit verschiedener Proteasen-Antagonisten und einem Kontrollpeptid untersucht. Nach 12-stündiger Inkubation wurden die Zellen aus dem unteren Kompartiment gesammelt, mit Kristallviolett gefärbt, und die Anzahl migrierter Zellen mittels optischer Dichtemessung quantifiziert.





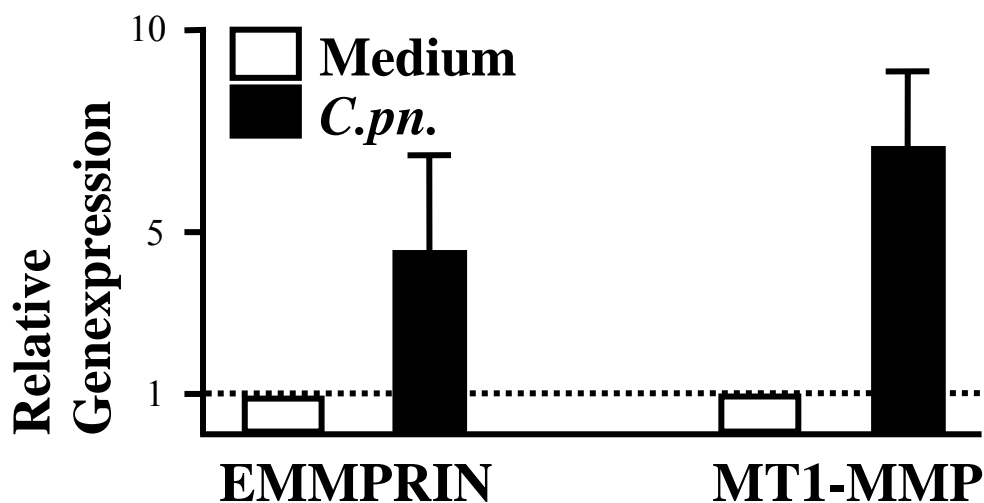
**Abbildung 9:** Migration von Monozyten durch extrazelluläre Matrix (Prinzip). Die in das obere Kompartiment des Transmigrationsassays eingebrachten Monozyten durchwandern eine mit extrazellulären Matrixbestandteilen (Matrigel) beschichtete poröse Membran. Die Fortbewegung der Monozyten erfolgt aufgrund der Abgabe proteolytischer Enzyme und wird durch MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) im unteren Kompartiment angeregt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 *C. pneumoniae* induziert die monozytäre Genexpression von EMMPRIN und MT1-MMP

Zellen der humanen monozytären Zelllinie MonoMac6 wurden für 48 Stunden mit *C. pneumoniae* inkubiert. Die Kontrolle der Infektion mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflußzytometrie unter Verwendung eines FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpers gegen Chlamydien ergab Infektionsraten zwischen 25 und 40 %.

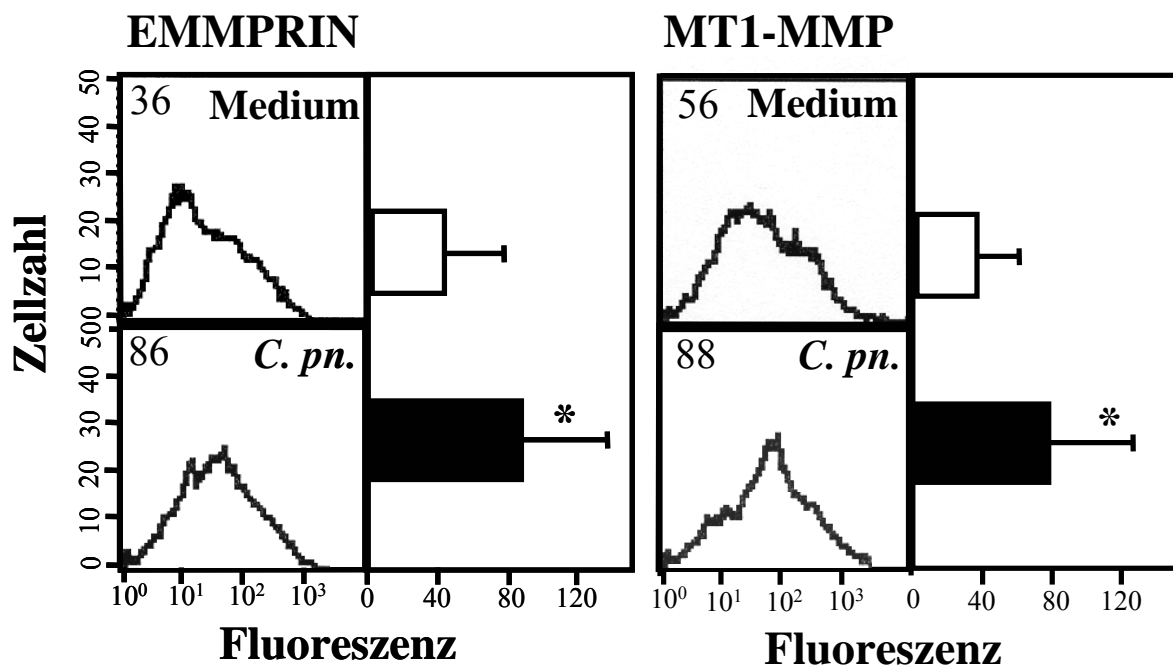
Die mit *C. pneumoniae* infizierten Monozyten zeigten in der quantitativen Real-time PCR eine gesteigerte mRNA-Expression für EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer) und für MT1-MMP (MMP-14, Membrane-type MMP-1) im Vergleich zu nicht-infizierten Monozyten. Als Standard wurde gleichzeitig die Amplifikation von GAPDH gemessen.



**Abbildung 10:** mRNA Expression von EMMPRIN und MT1-MMP *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten (MonoMac6) im Vergleich zu nicht-infizierten Monozyten. Die dunklen Säulen repräsentieren die Genexpression infizierter Monozyten in Relation zu nicht-infizierten Zellen. In der Abbildung wurden die Durchschnittswerte aus 7 unabhängigen Einzelversuchen zusammengefasst (relative Genexpression  $\pm$  STD).

### 5.2 *C. pneumoniae* erhöht die Oberflächenexpression von EMMPRIN und MT1-MMP auf Monozyten

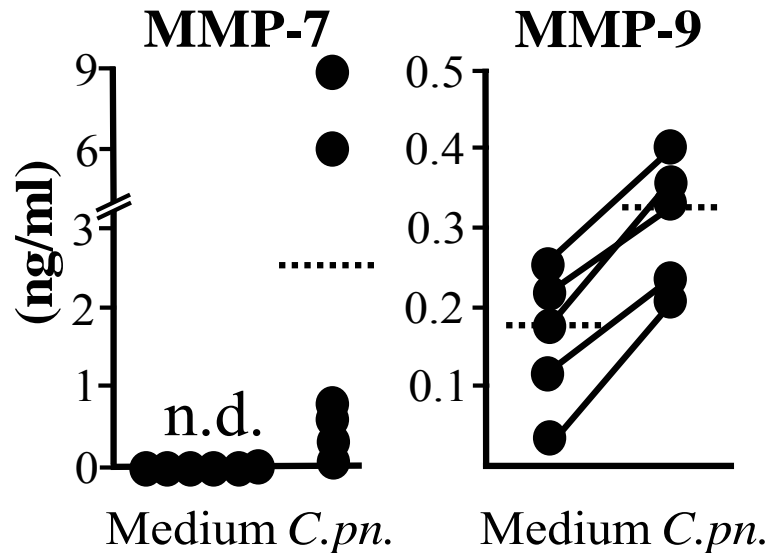
Durchflußzytometrische Messungen der EMMPRIN und MT1-MMP Oberflächenexpression zeigten eine signifikante Zunahme beider Proteine an der Zelloberfläche *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten (MonoMac6). Die durchschnittliche Zunahme der Fluoreszenz betrug für EMMPRIN, gemittelt aus 10 unabhängigen Versuchen (n=10)  $82,2 \pm 53,7$  bei *C. pneumoniae*-infizierten im Vergleich zu  $42,4 \pm 29,5$  bei nicht-infizierten Zellen ( $p < 0,01$ ). Für MT1-MMP betrug die durchschnittliche Zunahme der Fluoreszenz, gemittelt aus 11 unabhängigen Versuchen (n=11)  $78,9 \pm 51,7$  bei *C. pneumoniae*-infizierten im Vergleich zu  $40,3 \pm 30,6$  bei nicht-infizierten Zellen ( $p < 0,01$ ). Die unspezifische Fluoreszenz wurde unter Verwendung eines unspezifischen monoklonalen Kontrollantikörpers bestimmt und in der Auswertung berücksichtigt. Die gewonnenen Ergebnisse wurden an isolierten humanen Monozyten bestätigt.



