

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abt. Mikrobiologie  
und Hygiene der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

**Nachweis von *Chlamydia pneumoniae* bei Patienten  
mit atherosklerotischen Erkrankungen**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Albert-Ludwigs-Universität  
Freiburg i. Br.

Vorgelegt 2002

von Alexander Wolfgang Lux  
geboren in Singen /Hohentwiel

Dekan	Prof. Dr.rer.nat. M. Schumacher
1.Gutachter	PD Dr.med Heike Freidank
2. Gutachter	PD Dr. med. Thomas Els
Jahr der Promotion	2003

Gewidmet meinem Vater Wolfgang Lux  
der mich das Staunen gelehrt hat  
über die Tausend Wunder der Natur.

## Danksagung

Am Zustandekommen dieser Arbeit waren viele interessierte und hilfsbereite Menschen beteiligt, denen ich hier gesondert danken möchte:

- Herrn Prof.Dr.W. Bredt für die Möglichkeit zur Promotion in seiner Abteilung
- Frau PD Dr. Heike Freidank für die Bereitstellung des Themas und die unkomplizierte Betreuung
- Herrn PD Dr.Thomas Els für die Zweitkorrektur und die Mitbetreuung der Probensammlung in der Neurologie
- Herrn Dr. Peter Dern für die Mitbetreuung der Probensammlung in der Chirurgie
- Herrn Prof. Dr. C. Bode, Herrn PD Dr. T. Nordt und Herrn M.Rave für die Ermöglichung der Probensammlung in der kardiologischen Klinik
- Dem Pflege-und Ärzteteam des Herzkatheterlabors und der kardiologischen Stationen von Frerichs III und de la Camp für die Unterstützung der Probensammlung
- Frau Heike Legrand, Frau Daniela Lörch und Frau Dr. Margit Wiedmann – Al Ahmad für die Einführung in die Methodik, die Durchführung des MIF und manchen guten Tipp
- Frau Christine Kießling, Frau Andrea Pfaff und Frau Heike Wölk für die gute Arbeitsatmosphäre im PCR-Labor und die Sequenzierungen
- Frau PD Dr. U. Meyer-König für die Bereitstellung von Kontrollproben aus dem CMV-Labor
- Meiner Familie und dabei im Besonderen meiner Frau Andrea, die, trotz eigener beruflicher Belastung, für wohligen Ausgleich nach einem langen Labortag zu sorgen mußte

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt publiziert:

H.M.Freidank, A.Lux, P.Dern, T.Els (2000): *Chlamydia pneumoniae* DNA in Peripheral Venous Blood Samples from Patients with Carotid Artery Stenosis  
IN: Proceedings, Fourth Meeting of the European Society for Chlamydial Research, Helsinki, 98

H.M.Freidank, A.Lux, P.Dern, U.Meyer-König, T.Els (2002) *Chlamydia pneumoniae* DNA in Peripheral Venous Blood Samples from Patients with Carotid Artery Stenosis *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21, 60-62

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>1.1. TAXONOMIE UND KLASSIFIKATION</b>	<b>3</b>
<b>1.2. KLINISCHES BILD UND ASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN</b>	<b>5</b>
<b>1.3. BIOLOGIE</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1. ENTWICKLUNGSZYKLUS UND MORPHOLOGIE</b>	<b>7</b>
<b>1.3.2. ANTIGENE STRUKTUREN</b>	<b>8</b>
<b>1.3.3. WIRTSZELLINTERAKTION UND PATHOGENESE</b>	<b>9</b>
<b>1.3.4. EPIDEMIOLOGIE VON <i>C.PNEUMONIAE</i></b>	<b>10</b>
<b>1.4. DIAGNOSTIK</b>	<b>11</b>
<b>1.4.1. SEROLOGISCHE METHODEN</b>	<b>11</b>
<b>1.4.2. DIREKTE NACHWEISMETHODEN</b>	<b>11</b>
<b>1.5. THERAPIE</b>	<b>13</b>
<b>1.6. CHLAMYDIA PNEUMONIAE UND ATHEROSKLEROSE</b>	<b>14</b>
<b>1.7. ZIEL DIESER ARBEIT</b>	<b>16</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
<b>2.A NACHWEIS VON <i>C.PNEUMONIAE</i>-DNA MITTELS POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)</b>	<b>17</b>
<b>2.A.1. DNA-EXTRAKTION</b>	<b>17</b>
<b>2.A.1.1. BENÖTIGTE MATERIALIEN</b>	<b>17</b>
<b>2.A.1.2. PROBENGEWINNUNG</b>	<b>19</b>
<b>2.A.1.2.1. BLUTPROBEN</b>	<b>19</b>
<b>2.A.1.2.2. GEWEBEPROBEN</b>	<b>19</b>
<b>2.A.1.3. DNA-EXTRAKTION</b>	<b>19</b>
<b>2.A.1.3.1. DNA-EXTRAKTION AUS BLUTPROBEN</b>	<b>19</b>
<b>2.A.1.3.1.1. GEWINNUNG DER LEUKOZYTENFRAKTION (BUFFY COAT)</b>	<b>19</b>
<b>2.A.1.3.1.2. DNA-EXTRAKTION AUS BUFFY COAT</b>	<b>20</b>
<b>2.A.1.3.2. DNA-EXTRAKTION AUS GEWEBEPROBEN</b>	<b>21</b>
<b>2.A.1.4. ETHANOL-FÄLLUNG DER DNA</b>	<b>21</b>
<b>2.A.2. DNA-AMPLIFIKATION MITTELS POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)</b>	<b>22</b>
<b>2.A.2.1. BENÖTIGTE MATERIALIEN</b>	<b>23</b>
<b>2.A.2.2. ZUSAMMENSETZUNG DES REAKTIONSANSATZES</b>	<b>24</b>
<b>2.A.2.3. DURCHFÜHRUNG UND AMPLIFIKATIONSBEDINGUNGEN</b>	<b>25</b>
<b>2.A.3. POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE</b>	<b>26</b>
<b>2.A.3.1. BENÖTIGTE MATERIALIEN</b>	<b>26</b>
<b>2.A.3.2. GELHERSTELLUNG UND DURCHFÜHRUNG DER ELEKTROPHORESE</b>	<b>28</b>
<b>2.A.3.3. FÄRBUNG DER DNA-FRAGMENTE</b>	<b>29</b>
<b>2.A.3.3.1. BENÖTIGTE MATERIALIEN</b>	<b>29</b>
<b>2.A.3.3.2. SILBERFÄRBUNG NACH GRESSHOFF</b>	<b>29</b>
<b>2.A.4. ZYKLISCHES SEQUENZIEREN DOPPELSTRÄNGIGER DNA-FRAGMENTE</b>	<b>31</b>
<b>2.B MIKROIMMUNFLUORESCENZTEST (MIF)</b>	<b>33</b>
<b>2.B.1. BENÖTIGTE MATERIALIEN</b>	<b>33</b>
<b>2.B.2. DURCHFÜHRUNG DES MIF</b>	<b>34</b>
<b>2.B.2.1. OBJEKTTRÄGERREINIGUNG</b>	<b>34</b>
<b>2.B.2.2. ANTIGENAUFTRAGUNG</b>	<b>34</b>
<b>2.B.2.3. SERUMVERDÜNNUNG UND AUFTRAGUNG</b>	<b>34</b>
<b>2.B.2.4. ERSTE INKUBATION, WASCHEN UND TROCKNEN</b>	<b>35</b>
<b>2.B.2.5. AUFTRAGEN DER ANTI-HUMAN-ANTIKÖRPER</b>	<b>35</b>
<b>2.B.2.6. ZWEITE INKUBATION, WASCHEN UND TROCKNEN</b>	<b>35</b>
<b>2.B.3. MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>36</b>
<b>2.B.3.1. BEURTEILUNGSKRITERIEN FÜR DEN MIF</b>	<b>36</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
<b>3.A. CAROTISSTUDIE</b>	<b>38</b>
<b>3.A.1.1. PATIENTENPROBEN</b>	<b>38</b>

<b>3.A.1.2. ERGEBNISSE DER PCR-UNTERSUCHUNGEN AN PATIENTENPROBEN</b>	<b>38</b>
<b>3.A.1.3. ERGEBNISSE DES MIF DER PATIENTENPROBEN</b>	<b>39</b>
<b>3.A.2. KONTROLLPROBEN</b>	<b>40</b>
<b>3.A.2.1. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN AN KONTROLLPROBEN</b>	<b>40</b>
<b>3.A.2.2. TABELLARISCHE ERGEBNISÜBERSICHT</b>	<b>41</b>
<b>3.A.3. RISIKOFAKTOREN DER PATIENTEN MIT CAROTISSTENOSE</b>	<b>42</b>
<b>3.B. PTCA-STUDIE</b>	<b>43</b>
<b>3.B.1.1. PATIENTENPROBEN</b>	<b>43</b>
<b>3.B.1.2. ERGEBNISSE DER PCR- UNTERSUCHUNGEN AN PATIENTENPROBEN</b>	<b>43</b>
<b>3.B.1.3. ERGEBNISSE DES MIF DER PATIENTENPROBEN</b>	<b>44</b>
<b>3.B.2. KONTROLLPROBEN</b>	<b>44</b>
<b>3.B.2.1. ERGEBNISSE DER KONTROLLPROBEN</b>	<b>44</b>
<b>3.B.3. TABELLARISCHE ERGEBNISÜBERSICHT</b>	<b>45</b>
<b>3.B.4. RISIKOFAKTOREN DER PATIENTEN IN DER PTCA-STUDIE</b>	<b>46</b>
<b>4. DISSKUSSION</b>	<b>47</b>
<hr/>	
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>58</b>
<hr/>	
<b>6. LITERATURANGABEN</b>	<b>59</b>
<hr/>	

## 1. EINLEITUNG

*Chlamydia pneumoniae* wurde 1989 als neue Spezies in die Gattung Chlamydia eingruppiert (Grayston et al., 1989). Das sich obligat intrazellulär vermehrende Bakterium wurde insbesondere nach ersten Assoziationen mit atherosklerotischen Erkrankungen Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

### 1.1. Taxonomie und Klassifikation

Chlamydien gehören zur Ordnung der Chlamydiales, die die Familie Chlamydiaceae mit einer Gattung, Chlamydia, umfaßt. Diese enthält die drei humanpathogenen Arten *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* und die tierpathogene Art *Chlamydia pecorum* (Fukushi & Hirai, 1992; Herring, 1993).

Die einzelnen Arten unterscheiden sich in der Morphologie, den biochemischen Eigenschaften, den serologischen Reaktionen des Wirtes und durch ihr klinisches Erscheinungsbild. Innerhalb der eigenen Spezies finden sich hochgradige DNA-Homologien (92-100%), gegenüber verwandten Spezies finden sich Übereinstimmungen in deutlich geringerem Maß (Cox et al., 1988; Fukushi & Hirai, 1989, 1992).

*C.pneumoniae* wurde bereits 1965 aus dem Konjunktivalabstrich eines Kindes in Taiwan isoliert (Kuo et al., 1986) und als atypischer *C.psittaci*-Stamm (TW-183) betrachtet. Später wurde in den USA ein weiterer Stamm (AR-39) aus dem Rachenabstrich eines Patienten mit Pharyngitis isoliert (Grayston et al., 1986). Bis zur Anerkennung der Spezies *C.pneumoniae* wurde die Art als „TWAR“ benannt.

*C.pneumoniae* ist ein humanpathogener Erreger, vom dem bisher kein anderes Reservoir als der Mensch bekannt ist. Beschriebene Isolate aus einem Koalabären und einem Pferd (Kaltenboeck et al., 1993; Storey, 1993) sollen als Biovare von *C.pneumoniae* angesehen werden. (Everett et al., 1999)

Neuere Untersuchungen der ribosomalen 16S RNA verschiedener Spezies führten zu der Forderung nach einer Neugruppierung der Ordnung

Chlamydiales. So soll *C.pneumoniae* gemeinsam mit *C.psittaci* , *C.pecorum* und drei weiteren neubeschriebenen tierpathogenen Spezies in die Gattung *Chlamydophila* eingruppiert werden. *C.trachomatis* würde mit zwei weiteren neubeschriebenen tierpathogenen Spezies die Gattung *Chlamydia* bilden. Außerdem sollen zwei weitere Familien, *Simkaniaceae* und *Parachlamydiaceae* in die Ordnung Chlamydiales aufgenommen werden (Everett et al., 1999)

Da die Neuordnung noch nicht allgemein akzeptiert ist, wird in dieser Arbeit die bisherige Klassifikation beibehalten.

## 1.2. Klinisches Bild und assoziierte Erkrankungen

### *Chlamydia pneumoniae*

*Chlamydia pneumoniae* ist ein nach bisherigem Wissen ausschließlich humanpathogener Erreger akuter respiratorischer Infektionen wie Sinusitis, Otitis media, Pharyngitis, Bronchitis und Pneumonie (Grayston et al., 1986). Dies erklärt sich aus der Fähigkeit des Erregers, Epithelien des Respirationstraktes zu infizieren (Falsey & Walsh, 1993). Die Mehrheit der Infektionen verläuft subklinisch oder leicht, jedoch mit einer Neigung zur Chronifizierung (Saikku, 1992; Jantos et al., 1993), Infektionen mit tödlichem Ausgang werden nur selten beobachtet.

Des Weiteren wird *C.pneumoniae* mit anderen akuten Erkrankungen in Verbindung gebracht, wie mit Endokarditis (Marrie et al., 1990), Vaskulitis (Beaty et al., 1991) und reaktiver Arthritis (Gran et al., 1993).

Serologische Studien geben Hinweise auf eine Assoziation mit dem Erythema nodosum (Erntell et al., 1989) und der Sarkoidose (Black et al., 1992).

Auch chronische Erkrankungen des Respirationstrakts wie Asthma bronchiale und chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) sind mit *C.pneumoniae* in Verbindung gebracht worden (Hahn et al., 1991, 1994; Emre et al., 1995; Herten, 1996).

Neurologische Erkrankungen wie der M. Alzheimer und die Multiple Sklerose wurden im Zusammenhang mit *C.pneumoniae* kontrovers diskutiert (Balin et al., 1998; Sriram et al., 1998; Stille & Stephan, 1998).

Gegenstand vieler Untersuchungen wurde der Zusammenhang zwischen einer *C.pneumoniae*-Infektion und dem Auftreten atherosklerotischer Veränderungen. Erste Hinweise erbrachten seroepidemiologische Studien (Saikku et al., 1988). Andere Nachweismethoden wie Polymerasekettenreaktion (PCR), Immunhistochemie (IHC), Direktanzucht aus atherosklerotischem Gewebe und Tiermodelle bestätigten diesen Zusammenhang (Danesh et al., Review, 1997).

### *Chlamydia psittaci*

*Chlamydia psittaci* ist der Erreger der Ornithose (Psittakose, Papageienkrankheit) und mit *C. pneumoniae* am nächsten verwandt. *C. psittaci* löst bei Vögeln und anderen Tieren Infektionen des Respirations- und Intestinaltrakts aus, auch Konjunktividen kommen vor. Durch Inhalation von Aerosolen oder erregerehaltiger Stäube kann auch der Mensch erkranken. Das klinische Bild reicht von asymptomatischem Verlauf bis zur schweren atypischen Pneumonie.

### *Chlamydia trachomatis*

*Chlamydia trachomatis* kommt in den drei Biovaren Trachoma, Lymphogranuloma venereum (LGV) und einem tierpathogenen Biovar, dem Erreger der Mauspneumonie (MoPn), vor. Der Biovar Trachoma wird in die Serovare A-K, sowie Ba, Da und Ia unterteilt; die Krankheitsbilder umfassen follikuläre Keratokonjunktivitis (Trachom), Einschlußkonjunktivitis und Genitalinfektionen wie Urethritis, Zervizitis und Salpingitis.

