

# Untersuchungen zur Chlamydien-Wirtszell-Interaktion

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Simone Heß

geboren am 25.09.1972 in Frankfurt am Main

2002

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Klos

Tag der Promotion: 11.12.2002





## Zusammenfassung

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien mit einem biphasischen Entwicklungszyklus. Sie haben eine extrazelluläre infektiöse Form, die Stoffwechsel-inaktiv ist und eine intrazelluläre Form, die Stoffwechsel-aktiv, aber nicht mehr infektiös ist. Diese vermehrt sich innerhalb der Zelle und wandelt sich wiederum in die infektiöse Form um.

*Chlamydia trachomatis* und *Chlamydophila pneumoniae* befallen beim Menschen primär die Schleimhäute. *C. trachomatis* löst Entzündungen im Urogenitalbereich aus, die schwere Folgen wie beispielsweise Unfruchtbarkeit hervorrufen, sowie Entzündungen der Augen, die zur Erblindung führen können. Daneben ist *C. trachomatis* auch Auslöser einer Gelenkerkrankung, der reaktiven Arthritis. *C. pneumoniae* ist Hauptverursacher der bakteriellen atypischen Pneumonie und steht im Verdacht, an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt zu sein.

Für einige wenige Gene der Wirtszelle war bereits aufgezeigt worden, dass ihre Expression durch chlamydiale Infektion verändert wird. Dabei ist unklar, ob dies durch eine „passive“ Beeinflussung der Wirtszelle beispielsweise durch chlamydiale *heatshock*-Proteine oder LPS geschieht oder aber durch „aktive“ Prozesse der Chlamydien, wie das Einbringen chlamydialer Proteine in das Wirtszellzytosol über einen Typ III Sekretionsapparat.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine breite Analyse der Chlamydien-induzierten Genexpression der Wirtszelle durchgeführt werden. Dies sollte ein umfassenderes Bild der durch Chlamydien in der Wirtszelle ausgelösten Mechanismen liefern, um die Pathogenese besser zu verstehen und um Ansatzpunkte für mögliche Therapien chlamydialer Erkrankungen zu schaffen. Dazu wurden primär Microarrays (mit bis zu 12.000 Genen) verwendet und die Genexpression von epithelialen HeLa-Zellen zwischen 2 und 60 Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis* bzw. *C. pneumoniae* vergleichend analysiert.

Es konnten dabei über 1.500 Wirtszellgene gefunden werden, deren Expression sich nach chlamydialer Infektion veränderte, davon mehrere hundert, bei denen es zu einer mittleren oder starken Regulation kommt. Zusätzlich wurde für eine Auswahl an Genen eine Überprüfung der in den Arrays gewonnenen Ergebnisse sowie eine detaillierte Analyse durch *Real-Time*-RT-PCR und ELISA durchgeführt. Neben einer Vielzahl gleichartiger Zellantworten auf die beiden Chlamydienpezies findet man auch spezifische Unterschiede. Zwischen zwei *C. trachomatis* Biovaren lassen sich hingegen keine solchen Unterschiede nachweisen. Die ermittelten Effekte wurden fast ausschließlich durch lebende Chlamydien hervorgerufen – wobei zu berücksichtigen ist, dass bewusst eine kaum LPS-responsibel Zelllinie gewählt wurde. Durch Messungen von Zytokinen im Zellkulturüberstand nach Infektion mit *C. trachomatis* war es möglich exemplarisch zu zeigen, dass die gefundenen Regulationen auch auf Proteinebene nachzuvollziehen sind. Zusätzlich konnte die Übertragbarkeit identifizierter Regulationen von HeLa-Zellen auf eine Synovialfibroblastenlinie und primäre humane Chondrozyten gezeigt werden.

Neben diesen Untersuchungen wurde versucht, durch chemische Mutagenese eine Chlamydien-resistente CHO-Zelllinie zu erzeugen, um so Informationen über Faktoren, die für das Eindringen der Chlamydien in die Wirtszelle und das intrazellulär Überleben notwendig sind, zu erhalten. Auch wenn dieses Teilprojekt nicht zum Erfolg führte, zeigte sich die grundsätzliche Brauchbarkeit des verwendeten Ansatzes.

Ein weiteres Teilprojekt war die Erzeugung und Expression chlamydialer GFP-Fusionsproteine, die in HeLa-Zellen anschließend auf ihre phänotypischen Beeinflussungen der Zelle hin untersucht werden sollten. Hierbei wurden Proteine ausgewählt, die möglicherweise als Effektorproteine durch einen Typ III Sekretionsapparat in das Zytosol der Wirtszelle gelangen könnten, um dort auf die Zelle einzuwirken. Mit den hier erzeugten Fusionsproteinen soll versucht werden, die mittels Array und weiterführender Methoden aufgezeigten Wirtszellveränderungen nachzuvollziehen und damit die Signalkette von der Wirtszellantwort zurück zu den induzierenden Bakterien aufzuschlüsseln. Auch dieser mögliche Ansatz zeigt das Potential der breiten hier gewählten Wirtszellanalyse.

Zusammengefasst: Durch die primäre Verwendung der Arrays als Screening und anschließende genauere Analyse einzelner Veränderungen in der Genexpression der Wirtszelle konnten viele neue Chlamydien-induzierte Wirtszellantworten aufgezeigt werden. Diese Wirtszellantworten könnten nicht nur die Pathogenese akuter Erkrankungen verständlich machen, sondern auch nach Abgleich mit der Literatur viele Vorgänge, die bei einer Atherosklerose auftreten, erklären.



## Abstract

Chlamydia are obligate intracellular bacteria with a biphasic life-cycle: There is an infectious, metabolically inactive, extracellular form, and an intracellular form, which is metabolically active, but not infectious. It multiplies within the cell and transforms back to the infectious form. *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydophila pneumoniae* infect primarily the mucosa. In humans, *C. trachomatis* causes inflammations of the urogenital tract, which can lead to infertility, or an eye-disease that can cause blindness. A joint disease, reactive arthritis, is also one of the sequelae. *C. pneumoniae* is the leading cause for atypical bacterial pneumonia. It is suspected to participate in the development of atherosclerosis. Before our study, changes in the expression during chlamydial infection had been described only for a few host-cell genes. For most of them, it was not known whether these changes were caused by "active" processes of the Chlamydia, e.g. by transferring chlamydial proteins into the host-cell cytosol by the type III secretion apparatus or "passively", e.g. due to chlamydial heat-shock proteins or LPS.

In this project, to gain a better molecular understanding of the interaction between pathogen and host-cells, Microarrays (with up to 12,000 genes) were used for a comparative transcriptome analysis of HeLa-cells 2 to 60 h after infection with *C. trachomatis* or *C. pneumoniae*, respectively. Over 1,500 human genes could be determined whose expression changed after chlamydial infection, several hundred of them with a substantial degree of regulation. For verification of these results and a detailed analysis, real-time RT-PCR and ELISA followed. The majority of identified regulations were the same for both species. However, some specific differences could also be found. This was not the case for two different biovars of *C. trachomatis*. The evoked effects were almost exclusively caused by living Chlamydia, i.e. by an active bacterial mechanism. Cytokine-ELISAs of cell culture supernatant confirmed regulations on the protein level. Furthermore, it was possible to "transfer" identified regulations from HeLa-cells to a synovial fibroblast cell-line and to human primary chondrocytes. Additionally, to obtain informations about host cell factors necessary for chlamydial attachment and entry, or chlamydial intracellular survival, chemical mutagenesis was performed on CHO cells to produce chlamydia-resistant clones - an experimental approach which has been shown to be principally useful. A third, smaller project was the generation and expression of chlamydial GFP-fusion proteins. Their potential to induce phenotypical changes in HeLa-cells - as they have been identified by the transcriptome analysis during chlamydial infection - will be analyzed. For this project, putative effector proteins of the type III secretion apparatus were chosen.

In summary: By using Microarrays for a screening and other methods for a more detailed analysis, many new chlamydia-dependent host-cell reaction could be identified. These observations increase not only our understanding of acute chlamydial infections but also indicate how chlamydia could participate in the pathogenesis of atherosclerosis.





## **Schlagworte**

Chlamydien, Bakterien-Wirtszell-Interaktion, Microarrays

## **Keywords**

Chlamydia, Host-Pathogen-Interaction, Microarrays



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Taxonomie der Ordnung der <i>Chlamydiales</i> .....	2
1.2 Entwicklungszyklus und Biologie der Chlamydien .....	4
1.3 Pathogenese/Chlamydien-induzierte Erkrankungen.....	6
1.3.1 Erkrankungen durch <i>C. psittaci</i> .....	7
1.3.2 Erkrankungen durch <i>C. trachomatis</i> .....	7
1.3.3 Erkrankungen durch <i>C. pneumoniae</i> .....	8
1.4 Wechselwirkungen zwischen Chlamydien und ihren Wirtszellen .....	9
1.4.1 Vermehrte Expression/Freisetzung immunmodulatorischer Moleküle.....	9
1.4.2 Apoptose.....	9
1.4.3 Weitere Beeinflussungen.....	10
1.5 Der Typ III Sekretionsapparat.....	10
1.6 (cDNA-)Microarrays .....	11
1.7 Zielsetzung.....	13
2 Material und Methoden .....	15
2.1 Geräte.....	15
2.2 Eukaryonte Zellen, Bakterien und Kulturmedien.....	16
2.3 Vektoren .....	19
2.4 Primer .....	19
2.5 Enzyme und Kits .....	21
2.6 Puffer und Lösungen .....	22
2.7 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.8 Chemikalien.....	23
2.9 Internet.....	24
2.10 Molekularbiologische Methode.....	25
2.10.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	25
2.10.2 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	25
2.10.3 Präzipitation von Nukleinsäuren .....	26
2.10.3.1 Ethanolische Fällung .....	26
2.10.3.2 Isopropanolfällung.....	26
2.10.4 Agarosegelelektrophorese .....	27

2.10.5	Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	28
2.10.6	Restriktionsspaltung von DNA .....	29
2.10.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	29
2.10.8	TOPO-Cloning <sup>TM</sup> .....	30
2.10.8.1	Amplifikation und Aufreinigung des Inserts .....	31
2.10.8.2	Durchführung der Klonierung .....	31
	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen .....	32
2.10.8.3	Plasmid-Midi/Maxi-Präparation .....	32
2.10.8.4	Plasmid-Mini-Präparation .....	32
2.10.9	Isolierung von genomischer DNA .....	33
2.10.10	Nachweis von Mykoplasmen .....	33
2.10.11	Molekularbiologische Unterscheidung einzelner <i>C. trachomatis</i> Biovar/Serovar .....	34
2.10.12	Arbeiten mit RNA .....	35
2.10.13	Isolierung von RNA aus adhären Zellen .....	35
2.10.14	Denaturierende RNA-Agarosegele .....	35
2.10.15	cDNA-Synthese .....	36
2.10.16	Verwendung von (cDNA-)Microarrays .....	36
2.10.16.1	Durchführung von Atlas-Nylon-cDNA-Arrays .....	37
2.10.16.2	Durchführung von Affymetrix Microarrays .....	38
2.10.17	Real-Time-RT-PCR .....	39
2.10.17.1	Primergenerierung und Austestung der Primer .....	41
2.10.17.2	Quantitative Bestimmung von cDNA mittels <i>Real-Time-PCR</i> .....	42
2.11	Zell- und immunbiologische Methoden .....	43
2.11.1	Kultivierung von eukaryonten Zellen .....	43
2.11.2	Bestimmung der Zellzahl und Überprüfung der Vitalität der Zellen .....	43
2.11.3	Entfernung von Mykoplasmen aus Zellkulturen .....	44
2.11.4	Gewinnung von Zellkulturproben für die Überprüfung auf eine Mykoplasmen- Kontamination .....	44
2.11.5	Gewinnung von primären Chondrozyten aus humanem Knorpel-Gewebe .....	44
2.11.6	Transiente Transfektion von humanen Zelllinien .....	45
2.11.7	Transiente Transfektion nach der Lipofectamin <sup>TM</sup> -Methode .....	45
2.11.8	Transiente Transfektion nach der Effectene <sup>TM</sup> -Methode .....	46
2.11.9	Transiente Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode .....	46

2.11.10	Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels $\beta$ -Galaktosidase (x-Gal-Assay)	46
2.11.11	Chemische Mutagenese von eukaryonten Zellen mittels EMS	47
2.11.12	Anfertigung einer <i>Limiting Dilution</i>	48
2.11.13	ELISA ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )	48
2.11.13.1	Probengewinnung für den ELISA	49
2.11.13.2	Durchführung des ELISA	49
2.12	Methoden zum Arbeiten mit Chlamydien	49
2.12.1	Infektion von adhärennten Zellen mit Chlamydien	49
2.12.2	Überprüfung der Infektion	50
2.12.3	Bestimmung der Anzahl an infektiösen Einheiten (IFU) von Chlamydien	51
2.12.4	Abtöten der Chlamydien durch Bestrahlung mit UV-Licht	52
2.12.5	Aufreinigung von Elementarkörperchen (EK)	52
2.12.5.1	Erzeugung von krudem Chlamydienmaterial	53
2.12.5.2	Aufreinigung von Chlamydien durch Ultrazentrifugation – Produktion eines Chlamydienstocks	53
2.13	Mathematische/Statistische Verfahren	54
2.13.1	Fishers Exakter Test	54
3	Ergebnisse	57
3.1	Teil 1: Breite Analyse der Chlamydien-induzierten Genregulation der Wirtszelle	57
3.1.1	Vorarbeiten für die Analyse des Wirtszell-Transkriptoms	58
3.1.1.1	Vergleich der transienten Transfizierbarkeit verschiedener Zelllinien	59
3.1.1.2	Überprüfung der Infizierbarkeit von HeLa T mit <i>C. trachomatis</i> Serovar L2 und D und <i>C. pneumoniae</i>	60
3.1.1.3	Orientierende Messung phänotypischer Veränderungen der Wirtszelle nach Infektion mit <i>C. pneumoniae</i> und <i>C. trachomatis</i>	60
3.1.2	Untersuchung der <i>C. trachomatis</i> -induzierten Wirtszell-Genexpression mittels Clontech Atlas Arrays und weiterführender Methoden	61
3.1.2.1	Analyse der Genexpression durch Atlas Arrays	62
3.1.2.1.1	Atlas Array <i>C. trachomatis</i> /HeLa T 12h p.i.	62
3.1.2.1.2	Atlas Array <i>C. trachomatis</i> /HeLa T 24h p.i.	64
3.1.2.2	Überprüfung der Ergebnisse der Microarrays durch unabhängige Verfahren	69
3.1.2.2.1	Überprüfung der Ergebnisse mittels semiquantitativer Real-Time-RT-PCR	70

3.1.2.2.2	Überprüfung der Microarray Ergebnisse mittels ELISA für LIF, IL-6 und IL-11 .....	74
3.1.2.3	Übertragung der Ergebnisse auf andere Zellen: Nachweis von LIF, IL-6 und IL-11 bei einer Synovialfibroblast-Zelllinie und primären humanen Chondrozyten ..	76
3.1.2.4	Vergleichende Analyse der Veränderungen der Wirtszell-Genexpression durch <i>C. trachomatis</i> und <i>C. pneumoniae</i> .....	78
3.1.2.4.1	Untersuchung der Chlamydien-induzierten Genexpression mittels Affymetrix U95A Microarrays .....	78
3.1.2.5	Überprüfung der gefundenen Regulationen mit unabhängigen Methoden und Vergleich der Regulation bei verschiedenen Chlamydienstämmen .....	121
3.2	Teil 2: Untersuchungen zur Identifizierung von Faktoren, die zum Eindringen und Überleben der Chlamydien in der Wirtszelle notwendig sind .....	125
3.2.1	Überprüfung der Infizierbarkeit verschiedener CHO-Zell-Mutanten.....	126
3.2.2	Mutagenese-Experimente mit CHO-Zellen zur Generierung einer Chlamydien-resistenten Mutante .....	127
3.2.2.1	Austestung der optimalen Konzentration an EMS zur Mutagenese .....	127
3.2.2.2	Chemische Mutagenese und Versuch der Selektion von Chlamydien-resistenten Klonen.....	127
3.3	Teil 3: Erzeugung von chlamydialen GFP-Fusionsproteinen.....	128
3.3.1	Vorarbeiten zur Expression von GFP-Fusionsproteinen .....	129
3.3.2	Auswahl möglicher chlamydialer Effektorproteine.....	130
3.3.3	Expression der GFP-Fusionsproteine.....	130
4	Diskussion.....	133
4.1	Untersuchungen zur Chlamydien-induzierten Genexpression.....	133
4.1.1	Güte der Ergebnisse .....	133
4.1.1.1	Array-Ergebnisse .....	133
4.1.1.1.1	Statistische Bewertung der Array-Ergebnisse.....	134
4.1.1.1.2	Abgleich der Ergebnisse der Clontech und der Affymetrix-Arrays .....	138
4.1.1.1.3	Vergleich der Ergebnisse der Real-Time-RT-PCRs und der Array-Experimente .....	139
4.1.1.2	Überprüfung der Array-Ergebnisse durch ELISA .....	139
4.1.1.3	Vergleich mit Literaturangaben .....	140
4.1.2	Bedeutung der veränderten Genexpressionen.....	141

4.1.2.1 Vergleich von Regulationen, die durch <i>C. trachomatis</i> L2 oder D verursacht werden .....	143
4.1.2.2 Vergleich der Regulationen, die durch <i>C. trachomatis</i> oder <i>C.pneumoniae</i> ausgelöst werden.....	143
4.1.2.3 Vergleich mit Genregulationen bei Infektion mit anderen Bakterien .....	145
4.1.2.4 Übertragbarkeit auf andere Zellen.....	147
4.1.2.5 Zusammenhang aufgezeigter Regulationen der Genexpression mit Atherosklerose .....	147
4.1.2.5.1 Immunmodulatoren .....	148
4.1.2.5.2 Adhäsionsmoleküle .....	150
4.1.2.5.3 Transkriptionsfaktoren.....	151
4.1.2.5.4 Enzyme und assoziierte Proteine.....	151
4.1.2.5.5 Zusammenfassung .....	153
4.2 Chemische Mutagenese zur Erzeugung Chlamydien-resistenter Zellen .....	153
4.3 Expression chlamydialer GFP-Fusionsproteine .....	155
5 Literatur .....	157
Abbildungsverzeichnis .....	169
Tabellenverzeichnis .....	170
Abkürzungsverzeichnis .....	174
Anhang.....	177
Lebenslauf .....	211
Verzeichnis eigener Publikationen .....	213





# 1 Einleitung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Wechselwirkungen zwischen Bakterien der Familie der *Chlamydiaceae* und ihren humanen Wirtszellen untersucht. Einen Schwerpunkt der Arbeit bildete dabei die breite Analyse der Chlamydien-induzierten Veränderungen der Wirtszell-Genexpression mittels cDNA-Microarrays und weiterführender Methoden.

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien, das heißt sie lassen sich nicht in Nährmedien anzüchten, sondern vermehren sich ausschließlich innerhalb einer Wirtszelle. Sie liegen dabei in zwei Formen vor: den Elementarkörperchen (EK), die extrazelluläre, infektiöse Form, die aber nicht Stoffwechsel-aktiv ist und den Retikularkörperchen (RK), die die Stoffwechsel-aktive, sich vermehrende Form darstellen.

Einige Chlamydienpezies haben sich auf den Menschen als Wirt spezialisiert, andere infizieren ebenfalls oder ausschließlich Säugetiere oder Vögel. Inzwischen konnten auch Chlamydien bei anderen Tieren, wie beispielsweise Fröschen nachgewiesen werden [1]. Chlamydien gehören dabei zu den am häufigsten auftretenden Bakterien beim Menschen und lösen primär Erkrankungen der Schleimhäute im Augen-, Atemwegs- und Genitalbereich aus mit teilweise schwerwiegenden Folgen wie Erblindung oder Unfruchtbarkeit.

Als 1676 A. van Leeuwenhoek „kleine Tierchen“ in Speichel, Wasser und anderen Flüssigkeiten mit Hilfe seines Mikroskops entdeckte, war ihm noch nicht bewusst, dass diese kleinen Tierchen einmal so viel Aufmerksamkeit erregen würden. Es dauerte dann auch knapp 200 Jahre bis L. Pasteur (1857) herausfand, dass die Gärung durch solche „Tierchen“ hervorgerufen wird und keine Eigenschaft der Flüssigkeit selbst war und dass diese Mikroorganismen auch nicht spontan von selbst in der Flüssigkeit entstanden, sondern von außen zugefügt werden mussten. 1876 schließlich erbrachte R. Koch den Beweis für die von F. Henle aufgestellte Theorie, dass Bakterien, die von einem erkrankten Tier isoliert, kultiviert und auf ein anderes Tier übertragen wurden, dort zur gleichen Erkrankung führen wie bei dem ersten Tier. Damit war der Bezug zwischen einer Erkrankung und dem dafür verantwortlichen Erreger hergestellt. Im Folgenden wurde daran gearbeitet, diese Erreger unschädlich zu machen und damit die Krankheit zu bekämpfen.

Durch die Fortschritte in der Biochemie und Zellbiologie eröffneten sich in den letzten Jahrzehnten für die Mikrobiologie ganz neue Möglichkeiten, Bakterien und deren Wechselwirkungen mit Wirtszellen sowie daraus resultierende Erkrankungen zu untersuchen.

So werden häufig bestimmte Pathogenitätsfaktoren von Bakterien dadurch identifiziert, dass die fraglichen Gene des Keims verändert oder entfernt und die Auswirkungen auf das Bakterium, wie beispielsweise eine verringerte Pathogenität, studiert werden. Durch die Rekonstitution des ursprünglichen Gens läßt sich eindeutig zeigen, dass die eingetretene Veränderung tatsächlich auf dieses Gen zurückzuführen ist.

Ein solches Vorgehen zur Bestimmung von Pathogenitätsfaktoren ist bei Chlamydien nicht durchführbar, da sich das Bakterium durch seine besondere Lebensweise bisher allen Versuchen sein Genom zu manipulieren entzogen hat. Um dennoch ein besseres Verständnis für die Patho- und Wirkmechanismen von Chlamydien zu erhalten, wurde hier ein Zugang gewählt, bei dem die Wirtszelle im Vordergrund steht. So wird im Hauptteil dieser Arbeit die Reaktion der Wirtszelle auf eine chlamydiale Infektion auf Ebene der Genexpression analysiert. Darauf basierend sollen später durch Manipulationen der Wirtszelle weitere Einblicke in die Wechselwirkungen zwischen Chlamydien und ihren Wirtszellen ermöglicht werden.

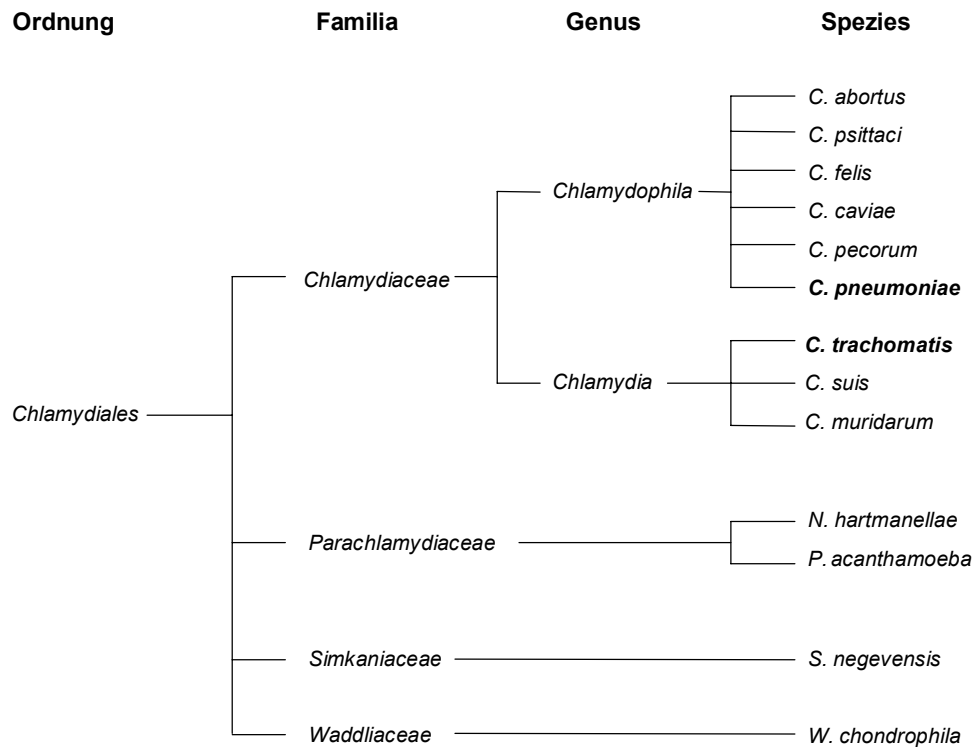
## 1.1 Taxonomie der Ordnung der *Chlamydiales*

Chlamydien gehören zu den Eubakterien, sind mit anderen Vertretern dieser Gruppe aber nur entfernt verwandt. Das erste Mal wurden sie 1907 von Halberstaedter und von Prowazek beschrieben, die schon eindeutig die beiden Entwicklungsformen unterschieden haben [2]. Bedingt durch ihre sehr geringe Größe und die Unfähigkeit, diese Bakterien in Medium anzuzüchten, wurden sie lange Zeit den Viren zugerechnet. Erst 1965 konnte gezeigt werden, dass es sich bei Chlamydien um Bakterien handelt und 1966 wurden sie schließlich einer eigenen Ordnung, den *Chlamydiales*, zugeteilt [3]. Lange Zeit wurde dieser Ordnung nur eine Familie, die *Chlamydiaceae* mit einem Genus, *Chlamydia*, zugesprochen. Seit den 1990er Jahren konnten, bedingt durch verbesserte molekularbiologische Methoden (phylogenetische Studien der 16S und 23S rRNA), viele neue verwandte Stämme bestimmt werden. Dies führte 1999 durch Everett et al. und auch Rurangirwa et al. [4,5] zu einer überarbeiteten Taxonomie (siehe Abbildung 1).

Demnach sind die *Chlamydiales* nun in vier Familien eingeteilt, wobei die Familie der *Chlamydiaceae* sich wiederum in die Genera *Chlamydia* und *Chlamydophila* unterteilt und als einzige humanpathogene Bakterien enthält.

Die *Chlamydophila* gliedern sich wiederum in sechs Spezies, wobei *C. pneumoniae* hauptsächlich humanpathogen ist, aber inzwischen auch aus verschiedenen Säugetieren isoliert werden konnte. *C. abortus* und *C. psittaci* sind zumindest auf den Menschen übertragbar und können dort Erkrankungen auslösen, wenn der Mensch auch nicht der eigentliche Wirt ist.

Bei den *Chlamydia* gibt es eine humanpathogene Spezies, *C. trachomatis*, sowie eine Spezies, die bei Schweinen (*C. suis*) und eine, die bei Mäusen (*C. muridarum*) Erkrankungen verursacht. Letztere konnten aber bisher nicht bei Menschen nachgewiesen werden.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ordnung Chlamydiales**

Die Spezies *C. trachomatis* läßt sich wiederum in zwei Biovarianten (Biovare) unterteilen: trachoma und lymphogranuloma venerum (LGV). Diese Biovare lassen sich ihrerseits wieder in verschiedene Serovarianten (Serovare) unterteilen, die über serologische Assays und inzwischen auch molekularbiologische Methoden, wie Sequenzierung und Vergleich spezifischer Gene, eingeteilt wurden: *C. trachomatis trachoma* wird in die 14 Serovare A bis K, einschließlich Ba, Da und Ia unterteilt und *C. trachomatis LGV* in die vier Serovare L1, L2, L2a und L3.

Inzwischen wurden mehrere Chlamydienisolate sequenziert und annotiert. Als erste vollständig sequenzierte Chlamydienstämme wurden *C. trachomatis* D/UW-3/Cx und *C. pneumoniae* CWL029 zugänglich über <http://chlamydia-www.berkeley.edu:4231/index.html>. Hinzu kamen zwei weitere *C. pneumoniae*-Stämme. Dabei zeigte sich, dass die Genome von *C. pneumoniae* hoch konserviert sind und nur wenige Abweichungen in den drei Genomen vorliegen. Außerdem wurde die Sequenz eines Isolates des LGV Biovars (L2/434/Bu) zumindest in Teilen zugänglich gemacht, sowie ein Isolat von *C. muridarum* sequenziert (Stamm Nigg,

ehemals *C. trachomatis trachoma* MoPn). Eine Übersicht über die sequenzierten Stämme und den Zugriff darauf bietet Tabelle 1:

Chlamydienstamm	Zugriff über
<i>Chlamydia trachomatis</i> D/UW-3/Cx	GenBank, Accession-Nummer: AE001437
<i>Chlamydia trachomatis</i> L2/434/Bu	nur über <a href="http://chlamydia-www.berkeley.edu:4231/index.html">http://chlamydia-www.berkeley.edu:4231/index.html</a>
<i>Chlamydia muridarum</i> Stamm Nigg	GenBank, Accession-Nummer: AE002160
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CWL029	GenBank, Accession-Nummer: AE001363
<i>Chlamyiphila pneumoniae</i> AR39	GenBank, Accession-Nummer: AE002161
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> J138	GenBank, Accession-Nummer: BA000008

**Tabelle 1: Übersicht über die bisher zugänglichen Genome verschiedener Chlamydienstämme.**

In der hier vorliegenden Doktorarbeit wurden ausschließlich die sequenzierten Stämme *C. trachomatis* L2, *C. trachomatis* D und *C. pneumoniae* CWL029 verwendet.