**Abbildung 11:** Oberflächenexpression von EMMPRIN und MT1-MMP auf *C. pneumoniae*-infizierten Monozyten (MonoMac6) im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. Dargestellt sind jeweils ein repräsentatives durchflußzytometrisches Histogramm mit gegen EMMPRIN bzw. gegen MT1-MMP gerichteten monoklonalen Antikörpern, sowie in der rechten Bildhälfte die graphische Auswertung von  $\geq 10$  Einzelversuchen (mittlere Fluoreszenz  $\pm$  STD). \* $p < 0,01$

### 5.3 *C. pneumoniae* induziert die Freisetzung von MMP-7 und MMP-9

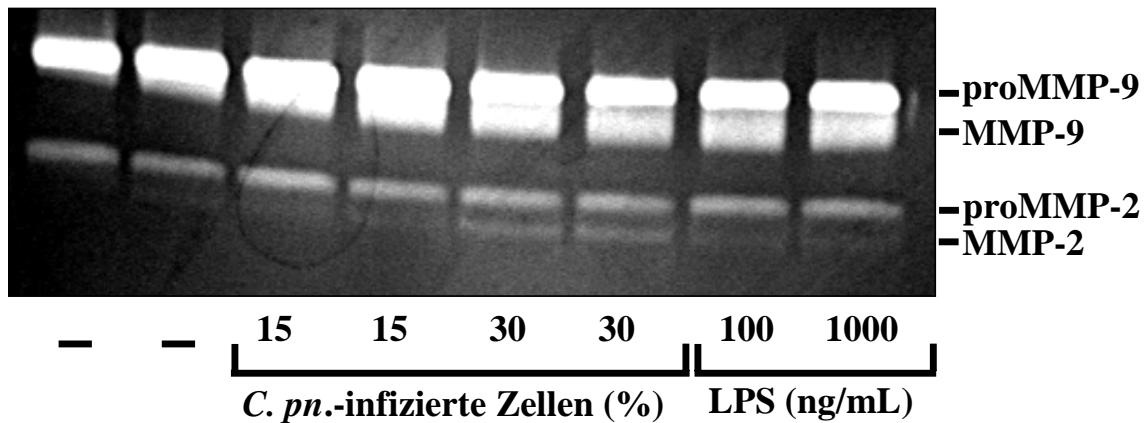
An Überständen *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten durchgeführte ELISAs zeigten eine gesteigerte MMP-7 und MMP-9 Sekretion:



**Abbildung 12:** *C. pneumoniae*-infizierte Monozyten sezernieren MMP-7 und MMP-9. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 5 bzw. 6 unabhängigen Versuchen. Es wurden die MMP-7 und MMP-9 Konzentrationen im Überstand *C. pneumoniae*-infizierter humaner Monozyten (MonoMac6) nach 48 stündiger Inkubation mit derjenigen nicht-infizierter Monozyten verglichen. Die gestrichelten Linien entsprechen den Mittelwerten der Einzelversuche.

### 5.4 *C. pneumoniae* induziert eine Steigerung der proteolytischen Aktivität monozytärer Zellen durch Induktion der MMP-2 und MMP-9

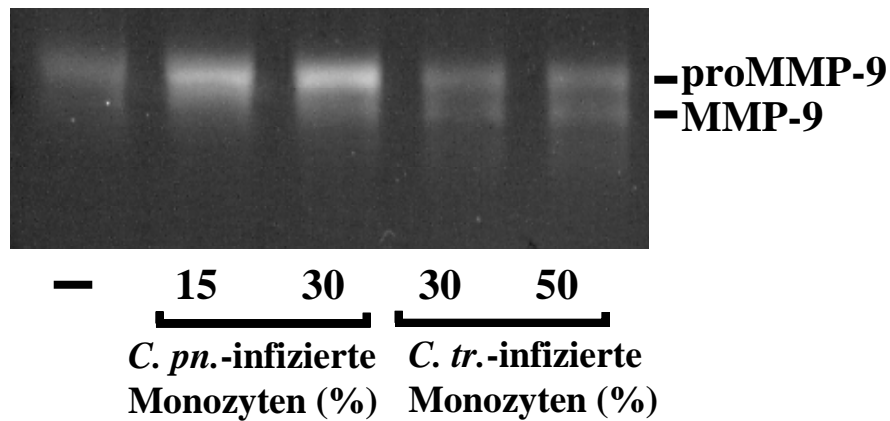
Humane monozytäre Zellen wurden mit steigenden Mengen von *C. pneumoniae* infiziert ( $10^5$  bzw.  $10^7$  ifu/ml). Die nach 48 Stunden gewonnenen Zellüberstände zeigten in der SDS-Page-Gelatin-Zymographie eine gesteigerte Aktivität der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9. Es wurde sowohl eine Zunahme der Sekretion der proMMP-9 und der aktiven MMP-9, als auch die Zunahme der aktiven MMP-2 beobachtet. Das Ausmaß der proteolytischen Aktivität war vergleichbar mit derjenigen unter maximaler Zellstimulation durch LPS (Positivkontrolle).



**Abbildung 13:** MMP-2 und MMP-9-Sekretion *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten: Von links nach rechts, jeweils doppelt bestimmt: Überstände nicht-infizierter Monozyten, mit *C. pneumoniae* in unterschiedlichen Konzentrationen ( $10^5$  ifu/ml, Infektionsrate 15% bzw.  $10^7$  ifu/ml, Infektionsrate 30%) infizierte Monozyten (Infektionsdauer: 48h), mit LPS in unterschiedlichen Konzentrationen (100ng/ml bzw. 1000ng/ml) stimulierte Monozyten. Der abgebildete Versuch zeigt die gesteigerte Aktivität der aktiven MMP-9 und der aktiven MMP-2 bei Infektion von Monozyten mit *C. pneumoniae*, die der maximalen Stimulation mit LPS entspricht. Abgebildet ist ein repräsentativer Versuch aus sechs unabhängigen Versuchen.

### 5.5 *C. pneumoniae*-spezifische Induktion der MMP-9-Aktivität in Monozyten

Um die Spezifität des Effektes einer *C. pneumoniae*-Infektion auf Monozyten nachzuweisen, wurden vergleichende Zymographien mit *C. trachomatis* durchgeführt. Infektionsraten von 30% führten bei einer Infektion mit *C. pneumoniae* zu einem deutlichen Anstieg der MMP-9 Aktivität. Dieser Effekt wurde bei einer Infektion mit *C. trachomatis* nicht beobachtet. Selbst bei Infektionsraten von 50% nimmt die MMP-9 Aktivität unter einer Infektion mit *C. trachomatis* (wenn überhaupt) nur minimal zu. *C. pneumoniae* hingegen scheint für die Stimulation der MMP-Aktivität humaner Monozyten besonders ausgestattet zu sein.

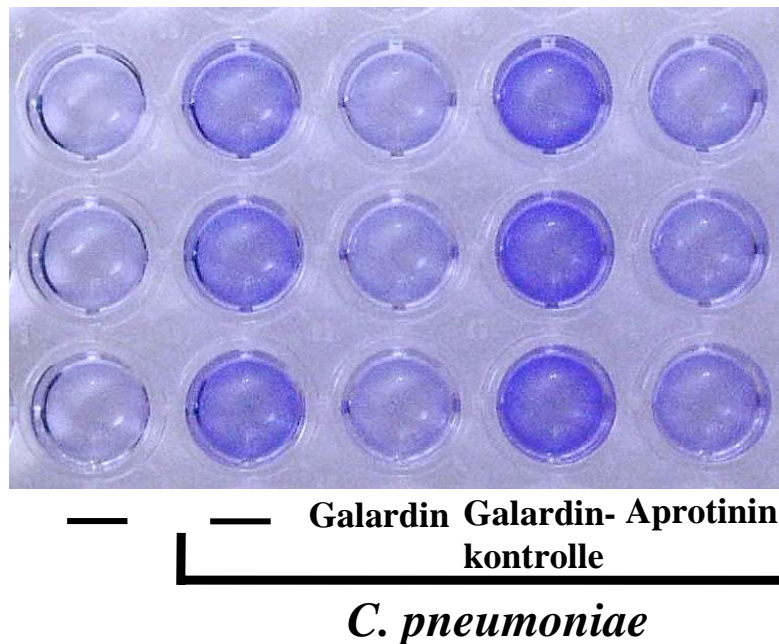


**Abbildung 14:** MMP-9-Sekretion *C. pneumoniae*- und *C. trachomatis*-infizierter Monozyten. Die Überstände *C. pneumoniae*- und *C. trachomatis*-infizierter isolierter humaner Monozyten (Infektionsraten 15% und 30% bzw. 30% und 50%) wurden im gezeigten Versuch im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Abgebildet ist ein repräsentativer Versuch von drei durchgeführten unabhängigen Versuchen.