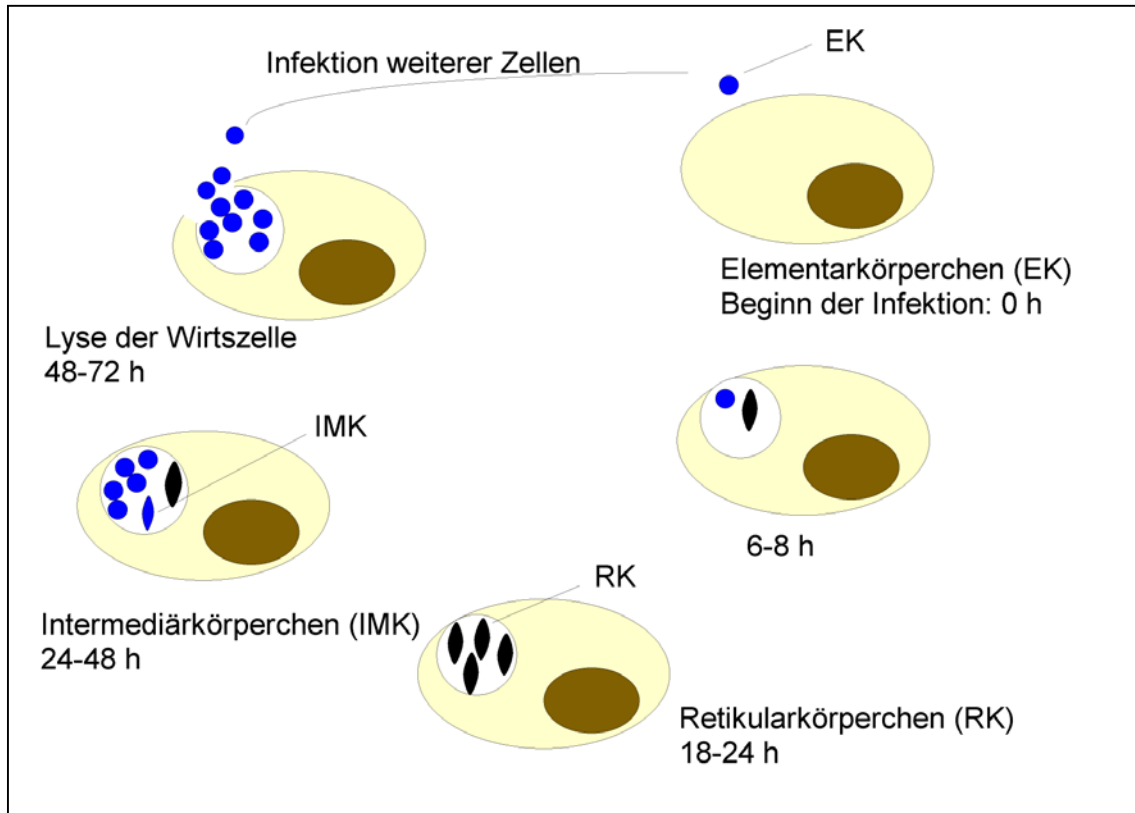
Der Biovar LGV umfaßt die Serotypen L<sub>1</sub>-L<sub>3</sub> sowie L<sub>2a</sub> und ist Auslöser des Lymphogranuloma venereum, einer Genitalinfektion mit Ulcera und begleitender Lymphadenitis (Stephens, 1999; Kayser et al., 1998).

### 1.3. Biologie

Chlamydien sind obligat intrazellulär lebende Bakterien, die sich von Viren durch ein größeres Genom, DNA- und RNA-Gehalt und eine den gramnegativen Bakterien ähnliche Zellwand unterscheiden.

#### 1.3.1. Entwicklungszyklus und Morphologie

Chlamydien machen einen zweiphasigen Entwicklungszyklus durch, in dessen Verlauf aus extrazellulär überlebensfähigen, metabolisch inaktiven, infektiösen Elementarkörperchen (EK) die intrazellulären, metabolisch aktiven und nicht infektiösen Retikularkörperchen (RK) entstehen. In Form der RK vermehren sich die Chlamydien durch Zweiteilung, bis sie sich durch die Übergangsform der Intermediärkörperchen wieder in EK umwandeln. Dieser Zyklus dauert je nach Chlamydienart 48-72 Stunden.



Die EK sind 300 nm klein und weisen eine rigide Zellwand auf. Diese enthält im Gegensatz zu gramnegativen Bakterien Peptidoglykane nur in sehr geringen Mengen, wie durch den Nachweis von N-Acetyl-Muraminsäure in Spuren bewiesen werden konnte (Su et al., 1985). In Untersuchungen des Genoms konnten jedoch überraschenderweise viele der für die Peptidoglykansynthese notwendigen Gene nachgewiesen werden (Stephens et al., 1998). Für die Stabilität der EK-Membran reichen die geringen nachweisbaren Peptidoglykanmengen allerdings nicht aus. Hierfür sind die über Disulfidbrücken vernetzten cysteinreichen Membranproteine OmcA, OmcB und das major outer membrane proteine (MOMP), zuständig (Newhall&Jones, 1983). Wie sich diese feinstrukturell zusammenlagern, ist bisher nicht bekannt, jedoch werden sie alle dem äußeren Membrankomplex zugeschrieben.

Die RK sind mit 800-1000 nm deutlich größer und enthalten keine cysteinreichen Membranproteine. Das MOMP ist im Gegensatz zu den EK nicht durch Disulfidbrücken stabilisiert, was eine Erklärung für die höhere Permeabilität der RK gegenüber der EK sein könnte. In den RK findet die RNA-, DNA- und Proteinsynthese statt, die Vermehrung erfolgt durch Zweiteilung der RK mit einer Verdoppelungszeit von ca. 2 Stunden (Moulder, 1991). Während dieser Phase lassen sich eine große Anzahl an Enzymen nachweisen, die die funktionelle Kapazität besitzen ATP und Reduktionspotential zur Verfügung zu stellen (Iliffe-Lee & McClarty, 1999). Die bisherige Annahme, Chlamydien seien ausschließlich „Energieparasiten“ (Moulder, 1991) ist daher angezweifelt worden.

### **1.3.2. Antigene Strukturen**

Chlamydien besitzen einerseits gattungsspezifische und andererseits speziesspezifische Antigene. Gattungsspezifische Antigene sind das Lipopolysaccharid (LPS) der Zellwand und Heat Shock Proteine (Hsp) der Größen 60 kDa (Hsp 60) und 70 kDa (Hsp 70).

Für *C.pneumoniae* wurden speziesspezifische Antigene in Form verschiedener Proteine zwischen 53 und 98 kDa Größe gefunden (Campbell et al., 1990; Freidank et al., 1993; Iijima et al., 1994). Die Funktion dieser Proteine ist aber bisher unbekannt.

Das MOMP ist für *C.trachomatis* und *C.psittaci* ein immundominantes, serovar-variables Antigen, nicht jedoch für *C.pneumoniae* (Campbell et al., 1990). Dies könnte mit dem Fehlen variabler Sequenzen im für das MOMP codierenden Gen von *C.pneumoniae* begründet werden (Gaydos et al., 1992), da die variablen Sequenzen im immundominanten MOMP der anderen Chlamydienarten dessen Serovar-Spezifität bedingen.

### **1.3.3. Wirtszellinteraktion und Pathogenese**

Chlamydien müssen als obligat intrazellulär lebende Bakterien verschiedene Strategien entwickelt haben, die ihnen den Eintritt und den unbeschädigten Aufenthalt in der Wirtszelle ermöglichen.

Für den ersten notwendigen Schritt, die Adhäsion des EK an die Wirtszelle, wurden verschiedene Strukturen der chlamydialen und der Wirtszellmembran verantwortlich gemacht, letztlliche Klarheit herrscht darüber jedoch noch nicht.

So wurden auf seiten der Chlamydien das MOMP (Su et al., 1996) und das OmcB (Ting et al., 1995) als potentielle Liganden von Glykosaminoglykanen genannt, welche ihrerseits als Brücke zur Bindung an Proteoglykane der Wirtszelle dienen könnten. Diese spielen bei der Adhäsion vieler Erreger an die Wirtszelle eine Rolle (Rostand&Esko, 1997).

Auch der Eintrittsweg ist nicht voll aufgeklärt. Allerdings gibt es Hinweise auf einen aktin-abhängigen Prozeß, der endocytoseähnlich ablaufen soll (Moulder, 1991; Boleti et al., 1999).

Nach dem Eintritt in die Wirtszelle verhindern Chlamydien die Fusion des Phagosoms mit Lysosomen (Hackstadt et al., 1998). Dies scheint eine Funktion von Membranbestandteilen der EK zu sein, da aufgereinigte chlamydiale Zellwandbestandteile ebenfalls endozytiert werden und verzögert mit Lysosomen verschmelzen (Levy & Moulder, 1982). So gewinnen Chlamydien Zeit, sich in die stoffwechselaktive Form der RK umzuwandeln und über die Expression eigener Genprodukte in den Wirtszellstoffwechsel einzugreifen.

#### **1.3.4. Epidemiologie von *C.pneumoniae***

Infektionen mit *C.pneumoniae* treten jahreszeitlich unabhängig auf und kommen weltweit vor. Dabei entfallen 15 Prozent der ambulant erworbenen Lungenentzündungen auf *C.pneumoniae* (Grayston, 1992a). Die Infektiosität ist eher niedrig, Hinweise für periodische Häufungen gefolgt von 4-5jährigen niedrigen Inzidenzen wurden beobachtet.

Die Seroprävalenzen in verschiedenen Altersgruppen unterscheiden sich. Im Kleinkindesalter liegen noch geringe Durchseuchungsraten vor, während der Adoleszenz jedoch erfolgt ein steiler Anstieg. In der Altersgruppe der 15-19jährigen liegt dann eine Durchseuchungsrate von fast 70 Prozent vor. Im Erwachsenenalter besteht eine hohe Antikörperrate, im höheren Lebensalter steigt diese noch an, so daß in der Altersgruppe der über 70jährigen die höchste Durchseuchung mit 80 Prozent Seropositiven gefunden wird (Grayston,1992b; Freidank,1998). Dies läßt sich durch wiederholte Infektionen während des Lebens erklären, da tierexperimentelle Befunde für eine Primärinfektion lediglich auf partiellen Schutz hindeuten (Yang et al.,1993).

Die Primärinfektion ist dabei durch die Bildung von IgM und IgG-Antikörpern gekennzeichnet, während eine Reinfektion mit raschem Anstieg von IgG und IgA ohne Bildung von IgM einhergeht (Surcel et al.,1993).

## **1.4. Diagnostik**

Die Diagnostik von Chlamydieninfektionen umfaßt serologische Methoden und Verfahren zum direkten Erregernachweis..

### **1.4.1. Serologische Methoden**

Die Serologie in der Diagnostik von Chlamydieninfektionen ist durch die schwierige Anzucht des Erregers nach wie vor unverzichtbar.

In der Komplementbindungsreaktion (KBR) können dabei gattungsspezifische Antikörper nachgewiesen werden, die gegen das Lipopolysaccharid gerichtet sind. Eine Speziesdiagnose ist daher mit der KBR nicht möglich.

Im Mikroimmunfluoreszenztest (MIF) werden speziesspezifische Antikörper der Klassen IgG, IgA und IgM nachgewiesen. (S. 2.B.)

### **1.4.2. Direkte Nachweismethoden**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) erlaubt die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Für *C.pneumoniae* wurden verschiedene speziesspezifische Primerpaare beschrieben. (Campbell et al., 1992 ; Black et al., 1994; Khan&Potter, 1996).

Die hohe Sensitivität erlaubt den Nachweis geringer Mengen an Erreger-DNA, selbst wenn der Erreger bereits abgestorben ist. Allerdings besteht durch die hohe Empfindlichkeit auch die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen durch Kontamination.

Die Anzucht von *C. pneumoniae* ist schwierig und gelingt deshalb nur unregelmäßig. Daher spielt sie in der Routinediagnostik eine untergeordnete Rolle. Die Anzucht erfolgt in Zellkultur (Kuo&Grayston,1990; Wong et al., 1992),

die sich bildenden Einschlüsse werden mit einem fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörper sichtbar gemacht.

Eine Erregerisolation durch Zellkultur gilt als Beweis für im Untersuchungsmaterial befindliche, lebensfähige Erreger. Allerdings schließt eine negative Zellkultur dies nicht aus, da Chlamydien sehr empfindlich auf unzulängliche Bedingungen bei Probenentnahme und Transport reagieren.

## 1.5. Therapie

Die Therapie von Chlamydieninfektionen erfolgt bisher empirisch, da über die Wiederanzucht von *C.pneumoniae* nach erfolgter Antibiotikatherapie nur lückenhafte Daten vorliegen. In den meisten Fällen wurde der Therapieerfolg an der Besserung der klinischen Symptome oder durch sinkende Antikörpertiter gemessen, obwohl dies eine persistierende Infektion nicht ausschließt (Hammerschlag et al.,1992). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß *C.pneumoniae* in zirkulierenden Monozyten von Patienten, die mit Acithromycin behandelt wurden, überleben kann (Maass et al, 2001).Hier sollten Studien Klarheit bringen, die den Erfolg einer Antibiotikatherapie gegen *C.pneumoniae* mittels Anzucht des Erregers nach abgeschlossener Antibiose überprüfen.

Angewandt werden zur Zeit Tetrazykline, Makrolide und Chinolone. Obwohl allgemeingültige Therapieempfehlungen nicht vorliegen, gibt es Schemata, die sich klinisch als effektiv erwiesen und deshalb weit verbreitet sind.

So können Erwachsene mit 2g Doxycyclin oder Erythromycin täglich für 2-3 Wochen behandelt werden, alternativ kommen 1,5 g Azithromycin täglich für 5 Tage in Betracht. Kinder können mit Erythromycin-Saft (40 mg/kg Körpergewicht) über 10-14 Tage therapiert werden (Hammerschlag, 1994).

Neuere Chinolone wie Gemifloxacin sind in vitro ebenfalls gut gegen *C.pneumoniae* wirksam und kommen wegen ihrer Wirksamkeit gegen andere Erreger ambulant erworbener Pneumonien zur Therapie derselben in Betracht. (Bartlett et al., 1998 ; Hammerschlag, 2000).

### 1.6. *Chlamydia pneumoniae* und Atherosklerose

Die Assoziation von *Chlamydia pneumoniae* mit atherosklerotischen Erkrankungen wird durch vier verschiedenen Indizienketten belegt:

- Seroepidemiologische Studien
- Direktnachweis in atherosklerotisch veränderten Gefäßen
- Antibiotikastudien
- Tiermodelle.

Erste Hinweise erbrachte eine seroepidemiologische Studie, die einen Zusammenhang zwischen erhöhten Antikörpertitern gegen *C. pneumoniae* und koronarer Herzkrankheit bzw. Herzinfarkt postulierte (Saikku et al., 1988). Weitere ähnliche Studien folgten, wobei 21 von 27 Studien eine positive Assoziation ergaben (Ward, 1999).

Der Direktnachweis des Erregers in veränderten Gefäßen erfolgt mittels PCR, durch Anzucht, immuncytochemische Anfärbung oder durch Mikroskopie. Hier liegen ebenfalls mehrere Studien vor, so daß zusammenfassend in 52 Prozent der veränderten gegenüber 6 Prozent der Kontrollgefäße *Chlamydia pneumoniae* nachgewiesen werden konnte (Brunham, 1999).