*C. trachomatis* D hat eine Genomgröße von 1.042.519 Nukleotiden und es konnten 894 mögliche kodierende Sequenzen ermittelt werden. Das Genom von *C. pneumoniae* CWL029 umfaßt 1.230.230 Nukleotide mit 1073 möglichen kodierenden Sequenzen. Für 80 % dieser Sequenzen gibt es ein Ortholog in der jeweils anderen Chlamydienspezies. Bei *C. trachomatis* bleiben 70 ORFs ohne Entsprechung in *C. pneumoniae*, bei *C. pneumoniae* sind es umgekehrt sogar 214. Zusätzlich besitzt nur *C. trachomatis* noch ein Plasmid, welches acht ORFs enthält (7493 bp bei *C. trachomatis* D, 7499 bp bei *C. trachomatis* L2). Die meisten *C. trachomatis*-Isolate enthalten dieses Plasmid. Es scheint aber nicht unverzichtbar zu sein, da es auch Isolate ohne Plasmid gibt. Seine Bedeutung konnte noch nicht bestimmt werden. [6] Es ist anzunehmen, dass die unterschiedlichen Erkrankungen, die die beiden sonst so homologen Spezies verursachen, teilweise auf diese nur in einer Spezies vertretenen Gene zurückzuführen sind.

Ein Vergleich der Genome von *C. trachomatis* Serovar L2 und D auf der Internetseite in Berkeley zeigt, dass die Sequenzen in großen Teilen identisch sind und sich häufig nur in einzelnen Basen unterscheiden. Allerdings gibt es einige wenige Sequenzen, die jeweils nur in einem der beiden Genome vorkommen. Beispielsweise fehlt ein ca. 4 kb Fragment bei Serovar L2, das bei Serovar D die Gene für CT165, CT166 und CT167 enthält.

Im Folgenden wird ausschließlich die Familie der *Chlamydiaceae* betrachtet.

## 1.2 Entwicklungszyklus und Biologie der Chlamydien

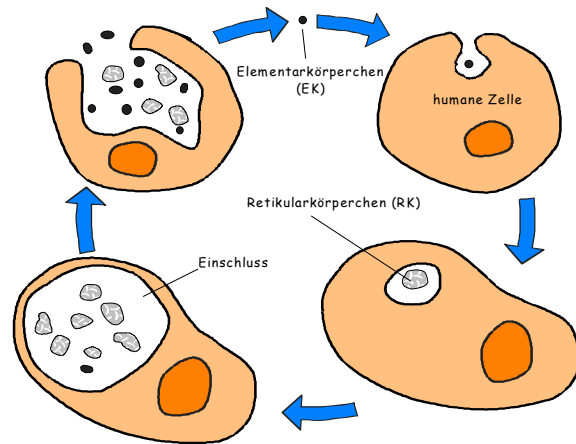
[7,8]

Der Entwicklungszyklus der Chlamydien reicht vom EK, das in die Zelle eindringt über das RK, das sich mehrfach in der Zelle teilt bis zurück zum EK, das aus der Zelle austritt, um

wieder neue Zellen zu infizieren. Bei *C. trachomatis* dauert dieser Entwicklungszyklus etwa zwei Tage, bei *C. pneumoniae* drei Tage.

Das EK hat einen Durchmesser von 0,2 – 0,4  $\mu\text{m}$  und eine feste Zellwand. Sein Genom liegt kondensiert vor. In dieser Form sind die Chlamydien infektiös, heften an ihre Wirtszellen an und werden von ihnen aufgenommen.

Sowohl der Mechanismus der Anheftung als auch der Aufnahme sind noch Gegenstand der Forschung. Dabei scheint es zwischen den einzelnen Chlamydienspezies Unterschiede im Aufnahmemechanismus zu geben, ebenso wie es Unterschiede gibt, ob die Zellen bei der Infektion *in vitro* mit den



Chlamydien statisch inkubiert werden oder

ob die Chlamydien auf die Zellen aufzentrifugiert werden.

**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von Chlamydien**

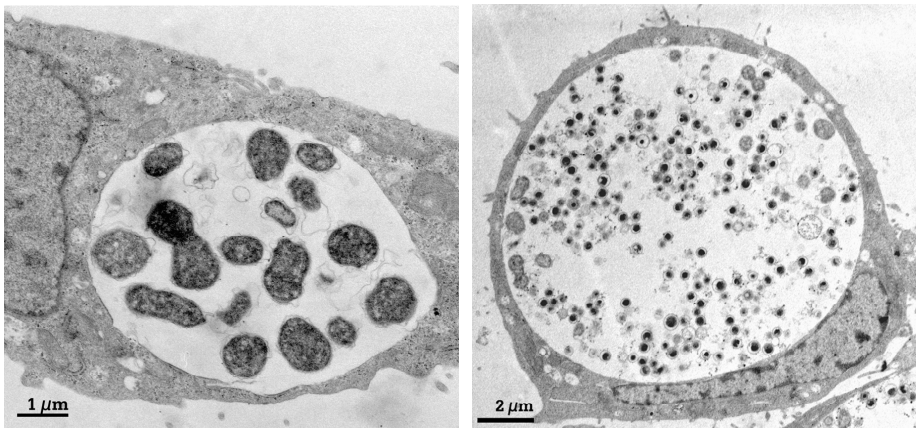
Bei der Aufnahme wurde sowohl eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme über *Clathrin-coated pits* als auch eine Microfilament-abhängige Aufnahme über Vesikel ohne Clathrin beschrieben. In jedem Fall scheinen Oberflächenproteine auf der Wirtszelle notwendig zu sein, da eine Behandlung mit Trypsin, welches Oberflächenproteine auf der Wirtszelle abspaltet, eine Aufnahme für mehrere Stunden verhindert. Entsprechende Proteine konnten allerdings noch nicht identifiziert werden.

Auf Seiten der Chlamydien wurden ebenfalls eine Reihe von Proteinen untersucht, die für die Anheftung notwendig sein könnten, wie Lectin-bindende Proteine oder Heparansulfat-ähnliche Glykoproteine auf der Oberfläche von EK, die aber noch nicht kloniert werden konnten, oder das Heparin-bindende chlamydiale Oberflächenprotein OmcB.

Nach der Aufnahme des EK verbleibt dieses in einem als Einschluss (*inclusion*) bezeichneten Vesikel, der nicht mit Lysosomen verschmilzt. In diesem Einschluss wandelt sich das EK in ein Stoffwechsel-aktives RK mit einem Durchmesser von 0,6 – 1,5  $\mu\text{m}$  um, wobei die Zellwandstruktur verändert wird und die DNA sich aus ihrer kondensierten Form löst. Das RK beginnt sich mehrmals binär zu teilen (logarithmische Phase der Vermehrung). Schließlich wandeln sich die RK wieder in EK um, die meist bei der Zerstörung der Zelle durch die Lyse des Einschlusses freigesetzt werden und neue Zellen infizieren können. Dabei läuft am Anfang des Zyklus die Entwicklung der Chlamydien in den Zellen synchron ab. So findet die Umwandlung von EK in RK ungefähr zwei Stunden nach Aufnahme der Chlamydien statt

und die erste Teilung der RK nach ca. 12 Stunden. Von da ab läuft die Entwicklung der einzelnen Chlamydien asynchron. Es läßt sich nicht mehr eindeutig bestimmen, ob Vorgänge in den Einschlüssen durch frisch entstandene RK, durch späte RK oder durch Chlamydien, die sich gerade wieder in EK umwandeln, ausgelöst werden.

Bei Chlamydien ist neben diesem infektiösen Entwicklungszyklus mit EK und RK noch eine persistierende Form beschrieben. Diese liegt in Monozyten vor [9,10] oder kann durch Gabe von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Penicillin oder den Entzug von Tryptophan und Cystein ausgelöst werden. Dabei wandelt sich das RK in eine Stoffwechsel-reduzierte Form um, die in der Wirtszelle persistiert. Es ist beschrieben worden, dass sich persistierende Chlamydien reaktivieren lassen und wieder auf andere Zellen übertragbar sind. [11]



**Abbildung 3:** Elektronenmikroskopische Bilder von *C. trachomatis* in HeLa T-Zellen (freundlicherweise erstellt von Dr. M. Rohde). Auf der linken Seite sieht man einen chlamydialen Einschuß 24 Stunden nach Infektion. Auf der rechten Seite ist ein Einschuß 48 Stunden nach Infektion abgebildet.

### 1.3 Pathogenese/Chlamydien-induzierte Erkrankungen

[12]

Beim Menschen treten häufig Infektionen mit Chlamydien auf, die oft symptomlos verlaufen. In einigen Fällen kommt es aber zu teilweise schwerwiegenden Erkrankungen.

Diese durch Chlamydien ausgelösten Erkrankungen können in zwei Gruppen unterteilt werden: a) die durch produktive Infektion direkt verursachten Erkrankungen und b) Erkrankungen die bei einer rezidivierenden oder persistierenden Infektion entstehen. Chlamydien befallen in der Regel zuerst die Schleimhäute. Von dort aus können sie sich dann ausbreiten. Der Verbreitungsmechanismus ist noch nicht hinreichend geklärt, aber man nimmt an, dass dies über infizierte Monozyten bzw. Makrophagen erfolgt. Die hauptsächlich humanpathogenen Spezies sind *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*. *C. psittaci* kann ebenfalls zu Erkrankungen beim Menschen führen. In einigen wenigen Fällen wurden Infektionen mit *C. felis* und *C. abortus* beschrieben.

Chlamydiale Erkrankungen werden in der Regel mit Antibiotika behandelt. Ein Impfstoff konnte noch nicht entwickelt werden. Problematisch sind Erkrankungen durch persistierende Chlamydien, da Stoffwechsel-reduzierte Organismen weniger beeinflussbar sind und Antibiotika daher schlechter wirken.

### **1.3.1 Erkrankungen durch *C. psittaci***

*C. psittaci* infiziert hauptsächlich Vögel, kann von dort aber durch Staub und Vogelkot auf den Menschen übertragen werden und dabei eine Ornithose/Psittacose (Papageienkrankheit) auslösen. Diese oft lebensbedrohliche Erkrankung, die primäre die Lungen betrifft, tritt allerdings relativ selten auf (800 bekannte Fälle in den USA zwischen 1987 und 1996).

### **1.3.2 Erkrankungen durch *C. trachomatis***

*C. trachomatis* löst eine Reihe von Erkrankungen aus, von denen Augeninfektionen und Infektionen des Genitaltrakts am häufigsten sind. Hierbei führen die humanpathogenen Biovare LGV und trachoma zu unterschiedlichen Krankheiten: Das LGV Biovar (Serovare L1-L3) befällt hauptsächlich das submucosale und lymphatische Gewebe im Genitalbereich. Es kommt zur Geschlechtserkrankung Lymphogranuloma venerum, in seltenen Fällen nach Streuung auch zu Meningitis, Arthritis, Pneumonitis und Konjunktivitis.

Das Biovar trachoma infiziert primär die Epithelzellen der Schleimhäute im Augenbereich (Serovare A-C) oder im Genitalbereich (D-K).

*C. trachomatis* (Serovar A-C) ist der häufigste Grund für vermeidbare Erblindungen mit über 400 Millionen Infizierten weltweit und geschätzten 6 Millionen Erblindeten (1995). Hierbei werden die Chlamydien in der Regel von Mensch zu Mensch oder durch kontaminierte Fliegen weitergegeben, was zu einer sehr hohen Durchseuchung in betroffenen Gebieten (Nordafrika, mittlerer Osten und Teile Indiens) führt. Infektionen können wiederholt auftreten und die dadurch ausgelöste Vernarbung des infizierten Gewebes kann schließlich zu Hornhautschäden und damit zum Verlust des Augenlichts führen.

Erkrankungen durch Infektionen des Genitaltrakts (Serovar D-K) sind ebenfalls mit geschätzten 90 Millionen Fällen weltweit jedes Jahr (1996) sehr häufig. Auch hierbei verlaufen die meisten Infektionen mit wenigen bis gar keinen Symptomen. Im Genitalbereich auftretende Erkrankungen sind dabei Salpingitis, Endometritis, Urethritis und Epididymitis. Außerdem kann die Infektion bei der Geburt auf das Neugeborene übertragen werden und dort zu einer Konjunktivitis oder Pneumonie führen. Auch bei Erkrankungen des Genitaltrakts führen Vernarbungen des Gewebes zu den schwersten Schäden. Ist der Eileiter betroffen, kann es zu Unfruchtbarkeit oder ektoper Schwangerschaft kommen.

Bei der Erkrankung Lymphogranuloma venereum kommt es nach einer Primärinfektion im Genitalbereich zu einer Sekundärinfektion der Lymphknoten in diesem Bereich, mit Fieber, Arthralgien und Gewichtsverlusten. Ein Persistieren der Infektion kann zu Gewebedestruktionen mit Ausbildungen von Abszessen, Strikturen oder Fisteln führen.

Reaktive Arthritis zählt ebenfalls zu den persistierenden chlamydialen Erkrankungen, hier in Folge einer Infektion mit Serovar D-K. Dabei persistieren einige wenige Chlamydien zumeist in einem der großen Gelenke der unteren Extremitäten, wo sie zu einer Entzündung führen. Da die Erreger hierbei in der Regel nur in sehr geringen Mengen auftreten, sind sie, bzw. ihre DNA und RNA, nur über molekularbiologische Methoden nachweisbar. Der kulturelle Nachweis ist bei dieser Gelenkerkrankung bisher nicht gelungen.

### **1.3.3 Erkrankungen durch *C. pneumoniae***

Seroepidemiologische Studien haben gezeigt, dass *C. pneumoniae* weltweit verbreitet ist und mindestens 80 % der Erwachsenen in ihrem Leben mit diesem Bakterium in Berührung kommen. Eine Infektion verläuft meist asymptomatisch, kann aber zu Erkrankungen der Atemwege, wie Pharyngitis, Bronchitis oder Pneumonie führen. Auch hier gibt es Hinweise auf persistierende Infektionen.

Seit einigen Jahren wird diskutiert, dass *C. pneumoniae* möglicherweise ein Risikofaktor für Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen ist. So können Chlamydien aus atherosklerotischen Plaques isoliert und angezüchtet werden, wobei PCR-Studien über die Häufigkeit von *C. pneumoniae* bei Koronararterien-Erkrankungen extrem unterschiedliche Ergebnisse lieferten mit 15 % bis zu 60 % positiver Proben. Dabei wird spekuliert, dass dies an den nicht ausreichend standardisierten Nachweismethoden liegt. [13]

Derzeit laufen auch Multicenter-Studien über die prophylaktische Gabe von Antibiotika bei Risikopatienten, die Aufschluß über eine mögliche bakterielle Beteiligung an Koronararterien-Erkrankungen liefern sollen. Des Weiteren wird in Tiermodellen der Einfluß von *C. pneumoniae* auf das Auslösen von Atherosklerose untersucht. Kalayoglu et al. konnten zeigen [14], dass sich murine Makrophagen bei Gabe von LDL und gleichzeitiger Infektion mit *C. pneumoniae* in Schaumzellen umwandeln, Zellen die typisch sind für Atherosklerose.

Noch ist allerdings nicht geklärt, ob Chlamydien ursächlich an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt sind oder ob sie nur als „unschuldige Zuschauer“ (*innocent bystander*-Hypothese) in atherosklerotische Plaques einwandern.



## 1.4 Wechselwirkungen zwischen Chlamydien und ihren Wirtszellen

In den letzten zehn Jahren wurden eine Vielzahl von Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Chlamydien und ihren Wirtszellen durchgeführt. Diese Studien, die mit verschiedenen Chlamydienstämmen und unterschiedlichen Zelllinien oder primären Zellen durchgeführt wurden, lieferten jedoch nur kleine Einblicke in die direkte Beeinflussung der Wirtszelle oder die Einflußnahme der Chlamydien auf den entzündlichen Prozeß.

Da auch die vorliegende Arbeit sich mit solchen Wechselwirkungen beschäftigt, seien hier einige Ergebnisse aus verschiedenen Bereichen der Einflußnahme kurz geschildert.

### 1.4.1 Vermehrte Expression/Freisetzung immunmodulatorischer Moleküle

Nach Infektion mit *C. trachomatis* oder *C. pneumoniae* kommt es bei vielen Zelltypen zu einem Anstieg der Sekretion verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen (eine Übersicht bietet Tabelle 1). Dies führt wahrscheinlich zu einer Aktivierung und zum Einwandern von immunmodulatorischen Zellen.

Zelltyp	Vermehrte Expression durch <i>C. trachomatis</i>	Vermehrte Expression durch <i>C. pneumoniae</i>
<b>Zytokine/ Wachstumsfaktoren</b>		
Epithelzellen	IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-11, Gro- $\alpha$ , GM-CSF [15,16]	IL-8 [17]
Endothelzellen		IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MCP1, TNF- $\alpha$ [18-20]
Glatte Muskelzellen		bFGF, IFN- $\beta$ , IL-6 [20,21]
Synoviozyten (fibroblastenartig)	IFN- $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ , GM-CSF [22,23]	
Makrophagen/ Monozyten/ PBMCs	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 [24,25]	IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, MCP1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ [18,26-30]
<b>Adhäsionsmoleküle</b>		
Epithelzellen		ICAM-1 [17]
Endothelzellen	ICAM-1, VCAM-1, MAdCAM-1 [31]	E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1 [32,33]
Makrophagen/ Monozyten		ICAM-1 [34]

**Tabelle 2: Publierte Chlamydien-induzierte Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen sowie der Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren bei verschiedenen Wirtszellen**

### 1.4.2 Apoptose

Es konnte auch gezeigt werden, dass eine Infektion mit *C. trachomatis* L2 oder *C. pneumoniae* die Wirtszelle für einen gewissen Zeitraum vor induzierter Apoptose schützt [35,36]. Allerdings wurde ebenso gezeigt, dass Chlamydien zu einem späteren Zeitpunkt in der Lage

sind, Apoptose bei ihren Wirtszellen zu induzieren [37]. Kürzlich wurde von Stenner-Liewen et al. [38] ein chlamydiales Protein identifiziert, das mit Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Familie (TNFR1, Fas, DR4 und DR5) interagiert. Dieses Protein („*Chlamydia* protein associated with death domains“, CADD, vormals CT610) konnte 36 Stunden nach Infektion erstmals nachgewiesen werden und führt bei Expression in eukaryonten Zellen zu Apoptose.

### 1.4.3 Weitere Beeinflussungen

Andere Beeinflussungen der Wirtszelle reichen von der Phosphorylierung von Wirtszellproteinen schon 10 Minuten nach Infektion der Zelle [39], über die Aktivierung und Translokation von NFκB, die ebenfalls sehr früh stattfindet [17,20], die Aktivierung von Caspase 1, welche dann Pro-IL-18 in IL-18 spaltet [40] bis zu zytotoxischen Effekten einiger Chlamydienpezies [41]. Inzwischen konnte sogar ein chlamydiales Protein, CT858/CPAF (*chlamydial protease- or proteasome-like activity factor*), im Zytosol der Wirtszelle nachgewiesen werden, das dort zur Degradation von Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle führt [42]. Der Mechanismus, über den Chlamydien dieses Protein in das Zytosol der Wirtszelle transferieren, konnte noch nicht aufgeklärt werden. Es wird ein Transport über den Typ III Sekretionsapparat diskutiert.

## 1.5 Der Typ III Sekretionsapparat

[43]

Bakterien haben verschiedene Möglichkeiten entwickelt Proteine zu sekretieren bzw. diese in eine Wirtszelle oder ein anderes Bakterium einzubringen. Eine Reihe von gramnegativen Bakterien besitzen dazu das sogenannte Typ III Sekretionssystem. Es ermöglicht ihnen, bei Kontakt mit einer Wirtszelle Proteine in deren Zytosol einzuschleusen.

Der Typ III Sekretionsapparat besteht aus ungefähr 20 Proteinen und hat eine sehr konservierte Struktur. Er wird häufig von seinem Aufbau her mit einer Spritze verglichen, die die Zellmembranen der Zielzelle durchdringt und bakterielle Proteine in die Zelle injiziert. Die Gene dieser Proteine sind im Genom des Bakteriums oft an einer Stelle konzentriert, z.B. auf einer Pathogenitätsinsel, oder zumindest in Gruppen zusammengefasst und nicht über das gesamte Genom verteilt. Die sekretierten Proteine liegen ebenfalls häufig in ihrer genomischen Nähe.

Trotz der großen Homologie der Proteine des Sekretionsapparates selbst wurden bisher nur wenig Homologien unter den sekretierten Proteinen gefunden. So ist kein konserviertes Signalpeptid nötig, dass beispielsweise bei der Typ I Sekretion das Protein zum Sekretionsap-

parat dirigiert und welches dann abgespalten wird. Es wird allerdings angenommen, dass die Struktur der ersten 15 bis 20 Aminosäuren des Proteins eine entscheidende Rolle bei der Erkennung spielt. Die sekretierten Proteine unterscheiden sich ebenfalls stark in ihrer Funktion, die von toxischen Effekten bei der Zielzelle (z.B. YopE bei *Yersinia* Spezies) bis zu Veränderungen des Aktinzytoskeletts der Zelle (z.B. SopE2 bei *Salmonella typhimurium* [44]) reichen.

Bei Chlamydien wurden über Homologievergleiche im Genom die Sequenzen der Proteine des Typ III Sekretionsapparates identifiziert. Sie teilen sich in drei Regionen, wobei der ausgebildete Apparat als solcher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Von Fields et al [45] konnte gezeigt werden, dass einige dieser Proteine tatsächlich gebildet werden und, dass eines der Proteine, CopN, in der Membran des Einschlusses lokalisiert ist. Außerdem zeigen elektronenmikroskopische Bilder von EK und RK Nadel-artige Oberflächenfortsätze („*spike-like surface appendices*“), die morphologisch vergleichbar sind mit ausgebildeten Typ III Apparaten von anderen Bakterien [46,47]. Es wird demnach allgemein angenommen, dass Chlamydien einen Typ III Sekretionsapparat besitzen.

Proteine, die durch den chlamydialen Typ III Apparat sekretiert werden, konnten noch nicht identifiziert werden. Allerdings gibt es dazu Vorarbeiten von Subtil et al. [48]. Dabei wurde der N-terminale Teil von chlamydialen Proteinen, die ihnen vielversprechend erschienen, mit einer Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis* als Reporter gen fusioniert und überprüft, ob sich diese Konstrukte durch den Typ III Sekretionsapparat von *Shigella flexneri* sekretieren lassen. Dies gelang bei einigen der untersuchten Proteinen. Da der N-terminale Teil vermutlich für die Ausschleusung verantwortlich ist, deutet dies darauf hin, dass auch die entsprechenden chlamydialen Proteine durch den Typ III Apparat sekretiert werden können. Es wird angenommen, dass ein Teil der Wirtszellbeeinflussung durch Chlamydien über Effektorproteine des Typ III Sekretionsapparates abläuft.

## 1.6 (cDNA-)Microarrays

Microarrays ermöglichen es eine breite vergleichende Expressionsanalyse von zwei oder mehr Zellpopulationen auf mRNA-Ebene durchzuführen. Dabei können beispielsweise stimulierte und nicht stimulierte Zellen verglichen werden, oder normales Gewebe mit tumorösem. Die Anzahl der Gene, die gleichzeitig betrachtet werden kann, variiert von Array zu Array zwischen wenigen Hundert bis zu mehreren Tausend.

Inzwischen bieten eine ganze Reihe von Firmen Microarray-Systeme an, die sich in Größe, Probengenerierung und Art der Träger erheblich unterscheiden, aber alle ein gemeinsames Prinzip haben:

Es werden Träger verwendet, auf denen DNA-Fragmente, die eindeutig die zu untersuchenden Gene repräsentieren, räumlich getrennt aufgebracht sind. Die zu untersuchende mRNA wird in eine markierte cDNA oder cRNA umgeschrieben und mit den Trägern hybridisiert. Die Intensität der markierten Proben auf dem Träger wird gemessen und der Intensität der Proben auf dem Vergleichs-Träger gegenübergestellt. Durch das Verhältnis der beiden Intensitäten zueinander kann bestimmt werden, ob ein Gen in einer Zellpopulation gegenüber der Kontrollpopulation vermehrt oder vermindert exprimiert wird.

Im folgenden sind die Hauptunterschiede zwischen den einzelnen Array-Systemen aufgeführt.

### **Generierung der Proben**

- Verwendung von gesamt RNA/poly A<sup>+</sup> RNA
- Umschreiben der mRNA mit spezifischen Primern/oligo(dT)/random Hexamer-Primer
- Umschreiben ausschließlich in cDNA/erst cDNA, dann cRNA
- Verwendung eines Amplifikationsschritts
- Markieren der Proben durch Radioaktivität (<sup>32</sup>P oder <sup>33</sup>P)/Fluoreszenz (z.B. Phycoerythrin)

### **Verwendete Träger**

- Anzahl der Gene (z.B. Clontech/BD Atlas Human Cell Cycle mit 111 Genen oder Affymetrix U95A mit 12.000 Genen)
- Material der Trägers Nylon/Glas/Plastik
- DNA-Fragmente auf Träger als Oligonukleotide (25mer/50mer/70mer) oder als PCR- oder cDNA-Fragmente (z.B. 200-600 bp Clontech/BD)
- Anzahl der DNA-Fragmente pro Gen, dabei auch Anzahl der unterschiedlichen und gleichen Fragmente pro Gen
- Art und Anzahl der Kontrollen auf Trägern

Neben diesen Unterschieden in der Gestaltung der Arrays, die schon zu anderen Ergebnissen führen können (z.B. bedingt durch die höhere Sensitivität von radioaktiv-markierten Proben gegenüber Fluoreszenz-markierten), können auch Unterschiede durch die Art der Auswertung entstehen. Hier gibt es verschiedene Software zur Verarbeitung der Signale auf den Trägern, die mit unterschiedlichen Methoden die Ergebnisse berechnen und ihre Zuverlässigkeit bewerten.

In dieser Arbeit wurden einerseits Microarrays der Firma Clontech/BD (human 1.2 Atlas Array) verwandt, bei denen Nylon-Träger mit 1200 Genen, repräsentiert durch 200-600 bp lange cDNA-Fragmente mit spezifisch umgeschriebener,  $^{32}\text{P}$ -markierter cDNA hybridisiert werden. Andererseits wurden Microarrays der Firma Affymetrix (U95A) eingesetzt, mit 12.000 Genen, die durch jeweils 16 verschiedene Oligomere von 25 Basen Länge auf Glaträgern repräsentiert werden. Hier werden die Proben erst in oligo(dT)-geprimte cDNA und dann in Fluoreszenz-markierte cRNA umgeschrieben, die über ein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

## 1.7 Zielsetzung

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien, die eine Reihe von Erkrankungen beim Menschen verursachen. Es wurden bereits einige Untersuchungen durchgeführt, um die Einflussnahme der Chlamydien auf die Wirtszelle zu verstehen. Dabei sind bisher nur einzelne Chlamydien-bedingte Regulationen aufgezeigt worden.

Das Hauptziel der vorliegenden Doktorarbeit ist die breite Analyse der Änderung der Genexpression der Wirtszelle nach produktiver Infektion mit Chlamydien. Durch diese umfassende Analyse soll ein vollständigeres Bild der Beeinflussung der Wirtszelle ermittelt werden und darüber ein besseres Verständnis für die Pathomechanismen einer chlamydialen Infektion erreicht werden.

Einerseits sollen sehr frühe Zeitpunkte nach Infektion betrachtet werden, um frühe Genregulationen, die potentielle Schlüsselemente der induzierten Regulationsvorgänge sind, zu finden. Andererseits soll auch die Genregulation zu sehr späten Zeitpunkten betrachtet werden, um mögliche Folgeerscheinungen vorangegangener Beeinflussungen nachzuweisen. So soll die Voraussetzung geschaffen werden, um die den Regulationen zu Grunde liegenden Signalwege aufzuklären.

Weiterhin soll ein Vergleich der von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* ausgelösten Regulationen durchgeführt werden. So soll überprüft werden, ob sich die Unterschiede im Genom und daraus resultierend in den Krankheitsbildern auch direkt in der Beeinflussung der Genexpression der Wirtszelle wiederfinden lassen.

Die primäre Analyse der Genregulation durch Microarrays soll anschließend durch die Verwendung weiterführender Methoden, wie *Real-Time-RT-PCR* und ELISA verifiziert und einzelne Beeinflussungen detaillierter untersucht werden.

Neben diesen breit angelegten Analysen soll noch auf einzelne Wechselwirkungen zwischen der Wirtszelle und dem Bakterium eingegangen werden.

Eine Versuchsreihe soll die Mechanismen der Aufnahme und des Überleben der Chlamydien in der Wirtszelle aufklären. Hierzu sollen zum Einen Mutanten einer Zelllinie mit unterschiedlich stark ausgeprägten Zuckerstrukturen an der Zelloberfläche daraufhin untersucht werden, wie gut sich diese Zellen noch mit Chlamydien infizieren lassen. zum Anderen soll durch chemische Mutagenese der Ausgangszelllinie versucht werden, Chlamydien-resistente Mutanten zu erzeugen. Über eine anschließende Substitution könnte das Gen/die Gene der Wirtszelle identifiziert werden, die für die Resistenz verantwortlich sind und somit die phänotypischen Eigenschaft gefunden werden, die für die Infektion der Zellen oder auch das intrazelluläre Überleben der Chlamydien notwendig ist.