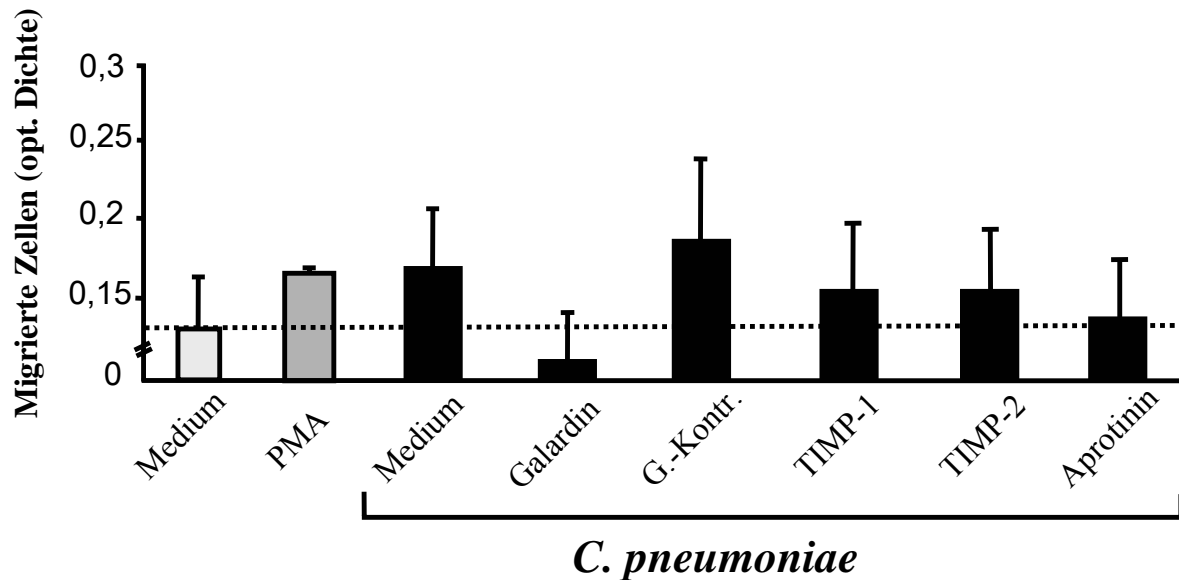
### 5.6 *C. pneumoniae* induziert die Transmigration von Monozyten durch extrazelluläre Matrix

Um die funktionellen Konsequenzen der bisherigen Ergebnisse (gesteigerte Expression von EMMPRIN und MT1-MMP, erhöhte Aktivität von MMP-2 und MMP-9) zu untersuchen, wurden Transmigrationsversuche durch Matrigel, einem im Aufbau der extrazellulären Matrix ähnlichen Gel, durchgeführt. *C. pneumoniae*-infizierte Monozyten zeigten eine im Vergleich zu nicht-infizierten Monozyten deutlich erhöhte Migrationsfähigkeit. Dieser Effekt wurde durch den Breitspektrum-MMP-Inhibitor Galardin (GM6001) aufgehoben. Bei Zugabe der physiologischen MMP-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 konnte ein partieller Rückgang der Monozytenmigration beobachtet werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus der Durchflußzytometrie und der Zymographie zeigt dies, dass die Zunahme der Migration *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten durch extrazelluläre Matrix durch spezifische MMP-Aktivierung verursacht wird. Zusätzlich wurden die Migrationsversuche auch unter Zugabe von Aprotinin, einem Inhibitor des Plasminogen-/Plasminsystems, durchgeführt. Neben den proteolytischen Eigenschaften des Plasmins selbst, ist der Plasminogenaktivator (uPA) in der Lage, bestimmte proMMPs durch Proteolyse der Propeptidomäne zu aktivieren (Nagase, 1997, S. 155). In früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass uPAR, der Rezeptor des Plasminogenaktivators, bei Infektion von Monozyten mit *C. pneumoniae* auf mRNA-Ebene und Proteinebene vermehrt exprimiert wird (May et al., 2002, S. 3616). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transmigrationsversuche

zeigten unter Aprotininzugabe eine Aufhebung der durch die Infektion mit *C. pneumoniae* induzierten Monozytenmigration. Die Beobachtung, dass sowohl Galardin als auch Aprotinin die Monozytenmigration hemmen, weist darauf hin, dass die durch *C. pneumoniae* verursachte Steigerung des Matrixabbaues durch das Zusammenspiel des Plasmin-Systems und des MMP-Systems vermittelt wird.



**Abbildung 15:** Migration *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten durch "Matrigel". Humane monozytäre Zellen (MonoMac6) wurden nach 24-stündiger Infektion mit *C. pneumoniae* gewaschen und in das obere Kompartiment des Transmigrationsassays eingebracht. Zusätzlich wurde im dargestellten Versuch der Breitspektrum MMP-Inhibitor Galardin (GM6001, 20 µg/ml), ein nicht-inhibierendes Kontrollpeptid (20 µg/ml) und der Plasminogen-Inhibitor Aprotinin (50 kIU/ml) eingesetzt. Nach 12 Stunden wurden die migrierten Zellen aus dem unteren Kompartiment gewonnen, mit Kristallviolett gefärbt, fotografiert und densitometrisch quantifiziert.



**Abbildung 16:** Migration *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten durch "Matrigel". Dargestellt ist die graphische Auswertung der densitometrisch ermittelten Migration *C. pneumoniae*-infizierter und nicht-infizierter Monozyten durch extrazelluläre Matrix (Matrigel). Zusammengefasst sind die Ergebnisse aus 7 unabhängigen Einzelversuchen (mittlere optische Dichte  $\pm$  STD).  $p < 0.01$ .

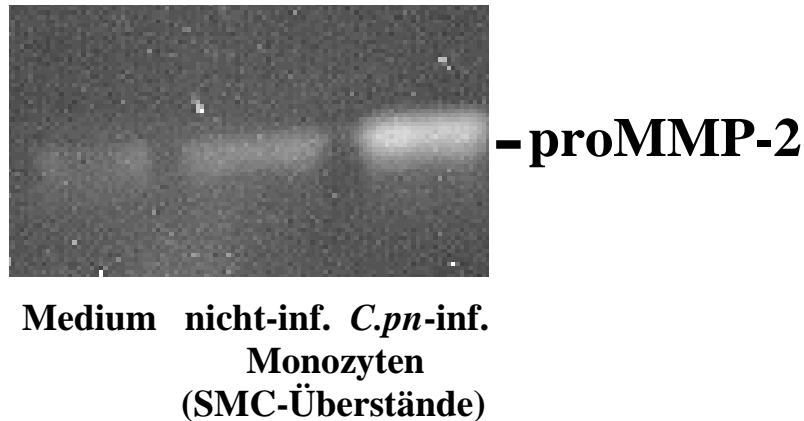
### 5.7 *C. pneumoniae*-infizierte Monozyten induzieren die MMP-2-Sekretion glatter Gefäßmuskelzellen durch Freisetzung inflammatorischer Zytokine

Innerhalb der atherosklerotischen Plaque kommt es zu Interaktionen zwischen Monozyten/Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen. Diese Interaktionen bewirken eine Steigerung der zellulären Aktivierung und der Entzündungsreaktion im Bereich der Plaque und könnten die Plaqueprogression und -ruptur beschleunigen. Es ist bekannt, dass *C. pneumoniae* die Sekretion inflammatorischer Zytokine wie etwa Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) oder IL-6 aus monozytären Zellen stimuliert (Kol et al., 1998 S. 301; Netea et al., 2000, S. 541). In dieser Arbeit untersuchten wir daher, ob und auf welchem Weg *C. pneumoniae*-infizierte Monozyten die Proteasenaktivität benachbarter Gefäßmuskelzellen stimulieren können.

Dazu wurden humane Gefäßmuskelzellen mit gereinigten Überständen humaner Monozyten, die vorher für 24 Stunden mit *C. pneumoniae* infiziert worden waren, inkubiert. Nach einstündiger Inkubation wurden die Monozytenüberstände entfernt und die glatten Muskelzellen nach einmaligem Waschen für weitere 12 Stunden mit Zellmedium inkubiert. Anschließend wurden die Überstände gewonnen und deren MMP-Aktivität mittels Gelatin-Zymographie analysiert.



Es zeigte sich, dass Überstände kultivierter, ruhender und nicht-infizierter Monozyten die MMP-2-Sekretion durch glatte Muskelzellen im Vergleich zur Mediumkontrolle nur geringfügig stimulieren. Im Gegensatz dazu steigerten die Überstände *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten die MMP-2-Sekretion der glatten Muskelzellen deutlich.