Nachdem eine Antibiotikastudie mit Azithromycin (Gupta et al., 1997) ein Absinken der Antikörpertiter gegen *C.pneumoniae* und ein damit verbundenes niedrigeres Erkrankungsrisiko für kardiovaskuläre Ereignisse belegte, wurden großangelegte Multicenterstudien geplant, deren endgültiges Ergebnis noch nicht vorliegt (Gurfinkel, 2000; Dunne, 2000; Jackson, 2000; Anderson&Muhlestein, 2000). Im März 2002 wurden auf dem Kongreß des American College of Cardiology die Ergebnisse der WIZARD-Studie (**W**eekly **I**ntervention with **Z**ithromax for **A**therosclerosis and its **R**elated **D**isorders) vorgestellt, die jedoch nur für Raucher und Diabetiker einen positiven Trend bezüglich der Verminderung kardiovaskulärer Ereignisse nach Erstinfarkt erbrachte (Deutsche Ärztezeitung, 20.02.2002).

Tiermodelle sollen Teilaspekte der Interaktion von Erreger und Gefäßendothel bzw. Wirtsorganismus der Untersuchung zugänglich machen. So wurde in einem Mausmodell nach nasaler Inokulation von *C. pneumoniae* der Erreger in atherosklerotischen Arealen der Aorta nachgewiesen (Moazed et al., 1997). Ebenso deutet die beschleunigte Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen bei Kaninchen nach Chlamydieninfektion in dieselbe Richtung. Azithromycin war dabei in der Lage, diese Veränderungen aufzuhalten (Muhlestein et al., 1998).

Das Vorhandensein von *Chlamydia pneumoniae* in einem Teil der atherosklerotisch veränderten Gefäßen ist unzweifelhaft. Welche Rolle der Erreger aber im Gesamtzusammenhang der Atherosklerose spielt, ist damit noch nicht beantwortet. Es werden vier Pathogenitätsmodelle diskutiert, dabei kommen *Chlamydia pneumoniae* folgende Rollen zu:

- Auslösendes Agens
- Beschleunigung/Aufrechterhaltung der Atherosklerose
- Auslöser einer atherogenen Wirtsreaktion
- „innocent bystander“, also „Trittbrettfahrer“.

Die nähere Erforschung des Erregers und seiner Auswirkungen auf den Wirtsorganismus ist vor dem Hintergrund der enormen Verbreitung atherosklerotischer Erkrankungen notwendig. Selbst wenn nur ein kleiner Teil derselben durch *C. pneumoniae* (mit)bedingt wären, könnte eine daran angepaßte Therapie eine Verbesserung der Lebensqualität des Patienten und gleichzeitig Kostenersparnis für das Gesundheitssystem bedeuten.

### **1.7. Ziel dieser Arbeit**

*Chlamydia pneumoniae* wurde bisher in mehreren Studien in atherosklerotisch verändertem Gefäßgewebe nachgewiesen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich der Erreger auch im Blut von Atherosklerosepatienten nachweisen läßt. Insbesondere für die hier untersuchten Patienten mit Carotisstenose liegen dazu bisher keine uns bekannten Daten vor.

Des weiteren sollte untersucht werden, ob die Durchführung einer Coronarangiographie bzw. einer perkutanen transluminalen Coronarangioplastie (PTCA) die Nachweisbarkeit von *Chlamydia pneumoniae*-DNA beeinflußt. Dies ist insofern von Bedeutung, als eine Manipulation im Plaquebereich zu einer Freisetzung des Erregers führen könnte, welche sich in einer veränderten Nachweishäufigkeit nach PTCA äußern würde.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.A Nachweis von *C.pneumoniae*-DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### 2.A.1. DNA-Extraktion

##### 2.A.1.1. Benötigte Materialien

##### 2 SP-Transportmedium

Saccharose	68,46 g	(Roth, Karlsruhe)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,088 g	(E.Merck, Darmstadt)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,088 g	(E.Merck, Darmstadt)
Rinderalbumin	2,0 g	

Jeweils lösen in 60 ml aqua bidest. , mischen, mit HCl auf pH 6,9 einstellen und mit aqua bidest auf 1 Liter auffüllen.

Antibiotikazugabe:

Streptomycin	50 mg/l
Vancomycin	100 mg/l
Nystatin	25 000 I.E./ml

**T<sub>1/2</sub>E-Puffer**

0,1 M Tris-HCl	10 ml
0,1 M EDTA	0,5 ml
aqua bidest.	89,5 ml

Mit NaOH auf pH 8 einstellen, anschließend sterilfiltrieren.

## **2.A.1.2. Probengewinnung**

### **2.A.1.2.1. Blutproben**

Den Patienten wurden peripher-venöse Blutproben entnommen und durch in den Entnahmeröhrchen befindliches Kalium-EDTA ungerinnbar gemacht. Bis zur Abholung wurden die Proben bei 4°C gekühlt und am gleichen Tag weiterverarbeitet.

### **2.A.1.2.2. Gewebeproben**

Als Ausgangsmaterial dienten atherosklerotisch veränderte Gefäße, die in der Abteilung Herz- und Gefäßchirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik Freiburg bei Gefäßoperationen gewonnen wurden. Das Gewebe wurde unter sterilen Bedingungen in 2 SP-Medium überführt und entweder bei -70°C tiefgefroren oder sofort weiterverarbeitet.

## **2.A.1.3. DNA-Extraktion**

### **2.A.1.3.1. DNA-Extraktion aus Blutproben**

Die gewonnenen Blutproben wurden noch am Entnahmetag weiterverarbeitet. Hierzu wurde zunächst die Leukozytenfraktion separiert, um daraus die DNA zu extrahieren.

#### **2.A.1.3.1.1. Gewinnung der Leukozytenfraktion (Buffy Coat)**

Buffy Coat ist eine Fraktion angereicherter Leukozyten, die aus Vollblut gewonnen wird. Die DNA-Ausbeute liegt im Vergleich zur Extraktion aus Vollblut um den Faktor fünf bis zehn höher.

Vollblut wird hierzu für 10 Minuten mit 3300 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation werden drei verschiedene Fraktionen sichtbar: Die obere, klare enthält Plasma, die mittlere ist der Buffy Coat mit angereicherten Leukozyten, die untere enthält konzentrierte Erythrozyten.

#### **2.A.1.3.1.2. DNA-Extraktion aus Buffy Coat**

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QUIAGEN QIAmp Blood Mini Kit nach Herstellerangaben.

Wesentliche Schritte dabei sind:

-200 µl Buffy Coat

mit

-20 µl QUIAGEN Protease

und

-200 µl Lysispuffer AL vermischen und für 10 Minuten bei 56°C inkubieren.

Nach Zugabe von

-200µl Ethanol

Gemisch in Extraktionsäule geben und bei 6000 x g für 1 Minute zentrifugieren.

Die DNA bindet an der Säule, das Zentrifugat wird verworfen.

Es erfolgen zwei Waschschriffe mit je 500 µl Waschpuffer AW1 und AW2, jeweils gefolgt von Zentrifugationsschritten. Der letzte wird mit 20 000 x g für 3 Minuten ausgeführt, um letzte Spuren der Waschpuffer aus der Säule zu entfernen.

Zur Elution der in der Säule gebundenen DNA werden 200 µl Elutionspuffer AE zugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation mit 6000 x g für eine Minute. Das Zentrifugat enthält nun die eluierte DNA in einem Volumen von 200 µl.

Das so erhaltene Extraktionsprodukt wird bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### **2.A.1.3.2. DNA-Extraktion aus Gewebeproben**

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QUIAGEN QIAmp DNA Mini Kit nach Herstellerangaben.

Von atherosklerotisch veränderten Geweben wurden aus dem makroskopisch sichtbaren Plaquerandbereich 25 mg entnommen und in kleine Stücke zerschnitten, bei makroskopisch unauffälligen Gefäßen wurden dafür Gewebestücke aus verschiedenen Gefäßabschnitten mit insgesamt 25 mg Gewicht verwendet.

Die Extraktion ist bis auf die hier verwendete Proteinase K mit der unter 2.A.1.3.1.2. beschriebenen Extraktion aus Buffy Coat identisch. Zur Eluation wurden allerdings 2 x 200µl Elutionspuffer verwendet.

Das Extraktionsprodukt betrug hier also 400 µl und wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### **2.A.1.4. Ethanol-Fällung der DNA**

Um die DNA im Extraktionsprodukt weiter zu konzentrieren, erfolgte eine DNA-Fällung:

- 100% Ethanol und 3 M Na-Acetat, pH 5,2 im Verhältnis 20:1 mischen, in dreifacher Menge des Extraktionsprodukts demselben zusetzen und vortexen
- Für 30 Minuten bei  $-70^{\circ}\text{C}$  oder über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  einfrieren
- Mit 20 000 x g für 10 Minuten zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet 2x waschen mit 75% Ethanol in doppelter Menge des Extraktionsproduktes (20 000 x g für 5 Minuten, Überstand verwerfen)

- Pellet waschen mit 100 % Ethanol in doppelter Menge des Extraktionsproduktes (20 000 x g für 5 Minuten, Überstand verwerfen)
- Restliches Ethanol verdunsten lassen
- Aufnahme in T<sub>1/2</sub>E-Puffer

### **2.A.2. DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Durch Verwendung einer thermostabilen Polymerase und spezifischer Primer können durch diese Methode ausgewählte Abschnitte der vorliegenden DNA amplifiziert werden.

Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, wurde in dieser Arbeit eine nested PCR verwendet. Dies ist ein Verfahren, bei dem das zweite Primerpaar innerhalb des Amplifikats des ersten Primerpaares ansetzt. Hierfür wurden die Primer HL-1, HR-1 und als zweites Primerpaar HM-1, HR-2 verwendet.

Amplifiziert wird ein 474bp Pst1 Fragment, das speziesspezifisch für *C. pneumoniae* ist und dessen Funktion bisher nicht bekannt ist. (Campbell et al., 1992 ; Khan&Potter, 1996)

**2.A.2.1. Benötigte Materialien**

	Hersteller
PCR-Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM Tris-HCl pH 9,0)	Amersham Pharmacia Biotech, USA
Nukleotidmix 20 mM/dNTP	Amersham Pharmacia Biotech, USA
Primer HL-1	TIB MOLBIOL, Berlin
Primer HR-1	TIB MOLBIOL, Berlin
Primer HM-1	TIB MOLBIOL, Berlin
Primer HR-2	TIB MOLBIOL, Berlin
Taq DNA Polymerase (5000 units/ml, Lösung in 59 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5mM Dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, Stabilisatoren, 50 % Glycerol)	Amersham Pharmacia Biotech, USA

Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer, 5´nach 3´:

Primer	Nukleotidsequenz
HL-1	GTT GTT CAT GAA GGC CTA CT
HR-1	TGC ATA ACC TAC GGT GTG TT
HM-1	GTG TCA TTC GCC AAG GTT AA
HR-2	ACC TGT CCA AGG TTC ATC CT

**2.A.2.2. Zusammensetzung des Reaktionsansatzes**

1. PCR	Angaben in $\mu$ l
PCR-Puffer	10
Nukleotidmix 1,25 mM	16
Primer HL-1	1
Primer HR-1	1
Taq DNA Polymerase	0,8
DNA	5
aqua bidest	66,2

Nested-PCR	
PCR-Puffer	10
Nukleotidmix 1,25 mM	16
Primer HM-1	1
Primer HR-2	1
Taq DNA Polymerase	0,8
DNA	1
aqua bidest	70,2

### 2.A.2.3. Durchführung und Amplifikationsbedingungen

Bei jeder PCR wurden mindestens eine Negativkontrolle sowie eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle diente dabei ein Reaktionsansatz, der statt DNA die gleiche Menge Aqua bidest. enthielt. Als Positivkontrolle wurde ein Lysat einer *C. pneumoniae*-infizierten Zellkultur verwendet.

Die Amplifikation wurde im Thermo-Cycler (Progene, TECHNE, Cambridge, England) durchgeführt. Die Weiterverarbeitung der Reaktionsprodukte erfolgte durch Harnstoff/Polyacrylamid-Elektrophorese mit anschließender Silberfärbung nach Gresshoff (Gresshoff et al., 1991).

Positive Proben wurden durch einen zweiten Reaktionsansatz bestätigt und sequenziert.

#### Amplifikationsbedingungen

1. PCR	Primer HL-1, HR-1		
1 Zyklus	Denaturierung	93°C	2 min
	Primer-Hybridisierung	55°C	1 min
	Extensionsreaktion	72°C	1,5 min
35 Zyklen	Denaturierung	93°C	1 min
	Primer-Hybridisierung	55°C	1 min
	Extensionsreaktion	72°C	1,5 min
1 Zyklus	Extensionsreaktion	72°C	5 min
	Abkühlen	4°C	

Nested-PCR	Primer HM-1, HR-2		
1 Zyklus	Denaturierung	93°C	2 min
	Primer-Hybridisierung	50°C	1 min
	Extensionsreaktion	72°C	1,5 min
35 Zyklen	Denaturierung	93°C	1 min
	Primer-Hybridisierung	50°C	1 min
	Extensionsreaktion	72°C	1,5 min
1 Zyklus	Extensionsreaktion	72°C	5 min
	Abkühlen	4°C	

### 2.A.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die in der PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden mittels Harnstoff/Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Da die DNA negativ geladene Phosphatgruppen enthält, ist eine Wanderung im elektrischen Feld möglich. Die Trennung nach Größe wird dabei durch die Porengröße des Gels bestimmt. Durch Abgleich mit einem gleichzeitig aufgetragenen Größenmarker wird eine Bestimmung des Molekulargewichts der DNA-Fragmente möglich.

#### 2.A.3.1. Benötigte Materialien

- 10x Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (10 x TBE)

108 g Tris	(USB, Cleveland)
55 g Borsäure	(E.Merck, Darmstadt)
40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0	(Titriplex III, Darmstadt)
Ad 1l Aqua bidest.	

## - Gellösung

8,5 g Harnstoff	(E.Merck, Darmstadt)
3,3 ml 30% Acrylamid-Bis-Lösung	(Roth, Karlsruhe)
2,0 ml 10x TBE	
Ad 20 ml aqua bidest.	
Zur Polymerisation:	
10 µl N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamine (TEMED)	(Serva, Heidelberg)
20 µl 40 % Ammoniumpersulfat	(Serva, Heidelberg)

## - Probenpuffer

2,1 g Harnstoff	(E.Merck, Darmstadt)
1 ml 10x TBE	
0,5 ml 0,01% Bromphenolblau	(Serva, Heidelberg)
1 ml 0,2% Xylene Cyanol FF	(Sigma, Deisenhofen)
Ad 5 ml aqua bidest.	

## - Isopropanol (E.Merck,Darmstadt)

Zum Überschichten des Gels während der Polymerisation

## - Kerosin (E.Merck, Darmstadt)

Zum Benetzen des Elektrophoresegeräts

## - Elektrophoresegerät: Multiphor II (Pharmacia)

## - Trägerfolie: Gel Bond PAG Film (Pharmacia)

## - Blottingpapier: 0,7-1,0 mm (S&amp;S)

in 3 cm breiten Streifen

- Größenmarker: PhiX 174 RF-DNA (Boehringer, Mannheim)
- 2%ige Glycerinlösung (E. Merck, Darmstadt)

### 2.A.3.2. Gelherstellung und Durchführung der Elektrophorese

Die Gußform besteht aus zwei Glasplatten. Die plane Glasplatte wird mit Wasser benetzt, dann wird die Trägerfolie mit einer Andruckrolle aufgewalzt. Die zweite Glasplatte enthält 24 aufgeklebte Slotformer und eine umlaufende Dichtung. Beide Platten werden durch Klemmen zusammengespant, sodaß zwischen Trägerfolie und zweiter Glasplatte ein Hohlraum entsteht. In diesen wird die Gellösung gegossen und mit Isopropanol überschichtet.

Nach der Polymerisation kann das Gel auf der Trägerfolie liegend auf die Keramikplatte des Elektrophoresegerätes verbracht werden. Zuvor wird diese mit Kerosin benetzt, um eine blasenfrei Auflage des Gels zu ermöglichen. Drei Blottingpapierstreifen werden kantengenau übereinandergelegt und mit 2x TBE getränkt. Auf Anoden- und Kathodenseite wird je ein dreifacher Streifen mit 0,5 cm Überdeckung auf das Gel gelegt.