Ein weiteres Ziel der Arbeit stellt die Identifizierung von möglichen chlamydialen Effektorproteinen, vornehmlich des Typ III Sekretionsapparates, dar. Diese möglichen Effektorproteine sollen in eukaryonten Zellen exprimiert werden und diese Zellen anschließend auf phänotypische Änderungen untersucht werden. Um überprüfen zu können, ob solche möglichen Effektoren überhaupt in eukaryonten Zellen exprimiert werden, ist als erstes die Fusion von chlamydialen Proteinen mit einem *green fluorescent protein* geplant. Nach erfolgreicher Expression dieser Fusionsproteine ist angestrebt, die Zellen entweder auf schon bekannte oder im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Chlamydien-induzierte Veränderungen zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Bilddokumentationssystem: E.A.S.Y.RH-3 (Herolab, Wiesloch)

Brutschränke: Modell B 5090 E, Modell function line (Heraeus, Osterode)

Filmkassetten: X-omatic mit Verstärkerfolie (Kodak, Rochester, USA)

Gelelektrophoresekammern für horizontale Agarosegele: verschiedene Modelle (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden und Biometra/Blomed Göttingen)

Heizblock: Modell BT3 (Techne-Driblock, Typ DB-3, Gesellschaft für Laborgeräte, Wertheim)

Hybridisierungsöfen: Modell 400 HY (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen), Modell Shake `n Stack (Hybaid, Heidelberg)

Mikroskope: Unterschiedliche Modelle (Zeiss, Jena)

PCR-Thermocycler: Modell TVC 5x9 (Landgraf, Langenhagen), Techne Genius (thermo Dux Gesellschaft für Laborgeräte, Wertheim)

Mikrotiterplattenscanner: Titertek Multiskan MCC/340 (Labsystems, Finnland)

*Real-Time*-RT-PCR-Geräte: Abi Prism 5700 und 7700 Sequence Detection System<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Weiterstadt)

pH-Meter: 761 Calimatic, digital (Knick)

Phosphoimagingplatte: BAS-MP 2040S (Fuji Photo Film, Japan)

Phosphoimager: Fuji BAS-2500 (Fuji Photo Film, Japan)

Photometer: Ultrospec III (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Schweden)

Spannungsgeräte: Standard Power Pack P25 (Biometra/Blomed Göttingen)

Speedvac: Speedvac Concentrator SVC 100 (Savant, Faringdale, USA)

Szintillationszähler: Win Spectral 1414 liquid scintillation counter (Wallac)

Taumelschüttler: Modell WT (Biometra, Göttingen)

Ultraschallgerät: Sonifer B12 (Branson, Danbury, USA)

UV-Crosslinker: UV-Stratalinker<sup>™</sup> (Stratagene, La Jolla, USA)

Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)

Zentrifugen: Biofuge 13 und 15R, Minifuge (Heraeus Sepatech, Osterode),

Kühlzentrifuge: Modell J2-21 (Beckman Coulter, Unterschleißheim), Typ Rotanta 96 RSC (Hettich Zentrifugen, Tutlingen)

Spezielle Software:

ArrayVision Version 5.1 (Imaging Research, St. Cathrines, Ontario, Kanada)

Clone Manager 6.0 (Scientific & Education Software)

Edit Sequence, Meg Align, Primer Select (DNA Star Inc.)

Microarray Suite Software Version 4.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)

Micrografx Designer Version 7.1, Micrografx Picture Publisher 7a (Micrografx Inc.)

Resolver Expression Data Analysis System Version 2.0 (Rosetta, Kirkland, WA, USA)

Referenzmanager Version 9.0 (Research Information Systems)

SigmaPlot™ Version 5.0 (Jandel Scientific Software)

Word 97, Excel 97 für Windows™ (Microsoft)

## 2.2 Eukaryonte Zellen, Bakterien und Kulturmedien

Eukaryonte Zelllinien und primäre Zellen:

Stammebezeichnung	Beschreibung	Kulturmedium
HeLa 229	Humane epitheloide Cervix-Carcinoma-Zelllinie, adhärenent  Subklon 229 erworben von der American Type Culture Collection, ATCC-Nummer CCL-2.1  Subklon 229 (H) erhalten von H. Holtmann, Abteilung für Molekularpharmakologie, MHH	MEM Eagle with Earle's BSS (Biochrome, Berlin) mit 2,2 g/l Natriumbicarbonat, 2 mM Glutamin, 0,1 mM nicht essentiellen Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat, 10 % [v/v] FCS
HeLa T	Subklon von HeLa 229, erhalten von R. Heilbronn, FU Berlin	siehe HeLa 229
HEp-2	Permanente, adhärenente Zelllinie, die als Epidermis-Carcinoma-Linie etabliert wurde, bei der sich aber herausgestellt hat, dass sie durch Kontamination mit HeLa-Zellen entstand ATCC-Nummer CCL-23	siehe HeLa 229
HEK293	Permanente, adhärenente Linie aus primärem embryonalen menschlichen Nierengewebe, transformiert mit gescherter humaner Adenovirus Typ 5-DNA; hypotriploid (modale Chromosomenzahl 64) ATCC-Nummer CRL-1573	NuitMix F12-Medium (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) mit 10 % [v/v] FCS, 1 mM Natriumpyruvat und 2 mM Glutamin
K4IM	adhärenente Synovialfibroblast-Zelllinie, transformiert mit DNA des SV40 T-Antigens, erhalten von C. Kaps, Charité, Berlin [49]	RPMI (Biochrome, Berlin) mit 10 % [v/v] FCS



Stammbezeichnung	Beschreibung	Kulturmedium
CHO-K1	Permanente, adhärenente, epitheliale Zelllinie aus Ovarien aus <i>Cricetulus griseus</i> (Hamster), größtenteils funktional haploid, ATCC-Nummer CRL-9618	NuitMix F12-Medium (Gibco) mit 10 % [v/v] FCS, 1 mM Natriumpyruvat und 2 mM Glutamin
CHO-lec1	Zelllinie entstanden aus CHO-Klon Pro-5 (ATCC-Nummer CRL-1781), hat eine Mutation in der GlcNAc-Glykosyltransferase, so dass N-gebundene Zuckerstrukturen auf Stufe von Man5-GlcNAc2-Asn blockiert sind (siehe auch Kapitel 3.2.1 , Abbildung 10), erhalten von P. Stanley über R. Gerardy-Schahn, MHH, ATCC-Nummer CRL-1735	alpha-Medium (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) mit 10 % [v/v] FCS
CHO-lec2	Zelllinie entstanden aus CHO-Klon Pro-5 (ATCC-Nummer CRL-1781), hat eine starke Reduktion beim Transport von UDP-Galactose in den Golgi-Apparat (siehe auch Kapitel 3.2.1 , Abbildung 10), erhalten von P. Stanley über R. Gerardy-Schahn, MHH, ATCC-Nummer CRL-1736	alpha-Medium (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) mit 10 % [v/v] FCS
CHO-lec8	Zelllinie entstanden aus CHO-Klon Pro-5 (ATCC-Nummer CRL-1781), hat eine starke Reduktion beim Transport von CMP-Sialinsäure in den Golgi-Apparat (siehe auch Kapitel 3.2.1 , Abbildung 10), erhalten von P. Stanley über R. Gerardy-Schahn, MHH, ATCC-Nummer CRL-1737	alpha-Medium (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) mit 10 % [v/v] FCS
primäre humane Chondrozyten	isoliert aus Oberschenkelknochen gesunder Spender, erhalten von C. Kaps, Charité, Berlin	Dulbecco's modified Eagle's medium (Biochrome, Berlin) mit 4,5 mg/ml Glucose, 10 mM HEPES und 10 % [v/v] FCS

**Tabelle 3: Verwendete Zelllinien und primären Zellen mit Angaben zu den eingesetzten Kulturmedien**

Alle Medienbestandteile wurden entweder bereits steril vom Hersteller bezogen oder sterilfiltriert. Das fetale Kälberserum (Gibco) wurde durch 30minütiges Erhitzen auf 56 °C inaktiviert. Zellen wurden generell im Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

## Bakterien:

Stammbezeichnung	Beschreibung	Kulturmedium
<i>E. coli</i> TOP10F <sup>c</sup> (Invitrogen, Karlsruhe)	chemisch kompetente Zellen Genotyp: F <sup>-</sup> { <i>laq1<sup>q</sup>Tn10</i> (Tet <sup>R</sup> )} <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>	LB-Medium: 10 g/L Bacto-Trypton (Difco), 5 g/L Hefe-Extrakt (Merck) und 10 g/L NaCl  SOB-Medium: 2 % [w/v] Trypton, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl  SOC-Medium: SOB-Medium mit 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose
<i>E. coli</i> TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe)	chemisch kompetente Zellen Genotyp: F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lac80lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 araD139</i> ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>	siehe <i>E. coli</i> TOP10F <sup>c</sup>
<i>Chlamydia trachomatis</i> D/UW-3/Cx	ATCC-Nummer: VR-885	Einfrühermedium: 11 PBS, 10 ml Phenolrot, 68,5 g Saccharose, 40µg/ml Gentamicin, 20 ml FCS  SF-3/Panserin 401 (Cytogen, Sinn), Serum-freies, definiertes Medium  SF-3*: SF-3 mit 20 µg/ml Cycloheximid (CHX, Sigma Chemicals, Deisenhofen) zur Anzucht von Chlamydien
<i>Chlamydia trachomatis</i> L2/434/Bu	ATCC-Nummer: VR-902B	siehe <i>C. trachomatis</i> D
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CWL-029	ATCC-Nummer: VR-1310	siehe <i>C. trachomatis</i> D
<i>Mycoplasma hominis</i>		Flüssigmedium: 2g PPLO-Brühe (Difco), 80 ml Aqua dest., beides autoklavieren, dann 10ml Pferdeserum, 10 ml Hefeextrakt, 1ml Penicillin, 1ml 0,2%iges Phenolrot Argininmedium: 2,5 ml 20%iges Arginin (in Aqua dest.), auf pH 6,0 mit steriler HCl einstellen

**Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme mit Angaben zu den eingesetzten Kulturmedien**

Alle Medien wurden mit Aqua dest. angesetzt und nach Zubereitung autoklaviert, falls nicht anders angegeben. Lösungen, die nachträglich zugegeben wurden, waren entweder durch Autoklavieren oder durch Sterilfiltration sterilisiert worden.

Zur Bereitung von Agarplatten wurde dem entsprechenden Medium vor dem Autoklavieren 15 g/L Bacto-Agar (Difco) beigegeben. Das Antibiotikum Ampicillin wurden als sterilfiltrierte Stammlösungen (100 g/L in Aqua dest.) bei -20 °C gelagert und bei Bedarf dem fertigen Medium zugegeben (100mg/l).

## 2.3 Vektoren

pCDNA3.1/CT-GFP-TOPO™ (Invitrogen, Karlsruhe)

Vektor (6,1 kb) mit CMV-Promotor und Ampicillin-Resistenz zur Einbringung von PCR-Amplifikaten über TOPO™-Cloning, enthält GFP-Protein 50 bp C-terminal nach der Klonierungsstelle

pCDNA3.1/HisB (Invitrogen, Karlsruhe)

Vektor (5,5 kb) mit CMV-Promotor und einer Polyhistidinsequenz vor der Einklonierungsstelle (*multiple cloning site*)

pCDNA3.1/His/lacZ (Invitrogen, Karlsruhe)

Vektor (8,6 kb), der auf dem pCDNA3.1/His-Vektor basiert und in die Klonierungsstelle eingefügt das Gen für LacZ ( $\beta$ -Galaktosidase) enthält

## 2.4 Primer

Primer für *Real-Time-RT-PCRs*:

Gen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Produktlänge [bp]	Annealing-Temperatur [°C]
Caspase 4	CTGGAGGGAATCTGCGG AACT	GCAGGCCTGGACAATGA TGAC	138	55
Caspase 8	GGACAGGAGGCCCCCAT CTA	ATCCCCCTGACAAGCCT GAATAAA	103	58
CTGF	GAGAACATTAAGAAGGG CAAAAAGTG	GCCGTCGGTACATACTC CACAGAAT	129	58
DUSP4	GCACAGCCCCATCACCA CCTC	CGCATGCGGCCCGTCCT AC	97	58
DUSP5	TGCAGCAACGTGGGAGA AAGAAGT	GCCCCGAAGCAACAGAG ACAGAC	139	58
EGR1	GAGGAGGAGATGGCCAT AGGAGAG	TAGTAATTGGGGAAGGG GAAGTGG	140	60
EPHA2	GCCCAGCGCCAAGTAAA CAGG	AGGATGGGGCCCGAGGG TCTAAAG	136	58
ETV4	ATTTCTGGTGGCCTTGCT GGATGAC	ATGGCTGGCCGGTTCTTC TGGA	135	58
FRA1	GAAGAGGAGCGCCGCCG AGTAAG	TCGCTGCAGCCCAGATT TCTCATC	138	58
GAS1	CAGATTGTGGCCAGTGA GGAT	GGGCGCAGATACAAACA GTGA	90	58
IER3	CCGGCTGGGATGAAGTC TGGTG	TCCTAATGGTCCGCCGA AGTCTCA	109	58
LIF	GGTGCGGCCCGGAGTTG TC	AAGCCGGATGAAGCAGG AAGGAGA	129	58
MCL1	TTGGGGCAGTGAGGGCT TAGGACA	CTTTTGGAGGATTTGCC GAACT	132	58
Mip-2 $\alpha$	TTTAGGTCAAACCCAA GTTAGTT	TTCTTGGATTCTCAGCC TCTATC	150	58

Gen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Produktlänge [bp]	Annealing-Temperatur [°C]
NR4A2	GTCAAGAGGGGGCAAGT CACA	AAGGGGGCTAGGAGGGT TACAGAA	93	58
P-Cadherin	CCCGCCCTACGACACCC TCTTG	AGCGGCTGCCCACTCG TTCA	134	55
RPS9	CGCAGGCGCAGACGGTG GAAGC	CGAAGGGTCTCCGCGGG GTCACAT	ca. 90bp	60 (55,58)
ZFP36	CTCCCCATCTTCAATCGC ATCTCT	GTCCCCAAGTCCCCAC AG	138	55

**Tabelle 5: Primer für die spezifische Amplifikation von Teilstücken von cDNA in der *Real-Time-PCR*, angegeben sind die Namen der Gene (Abkürzung) für die Primer entwickelt wurden, sowie die Primersequenz, die Produktlänge und die Temperatur, die für das Annealing in der PCR verwendet wurde. Bei dem Teilstück von RPS9 konnte die Länge nur in einem Agarosegel abgeschätzt werden, da dieses Primerpaar aus der Arbeitsgruppe von J. Buer (GBF, Braunschweig) übernommen wurde und uns keine weiteren Informationen dazu vorlagen.**

Primer für GFP-Fusionsproteine, sowohl mit als auch ohne Stopp zwischen dem chlamydialen Gen und dem GF-Protein:

Genbezeichnung	Vortwärts-Primer	Rückwärts-Primer ohne Stopp	Rückwärts - Primer mit Stopp	Produktlänge [bp]	Annealing-Temperatur [°C]
CPh0585	AAGCTTACCAT GGCAACACCCGC TCA	GGGTACCTCCT TGAAATTGCTCTT GC	GGGTACCTTAT CCTTGAAATTGCT CTTG	1997	56
CT089, lcrE	AAGCTTACCAT GACTGCATCAG GAGGA	GGGTACCGGGT GATGGAGGCTG TG	GGGTACCTTAG GGTGATGGAGG CTG	1272	56
CT119, incA	AAGCTTACCAT GACAACGCCTA CTCTA	GGGTACCGGAG CTTTTTGTAGA GGG	GGGTACCCTAG GAGCTTTTTGT AGAG	822	54
CT232, incB	AAGCTTACCAT GGTTCATCTG TATACAA	GGGTACCTTCT TGAGGTTTTGT TGGG	GGGTACCCTAT TCTTGAGGTTT TGTT	348	54
CT233, incC	AAGCTTACCAT GACGTACTCTA TATCC	GGGTACCGCTT ACATATAAAGT TTGAG	GGGTACCCTAG CTTACATATAA AGTTTG	537	56
CT249	AAGCTTACCAT GGGTATCAAAC CTCATG	GGGTACCCGCC TTTGAAGTAAT CGAA	GGGTACCCTAC GCCTTTGAAGT AATC	350	52
CT354, ksgA	AAGCTTACCGT GGCACGGAGTT CTATA	GGGTACCAATA TCTTTTAATAA GTGG	GGGTACCCTAA ATATCTTTTAA TAAG	830	54

**Tabelle 6: Primer für die Amplifikation von chlamydialen Genen zur Erzeugung von eukaryonten Expressionsvektoren. Angegeben sind die Bezeichnungen der chlamydialen Gene für die Primer entwickelt wurden, sowie die Primersequenz, die Produktlänge und die Temperatur, die für das Annealing in der PCR verwendet wurde.**

Weitere Primer:

Primer für den Genus-spezifischen Nachweis von Mykoplasmen:

Mh 756p Biot: 5'-GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA-3'

Mh 1020n: 5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3'

RAS-MyGenusH1DIG: 5'-CCC GTC AAT TCC TTT AAG TTT-3'

Die ersten beiden Primer amplifizieren ein 265 bp Fragment aus dem 16S rRNA-Gen, wobei die Annealing-Temperatur in der PCR bei 55 °C liegen sollte. Der erste Primer ist dabei am 5'-Ende biotinyliert. Der dritte Primer (Hybridisierungssonde) bindet in dem Amplifikat und ist am 5'-Ende an Digoxigenin gekoppelt.

Primer für die Typisierung von *C. trachomatis*:

Primer zur Typisierung über CT166:

JP43: 5'-TGA TTC CTA TCC ACT AAG GT-3'

JP44: 5'-GCT GAT TTG CAT GGC ATG-3'

JP45: 5'-GCT TGC TGA AAG GCC TC-3'

JP37: 5'-GGG TAC CTC ATC TAA TAC CTA AGG TAC T-3'

Die Primer JP43/JP44 binden außerhalb des Deletion (am Ende des Gens CT164, sowie nach CT168) und ergeben bei *C. trachomatis* L2 ein Amplifikat von 1109 bp bei *C. trachomatis* D ein Stück von ca. 4,7 kb. Die Primer JP45/JP37 binden innerhalb von CT166 und ergeben ein Amplifikat von 924 bp. Alle Primer haben eine Annealing-Temperatur von 55 °C.

Primer für die Sequenzierung eines Teilstücks des MOMP-Gens:

JP50: 5'-CTG TGG GAA GGT TTC GG-3'

JP51: 5'-ACT TTA GGT TTA GAT TGA GC-3'

JP52: 5'-CCA CTT GGT GTG ACG CT-3'

Die Primer JP50/JP51 amplifizieren ein 500 bp langes Teilstück aus einem variablen Bereich des MOMP-Gens. Die Annealing-Temperatur liegt bei 55 °C. JP52 wird zur Sequenzierung des Teilstücks verwendet und setzt ca. 25 bp nach JP50 an.

Oligo(dT)<sub>15</sub> Primer 0,5 mg/ml (Promega, Mannheim)

## 2.5 Enzyme und Kits

Anti-Digoxigenen-AP Fab fragments (Roche, Mannheim)

Effectene (Qiagen, Hilden)

ELISA: human IL-6 DuoSet ELISA Development Kit,  
 human IL-8 DuoSet ELISA Developmen Kit,  
 human IL-11 Quantikine<sup>®</sup> ELISA Kit,  
 human LIF Quantikine<sup>®</sup> ELISA Kit (R&D Systems, Wiesbaden)

GFX<sup>™</sup> DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA)

Kits zum Nachweis von Chlamydien:

MicroTrak *Chlamydia trachomatis* Direct Specimen Test (Behringwerke, Liederbach)  
 IMAGEN *Chlamydia pneumoniae* Kit (Dako, Ely, Großbritannien)

Lipofectamin (Invitrogen, Karlsruhe)  
*Pfu*-Polymerase (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)  
 Plasmid-Midi Kit (Qiagen, Hilden)  
 Restriktionsenzyme mit entsprechenden Puffern (New England Biolabs, Frankfurt a.M.)  
 Ribonuklease-Inhibitor RNasin, rekombinant (Promega, Mannheim)  
 Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)  
 SYBR<sup>®</sup>-Green PCR Core Reagent Kit, SYBR<sup>®</sup>-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt)  
*Taq*-Polymerase (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)  
 TOPO-Cloning Kit (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)

## 2.6 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit Aqua dest. angesetzt und, sofern nicht anders angegeben, durch Autoklavieren oder Sterilfiltration sterilisiert.

Lösung	Zusammensetzung
2x HBS	0,82 g NaCl; 13,3 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O; 1,19 g Hepes (Säure) ad 50 ml ddH <sub>2</sub> O, auf pH 7,14 einstellen
20x SSC	175 g NaCl; 88,2 g MgSO <sub>4</sub> ; in 800 ml dH <sub>2</sub> O lösen, auf pH 7,2 mit HCl einstellen, ad 1 l dH <sub>2</sub> O
50x TAE	2 M Tris-Acetat, pH 8; 150 mM EDTA, pH 8,0
5x GEBS	20 % [v/v] Glycerin; 50 mM EDTA, pH 8,0; 0,05 % Bromphenolblau; 0,5 % [v/v] N-Laurylsarcosyl
Kalium-Eisen(II)/Eisen(III)cyanid	8,45 g K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> x 3 H <sub>2</sub> O; 7,84 g K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ; auf 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen, durch 0,45 µm Filter geben, Lichtgeschützt bei 4 °C lagern
PBS	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; in 800 ml dH <sub>2</sub> O lösen, auf pH 7,4 einstellen mit HCl, ad 1 l dH <sub>2</sub> O, sollte eine Leitfähigkeit von 15 mS/cm haben
Puffer 1 (Mini-Präparation)	50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; nach dem autoklavieren 0,15 mg/ml RNase zufügen; bei 4 °C lagern
Puffer 2 (Mini-Präparation)	0,2 N NaOH; 1 % [w/v] SDS; immer frisch ansetzen
Puffer 3 (Mini-Präparation)	11,78 g Natriumacetat; 35,4 ml Aqua dest.; 4,6 ml Eisessig; bei 4 °C lagern
RNA-5x Laufpuffer	0,1 M MOPS, pH 7,0; 40 mM Natriumacetat; 5 mM EDTA, pH 8,0

Lösung	Zusammensetzung
2x HBS	0,82 g NaCl; 13,3 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O; 1,19 g Hepes (Säure) ad 50 ml ddH <sub>2</sub> O, auf pH 7,14 einstellen
20x SSC	175 g NaCl; 88,2 g MgSO <sub>4</sub> ; in 800 ml dH <sub>2</sub> O lösen, auf pH 7,2 mit HCl einstellen, ad 1 l dH <sub>2</sub> O
50x TAE	2 M Tris-Acetat, pH 8; 150 mM EDTA, pH 8,0
RNA-Probenauftragspuffer	50 % Formamid; 2,2 M Formaldehyd (37 %ig); 10 mM EDTA; 20 % Glycerin (87 %ig); 0,2 % Bromphenolblau; 50 µg/ml Ethidiumbromid
Substrat-Färbelösung (x-Gal-Assay)	100 µl x-Gal-Lösung; 100 µl Kalium-Eisen(II)/Eisen(III)cyanid; 8 µl 1 M MgCl <sub>2</sub> ; 3792 µl PBS; immer frisch ansetzen
TE 10/1	10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA
Waschpuffer (Präparation gen. DNA)	25 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 % [v/v] Triton X 100
x-Gal-Lösung	40 mg/ml x-Gal in N,N-Dimethylformamid, immer frisch ansetzen

**Tabelle 7: Verwendete Lösungen mit ihren Zusammensetzungen**

## 2.7 Verbrauchsmaterialien

Dynabeads<sup>®</sup> M28 Streptavidin (DynaL, Hamburg)

Glasperlen 1,7-2,0 mm (Roth, Karlsruhe)

Materialien für die *Real-Time-PCR*: Optical Adhesive Covers, Optical Tubes und Optical Caps (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Material für RNA-Arbeiten: Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße, verschiedenen Größen (Biozym/Cambrex, Hessisch Oldendorf)

Reaktionsgefäße:

0,5; 1,5 und 2,0 mit und ohne Schraubdeckel (Sarstedt, Nümbrecht)

12, 15 und 50 ml Plastikröhrchen (Greiner, Frickenhausen)

Mikrotiterplatten, (6, 12, 24, 96-well) Polystyrol, Flachboden (Greiner, Frickenhausen und TPP, Trasadingen, Schweiz)

Röhrchen mit Deckgläsern, 7 ml (Dunn Labortechnik, Asbach)

Spritzen und Kanülen: unterschiedliche Größen (Sterican/Braun, Melsungen)

Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen: 25, 75 und 182 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche (Greiner, Frickenhausen)

Zentrifugenröhrchen: Ultra Clear Centrifuge Tubes (Beckman Coulter, Unterschleißheim)

## 2.8 Chemikalien

Agarose: ultraPure (Life Technologies, Eggenstein), SeaKem LE (Bio Whittaker/Cambrex, Apen)

BCP, 1-Bromo-3-Chloro-Propan (Sigma, Deisenhofen)

Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)

Cycloheximid (Sigma Chemicals, Deisenhofen)

DEPC, Diethyl-pyrocarbonat (Applichem, Darmstadt)  
Desoxy-Adenosintriphosphat ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ , 10 mCi/ml), (Amersham, Braunschweig)  
Ethidiumbromid (Boehringer, Mannheim)  
Ethylmethansulfonat (EMS) (Fluka, Neu Ulm)  
Fetales Kälberserum (FCS) (Life Technologies, Eggenstein)  
GenElute<sup>TM</sup> LPA, lineares Polyacrylamid (Sigma, Deisenhofen)  
Glycerin (Merck, Darmstadt)  
Lachssperm, gebrauchsfertige Lösung zum Hybridisieren (Boehringer, Mannheim)  
MOPS (Merck, Darmstadt)  
Penicillin (50 U/ml), (GibcoBRL, Eggenstein)  
SDS (Serva, Heidelberg)  
Streptomycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ), (GibcoBRL, Eggenstein)  
Tris (Serva, Heidelberg)  
Trizol (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)  
Trypanblau (Boehringer, Mannheim)  
x-Gal (Boehringer, Mannheim)

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.a. Qualität von Sigma Chemicals, Deisenhofen, bezogen.

## 2.9 Internet

Es wurden folgende Internet-Seiten für Informationen verwendet:

National Center for Biotechnology Information (NCBI):

Hauptseite: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Suchmaschine für Literatur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>

Verzeichnis von Gen-/Protein-Sequenzen: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>

Verzeichnis/Suchmaschine für genetische Loci mit Beschreibungen zu den einzelnen Genen:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>

Seite des Chlamydiengenomprojektes: <http://chlamydia-www.berkeley.edu:4231/index.html>

Informationsseite über Chlamydien: <http://www.chlamydiae.com>



## 2.10 Molekularbiologische Methode

### 2.10.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA und RNA absorbieren durch die in ihnen enthaltenen Purin- und Pyrimidinbasen ultraviolettes Licht im Bereich zwischen 250 und 270 nm. Über diese Eigenschaft lassen sich Nukleinsäurekonzentrationen nach folgender Formel bestimmen:

$$c = E_{260} \times (d \times \epsilon)^{-1}$$

mit  $c$  = Konzentration der Nukleinsäure  
 $E_{260}$  = Extinktion bei 260 nm  
 $d$  = Schichtdicke der Quarzküvette (1 cm)  
 $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient der Nukleinsäure

Im neutralen pH-Bereich stellen sich die Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  der einzelnen Basen und ihre Absorptionsmaxima wie folgt dar:

Adenin	$15158 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (259nm)
Cytosin	$7345 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (271 nm)
Guanin	$11615 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (253 nm)
Thymin	$8500 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (260 nm)
Uracil	$10100 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (260 nm)

Geht man davon aus, dass die einzelnen Basen zu gleichen Teilen in der Nukleinsäure vorkommen, so ergeben sich für eine  $E_{260} = 1$ , unter Berücksichtigung des hyperchromen Effektes, folgende Nukleinsäurekonzentrationen:

dsDNA	50 $\mu\text{g/ml}$
ssDNA	40 $\mu\text{g/ml}$
RNA	40 $\mu\text{g/ml}$ .

Dabei sollten die Proben immer gegen einen Leerwert mit gleichem Lösungsmittel gemessen werden.

Um Aufschluß über eventuelle Verunreinigungen der Nukleinsäure durch Proteine zu erhalten, wird die Extinktion der Probe bei 280 nm bestimmt. Der Quotient aus  $E_{260}$  und  $E_{280}$  sollte für reine DNA zwischen 1,8 und 1,9, für RNA zwischen 1,9 und 2,0 liegen.

### 2.10.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zum Entfernen von Proteinen aus DNA-Lösungen, die dort etwa bei einer Transfektion störend wirken würden, wird die Lösung mit einem gleichen Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt und gut durchmischt. Anschließend wird zur Auftrennung von wässriger und organischer Phase eine Zentrifugation bei

13000 rpm (Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, Osterode) und 4 °C für 3 min angeschlossen. Die obere, wässrige Phase, die die DNA enthält wird nun vorsichtig abgenommen. Zur Entfernung verbliebenen Phenols kann eine Nachextraktion mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) angeschlossen werden.

### **2.10.3 Präzipitation von Nukleinsäuren**

Um Nukleinsäuren anzukonzentrieren oder sie in ein anderes Lösungsmittel zu überführen können sie mit Alkohol (Ethanol oder Isopropanol) gefällt werden. Dabei nutzt man die sehr geringe Löslichkeit von Nukleinsäuresalzen in diesen Flüssigkeiten.

#### **2.10.3.1 Ethanolische Fällung**

Bei der ethanolischen Fällung mit Natriumacetat werden sämtliche in Lösung befindlichen Nukleotide ausgefällt; sie wurde hier zur Fällung von DNA verwendet.

Die DNA-Lösung wird mit 1/10 ihres Volumens an 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und dem 2,5fachen Volumen an eiskaltem 96 %igem Ethanol versetzt. Zusätzlich kann noch als Fällhilfe Glykogen (meist 1 µl einer 20g/l Lösung) zugegeben werden. Nach 30 min bei -70 °C werden die gefällten Nukleinsäuren bei 13000 rpm (Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, Osterode) und 4 °C für 30 min sedimentiert. Das Pellet wird anschließend mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, um noch vorhandene Salze zu entfernen. Nach dem Trocknen in der Speedvac wird die DNA in Ampullen-Wasser oder TE-Puffer wieder gelöst.