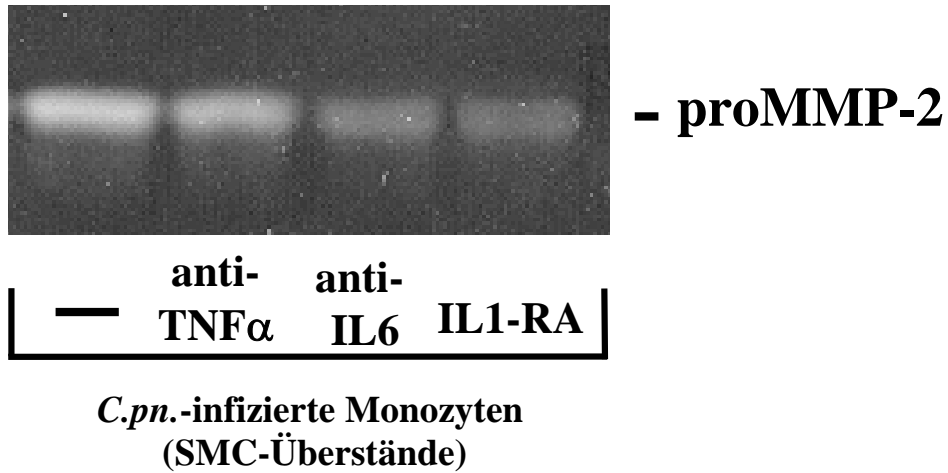


**Abbildung 17:** *C. pneumoniae*-infizierte Monozyten stimulieren die MMP-Aktivität glatter Gefäßmuskelzellen. Gelatin-Zymographie von Zellkulturüberständen glatter Gefäßmuskelzellen (SMCs).

Um den Einfluß monozytärer Zytokine auf glatte Muskelzellen zu untersuchen wurden den Überständen *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten in einem Folgeversuch blockierende Antikörper zugegeben.

Bei Zugabe eines monoklonalen gegen IL-6 gerichteten Antikörpers (anti-IL-6), oder eines IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1-RA) wurde die MMP-2-Sekretion durch die glatten Muskelzellen effektiv inhibiert. Der Inhibitionsversuch mit anti-TNF- $\alpha$  zeigte einen (wenn überhaupt) nur geringfügigen Effekt.

Es kann daher angenommen werden, dass *C. pneumoniae*-infizierte Monozyten die proteolytische Aktivität nicht nur durch eine direkte Steigerung der Sekretion von MMPs, sondern auch durch eine Zytokin-vermittelte (IL-1 $\beta$  und IL-6) Stimulation der MMP-Aktivität benachbarter Gefäßzellen, bewirken.



**Abbildung 18:** *C. pneumoniae*-infizierte Monozyten induzieren die MMP-Aktivität glatter Gefäßmuskelzellen durch Zytokinsekretion. Gelatin-Zymographie von Überständen glatter Gefäßmuskelzellen, die mit Monozytenüberständen unter An- bzw. Abwesenheit eines blockierenden Antikörpers (anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-6) oder eines Rezeptorantagonisten (IL-1-RA) inkubiert wurden (20  $\mu$ g/ml). Abgebildet ist ein repräsentativer Versuch aus 5 unabhängigen Versuchen.

## 6. Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen bilden in den westlichen Industrienationen die weitaus häufigste Todesursache. Als chronisch entzündliche Gefäßerkrankung führt die Artherosklerose an den Koronararterien zur ischämischen Herzinsuffizienz, durch Ruptur der artherosklerotischen Plaque wird der oft tödlich verlaufende, akute Herzinfarkt ausgelöst.

In allen Stadien der Plaqueentstehung spielen einwandernde Monozyten und sich daraus differenzierende Makrophagen eine zentrale Rolle. Daneben ist die zellulär vermittelte Proteolyse in allen Entwicklungsstadien der Erkrankung essentiell. Sie ermöglicht zunächst die Migration der beteiligten Zellen in die entstehende Plaque, weiterhin werden die extrazellulären Matrixproteine ständig um- und abgebaut. Schließlich wird aufgrund eines Ungleichgewichtes zwischen Synthese und Degradation extrazellulärer Matrixproteine die fibröse Schutzkappe der Plaque ausgedünnt. Dies führt zur physikalischen Ruptur der Plaque mit Freilegung Thrombozyten aktivierender Matrixproteine und mündet somit in den thrombotischen Verschluss der Koronararterie (Lusis, 2000).

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) tragen wesentlich zur Progression und Ruptur atherosklerotischer Plaques bei. Insbesondere die Anwesenheit von MT1-MMP, MMP-2, MMP-7 und MMP-9 in der Gefäßwand, wird mit dem Phänotyp einer instabilen Plaque in Verbindung gebracht (Sukhova et al., 1999, S. 2505; Galis&Khatri, 2002, S. 256-257; Brown et al., 1995, S. 2129; Rajavashisth et al., 1999, S. 3108).

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass *C. pneumoniae*-infizierte Monozyten die Plaqueprogression und Plaqueruptur möglicherweise zusätzlich beschleunigen. Dies könnte 1.) direkt durch die Steigerung der monozytären Expression, Sekretion und Aktivierung von MMPs, und 2.) indirekt durch die Cytokin-vermittelte (IL-6, IL-1 $\beta$ ) Induktion der MMP-Freisetzung aus benachbarten glatten Gefäßmuskelzellen erfolgen.

In der Vergangenheit konnten zahlreiche Studien *C. pneumoniae* im Inneren atherosklerotischer Plaques nachweisen (Maass et al., 1998, S. 25; Muhlestein et al., 1996, S. 1555). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass sie dort atherogene Entzündungsreaktionen stimulieren (Vehmaan-Kreula et al., 2001, S. 6; Kaukoronta-Tolvanen et al., 1996, S. 410; Dechend et al., 1999, S. 1370). Unsere Arbeitsgruppe konnte vor kurzem zeigen, dass *C. pneumoniae* die Rekrutierung infizierter Monozyten an die Gefäßwand induzieren kann. Dieser Effekt konnte *in vivo* bei zuvor gefäßgesunden Mäusen beobachtet

werden, und wird vermutlich durch das Integrin-(Adhäsionsrezeptor)-System vermittelt (May et al., 2003, S. 789).

Die vorliegende Arbeit beschreibt potentielle atherogene Effekte *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten innerhalb betroffener Gefäßwände: *C. pneumoniae*-infizierte Monozyten stimulierten die proteolytische Aktivität und den damit verbundenen Abbau extrazellulärer Matrix. Diese Prozesse werden scheinbar durch die schrittweise Aktivierung zellassoziierter Proteasen, wie MMP-2, MMP-7, MMP-9 und Plasmin vermittelt.

Die Zunahme der proteolytischen Aktivität ging mit einer Steigerung der Expression des EMMPRIN-Rezeptors, der MT1-MMP sowie des uPA-Rezeptors einher. Die rezeptorassoziierte Proteolyse steht daher möglicherweise mit der beobachteten Steigerung der Migration infizierter Monozyten durch extrazelluläre Matrix (Matrigel) in direktem Zusammenhang.

Monozyten stehen ebenfalls in dem Verdacht Chlamydien an glatte Muskelzellen der Gefäßwand zu übertragen (Dechend et al., 2003, S. 263). Wir beobachteten, dass *C. pneumoniae*-infizierte Monozyten glatte Muskelzellen auch stimulieren können, ohne dabei die Bakterien an die Muskelzellen weiterzugeben. Eine mögliche Rolle spielen dabei die Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6. Bei Inkubation von glatten Muskelzellen mit gereinigten Überständen *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten beobachteten wir eine Anregung der Zellen zur Freisetzung von aktiver MMP-2. Dieser Effekt konnte sowohl durch einen IL-1-Rezeptorantagonisten, als auch durch einen gegen IL-6 gerichteten monoklonalen Antikörper inhibiert werden.

Die gesteigerte Zytokinproduktion infizierter Monozyten scheint zudem auch Einfluß auf die Aktivierung von Metalloproteinasen und Proteaserezeptoren nicht-infizierter Monozyten in der Umgebung zu haben: In der Durchflußzytometrie fiel auf, dass die gesamte Monozytenpopulation der *C. pneumoniae*-infizierten Gruppe eine Hochregulation der Proteaserezeptoren EMMPRIN und MT1-MMP aufwies, obgleich nur 25-30% der Zellen tatsächlich *C. pneumoniae* enthielten, bzw. durch den positiven Chlamydiennachweis mittels eines monoklonalen Antikörpers als infiziert gelten konnten.

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse beider Versuche darauf hin, dass *C. pneumoniae* nicht nur die infizierte Einzelzelle aktiviert, sondern auch perizelluläre Entzündungsprozesse induziert, die benachbarte Zellen innerhalb einer atherosklerotischen Läsion stimulieren. Das Zusammenwirken von Monozyten und glatten Muskelzellen könnte zu einer für die Plaquestabilität kritischen Akkumulation der MMP-Aktivität in der Gefäßwand führen.