Nun werden 3 µl Probenpuffer mit 6 µl PCR-Produkt vermischt, davon werden 8 µl in die Slots verbracht. In den ersten und letzten Slot werden 2 µl Größenmarker und 4 µl Probenpuffer aufgetragen. Der Größenmarker zeigt zehn Banden folgender Größenordnung:

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Basenpaare	1353	1078	872	603	310	281/271	234	194	118	72

Der Stromkreis wird geschlossen indem die Pole auf den 2x TBE-benetzten Blottingpapierstreifen gelegt werden. Die Trennung erfolgt bei 350 V und dauert ca. 45 min, auf jeden Fall aber bis der Farbmaler Bromphenolblau zur Anode gewandert ist.

### 2.A.3.3. Färbung der DNA-Fragmente

Die während der Elektrophorese getrennten DNA-Fragmente können mittels Färbung sichtbar gemacht werden. Hier kam die Silberfärbung nach Gresshoff zum Einsatz. (Gresshoff *et al.*; 1991)

#### 2.A.3.3.1. Benötigte Materialien

10% Essigsäure	(E.Merck, Darmstadt)
0,5% Silbernitrat-Lösung	(Roth, Karlsruhe)
2,5% Natriumcarbonat-Lösung	(Riedel-deHaën, Seelze)
0,2% Natriumthiosulfat-Lösung	(Aldrich, Gillingham, GB)
37% Formaldehyd-Lösung	(Riedel-deHaën, Seelze)
2% Glycerin-Lösung	(E.Merck, Darmstadt)

#### 2.A.3.3.2. Silberfärbung nach Gresshoff

Die während der Elektrophorese getrennten DNA-Fragmente werden durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Mit dieser Methode können selbst Mengen im Nanogrammbereich angefärbt und so nachgewiesen werden. Die Färbung beruht auf der Reduktion von Silberionen. Diese werden nach der Bindung an die Nukleinsäurebasen durch Formaldehyd zu metallischem Silber reduziert.

Zunächst wird das Gel nach erfolgter Elektrophorese für 30 Minuten in 10%iger Essigsäure eingelegt. Es folgen drei Waschschrte mit Aqua bidest. für je 5 Minuten.

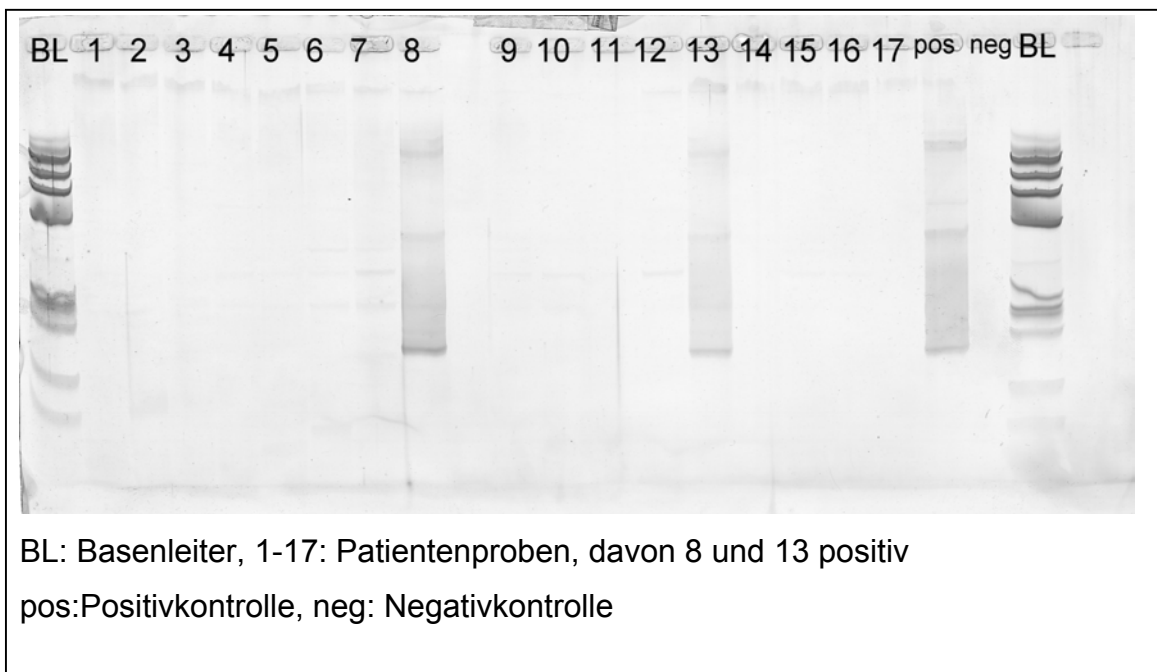
Für die Silberfärbung werden 60 ml Silbernitratlösung mit 240 ml Aqua bidest. und 450 µl Formaldehyd versetzt. Dieses Reagenz wirkt 30 Minuten im

Schüttelbad auf das Gel ein. Danach wird für 20 Sekunden mit aqua bidest. gespült und daran der Entwicklungsvorgang angeschlossen.

Die Entwicklungslösung enthält 300 ml Natriumcarbonatlösung, 450 µl Formaldehyd und 300 µl Natriumthiosulfatlösung. Das Thiosulfat soll dabei unlösliche Silbersalze löslich machen und Silberionen von der Oberfläche des Gels entfernen, um dadurch unspezifische Färbungen zu vermeiden. Zunächst läßt man eine geringe Menge des Entwicklers für 20 Sekunden auf das Gel einwirken, schüttet diese ab und übergießt das Gel mit dem Rest des Entwicklers, bis die Banden deutlich sichtbar sind. Anschließend wird das Gel in ein Stopbad mit 10%iger Essigsäure eingelegt.

Sowohl Färbung wie Entwicklung erfolgt mit frisch zubereiteten, ca. 4°C kalten Lösungen.

Das Gel kann durch Tränken mit 2%igem Glycerin und durch Abdecken mit darin getränkter Cellophanfolie konserviert werden.



#### 2.A.4. Zyklisches Sequenzieren doppelsträngiger DNA-Fragmente

Beim zyklischen Sequenzieren werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide durch eine hitzestabile DNA-Polymerase in DNA-Fragmente eingebaut. Hierzu erfolgte zunächst eine Aufreinigung des PCR-Produktes mittels des GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GFX, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

Das gereinigte PCR-Produkt wurde danach mit dem Thermo Sequenase II dye terminator cycle sequencing premix kit (Amersham Pharmacia Biotech, Cleveland, USA) für die Sequenzierung vorbereitet.

Abweichend von den Herstellerangaben erfolgte folgende Präparation:

Sequenase Reagent A	2 µl
Sequenase Reagent B	2 µl
Primer HR-2	0,1 µl
PCR-Produkt	3 µl
Aqua bidest	12,9 µl

Im Thermocycler (TC1, Perkin Elmer, USA) wurden die Proben nach folgendem Schema für 25 Zyklen inkubiert:

Denaturierung	96 °C	30 s
Primer-Hybridisierung	50°C	15 s
Extensionreaktion	60°C	1 min

20µl des Produkts wurden mit 35µl 100%igem Ethanol versetzt, durchmischt und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 20 000 x g für 30 Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet in 4 µl Loading Dye aufgenommen und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Die

Analyse erfolgte mit dem Sequenzierautomaten (System 373A, Applied Biosystems, USA).

## 2.B Mikroimmunfluoreszenztest (MIF)

Mit dem Mikroimmunfluoreszenztest sollte der serologische Status im Hinblick auf *C. pneumoniae*-Infektion erkannt werden. Von jedem Probanden wurde daher eine gleichzeitig abgenommene Serumprobe im Routinediagnostiklabor mittels MIF getestet. Die Methodik wurde 1970 von Wang et al. zum Nachweis von *C. trachomatis*-Antikörpern entwickelt, ist aber durch den Einsatz eines *C.pneumoniae*-Antigens auch zum Nachweis der speziesspezifischen *C.pneumoniae*-Antikörper geeignet.

### 2.B.1. Benötigte Materialien

PBS	
0,9% NaCl-Lösung	
Antigensuspension Prototyp AR-39	(Washington Research Foundation, Seattle,USA)
Dottersack-Lösung	(Washington Research Foundation, Seattle,USA)
Sekundärantikörper: Fluoreszeinisothiocyanat-konjugierte Anti-Human-Antikörper IgG, IgM,IgA	(Behring)
Rheumafaktorabsorbens	(Behring)

## **2.B.2. Durchführung des MIF**

### **2.B.2.1. Objektträgerreinigung**

Um unspezifische Fluoreszeinanfärbungen zu vermeiden, werden die Objektträger intensiv gereinigt: Für 12 Stunden Bad in 3%igem HCL-Ethanol, Spülung mit Aqua bidest. und Trocknen mit fusselfreien Papiertüchern. Anschließend erfolgte eine Lufttrocknung für weitere 24 Stunden.

### **2.B.2.2. Antigenauftragung**

Das konzentrierte Antigen wurde mit 3-5%iger Dottersacklösung im Verhältnis von 1:2 verdünnt, um so eine bessere Haftung am Objektträger zu erzielen.

Auf einen Objektträger wurden 16 Antigenpunkte aufgetragen und damit 16 Reaktionsfelder erstellt.

Nach dem Auftragen wurden die Objektträger eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

### **2.B.2.3. Serumverdünnung und Auftragung**

Für den Nachweis von IgG wurden die Probandenserum im Verhältnis von 1:8 mit PBS verdünnt und bis 1:1024 austitriert. Von jeder Verdünnungsstufe wird mit einer 1µl Platinöse ein Tropfen entnommen und auf je ein Reaktionsfeld aufgetragen.

Rheumafaktoren (RF) im Serum können beim Nachweis von IgA und IgM störende unspezifische Reaktionen hervorrufen. Um die Rheumafaktoren zu binden, wird das Serum für 15 Minuten mit RF-Absorbens inkubiert.

Dazu werden 12,5 µl Serum mit 50 µl RF-Absorbens und 37,5µl PBS versetzt.

Dies entspricht einer Verdünnung von 1:8. Danach wird der Ansatz für 5 Minuten mit 660x g zentrifugiert. Der Überstand wird im Fall des IgM-Nachweises zunächst nur in vorliegender Verdünnung aufgetragen, im Fall des IgA-Nachweises wird bis 1:64 austitriert und in jeder Verdünnungsstufe aufgetragen.

#### **2.B.2.4. Erste Inkubation, Waschen und Trocknen**

Nach dem Auftragen des Serums wurde der Objektträger in einer feuchten Kammer für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgten vier Waschschrirte in PBS und drei weitere in Aqua bidest.. Anschließend Trocknung bei 37 °C.

#### **2.B.2.5. Auftragen der Anti-Human-Antikörper**

Die Antikörperkonjugate wurden ebenfalls mit einer 1µl Platinöse auf die Reaktionsfelder aufgetragen.

#### **2.B.2.6. Zweite Inkubation, Waschen und Trocknen**

Diese Schritte erfolgten wie unter 2.B.2.4. beschrieben.

### 2.B.3. Mikroskopische Auswertung

Die einzelnen Reaktionsfelder wurden bei 1000-facher Vergrößerung beurteilt. Gewertet wurden dabei solche fluoreszeinmarkierte Elementarkörperchen, die sich als solide, gleichmäßig gefärbte, glatt begrenzte, apfelgrüne Punkte darstellten. Die Einordnung in relative Stärkegrade erfolgte dabei nach folgenden Kriterien:

+++	sehr viele, sehr stark aufleuchtende EK
++	viele, stark aufleuchtende EK
+	deutlich aufleuchtende EK
(+)	schwach aufleuchtende EK
±	fraglich angefärbte EK
∅	keine fluoreszeinmarkierten EK erkennbar

Dabei wird (+) noch als positiv beurteilt, ± als negativ befundet.

#### 2.B.3.1. Beurteilungskriterien für den MIF

Für die Auswertung des MIF gelten die beschriebenen Kriterien für die Definition der serologisch akuten und abgelaufenen *C.pneumoniae*-Infektion (Wang & Grayston, 1986)

Zeichen einer akuten Infektion:

- ein vierfacher Titeranstieg in der IgG- oder IgM-Fraktion
- eine Serokonversion
- ein IgM-Titer  $\geq 1:16$
- ein IgG-Titer  $\geq 1:512$

Zeichen einer abgelaufenen Infektion:

- ein IgG-Titer  $\geq 1:16$  und  $< 1:512$  bei einem IgM-Titer  $< 1:16$

Definition einer Seronegativität:

- ein IgG-Titer  $< 1:16$  und ein IgM-Titer  $< 1:16$
- ein IgA-Titer  $< 1:16$

## **3. ERGEBNISSE**

### **3.A. Carotisstudie**

#### **3.A.1.1. Patientenproben**

Wir untersuchten Proben von 61 Patienten, wovon 57 an einer sonographisch verifizierten hochgradigen Carotisstenose und 4 an anderen atherosklerotischen Erkrankungen litten.

Von den 57 Carotispatienten konnten wir in 53 Fällen peripher-venöse Blutproben, in einem Fall nur eine Gewebeprobe und in 3 Fällen korrespondierende Blut- und Gewebeproben gewinnen und untersuchen.

Von 4 Patienten mit anderen atherosklerotischen Erkrankungen liegt in einem Fall eine Gewebeprobe vor, in 3 Fällen konnten korrespondierende Blut- und Gewebeproben untersucht werden.

Blut- und Gewebeproben wurden mittels PCR auf das Vorhandensein von *C.pneumoniae*-DNA untersucht, Serumproben wurden im MIF auf *C.pneumoniae*-spezifische Antikörper getestet.

#### **3.A.1.2. Ergebnisse der PCR-Untersuchungen an Patientenproben**

Von 56 Blutproben der Patienten mit Carotisstenose erwiesen sich in der PCR 7 Proben, von den 4 Gewebeproben 2 als positiv.

Bei den Proben von Patienten mit anderen atherosklerotischen Veränderungen handelte es sich in 2 Fällen um Operationspräparate verkalkter Aortenklappen, in den beiden anderen Fällen um Arteria poplitea-Präparate.

Von 3 untersuchten Blutproben aus dieser Gruppe zeigten alle 3 positive PCR-Resultate, von 4 Gewebeproben war 1 PCR-positiv. Die zugehörige Blutprobe der positiv getesteten Gewebeprobe war ebenfalls positiv. Hierbei fiel auf, daß alle PCR-positiven Blutproben erst nach der Operation gewonnen wurden.

Insgesamt waren also 10 von 59 Blutproben und 4 von 8 Gewebeproben positiv.

### 3.A.1.3. Ergebnisse des MIF der Patientenproben

Im MIF wurden 50 Serumproben untersucht, von 9 Patienten war kein Serum vorhanden. Die Gegenüberstellung von PCR- und MIF-Ergebnissen ist nachfolgend dargestellt:

MIF-Titer	PCR-positive Patienten (N=9)	PCR-negative Patienten (N=41)
Negativ (IgG ≤ 8)	1/9 (11,1 %)	12/41 (29,3 %)
Abgelaufene Infektion (IgG 16 – 256)	6/9 (66,7 %)	29/41 (70,7 %)
Akute Reinfektion (IgG ≥ 512)	2/9 (22,2 %)	0/41 (0 %)
IgA Titer ≥ 32	4/9 (44,4 %)	5/41 (12,2 %)

### **3.A.2. Kontrollproben**

Um eine möglichst hohe Verlässlichkeit der Daten zu gewährleisten, untersuchten wir drei verschiedene Kontrollgruppen. Hierzu wurden 50 Blutproben gesunder Medizinstudenten gewonnen und mittels PCR untersucht. Dies sollte vor allem dazu dienen, eventuell auftretende systematische Fehler der PCR-Methodik, z.B. durch Verunreinigung des Arbeitsplatzes mit *C.pneumoniae*-DNA, aufzudecken. Da in dieser Kontrollgruppe mit einem Durchschnittsalter von 22 Jahren arteriosklerotische Erkrankungen unwahrscheinlich sind, hätten häufige positive PCR-Ergebnisse auf eine unzulängliche Methodik hingedeutet.