#### **2.10.3.2 Isopropanolfällung**

Die Isopropanolfällung hat den Vorteil, daß sie nur ein geringes Fällungsvolumen benötigt. Der Nachteil liegt darin, daß Isopropanol einen relativ hohen Siedepunkt hat und so die Trocknung der Nukleinsäure recht lange dauert. Diese Fällung wurde für RNA-Lösungen verwendet, wobei ausschließlich mit RNase-freien Materialien gearbeitet wurde.

Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte bei Raumtemperatur durch die Zugabe eines Probenvolumens an Isopropanol (2-Propanol). Zusätzlich wurde hier 1 µl LPA als Fällhilfe zugesetzt. Nach dem guten Durchmischen der Probe wird diese 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 min bei 13000 rpm (Biofuge 15R, Heraeus Sepatech) und 4 °C zentrifugiert. Es folgt ein Waschschriff mit 70%igem Ethanol. Die RNA wird im Heizblock bei 37 °C getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst, wozu sie 10 min bei 60 °C inkubiert wird.

#### 2.10.4 Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäuregemische können durch eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Dies kann zur Aufreinigung, zur Identifizierung und zur Quantifizierung von Nukleinsäuren genutzt werden.

Das Prinzip der Agarosegelelektrophorese beruht darauf, daß Nukleinsäuren durch ihre Phosphatgruppen eine negative Gesamtladung haben und somit in einem elektrischen Feld vom Minus- zum Pluspol wandern. Das Wanderungsverhalten der Nukleinsäuren im Gel wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wobei kleine Fragmente in der Regel schneller wandern als große. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist weiterhin abhängig von der elektrischen Feldstärke, der Temperatur, dem pH-Wert und der Ionenstärke des verwendeten Puffers, der Konformation der Nukleinsäure (linearisierte DNA, Plasmide, supercoiled-Formationen) und von der Dichte der Agarosegelmatrix, die aus vernetzten linearen Polymeren aus D-Galactose und 3,6-anhydro-L-Galactose besteht.

Das Wanderungsverhalten wird in der Regel nur über die Änderung der Agarosekonzentration, also die Änderung der Geldichte, moduliert:

Größe der Nukleinsäurefragmente	Konzentration an Agarose
0,2- 3 kb	1,5 %
0,5-10 kb	1,0 %
0,8-12 kb	0,7 %

Nach erfolgter Gelelektrophorese werden die Nukleinsäuren durch Ethidiumbromid, welches zwischen die Nukleinsäurestränge interkaliert, sichtbar gemacht. Ethidiumbromid läßt sich durch UV-Licht (Absorption bei 302 nm) zur Fluoreszenz im sichtbaren Wellenlängenbereich anregen.

Über den Vergleich von im Gel mitgeführten Längenstandards (Marker) kann eine Abschätzung der Nukleinsäurefragmentlängen sowie eine semiquantitative Konzentrationsbestimmung der einzelnen Fragmente durchgeführt werden. Dazu wurden zur Abschätzung von DNA-Fragmenten folgende kommerzielle Standards verwendet:

1 kb-DNA-Ladder (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe):

Fragmentgrößen in bp: 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2026, 1636, 1018, 506, 344, 298, 201, 154, 134, 75

Das Fragment mit 1636 entspricht 10 % der Gesamtmenge an aufgetragenem DNA-Marker.

$\lambda$ -Hind III-Marker (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe):

Fragmentgröße in bp:	DNA-Menge in 1 $\mu$ g Marker in ng:
(23130)	(480), nicht zur Mengenabschätzung geeignet
9416	195
6557	135
(4316)	(89), nicht zur Mengenabschätzung geeignet
2322	48
2027	41
564	10

100bp-Ladder (GibcoBRL):

Fragmentgrößen von 100 – 1500bp in 100bp Abständen, dabei besonders prominente Bande bei 600bp

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über einen visuellen Vergleich der Banden, kann aber auch mit Hilfe der internen Quantifizierungsoption des E.A.S.Y.<sup>TM</sup> Bilddokumentationssystem durchgeföhrt werden.

Die DNA wurde mit 5x GEBS (final 1x GEBS) versetzt und in einer Flachbettgelkammer bei ungefähr 5V pro cm Elektrodenabstand im Gel in TAE-Puffer aufgetrennt. Die Agarose wurde dazu in gewünschter Konzentration in TAE-Puffer durch aufkochen gelöst und anschließend die Agaroselösung in einer entsprechenden Gelkammer wieder aushärten lassen.

Die Visualisierung der DNA-Fragmente durch Ethidiumbromid erfolgte durch anschließende 15 min Inkubation in einer Ethidiumbromid-Lösung (400  $\mu$ g Ethidiumbromid in 300 ml Wasser) mit angeschlossenen Waschschrift im Wasserbad zur Entfernung überschüssigen Ethidiumbromids.

### 2.10.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um DNA, etwa nach einer Restriktionsspaltung und anschließender Auftrennung der Fragmente im Agarosegel, weiter verwenden zu können muß diese aus dem Agarosegel zurückgewonnen werden. Dazu wurde hier ein Kit der Firma Amersham Biotech (GFX<sup>TM</sup> DNA and Gel Band Purification Kit) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wird das entsprechende DNA-Fragment, nach Einlagerung von Ethidiumbromid, auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und mit einem Skalpell herausgeschnitten. Dieses Gelstück wird gelöst und auf eine Trennsäule aufgetragen. Diese bindet die gelöste DNA unter den gegebenen Pufferbedingun-

gen. Anschließend kann die DNA dort gewaschen und durch Änderung des pH-Wertes eluiert werden.

### 2.10.6 Restriktionsspaltung von DNA

Eine Restriktionsspaltung ist das sequenzspezifische Schneiden von doppelsträngiger DNA. Sie wird durch spezielle Endonukleasen katalysiert.

Die hier verwendeten Restriktionsenzyme diffundieren an dem DNA-Doppelstrang entlang und spalten ihn an palindromen Erkennungssequenzen, die zwischen vier und acht Nukleotide umfassen. Die dadurch entstehenden Schnittstellen können entweder 5'- oder 3'-überhängende (kohäsive oder „*sticky*“) Enden oder nicht überstehende glatte („*blunt*“) Enden haben.

Die Enzyme wurden in einer Konzentration von 10 U/ $\mu$ g DNA eingesetzt und die Restriktionsspaltung in den vom Hersteller (New England Biolabs, Schwalbach) empfohlenen Puffern für eine Stunde bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5x GEBS, direkt anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion oder Hitzeinaktivierung der Enzyme abgestoppt.

Bei den Reaktionen wurde darauf geachtet, daß ein Glycerinanteil von 5 % im Reaktionsansatz nicht überschritten wurde. Bei zu hohen Glycerinkonzentrationen und falscher Pufferwahl kommt es zu einer Minderung der Enzymaktivität oder es kann bei einigen Restriktionsenzymen zu einer unspezifischen Schnittaktivität („Staraktivität“) kommen, wodurch unerwünschte DNA-Fragmente entstehen.

### 2.10.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

[50]

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Prozeß zur Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Fragments (Template). Dazu wird ein DNA-Doppelstrang, der die gewünschte zu amplifizierende Sequenz enthält, aufgeschmolzen und das jeweils komplementäre Stück synthetisiert. Bei einem DNA-Einzelstrang wird mit diesem begonnen und ein Gegenstrang erzeugt. Anschließend werden die Doppelstränge erneut aufgeschmolzen und der Prozeß wiederholt. So erhält man eine exponentielle Vervielfältigung des Ausgang-Fragments.

Die Synthese erfolgt dabei in zwei Schritten, wobei im ersten Schritt ein kurzes komplementäres DNA-Oligomer (Primer) an den Anfang der zu bildenden Sequenz bindet (Annealing) und anschließend eine DNA-Polymerase dort ansetzt und den Gegenstrang synthetisiert (Elongation).

Durch Wahl von Primern, die sehr spezifisch nur an eine DNA-Sequenz binden, kann ein bestimmtes DNA-Fragment amplifiziert werden. Wichtig ist die Temperatur, die zur Hybridisierung der Primer gewählt wird (Annealing-Temperatur). Liegt diese Temperatur zu hoch, kann keine Doppelstrangausbildung stattfinden, ist die Temperatur zu niedrig, kommt es zu unspezifischen Bindungen zwischen Primer und DNA-Strang, und unterschiedliche DNA-Fragmente werden synthetisiert.

Zur wiederholten Synthese des Gegenstranges müssen DNA-Polymerasen verwendet werden, die relativ hohe Temperaturen aushalten (das Aufschmelzen des Doppelstranges erfolgt bei 96 °C) und die zudem bei hohen Temperaturen aktiv sind (72 °C), da sonst die Spezifität der Primer zu gering ist. Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde entweder die *Taq*-Polymerase oder die *Pfu*-Polymerase verwendet. Die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* YTI hat den Vorteil, dass sie in der gleichen Zeit mehr DNA-Doppelstrang synthetisieren kann als die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*. Dafür hat die *Pfu* aber eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die zu einer wesentlich geringeren Fehlerrate führt. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die *Pfu*-Polymerase ein glattes Ende des DNA-Stranges erzeugt, im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase, die einen Adenosin-Überhang erzeugt.

Bei Verwendung von *Pfu* in der PCR wurde daher die Elongationszeit, je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Stranges, gegenüber denen bei Verwendung von *Taq* verlängert.

Zur Optimierung von neuen Primern wurde die Annealing-Temperatur ( $T_M$ ) nach der GC-Methode ermittelt und je eine PCR für die Annealing-Temperaturen  $T_{M, \text{errechnet}} \pm 4$  °C durchgeführt. Die PCR wurde im Agarosegel analysiert und die Annealing-Temperatur gewählt, die ein eindeutiges Amplifikat ergab und möglichst keine zusätzlichen unerwünschten Produkte und dabei die höchstmögliche Temperatur ohne Verlust an Ausbeute der PCR ergab.

Die Berechnung der Annealing-Temperatur über die GC-Methode erfolgte nach folgender Formel:

$$T_{M, \text{errechnet}} [\text{°C}] = (\text{Anzahl G bzw. C}) \times 4 + (\text{Anzahl T bzw. A}) \times 2$$

### 2.10.8 TOPO-Cloning<sup>TM</sup>

Diese Art der Klonierung ermöglicht es ein gewünschtes DNA-Fragment auf einfache und schnelle Weise in einen Vektor einzubringen. Voraussetzung für diese Methode ist ein speziell vorbereiteter Vektor, der linearisiert wurde und an den Enden Topoisomerasen besitzt. Diese Enzyme sind in der Lage DNA-Fragmente, die einen Adenosin-Überhang an ihren Enden aufweisen, in den offenen Vektor einzubinden. Dabei erfolgt die Ligation des Inserts mit

dem Vektor in willkürlicher Orientierung. Daher ist eine Überprüfung, ob das Insert in der gewünschten Orientierung eingebunden wurde notwendig.

### 2.10.8.1 Amplifikation und Aufreinigung des Inserts

Die PCR zur Erzeugung bzw. Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments erfolgte in einem 100 µl Ansatz, wobei hier zur Vermeidung von Mutationen statt der *Taq*-Polymerase die *Pfu*-Polymerase verwendet wurde.

Da die *Pfu*-Polymerase, im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase, keine überhängenden A-Enden bei den PCR-Produkten erzeugt, wurde im Anschluß an die PCR noch eine Inkubation für 8 min bei 72 °C mit 1U *Taq* pro 100 µl Ansatz durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde durch eine Gelelektrophorese und anschließende Aufreinigung aus dem Gel isoliert.

### 2.10.8.2 Durchführung der Klonierung

Die Klonierung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem CT-GFP Fusion TOPO-Cloning™ Kit (Invitrogen, Karlsruhe). Dabei wird das zu klonierende PCR-Fragment mit dem mitgelieferten TOPO-Cloning-Vektor (pCDNA3.1/CT-GFP-TOPO) gemischt und den im Ansatz befindlichen Topoisomerasen die Möglichkeit gegeben, die Ligation von Vektor und Insert durchzuführen. Anschließend wird ein Teil des Ansatzes durch chemische Transformation in die ebenfalls im Kit befindlichen Bakterien TOP10 eingebracht. Die Bakterien werden nach einer kurzen Wachstumsphase in LB-Flüssigmedium auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und am Folgetag Einzelkolonien ausgewählt, vermehrt und das Plasmid durch eine Mini-Präparation isoliert

Hier wurden die Primer zur Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments so gewählt, dass anschließend durch eine Restriktionsspaltung (mit KpnI) das fertige Plasmid daraufhin überprüft werden konnte, ob ein Insert in der gewünschten Orientierung und Länge vorlag. Für das hier durchgeführte TOPO-Cloning wurden alle Primer nach dem gleichen Prinzip konstruiert. Der 5'-Primer wurde so gewählt, dass vor dem Beginn des Gens eine Kozak-Sequenz eingefügt wurde, da diese im Vektor nicht enthalten ist:

	Kozak	Protein
AAG	CTTACC	ATGNNNNNNNNNNNNNNNNNN

Der 3'-Primer enthielt wahlweise ein Stopp am Ende des Proteins, um dieses alleine exprimieren zu können oder dieses Stopp wurde weggelassen, um ein Fusionsprotein mit dem dahinterliegenden GFP zu erzeugen. Zusätzlich wurde eine KpnI-Restriktionsschnittstelle eingefügt:

	KpnI	(Stopp)	Protein
G	GGTACC	(TTA)	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

### **Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen**

[51]

Zur Präparation von Plasmiden wurde eine Methode verwendet, die auf der alkalischen Lyse der plasmidhaltigen Bakterien und anschließender Isolierung der Plasmide beruht. Dabei wurde bei der Aufreinigung von größeren Mengen an Bakterienkultur ein Kit der Firma Qiagen verwendet (Plasmid-Midi-Kits 200 ml Bakterienkultur, Plasmid-Maxi-Kits 500 ml Bakterienkultur) oder aber bei kleinen Mengen eine Mini-Präparation mit selbst angesetzten Lösungen durchgeführt.

#### **2.10.8.3 Plasmid-Midi/Maxi-Präparation**

Die Aufreinigung erfolgt nach dem Protokoll des Qiagen-Plasmid-Midi bzw. Maxi-Kits (Qiagen, Hilden). Dabei werden 200 ml (Midi-Präp) bzw. 500 ml (Maxi-Präp) einer Übernachtskultur von Bakterien erst auf Eis abgekühlt und dann die Bakterien sedimentiert. Die Bakterien werden anschließend lysiert und die Reste der Bakterien von der wässrigen Lösung, die das Plasmid enthält, durch Zentrifugation abgetrennt. Anschließend wird das Plasmid über eine mitgelieferte Säule aufgereinigt und die Plasmid-DNA aus der Lösung über eine Isopropanol-Fällung gewonnen. Die DNA wird nach der Trocknung in 200 µl bis 1 ml Ampullen-Wasser aufgenommen und eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

#### **2.10.8.4 Plasmid-Mini-Präparation**

Von einer 3 ml Übernachtskultur mit den plasmidhaltigen Bakterien werden 2 ml verwendet und die Bakterien, nach Sedimentation (13.000 rpm, 4 °C, 2 min rpm Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, Osterode), durch eine alkalische Lösung lysiert. Nach Abzentrifugation (13.000 rpm, 4 °C, 5 min rpm Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, Osterode) der Bakterienreste erfolgt eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender ethanolischer Fällung. Die Plasmid-DNA wird in der Regel in 20 µl Ampullen-Wasser resuspendiert.



### 2.10.9 Isolierung von genomischer DNA

Mit diesem Verfahren wurde genomische DNA aus Zellkulturen und aus Chlamydienstocks durch alkalische Lyse isoliert. Hierbei wird sämtliche vorhandene genomische DNA isoliert, also auch die DNA von Organismen, die in der Probe als Kontamination vorliegen.

Bei Proben, die potentiell kontaminös sind wurden diese durch eine Inkubation von 10 min bei 80 °C inaktiviert. Anschließend wurden die Proben gewaschen (Waschlösung: 25 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 % [v/v] Triton X 100, Zentrifugation 20 min bei 13000 rpm) und durch Zusatz von 0,4 %iger Natronlauge und erhitzen auf 60 °C für 45 min lysiert. Nach der Neutralisation der Proben mit 0,2 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,6 wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

Bei Proben, die nur geringe Mengen an Zellen bzw. Bakterien enthalten wurde zur Unterstützung der Aufreinigung eine definierte Menge eukaryonter Zellen ( $10^4$ ) vor der Aufreinigung zugegeben.

### 2.10.10 Nachweis von Mykoplasmen

Das hier angewandte Verfahren basiert auf einer PCR von Huniche et al [52] und wurde in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit von F. Tidow weiterentwickelt.

Bei diesem Verfahren wird erst genomische DNA aus der zu untersuchenden Probe isoliert und anschließend eine Genus-spezifische PCR für Mykoplasmen durchgeführt. Es wird eine Hybridisierung des PCR-Amplifikats mit einem weiteren spezifischen Primer angeschlossen, der über eine enzymatische Reaktion nachgewiesen wird.

Die zu untersuchenden Proben wurden entweder, wie bei der Überprüfung von Chlamydienstocks, direkt zur Isolierung genomischer DNA (siehe 2.10.9 ) eingesetzt, oder aber bei Zellkulturproben wie unter 2.11.4 beschrieben vorbereitet und aus der so vorbereiteten Probe genomische DNA gewonnen

Von der genomischen DNA wurden 5 – 10 % des Ansatzes in eine 50 µl PCR eingesetzt.

Für die PCR wurden die Genus-spezifischen Primer Mh 756p und Biot Mh 1020n eingesetzt, die ein Teilstück des 16S rRNA Gens amplifizieren. Der Primer Biot Mh 1020n ist dabei am 5'-Ende biotinyliert, wodurch das PCR-Amplifikat nach abgeschlossener PCR durch Streptavidin-gekoppelte magnetische Kügelchen (Dynabeads<sup>®</sup> M-280 Streptavidin, Dynal, Hamburg) aufgereinigt werden kann. Nach einer alkalischen Auftrennung der Doppelstrang-DNA wurde die Hybridisierung mit dem dritten Oligonukleotid RAS-MyGenusH1DIG angeschlossen. Dieses Oligonukleotid ist am 5'-Ende digoxigeniert und nach der Hybridisierung erfolgt

der Nachweis des Oligonukleotids über einen Anti-Digoxigenin-Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche, Mannheim, eingesetzt 1:5000 verdünnt), welcher an alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Die AP kann über den Umsatz von 4-Methyl-Umbelliferylphosphat nachgewiesen werden, wobei der Umsatz zu einer Gelbfärbung der Probe führt, welcher photometrisch bestimmt werden kann (Anregung bei 355 nm, Emission bei 460 nm). Über eine parallel mitgeführte Verdünnungsreihe an Mykoplasmen kann die Sensitivität des Nachweises ermittelt werden. In der Regel wurden Nachweisgrenzen von  $10^1$  Mykoplasmen im Ansatz erreicht.

#### **2.10.11 Molekularbiologische Unterscheidung einzelner *C. trachomatis* Biovare/Serovare**

Um die einzelnen *C. trachomatis* Biovare bzw. Serovare unterscheiden zu können wurden in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Dissertation von K. Endlich zwei Methoden entwickelt. Hier ging es hauptsächlich um die Unterscheidung der Serovare L2 und D, die in der Arbeitsgruppe verwendet wurden.

Zum einen wurde eine Sequenzierung eines Teilstücks des MOMP-Gens durchgeführt, welches hypervariable Regionen besitzt, die in den einzelnen Chlamydienstämmen unterschiedlich aussehen. Durch einen Sequenzvergleich mit veröffentlichten Sequenzen für die MOMP-Teilstücke von *C. trachomatis* Serovar L2 und Serovar D lassen sich eindeutig die in der Arbeitsgruppe verwendeten Serovare zuordnen. Mit dieser Methode können auch andere Serovare durch einen Sequenzabgleich unterschieden werden.

Die andere Methode basiert auf einer Sequenz, die in Serovar D vorkommt, in Serovar L2 aber deletiert ist. Hierbei handelt es sich um CT165, CT166, CT167 und Teile von CT168. Für die Unterscheidung wurden zwei PCRs entwickelt. Dafür wurden die Primer in der einen PCR wurden so gewählt, dass ein Stück genomische DNA innerhalb der Deletion amplifiziert wird und somit nur bei Verwendung von Serovar D ein Amplifikat geliefert wird. Für die andere PCR wurden Primer eingesetzt, die außerhalb der Deletion ansetzen. Bei Verwendung von genomischer DNA von Serovar L2 wird nun ein kürzeres Stück (ca. 1100 bp) amplifiziert als bei Serovar D (ca. 4700 bp). Somit sind auch mit dieser Methode beide Serovare unterscheidbar.

Diese Methode eignet sich nur zur Unterscheidung von Serovaren mit und ohne Deletion. So kann beispielsweise Serovar E, welches ebenfalls die Sequenzen für CT165 bis CT168 enthält auf diesem Wege nicht von Serovar D unterschieden werden. Hier müßte eine Sequenzierung des MOMP-Gens erfolgen.

### 2.10.12 Arbeiten mit RNA

Bei Arbeiten mit RNA müssen besondere Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden, da es sehr leicht zu einer Kontamination mit ubiquitären Ribonukleasen (RNasen) kommen kann, die in sehr kurzer Zeit sämtliche freie RNA abgebaut haben. Daher sollte nur mit entsprechender Schutzkleidung (Kittel, Handschuhe) gearbeitet werden, und sämtliches Material sollte RNase-frei sein und ausschließlich für diese Arbeiten genutzt werden. RNasen können durch DEPC (final 0,2 % [v/v]) zerstört werden. Lösungen sollten nach Zugabe und erfolgter Wirkung von DEPC autoklaviert werden, um das hochgiftige DEPC zu inaktivieren.

### 2.10.13 Isolierung von RNA aus adhärennten Zellen

[53]

Zur Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde Trizol-Reagenz (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) nach dem entsprechenden Protokoll der Firma verwendet. Trizol ist ein Gemisch aus Phenol und Guadiniumthiocyanat, welches die Zellen lysiert, dabei RNasen hemmt (Guadiniumthiocyanat) und die Integrität der RNA nicht beeinträchtigt. An die Lyse der Zellen wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Isolierung der RNA über eine Isopropanol-Fällung angeschlossen. Das Herstellerprotokoll wurde für die RNA-Gewinnung für die Durchführung der Affymetrix-Arrays und nachfolgende *Real-Time*-PCR-Analysen abgewandelt, so wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion durch eine Phenol-BCP-Extraktion (auf 1 ml Trizol werden statt 500 µl Chloroform 200 µl BCP gegeben) ersetzt und statt Glykogen wurde als Fällhilfe LPA (1 µl je Probe) verwendet.

### 2.10.14 Denaturierende RNA-Agarosegele

Die Elektrophorese von RNA in denaturierenden Agarosegelen verläuft nach dem gleichen Prinzip wie die Gelelektrophorese in nicht denaturierenden Gelen (siehe 2.10.4). Da RNA allerdings zur Ausbildung von voluminösen Tertiärstrukturen neigt, die ihre Wanderungseigenschaften im Gel verändert, wird sie vor dem Auftragen auf das Gel denaturiert und denaturierende Bedingungen während der Gelelektrophorese beibehalten, so daß ein Rückfalten in Sekundär- und Tertiärstrukturen verhindert wird.

Für ein 1%iges Gel (80 ml) wurden 0,8 g Agarose in 61 ml DEPC-Wasser aufgeköcht, auf ca. 60 °C abgekühlt und mit 16 ml 5x Laufpuffer und 3,3 ml 37%igem Formaldehyd versetzt, gut durchmischt und in eine entsprechende Gelkammer gegossen.

Die Proben wurden 1:1 mit Probenauftragspuffer versetzt und für 10-15 Minuten im Wasserbad bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurden sie auf das Gel geladen und die Elektrophorese wurde sofort in 1x Laufpuffer gestartet (5 V pro cm Elektrodenabstand). Nach Abschluß der Elektrophorese kann die RNA direkt unter UV-Licht betrachtet werden, da im Probenauftragspuffer Ethidiumbromid enthalten ist.

### **2.10.15 cDNA-Synthese**

Bei der cDNA-Synthese wird über eine Reverse Transkription (RT) aus RNA ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) erzeugt. Dazu wird eine Reverse Transkriptase verwendet, die genauso wie die DNA-Polymerase an ein kurzes doppelsträngiges Stück bindet (hier aus DNA und RNA) und den komplementären Gegenstrang zur RNA synthetisiert. Als kurzes komplementäres Stück wurde hier ein 16-18 Nukleotide langes Oligo-dT-Stück verwendet, welches an den poly-A-Schwanz von eukaryonten mRNAs binden kann. So konnte sämtliche eukaryonte mRNA als Vorlage dienen. Eine Alternative bieten spezifische Primer, die entsprechend nur für eine bestimmte RNA kodieren oder Primer mit zufälligen Basenabfolgen (Random-Hexamer-Primer), die für alle RNAs verwendet werden können.

Die cDNA-Synthese wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Es wurden 5 µg RNA mit 1 µl Oligo-dT<sub>15</sub>-Primer (0,5 mg/ml, Promega, Mannheim) versetzt, auf 12,6 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe 2 min auf Eis abgekühlt und dort der eiskalte Reaktionsmix (4µl 5xSuperscript-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTPs, 0,4 µl RNase-Inhibitor 40 U/µl) zugefügt. Das Gemisch wurde 2 min bei 42 °C inkubiert und anschließend 1 µl Superscript Reverse Transkriptase (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) zugefügt. Nach 35 min bei 42 °C wurde das Reaktionsgemisch auf 60 µl mit Wasser bzw. TE 10/1 aufgefüllt und weitere 5 min bei 90 °C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase inkubiert.

Die cDNA wurde bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

### **2.10.16 Verwendung von (cDNA-)Microarrays**

Microarrays werden verwendet, um die Anwesenheit und Menge einer bestimmten RNA oder DNA in einer Probe zu ermitteln, wobei bei die Methode gleichzeitig RNA oder DNA einer großen Anzahl unterschiedlicher Gene in der selben Probe vergleichend untersucht werden kann. Häufig werden Arrays zur Untersuchung von Expressionsmustern auf mRNA-Ebene herangezogen, wobei stimulierte mit nicht stimulierten Zellen verglichen werden.

Ein Array besteht aus einem Träger aus Glas, Nylon oder Plastik auf den kurze DNA-Fragmente aufgebracht sind, die eindeutig für ein bestimmtes Gen bzw. eine bestimmte Sequenz

kodieren. Aus der zu untersuchenden Zellpopulation wird die (m)RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Diese wird entweder direkt markiert oder aber wieder in markierte cRNA umgeschrieben. Die Markierung erfolgt entweder radioaktiv oder über einen Fluoreszenzfarbstoff. Die markierte Probe wird dann mit dem Array hybridisiert und das Signal (Radioaktivität oder Fluoreszenz), welches proportional zur eingesetzten Menge an entsprechender RNA ist, ausgelesen. Nach einem Abgleich der Intensitäten innerhalb der zu vergleichenden Array-Träger können die Signale auf den verschiedenen Array-Trägern miteinander verglichen und so Unterschiede in der Expression einzelner Gene ermittelt werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Microarrays der Firmen Clontech/BD und Affymetrix verwendet, die sich sowohl im Trägermaterial, als auch in der Probenaufbereitung und Markierung unterscheiden.

Atlas-Nylon-cDNA-Arrays der Firma Clontech verwenden als Trägermaterial Nylonmembranen, auf die 200-600 bp lange durch PCR erzeugte cDNA-Fragmente aufgebracht sind. Die mRNA wird über spezifische Primer in radioaktiv-markierte cDNA umgeschrieben, die in die Hybridisierung eingesetzt wird. Die Detektion erfolgt mittels Phosphorimager. Als Kontrollen sind Fragmente genomischer DNA sowie virale DNA aufgebracht.

Die eingesetzten U95A Arrays der Firma Affymetrix verwenden 25 bp lange Oligonukleotide, die photolithographisch auf einen Glasträger aufgebracht sind. Die zu untersuchende RNA wird mit Oligo-dT-Primern in cDNA und diese anschließend wieder in cRNA umgeschrieben, welche biotinyliert ist. Nach der Hybridisierung der Probe mit der Membran wird ein Streptavidin-gekoppeltes Fluorophor (hier Phycoerythrin) zugegeben, welches über einen Laser ausgelesen wird. Jedes Gen wird durch 11 bis 16 verschiedene Oligonukleotide repräsentiert, wobei jeweils ein *perfect match* (PM) und ein *mismatch* (MM) Oligonukleotid zusammengehören. Beim MM-Oligonukleotid ist jeweils Position 13 von 25 verändert. Die entsprechende cRNA sollte nur an das PM binden, nicht aber an das MM, so dass eine Kontrolle für unspezifische Bindungen vorhanden ist.

#### **2.10.16.1 Durchführung von Atlas-Nylon-cDNA-Arrays**

Die Atlas cDNA-Microarrays wurden weitestgehend nach Herstellerangaben durchgeführt.

Es wurden je Probe 4 µg gesamt RNA mit 1 µl des spezifischen Primergemischs mit Superscript II Reverser Transkriptase (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) nach dem Protokoll der Firma Clontech in <sup>32</sup>P-markierte cDNA umgeschrieben. Die so erhaltenen cDNAs wurden im Szintillationszähler im Kanal für <sup>3</sup>H gemessen und bei ausreichender Aktivität (mindestens 2x10<sup>6</sup> cpm pro Probe) zur Hybridisierung verwendet.

Die Hybridisierung und das anschließende Waschen der Membranen erfolgten nach Herstellerangaben.