Experimentelle und klinische Studien sowie Tierversuche legen das Vorhandensein eines für *C. pneumoniae* spezifischen Aktivierungsweges nahe (Saikku et al., 1988, S. 985; Hu et al., 1999, S. 752). In dieser Studie ließ sich auch unter hohen Infektionsraten von Monozyten mit *C. trachomatis* keine nennenswerte Steigerung der MMP-Aktivität nachweisen. Diese Beobachtung könnte eine pathophysiologische Erklärung dafür liefern, dass *C. trachomatis* (im Gegensatz zu *C. pneumoniae*) bei Versuchstieren zu keiner beschleunigten Atherogenese führt, selbst wenn das Bakterium in der Gefäßwand nachweisbar ist (Hu et al., 1999, S. 750). Nichtsdestoweniger konnte der genaue *C. pneumoniae*-spezifische Aktivierungsweg noch nicht identifiziert werden. Wie ein Lipopolysaccharid (LPS)-Inhibitionsversuch mit Polymyxin B im Rahmen dieser Arbeit zeigte, scheint jedoch chlamydiales LPS bei der Monozytenaktivierung keine führende Rolle zu spielen (Daten nicht wiedergegeben).

Die Zusammenfassung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigt, dass die Infektion monozytärer Zellen mit *C. pneumoniae* eine Aktivierungskaskade induziert, die durch vermehrte Synthese, Expression und/oder Aktivierung verschiedener Proteaserezeptoren und MMPs eine Steigerung des Matrixabbaus zur Folge hat. Daraus könnte, sowohl eine vermehrte Migration von Monozyten in die Gefäßwand, als auch eine Beschleunigung der Plaquestabilisierung resultieren. Zudem scheinen Cytokin-vermittelte, interzelluläre Aktivierungsvorgänge bei diesem Prozess eine Rolle zu spielen. Unsere Ergebnisse unterstützen somit das Konzept, dass *C. pneumoniae* einen aktiven Beitrag zu inflammatorischen und atherogenen Vorgängen innerhalb der atherosklerotischen Plaque leistet, und so zur Plaqueprogression und Destabilisierung beiträgt.

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Antibiotika-Studien zur Sekundärprävention bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung durchgeführt. Die bislang umfangreichsten Studien ACES (Azithromycin and Coronary Events Study) und PROVE-IT (Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy Study) konnten im Jahr 2005 abgeschlossen werden (Grayston et al., 2005, S. 1637; Cannon et al., 2005, S. 1646). Die an je etwa 4000 Koronarpatienten unter Placebo-Kontrolle durchgeführten Studien zeigten für die mit Azithromycin bzw. Gatifloxacin behandelten Patientengruppen keine Vorteile bezüglich des Überlebens oder des Auftretens eines Infarktereignisses. Mögliche Ursachen für das Versagen der antibiotischen Therapie könnten neben der Wahl des Antibiotikums und der Dauer und Art der Verabreichung, auch im Zeitpunkt des Therapiebeginns liegen. In die ACES-Studie wurden Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung und angiographischem Nachweis einer mindestens 50%igen Koronarstenose oder einem dokumentierten Infarktereignis in der Vergangenheit aufgenommen. In die PROVE-IT-Studie wurden ausnahmslos Patienten mit

akutem Koronarsyndrom (akuter Myokardinfarkt oder instabile Angina pectoris) eingeschlossen. Die Studienergebnisse liefern Hinweise darauf, dass im Spätstadium der Erkrankung die mit der Ruptur vulnerabler Plaques einhergeht, eine antibiotische gegen Chlamydien gerichtete Therapie den Krankheitsverlauf nicht mehr positiv beeinflussen kann. Gemessen an den hohen Erwartungen, die insbesondere durch tierexperimentelle Untersuchungen und durch einzelne Pilotstudien geweckt worden waren, enttäuschen die Ergebnisse der ACES und PROVE-IT Studien.

Die in der Vergangenheit durchgeführten tierexperimentellen Studien zeigten, dass sich der Effekt einer durch *C. pneumoniae* induzierten Beschleunigung der Atherosklerose, bei früher Antibiotikagabe zum Teil erheblich reduzieren lässt (Fong et al., 2000, S. 514; Muhlestein et al., 1998, S. 635; Grayston et al., 2005, S. 1639). In der Frühphase der Atherosklerose stehen neben der endothelialen Dysfunktion vor allem proliferative Vorgänge innerhalb der Gefäßwand im Vordergrund. Die klinischen Studien erfassen aber im Wesentlichen die Spätphase der Atherosklerose in der Plaqueeosion oder Plaqueruptur zu den bekannten thrombembolischen Komplikationen führen. Während in der Frühphase der Plaqueeinstellung stabilisierende Vorgänge, wie die Proliferation glatter Muskelzellen und der Aufbau einer dichten extrazellulären Matrix überwiegen, kommt es mit fortschreitender Erkrankung durch Zelluntergang und Matrixabbau zur Plaquestabilisierung und später zur Ruptur (Lusis, 2000). Das Versagen der sekundärpräventiven Antibiose, könnte somit auch darauf hindeuten, dass die beobachtete Beschleunigung der Atherogenese durch *C. pneumoniae* vor allem auf der Beeinflussung der proliferativen Phase des Entzündungsgeschehens beruht (Neumann, 2002).

Aufgrund der langen klinischen Latenz zwischen der Entstehung erster atherosklerotischer Läsionen und dem Auftreten der typischen Komplikationen, der hohen Reinfektionsrate durch *C. pneumoniae* und der intrazellulären Persistenz des Erregers, erscheinen die praktische Umsetzung und die Evaluation eines früh beginnenden antibiotischen Therapieansatzes jedoch kaum möglich.

Dennoch kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt eine Infektion mit *C. pneumoniae* als ein weiterer Risikofaktor bei der Entstehung der Atherosklerose gelten. Bei der Behandlung dieser multifaktoriellen entzündlichen Erkrankung werden aber wohl auch zukünftig die etablierten medikamentösen Therapien Vorrang haben.

## 7. Zusammenfassung

*C. pneumoniae* ist ein gram-negatives, obligat intrazelluläres Bakterium, das beim Menschen als Erreger von Infektionen des oberen und unteren Respirationstraktes weit verbreitet ist. In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise darauf, dass *C. pneumoniae* an der Entstehung und Progression der Atherosklerose beteiligt ist. Eine zentrale Rolle scheinen dabei Monozyten/ Makrophagen zu spielen, da sie zum einen als Vektoren zwischen Alveolarraum und Gefäßwand fungieren können, und zum anderen selbst an allen Stadien der Atherosklerose maßgeblich beteiligt sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen einer Infektion von Monozyten mit *C. pneumoniae* hinsichtlich einer Veränderung der Aktivität von Matrix Metalloproteinasen und der daraus resultierenden funktionellen Konsequenzen zu untersuchen. Zudem wurde untersucht, ob und durch welche möglichen Mechanismen *C.pneumoniae*-infizierte Monozyten Einfluß auf glatte Gefäßmuskelzellen (SMCs) nehmen.

Es wurden zunächst Chlamydien der Gattungen *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* in ausreichender Menge gezüchtet. Mit den aufgereinigten Chlamydien wurden humane Monozyten und humane MonoMac6-Zellen infiziert. Bei einer Infektion von Monozyten mit *C. pneumoniae* kam es sowohl zu einer Steigerung der mRNA- und Oberflächenexpression des Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducers (EMMPRIN) und der membrantyp-1 MMP (MT1-MMP), als auch zu einer Zunahme der Sekretion von löslichem MMP-7, MMP-9 sowie des Urokinase-Rezeptors (uPAR). Zudem zeigten Zellkulturüberstände *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten (im Gegensatz zu Überständen *C. trachomatis*-infizierter Monozyten), gesteigerte Aktivitäten der MMP-2 und MMP-9.

Die funktionellen Konsequenzen der gesteigerten proteolytischen Aktivität *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten wurden mittels Migrationsversuchen weiter untersucht. Die dabei beobachtete Zunahme der Transmigration infizierter Monozyten, war sowohl unter Zugabe des Breitspektrum-MMP-Inhibitors Galardin, als auch unter Zugabe des Plasmin-Inhibitors Aprotinin, deutlich vermindert.

In einem Folgeversuch wurden gereinigte Überstände *C. pneumoniae*-infizierter Monozyten mit glatten Gefäßmuskelzellen inkubiert. Dies induzierte eine Steigerung der MMP-2 Sekretion durch die glatten Muskelzellen. Dieser Effekt beruhte auf einer Sekretion von Interleukin-1 und Interleukin-6.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass *C. pneumoniae* zum einen die proteolytische Aktivität infizierter Monozyten direkt steigert, und zum anderen indirekt eine Zunahme der MMP-Sekretion in benachbarten glatten Muskelzellen induziert. Diese Mechanismen könnten für die beschleunigte Genese und Progression der Atherosklerose nach einer *C. pneumoniae*-Infektion mitverantwortlich sein.