Eine weitere Gruppe bestand aus Patienten, deren aus Blutproben extrahierte DNA zur Diagnose von Cytomegalievirus-Infektionen in der Abteilung Virologie des Institutes archiviert war. Patienten dieser Gruppe wurden den Carotispatienten nach Alter und Geschlecht zugeordnet. Damit sollte eine Kontrollgruppe etabliert werden, die in Bezug auf Alter und Geschlecht mit der Patientengruppe besser vergleichbar ist.

Um die Gewebe-PCR auf mögliche systematische Fehler hin zu überprüfen, wurden 16 Gefäßproben der Arteria mammaria interna untersucht. Dieses Gefäß wird nach entsprechender Präparation zur Bypass-Operation benutzt und enthält im Regelfall keine atherosklerotischen Plaques.

Da Inhibitoren im DNA-Extrakt zu falsch negativen PCR-Ergebnissen führen können, wurde für alle negativen Patientenproben eine Inhibitionskontrolle durchgeführt. Dafür wurden statt 5µl DNA-Extrakt nur 4µl eingesetzt und durch 1µl einer 1:100 verdünnten Positivkontrolle ergänzt.

#### **3.A.2.1. Ergebnisse der Untersuchungen an Kontrollproben**

Positive PCR-Ergebnisse konnten in keinem Fall der Kontrollproben gefunden werden. Inhibition trat in keinem Fall auf.

**3.A.2.2. Tabellarische Ergebnisübersicht**

Anzahl und Art	Material	Positives PCR-Ergebnis
<b>61 Patienten</b>		
57 mit Carotisstenose	53 x Blutprobe 3 x Blut und-Gewebeprobe 1 x nur Gewebeprobe	Blut-PCR: 7/56  Gew.-PCR: 2/4
4 mit anderen atherosklerotischen Erkrankungen	3 x Blut-und Gewebeprobe 1 x nur Gewebeprobe	Blut-PCR: 3/3  Gew.-PCR: 1/4  Beide PCR: 1/4
<b>50 Kontrollen</b> (Medizinstudenten)	50 x Blutprobe	Blut-PCR: 0/50
<b>59 Kontrollen</b> (nach Alter und Geschlecht korreliert)	59 x asservierte DNA aus CMV-Routinelabor, aus Blutproben gewonnen	PCR: 0/59
<b>16 Kontrollen</b> (Bypass-Patienten)	16 x Arteria mammaria interna-Proben	Gew.-PCR: 0/16

### 3.A.3. Risikofaktoren der Patienten mit Carotisstenose

In der Gruppe der Patienten mit Carotisstenose wurden die für jeden einzelnen zutreffenden Risikofaktoren dokumentiert. Dabei waren für 2 PCR-negative Patienten keine Daten vorhanden. Die Verteilung wird nachfolgend aufgeführt:

	PCR-positive Patienten (N=7)	PCR-negative Patienten (N=49)
Anteil Männer (Prozent)	71,4	69,4
Durchschnittsalter (Jahre)	64,3	63,5
Rauchen	3/7 (42,9 %)	22/47 (46,8 %)
Hypercholesterinämie	6/7 (85,7 %)	33/47 (70,2 %)
Arterielle Hypertonie	7/7 (100 %)	31/47 (66,0 %)
Diabetes mellitus	6/7 (85,7 %)	12/47 (25,5 %)
Hyperuricämie	1/7 (14,3 %)	4/47 (8,5 %)
≥ 3 Risikofaktoren	5/7 (71,4 %)	16/47 (34,0 %)
Anteil asymptomatischer Stenosen	3/7 (42,9 %)	5/47 (10,6 %)

### **3.B. PTCA-Studie**

#### **3.B.1.1. Patientenproben**

Wir untersuchten 152 Proben von 74 Patienten, die zur Coronarangiographie in die Klinik kamen. Bei 52 von ihnen wurde zusätzlich eine PTCA (perkutane transluminale Coronarangioplastie) durchgeführt; diese Patienten stellen die eigentliche Studiengruppe dar.

Die Blutentnahmen erfolgten zu drei verschiedenen Zeitpunkten: Vor der Coronarangiographie, direkt nach der PTCA und 16-24 Stunden nach der PTCA bzw. Coronarangiographie.

Es konnten in der PTCA-Gruppe 40 Proben vor, 37 Proben direkt nach und 45 Proben 12-24 Stunden nach PTCA gewonnen werden. In jedem Fall konnte zumindest eine Probe nach PTCA untersucht werden.

#### **3.B.1.2. Ergebnisse der PCR- Untersuchungen an Patientenproben**

Es konnte in keiner der Proben Chlamydia pneumoniae-DNA nachgewiesen werden. Daher ergab sich kein Hinweis auf eine erhöhte Nachweisbarkeit nach Manipulation im Plaquebereich, wie sie die Durchführung einer PTCA darstellt.

**3.B.1.3. Ergebnisse des MIF der Patientenproben**

MIF-Titer	Patienten, die PTCA erhielten (N=45)	Patienten, die Coronarangiographie erhielten (N=21)
Negativ (IgG $\leq$ 8)	9/45 (20 %)	11/21 (52,4 %)
Abgelaufene Infektion (IgG 16 – 256)	35/45 (77,8 %)	10/21 (47,6 %)
Akute Reinfektion (IgG $\geq$ 512)	1/45 (2,2 %)	0/21 (0 %)
IgA Titer $\geq$ 32	1 /45 (2,2 %)	2/21 (9,5 %)

**3.B.2. Kontrollproben**

Um eine mögliche Inhibition der PCR zu erkennen, wurden in einem Parallelansatz Patientenproben mit Chlamydien-DNA gespickt wie unter 3.A.2. beschrieben.

**3.B.2.1. Ergebnisse der Kontrollproben**

Es ergab sich in keinem Fall ein Hinweis auf eine Inhibition der PCR.

**3.B.3. Tabellarische Ergebnisübersicht**

Anzahl und Art	Material	Positives PCR-Ergebnis
<b>74 Patienten</b>		
22 Coronarangiographie	22 x Blutprobe bei Aufnahme  8 x Blutprobe 16-24 h nach Coro	Blut-PCR: 0/30
52 Coronarangiographie + PTCA	40 x Blutprobe bei Aufnahme  37 x Blutprobe direkt nach PTCA  45 x Blutprobe 16-24 h nach PTCA	Blut-PCR: 0/122

**3.B.4. Risikofaktoren der Patienten in der PTCA-Studie**

	PTCA- Patienten (N=52)	Coronarangiographie- Patienten (N=22)
Anteil Männer (Prozent)	84,6 %	81,8 %
Durchschnittsalter (Jahre)	65,3	64,7
Rauchen	18/51 (35,3 %)	7/19 (36,8 %)
Hypercholesterinämie	31/51 (60,8 %)	13/19 (68,4 %)
Arterielle Hypertonie	38/51 (74,0 %)	16/19 (84,2 %)
Diabetes mellitus	14/51 (27,4 %)	6/19 (31,6 %)
≥ 3 Risikofaktoren	14/51 (27,4 %)	6/19 (31,6 %)

## 4. DISSKUSSION

Nach dem ersten Bericht über eine Assoziation von *Chlamydia pneumoniae* mit koronarer Herzkrankheit (Saikku et al., 1988), wurde die Forschung auch auf andere Gefäßerkrankungen wie Bauchaortenaneurysma und Carotisstenose ausgedehnt. Die Methodik wurde von rein serologischen Untersuchungen auf Kombination von Serologie und Ultraschall der Carotiden ausgeweitet, Endarteriektomiepräparate wurden immunhistochemisch und mittels PCR untersucht, außerdem wurde versucht, den Erreger direkt aus dem Präparat zu isolieren. Andere Methoden wie Untersuchung exprimierter Chlamydiengene durch m-RNA Amplifikation wurden ebenfalls eingesetzt. In dieser Arbeit sollten die Daten durch PCR aus dem peripheren Venenblut von Patienten mit sonographisch diagnostizierter Carotisstenose vervollständigt werden.

Eine frühe prospektive Kohortenstudie (Melnick et al., 1993) an 15800 Männern und Frauen in den USA untersuchte den Antikörperstatus gegen *Chlamydia pneumoniae* und sonographisch die Intima-Media-Dicke der Carotis. Hierbei wurde ein signifikanter Zusammenhang von vorangegangener Infektion und asymptomatischer Carotisstenose gefunden. Dies wurde durch weitere Studien in anderen Populationen bestätigt (Schmidt et al., 2000; Kawamoto et al., 2001), eine dritte fand neben der Assoziation von Seropositivität gegenüber *Chlamydia pneumoniae* eine fast ebenso starke für das Cytomegalievirus (CMV), nicht aber für *Helicobacter pylori* und das Herpes simplex –Virus (Espinola-Klein et al., 2000).

In einer ähnlich angelegten Studie wurde die Intima-Media-Dicke an einem zweiten Zeitpunkt nachgemessen. Hier konnte eine signifikant schnellere Zunahme der Stenose bei seropositiven Patienten gegenüber seronegativen beobachtet werden (Sander et al., 2001).

Zwei Studien beschreiben einen fehlenden Zusammenhang von Seropositivität und Intima-Media –Dicke (Coles et al., 1999 ; Markus et al., 1999).

Das Vorhandensein von *Chlamydia-pneumoniae*-DNA in atherosklerotisch veränderten Plaques der Arteria carotis untersuchten ebenfalls mehrere Studien. In allen wurde aus Operationsmaterial zunächst die DNA extrahiert und anschließend

mittels PCR untersucht. Dabei wurde *Chlamydia-pneumoniae*-DNA in unterschiedlichen Häufigkeiten gefunden: *Grayston et al.* berichteten von 60 Prozent PCR-positiven Plaques, *Maass et al.* von 15 Prozent, *Nadrchal et al.* von 28 Prozent. *Maass et al.* untersuchten dabei frühe subendotheliale Läsionen in der Nachbarschaft der Plaques, konnten dort aber keine Erreger-DNA nachweisen. Dies könnte also eher auf einen Beitrag der Chlamydien zur Progression vorhandener, schwererer Läsionen als auf eine Initiation der Läsion hinweisen (Grayston et al., 1995 ; Maass et al., 1997 ; Nadrchal et al., 1999).

Eine weitere Studie formulierte dabei einen Zusammenhang von PCR-Positivität und langjähriger Raucheranamnese. Während in der Nichtrauchergruppe 36 Prozent der Plaques PCR-positiv getestet wurden, waren es in der Rauchergruppe 94 Prozent. Mit anderen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes, Hypertonie und Hypercholesterinämie ergaben sich dabei keine Assoziationen (Dobrilovic et al., 2001).

Atherosklerotische Plaques im Operationspräparat können auch mittels immunhistochemischer Verfahren auf speziesspezifische Chlamydienantigene untersucht werden. Dabei wurden in einer Studie 57 Prozent der Plaques positiv getestet (Grayston et al., 1995), in einer weiteren ergaben PCR und Immunhistochemie zusammen 69 Prozent positive Resultate. Außerdem ist dabei eine Erregerisolation aus dem Operationspräparat gelungen (Jackson et al., 1997).

In einem anderen Ansatz wurden Immunhistochemie und PCR gleichzeitig ausgeführt. Obwohl die PCR weder *Chlamydia-pneumoniae*-DNA noch chlamydiale 16S-RNA nachweisen konnte, zeigte die Immunhistochemie in Makrophagen aller untersuchter Plaques positive Ergebnisse. Dies könnte auf das Persistieren chlamydialer Antigene, nicht aber auf Vorhandensein metabolisch aktiver Erreger zurückzuführen sein (Meijer et al., 2000).

Unsere Studie hat gezeigt, daß sich auch im peripheren Venenblut von Patienten mit Carotisstenose *Chlamydia pneumoniae*-DNA nachweisen läßt. Die Nachweishäufigkeit liegt dabei im unteren Bereich der publizierten Ergebnisse für den Nachweis aus Plaquegewebe. Dies könnte erklärt werden durch die höhere Dichte an chlamydieninfizierten Wirtszellen im Plaquebereich. In der Blutbahn

hingegen könnten diese einem Verdünnungseffekt ausgesetzt sein, so daß die Sensitivität der PCR teilweise unterschritten werden könnte.

Eine andere Möglichkeit wäre die passagere Freisetzung aus rupturierten Plaques in die Blutbahn, die einen Nachweis nur in einem bestimmten Zeitintervall möglich machen würde. Einen Hinweis in diese Richtung könnten die Ergebnisse der postoperativ gewonnenen Blutproben von Patienten mit anderen atherosklerotischen Erkrankungen darstellen: Hier konnte in 3 von 3 Proben *Chlamydia pneumoniae*-DNA nachgewiesen werden. Obwohl dies angesichts der kleinen Zahlen nur episodenhaften Charakter hat, könnte der Befund eine Folge intraoperativ verletzter Endothelien und dadurch freigesetzter infizierter Wirtszellen sein. Dies veranlaßte uns, in einer weiteren Studie die Nachweisbarkeit von *Chlamydia pneumoniae*-DNA vor und nach Plaquemanipulation durch PTCA zu untersuchen (s.u.).

Wie in den meisten zitierten Studien ließ sich keinem der im Fragebogen erhobenen Faktoren ein erhöhtes Risiko für PCR-Positivität zuschreiben. Die Gruppen der PCR-Positiven unterschied sich auch hinsichtlich des Alters und der Geschlechtsverteilung nicht von den PCR-Negativen.

Bei den Ergebnisse des MIF fielen in der Gruppe der PCR-Positiven 2 Patienten mit den Kriterien einer akuten Reinfektion und 4 Patienten mit erhöhten IgA-Titern auf, so daß man von einem neuerlichen Kontakt des Organismus mit dem Erreger ausgehen kann. Ob es sich dabei um eine endogene Reinfektion, wie zum Beispiel durch während einer Plaqueruptur freigesetzte Erreger handelt, oder ob eine exogene Infektion des Respirationstraktes vorliegt, kann aufgrund dieser Ergebnisse jedoch nicht bestimmt werden.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß *Chlamydia pneumoniae* bei Patienten mit Carotisstenose regelmäßig nachgewiesen werden kann. Dies wird nicht nur durch positive Nachweisergebnisse unterschiedlicher Methoden, sondern auch durch Studien an verschiedenen Populationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten untermauert. Dennoch schwankt die Häufigkeit positiver Nachweise stark. Für die PCR aus Plaquetgewebe wurde daher ein Ringversuch durchgeführt, bei dem verschiedene Arbeitsgruppen ihr jeweils etabliertes Laborprotokoll anwandten. Das Ergebnis fiel ernüchternd aus, da die verschiedenen Laboratorien völlig inkongruente Daten produzierten. Zum einen wurden Negativkontrollen positiv getestet, zum

anderen betrug die Übereinstimmungsrate der Ergebnisse für klinische Gefäßproben maximal 25 Prozent (Apfalter et al., 2001).

Eine andere Studie fand im Blut von gesunden Blutspendern mit einem Altersdurchschnitt von 49 Jahren 46 Prozent PCR-Positivität für *Chlamydia pneumoniae* DNA (Boman et al., 1998). Dies ist ein deutlich höherer Prozentsatz als der, den viele Studien an Atherosklerosepatienten angeben. Da aber bisher keine standardisierten Methoden und Protokolle existieren, ergeben sich für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen enorme Schwierigkeiten.