Die Atlas Array Membranen wurden für wenige Tage bis zu mehreren Wochen auf Phosphoimaging-Platten exponiert und anschließend die Platten mit einem Phosphoimager ausgelesen. Die nun digitalisiert vorliegende Intensität der Signale auf den einzelnen Membranen wurde erst über die Intensität der auf den Membranen befindlichen Haushaltsgene (*housekeeping genes*) normalisiert und dann die Werte für die einzelnen Gene Computer-gestützt verglichen (Array Vision). Die so aufgezeigten Regulationen wurden zusätzlich visuell auf mögliche falsch-positive Ergebnisse durch Kontaminationen oder Artefakte auf den Membranen bzw. überstrahlende Radioaktivität von Nachbarpunkten kontrolliert und anschließend zur weiteren Analyse in eine Excel-Datei überführt.

Es ist möglich die Nylon-Membranen der Atlas Arrays zu „strippen“. Als „Strippen“ bezeichnet man das Entfernen der auf dem Array befindlichen radioaktiv markierten Proben, um die Membranen für ein weiteres Array-Experiment zu verwenden. Laut Angabe des Herstellers kann eine solche Nylon-Membran bis zu viermal verwendet werden. Hier wurden die Membranen nach Herstellerangaben gestrippt und einmal wiederverwendet.

#### **2.10.16.2 Durchführung von Affymetrix Microarrays**

Die U95A-Microarrays von Affymetrix wurden nach Herstellerangaben durch P. Hedge (GSK) durchgeführt.

Dabei wurden 10 µg gesamt-RNA erst durch eine Reverse Transkription mit T7-dT<sub>24</sub>-Primern in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Synthese des zweiten DNA-Stranges mit DNA-Polymerase I, ein Verdau der noch vorhandenen RNA und eine Vervollständigung der DNA-Stränge durch die T4 DNA-Polymerase. Nach einer Abtrennung der Proteine wurde die DNA wieder in cRNA mittels T7 RNA-Polymerase umgeschrieben, wobei nur biotinylierte Nukleotide eingesetzt wurden. Nach einer Aufreinigung der cRNA wurde diese mit den Affymetrix-Arrays hybridisiert, die Arrays gewaschen und mit Streptavidin-gekoppeltem Phycoerythrin inkubiert. Das Streptavidin bindet an die Biotinmoleküle der cRNA und anschließend kann das Phycoerythrin durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt werden und so die cRNA detektiert werden. Dabei ist die Intensität des Fluoreszenzsignals proportional zur gebundenen cRNA-Menge.

Das Auslesen der Microarrays erfolgte mit Hilfe der Affymetrix Microarray Suite Software (Version 4.0). Die .cel-Files, die die Intensitäten der jeweiligen Arrays enthalten, wurden in

die Resolver-Software (Resolver Expression Data Analysis System Version 2.0, Rosetta, Kirkland, WA, USA) eingelesen und das *Resolver error model* für die Datenverarbeitung und Primärauswertung verwendet.

### 2.10.17 Real-Time-RT-PCR

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Menge einer bestimmten mRNA in einer Probe zu ermitteln, um dadurch etwa eine Aussage über die Zu- oder Abnahme der Expression eines bestimmten Gens treffen zu können. Eine neuere Methoden ist dabei die *Real-Time-RT-PCR*, bei der nach einer Reversen Transkription (RT) eine PCR erfolgt, in der zeitaufgelöst die Entstehung des Amplifikats verfolgt wird. Dabei ist der Zeitraum bis zum Auftreten eines Amplifikates ein Maß für die mRNA-Menge im Ausgangsmaterial.

In der *Real-Time-PCR* wird nach jedem durchlaufenen Zyklus ein Fluoreszenzsignal, das proportional zu der Menge an Doppelstrang-DNA (dsDNA) ist, aufgezeichnet. Der Zeitpunkt, d.h. die Zykluszahl an dem dieses Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund (*threshold*) heraustritt und meßbar wird, wird *Threshold-Cycle* ( $C_T$ ) genannt. Über eine Eichkurve aus einer Verdünnungsreihe an Ausgangsmaterial (cDNA) oder einem Plasmid mit einem Insert, welches das zu quantifizierende Gen oder ein entsprechendes Teilstück enthält, kann nun der  $C_T$ -Wert der Probe abgeglichen und somit eine Quantifizierung vorgenommen werden. Dabei kann entweder bei Verwendung einer Verdünnungsreihe aus cDNA eine relative Menge, das Äquivalenzvolumen, ermittelt werden oder aber bei Verwendung von einem Plasmid direkt die Kopienzahl des Gens in der Ausgangsprobe bestimmt werden.

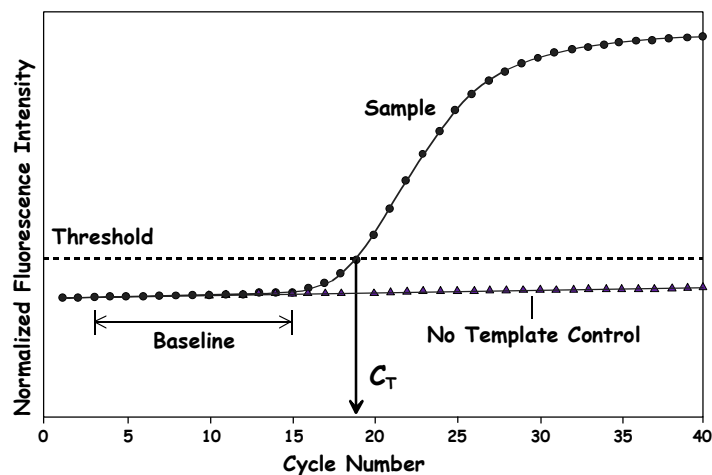


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ergebnisses einer Fluoreszenz-Messung während einer *Real-Time-PCR*. Aufgetragen ist die Zykluszahl der PCR (*Cycle Number*) gegen die normalisierte Fluoreszenz-Intensität (*Normalized Fluorescence Intensity*) für eine Probe (*Sample*) und eine Negativ-Kontrolle ohne cDNA (*No Template Control, NTC*). Der  $C_T$ -Wert, die Zykluszahl bei der das Fluoreszenzsignal der Probe aus dem Hintergrund (*Threshold*) heraustritt wurde hier durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Das Fluoreszenzsignal in einer *Real-Time*-PCR kann entweder spezifisch für ein bestimmtes Gen sein oder aber nur die Menge an entstandener dsDNA angeben. Für ein spezifisches Signal wird ein dritter Primer (Sonde) für das gewünschte Gen benötigt, der ein Fluoreszenzsignal mitführt. Für dieses Verfahren gibt es verschiedene Methoden, die alle auf dem Prinzip des Fluoreszenz Resonanzenergie Transfers (FRET) beruhen. Dabei werden Oligonukleotid-Sonden verwendet, an die zwei Fluorophore gekoppelt sind. Diese Fluorophore verhalten sich anders, wenn sie in enger räumlicher Nähe, hier gekoppelt an die Sonde, vorliegen, als wenn sie weiter voneinander entfernt sind. Nach Bindung der Sonde an die Einzelstrang-DNA wird die Sonde durch die DNA-Polymerase, die in der PCR-Reaktion den Gegenstrang erzeugt, zerstört. Dabei werden die beiden Fluorophore getrennt und die Fluoreszenz ändert sich. Die Änderung dieses Fluoreszenzsignals wird gemessen, wobei die Fluoreszenz des freien Fluorophores ein Maß für die entstandene Doppelstrang-DNA mit der entsprechenden Sequenz, an die die Sonde spezifisch bindet, darstellt.

Die andere Technik, die ein unspezifisches Signal für alle dsDNA ergibt, beruht auf einem Fluoreszenz-Farbstoff, der erst bei Einlagerung in die dsDNA fluoresziert, wofür SYBR<sup>®</sup>-Green verwendet wird. Dabei ist während des PCR-Laufs keine Unterscheidung zwischen einem gewünschten Amplifikat und einem unerwünschten Produkt möglich, so dass nach einem PCR-Lauf eine Überprüfung auf mögliche weitere Produkte erfolgen sollte. Dies kann über ein anschließendes Agarosegel zur Überprüfung der Amplifikatlänge sowie über eine zusätzlich aufgezeichnete Schmelzkurve geschehen. Eine solche Schmelzkurve kann von dem *Real-Time*-PCR-Gerät aufgezeichnet werden. Es kann über den Verlauf der Schmelzkurve unterschieden werden, ob nur ein Amplifikat oder mehrere entstanden sind, wobei die am häufigsten auftretenden unerwünschten Produkte durch die Verlängerung von sich teilweise überlappenden Primerteilstücken als „*Primerdimer*“ entstehen. Diese weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt als die eigentlichen Produkte auf.

*Real-Time*-PCR-Geräte werden von verschiedenen Herstellern angeboten, wobei zwei Systeme unterschieden werden können: das TaqMan<sup>®</sup>-System (Applied Biosystems, Weiterstadt) sowie das LightCycler<sup>®</sup>-System (Roche, Mannheim), die sich durch Unterschiede in der Wahl der spezifischen Sonden, der Datengewinnung und Anzahl der gleichzeitig zu bearbeitenden Proben und Volumen dieser Proben auszeichnen.

Die hier vorgestellten Daten wurden mit TaqMan<sup>®</sup>-Geräten unter Verwendung von SYBR-Green gewonnen.



### 2.10.17.1 Primergenerierung und Austestung der Primer

Für die Generierung der Primer für die *Real-Time*-PCR in einem TaqMan<sup>®</sup>-Gerät gibt es bestimmte Vorgaben, so sollte der zu amplifizierende Bereich zwischen 90 bis 150 bp liegen, wobei die Primer eine Länge von 17 bis 25 Nukleotiden haben sollten. Zusätzlich sollte der zu amplifizierende Bereich eher im „hinteren“ Teil des Gens, d.h. im 3'-Bereich liegen, da die Reverse Transkriptase von dieser Seite her die cDNA synthetisiert und die Synthese häufig nach 1500 bis 2000 bp abbricht. Außerdem ist es wünschenswert, dass in diesem Bereich eine Intron-Exon-Grenze liegt, so dass ein Amplifikat aus genomischer DNA eine andere Länge aufweist als ein Amplifikat aus cDNA. So kann in der PCR eine Verunreinigung mit genomischer DNA schnell detektiert werden. Weiterhin ist es nützlich, wenn die generierten Primer alle eine ähnliche Annealing-Temperatur besitzen (möglichst um 60 °C), da so mehrere Gene im gleichen PCR-Lauf untersucht werden können.

Bevor die Primer in der quantitativen *Real-Time* PCR eingesetzt werden können, muss überprüft werden, ob sie bei der gewünschten Annealing-Temperatur verwendbar sind und dabei keine unerwünschten zusätzlichen Produkte entstehen.

Im nächsten Schritt muß das beste Verhältnis der Primerkonzentrationen im PCR-Ansatz ermittelt werden. Dabei wird angestrebt, eine möglichst große Differenz der C<sub>T</sub>-Werte von Probe mit cDNA und Probe ohne cDNA im Ansatz zu erhalten, was einem hohen Signal-Rauschabstand entspricht. Bei ungünstigen Primerverhältnissen wird das Genstück wesentlich schlechter amplifiziert und es können sogar unerwünschte Nebenprodukte aus Primer-selbstamplifikationen entstehen.

Die Bestimmung des besten Verhältnisses an Primern im Ansatz wurde durch eine sogenannte Primermatrix nach Herstellerangaben durchgeführt.

Von der im Pipettierschema (siehe Tabelle 8) erstellten Probe werden dabei Doppelansätze mit je 20 µl eines Oligonukleotidgemisches in bestimmtem Verhältnis pro Ansatz mit 30 µl Mastermix (Enzyme, Nukleotide, Puffer, etc.) versetzt und in der *Real-Time*-PCR eingesetzt.

Primer-Verhältnis [3':5' Primer]	Template-Menge	5'-Primer [5 pmol/μl]	3'-Primer [5 pmol/μl]	ddH <sub>2</sub> O
50 : 50 K	—	1,25 μl	1,25 μl	47,5 μl
50 : 50	2,5 μl	1,25 μl	1,25 μl	45 μl
50 : 300 K	—	1,25 μl	7,5 μl	41,25 μl
50 : 300	2,5 μl	1,25 μl	7,5 μl	38,75 μl
50 : 900 K	—	1,25 μl	22,5 μl	26,25 μl
50 : 900	2,5 μl	1,25 μl	22,5 μl	23,75 μl
300 : 50 K	—	7,5 μl	1,25 μl	41,25 μl
300 : 50	2,5 μl	7,5 μl	1,25 μl	38,75 μl
300 : 300 K	—	7,5 μl	7,5 μl	35 μl
300 : 300	2,5 μl	7,5 μl	7,5 μl	32,5 μl
300 : 900 K	—	7,5 μl	22,5 μl	20 μl
300 : 900	2,5 μl	7,5 μl	22,5 μl	17,5 μl
900 : 50 K	—	22,5 μl	1,25 μl	26,25 μl
900 : 50	2,5 μl	22,5 μl	1,25 μl	23,75 μl
900 : 300 K	—	22,5 μl	7,5 μl	20 μl
900 : 300	2,5 μl	22,5 μl	7,5 μl	17,5 μl
900 : 900 K	—	22,5 μl	22,5 μl	5 μl
900 : 900	2,5 μl	22,5 μl	22,5 μl	2,5 μl

**Tabelle 8: Pipettierschema für die Primermatrix, wobei in Spalte eins das Primerverhältnis im Ansatz in fmol/Ansatz angegeben ist.**

### 2.10.17.2 Quantitative Bestimmung von cDNA mittels *Real-Time-PCR*

Zur Quantifizierung einer bestimmten cDNA in einer Probe und dem anschließenden Vergleich dieser cDNA-Menge mit der cDNA-Menge in einer zweiten Probe (hier in der Regel cDNA von Chlamydien-infizierten Zellen im Vergleich mit schein-infizierten Zellen) wird erst das Äquivalenzvolumen der cDNA in der Probe über eine Standardreihe mit einer cDNA-Verdünnungsreihe ermittelt und anschließend die Menge über ein *Housekeeping*-Gen normiert. Hierbei werden die  $C_T$ -Werte der Verdünnungsreihe (Standard) gegen den Logarithmus der Probenkonzentration (eingesetztes Volumen oder Kopienzahl) aufgetragen und daraus eine Geradengleichung ermittelt. Die Menge des nachzuweisenden Gens in einer unbekannt Probe kann nun anhand dieser Geradengleichung bestimmt werden.

Laut Applied Biosystems ist die Steigung der Geradengleichung der Verdünnungsreihe ein Maß für die Güte der *Real-Time-PCR* und der Primer, wobei über die Steigung die Effizienz (E) der Reaktion ermittelt werden kann mit:

$$E = 10^{-1/S} - 1 \quad , \text{ mit } S = \text{Steigung der Standardkurve, semilogarithmisch.}$$

Eine gute Steigung liegt bei  $-3$  bis  $-3,5$  und beschreibt eine Effizienz der Amplifikationsreaktion um 100 %.

Für eine Probe wird immer sowohl das Äquivalenzvolumen des gewünschten Gens, als auch das für ein *Housekeeping*-Gen, hier Ribosomales Protein 9 (RPS9) ermittelt. Über das Äquivalenzvolumen des *Housekeeping*-Gens, welches theoretisch bei allen Proben gleich sein sollte, da die gleiche Menge an RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt wurde und ein gleiches Probenvolumen in die *Real-Time*-PCR eingesetzt, kann eine Normalisierung der einzelnen zu vergleichenden Proben stattfinden. Anschließend können die Proben zueinander ins Verhältnis gesetzt werden, um mögliche Regulationen der Genexpression zu ermitteln.

## 2.11 Zell- und immunbiologische Methoden

### 2.11.1 Kultivierung von eukaryonten Zellen

Bei allen verwendeten Zelllinien handelte es sich um adhärente Zellen, die unter sterilen Bedingungen bei 37 °C in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> in Standardzellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) im Brutschrank kultiviert wurden (Zelllinien und Zellkulturmedien siehe 2.2).

Als adhärent bezeichnet man Zelllinien, die in Kultur an die Oberfläche des Kulturgefäßes anhaften, vornehmlich an den Gefäßboden. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage, kurz vor der Konfluenz der Zellen (ca. 10<sup>7</sup> Zellen bei Zellkulturflasche mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche), erneut in geringerer Zelldichte in neuem Medium ausgesät (passagiert), um ihnen optimale Wachstumsbedingungen zu liefern. Für das Passagieren müssen die Zellen vorher von den Zellkulturflaschen abgelöst werden. Dies geschieht hier durch Inkubation mit Trypsin, einer Protease, die die Zellvernetzungen mit dem Kulturflaschenboden abspaltet. Da die Aktivität des Trypsins in Zellkulturmedium stark abgemindert ist wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen und dann mit einem kleinen Volumen an Trypsin-EDTA (Biochrome, Berlin) für wenige Minuten inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde durch Beklopfen des Bodens der Kulturflasche unterstützt und die Zellen in PBS oder frischen Medium suspendiert. Zur Weiterkultivierung der Zellen wurde etwa 1/5 der Zellsuspension erneut in Medium ausgesät, der Rest der Zellen wurde in Experimenten eingesetzt oder verworfen.

### 2.11.2 Bestimmung der Zellzahl und Überprüfung der Vitalität der Zellen

Vor dem Einsatz von Zellen wurde deren Konzentration bestimmt. Dazu wurden die Zellen in Suspension gebracht und in einer Zählkammer mit definiertem Volumen unter dem Lichtmikroskop gezählt. Tote Zellen wurden mit Trypanblau markiert, einem sauren Farbstoff, der durch defekte Zellmembranen diffundiert.

Die Bestimmung der Zellzahl wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$\text{Zellkonzentration [Zellen/ml]} = (\text{Zellen} \times 1000) / (\text{Kammervolumen} \times \text{Verdünnungsfaktor})$$

Bei der verwendeten Neubauer-Zählkammer ergibt sich das Kammervolumen als  $0,4 \text{ mm}^3$  (Kammerhöhe =  $0,1 \text{ mm}$ ; Kammerfläche =  $4 \text{ mm}^2$ ). In der Regel wurden die Zellen mit einem gleichen Teil Trypanblau verdünnt.

### **2.11.3 Entfernung von Mykoplasmen aus Zellkulturen**

Mykoplasmen sind zellwandlose Bakterien, die häufig als Kontaminationen in Zellkulturen auftreten. Je nach Spezies können sie entweder im Zellkulturmedium oder direkt auf der Zelloberfläche wachsen und sind nur schwer kulturell nachweisbar.

Zur Entfernung von Mykoplasmen aus Zellkulturen werden die Zellen mit dem Antibiotikum Ciprofloxazin (Ciprobay 200, Bayer, Leverkusen), für welches Mykoplasmen sensitiv sind, in einer Konzentration von  $20\text{-}50 \text{ }\mu\text{g/ml}$  für zwei Wochen kultiviert.

Anschließend werden die Zellen zwei weitere Wochen ohne Antibiotikum kultiviert und danach überprüft, ob die Behandlung erfolgreich war (siehe 2.10.10). Sollten noch Mykoplasmen nachgewiesen werden wird die Behandlung wiederholt und dabei die Konzentration an Ciprofloxazin nach Möglichkeit erhöht.

### **2.11.4 Gewinnung von Zellkulturproben für die Überprüfung auf eine Mykoplasmen-Kontamination**

Die zu überprüfenden Zellen wurden eine Woche ohne Antibiotika-Zusatz im Medium kultiviert und anschließend  $1\text{-}2 \times 10^6$  Zellen im Zellkulturmedium bei  $13.000 \text{ rpm}$  (Biofuge 13, Heraeus Sepatech, Osterode) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet, das mögliche Mykoplasmen enthalten würde bis zur Verwendung im Test bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.11.5 Gewinnung von primären Chondrozyten aus humanem Knorpel-Gewebe**

Zur Gewinnung von primären humanen Chondrozyten wurde steriles Gewebe von gesunden Spendern im Alter zwischen 20 und 50 Jahren entnommen, die Chondrozyten daraus isoliert und in Kultur genommen. Solche primären Zellen können einige Wochen kultiviert werden, bevor sie ihre gewebespezifischen Eigenschaften verlieren.

Die hier verwendeten Chondrozyten wurden von C. Kaps (Abteilung für Rheumatologie, Charité, Berlin) nach unten stehendem Verfahren isoliert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Scheiben von Hyalinknorpel wurden aus dem Oberschenkelknochen entnommen, wobei nur zwei Drittel des Materials verwendet wurden, um eine Verunreinigung mit Knochen oder Bindegewebe zu vermeiden. Das Gewebe wurde für 16 Stunden bei 37 °C in RPMI mit 10 % FCS und 2 mg/ml Kollagenase Typ CSL II (Seromed, Berlin) und 0,1 mg/ml Hyaluronidase (Sigma, Deisenhofen) in Rollerflaschen inkubiert, um die Extrazellulärmatrix abzubauen. Anschließend wurde die Chondrozyten-Suspension in *Hank's buffered salt solution* gewaschen und in Flaschen für adhärente Zellen in Kultur genommen.

### **2.11.6 Transiente Transfektion von humanen Zelllinien**

Das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryote Zellen wird als Transfektion bezeichnet und kann über verschiedene Methoden erfolgen, wobei neben der Methode noch zu unterscheiden ist, ob die DNA dauerhaft in die Zelle eingefügt werden soll (Erzeugung einer stabilen Zelllinie) oder aber ein Plasmid transient in die Zelle eingebracht wird. Hier wurden ausschließlich transiente Transfektionen über verschiedene Methoden durchgeführt.

Die Wahl der Transfektionsmethode ist abhängig von der verwendeten Zelllinie und dem Ziel dieser Transfektion. So zeichnete sich die Lipofectamin-Methode bei HeLa-Zellen beispielsweise durch eine sehr hohe Effizienz der Transfektion aus, wirkte aber auch toxisch, so daß sehr viele Zellen nach Transfektion abstarben. Die Calciumphosphat-Methode ist wesentlich preisgünstiger als die Lipofectamin-Methode, da alle Lösungen selbst herstellbar sind. Außerdem wirkt sich die Methode nicht negativ auf das Überleben der Zellen aus. Der Nachteil liegt in der niedrigeren Effizienz und in der Anfälligkeit für Schwankungen der Ergebnisse durch geringfügige Veränderungen in der Durchführung der Transfektion.

Die Effizienz der transienten Transfektionen wurde hier über  $\beta$ -Galaktosidase gemessen.

### **2.11.7 Transiente Transfektion nach der Lipofectamin<sup>TM</sup>-Methode**

Lipofectamin<sup>TM</sup> (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) ist ein 3:1 (w/w)-Gemisch aus einem polykationischen und einem neutralen Lipid. Das Lipid bildet ein Liposom, welches die zu transfizierende DNA umschließt und durch die Zellmembran transportiert.

Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers, dabei wurden am Vortag der Transfektion  $2 \times 10^5$  Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und zur Transfektion 1  $\mu$ g Plasmid-DNA und 6  $\mu$ l Lipofectamin nach Vorschrift eingesetzt.

Nach 5 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank erfolgte ein kompletter Mediumwechsel.

### 2.11.8 Transiente Transfektion nach der Effectene™-Methode

Effectene™ (Qiagen, Hilden) ist ein kationisches Lipid, welches keine Liposomen formt. Es wird zusammen mit einem zweiten Molekül (Enhancer) eingesetzt, das zu einer Kondensation der DNA führt. Nach der Kondensation umschließen die kationischen Lipide die DNA und so kann sie von der Zelle leicht aufgenommen werden.

Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers, dabei wurden am Vortag der Transfektion  $2 \times 10^5$  Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und zur Transfektion 0,4 µg Plasmid-DNA, 10 µl Effectene und 3,2 µl Enhancer nach Vorschrift eingesetzt.

Am Folgetag der Transfektion erfolgte ein kompletter Mediumwechsel.

### 2.11.9 Transiente Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode

Bei der Calciumphosphat-Transfektion werden der Plasmidlösung Calciumionen in Form von Calciumchlorid zugesetzt, welches als Calciumphosphat zusammen mit der DNA ausfällt. Diese Präzipitate werden von den Zellen durch Pinozytose aufgenommen.

Hierbei wurden pro Loch einer 6-Loch-Platte am Vortag  $2 \times 10^5$  Zellen ausgesät und vor der Transfektion mit 2 ml frischem Medium versorgt. 7 µg Plasmid-DNA wurden mit TE-Puffer auf 80 µl aufgefüllt und mit 11,5 µl  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (2 M) versetzt. Unter stetiger Luftzufuhr (hier erreicht durch die Verwendung einer Spritze mit Kanüle) wurden 91,5 µl 2x HBS zupipettiert. Nach 45 min bei Raumtemperatur zur Präzipitation der DNA wurde das Gemisch auf die Zellen gegeben und das Medium nach 5 Stunden Inkubation im Brutschrank komplett durch frisches Medium ersetzt.

### 2.11.10 Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels $\beta$ -Galaktosidase (x-Gal-Assay)

Das lacZ-Gen aus *Escherichia coli* codiert ein Enzym, die  $\beta$ -Galactosidase, die die hydrolytische Spaltung von  $\beta$ -Galactosiden in  $\beta$ -Galactose und einen Rest katalysiert. Dieses Gen kann in Plasmide eingebracht und zur transienten Testtransfektion verwendet werden.

Für  $\beta$ -Galactosidase gibt es verschiedene Reportersysteme, die darauf basieren, dass die  $\beta$ -Galactosidase einen Stoff so spaltet, dass neben der  $\beta$ -Galactose ein gut detektierbares Molekül wie beispielsweise ein Farbstoff entsteht. So kann nach einer Transfektion überprüft werden, ob die Zellen  $\beta$ -Galactosidase exprimieren und somit die Transfektion erfolgreich war. Hier wurde x-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranose) als Reportermolekül

gewählt, welches durch  $\beta$ -Galactosidase in  $\beta$ -Galactose und den tiefblauen Farbstoff 5-Bromo-4-chloro-indigo gespalten wird.

Um den Zellen Zeit zu geben,  $\beta$ -Galactosidase zu exprimieren wurde die Effizienz durch Nachweis des entsprechenden Farbstoffs 2-3 Tagen nach Transfektion ermittelt. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit PBS-Glutaraldehyd für 10 min fixiert und nach anschließendem dreimaligem Waschen mit PBS mit der Substrat-Färbelösung bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Eine Blaufärbung der Zellen setzte nach 30 min bis zu mehreren Stunden ein, wobei in der Regel nach 24 h keine Änderung der Blaufärbung mehr auftrat.

Die Effizienz der (transienten) Transfektion ist der Anteil der blaugefärbten Zellen an der Gesamtheit der Zellen.

### **2.11.11 Chemische Mutagenese von eukaryonten Zellen mittels EMS**

[54]

Um eine möglichst hohe Anzahl an unterschiedlichen Klonen einer Zelllinie zu erzeugen, um so z.B. neue Phänotypen zu erhalten, bietet sich die chemische Mutagenese an. Als Mutagen wird dabei häufig Ethylmethansulfonat (EMS) verwendet, das bei entsprechender Dosierung ungefähr eine Mutation pro Zelle erzeugt. Dabei werden die Zellen für 16-18 Stunden mit EMS behandelt, anschließend gewaschen und in frischem Medium für 4-8 Tage inkubiert, um einer möglichen Mutation der Zelle Zeit zu geben, sich auszuprägen. Anschließend können die Zellen auf einen neuen Phänotyp hin untersucht werden.

Bei funktional diploid Zellen ist dies schwierig, da viele Mutationen rezessiv sind und somit für eine Detektion auf beiden Chromosomen auftreten müssten, was bei zufälligen Mutationen sehr unwahrscheinlich ist. Daher wird für solche Experimente gerne die größtenteils funktional haploide Zelllinie CHO verwendet.

Vor der Durchführung der Mutagenese sollte noch die ideale Wirkkonzentration des Mutagens ermittelt werden. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass ein Großteil der Zellen eine Mutation erhält, die Zellen aber noch nicht so viele Mutationen aufweisen, dass sie absterben. Dies ist in der Regel der Fall, wenn ungefähr 80 % der Zellen eine Mutagenese überleben. Dabei ist die Wirkkonzentration abhängig von der Zelllinie und den Kulturbedingungen und wird über eine Dosis-Wirkungskurve mit unterschiedlichen Mutagenkonzentrationen im Ansatz ermittelt. In der Literatur ist ein Richtwert von 200-300  $\mu\text{g/ml}$  EMS für CHO-Zellen angegeben.

### 2.11.12 Anfertigung einer *Limiting Dilution*

Bei diesem Verfahren geht es um die Gewinnung einzelner Zellen aus einer Zellsuspension. Dies ist z.B. notwendig um nach einer Mutagenese mögliche neue Klone zu isolieren und diese dann auf ihre Eigenschaften hin untersuchen zu können. Dabei wird eine Zellsuspension immer weiter verdünnt und ein Teil jeder Verdünnung in einer 96-Loch-Platte ausgesät, bis weniger als eine Zelle im Durchschnitt pro Loch vorhanden ist (eine limitierende Verdünnung, *limiting dilution*).

Hierzu werden adhärente Zellen aus dem Kulturgefäß herausgelöst und resuspendiert. Suspensionszellen können direkt verwendet werden. Zuerst wird die Zellzahl bestimmt und auf  $2,3 \times 10^3$  Zellen/ml mit Zellkulturmedium eingestellt. 100 µl dieser Zellsuspension werden mit 4,5 ml Kulturmedium versetzt, gut durchmischt und zu einem großen Teil auf eine 96-Loch-Platte ausplattiert. Dabei wird je Loch ein Tropfen Zellsuspension, dies entspricht 100 µl, gegeben und so die ersten drei Reihen der Platte (36 Löcher) gefüllt (rechnerisch 5 Zellen/Loch). Die verbliebene Zellsuspension (1 ml) wird mit 4 ml Medium versetzt und davon erneut 3,6 ml genauso ausplattiert (rechnerisch 1 Zelle/Loch). Nun werden erneut 1,5 ml Medium zugegeben und in die zwei verbliebenen Reihen der Platte verteilt. In dieser letzten Verdünnung sollte nur noch jedes zweite Loch eine Zelle enthalten.