## 8. Literaturverzeichnis

Airenne, S., Surcel, H.M., Alakärppä, H., Laitinen, K., Paavonen, J., Saikku, P., Laurila, A.  
*Chlamydia pneumoniae* Infection in Human Monocytes.  
*Infect. Immun.* 67 (1999) 1445-1449

Allaire, E., Forough, R., Clowes, M., Starcher, B., Clowes, A.W.  
Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model.  
*J. Clin. Invest.* 102 (1998) 1413-1420

Basbaum, C.B., Werb, Z.  
Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface.  
*Curr. Opin. Cell. Biol.* 8 (1996) 731-738

Beatty, W.L., Morrison, R.P., Byrne, G.I.  
Persistent Chlamydiae: from cell culture to a paradigm for Chlamydial pathogenesis.  
*Microbiol. Rev.* 58 (1994) 686-699

Behrendt, N.  
The urokinase receptor (uPAR) and the uPAR-associated protein (uPARAP/Endo180): membrane proteins engaged in matrix turnover during tissue remodeling.  
*Biol. Chem.* 385 (2004) 103-36

Birkedal- Hansen, H.  
Proteolytic remodelling of extracellular matrix.  
*Curr. Opinion in Cell. Biol.* 7 (1995) 728-735

Biswas, C., Zhang, Y., De Castro, R., Guo, H., Nakamura, T., Kataoka, H., Nabeshima, K.  
The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily.  
*Cancer Res.* 55 (1995) 434-439

Blasi, F., Cosentini, R., Raccanelli, R., Massari, F.M., Arosio, C., Tarsia, P., Allegra, L.  
A possible association of Chlamydia pneumoniae infection and acute myocardial-infarction in patients younger than 65 years of age.  
*Chest* 112 (1997) 309-312

Blasi, F., Boman, J., Espositi, G.  
*Chlamydia pneumoniae* detection in peripheral blood mononuclear cells is predictive of vascular infection.  
*J. Inf. Dis.* 180 (1999) 2074-2076

Boman, J., Söderberg, S., Forsberg, J., Birgander, L.S., Allard, A., Persson, A., Jidell, E., Kumlin, U., Juto, P., Waldenström, A., Wadell, G.  
High Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* DNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Cardiovascular Disease and in Middle- aged Blood Donors.  
*J. Inf. Dis.* 178 (1998) 274-277

- Boman, J., Gaydos, C.  
Polymerase Chain Reaction Detection of *Chlamydia pneumoniae* in Circulating White Blood Cells.  
*J. Inf. Dis.* 181 (2000) 452-454
- Brew, K., Dinakarandian, D., Nagase, H.  
Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.  
*Biochem. Biophys. Acta* 1477 (2000) 267-283
- Brown, D.L., Hibbs, M.S., Kearney, M., Loushin, C., Isner, J.M.  
Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina.  
*Circulation* 91 (1995) 2125-2131
- Byrne, G.I., Oulette, S.P., Wang, Z., Rao, J.P., Lu, L., Beatty, W.L., Hudson, A.P.  
*Chlamydia pneumoniae* Expresses Genes Required for DNA Replication but not Cytokinesis during Persistent Infection of Hep-2-Cells.  
*Infection and Immunity* 69 (2001) 5423-5429
- Campbell, L.A., Blessing, E., Rosenfeld, M., Lin, T., Kuo, C.C.  
Mouse Models of *C. pneumoniae* Infection and Atherosclerosis.  
*J. Inf. Dis.* 181 (2000) 508-513
- Cannon, C.P., Braunwald, E., McCabe, C.H., Grayston, J.T., Muhlestein, B., Giugliano, R.P., Cairns, R., Skene, A.M.  
Antibiotic Treatment of *Chlamydia pneumoniae* after Acute Coronary Syndrome.  
*N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1646-1654
- Chavakis, T., May, A.E., Preissner, K.T., Kanse, S.M.  
Molecular mechanisms of zinc dependent leucocyte adhesion involving urokinase receptor and  $\beta$ 2-integrins.  
*Blood* 93 (1999) 2976-2983
- Collen, D., Lijnen, H.R.  
Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis.  
*Blood* 78 (1991) 3114-3124
- Cook, P.J., Honeybourne, D., Lip, G.Y., Beevers, D.G., Wise, R., Davies, P.  
*Chlamydia pneumoniae* antibody titers are significantly associated with acute stroke and transient cerebral ischemia- the west Birmingham stroke project.  
*Stroke* 29 (1998) 404-410
- Creemers, E., Cleutjens, J., Smits, J., Daemen, M.  
Matrix Metalloproteinase Inhibition After Myocardial Infarction – A New Approach to Prevent Heart Failure?  
*Circ. Res.* 89 (2001) 201-210
- Dahlen, G.H., Boman, J., Birgander, L.S., Lindblom, B.  
Lp (A) Lipoprotein, IgG, IgA and IgM antibodies to *Chlamydia pneumoniae* and HLA class II genotype in early coronary artery disease.  
*Atherosclerosis* 114 (1995) 165-174

Dechend, R., Maass, M., Gieffers, J.m, Dietz, R., Scheidereit, C., Leutz, A., Gulba, D.C.  
*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* 100 (1999) 1369-1373

Dechend, R., Gieffers, J., Dietz, R., Jorres, A., Rupp, J., Luft, F.C., Maass, M.  
Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibition reduces *Chlamydia pneumoniae*-induced cell interaction and activation.

*Circulation* 108 (2003) 261-265

Dollery, C.M., McEwan, J.R., Henney, A.M.  
Matrix Metalloproteinases and Cardiovascular Disease.

*Circ. Res.* 77 (1995) 863-868

Fong, I.W., Chiu, B., Viira, E., Fong, M.W., Jang, D., Mahony, J.  
Rabbit model for chlamydia pneumoniae infection.

*J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 48-52

Fong, I.W., Chiu, B., Viira, E., Yang, D., Fong, J.D., Peeling, R., Mahony, J.B.  
Can an antibiotic (Macrolide) prevent *Chlamydia pneumoniae*- induced atherosclerosis in a rabbit model?

*Clin. Diag. Lab. Immunol.* 6 (1999) 891-894

Fong, I.W.,  
Antibiotic Effects in a Rabbit Model of *Chlamydia pneumoniae*- Induced Atherosclerosis.  
*J. Inf. Dis.* 181 (2000) 514-518

Galis, Z.S., Khatri, J.J.  
Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis. The Good, the Bad and the Ugly.

*Circ. Res.* 90 (2002) 251-262

Gieffers, J., Fulgraf, H., Hahn, J., Klinger, M., Dalhoff, K., Katus, H.A., Solbach, W., Maass, M.,  
*Chlamydia pneumoniae* Infection in Circulating Human Monocytes is Refractory to Antibiotic Treatment.

*Circulation* 103 (2001) 351-356

Gimbrone, M. A. Jr  
Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis.

*Am. J. Pathol.* 155 (1999) 1-5

Glass, C.K., Witztum, J.L.  
Atherosclerosis: The Road Ahead.

*Cell* 104 (2001) 503-516

Grayston, J.T., Kuo, C.C., Wang, S.P., Altman, J.  
A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections.

*N. Engl. J. Med.* 315 (1986) 161-168

Grayston, J.T., Kuo, C.C., Campbell, L.A., Benditt, E.P.  
Chlamydia pneumoniae strain TWAR and atherosclerosis.  
*Eur. Heart J.* 14 (1993) Suppl. K66-71

Grayston, J.T., Kronmal, R.A., Jackson, L.A., Parisi, A.F., Muhlestein, J.B., Cohen, J.D.,  
Rogers, W.J., Crouse, J.R., Borrowdale, S.L., Schron, E., Knirsch, C.  
Azithromycin for the Secondary Prevention of Coronary Events.  
*N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1637-1645

Gurfinkel, E., Bozovich, G., Daroca, A., Beck, E., Mautner, B.  
Randomised trial of roxithromycin in non Q- wave coronary syndromes: ROXIS pilot study.  
*Lancet* 350 (1997) 404-407

Gurfinkel, E.  
Inflammation, Infection, or Both in Atherosclerosis: The ROXIS Trial in Perspective.  
*J. Inf. Dis.* 181 (2000) 566-568

Halpert, I., Sires, U.I., Roby, J.D., Potter-Perigo, S., Wight, T.N., Shapiro, S.D., Welgus,  
H.G., Wickline, S.A., Parks, W.C.  
Matrilysin is Expressed by Lipid-Laden Macrophages at Sites of Potential Rupture in  
Atherosclerotic Lesions and Localizes to Areas of Versican Deposition, a Proteoglycan  
Substrate for the Enzyme.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 9748-9753