Vor diesem Hintergrund erschien uns die Evaluation der verwendeten Methodik besonders wichtig. Die Teilnahme an einem nationalen Ringversuch ergab dabei eine Sensitivität der PCR von 0,01 IFU / 25 µl. „IFU“ steht dabei für „inclusion forming unit“ und bezeichnet die benötigte Chlamydienmenge, die in der Zellkultur zu sichtbaren Einschlüssen führt. Eine Sensitivität in dem genannten Bereich könnte die DNA eines einzigen Erregers nachweisen.

Um unsere PCR-Methode im Hinblick auf falsch positive Ergebnisse durch Verfahrensfehler und Kontamination zu evaluieren, wurden außerdem 50 Blutproben gesunder Medizinstudenten untersucht. Mit einem Altersdurchschnitt von 22 Jahren konnte hier von einer niedrigen Atheroskleroseprävalenz ausgegangen werden.

Parallel dazu wurde eine der Carotis-Gruppe nach Alter und Geschlecht zugeordnete Kontrollgruppe etabliert. Hierfür wurde archivierte DNA aus einem CMV-Routinelabor in die PCR eingesetzt.

Da sich für keine der Kontrollgruppen positive PCR-Ergebnisse ergaben, konnten sowohl die Möglichkeit von Verfälschung durch Kontamination als auch eine bloße Altersabhängigkeit der Ergebnisse relativiert werden.

Wenn auch die Vergleichbarkeit mit anderen Studien aus o.g. Gründen nur eingeschränkt möglich ist, so haben die durchgeführten Kontrollexperimente doch erlaubt, die angewandte Methodik in sich als stimmig und aussagekräftig zu betrachten.

Die PCR-Positivität von drei postoperativ gewonnenen Blutproben veranlaßte uns, in einer Versuchsreihe Blutproben vor und nach Manipulation an atherosklerotischen Gefäßwänden zu vergleichen. Wenn nach Manipulation höhere Raten an PCR-

Positivität nachweisbar wären, könnte dies auf ausgeschwemmte infizierte Wirtszellen hindeuten, die dadurch der PCR aus Blut zugänglich geworden sind.

Da bereits eine Studie vorliegt, die ein Ansteigen von Antikörpern gegen *Chlamydia pneumoniae* innerhalb eines Monats nach perkutaner transluminaler Coronarangioplastie (PTCA) beschreibt (Tiran et al., 1999), entschieden wir uns für diese Patientengruppe. Bei dieser Methode wird ein Katheter in die Coronarien eingeführt und im Plaquebereich ein Ballon aufgeblasen, der die Engstelle aufweitet. In gleicher Sitzung kann ein Stent eingesetzt werden, der das Gefäß offen halten soll. Ob diese Manipulationen Auswirkungen auf die Nachweisbarkeit von *Chlamydia pneumoniae*-DNA haben, sollte mittels PCR überprüft werden.

Die Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein der Erreger im Plaquebereich. Hierfür ergaben sich aus den frühen, wiederum serologischen Studien, erste Anhaltspunkte (Saikku et al., 1988), die durch andere Arbeitsgruppen bestätigt wurden (Thom et al., 1991; Saikku, 1993; Mendall et al., 1995). In diesen Studien waren Antikörpertiter gegen *Chlamydia pneumoniae* in Patientengruppen mit KHK signifikant höher als in Kontrollgruppen.

In atherosklerotischen Plaques aus Coronarien obduzierter Patienten wurde der Erreger zuerst mittels Elektronenmikroskopie und Immunhistochemie (IHC) nachgewiesen (Shor et al., 1992). Weitere Studien folgten, die meisten setzten dabei IHC und PCR als Nachweistechnik ein. Bis heute sind viele Studien publiziert worden, die einen positiven Nachweis aus Plaquegewebe führen konnten. Ähnlich wie im Falle der untersuchten Carotis-Plaques unterscheiden sich die Ergebnisse auch hier zum Teil beträchtlich. Nachweisraten von 79, 68, 55 und 32 Prozent (Muhlestein et al., 1996; Ouchi et al., 1998; Kuo et al., 1993; Radke et al., 2001) wurden ebenso angegeben wie Häufigkeiten von 8 Prozent (Jantos et al., 1999).

In anderen Fällen konnte kein Nachweis des Erregers geführt werden (Weiss et al., 1996; Daus et al., 1999).

Auch hier gilt, daß die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen aufgrund fehlender Standards nicht ohne weiteres verglichen werden können. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe wurden in Coronarplaquegewebe in 46 Prozent der Fälle positive PCR-Resultate gefunden (Tomas, 1999). Es handelte sich dabei um im Rahmen von Bypass-Operationen gewonnene Präparate, die mit derselben Methodik untersucht wurden, wie sie in dieser Arbeit zum Einsatz kam.

Dennoch konnten in unserer Gruppe der Coronarangiographie/-und PTCA-Patienten keine positiven Resultate in der PCR aus Leukozytenkonzentrat festgestellt werden. Dies galt sowohl für die Proben, die vor den Untersuchungen, als auch für die nach der PTCA gewonnenen Proben. Eine denkbare Inhibition der PCR wurde durch eine parallel mitgeführte Probe, die mit Chlamydien-DNA gespickt war, ausgeschlossen. Für eine mögliche vermehrte Freisetzung von Chlamydien-DNA während Manipulation am Plaque konnte also in dieser Arbeit kein Hinweis gefunden werden. Die Ergebnisse des MIF dieser Gruppe deckte sich mit den erwarteten Durchseuchungsraten in dieser Altersklasse. So lagen in 78 Prozent der Fälle IgG-Antikörper als Zeichen für eine durchgemachte Infektion vor. In einem Fall ergab sich ein IgG-Titer  $\geq 512$ , was für eine akute Reinfektion spricht. Die PCR aus der zugehörigen Blutprobe fiel dennoch negativ aus.

Noch während der Laufzeit unserer Studie wurde eine Arbeit publiziert, die ebenfalls Blutproben vor und nach PTCA verglich. Hierbei wurden auch drei Proben pro Patient untersucht, die dritte wurde jedoch im Unterschied zu unserer Studie bereits 4 Stunden nach dem Eingriff gewonnen. Obwohl Chlamydien-DNA in 7 Prozent aller PTCA-Patienten gefunden wurde, waren die positiven Proben zu allen drei Zeitpunkten gleichmäßig verteilt. Für eine Freisetzung durch Manipulation ergab sich auch hier kein Hinweis (Smieja et al., 2001). Legt man diese Daten zugrunde, könnte die Zahl von 52 in unsere Studie eingeschlossenen Patienten zu klein für faßbare Ergebnisse sein.

In anderen Studien, die verschiedene Patienten mittels Blut-PCR untersuchten, wurden andere, zum Teil sehr viel höhere Positivitätsraten gefunden. So wurden in einer Gruppe von Peritonealdialysepatienten 60 Prozent, bei KHK-Patienten 59 Prozent, bei Patienten mit abdominalen Aortenaneurysmen 49 Prozent und bei gesunden Blutspendern 46, 26 und 17 Prozent PCR-Positivität publiziert (Iliescu et al., 2000 ; Boman et al., 1998 ; Blasi et al., 1999 ; Bodetti&Timms, 2000 ; Kaul et al., 2000).

Für die Unterschiede zwischen genannten Studien und den Ergebnissen dieser Arbeit können verschiedene mögliche Ursachen in Betracht kommen. Einerseits sind das die schon mehrfach genannten methodischen Unterschiede, die eine direkte Vergleichbarkeit erschweren. Dies wurde in einer Studie, in der fünf gängige

Chlamydien-PCR-Methoden verglichen wurden, deutlich: Obwohl alle eine ähnliche Sensitivität aufwiesen, welche durch Testung gegebener DNA-Mengen gemessen wurde, unterschieden sich die Ergebnisse bei der Testung von Patientenproben. Unter diesen kontrollierten Bedingungen lagen die höchsten Nachweisraten im Blut von KHK-Patienten bei nur 7,4 Prozent, eine andere Methode erbrachte 1,4 Prozent Positive und mit den drei anderen Methoden brachte keine Probe ein positives Ergebnis (Mahony et al., 2000). Als Schlußfolgerung dieser Studie wurden Forderungen laut, die längst überfällige Standardisierung der Methoden durch direkten Vergleich, Ringversuche und Etablierung eines „Goldstandards“ in Angriff zu nehmen. Ein Jahr später wurden umfassende Leitlinien und methodische Empfehlungen publiziert, durch die Diskrepanzen aufgrund methodischer Mängel in Zukunft vielleicht ausgeschlossen werden können. Die Empfehlungen umfassen Arbeitsplatzhygiene, räumliche Trennung von Probenaufarbeitung und PCR-Durchführung und konkrete Empfehlungen bisher evaluierter PCR-Methoden (Dowell et al., 2001).

Die Untersuchungen von Plaque-Material aus Coronarien in unserer Arbeitsgruppe, in der *Chlamydia pneumoniae* DNA in 46 Prozent der Fälle nachgewiesen werden konnte, hätte ebenfalls höhere Positivitätsraten in der Blut-PCR erwarten lassen können. Aber wie schon für die Carotisstudie ausgeführt, kann der Verdünnungseffekt im peripheren Blut zu einem Unterschreiten der Sensitivitätsgrenze der PCR führen. Außerdem liegen bei Patienten, die sich einer Bypass-Operation unterziehen, andere atherosklerotische Veränderungen vor als bei Patienten, die mittels PTCA behandelt werden. Im Regelfall sind Bypass-Patienten von mehr oder von schwereren Stenosen betroffen, oder vorangegangene Dilatationen blieben ohne Effekt, so daß von einer längeren und/oder schwereren Krankheitsgeschichte ausgegangen werden kann.

Der Effekt schwererer oder länger bestehender atherosklerotischer Veränderungen auf die Nachweishäufigkeit ist dabei noch nicht endgültig geklärt. Es existieren nur wenige Studien, die den Schweregrad der atherosklerotischen Veränderungen histopathologisch begutachteten und gleichzeitig einen Chlamydien-Nachweis durchführten. In zwei Studien konnte kein Zusammenhang zwischen Schweregrad und Nachweishäufigkeit gefunden werden (Davidson et al., 1998; Thomas et al.,

1999), in einer dritten wurden in schweren Läsionen deutlich höhere PCR-Positivitätsraten erzielt als in frühen Läsionen (Saldeen et al., 1998).

Das unterschiedliche Ergebnis bei Carotis- und PTCA-Patienten in dieser Arbeit kann mit den unterschiedlichen Erkrankungen zusammenhängen. Vielleicht spielt die Läsionsgröße eine Rolle, so daß die größeren atherosklerotischen Plaques der Carotis häufiger zu einem positiven Nachweis im Blut führen. Auch die ungleiche Verteilung symptomatischer Patienten in beiden Krankheitsgruppen könnte einen Einfluß haben: In der Carotisgruppe waren bei einer Mehrzahl der Patienten neurologische Symptome im Sinne einer cerebralen Embolie aufgetreten, während bei den PTCA-Patienten nur wenige zuvor durch einen Infarkt symptomatisch wurden. Es könnten in beiden Gruppen also Endothelschäden unterschiedlichen Ausmaßes vorliegen, so daß infizierte Wirtszellen in unterschiedlicher Häufigkeit in die Blutbahn gelangen.

Ausgehend von ähnlichen Überlegungen untersuchte eine Studie, ob bei KHK-Patienten nach erlittenem Herzinfarkt die Nachweisbarkeit von Chlamydien-DNA höher ist als in einer KHK-Kontrollgruppe. Dies war aber nicht der Fall (Maass et al., 2000).

Eine andere Frage in diesem Zusammenhang ist, ob eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* einen Einfluß auf Restenoseraten dilatierter Coronargefäße hat. Hierzu wurden mehrere prospektive Studien durchgeführt, die den Antikörperstatus vor der Dilatation mit dem bei erfolgter Restenose verglichen und gleichzeitig in Kontrollgruppen ohne erfolgte Restenose dieselben Daten erhoben. Bis jetzt sind vier Studien publiziert, die alle keinen Zusammenhang zwischen Restenose und Antikörpertiter gegen *Chlamydia pneumoniae* finden konnten (Zhou et al., 1999; Carlsson et al., 2000; Mattila et al., 2001; Schiele et al., 2001).

Studien, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden oder wie sie von anderen Arbeitsgruppen an Patientenmaterial erfolgen, stellen wichtige Erkenntnisse zur Häufigkeit und Verteilung chlamydienassoziiierter Erkrankungen bereit. Für die Klärung von Ursächlichkeit und Einflußmechanismen müssen sie aber durch experimentelle Studien ergänzt werden, die unter modellhaften Voraussetzungen Einzelaspekte der Erkrankung zu verstehen versuchen.

Für die Fragestellung nach dem Zusammenhang von Chlamydieninfektion und Atherosklerose sind daher mehrere tierexperimentelle Studien veröffentlicht worden.

Dies waren zunächst die schon eingangs erwähnten Studien an Kaninchen. Dazu waren definierte Erregermengen nasal inokuliert worden, bevor Untersuchungen an verschiedenen Geweben die Verteilung des Erregers im Organismus klären sollten. Während eine Studie sich auf die Auswirkungen im Respirationstrakt beschränkte (Moazed et al., 1996), untersuchten andere auch Gefäßgewebe. In zwei der Studien wurden die Kaninchen artgerecht ernährt (Fong et al., 1997; Laitinen, 1997), in der dritten wurde cholesterinreiche Nahrung gegeben (Muhlestein et al., 1998).

In diesen drei Studien konnte die Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen beobachtet werden. Hierzu gehören Verdickung der Intima, fibroide oder kalzifizierte Plaques, Anhäufungen von Schaumzellen (fatty streaks) und Proliferation glatter Muskelzellen. Die Veränderungen traten dabei unabhängig von der Nahrungsart auf, in den nicht infizierten Kontrollgruppen konnten sie dagegen nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuteten in die Richtung einer ursächlichen Beteiligung von *Chlamydia pneumoniae* an der Auslösung der Atherosklerose. Dies wird verstärkt durch die Beobachtung von Muhlestein et al., wonach eine Azithromycin-Gabe bei diesen Tieren die Entwicklung atherosklerotischer Plaques verhindert.

Weitere Studien wurden an transgenen Mäusen durchgeführt, die ein defektes Apolipoprotein E besitzen, und daher spontan Atherosklerose entwickeln. Werden hier Erreger nasal inokuliert, kann man sie in atherosklerotischen Läsionen der Aorta in hohen Prozentsätzen nachweisen, während parallel infizierte Wildtypmäuse ohne spontane Atheroskleroseentwicklung deutlich geringere Nachweisraten aufwiesen (Moazed et al., 1997). Dies würde also für einen Tropismus des Erregers im Plaquebereich sprechen.

Die Mauslinie C57BL/6J entwickelt Atherosklerose bei Gabe einer cholesterinreichen Diät. Werden solche Mäuse mit *Chlamydia pneumoniae* infiziert, entwickeln sich atherosklerotische Veränderungen deutlich schneller und sind dabei signifikant größer (Blessing et al., 2001). Hier kann *Chlamydia pneumoniae* eine Rolle als Kofaktor zugesprochen werden.

Keinen Hinweis für eine Beteiligung fand eine schwedische Studie (Caligiuri et al., 2001): An den oben genannten Mauslinien konnten nach Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* keine Unterschiede zu den nicht infizierten Kontrollgruppen festgestellt werden.

Aufgrund der im Tierversuch gewonnenen Erkenntnisse wurde versucht, die Interaktion der Chlamydien mit menschlichen Zellen zu erhellen. Der Schaumzellbildung aus Makrophagen galt dabei besonderes Interesse, da diese als wichtiges Kennzeichen früher atherosklerotischer Veränderungen gilt. Werden menschliche Makrophagen mit oxidierten LDL in Kultur gehalten und mit *Chlamydia pneumoniae* infiziert, können Schaumzellen deutlich häufiger beobachtet werden als in der nicht infizierten Kontrollgruppe (Kalayoglu & Byrne, 1998). Dieser Effekt ist wahrscheinlich unabhängig vom LDL-Rezeptor, da auch Makrophagen LDL-Rezeptor-defizienter Mäuse nach Chlamydieninfektion verstärkt zur Schaumzellbildung neigen (Kalayoglu et al., 1999).