Nach mehren Tagen im Brutschrank sollten in den unteren Reihen der Platte Einzelklone heranwachsen.

### 2.11.13 ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Das ELISA ist ein Verfahren zum Nachweis einer bestimmten Substanz durch Antikörper, die mit einem Enzym verbunden sind, welches eine detektierbare Reaktion, z.B. eine Farbentwicklung, katalysiert.

Hierbei wird ein Reaktionsgefäß mit einem meist monoklonalen Antikörper (*capture antibody*) für die nachzuweisende Substanz beschichtet. Anschließend wird die Lösung mit der nachzuweisenden Substanz in das Reaktionsgefäß gegeben und die Antikörpermoleküle binden spezifisch an diese Substanz. Unspezifische Bindungsstellen werden anschließend mit BSA abgesättigt. Nun erfolgt eine Inkubation mit einem zweiten Antikörper (*detection antibody*), der an ein Enzym gekoppelt ist. In einer anschließenden Nachweisreaktion wird das entsprechende Substrat für das Enzym zugesetzt und der Umsatz dieses Substrates gemessen. Waschschritte nach jedem Inkubationsschritt entfernen nicht gebundene Substanzen, daher sollte der Substratumsatz direkt proportional zur Menge des eingesetzten Enzyms, also auch zur Menge der nachzuweisenden Substanz sein. Für solche Nachweise werden häufig Enzyme



verwendet, die eine Farbreaktion auslösen (z.B. alkalische Phosphatase), da solche Reaktionen sehr gut detektierbar sind. Zur Konzentrationsabschätzung wird eine Eichreihe mit bekannten Konzentrationen der nachzuweisenden Substanz verwendet.

#### **2.11.13.1 Probengewinnung für den ELISA**

Die Proben wurden nach den im Ergebnisteil angegebenen Zeitpunkten entnommen, wobei zu diesem Zeitpunkt ein Austausch des Zellkulturmediums erfolgte. Das abgenommene Medium wurde 20 min bei 500xg und 4 °C zentrifugiert, um möglicherweise mitgeführte Zellen abzutrennen. Anschließend wurde das Medium aliquotiert und bis zur Durchführung des ELISA bei -80 °C gelagert.

#### **2.11.13.2 Durchführung des ELISA**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ELISA zur Bestimmung von IL-6, IL-8, IL-11 und LIF verwendet. Alle ELISA wurden von der Firma R&D-Systems (Wiesbaden) bezogen und nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.12 Methoden zum Arbeiten mit Chlamydien**

Alle Arbeiten mit lebenden Chlamydien wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Arbeiten außerhalb der Sicherheitswerkbank wurden in aerosoldichten Behältnissen ausgeführt.

#### **2.12.1 Infektion von adhärennten Zellen mit Chlamydien**

Chlamydienstämme unterscheiden sich sehr stark in ihrer Infektiosität. Daher können, je nach Chlamydienstamm, verschiedene Verfahren zur Infektion angewandt werden. Bei sehr infektiösen Chlamydienstämmen kann eine Infektion durch einfache Inkubation der Chlamydien mit den Zellen erfolgen. In den meisten Fällen ist aber eine Aufzentrifugation der Chlamydien auf den Zellrasen sinnvoll.

Für die hier durchgeführten Arbeiten wurde meist eine Infektion über Zentrifugation durchgeführt. Diese Art der Infektion hat den Vorteil, dass sie bei allen hier verwendeten Chlamydienstämmen genutzt werden kann, dass sie bei den meisten Stämmen zu einer sehr hohen Infektionsrate führt und dass der Zeitpunkt der Infektion sehr genau ermittelt werden kann. Die Zellen werden in Zellkulturplatten (6-, 12-, 24- oder 96-Lochplatten) oder kleinen Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) bis zur Konfluenz wachsen gelassen und anschließend die gewünschte Menge an Chlamydien in Zellkulturmedium resuspendiert und auf die Zellen gegeben. Bei einer Anzucht der Chlamydien zur Stock-Herstellung wurde dabei meist

SF-3-Medium mit Cycloheximid (SF-3\*) verwendet, da in diesem Medium die Chlamydien am besten wachsen. Für die Anzucht von *C. trachomatis* L2 konnte allerdings auch das reguläre Zellkulturmedium für die entsprechende Zelllinie verwendet werden. Für Experimente in denen eine Zellantwort auf eine Chlamydieninfektion untersucht werden sollte wurde SF-3 ohne Zusätze verwendet, da so definierte Bedingungen vorlagen.

Die Zellen wurden mit den Chlamydien bei 3900xg und 35 °C für 55 min zentrifugiert, anschließend gewaschen, um im Medium verbliebene Chlamydien zu entfernen und mit neuem Medium versorgt. Die weitere Inkubation der infizierten Zellen erfolgte bei Infektion mit *C. trachomatis* bei 37 °C bei *C. pneumoniae* 35 °C im Brutschrank.

Die Infektion von primären Chondrozyten mit *C. trachomatis* L2 erfolgte ebenfalls durch Zentrifugation. Hier wurden die Zellen aber nicht als Monolayer infiziert, sondern die Chondrozyten erst abgelöst, mit den Chlamydien vermischt und so ausgesät, dass sie nach Anheftung an das Kulturgefäß einen Multilayer ergeben mussten. Anschließend erfolgte die Zentrifugation, wobei der nachfolgende Waschschrift sehr vorsichtig durchgeführt wurde, da die Chondrozyten zu diesem Zeitpunkt noch nicht wieder fest an der Unterlage angeheftet waren.

Für *C. trachomatis* L2 konnte für einige Experimente eine direkte Inkubation von Zellen mit Chlamydien gewählt werden, da dieses Serovar wesentlich infektiöser ist als die anderen Serovare mit denen gearbeitet wurde. Bei diesem Verfahren werden die Chlamydien im Zellkulturmedium resuspendiert und für zwei Stunden mit den Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit neuem Medium versorgt. Es können Zellen in beliebigem Kulturgefäß verwendet werden.

### 2.12.2 Überprüfung der Infektion

Eine Aussage über die Infektionsrate bei Chlamydien-infizierten eukaryonten Zellen läßt sich unter dem Lichtmikroskop nur schwer treffen. Einschlüsse mit *C. pneumoniae* sind auch für ein geübtes Auge nur schwer zu erkennen, bei *C. trachomatis* können sie meist nach 24-36 h erkannt werden. Eine bessere und verlässlichere Methode ist das Markieren der Chlamydien mit einem Antikörper, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist.

Hier wurde für die Fluoreszenzfärbung ein FITC (Fluoresceinisothiocynat)-markierter monoklonaler Antikörper gegen MOMP verwendet, wobei es einen Spezies-spezifischen Antikörper für *C. trachomatis* und einen für *C. pneumoniae* gibt. Für die Detektion des FITC wurden entsprechende Filter des Fluoreszenzmikroskops gewählt (Excitation bei 490 nm, Emission bei 520 nm). Der Antikörperlösung ist zusätzlich ein Farbstoff beigelegt, der Zellen rot färbt,

so daß ein starker Kontrast zwischen rot eingefärbten Zellen und grün fluoreszierenden Chlamydien besteht.

Für die Detektion von *C. trachomatis* wurde der ‚MicroTrak *Chlamydia trachomatis* Direct Specimen Test‘ der Behringwerke (Liederbach) verwendet und die Detektion nach Herstellerangaben durchgeführt. Für den Nachweis von *C. pneumoniae* wurde der IMAGEN *Chlamydia pneumoniae* Kit (Dako, Ely, Großbritannien) ebenfalls nach Herstellerangaben verwendet.

Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen auf Glasplättchen ausgesät, so dass sie sich aus den Kulturgefäßen herausnehmen lassen und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden können. Nach entsprechender Inkubationszeit der Zellen mit Chlamydien wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen auf dem Glasplättchen fixiert und das Glasplättchen mit Entellan auf einen Objektträger geklebt. Die Zellen wurden mit der Antikörperlösung (15 µl) inkubiert, gewaschen und die Präparate getrocknet. Anschließend wurden sie mit dem mitgelieferten Eindeckmedium versehen, mit einem Deckgläschen abgedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Die so vorbereiteten Präparate sind für ein bis zwei Tage bei Lagerung im Kühlschrank stabil, die Fluoreszenz läßt aber schnell nach. Daher sollte eine Auswertung der chlamydialen Infektion relativ rasch geschehen.

### **2.12.3 Bestimmung der Anzahl an infektiösen Einheiten (IFU) von Chlamydien**

Um ein Maß für die eingesetzte Menge an Chlamydien zu erhalten, wird die Anzahl an infektiösen Einheiten (*infection forming units*, IFUs) der Chlamydien bestimmt. Dies geschieht über das Auszählen von Einschlusskörpern in Zellen, die mit Chlamydien infiziert wurden.

Dazu wurden Wirtszellen mit einer Verdünnungsreihe einer Chlamydien suspension infiziert. Nach ein bzw. zwei Tagen, je nach Zellart, erfolgte eine Fluoreszenzfärbung der Chlamydien. Nun wurde eine Probe gewählt, bei der nicht alle Zellen mit Chlamydien infiziert waren und die Anzahl an Zellen mit chlamydialen Einschlüssen in einem geschlossenen Zellrasen in einem Sichtfenster des Mikroskops bestimmt. Dieser Vorgang wurde zehnmal wiederholt und schließlich aus dem Mittelwert der gefundenen Einschlüsse, dem Verdünnungsfaktor der Chlamydien suspension und einem Korrekturfaktor für das verwendete Objektiv des Mikroskops eine Chlamydienkonzentration in IFU/ml bestimmt. Bei den Korrekturfaktoren hielten wir uns an die Angaben der Arbeitsgruppe von Professor Straube aus Jena.

Objektiv:	Faktor:
20er	175
40er	677
63er	1682
100er	4355

Formel zur Bestimmung der IFUs:

IFU/ml = Mittelwert der gezählten Einschlüsse  $\times$  Verdünnungsfaktor  $\times$  Objektivfaktor

#### **2.12.4 Abtöten der Chlamydien durch Bestrahlung mit UV-Licht**

Um die passiven Beeinflussungen der Wirtszellen durch Chlamydien zu untersuchen, wie etwa die Zellantwort auf LPS oder Hitzeschockproteine der Chlamydien, müssen die Chlamydien abgetötet werden. Dies muß allerdings so schonend ablaufen, dass die Proteine auf der Oberfläche der Chlamydien nicht denaturiert werden. Daher ist es nicht möglich die Chlamydien suspension stark zu erhitzen. Andere Möglichkeiten zum Abtöten von Bakterien sind die radioaktive Bestrahlung oder die Bestrahlung mit UV-Licht. In unserer Arbeitsgruppe ergaben Experimente mit Chlamydien, dass diese sich nur in geringem Maße durch radioaktive Bestrahlung abtöten lassen. Eine Behandlung mit UV-Licht führte allerdings zu einem vollständigen Abtöten der Bakterien, wie durch Infektionsversuche gezeigt werden konnte.

Bei der Bestrahlung wurden die Chlamydien suspension in einem Eppendorfgefäß auf Eis in den UV-Stratalinker (Stratagen, La Jolla, USA) gestellt und mit einer Energie von 10 J bestrahlt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Chlamydien immer gekühlt blieben. Anschließend wurden die abgetöteten Chlamydien direkt in einen Versuch eingesetzt oder bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.12.5 Aufreinigung von Elementarkörperchen (EK)**

Da Chlamydien obligat intrazellulär wachsen, ist es schwierig eine reine Chlamydien suspension zu erhalten. Dies ist aber für Experimente, wo die Auswirkungen von Chlamydien auf eukaryote Zellen ausgetestet werden sollen, essentiell, denn eine Verunreinigung mit größeren Mengen an Zelltrümmern oder gar lebenden Zellen würde die Antwort der Zellen wahrscheinlich stark beeinflussen. In dieser Arbeit wird zwischen krudem Chlamydienmaterial, Bandenmaterial und hochreinen Chlamydien unterschieden.

### **2.12.5.1 Erzeugung von krudem Chlamydienmaterial**

Bei krudem Chlamydienmaterial handelt es sich um eine Mischung aus Zellen und Chlamydien, die nur von Zellüberständen befreit sind. Hierbei wird ein infizierter Zellrasen, in dem sich hauptsächlich fortgeschrittene Einschlüsse mit EK befinden, vom Boden des Kulturgefäßes abgeschabt, wobei vorher vorsichtig überschüssiges Medium entfernt wurde und in wenig Medium resuspendiert. Dieses Material wird bei 12000 rpm, 4 °C in 1h sedimentiert (Modell J2-21, Rotor JA-20, Beckman Coulter, Unterschleißheim) und in Einfriermedium bei -70 °C gelagert. Solches Material wurde für Vorversuche oder Infektionen zur Stock-Produktion verwendet.

### **2.12.5.2 Aufreinigung von Chlamydien durch Ultrazentrifugation – Produktion eines Chlamydienstocks**

Die anderen beiden Sorten von Chlamydienmaterial, hochreine Chlamydien und Bandenmaterial, entstehen bei der Auftrennung von Chlamydien und Zelltrümmern durch Ultrazentrifugation (UZ) durch ein Urografin-Kissen. Diesem Verfahren liegt zugrunde, dass die verschiedenen Bestandteile eines solchen Chlamydien-Zell-Gemisches während der Zentrifugation unterschiedlich schnell in Urografin sedimentieren. Dadurch wird eine Abtrennung der EK, die relativ schnell sedimentieren und sich am Boden des Röhrchens ansammeln, erreicht. Weiterhin kann eine Bande aus dem Urografin isoliert werden, die ebenfalls Chlamydien enthält, aber nicht ganz frei von Zelltrümmern ist. Dieses Gemisch wird als Bandenmaterial bezeichnet.

Die Ausbeute an hochreinem Chlamydienmaterial liegt in der Regel bei 1 % bis maximal 10 % des Ausgangsmaterial, wobei noch ein Großteil der Chlamydien in Form von Bandenmaterial isoliert und verwendet werden. Bandenmaterial wird ebenfalls für Vorversuche und für eine neue Stock-Produktion verwendet. Die reinen Chlamydien wurden hingegen für die Hauptexperimente eingesetzt.

Für einen Ultrazentrifugationslauf wurde das krude Material aus ca. 110 kleinen Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) oder 10 großen Zellkulturflaschen (182 cm<sup>2</sup>) verwendet. Das Material wurde aufgetaut und in zwei Fraktionen unterteilt, die im Folgenden getrennt behandelt wurden, um das Risiko, das Material durch eine Kontamination zu verlieren, zu verringern. Das Material wurde mit einem gleichen Volumen an Glasperlen (1,7-2,0 mm, Roth, Karlsruhe) in 50 ml Röhrchen versetzt und 15 min bei voller Drehzahl gevortext, um die Zellreste zu zerkleinern und daran haftende Chlamydien abzulösen. Die Chlamydien-Zell-Suspension wurde abgenommen und in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Die Glasperlen wurden noch mal mit

wenig frischem Medium abespült und das Medium zu der Chlamydiensuspension gegeben. Grobe Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation für 15 min bei 500xg abgetrennt. Der Überstand wurde in den UZ-Lauf eingesetzt. Dafür wurden 6 UZ-Röhrchen (Ultra-Clear Centrifuge Tubes, Beckman Coulter, Unterschleißheim) mit 6 ml 35%igem Urografin (Schering, Berlin) gefüllt, dies mit 1 ml 10%igem Urografin vorsichtig überschichtet und anschließend 4 ml krudes Chlamydienmaterial darüber geschichtet, wobei jeweils drei Röhrchen mit Material aus der gleichen Fraktion bestückt wurden. Die Röhrchen wurden vorsichtig in die entsprechenden UZ-Einhänge überführt, austariert und die Chlamydien bei 22500 rpm für 6 h bei 4 °C (Ultrazentrifuge L5 75, Ausschwingrotor SW-40 Ti, Beckman Coulter, Unterschleißheim) zentrifugiert.

Anschließend wurde vorsichtig das Bandenmaterial abgezogen und in zwei Fraktionen gesammelt. Das pelletierte reine Chlamydienmaterial wurde in Einfriermedium resuspendiert, eine Sterilkontrollen auf Kochblut durchgeführt und in Zellkulturmedium angelegt (1 Woche Inkubation bei 37 °C). Das hochreine Material wurde aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Die beiden Fraktionen Bandenmaterial wurden auf 50 ml mit Einfriermedium aufgefüllt und die Chlamydien in 1h bei 4 °C und 12000 rpm (Modell J2-21, Rotor JA-20, Beckman Coulter, Unterschleißheim) erneut sedimentiert. Das Pellet wurde in Einfriermedium resuspendiert, es wurde ebenfalls eine Sterilkontrolle angelegt und das Material aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Das gesamte Material aus einem UZ-Lauf, die beiden Fraktionen reines Material, sowie das Bandenmaterial wird als ein Stock bezeichnet und von allen vier Fraktionen wird die Anzahl der IFUs bestimmt sowie eine Kontrolle auf Kontamination mit Mykoplasmen durchgeführt. Ein wiederholtes Einfrieren von Chlamydienproben wird möglichst vermieden, da dabei Infektiosität verloren geht.

## **2.13 Mathematische/Statistische Verfahren**

### **2.13.1 Fishers Exakter Test**

[55]

Fishers Exakter Test kann verwendet werden um zu bestimmen, inwieweit eine experimentell gefundene Korrelation – hier die Regulation bzw. Nichtregulation eines Gens in jeweils beiden Wiederholungsexperimenten – statistisch signifikant ist.

Dazu werden die tatsächlichen Anzahlen des Auftretens der möglichen Kombinationen pro Versuch - hier: „in beiden Experimenten reguliert“, „in beiden Experimenten nicht reguliert“,

„im ersten, aber nicht im zweiten reguliert“ oder „im zweiten nicht aber im ersten reguliert“ – bestimmt und in einer Vier-Felder-Tafel dargestellt. Bei einem kausalen Zusammenhang sollten nun die Kombinationen mit gleichem Ergebnis in beiden Experimenten häufiger auftreten, als es bei einer rein zufälligen Verteilung zu erwarten ist.

Um dies zu quantifizieren, wird unter der Hypothese, dass die Ergebnisse im ersten und im zweiten Experiment unabhängig sind - die Regulation also rein zufällig auftritt, bestimmt, wie wahrscheinlich die gemessene oder eine noch extremere Verteilung der Kombination wäre.





### 3 Ergebnisse

Der erste Teil dieses Kapitels umfasst die Analyse von Chlamydien-induzierten Genregulation der Wirtszelle bei einer produktiven Infektion. Der zweite und dritte Teil befasst sich mit der Erforschung anderer Wechselwirkungen zwischen Chlamydien und ihren Wirtszellen: dem Versuch der Identifizierung von Faktoren bzw. Mechanismen, die zu Anheftung, Aufnahme und Überleben der Chlamydien in der Wirtszelle notwendig sind sowie der Expression von möglichen chlamydialen Effektorproteinen in eukaryonten Zellen.

#### 3.1 Teil 1:

##### **Breite Analyse der Chlamydien-induzierten Genregulation der Wirtszelle**

In diesem Teil der Arbeit wurde auf breiter Ebene die Veränderung der Genexpression der Wirtszelle nach produktiver Infektion mit Chlamydien untersucht, um die chlamydialen Wirk- und Pathomechanismen auf zellulärer Ebene besser zu verstehen. Es besteht die Hoffnung, daraus Ansatzpunkte zur Therapie durch Chlamydien hervorgerufener Erkrankungen zu finden.

Zu dieser Analyse wurden primär cDNA-Microarrays eingesetzt, mit denen gleichzeitig die Regulation vieler humaner Gene auf mRNA-Ebene bestimmt werden kann. Es kamen dabei, zeitlich getrennt, zwei unterschiedliche Microarray-Systeme zum Einsatz:

Die ersten Untersuchungen erfolgten mit einem Microarray der Firma Clontech/BD, der ca. 1200 Gene umfasst. Damit wurde die Beeinflussung epithelialer Wirtszellen durch *C. trachomatis* zu zwei Zeitpunkten nach Infektion untersucht. Ein Teil der so ermittelten Veränderungen des Wirtszelltranskriptoms in einer produktiven Infektion wurde anschließend mit unabhängigen Methoden verifiziert und näher charakterisiert. So wurde eine Überprüfung in der *Real-Time-RT-PCR* angeschlossen, sowie eine exemplarische Analyse erhaltener Ergebnisse auf Proteinebene im ELISA. Zur Überprüfung der breiteren Gültigkeit der erhaltenen Ergebnisse wurde zusätzlich untersucht, ob sich die gefundenen Regulation nicht nur im verwendeten Wirtszellmodell nachweisen lassen, sondern auch auf Zellen übertragbar sind, die bei einer anderen Erkrankung durch *C. trachomatis*, der reaktiven Arthritis, als Wirtszelle dienen können.

In einem weiteren Block von Experimenten wurde eine deutlich größere Microarray-Studie in Zusammenarbeit mit der Firma GlaxoSmithKline (GSK) durchgeführt, wobei ein Chip der Firma Affymetrix mit ca. 12000 Genen verwendet wurde. Hierbei wurde die Infektionen mit

*C. trachomatis* und *C. pneumoniae* zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Infektion vergleichend untersucht. Eine weitere Analyse einzelner Gene mittels *Real-Time-RT-PCR* schloss sich hier ebenfalls an.

Microarrays liefern in nur wenigen Experimenten eine Vielzahl von Einzelergebnissen – in unserem Fall insgesamt mehr als 250.000 Meßwerte. Leider bietet die heute zur Verfügung stehende Software bisher keine umfangreichen Hilfen zur Auswertung dieser Daten. Da aber ohne eine Gewichtung der erhaltenen Ergebnisse, ohne das Zusammenfassen von Genregulationen in funktionelle Gruppen und besondere Berücksichtigung der jeweiligen Fragestellung keine sinnvolle Bewertung und Interpretation der Array-Ergebnisse stattfinden kann, muss in diesem Bereich ein Großteil der Arbeit bei Microarray-Projekten aufgebracht werden. Dies spiegelt sich auch im Aufbau dieser Dissertation wider.

### **3.1.1 Vorarbeiten für die Analyse des Wirtszell-Transkriptoms**

Diese Dissertation basiert auf einer vorausgegangenen Diplomarbeit am Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, in der die Durchführung von cDNA-Microarrays zur Analyse der Chlamydien-induzierten Genregulation der Wirtszelle vorbereitet wurde (Diplomarbeit S. Heß: „Chlamydieninduzierte phänotypische Änderungen der Wirtszelle“). Ein wichtiger Teil dieser Diplomarbeit war die Bestimmung einer geeigneten Wirtszelllinie für diese Untersuchungen. Diese Zelllinie mußte drei Kriterien erfüllen: Sie sollte erstens produktiv mit Chlamydien infizierbar sein, um so den kompletten Ablauf des Geschehens in der Wirtszelle untersuchen zu können, zweitens sollte die Zelle auf diese Infektion auch mit meßbaren phänotypischen Veränderungen reagieren, da solche Veränderungen später noch genauer charakterisiert werden sollten und drittens sollte diese Zelllinie gut genetisch manipulierbar sein, da angestrebt war, chlamydiale Gene durch transiente Transfektion in die Wirtszelle einzubringen und die phänotypischen Veränderungen der Wirtszelle durch Expression dieser Gene zu untersuchen, um so mögliche chlamydiale Effektorproteine zu ermitteln.

Die damaligen Untersuchungen wurden mit *C. trachomatis* vorgenommen, wobei das besonders infektiöse und somit gut zu handhabende Serovar L2 verwendet wurde, das zu diesem Zeitpunkt zu den am besten charakterisierten Serovaren gehörte. Auch war ein Teil seiner genomischen Sequenz schon bekannt. Als optimale Wirtszelle wurde die epitheliale Cervixcarcinoma Zelllinie HeLa 229 bestimmt. Diese Zelllinie ließ sich gut mit *C. trachomatis* L2 produktiv infizieren, zeigte eine Chlamydien-induzierte Zunahme der Sekretion der Zytokine

IL-6 und IL-8 sowie eine zeitweilige Resistenz gegen induzierte Apoptose und konnte mit einer Effizienz von bis zu 30 % relativ gut transient transfiziert und damit genetisch manipuliert werden.

Für die hier vorgestellten Experimente konnte allerdings nur teilweise auf diese Vorarbeiten zurückgegriffen werden. So wurde nach Abschluß der Diplomarbeit ein neuer Subklon der verwendeten HeLa-Zelllinie verfügbar, der noch besser transfizierbar sein sollte als der bisherige. Auch sollte nun neben *C. trachomatis* auch mit *C. pneumoniae* gearbeitet werden, welche in der Diplomarbeit noch nicht verwendet wurde. Für die Untersuchungen mit *C. pneumoniae* stand ein vollständig sequenzierter und annotierter Stamm zur Verfügung: *C. pneumoniae* CWL 029. Außerdem sollte auch mit dem *C. trachomatis* D/UW-3/Cx gearbeitet werden. Für den geplanten Wechsel sowohl der Wirtszelle als auch der Chlamydienstämme wurde es notwendig, die transiente Transfizierbarkeit der Zellen neu zu vergleichen und außerdem zu prüfen, wie gut sich die Zellen mit den neu gewählten Chlamydienstämmen infizieren lassen und ob vorher gemessene phänotypische Veränderungen der Wirtszellen auch an diesem HeLa-Subklon nachweisbar sind.

Es sei hier ausdrücklich vermerkt, dass bei allen in dieser Arbeit verwendeten Zellen und Chlamydienstämmen durch eine PCR mit anschließender Hybridisierung (siehe 2.10.10 ) sichergestellt wurde, dass keine Kontamination mit Mykoplasmen vorlag. Dabei lag die Nachweisgrenze bei diesem Verfahren bei 10 Mykoplasmen im Ansatz.

### **3.1.1.1 Vergleich der transienten Transfizierbarkeit verschiedener Zelllinien**

Es wurde die neue Zelllinie HeLa T mit zwei Subklone der bisher verwendeten Zelllinie HeLa 229 verglichen, wobei der eine Subklon direkt von ATCC bezogen wurde und der andere uns von H. Holtmann (Institut für Molekularpharmakologie, MHH) zur Verfügung gestellt wurde. Als Positivkontrolle wurde eine weitere Zelllinie eingesetzt, die bekanntermaßen ausgesprochen gut transient transfizierbar ist. Diese Zelllinie, die humane embryonale Fibroblastenlinie HEK<sup>293</sup>, konnte nur für die transiente Transfektion als Kontrolle dienen, da eine produktive Chlamydieninfektion bei diesen Zellen nicht möglich ist, wie frühere Experimente ergeben hatten.

Die Bestimmung der Effizienz der transienten Transfektion erfolgte über eine Transfektion mit dem Vektor pCDNA3.1-HislacZ für  $\beta$ -Galaktosidase und anschließendem x-Gal-Assay (siehe 2.11.10 ). Dabei entspricht die Effizienz der transienten Transfektion dem Prozentsatz  $\beta$ -Galaktosidase-positiver, also im Assay blaugefärbter, Zellen.

Bei dem Vergleich konnte die Effizienz der Transfektion bei der Zelllinie HeLa 229, die in der vorangegangenen Diplomarbeit erreicht wurde, nicht reproduziert werden; die Effizienz lag bei ca. 10 %.

Die neue Zelllinie HeLa T hingegen ließ sich, wie erwartet, sehr gut transfizieren und erreichte bei einer transienten Transfektion mit Lipofectamin sogar eine Effizienz von bis zu 90 %, wie in zwei unabhängigen Experimenten gezeigt werden konnte.

Zelllinie/Methode	Ca <sup>2+</sup>	Lipofectamin	Effectene
HEK 293 <sup>+</sup>	40 %	60 – 80 %	20 %
HeLa 229 (ATCC)	5 %	< 1 %	< 1 %
HeLa 229 (Holtmann)	10 %	10 %	5 %
HeLa T	30 – 50 %	90 %	5 %

**Tabelle 9: Effizienzen der transienten Transfektion durch verschiedene Methoden bei unterschiedlichen Zelllinien. Die Prozentangaben basieren auf visuellen Abschätzungen unter dem Lichtmikroskop und ließen sich in einem Wiederholungsexperiment bestätigen.**

### 3.1.1.2 Überprüfung der Infizierbarkeit von HeLa T mit *C. trachomatis* Serovar L2 und D und *C. pneumoniae*

Infektionsexperimente mit *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* ergaben, dass sich die Chlamydienart in der Zelllinie HeLa T gut kultivieren lassen. Ein Unterschied zur Kultivierbarkeit in Hep-2-Zellen, die häufig als Modell-Zelllinie für die Anzucht von Chlamydien verwendet werden, konnte nicht festgestellt werden.

### 3.1.1.3 Orientierende Messung phänotypischer Veränderungen der Wirtszelle nach Infektion mit *C. pneumoniae* und *C. trachomatis*

Von den Zytokinen IL-6 und IL-8 ist bekannt, dass ihre Expression vor allem transkriptionell gesteuert ist. In der vorangegangenen Arbeit konnte bei HeLa 229-Zellen ein Anstieg der Sekretion von IL-6 und IL-8 nach Infektion mit *C. trachomatis* L2 gezeigt werden. Hierbei war der stärkste Unterschied in der Sekretion der Zytokine zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen zwischen 24 und 40 Stunden nach Infektion messbar und lag bei IL-6 bei Faktor 26, bei IL-8 bei Faktor 28. Hier sollte überprüft werden, ob ein ähnlicher Anstieg in der Interleukin-Sekretion bei dem neuen HeLa-Subklon nach Infektion mit *C. trachomatis* L2 und der neuen Spezies *C. pneumoniae* erreicht werden konnte.