Hayashida, K., Tanaka, M., Morita, H., Hayashi, F., Inada, T., Suzuki, H., Sakamoto, T.,  
Katsuragawa, M., Hibino, H., Kambara, H.  
Chlamydia pneumoniae seropositivity predicts the risk of restenosis after percutaneous  
transluminal angioplasty.  
*Heart Vessels* 16 (2002) 137-147

Hu, H., Pierce, G.N., Zhong, G.  
The atherogenic effects of *chlamydia* are dependent on serum cholesterol and specific to  
*Chlamydia pneumoniae*.  
*J. Clin. Invest.* 103 (1999) 747-753

Hyman, C.L., Augenbraun, M.H., Roblin, P.M., Sohachter, J., Hammerschlag, M.R.  
Asymptomatic respiratory tract infection with Chlamydia pneumoniae TWAR.  
*J. Clin. Microbiol.* 29 (1991) 2082-2083

Jackson, L.A.  
Description and status of the azithromycin and coronary events study (ACES).  
*J. Inf. Dis.* 181 (2000) 579-581

Kähler, J., Köster, R., Bräser, J.-H., Schäfer, P., Terres, W., Hamm, C.W., Meinertz, T.  
Bedeutung von Chlamydia pneumoniae in der Pathogenese der koronaren Herzerkrankung.  
*Z. Kardiol.* 88 (1999) 885-895

Kanse, S.M., Kost, C., Wilhelm, O.G., Andreasen, P.A., Preissner, K.T.  
The urokinase receptor is a major vitronectin binding protein on endothelial cells.  
*Exp. Cell Res.* 224 (1996) 344-353

- Kaukoronta-Tolvanen, S.S., Roni, T., Leionen, M., Saikku, P., Leitinen, K.  
Expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated by *Chlamydia pneumoniae*.  
*Microb. Pathog.* 21 (1996) 407-411
- Kleemola, M., Saikku, P., Visakorpi, R., Wang, S., Grayston, J.  
Epidemics of pneumonia caused by TWAR, a new Chlamydial organism, in military trainees  
in Finland.  
*J. Infect. Dis.* 157 (1988) 230-236
- Kol, A., Sukhova, G.K., Lichtman, A.H., Libby, P.  
Chlamydial Heat Shock Protein 60 Localizes in Human Atheroma and Regulates Macrophage  
Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Matrix Metalloproteinase Expression.  
*Circulation* 98 (1998) 300-307
- Kuo, C.C., Shor, A., Campbell, L.A., Fukushi, H., Patton, D.L., Grayston, J.T.  
Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries.  
*J. Infect. Dis.* 167 (1993) 841-849
- Kuo, C.C.  
Pathologic manifestation of chlamydial infection.  
*Am. Heart J.* 138 (1999) 496-499
- Kuo, C.C., Campbell, L.A.  
Detection of *Chlamydia pneumoniae* in Arterial Tissues.  
*J. Inf. Dis.* 181(suppl.) (2000) 432-436
- Leinonen, M., Linnanmaki, E., Mattila, K., Nieminen, M.S., Valtonen, V., Leirisalo-Repo,  
M., Saikku, P.  
Circulating immune complexes containing chlamydial lipopolysaccharide in acute myocardial  
infarction.  
*Microb. Pathog.* 1 (1990) 67-73
- Libby, P.  
The molecular bases of the acute coronary syndromes.  
*Circulation* 91 (1995) 2844-2850
- Libby, P.  
The interface of atherosclerosis and thrombosis: basic mechanisms.  
*Vasc. Med.* 3 III (1998) 225-229
- Libby, P.  
Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes.  
*Circulation* 104 (2001) 365-372
- Libby, P., Ridker, P.M., Maseri, A.  
Inflammation and Atherosclerosis.  
*Circulation* 105 (2002) 1135-1143
- Lijnen, H.R., Collen, D.  
Mechanisms of physiological fibrinolysis.  
*Bailliere`s Clin. Haematol.* 8 (1995) 277-290

Lijnen, H.R., Van Hoef, B., Lupu, F., Moons, L., Carmeliet, P., Collen, D.  
Function of plasminogen/ plasmin and matrixmetalloproteinase system after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes.  
*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (1998) 1035-1045

Lijnen, H.R., Soloway, P., Collen, D.  
Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 impairs arterial neointima formation after vascular injury in mice.  
*Circ. Res.* 85 (1999) 1186-1191

Lijnen, H.R., Lupu, F., Moons, L., Carmeliet, P., Goulding, D., Collen, D.  
Temporal and Topographic Matrix Metalloproteinase Expression after Vascular Injury in Mice.  
*Thromb. Haemost.* 81 (1999) 799-807

Lijnen, H.R.  
Extracellular proteolysis in the development and progression of atherosclerosis.  
*Biochem. Soc. Transactions* 30 (2002) 163-167

Lim, M., Martinez, T., Jablons, D., Cameron, R., Guo, H., Toole, B., Li, J.D., Basbaum, C.  
Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38.  
*FEBS Lett.* 441 (1998) 88-92

Löms Ziegler- Heitbrock, H.W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., Riethmuller, G.  
Establishment of a human cell line (MonoMac6) with characteristics of mature monocytes.  
*Int. J. Cancer* 41 (1988) 456-461

Löms Ziegler-Heitbrock, H.W., Schraut, W., Wendelgaß, P., Ströbel, M., Sternsdorf, T., Weber, C., Aepfelbacher, M., Ehlers, M., Schütt, C., Haas, J.G.  
Distinct patterns of differentiation induced in the monocytic cell line MonoMac6.  
*J. Leukoc. Biol.* 55 (1994) 73-80

Lusis, A. J.  
Atherosclerosis  
*Nature* 407 (2000) 233-241

Maass, M., Bartels, C., Engel, P.M., Mamat, U., Sievers, H.-H.  
Endovascular Presence of Viable *Chlamydia pneumoniae* Is a Common Phenomenon in Coronary Artery Disease.  
*JACC* 31 (1998) 827-832

Maass, M., Bartels, C., Kruger, S., Krause, E., Engel, P.M., Dahlhoff, K.  
Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease.  
*Atherosclerosis* 140 (1998) 25-35

Maass, M., Gieffers, J., Solbach, W.  
Atherogenically relevant cells support continuous growth of *Chlamydia pneumoniae*.  
*Herz* 25 (2000) 68-72

- Maass, M., Jahn, J., Gieffers, J., Dalhoff, K., Katus, H.A., Solbach, W.  
Detection of *Chlamydia pneumoniae* within peripheral blood monocytes of patients with unstable angina pectoris or myocardial infarction.  
*J. Inf. Dis.* 181 (2000) 449- 451
- Major, T.C., Liang, L., Lu, X., Rosebury, W., Bocan, T.M.A.  
Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) Is Induced Upon Monocyte Differentiation and Is Expressed in Human Atheroma.  
*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 1200-1207
- Matias-Roman, S., Gálvez, G.B., Genis, L., Yanez-Mo, M., de la Rosa, G., Sanchez-Mateos, P., Sanchez-Madrid, F., Arroyo, A.G.  
Membrane-type 1-matrix metalloproteinase is involved in migration of human monocytes and is regulated through their interaction with fibronectin or endothelium.  
*Blood* 105 (2005) 3956-3964
- May, A.E., Kanse, S.M., Chavakis, T., Preissner, K.T.  
Molecular interactions between the urokinase receptor and integrins in the vasculature.  
*Fibrinol. & Proteol.* 12 (1998) 205-210
- May, A.E., Kanse, S.M., Lund, L., Giesler, R.H., Imhof, B., Preissner, K.T.  
Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via  $\beta$ 2-integrins in vivo.  
*J. Exp. Med.* 188 (1998) 1029-1037
- May, A.E., Schmidt, R., Kanse, S.M., Chavakis, T., Stephens, R.W., Schoemig, A., Preissner, K.T., Neumann, F.J.  
Urokinase receptor surface expression regulates monocyte adhesion in acute myocardial infarction.  
*Blood* 100 (2002) 3611-3617
- May, A.E., Redecke, V., Grüner, S., Schmidt, R., Massberg, S., Miethke, T., Ryba, B., Da Costa, C.P., Schömig, A., Neumann, F.J.  
Recruitment of *Chlamydia pneumoniae*-infected macrophages to the carotid artery wall in noninfected, nonatherosclerotic mice.  
*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 789-794
- Mendall, M.A., Carrington, D., Strachan, D., Patel, P., Molineaux, N., Levi, J., Toosey, T., Camm, A.J., Northfield, T.C.  
Chlamydia pneumoniae- risk factors for seropositivity and association with coronary heart disease.  
*J. Infect.* 30 (1995) 121-128
- Mehta, J.L., Saldeen, T.G., Rand, K.  
Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease.  
*JACC* 31 (1998) 1217-1225
- Moazed, T.C., Kuo, C., Grayston, J.T.  
Murine models of Chlamydia pneumoniae infection and atherosclerosis.  
*J. Inf. Dis.* 175 (1997) 883-890