Auch der Effekt einer Chlamydieninfektion auf menschliche glatte Muskelzellen wurde untersucht. Dabei fand man, daß die Infektion endothelialer Zellen dieselben zur Sekretion eines löslichen Faktors bewegt, welcher auf glatte Muskelzellen proliferationsfördernd wirkt. Somit könnte auch die Verdickung der Intima, ein anderes Kennzeichen atherosklerotischer Veränderungen, durch Chlamydien mitbedingt sein (Coombes & Mahony, 1999).

Mit den angeführten Studien liegen also auch Hinweise für eine Beteiligung von *Chlamydia pneumoniae* an auslösenden oder unterhaltenden Prozessen der Atheroskleroseentstehung vor. Da eine endgültige Klärung der Rolle des Erregers aber bis jetzt nicht erfolgt ist, erhofft man sich weitere Erkenntnisse aus den Ergebnissen der zur Zeit laufenden prospektiven Antibiotikastudien. Hier wird an verschiedenen Gruppen ein Zusammenhang von wirksamer Antibiose gegen *Chlamydia pneumoniae* mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse untersucht (Gurfinkel, 2000; Dunne, 2000; Jackson, 2000; Anderson & Muhlestein, 2000). In der WIZARD-Studie an über 7700 Herzinfarktpatienten mit hohem *Chlamydia pneumoniae*-Antikörpertiter war dieser Effekt geringer ausgeprägt als erwartet. Nach initialer Behandlung mit 600 mg Azithromycin täglich für 3 Tage und Weiterbehandlung mit 600 mg Azithromycin wöchentlich für 11 Wochen wurden Verum- und Placebogruppe 2 Jahre lang bezüglich erneutem Infarkt, der Notwendigkeit einer Revaskularisierung und dem Auftreten von Angina pectoris beobachtet. Ein positiver Trend zur Verminderung dieser Ereignisse unter Antibiose ergab sich dabei während des Gesamtbeobachtungszeitraums nur für Diabetiker und Raucher, während der ersten Tage unter Antibiose jedoch für die gesamte Verumgruppe (Deutsche Ärztezeitung, 20.03.2002).

Sollte sich nach Abschluß der anderen laufenden Studien eine absinkende Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse unter Antibiose herausstellen, wäre ein weiterer Hinweis für eine mögliche Beteiligung von *Chlamydia pneumoniae* an atherosklerotischen Erkrankungen erbracht.

Damit käme der Diagnostik eine entscheidende Bedeutung zu, um durch die Untersuchung nicht-invasiv gewonnener Proben wie Blut oder Serum zu entscheiden, für welche Patienten eine antibiotische Therapie Vorteile erbringt.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Rolle von *Chlamydia pneumoniae* bei der Atheroskleroseentstehung wird kontrovers diskutiert. Obwohl der Nachweis von *Chlamydia pneumoniae* aus Blut- und Gewebeproben von Atherosklerosepatienten häufig gelingt, bestehen Unklarheiten über das Ausmaß der Verbreitung des Erregers bei verschiedenen Patientengruppen.

Zum Nachweis chlamydialer DNA aus atherosklerotischen Plaques liegen bereits einige Studien vor. Diese Arbeit sollte zur Ergänzung der Datenlage beitragen, indem Patienten mit Carotisstenose auf *Chlamydia pneumoniae* DNA im peripheren Venenblut untersucht wurden. Der Nachweis gelang in 7 von 56 Fällen. Es konnte also gezeigt werden, daß der Nachweis chlamydialer DNA bei Patienten mit Carotisstenose auch mittels PCR aus peripherem Venenblut möglich ist.

Ebenso konnte Chlamydien-DNA in Gewebeproben atherosklerotischer Veränderungen in 3 von 8 Fällen nachgewiesen werden.

In den unterschiedlichen Kontrollgruppen bestehend aus Medizinstudenten, aus nach Alter und Geschlecht korrelierten Patienten mit anderen Erkrankungen und aus gesunden Gefäßabschnitten der Arteria mammaria interna, konnte in keinem Fall ein positiver Chlamydiennachweis geführt werden

Die Möglichkeit einer erhöhten Nachweisbarkeit chlamydialer DNA durch Manipulation im Bereich atherosklerotischer Plaques wurde mittels PCR aus Blutproben vor und nach PTCA (perkutaner transluminaler Coronarangioplastie) untersucht.

Dabei konnte in keiner der 122 Proben von 52 Patienten Chlamydien-DNA nachgewiesen werden. Auch 30 parallel untersuchte Proben von 22 Patienten die zur Coronarangiographie kamen, erwiesen sich in der PCR als negativ. Für einen Einfluß der PTCA auf die Nachweisbarkeit chlamydialer DNA im Blut ergab sich also kein Hinweis.

## 6. LITERATURANGABEN

Anderson, J.L., Muhlestein, J.B. (2000) The ACADEMIC Study in Perspective (Azithromycin in Coronary Artery Disease: Elimination of Myocardial Infection with Chlamydia). *J Inf Dis* **181**, (Suppl 3), 569-571

Apfalter, P., Blasi, F., Boman, J., Gaydos, C.A., Kundi, M., Maass, M., Makrithatis, A., Meijer, A., Nadrchal, R., Persson, K., Rotter, M.L., Tong, C.Y.W., Stanek, G., Hirschl, A.M. (2001) Multicenter Comparison Trial of DNA Extraction Methods and PCR Assays for Detection of Chlamydia pneumoniae in Endarterectomy Specimens. *J Clin Microbiol* **39**(2), 519-524

Balin, B.J., Gerard, H.C., Arking, E.J., Appelt, D.M., Branigan, P.J., Abrams, J.T., Whittum-Hudson, J.A., Hudson, A.P. (1998) Identification and localization of *C.pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **187**, 23-42

Bartlett, J.G., Breiman, R.F., Mandell, L.A., File, T.M. (1998). Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for management. *Clin Inf Dis* **26**, 811-38

Beaty, C.D., Grayston, J.T., Wang, S.-P., Kio, C.-C., Reto, C.S., Martin, T.R. (1991) *C.pneumoniae*, strain TWAR, infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* **144**, 1408-1410

Black, C.M., Bullard, J.C., Staton Jr, G.W., Hutwagner, L.C., Perez, R.L. (1992) Seroprevalence of *C.pneumoniae* antibodies in patients with pulmonary sarcoidosis in North Central Georgia. In: Proceedings of the European Society for Chlamydial research. Mardh, P.-A., La Placa, M., Wards, M.E. (eds.). Almqvist & Wiksell International, Stockholm, 175.

Black, C.M., Fields, P.I., Messmer, T.O., Berdal, B.P. (1994) Detection of *Chlamydia pneumoniae* in clinical specimens by polymerase chain reaction using nested primers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **13**, 752-756

Blasi, F., Boman, J., Esposito, G., Melissano, G., Chiesa, R., Cosentini, R., Tarsia, P., Tshomba, Y., Betti, M., Alessi, M., Morelli, N., Allegra, L. (1999) Chlamydia pneumoniae detection in peripheral blood mononuclear cells is predictive of vascular infection. *J Inf Dis* **180**, 2074-2076

Blessing, E., Campbell, L.A., Rosenfeld, M.E., Chough, N., Kuo, C. (2001) Chlamydia pneumoniae infection accelerates hyperlipidemia induced atherosclerotic lesion development in C57BL/6J mice. *Atherosclerosis* **158**, 13-17

Bodetti, T.J., Timms, F. (2000) Detection of Chlamydia pneumoniae DNA and antigen in the circulating mononuclear cell fractions of humans and koalas. *Infect Immun* **68**, 2744-2747

Boleti, H., Benmerah, A., Ojcius, D.M., Cerf-Benaussan, N., Dautry-Varsat, A. (1999) Chlamydia infection of epithelial cells expressing dynamin and Eps15 mutants: clathrin-independent entry into cells and dynamin-dependent productive growth. *J Cell Sci* **112**, 1487-1496

Boman, J., Soderberg, S., Forsberg, J., Birgander, L.S., Allard, A., Persson, K., Jidell, E., Kumlin, U., Juto, P., Waldenstrom, A., Wadell, G. (1998) 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**, 274-277

Brunham, R.C. (1999) Human Immunity to Chlamydiae. In: Stephens, R.S. (Ed.) Chlamydia. Intracellular Biology, Pathogenesis and Immunity. *ASM Press, Washington*, 227

Caligiuri, G., Rottenberg, M., Nicoletti, A., Wigzell, H., Hansson, G.K. (2001) Chlamydia pneumoniae infection does not induce or modify atherosclerosis in mice. *Circulation* **103**, 2834-2838

Campbell, L.A., Kuo, C.-C., Grayston, J.T. (1990) Structural and antigenic analysis of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun* **58**, 93-97

Campbell, L.A., Melgosa, M.P., Hamilton, D.J., Kuo, C.-C., Grayston, J.T. (1992) Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**, 434-439

- Carlsson, J., Miketic, S., Brom, J., Ross, R., Bachmann, H., Tebbe, U. (2000) Prior cytomegalovirus, Chlamydia pneumoniae or Helicobacter pylori infection and the risk of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Int J Cardiol* **73**, 165-171
- Coles, K.A., Plant, A.J., Riley, T.V., Smith, D.W., McQuillan, B.M., Thompson, P.L. (1999) Lack of association between seropositivity to Chlamydia pneumoniae and carotid atherosclerosis. *Am J Cardiol* **84** (7), 825-828
- Coombes, B.K., Mahony, J.B. (1999) Chlamydia pneumoniae infection of human endothelial cells induces proliferation of smooth muscle cells via an endothelial cell-derived soluble factor(s). *Infect Immun* **67**, 2909-2915
- Danesh, J., Collins R., Peto, R. (1997) Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* **350**, 430-436.
- Daus, H., Ozbek, C., Saage, D., Scheller, B., Schieffer, H., Pfreundschuh, M., Gause, A. (1998) Lack of evidence for a pathogenic role of Chlamydia pneumoniae and cytomegalovirus infection in coronary atheroma formation. *Cardiology* **90**, 83-88
- Davidson, M., Kuo, C.-C., Middaugh, J.P., Campbell, L.A., Wang, S.P., Newman, W.P. 3rd, Finley, J.C., Grayston, J.T. (1998) Confirmed previous infection with Chlamydia pneumoniae and its presence in early coronary atherosclerosis. *Circulation* **98**, 628-633
- Dobrilovic, N., Vadlamani, L., Meyer, M., Wricht, C.B. (2001) Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic carotid artery plaques: high prevalence among heavy smokers. *Am Surg* **67** (6), 589-593
- Dowell, S.F., Peeling, R.W., Boman, J., Carlone, G.M., Fields, B.S., Guarner, J., Hammerschlag, M.R., Jackson, L.A., Kuo, C.-C., Maass, M., Messmer, T.O., Talkington, D.F., Tondella, M.L., Zaki, S.R. (2001) Standardizing Chlamydia pneumoniae assays: Recommendations from the Center for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease control (Canada). *Clin Inf Dis* **33**, 492-503
- Dunne, M.W. (2000) Rationale and Design of a Secondary Prevention Trial of Antibiotic Use in Patients after Myocardial Infarction: The WIZARD Trial. *J Inf Dis* **181** (Suppl 3), 572-578
- Emre, U., Sokolovskaya, N., Roblin, P.M., Schachter, J., Hammerschlag, M.R. (1995) Detection of anti-*C.pneumoniae* IgE in children with reactive airway disease. *J Inf Dis* **172**, 265-267
- Erntell, M., Ljunggren, K., Gadd, T., Persson, K. (1989) Erythema nodosum – a manifestation of *C. pneumoniae* (strain TWAR) infection. *Scand J Infect Dis* **21**, 693-696
- Espinola-Klein, C., Rupprecht, H.J., Blankenberg, S., Bickel, C., Kopp, H., Rippin, G., Hafner, G., Pfeiffer, U., Meyer, J. (2000). Are morphological or functional changes in the carotid artery wall associated with Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, cytomegalovirus or herpes simplex infection? *Stroke* **31**(9), 2127-2133
- Everett, K.D.E., Bush, R.M. & Andersen, A.A. (1999) Emended description of the order *Chlamydiales*. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 415-440
- Falsey, A.R. & Walsh, E.E. (1993) Transmission of *Chlamydia pneumoniae*. *J. Inf. Dis.* **168**, 439-496
- Fong, I.W., Chiu, B., Viira, E., Fong, M.W., Jang, D., Mahony, J. (1997) Rabbit model for Chlamydia pneumoniae infection. *J Clin Microbiol* **35**, 48-52
- Freidank, H.M., Herr, A.S., Jacobs, E. (1993) Identification of Chlamydia pneumoniae-specific protein antigens in immunoblots. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **12**, 947-951
- Freidank, H.M. (1997) *Chlamydia pneumoniae* – Epidemiologie, Diagnostik und klinische Bedeutung. In: *Habilitationschrift zur Erlangung der venia legendi*, von H. Freidank, Freiburg
- Fukushi, H. & Hirai, K. (1992). Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 306-308

- Gaydos, C.A., Quinn, T.C., Bobo, L.D., Eiden, J.J. (1992) Similarity of *Chlamydia pneumoniae* strains in variable domain IV region of the major outer membrane protein gene. *Infect Immun* **60**, 5319-5323
- Gieffers J, Fullgraf H, Jahn J, Klinger M, Dalhoff K, Katus HA, Solbach W, Maass M. (2001) *Chlamydia pneumoniae* infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation* **103**,351-6
- Gran J.T., Hjetland,R., Andreassen, A.H.(1993). Pneumonia, myocarditis and reactive arthritis due to *C. pneumoniae*. *Scand J Rheumatol* **22**, 43-44
- Grayston, J.T., Kuo, C.-C., Wang, S.P & Altmann, J. (1986) A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N.Engl.J.Med.* **315**,161-168
- Grayston, J.T., Kuo, C.-C., Campbell; L.A. & Wang, S.P. (1989).*Chlamydia pneumoniae* sp.nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 88-90
- Grayston, J.T.(1992a) *Chlamydia pneumoniae*,strain TWAR pneumonia. *Annu Rev Med* **43**, 317-323
- Grayston, J.T.(1992b) Infections caused by*Chlamydia pneumoniae*,strain TWAR. *Clin Inf Dis* **15**, 757-763
- Grayston, J.T., Kuo, C.C., Coulson, A.S., Campbell, L.A., Lawrence, R.D., Lee, M.J., Strandness, E.D., Wang, S.P.(1995) Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* **92** (12), 3397-3400
- Gresshoff, P.M., Bassam, B.J., Caetano-Anolles G. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels.*Anal Biochem* **191**, 80-83
- Gupta, S., Leatham, E.W., Carrington, D., Mendall, M.A., Kaski, J.C., Camm, J.(1997). Elevated *Chlamydia pneumoniae* Antibodies, Cardiovascular Events, and Azithromycin in Male Survivors of Myocardial Infarction. *Circulation* **96**, 404-407
- Gurfinkel, E.(2000) Inflammation, Infection, or Both in Atherosclerosis: The ROXIS Trial in Perspective. *J Inf Dis* **181** (Suppl 3), 566-568
- Hackstadt, T., Scidmore-Carlson,M., Fischer,E.(1998) Rapid dissociation of the *Chlamydia trachomatis* inclusion from endocytic compartments, S.127 –130 in: Stephens, R.S. (Editor) Chlamydial Infections. *Proceedings of the Ninth International Symposium on Human Chlamydial Infection*. International Chlamydia Symposium, San Francisco, Calif.
- Hahn, D.L., Dodge, R.W., Golubjatnikov,R. (1991) Association of *C.pneumoniae* with wheezing asthma bronchitis and adult-onset asthma. *JAMA* **266**, 225-230
- Hahn, D.L., Golubjatnikov,R. (1994) Asthma and chlamydial infection: a case series. *J Family Practice* **38**, 589-595
- Hammerschlag, M. R., K. Chirgwin, P. M. Roblin, M. Gelling, W. Dumornay, L. Mandel, P. Smith, J. Schachter. (1992) Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. *Clin Infect Dis* **14**,178-182
- Hammerschlag, M.R. (1994). Antimicrobial Susceptibility and Therapy of Infections caused by *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*,**38**,9,1873-1878
- Hammerschlag, M.R. (2000). Activity of gemifloxacin and other new quinolones against *Chlamydia pneumoniae*: A review. *J Antimicrob Chem* **45**, Suppl.S1, 35-39
- Herring,A.J.(1993). Typing *Chlamydia psittaci*- a review of methods and recent findings. *Br Vet J* **149**, 455-475
- Hertzen von, L. (1996) *C.pneumoniae* infection in chronic obstructive pulmonary disease-diagnostic, epidemiological and immunological aspects. National Public Health Institute KTL A11/1996, Helsinki, Finland
- Iijima, Y., Miyashita, N., Kishimoto, T., Kanamoto, Y., Soejima, R., Matsumoto, A.(1994) Characterization of *Chlamydia pneumoniae* specific proteins immunodominant in humans. *J Clin Microbiol* **32**, 583-588