Dazu wurden HeLa T-Zellen mit *C. trachomatis* L2 oder *C. pneumoniae* infiziert, resultierend in über 90 % Infektionseffizienz. Anschließend wurde über einen ELISA die Konzentration der Zytokine im Zellkulturüberstand bestimmt.

Bei der Infektion der Zellen mit *C. trachomatis* L2 konnten die Ergebnisse aus den Experimenten mit dem anderen Subklon von HeLa-Zellen reproduziert werden. So konnte ein Anstieg von Interleukin 6 um das 27fache 20 bis 28 Stunden nach Infektion gemessen werden. Bei IL-8 konnte ein bis zu 20facher Anstieg der Sekretion im Zeitraum von 20 bis 44 Stunden nach Infektion ermittelt werden.

Für die Infektion mit *C. pneumoniae* lagen bisher keine Daten vor. Hier konnte ein Anstieg der Zytokin-Sekretion von ungefähr Faktor 5 sowohl für IL-6 also auch für IL-8 gemessen werden. Bei IL-6 war der Anstieg der Sekretion bei infizierten gegenüber nicht infizierten Zellen schon nach 20 Stunden zu messen und hielt bis zum Versuchsende nach 44 Stunden an, IL-8 war erst nach 40 bis 44 Stunden nachzuweisen.

HeLa T-Zellen erfüllen die Kriterien Infizierbarkeit durch *C. trachomatis* wie *C. pneumoniae*, genetische Manipulierbarkeit sowie deutlich induzierte Zellantworten sehr gut und wurden daher in den nachfolgenden Array-Experimenten verwendet.

### **3.1.2 Untersuchung der *C. trachomatis*-induzierten Wirtszell-Genexpression mittels Clontech Atlas Arrays und weiterführender Methoden**

Ein vollständiger Infektionszyklus von *C. trachomatis* dauert ca. 48 Stunden. Die Analyse der Genexpression mittels Microarray stellt jeweils nur eine Momentaufnahme der Genexpression zu einem bestimmten Zeitpunkt dar.

Nach in der Literatur beschriebenen phänotypischen Veränderungen bzw. veränderten Genexpressionen nach chlamydialer Infektion (siehe 1.4) und den hier durchgeführten Vorversuchen mit IL-6 und IL-8 wurden für die Analyse mittels cDNA-Microarrays die Zeitpunkte 12 und 24 Stunden nach Infektion gewählt. Zu diesen Zeitpunkten sollten eine Reihe von Chlamydien-induzierten Veränderungen der Genexpression der Wirtszelle aufzeigbar sein.

Ursprünglich war vorgesehen, diese Experimente mit dem gut charakterisierten *C. trachomatis* Serovar D durchzuführen. Nach Abschluß der Array-Experimente und deren Überprüfung mittels *Real-Time-RT-PCR* wurden zwei neue molekularbiologische Methode zur Unterscheidung einzelner *C. trachomatis* Biovare/Serovare in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Dissertation von K. Endlich entwickelt (siehe 2.10.11 ). Dabei stellte sich heraus, dass der verwendete Chlamydienstamm dem ebenfalls gut charakterisierte *C. trachomatis* Serovar L2 entsprach, so dass dieses auch weiterhin verwendet wurden.

### 3.1.2.1 Analyse der Genexpression durch Atlas Arrays

HeLa T-Zellen wurden mit hoch aufgereinigten EK des *C. trachomatis* Serovars L2 infiziert (MOI 5.7). Unter diesen Bedingungen wurde eine relativ vollständige Infektion (> 90 %) erreicht. Die Zellen wurden, ebenso wie analog behandelte, schein-infizierte Zellen, 12 bzw. 24 Stunden nach der Infektion lysiert und die RNA isoliert. Die RNA wurde in <sup>32</sup>P-markierte cDNA umgeschrieben und jeweils mit einer Atlas-Array Membran (human 1.2) der Firma Clontech hybridisiert. Die Membranen wurden ein bis zwei Wochen auf Phosphoimaging-Platten exponiert, die Platten mit einem Phosphoimager ausgelesen und die so erhaltenen digitalisierten Daten computergestützt normalisiert und verglichen.

Als Maß für die Regulation wurde das Verhältnis der Genexpression (hier die Stärke des Hybridisierungssignals auf der Microarray-Membran) von infizierten Zellen zu schein-infizierten Zellen bei positiver Regulation, das heißt bei stärkerer Expression des Gens in infizierten Zellen, bzw. dessen negativer Kehrwert bei negativer Regulation, also bei schwächerer Expression nach Infektion verwendet. Dieses Maß wird im weiteren auch als Faktor der Regulation bezeichnet.

#### 3.1.2.1.1 Atlas Array *C. trachomatis*/HeLa T 12h p.i.

In unserem ersten Experiment, 12 Stunden nach Infektion, konnten geringe Veränderungen in der Genexpression der infizierten im Vergleich zu schein-infizierten Zellen ermittelt werden. Bei einem Faktor von mindestens 1,5 für eine vorliegende Regulation konnten 15 Gene ermittelt werden, die positive oder negative Regulation aufzeigten (siehe Tabelle 10). Die stärkste Regulation war bei dem Transkriptionsfaktor NFYC mit einem Anstieg der Expression bei infizierten Zellen um den Faktor 5,2 zu beobachten. Die stärkste negative Regulation wurde bei dem Adhäsionsmolekül LFA-1 mit -3,3 gefunden.

Gen	GenBank Accession	12h p.i.
<i>[Transkriptionsfaktoren]</i>		
E2F1 retinoblastoma-binding protein 3	M96577	2,7
EGR1 <sup>at,c</sup> early growth response protein 1	X52541; M62829	1,6
<b>NFYC</b> CCAAT transcription binding factor $\gamma$ subunit	Z74792	<b>5,2</b>
TFDP1 <sup>at</sup> E2F dimerization partner 1	L23959	1,5
<i>[Zytokine]</i>		
LIF <sup>c</sup> leukemia inhibitory factor	X13967; M63420	1,6

Gen	GenBank Accession	12h p.i.
<i>[Proteine der intrazellulären Signaltransduktion]</i>		
AXL <sup>at</sup> tyrosine-protein kinase receptor UFO precursor	M76125	-1,9
NRAS <sup>at</sup> Ras-family member N-ras	X02751	-1,6
PRKAR1B PKA, type I, $\alpha$ , regulatory subunit	M65066	1,6
<i>[Proteine der Zellzyklus-Regulation]</i>		
CCNK cyclin K	AF060515	1,7
CDC20 <sup>a</sup> cell division cycle 20	U05340	1,6
CDK4 cyclin-dependent kinase 4	M14505	-1,7
<i>[Adhäsionsmoleküle]</i>		
<b>LFA-1</b> leukocyte adhesion glycoprotein	M15395	<b>-3,3</b>
<i>[Proteine mit unterschiedlichen Funktionen]</i>		
NOL1 <sup>ap</sup> proliferating cell nucleolar antigen P120	X55504	-1,6
PDE3B cGMP-inhibited 3',5'-cyclic phosphodiesterase B	U38178	-1,6
PTMS <sup>ap</sup> parathyrosin	M24398	-2,2

**Tabelle 10:** Ergebnisse eines cDNA-Array Experiments von HeLa-Zellen zwölf Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis* L2 bei Verwendung von human 1.2 Atlas-Arrays der Firma Clontech/BD. Der angegebene Regulationsfaktor ist das Verhältnis der Genexpression infizierter gegenüber schein-infizierter Zellen bei hochregulierten, und der negative Kehrwert dieses Verhältnisses bei runterregulierten Genen, wobei hier alle Gene mit einem Faktor größer 1,5 (bzw. kleiner -1,5) aufgeführt sind. Die Gene sind in funktionelle Gruppen unterteilt. In der ersten Spalte steht der Genname und dessen Abkürzung, in der zweiten Spalte die GenBank-Accession-Nummer; zusätzliche Informationen zu den Genen finden sich im Anhang. Hervorgehoben sind Gene mit einer Regulation größer Faktor drei, (ap) steht dabei für eine Regulation des selben Gens beim Vergleich von *C. pneumoniae*-infizierten mit schein-infizierten HeLa-Zellen durch später durchgeführte Microarrays der Firma Affymetrix, (at) bei einer Regulation durch *C. trachomatis* und (a) markiert Gene, deren Regulation sowohl durch *C. trachomatis* als auch durch *C. pneumoniae* verändert wird.

Da dieses Experiment nur eine geringe Anzahl an regulierten Genen ergab, wurde auf eine Wiederholung verzichtet und statt dessen direkt ein Microarray für den Zeitpunkt 24 Stunden nach Infektion durchgeführt.

### 3.1.2.1.2 Atlas Array *C. trachomatis*/HeLa T 24h p.i.

Die Analyse der Veränderung der Genexpression bei HeLa-Zellen 24 Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis* ergab, wie erhofft, eine größere Anzahl regulierter Gene und auch stärkere Unterschiede der Genexpression von infizierten Zellen gegenüber schein-infizierten Zellen. Dieses Experiment wurde daher noch einmal (mit gestrippten Membranen) wiederholt. Bei dem Vergleich der beiden unabhängigen Experimente waren 18 Gene von 1176 auf dem Array enthaltenen in beiden Experimenten mehr als Faktor 3 hochreguliert. Eine Verminderung der Genexpression um den Faktor 3 oder mehr konnte bei keinem Gen ermittelt werden. 59 Gene waren reproduzierbar um einen Faktor  $\pm 1,5$  oder mehr reguliert, wobei 25 davon nach chlamydialer Infektion eine verminderte Expression zeigten.

Die Gene mit einem Faktor der Regulation größer 1,5 bzw. kleiner  $-1,5$  wurden in funktionelle Gruppen unterteilt, die sich hier an den in Kapitel 3.1.2.4.1.2 gebildeten Gruppen orientieren und sind in den folgenden acht Tabellen mit den entsprechenden Regulationsfaktoren aufgelistet.

#### Transkriptionsfaktoren:

Es konnten 24 Stunden nach *C. trachomatis*-Infektion von HeLa T-Zellen 11 Transkriptionsfaktoren ermittelt werden, deren Regulation sich gegenüber schein-infizierten Zellen geändert hat (siehe Tabelle 11). Es werden fast genauso viele Transkriptionsfaktoren vermindert (4) wie vermehrt (7) exprimiert, wobei aber die Faktoren der Regulation bei den hochregulierten Genen wesentlich größer sind.

Gen	GenBank-Accession	24h p.i. Exp. 1	24h p.i. Exp. 2
COP5S jun activation domain binding protein	U65928	-1,5	-1,8
ERG1 ets-related gene transforming protein	M21535	-1,6	-1,8
TAF5L PCAF-associated factor 65 $\beta$	AF06973	-1,8	-2,0
ZFX <sup>a</sup> zinc finger protein, X-linked	X59738	-1,7	-2,8
KLF5 <sup>a</sup> Kruppel-like factor 5	D14520	1,7	1,6
CREB cAMP-response element binding protein	M34356	1,6	1,6
<b>EGR1<sup>at,c</sup></b> early growth response protein 1	X52541; M62829	<b>27,9</b>	<b>33,0</b>
<b>ETR101<sup>a</sup></b> immediate early protein	M62831	<b>3,4</b>	<b>3,8</b>
<b>FRA1<sup>at</sup></b> fos-related antigen 1	X16707	<b>9,2</b>	<b>6,5</b>
<b>JUN<sup>at</sup></b>	J04111	<b>8,3</b>	<b>13,6</b>



Gen	GenBank-Accession	24h p.i. Exp. 1	24h p.i. Exp. 2
c-JUN proto-oncogene			
<b>ZFP36<sup>at</sup></b> zinc finger protein 36	M92843	<b>21,8</b>	<b>11,3</b>

Tabelle 11: Dargestellt sind die Transkriptionsfaktoren und die Faktoren ihrer Regulation beim Vergleich mittels cDNA-Array (Atlas human 1.2 Array, Clontech/BD) infizierter HeLa-Zellen gegenüber nicht infizierte Zellen 24 Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis* L2 in zwei unabhängigen Experimenten (Exp.1 und Exp.2). In der ersten Spalte steht der Gennamen und die Abkürzung des Gens, in der zweiten Spalte die GenBank-Accession-Nummer; weitere Informationen zu den Genen finden sich im Anhang . Spalte 4 und 5 geben die Faktoren der Regulation in den beiden Experimenten an. Zuerst werden Gene aufgeführt, die nach Infektion vermindert exprimiert werden, dann folgen vermehrt exprimierte Gene. Hervorgehoben sind Gene mit einer Regulation größer Faktor drei. (ap) steht für eine Regulation des selben Gens beim Vergleich von *C. pneumoniae*-infizierten mit schein-infizierten HeLa-Zellen durch später durchgeführte Microarrays der Firma Affymetrix, (at) bei einer Regulation durch *C. trachomatis* und (a) markiert Gene, deren Regulation sowohl durch *C. trachomatis* als auch durch *C. pneumoniae* verändert wird.

### Zytokine, Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren und assoziierte Proteine:

Es konnten in dieser Gruppe 7 Gene ermittelt werden, die 24 Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis* bei HeLa-Zellen reguliert waren (siehe Tabelle 12). In dieser Gengruppe konnten auch die stärksten reproduzierbaren Regulationsfaktoren in diesem Array-Experiment überhaupt ermittelt werden, mit Faktor 60 bzw. 90 bei Interleukin 8.

Gen	GenBank-Accession	24h p.i. Exp. 1	24h p.i. Exp. 2
TGFB2 transforming growth factor, $\beta$ 2	M19154; M22045; M22046; Y00083	-1,5	-1,7
CXCR4 <sup>a</sup> chemokine (C-X-C) receptor 4	D10924	2,1	3,5
<b>IL-11<sup>a</sup></b> interleukin-11	M57765	<b>29,1</b>	<b>33,7</b>
<b>IL-8<sup>a</sup></b> interleukin 8	Y00787	<b>60,7</b>	<b>90,3</b>
<b>IGFBP3<sup>a</sup></b> insulin like growth factor binding protein 3	M31159; M35878	<b>5,2</b>	<b>2,0</b>
<b>LIF<sup>c</sup></b> leukemia inhibitory factor	X13967; M63420	<b>18,6</b>	<b>4,4</b>
<b>MIP-2<math>\alpha</math><sup>a</sup></b> macrophage inflammatory protein 2 $\alpha$	X53799	<b>18,8</b>	<b>5,7</b>
<b>VEGF<sup>a</sup></b> vascular endothelial growth factor	M32977	<b>7,6</b>	2,3

Tabelle 12: *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, ihren Rezeptoren und assoziierten Proteinen, ermittelt durch Atlas Arrays (Clontech). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 11.

### Zellzyklusregulation:

Es konnte nur ein Protein der Zellzyklus-Kontrolle ermittelt werden, dass nach chlamydialer Infektion bei HeLa-Zellen verändert (vermindert) exprimiert wurde: CDC2L5 (siehe Tabelle 13).

Gen	GenBank-Accession	24h p.i. Exp. 1	24h p.i. Exp. 2
CDC2L5 CDC2-related protein kinase CHED	M80629	-1,6	-2,5

**Tabelle 13:** *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen der Zellzykluskontrolle, ermittelt durch Atlas Arrays (Clontech). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 11.

### Intrazelluläre Signaltransduktion:

Es konnte für 11 Proteine der intrazellulären Signaltransduktion nachgewiesen werden, dass sie 24 Stunden nach der Infektion durch *C. trachomatis* verändert exprimiert wurden (siehe Tabelle 14). Wobei drei der Proteine vermindert, der Rest vermehrt exprimiert wird.

Gen	GenBank-Accession	24h p.i. Exp. 1	24h p.i. Exp. 2
LCK proto-oncogene tyrosine-protein kinase lck	U07236	-1,7	-1,8
TOB1 <sup>a</sup> transducer of ERBB2, 1	D38305	-1,9	-2,4
TSC2 tuberin	X75621	-1,7	-1,8
AHRB transforming protein rhoB	X06820	1,7	1,6
GADD45A <sup>at</sup> growth arrest and DNA-damage-inducible 45, $\alpha$	M60974	1,7	2,7
<b>GEM<sup>a</sup></b> ras-like protein KIR	U10550	<b>3,7</b>	<b>4,7</b>
HINT1 protein kinase C inhibitor 1	U51004	1,8	1,6
LIMK-1 LIM domain kinase 1	D26309	1,6	1,8
<b>LNK<sup>a</sup></b> lymphocyte adaptor protein	AF055581	<b>3,8</b>	<b>4,0</b>
SFN <sup>a</sup> stratifin; 14-3-3 protein sigma	AF02908	2,7	1,6
<b>SGK<sup>a</sup></b> serum/glucocorticoid-regulated protein kinase	AJ00051	2,5	<b>3,4</b>

**Tabelle 14:** *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen der intrazellulären Signaltransduktion, ermittelt durch Atlas Arrays (Clontech). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 11.

### Adhäsionsmoleküle:

Bei HeLa-Zellen konnten 4 Adhäsionsmoleküle aufgezeigt werden, deren Expression nach *C. trachomatis*-Infektion hochreguliert wurde (siehe Tabelle 15). Es konnten keine Adhäsionsmoleküle mit verminderter Expression nachgewiesen werden.

Gen	GenBank Accession	24h p.i. Exp. 1	24h p.i. Exp. 2
CDH3 cadherin 3, placental	X63629	11,7	7,1
<b>ICAM1</b> intercellular adhesion molecule-1	J03132	<b>5,0</b>	<b>4,4</b>
ITGA5 integrin $\alpha$ 5	X06256	2,0	2,6
<b>SQM1</b> NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit	M33374	<b>3,9</b>	<b>4,2</b>

**Tabelle 15:** *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen der Adäsionsmolekülen, ermittelt durch Atlas Arrays (Clontech). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 11

### Pro- und anti-apoptotische Gene:

Es konnten 5 Proteine mit pro- oder anti-apoptotischer Wirkung ermittelt werden, die 24 Stunden nach *C. trachomatis*-Infektion bei HeLa-Zellen verändert exprimiert wurden (siehe Tabelle 16). Hierbei wurden vier von fünf Genen hochreguliert.

Gen	GenBank Accession	24h p.i. Exp. 1	24h p.i. Exp. 2
CASP10 caspase-10	U60519	-1,6	-1,6
<b>CASP4<sup>a</sup></b> caspase 4	U28014	<b>5,6</b>	2,1
<b>EPHA2<sup>a</sup></b> ephrin type-A receptor 2	M59371 M36395	<b>8,3</b>	<b>15,7</b>
<b>IER3<sup>a</sup></b> immediate early response 3	AF039067; AF071596	<b>9,3</b>	<b>5,8</b>
<b>MCL1<sup>a</sup></b> myeloid cell leukemia sequence 1	L08246	<b>3,6</b>	<b>6,1</b>

**Tabelle 16:** *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von pro- oder anti-apoptotischen Proteinen, ermittelt durch Atlas Arrays (Clontech). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 11

### Proteine mit bekanntem Bezug zu Arthritis:

Das CD-44 Antigen war das einzige Gen mit bekanntem Bezug zu Arthritis, das 24 Stunden nach *C. trachomatis*-Infektion verändert exprimiert wurde (siehe Tabelle 17). CD44 wird vermehrt bei reaktiver Arthritis auf Makrophagen nachgewiesen [56].

Gen	GenBank Accession	24h p.i. Exp. 1	24h p.i. Exp. 2
CD44 <sup>a</sup> CD44 antigen	M59040	2,1	1,7

**Tabelle 17:** *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen mit bekanntem Bezug zu Arthritis, ermittelt durch Atlas Arrays (Clontech). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 11

### Gene mit unterschiedlichen Funktionen:

Von den 59 Genen, die in diesem Experiment eine Regulation größer 1,5 zeigten, konnten 18 nicht in eine der vorangegangenen Gruppen eingeteilt werden. Diese Gene sind in Tabelle 18 aufgeführt. Ein Großteil dieser Gene (15) wird nach chlamydialer Infektion vermindert ex-

primiert, wobei die meisten Faktoren sehr gering sind (ausgenommen die einmalige sehr starke Regulation bei Glutaredoxin).

Gen-Abkürzung	GenBank Accession	24h p.i. Exp. 1	24h p.i. Exp. 2
APP protease nexin-II	Y00264	-2,0	-1,6
CYP11A mitochondrial cytochrome P450 XIA1	M14565	-2,5	-2,0
GSTA1 glutathione S-transferase A1	M25627	-2,6	-1,7
GSTM1 glutathione S-transferase mu1	X68676	-1,8	-1,7
HSPCA <sup>ap</sup> heat shock 90kD protein 1, $\alpha$	X07270	-1,6	-2,6
HSPF1 <sup>a</sup> heat shock 40kD protein 1	D49547	-1,5	-1,6
ID2 DNA-binding protein inhibitor Id-2	M97796	-1,7	-1,8
<b>LIG1</b> DNA ligase I	M36067	<b>-3,1</b>	-1,5
PLCG1 phospholipase C $\gamma$ 1	M34667	-1,9	-1,9
<b>POLE2</b> DNA polymerase $\epsilon$ subunit B	AF02584	-2,6	<b>-5,9</b>
PPM1A protein phosphatase 2C $\alpha$ isoform	S87759	-1,9	-2,2
PURA purine-rich single-stranded DNA-binding protein $\alpha$	M96684	-1,6	-2,0
ROBO1 roundabout 1	AF04099	-1,5	-1,9
SLC1A4 <sup>at</sup> neutral amino acid transporter A	L14595	-1,6	-1,5
SNAP25 synaptosomal-associated protein 25	L19761	-1,7	-2,0
<b>DBP</b> <b>DNA-binding protein</b>	D28468	1,7	2,0
<b>GLRX<sup>a</sup></b> <b>glutaredoxin</b>	X76648	<b>112,0</b>	<b>3,9</b>
GLUT1 erythrocyte glucose transporter 1	K03195	1,7	2,0

**Tabelle 18:** *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen unterschiedlicher Funktion, die in keine der anderen Gruppen eingeteilt werden konnten, ermittelt durch Atlas Arrays (Clontech). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 11

In einer späteren Publikation konzentrierten wir uns auf Gene, die reproduzierbar  $\geq$  Faktor 3 reguliert waren. Diese konservative Herangehensweise wurde gewählt, um die Wahrscheinlichkeit „echter“ Regulationsereignisse zu erhöhen und falsch positive Ergebnisse klein zu halten.

### 3.1.2.1.2.1 Statistische Bewertung

Für eine statistische Bewertung der Ergebnisse der 24 Stunden-Arrays, bei der freundlicherweise Dr. H. Herrmann aus der Bioinformatik-Abteilung der MHH half, wurde Fishers Exakter Test (siehe 2.13.1) angewandt.

Die zugehörige Vier-Felder Tafel des Tests sieht wie folgt aus:

Anzahl der Gene	Experiment 1 Faktor der Regulation < 3	Experiment 1 Faktor der Regulation ≥ 3
Experiment 2 Faktor der Regulation < 3	369	23
Experiment 2 Faktor der Regulation ≥ 3	7	18

**Tabelle 19: Vier-Felder-Tafel zur statistischen Bewertung der Ergebnisse der Arrays 24 Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis* mittels Fishers Exaktem Test. Dargestellt ist die Anzahl der Gene in den beiden Array-Experimenten, aufgeschlüsselt nach dem Faktor der Regulation in beiden Experimenten. (419 Gene waren in beiden Experimenten auswertbar, das heißt beim Vergleich der zusammen gehörenden Membranen konnte auf mindestens einer von zwei Membranen ein Signal gemessen werden und somit bestimmt werden, ob eine Regulation vorliegt.)**

Der Test ergab eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,00005$ , dass die gefundenen, reproduzierten Regulationen, die größer einem Faktor von drei waren, nur auf statistische Streuung zurückzuführen sind.

Für die Bewertung wurden dazu nur (die 419 von 1176) Gene herangezogen, bei denen eine Berechnung der Regulation in beiden Experimenten möglich war, also mindestens auf einer der beiden Membranen bei einem Vergleich infizierter versus nicht-infizierter Zellen ein Signal für das Gen ermittelt werden konnte.

### 3.1.2.2 Überprüfung der Ergebnisse der Microarrays durch unabhängige Verfahren

Um eine Bestätigung der Chlamydien-induzierten Genexpression in HeLa-Zellen zu erhalten, die durch die Versuche mit den Microarrays gewonnen wurden und die Regulationen näher zu untersuchen, wurde ein Teil der Genregulation durch unabhängige Methoden verifiziert. Hierzu wurde einerseits die semiquantitative *Real-Time*-RT-PCR (mit SYBR-green) verwendet, um die Ergebnisse auf mRNA-Ebene zu überprüfen und andererseits für einige regulierte Gene eine Analyse auf Proteinebene mittels ELISA gewählt. Bei diesen Untersuchungen wurden zusätzliche Analyse-Zeitpunkte hinzugenommen, um ein vollständigeres Bild der Regulationsvorgänge zu erhalten. Als weitere Vergleichsgruppe wurden Zellen mit UV-inaktivierten Chlamydien behandelt. Diese Chlamydien sind durch UV-Licht-Einwirkung abgetötet, aber in ihren Oberflächenstrukturen nicht verändert. So sollte überprüft werden, ob die

Genregulationen aktiv durch lebende Chlamydien oder aber auch passiv durch Oberflächenstrukturen der Bakterien, wie beispielsweise LPS, hervorgerufen werden.

### 3.1.2.2.1 Überprüfung der Ergebnisse mittels semiquantitativer Real-Time-RT-PCR

#### 3.1.2.2.1.1 Auswahl der Gene

Es wurden für diese Experimente Gene ausgewählt, deren Funktion bekannt ist und die evtl. auch in Zusammenhang mit Chlamydien und der durch sie hervorgerufenen Erkrankungen gebracht werden können. Zusätzlich fanden Gene mit einer besonders starken Veränderung der Expression nach chlamydialer Infektion Berücksichtigung. Insgesamt wurden 10 Gene zur Überprüfung durch eine *Real-Time*-RT-PCR ausgewählt. Für zwei der Gene (Mip-2 $\alpha$  und Caspase 8) waren schon *Real-Time*-PCRs in der Arbeitsgruppe von J. Buer an der GBF in Braunschweig etabliert. Mit dem pro-apoptotischen Gen Caspase 8 wurde auch ein Gen betrachtet, bei dem laut Array keine Regulation vorlag, um auch einen solchen Fall exemplarisch zu verifizieren.

#### 3.1.2.2.1.2 Überprüfung der Primer für die Real-Time-RT-PCR

Für einen Großteil der zu untersuchenden Gene mußten Primerpaare entworfen und ausgetestet werden. Die Kriterien für die Entwicklung der Primer sind unter 2.10.17.1 angegeben. An dieser Stelle wird nur exemplarisch für ein Gen, das anti-apoptotische Protein MCL1, das Verfahren zur Überprüfung der Primer für die Verwendbarkeit in der *Real-Time*-RT-PCR dargestellt.

Zuerst wurde ausgetestet, ob die Primer bei der gewünschten Annealing-Temperatur in einer herkömmlichen PCR ein Amplifikat entsprechender Länge ergaben. Nach diesem Test wurde eine Primermatrix erstellt, um die bestmögliche Kombination der Primerkonzentrationen im Ansatz zu ermitteln. In Tabelle 20 ist das Ergebnis der Primermatrix dargestellt. Hier hat sich eine Primerkonzentration von 900 pmol/ml im Endansatz von beiden Primern als die günstigste mit dem größten Signal-Rauschabstand ( $\geq 40$  versus 27 Zyklen) erwiesen. Zusätzlich wurden die einzelnen Proben im Agarosegel daraufhin überprüft, ob sich außer dem gewünschten Amplifikat noch weitere gebildet haben. Dies ist in der Regel eine unerwünschte Amplifikation der Primer selbst. Als Qualitätskontrolle dienten weiterhin die Dissoziationskurven der PCR-Läufe, die vom TaqMan<sup>®</sup>-Gerät aufgenommen wurden. Aus diesen Dissoziationskurven läßt sich ebenfalls auf das Vorhandensein von unerwünschten, zusätzlichen Amplifikaten schließen.

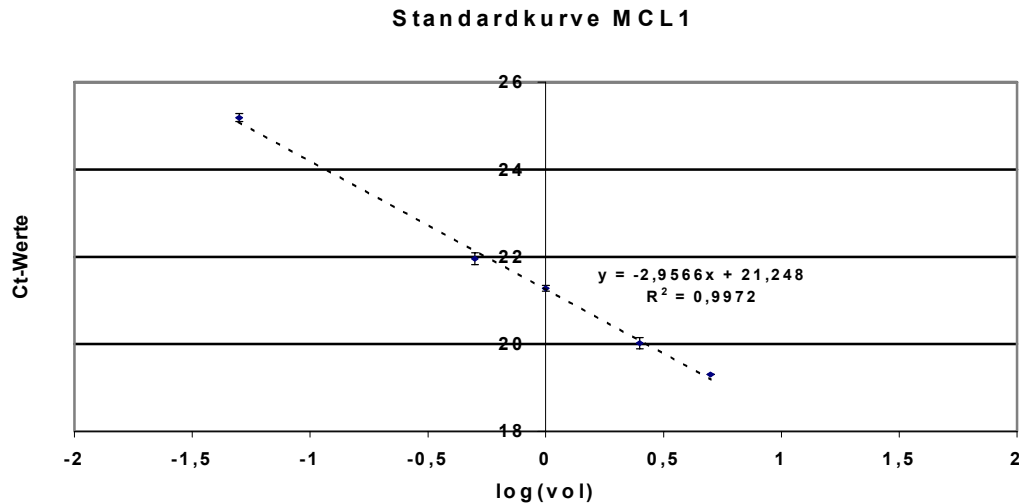
Für die verwendeten Primer für MCL1 wurden keine anderen Amplifikate als das gewünschte 109 bp Amplifikat aus der cDNA gefunden (Daten nicht gezeigt).