- Moazed, T.C., Kuo, C., Grayston, J.T., Campbell, L.A.  
Evidence of systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* via macrophages in the mouse.  
*J. Inf. Dis.* 177 (1998) 1322-1325
- Muhlestein, J.B., Hammond, E.H., Carlquist, J.F., Radicke, E., Thomson, M.J., Kargounis, L.A., Woods, M.L., Anderson, J.L.  
Increased incidence of *Chlamydia* species within the coronary artery of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease.  
*J. Am. Coll. Cardiol.* 27 (1996) 1555-1561
- Muhlestein, J.B., Anderson, J.L., Hammond, E.H., Zhao, L., Trehan, S., Schwobe, E.P., Carlquist, J.F.  
Infection With *Chlamydia pneumoniae* Accelerates the Development of Atherosclerosis and Treatment With Azithromycin Prevents It in a Rabbit Model.  
*Circulation* 97 (1998) 633-636
- Nagase, H.  
Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.  
*Biol. Chem.* 378 (1997) 151-160
- Neumann, F.J.  
*Chlamydia pneumoniae* – Atherosclerosis Link. A Sound Concept in Search for Clinical Relevance.  
*Circulation* 106 (2002) 2414-2416
- Netea, M.G., Selzman, C.H., Kullberg, B.J., Galama, J.M., Weinberg, A., Stalenhoef, A.F., Van der Meer, J.W., Dinarello, C.A.  
Acellular components of *Chlamydia pneumoniae* stimulate cytokine production in human blood mononuclear cells.  
*Eur. J. Immunol.* 30 (2000) 541-549.
- Nikkari, S.T., O'Brien, K.D., Ferguson, M, Hatsukami, T., Welgus, H.G., Alpers, C.E., Clowes, A.W.  
Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis.  
*Circulation* 92 (1995) 1393-1398
- Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., Okada, Y.  
Membrane- type 1- matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules.  
*J. Biol. Chem.* 272 (1997) 2446-2451
- Ouchi, K., Fujii, B., Kudo, S., Shirai, M., Yamashita, K., Gondo, T., Ishihara, T., Ito, H., Nakazawa, T.  
*Chlamydia pneumoniae* in Atherosclerotic and Nonatherosclerotic Tissue.  
*J. Inf. Dis.* 181 (2000) 441-443
- Pei, D.  
Identification and characterization of the fifth membrane- type matrix metalloproteinase MT5- MMP.  
*J. Biol. Chem.* 274 (1999) 8925-8932



Preissner, K.T., Kanse, S.M., May, A.E.

Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication.

*Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000) 621-628

Rajavashisth, T.B., Xu, X.P., Jovinge, S., Meisel, S., Xu, X.O., Chai, N.N., Fishbein, M.C., Kaul, S., Cercek, B., Sharifi, B., Shah, P.K.

Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: Evidence for activation by proinflammatory mediators.

*Circulation* 99 (1999) 3103-3109

Ross, R.

Atherosclerosis – An Inflammatory Disease.

*New Eng. J. Med.* 340 (1999) 115-126

Rothstein, N.M., Quinn, T.C., Madico, G., Gaydos, C.A., Lowenstein, C.J.

Effect of Azithromycin on Murine Arteriosclerosis Exacerbated by *Chlamydia pneumoniae*.

*J. Inf. Dis.* 183 (2001) 232-238

Rouis, M., Adamy, C., Duverger, M., Lesnik, P., Horellou, P., Moreau, M., Emmanuel, F., Caillaud, J.M., Laplaud, P.M., Datchet, C., Chapman, M.J.

Adenovirus- mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apoprotein E- deficient mice.

*Circulation* 100 (1999) 533-540

Saikku, P., Laionon, M., Mattila, K., Ekman, M.R., Nieminen, M.S., Makela, P.H., Huttunen, J.K., Valtonen, V.

Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart-disease and acute myocardial-infarction.

*Lancet* 29.2 (1988) 983-986

Sato, H., Takino, T., Kinoshita, T., Imai, K., Okada, Y., Stetler-Stevenson, W.G., Seiki, M.

Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membranetype-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP)

*FEBS* 385 (1996) 238-240

Sato, H., Okada, Y., Seiki, M.

Membrane- Type Matrix Metalloproteinases (MT- MMPs) in Cell Invasion.

*Thromb. Haemost.* 78 (1997) 497-500

Shor, A., Kuo, C.C., Patton, D.L.

Detection of *Chlamydia pneumoniae* in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques.

*S. Afr. Med. J.* 82 (1992) 158-161

Silence, J., Collen, D., Lijnen, H.R.

Reduced Atherosclerotic Plaque but Enhanced Aneurysm Formation in Mice With Inactivation of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) Gene.

*Circ. Res.* 90 (2002) 897-903

- Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A., Goldberg, G.I.  
Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase – Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease.  
*J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5331-5338
- Sukhova, G.K., Schonbeck, U., Rabkin, E., Schoen, F.J., Poole, A.R., Billingham, R.C., Libby, P.  
Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques.  
*Circulation* 99 (1999) 2503-2509
- Thom, D.H., Wang, S.P., Grayston, J.T., Siskovick, D.S., Stewart, D.K., Kronmal, R.A., Weiss, N.S.  
Chlamydia pneumoniae strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary artery disease.  
*Arterioscler. Thromb.* 11 (1991) 547-551
- Thom, D.H., Grayston, J.T., Siskovick, D.S., Wang, S.P., Weiss, N.S., Daling, J.R.  
Association of prior infection with Chlamydia pneumoniae and angiographically demonstrated coronary artery disease.  
*JAMA* 268 (1992) 68-72
- Thomas, G.N., Scheel, O., Koehler, A.P., Bassett, D.C., Cheng, A.F.  
Respiratory chlamydial infections in a Hong Kong teaching hospital and association with coronary heart disease.  
*Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 104 (1997) 30-33
- Vehmaan-Kreula, P., Puolakkainen, M., Sarvas, M., Welgus, H.G., Kovanen, P.T.  
Chlamydia pneumoniae induce secretion of the 92-kDa gelatinase by human monocyte-derived macrophages.  
*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 1-8
- Vink, A., Poppen, M., Schoneveld, A.H., Roholl, P., de Kleijn, D., Borst, C., Pasterkamp, G.  
Distribution of Chlamydia pneumoniae in the Human Arterial System and Its Relation to the Local Amount of Atherosclerosis Within the Individual.  
*Circulation* 103 (2001) 1613-1617
- Werb, Z.  
ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology.  
*Cell* 91 (1997) 439-442
- Westermarck, J., Kähäri, V.  
Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion.  
*FASEB J.* 13 (1999) 781-792
- Wong, Y.K., Dawkins, K.D., Ward, M.E.  
Circulating Chlamydia pneumoniae DNA as a predictor of coronary artery disease.  
*J. Am. Coll. Cardiol.* 34 (1999) 1435-1439

Wong, Y.K., Gallagher, P.J., Ward, M.E.  
*Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis.  
*Heart* 81 (1999) 232-238

Yamashita, K., Ouchi, K., Shirai, M., Gondo, T., Nakazawa, T., Ito, H.  
Distribution of *Chlamydia pneumoniae* Infection in the Atherosclerotic Carotid Artery.  
*Stroke* 29 (1998) 773-778

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt zuallererst Herrn PD Dr. med. Andreas May und Herrn Dr. med. Roland Schmidt für die hervorragende Betreuung.

Herr PD Dr. May, den ich im Rahmen einer Famulatur am Klinikum Rechts der Isar kennenlernte, bot mir spontan die Mitarbeit in der von ihm geleiteten Arbeitsgruppe an. Er überließ mir nicht nur das Thema der Arbeit, sondern begleitete auch alle Stadien der Durchführung bis hin zur kritischen Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Dr. Schmidt danke ich für die ausgezeichnete Einarbeitung in die theoretischen und praktischen Grundlagen und für unzählige wertvolle Anregungen und Hilfestellungen.

Frau Monika Höderle und Frau Judith Hellmold danke ich für die Hilfe bei der technischen Umsetzung.

Herrn Prof. Dr. med. T. Miethke, Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene am Klinikum Rechts der Isar danke ich sehr für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und der technischen Ausstattung, die für die Anzucht und Aufreinigung der Chlamydien notwendig waren.

Die vorliegende Arbeit entstand an der Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. A. Schömig. Ich danke Herrn Prof. Dr. Schömig für die Möglichkeit, diese Arbeit in der experimentellen Abteilung durchführen zu können, sowie für die dortigen hervorragenden Arbeitsbedingungen.