- Iliescu, E.A., Fiebig, M.F., Morton, A.R., Sankar-Mistry, P.(2000) Chlamydia pneumoniae in peripheral blood mononuclear cells in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* **20**,722-726
- Iliffe-Lee, E.R., McClarty, G.(1999) Glucose metabolism in *Chlamydia trachomatis*: the 'energy parasite' hypothesis revisited
- Jackson, L.A., Campbell, L.A., Kuo, C.C., Rodriguez, D.I., Lee, A., Grayston, J.T.(1997). Isolation of Chlamydia pneumoniae from a carotid endarterectomy specimen. *J Inf Dis* **176** (1), 292-295
- Jackson, L.A. (2000) Description and Status of the Azithromycin and Coronary Events Study (ACES). *J Inf Dis* **181** (Suppl 3), 579-581
- Jantos C.A., Artelt, P., Schiefer, H.G.(1993). Acute lower respiratory tract infection associated with *C. pneumoniae* in Germany. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* **12**, 33-35
- Jantos, C.A., Nesseler, A., Waas, W., Baumgartner, W., Tillmanns, H., Haberbosch, W.(1999) Low prevalence of Chlamydia pneumoniae in atherectomy specimens from patients with coronary heart disease. *Clin Inf Dis* **28**, 988-992
- Kalayoglu, M.V., Byrne, G.I.(1998) Induction of Macrophage Foam Cell Formation by Chlamydia pneumoniae. *J Inf Dis* **177**, 725-729
- Kalayoglu, M.V., Miranpuri, G.S., Golenbock, D.T., Byrne, G.I.(1999) Characterization of low density lipoprotein uptake by murine macrophages exposed to Chlamydia pneumoniae. *Microbes Infect* **6**, 409-418
- Kaltenboeck, B., Kousoulas, K.G., Storz, J.(1993). Structures of an allelic diversity and relationships among the outer membrane protein (omp A9 genes of the four chlamydial species. *J Bacteriol* **175**, 487-502
- Kaul, R., Uphoff, J., Wiedeman, J., Yadlapalli, S., Wenman, W.M.(2000) Detection of Chlamydia pneumoniae DNA in CD3+ lymphocytes from healthy blood donors and patients with coronary artery disease. *Circulation* **102**, 2341-2346
- Kawamoto, R., Doi, T., Tokunaga, H., Konishi, I.(2001). An association between an antibody against Chlamydia pneumoniae and common carotid atherosclerosis. *Intern Med* **40** (3), 208-213
- Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, R.M.(1998). Medizinische Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart* 338ff
- Khan, M.A., Potter, C.W.(1996) The nPCR detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* in children hospitalized for bronchiolitis. *J Inf* **33**, 173-175
- Kuo, C.-C., Chen, H.-H., Wang, S.-P., Grayston, J.T. (1986). Identification of a new group of *C.psittaci* strain called TWAR. *J Clin Microbiol* **24**, 1034-1037
- Kuo, C.-C., Grayston, J.T.(1990) A sensitive cell line, HL-cells for isolation and propagation of *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *J Inf Dis* **162**, 755-758
- Kuo, C.-C., Shor, A., Campbell, L.A., Fukushi, H., Patton, D.L., Grayston, T. (1993) Demonstration of Chlamydia pneumoniae in Atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Inf Dis* **167**,841-849
- Laitinen, K., Laurila, A., Pyhala, L., Leinonen, M., Saikku, P.(1997) Chlamydia pneumoniae infection induces inflammatory changes in the aortas of rabbits. *Infection&Immunity* **65**, 4832-4835
- Levy, N.J. & Moulder, J.W.(1982) Attachment of cell walls of *Chlamydia psittaci* to mouse fibroblasts (L cells). *Infect Immun* **37**,1059-1065
- Maass, M., Krause, E., Engel, P.M., Kruger, S. (1997) Endovascular presence of Chlamydia pneumoniae in patients with hemodynamically effective carotid artery stenosis. *Angiology* **48** (8), 699-706
- Maass, M., Jahn, J., Gieffers, J., Dalhoff, K., Katus, H.A., Solbach, W. (2000) Detection of Chlamydia pneumoniae within peripheral blood monocytes of patients with unstable angina or myocardial infarction. *J Inf Dis* **181**, Suppl 3, 449-451

- Mahony, J.B., Chong, S., Coombes, B.K., Smieja, M., Petrich, A. (2000) Analytical sensitivity, reproducibility of results, and clinical performance of PCR assays for detecting *Chlamydia pneumoniae* DNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Microbiol* **38**, 2622-2627
- Markus, H.S., Sitzer, M., Carrington, D., Mendall, M.A., Steinmetz, H. (1999) *Chlamydia pneumoniae* infection and early asymptomatic carotid atherosclerosis. *Circulation* **100** (8), 832-837
- Marrie, T.J., Marczy, M., Mann, O.E., Landymore, R.W., Raza, A., Wang, S.-P., Grayston, J.T. (1990). Culture-negative endocarditis probably due to *C.pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **112**, 199-204
- Mattila, K.J., Juvonen, J.T., Kotamaki, M.K., Saikku, P.A. (2001) *Chlamydia pneumoniae* and luminal narrowing after coronary angioplasty. *J Intern Med* **250**, 67-71
- Meijer, A., Roholl, P.J., Gielis-Propert, S.K., Ossewaarde, J.M. (2000) *Chlamydia pneumoniae* antigens, rather than viable bacteria, persist in atherosclerotic lesions. *J Clin Pathol* **53** (12), 911-916
- Melnick, S.L., Shahar, E., Folsom, A.R., Grayston, J.T., Sorlie, P.D., Wang, S.P., Szklo, M. (1993). Past infection by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR and asymptomatic carotid atherosclerosis. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Am J Med* **95**(5), 499-504
- Mendall, M.A., Carrington, D., Strachan, D., Patel, P., Molineaux, N., Levi, J., Toosey, T., Camm, A.J., Northfield, T.C. (1995) *Chlamydia pneumoniae*: Risk factors for seropositivity and association with coronary heart disease. *J Infect* **30**, 121-128
- Moazed, T.C., Kuo, C., Patton, D.L., Grayston, J.T., Campbell, L.A. (1996) Experimental rabbit models of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Am J Pathol* **148**, 667-676
- Moazed, T.C., Kuo, C., Grayston, J.T., Campbell, L.A. (1997) Murine models of *Chlamydia pneumoniae* infection and atherosclerosis. *J Inf Dis* **175**, 883-90
- Moulder, J.W. (1991) Interaction of *Chlamydiae* and host cells in vitro. *Microbiol Rev* **55**, 143-190
- Muhlestein, J.B., Hammond, E.H., Carlquist, J.F., Radicke, E., Thomson, M.J., Karagounis, L.A., Woods, M.L., Anderson, J.L. (1996) Increased incidence of *Chlamydia* species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerosis versus other forms of cardiovascular disease. *Am Coll Cardiol* **27**(7), 1555-1561
- Muhlestein, J.B., Anderson, J.L., Hammond, E.H., Zhao L., Trehan S., Schwobe E.P., Carlquist, J.F. (1998) Infection with *Chlamydia pneumoniae* accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation* **97**, 633-636
- Nadrchal, R., Makrithatis, A., Apfalter, P., Rotter, M., Trubel, W., Huk, I., Polterauer, P., Hirschl, A.M. (1999) Detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in atheromatous tissues by polymerase chain reaction. *Wien Klin Wochenschr* **111** (4), 153-156
- Newhall, W.J., V., Jones, R.B. (1983) Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of *Chlamydiae*. *J Bacteriol* **154**, 998-1001
- Ouchi, K., Fujii, B., Kanamoto, Y., Karita, M., Shirai, M., Nakazawa, T. (1998) *Chlamydia pneumoniae* in coronary and iliac arteries of Japanese patients with atherosclerotic cardiovascular diseases. *J Med Microbiol* **47**, 907-913
- Radke, P.W., Merkelbach-Bruse, S., Messmer, B.J., vom Dahl, J., Dorge, H., Naami, A., Vogel, G., Handt, S., Hanrath, P. (2001) *Coron Artery Dis* **12**, 1-6
- Rostand, K.S., Esko, J.D. (1997) Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect Immunol* **65**, 1-8
- Saikku, P., Mattila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinonen, M., Ekman, M.-R., Mäkelä, P.H., Valtonen, V. (1988) Serological evidence of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* **ii** 983-985

Saikku, P. (1992) The epidemiology and significance of *C.pneumoniae*. *J Inf* **25**, Suppl 1, 27-34

Saikku, P. (1993) Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor in acute myocardial infarction. *Europ Heart J* **14**, Suppl. K, 62-65

Saldeen, T.G.P., Ericson, K., Lindquist, O., Pahlson, C., Lindblom, B., Liu, A.J., Mehta, J.L. (1998) Chlamydia and HLA-DR Genotypes in Coronary Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* **31**, A 272

Sander, D., Winbeck, K., Klingelhofer, J., Etgen, T., Conrad, B. (2001). Enhanced progression of early carotid atherosclerosis is related to Chlamydia pneumoniae seropositivity. *Circulation* **103** (10), 1390-1395

Schiele, F., Batur, M.K., Seronde, M.F., Meneveau, N., Sewoke, P., Bassignot, A., Couetdic, G., Caulfield, F., Bassand, J.P. (2001) Cytomegalovirus, Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori IgG antibodies and restenosis after stent implantation: an angiographic and intravascular ultrasound study. *Heart* **85**, 304-311

Schmidt, C., Hulthe, J., Wikstrand, J., Gnarpe, H., Gnarpe, J., Agewall, S., Fagerberg, B. (2000). Chlamydia-pneumoniae seropositivity is associated with carotid-artery intima-media thickness. *Stroke*, **31** (7), 1526-31

Shor, A., Kuo, C.C., Patton, D.L. (1992) Detection of Chlamydia pneumoniae in the coronary atheroma plaque. *South Afr Med J* **82**, 158-161

Smieja, M., Cong, S., Natarajan, M., Petrich, A., Rainen, L., Mahony, J.B. (2001) Circulating nucleic acids of Chlamydia pneumoniae and Cytomegalovirus in patients undergoing coronary angiography *J Clin Microbiol* **39**, 596-600

Sriram, S., Mitchell, W., Stratton, C. (1998) Multiple sclerosis associated with *C.pneumoniae* infection of the CNS. *Neurology* **50**, 571-572

Stephens, R.S., Editor (1999). In: *Chlamydia. Intracellular Biologie, Pathogenesis, and Immunity*. **ASM Press, Washington**, xi ff

Stille, W., Stephan, C. (1998) Argumente für eine Antibiotika-Therapie der multiplen Sklerose. *Chemother J* **7**, 143-146

Storey, C., Lusher, M. & Richmond, S. (1993). Evidence for *Chlamydia pneumoniae* of non-human origin. *J Gen Microbiol* **139**, 2621-2626

Su, H., Zhang, Y.-X., Li, R. (1985) Presence of muramic acid in *Chlamydia trachomatis* proved by liquid chromatography-mass spectrometry. *Kexue Tongbao* **30**, 695-699

Su, H., Raymond, L., Rockey, D.D., Fischer, F., Hackstadt, T., Cladwell, H.D. (1996) A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proc Nat Acad Sci USA* **93** 11143-11148

Surcel, H.M., Syrjälä, H., Leinonen, M., Saikku, P., Herva, E. (1993) Cell-mediated immunity to *Chlamydia pneumoniae* measured as lymphocyte blast transformation in vitro. *Infect Immun* **61**, 2196-2199

Thom, D.H., Wang, S.-P., Grayston, J.T., Siscovick, D.S., Stewart, D.K., Kronmal, R.a., Weiss, N.S. (1991) Chlamydia pneumoniae strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary heart disease. *Arteriosclerosis Thromb.* **11**, 547-551

Thomas, M., Wong, Y., Thomas, D., Ajaz, M., Tsang, V., Gallagher, P.J., Ward, M.E. (1999) Relation between direct detection of Chlamydia pneumoniae DNA in human coronary arteries at postmortem examination and histological severity (Stary grading) of associated atherosclerotic plaque. *Circulation* **99**, 2733-2736

Tiran, A., Tio, R.A., Ossewaarde, J.M., Tiran, B., Heijer, P.D., The, T.H., Wilders-Truschnig, M.M. (1999) Coronary angioplasty induces rise in Chlamydia pneumoniae-specific antibodies *J Clin Microb* **37**, 1013-1017

Ting, L.-M., Hsia, R.-C., Haidaris, C.G., Bavoi, P.M. (1995) Interaction of outer membrane proteins of *Chlamydia psittaci* GPIC with the HeLa cell surface. *Infect Immun* **63**, 3600-3608

Tomas, J. (2000) in: Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades, Institut für med. Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg

Wang, S.P., Grayston, J.T. (1986) Microimmunofluorescence serological studies with the TWAR organism. In: Chlamydial Infections (J.D. Oriol, et al., eds), pp. 566. Cambridge University Press, Cambridge

Ward, M.E., (1999) Mechanisms of Chlamydia-Induced Disease. In: Stephens, R.S. (Ed.) Chlamydia. Intracellular Biology, Pathogenesis and Immunity. *ASM Press, Washington*, 195

Weiss, S.M., Roblin, P.M., Gaydos, C.A., Cummings, P., Patton, D.L., Schulhoff, N., Shani, J., Frankel, R., Penney, K., Quinn, T.C., Hammerschlag, M.R., Schachter, J. (1996) Failure to detect Chlamydia pneumoniae in coronary atheromas of patients undergoing atherectomy. *J Inf Dis* **173**, 957-962

Wong, K.H., Skelton, S.K., Chan, Y.K. (1992) Efficient culture of *Chlamydia pneumoniae* with cell lines derived from the human respiratory tract. *J Clin Microbiol* **30**, 1625-1630

Yang, Z.P., Kuo, C.-C., Grayston, J.T. (1993) A mouse model of *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR pneumonitis. *Infect Immun* **61**, 2037-2040

Zhou, Y.F., Csako, G., Grayston, J.T., Wang, S.P., Yu, Z.X., Shou, M., Leon, M., Epstein, S.E. (1999) Lack of association of restenosis following coronary angioplasty with elevated C-reactive protein levels or seropositivity to Chlamydia pneumoniae. *Am J Cardiol* **84**, 595-598