Primerverhältnis	C <sub>T</sub> -Werte	Mittelwert	Standard-abweichung	C <sub>T</sub> -Primer K - C <sub>T</sub> -Primer
MCL1hs 50-50K	40 40	40,00	0,00	2,4
MCL1hs 50-50	38,08 37,07	37,58	0,71	
MCL1hs 50-300 K	40 40	40,00	0,00	8,6
MCL1hs 50-300	32,63 30,09	31,36	1,80	
MCL1hs 50-900 K	40 40	40,00	0,00	9,3
MCL1hs 50-900	30,09 31,38	30,74	0,91	
MCL1hs 300-50 K	40 40	40,00	0,00	4,8
MCL1hs 300-50	35 35,36	35,18	0,25	
MCL1hs 300-300 K	40 40	40,00	0,00	10,5
MCL1hs 300-300	29,3 29,65	29,48	0,25	
MCL1hs 300-900 K	39,05 40	39,53	0,67	12,1
MCL1hs 300-900	27,29 27,55	27,42	0,18	
MCL1hs 900-50 K	40 40	40,00	0,00	5,4
MCL1hs 900-50	34,2 34,94	34,57	0,52	
MCL1hs 900-300 K	40 40	40,00	0,00	10,6
MCL1hs 900-300	29,42 29,44	29,43	0,01	
MCL1hs 900-900 K	40 40	40,00	0,00	<b>12,9</b>
MCL1hs 900-900	27,4 26,78	27,09	0,44	

**Tabelle 20: Ergebnisse der Primermatrix für MCL1.** In der ersten Spalte stehen das Primerverhältnis (in pmol/ml im Endansatz) und die Angabe, ob der Ansatz cDNA enthält oder nicht (K). Es folgen die C<sub>T</sub>-Werte der einzelnen Primerkombinationen, deren Mittelwerte und Standardabweichungen. In der letzten Spalte sind die Differenzen der C<sub>T</sub>-Werte der gleichen Primerkombination mit und ohne cDNA aufgeführt, der Wert mit der größten Differenz ist hervorgehoben. Für Proben bei denen kein Amplifikat entstand wurde die maximale Zykluszahl (40) eingesetzt.

Anschließend wurde eine Standardkurve für das Gen mit einer Verdünnungsreihe aus cDNA aufgestellt. Diese wurde aus RNA von HeLa-Zellen, 24 Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis* gewonnen, umgeschrieben. So konnte überprüft werden, ob die Verdünnungsreihe

im gewählten Bereich linear war und aus der Geradengleichung die Effizienz des Primerpaares ermittelt werden. Aus der hier vorliegenden Steigung von ca.  $-3,0$  ergibt sich eine Effizienz von kalkulierten 115 %, was ein sehr gutes Ergebnis darstellt.



**Abbildung 5:** Standardkurve für das Gen MCL1, aufgetragen ist der Logarithmus des eingesetzten Volumens an cDNA gegen den  $C_T$ -Wert der Probe, ermittelt aus Doppelwerten. Die Geradengleichung und die Anpassung der Standardgerade an die Punkte sind angegeben.

Nur ein Primerpaar von 11 verwendeten zeigte bei den Vortests eine sehr schlechte Amplifikation des Gens (ZFP36) und zudem noch ein unerwünschtes Amplifikat in der *Real-Time*-PCR und konnte daher nicht verwendet werden. Die Ergebnisse aller Primermatrizes sind in Tabelle 21 aufgelistet.

Primerpaar (Gen)	Primerverhältnis im Ansatz [pmol/ml]	$C_T$ -Primer K – $C_T$ -Primer
Caspase 4	900/300	15
Caspase 8*	900/900	14
CDH3	900/900	9
EGR1	300/300	10
EPHA2	900/50	15
FRA1	300/900	9
IER3	50/50	10
LIF	300/50	8
MCL1	900/900	13
MIP-2 $\alpha$ *	300/300	15
ZFP36 <sup>#</sup>	300/50	11

**Tabelle 21:** Ergebnisse der Primermatrizes für die verwendeten Primerpaare. Die beiden mit (\*) gekennzeichneten Primerpaar mit entsprechenden Angaben wurden von der Arbeitsgruppe von J. Buer (GBF, Braunschweig) übernommen. <sup>#</sup> Bei ZFP36 gab es ein unerwünschtes Amplifikat bei der Primeraustestung, daher wurde das Primerpaar im Folgenden nicht mehr verwendet.

### 3.1.2.2.1.3 Generierung der Proben und Ergebnisse der Real-Time RT-PCR

HeLa T-Zellen wurden in 6-Loch-Platten mit *C. trachomatis* L2 mit einer MOI 5,7 infiziert (resultierend in über 90 % infizierter Zellen) bzw. schein-infiziert. Zusätzlich wurden für ei-



nen Analyse-Zeitpunkt Zellen mit UV-inaktivierten Chlamydien in gleicher Menge behandelt. Die RNA aus den Zellen wurde 6, 12 bzw. 24 Stunden nach Infektion isoliert und im Gel auf Degradierung hin überprüft, in cDNA umgeschrieben und in einer PCR mit Primern für das *Houskeeping*-Gen RPS9 amplifiziert, um ihre Güte zu testen. Die so gewonnenen Proben wurden für die Analyse mittels *Real-Time*-PCR verwendet.

Es konnten neun der zehn Gene überprüft werden, für das Gen ZFP36 stand kein geeigneter Primer zur Verfügung. Bei sieben überprüften Genen konnte die Hochregulation nach chlamydialer Infektion, die im Array-Experiment bei HeLa-Zellen 24 Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis* L2 gesehen worden war, bestätigt werden (siehe Tabelle 22). Das im Array-Experiment nicht regulierte Gen Caspase 8 (Casp 8) zeigte auch hier keine Regulation. Einzig die veränderte Expression des Adhäsionsmoleküls P-Cadherin (CDH3) konnte in der *Real-Time*-PCR nicht bestätigt werden.

Bei zwei der hier überprüften Gene war im Array-Experiment, das 12 Stunden nach Infektion durchgeführt wurde, eine Regulation zu sehen: LIF und EGR1. Diese Regulation bestätigte sich ebenfalls in der *Real-Time*-PCR.

Die Ergebnisse der sensitiven *Real-Time*-PCR zeigen, dass die vermehrte Expression der untersuchten Gene jedoch oft schon sechs Stunden nach Infektion (oder sogar früher) beginnt. EGR1 wies die stärkste Veränderung unter den ausgewählten Genen auf und seine mRNA war schon sechs Stunden nach Infektion stark erhöht.

Keines der untersuchten Gene zeigte eine veränderte Expression nach Behandlung der Zellen mit UV-inaktivierten Chlamydien.

Gen-Abkürzung	6 h p.i.	12 h p.i.	24 h p.i.	24 h UV-inaktivierte EK
Casp8	0	0	0	0
CDH3	0	0	0	0
EGR1	++	++++	+++++	0
EPHA2	+	+	+++	0
FRA1	+	+	++	0
IER3	+	++	+++	0
LIF	+	++	++++	0
MCL-1	0	+	+++	0
MIP-2 $\alpha$	0	++	++	0

**Tabelle 22:** Semiquantitative Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs der Expression ausgewählter Gene mittels *Real-Time*-RT-PCR von HeLa-Zellen infiziert mit *C. trachomatis* L2 (bzw. UV-inaktivierten Chlamydien) versus nicht infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (p.i.). Die Faktoren der Genregulation ergeben sich aus Doppelwerten zweier unabhängiger Experimente mit + Faktor 2-3, ++ <10, +++ <30, ++++ <100, +++++ >100

### 3.1.2.2.2 Überprüfung der Microarray Ergebnisse mittels ELISA für LIF, IL-6 und IL-11

Der Array 24 Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis* ergab bei HeLa-Zellen einen Anstieg der RNA für die Zytokine IL-8, IL-11 und LIF. Der Anstieg für IL-8 war bereits bekannt und diente im Array als eine Positivkontrolle. Die Hochregulation von IL-11 und LIF sollte auf Protein-Ebene mittels ELISA überprüft werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, warum im Array kein Anstieg von IL-6 gemessen wurde, obwohl laut eigener Vorversuche (siehe 3.1.1.3) ein Anstieg erwartet worden war.

Für die Analyse wurden HeLa-Zellen in 24-Loch-Platten bis zur Konfluenz kultiviert und entweder mit *C. trachomatis* mit einer MOI von 2 infiziert (resultierend in mehr als 90 % infizierten Zellen), mit einer gleichen Menge UV-inaktivierten Chlamydien behandelt oder aber analog ohne Chlamydien kultiviert. Die Konzentration von IL-6, IL-11 und LIF wurde alle sechs Stunden in den Zellkulturüberständen bestimmt (Abbildung 6).

Es konnte ein deutlicher Anstieg der IL-11-Sekretion bei infizierten gegenüber nicht-infizierten HeLa-Zellen gezeigt werden. Dieser Anstieg der Sekretion beginnt ca. 12 Stunden nach Infektion und erreicht sein Maximum nach 42 Stunden (Faktor 4,3). Dabei verhält sich die IL-11-Sekretion bei schein-infizierten Zellen und Zellen, die mit UV-inaktivierten Chlamydien behandelt wurden, annähernd gleich.

Auch für IL-6 konnte ein Anstieg der Sekretion bei infizierten Zellen gegenüber schein-infizierten Zellen bzw. Zellen mit UV-inaktivierten Chlamydien nachgewiesen werden. Die Unterschiede in der Sekretion sind aber geringer als bei IL-11 und auch erst später meßbar. Insbesondere ist kaum ein Unterschied 24 Stunden nach Infektion, dem Zeitpunkt des Arrays, nachweisbar. Nach 48 Stunden war bei den infizierten Zellen keine weitere IL-6-Sekretion mehr messbar, wohingegen die Kontrollzellen und die Zellen mit toten Chlamydien weiterhin IL-6 sekretierten. So waren 54 Stunden nach Infektion keine Unterschiede in der Sekretion mehr nachweisbar und nach diesem Zeitpunkt kehrte sich das Verhältnis um; es kommt zu einem Anstieg der Sekretion von IL-6 gegenüber den infizierten Zellen.

Bei infizierten HeLa-Zellen konnte als Trend ein leichter Anstieg der LIF-Sekretion gegenüber den Zellen gemessen werden, die mit toten Chlamydien behandelt oder schein-infiziert wurden, dieser Anstieg war aber bei diesen Zellen nicht signifikant.

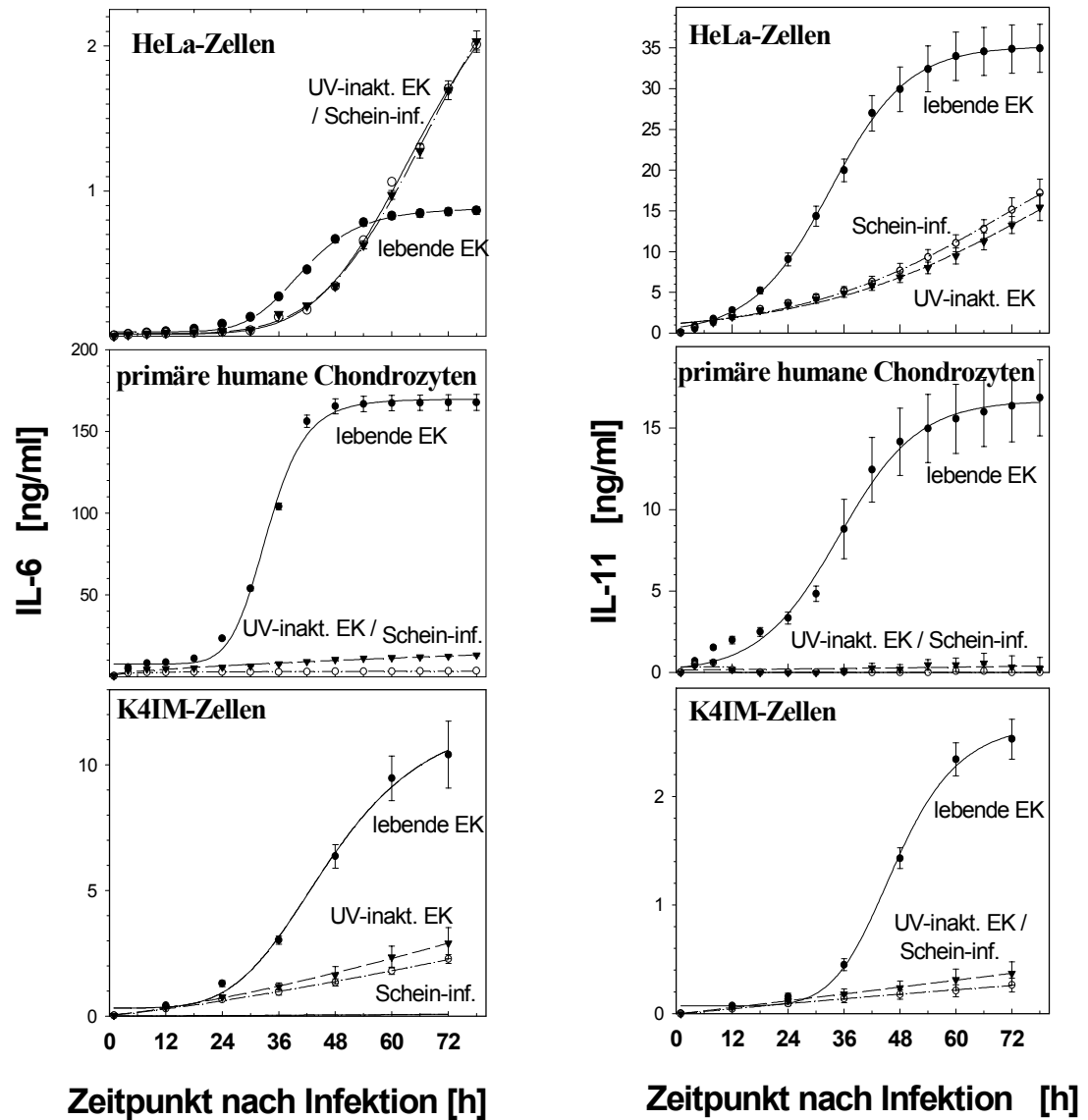


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von IL-11 und IL-6 im Überstand von HeLa T-Zellen, primären humanen Chondrozyten und der Synovialfibroblast-Zelllinie K4IM nach Infektion mit lebenden *C. trachomatis*, Behandlung mit durch UV-Bestrahlung abgetöteten Chlamydien oder Scheininfektion. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung von Dreifach-Werten, wobei die Ergebnisse in einem Wiederholungsexperiment bestätigt werden konnten.

### 3.1.2.3 Übertragung der Ergebnisse auf andere Zellen:

#### Nachweis von LIF, IL-6 und IL-11 bei einer Synovialfibroblast-Zelllinie und primären humanen Chondrozyten

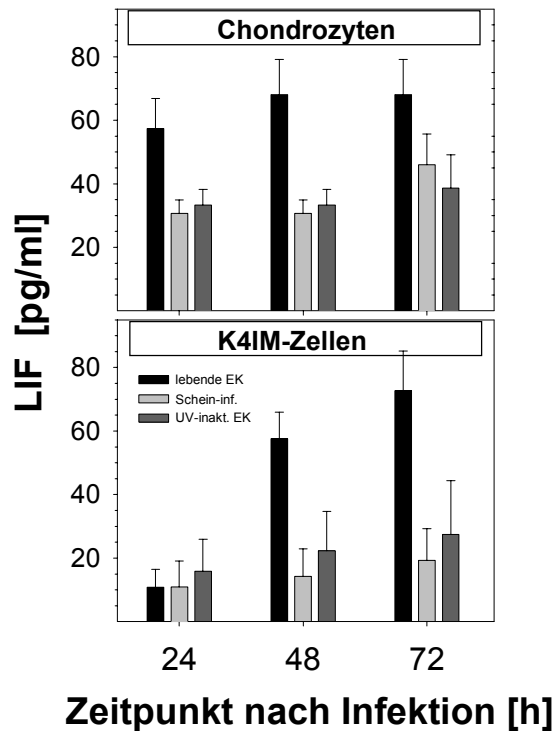
Nach der Überprüfung der Array-Ergebnisse in HeLa T-Zellen sollte exemplarisch ermittelt werden, ob sich beobachtete induzierte Regulationsvorgänge in anderen Zellen, die *in vivo* auch bei einer chlamydialen Erkrankung, wie beispielsweise der reaktiven Arthritis, eine Rolle spielen könnten, reproduzieren lassen. Hierzu wurden primäre humane Chondrozyten gewählt sowie die Synovialfibroblast-Zelllinie K4IM. Von Synovialfibroblasten ist bekannt, dass sie sich von Chlamydien *in vitro* infizieren lassen [22,23]. Von Chondrozyten ist dazu dagegen noch nichts bekannt. Sie stellen jedoch als Gelenkzellen einen weiteren möglichen Wirt für die Chlamydien dar.

Die Synovialfibroblasten-Linie K4IM wurde auf 24-Loch-Platten bis zur Konfluenz wachsen gelassen und dann mit *C. trachomatis* (MOI 2) infiziert. Die Chondrozyten wurden ebenfalls in 24-Loch-Platten infiziert. Dazu wurden sie direkt mit den Chlamydien vermischt und in einer mehrere Zellen dicken Schicht zusammen mit den Chlamydien zentrifugiert. Dieses Vorgehen, mit dem eine vielschichtige Kultur erreicht wird, trägt zu einer eher physiologischen Kultur der primären Zellen bei. Zur Infektion wurde die gleiche Menge an Chlamydien, wie sie im Experiment mit K4IM und HeLa-Zellen eingesetzt wurde, verwendet, was in einer MOI von 0,4 resultierte. Die Zellkulturüberstände wurden auch hier im Abstand von sechs Stunden durch frisches Medium ersetzt und die Konzentrationen von IL-11 und IL-6 im ELISA bestimmt.

Sowohl bei primären Chondrozyten als auch bei der Synovialfibroblast-Zelllinie konnte ein Anstieg der Zytokin-Sekretion von IL-11 und IL-6 nach chlamydialer Infektion gemessen werden. Dagegen war der Unterschied in der Sekretion von schein-infizierten Zellen und Zellen, die mit UV-inaktivierten Chlamydien behandelt wurden, sehr gering (Abbildung 6).

Für die Überprüfung der Zellkulturüberstände auf LIF wurde das Medium auf den Zellen nur in einem Abstand von 24 Stunden gewechselt, da uns durch Vorexperimente bekannt war, dass nur eine geringe Sekretion von LIF erfolgen würde. Durch die längeren Zeiträume, die das Medium auf den Zellen verbleiben würde, sollte eine Anreicherung des sekretierten LIF in den Meßbereich des ELISAs erreicht werden. Hier konnte bei primären Chondrozyten und bei der Synovialfibroblast-Zelllinie ein Anstieg von LIF nach Infektion der Zellen mit *C. trachomatis* gemessen werden. Ein Unterschied in der Sekretion von LIF bei schein-infizierten

Zellen und Zellen, die mit abgetöteten Chlamydien behandelt wurden lag nicht vor (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Graphische Darstellung der Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von LIF im Überstand von primären humanen Chondrozyten und der Synovialfibroblast-Zelllinie K4IM nach Infektion mit lebenden *C. trachomatis*, Behandlung mit durch UV-Bestrahlung abgetöteten Chlamydien oder Scheininfektion. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung von Dreifach-Werten, wobei die Ergebnisse in einem Wiederholungsexperiment bestätigt werden konnten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die Verwendung von Microarrays der Firma Clontech 24 Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis* 18 Gene ermittelt werden konnten, die reproduzierbar mit einem Faktor  $\geq 3$  verändert exprimiert wurden. Von diesen konnten acht (von neun analysierten) durch die Verwendung einer *Real-Time-RT-PCR* bestätigt und weiterführend untersucht werden, darunter Transkriptionsfaktoren, anti-apoptotische Proteine und Zytokine. Weiterhin ließ sich durch die Verwendung von ELISAs der durch die Arrays ermittelte Chlamydien-induzierte Anstieg der Zytokine IL-11 und LIF auf Proteinebene verifizieren. Diese beiden Regulationen, sowie der Anstieg für IL-6, waren auch in anderen Zellen nachvollziehbar.

### 3.1.2.4 Vergleichende Analyse der Veränderungen der Wirtszell-Genexpression durch *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*

#### 3.1.2.4.1 Untersuchung der Chlamydien-induzierten Genexpression mittels Affymetrix U95A Microarrays

Nach der erfolgreichen Durchführung der Experimente mit cDNA-Microarrays der Firma Clontech konnten wir in Kooperation mit der Firma GlaxoSmithKline (King of Prussia, USA) eine stark erweiterte Versuchsreihe mit dem U95A Microarray der Firma Affymetrix mit ca. 12.000 Genen durchführen.

Hierbei konnten wir die Chlamydien-induzierte Genregulation zu mehreren, auch schon sehr frühen Zeitpunkten untersuchen und dies sowohl bei einer Infektion mit *C. trachomatis* als auch bei einer Infektion mit *C. pneumoniae*. Dadurch sollten einerseits Gene ermittelt werden, deren Regulation sehr früh während der Infektion erfolgt, und die möglicherweise Schlüsselfunktionen bei der Infektion der Zelle innehaben und zu weiteren Veränderungen der Zelle nach Infektion durch Chlamydien beitragen. Weiteres Ziel war eine vergleichende Analyse von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*, die sich in ungefähr 300 Genen unterscheiden. Ein Vergleich der Regulationsvorgänge, die durch beide Spezies induziert werden, sollte Aufschluß darüber geben, wie stark diese Regulationen Genus- bzw. Spezies-spezifisch sind.

##### 3.1.2.4.1.1 Planung und Durchführung der Microarrays

Da es aus praktischen Gründen nicht möglich war, sämtliche Versuchsbedingungen in einem Experiment unterzubringen wurde es in zwei Blöcke unterteilt, wobei der erste Block sich auf die Veränderungen der Genexpression durch *C. pneumoniae* konzentriert und der zweite Block auf die Veränderungen durch *C. trachomatis*. Eine Übersicht über die geplanten Experimente und die tatsächlich analysierten Zeitpunkte findet sich in Tabelle 23 und Tabelle 24. Für die Experimente wurden die Zellen in 12-Loch-Platten kultiviert und mit einer MOI 3,5 bei *C. pneumoniae* und einer MOI 1 bei *C. trachomatis* L2 infiziert, was in einer Infektion von über 90 % der Zellen resultierte. Nach der angegebenen Zeit wurde die RNA isoliert, im Gel überprüft und für die Durchführung des Array-Teils des Experimentes auf Trockeneis zu unseren Kooperationspartnern geschickt. Die Durchführung der Arrays erfolgte durch P. Hegde (Transcriptome Analysis, GSK, King of Prussia, USA) und die Computer-gestützte erste Auswertung der Primärdaten wurde von M. Magid-Slav (Bio-Informatics, GSK, King of Prussia, USA) durchgeführt.

Zeitpunkte p.i. [h]	schein-infizierte HeLa-Zellen	HeLa-Zellen infiziert mit <i>C. pneumoniae</i>	HeLa-Zellen behandelt mit UV-inaktivierten <i>C. pneumoniae</i>	HeLa-Zellen infiziert mit <i>C. trachomatis</i>
2	+	+		
4	+	(+)	+	+
12	+	+		
24	+	+		+
36	+	+	+	
48	+	+		
60	+	+		

**Tabelle 23: Übersicht über die Versuchsplanung des ersten Blocks an Affymetrix-Microarray-Experimenten. Angegeben sind die Bedingungen unter denen aus HeLa-Zellen RNA gewonnen und mit Affymetrix U95A-Microarray-Chips untersucht wurde. Die Angabe in Klammern weist auf einen Versuch hin, bei dem die Hybridisierung mit einem Chip versagt hat und somit keine Daten vorliegen.**

Im ersten Versuchsblock konnte kein Array 4 Stunden nach *C. pneumoniae*-Infektion durchgeführt werden. Daher fand von diesem Zeitpunkt nur ein Vergleich von schein-infizierten Zellen und Zellen mit UV-inaktivierten Chlamydien statt. Die Arrays mit den anderen Bedingungen konnten alle ausgewertet werden.

Zeitpunkte p.i. [h]	schein-infizierte HeLa-Zellen	HeLa-Zellen infiziert mit <i>C. trachomatis</i>	HeLa-Zellen behandelt mit UV-inaktivierte <i>C. trachomatis</i>	HeLa-Zellen infiziert mit <i>C. pneumoniae</i>
2	(+)	(+)		
4	+	+	+	+
12	+	+		
24	(+)	(+)	+	
36	+	+		+
48	+	+		

**Tabelle 24: Übersicht über die Versuchsplanung des zweiten Blocks an Affymetrix-Microarray-Experimenten. Angegeben sind die Bedingungen unter denen aus HeLa-Zellen RNA gewonnen und mit Affymetrix U95A-Microarray-Chips untersucht wurde. Die Angaben in Klammern weisen auf die Versuche hin, bei denen die Hybridisierung mit einem Chip versagt hat und somit keine Daten vorliegen.**

Im zweiten Versuchsblock entfielen komplett die Vergleiche 2 und 24 Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis*. Da bei den ersten Experimenten zur Untersuchung der *C. trachomatis*-induzierten Genregulationen mit Microarrays der Firma Clontech der Schwerpunkt auf dem Vergleich der Genexpression 24 Stunden nach Infektion lag, und dieser Array hier nicht gelungen war, wurde eine Wiederholung eines Teils dieser Arrays durchgeführt. So sollte ein direkter Vergleich der beiden Array-Systeme ermöglicht werden. Der Vergleich 2 Stunden nach Infektion wurde auch erneut durchgeführt und zusätzlich der Vergleich 48 Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis* wiederholt, um hier ein echtes Wiederholungsexperiment durchzuführen und eine Vergleichsmöglichkeit zwischen den beiden Versuchsreihen zu haben. Eine Übersicht über die Versuchsplanung bietet Tabelle 25.

Zeitpunkte p.i. [h]	schein-infizierte HeLa-Zellen	HeLa-Zellen infiziert mit <i>C. trachomatis</i>	HeLa-Zellen behandelt mit UV-inaktivierten <i>C. trachomatis</i>
2	+	+	
24	+	+	+
48	+	+	

**Tabelle 25: Übersicht über die Versuchsplanung der Wiederholungsexperimente des zweiten Blocks an Affymetrix-Microarray-Experimenten. Angegeben sind die Bedingungen unter denen aus HeLa-Zellen RNA gewonnen und mit Affymetrix U95A-Microarray-Chips untersucht wurde.**

Nach der ersten Auswertung der Arrays, also der Berechnung der Faktoren der Genregulation bei GSK, wurden die Daten als Excel-Arbeitsblätter wieder nach Hannover transferiert und weiter analysiert.

Die Datensätze für jedes regulierte Gen enthalten jeweils eine Abkürzung des Gennamens, den ausgeschriebenen Gennamen, in einigen Fällen mit kurzer funktioneller Beschreibung des Gens, die zugehörige GenBank-Accession-Nummer, über die in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) das Gen/die Sequenz identifiziert werden kann, die Nummer der Sequenz bei Affymetrix und die auf dem Microarray-Chip gemessenen Intensitäten und die daraus ermittelte Regulation mit entsprechender Wahrscheinlichkeit (p-Value). Dabei kann es vorkommen, dass für eine Genabkürzung mit gleicher Accession-Nummer zwei Affymetrix-Nummern existieren, also zwei Sequenzen aus der gleichen Primärsequenz auf dem Chip vorliegen und somit zwei Datensätze generiert werden können. Weiterhin gibt es Gene, für die mehrere unterschiedliche Sequenzen, resultierend aus unterschiedlichen Accession-Nummern vorliegen und folglich auch hier mehrere Datensätze generiert worden sind. Daher wird im folgenden von Genspots gesprochen, wenn nicht berücksichtigt wurde, ob die erhaltenen Datensätze alle von unterschiedlichen Genen oder von einem Gen mit verschiedenen Affymetrix-Nummern oder sogar GenBank-Accession-Nummern stammen (zwischen der Anzahl der regulierten Gene und Genspots ist ein Unterschied von maximal 12 %).

Bei der Berechnung der Regulationsfaktoren wurde sowohl die Intensität der Genspots, als auch die Fehlerwahrscheinlichkeit der Daten (p-Value) berücksichtigt. Nur Werte mit einem p-Value kleiner 0,01 wurden berücksichtigt. Bei Intensitäten kleiner 2 für die beiden zu vergleichenden Genspots wurde zwar auch ein Regulationsfaktor berechnet, dieser ist aber mit einem größeren Fehler behaftet und wird als „unsicherer“ Faktor eingestuft.



### 3.1.2.4.1.2 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

Zuerst wurde eine Übersicht der Ergebnisse erstellt, aufgeschlüsselt nach Spezies, Zeitpunkt und Stärke der Regulation, die in den folgenden vier Tabellen zusammengefasst ist. Eine graphische Übersicht über diese Daten ist nochmal in Kapitel 4.1.1.1 (Abbildung 13) eingefügt.

Bei dem Vergleich von Zellen, die mit *C. trachomatis* L2 infiziert wurden mit schein-infizierten (Tabelle 26) konnten im gesamten Testzeitraum ungefähr 1600 Genspots ermittelt werden, die eine abweichende Regulation zeigten. Dabei nahm die Anzahl an regulierten Genen ab 24 Stunden nach Infektion zu und erreichte ihren Höhepunkt nach 48 Stunden mit über 400 vermehrt und über 300 vermindert exprimierten Genen. Im Zeitraum von zwei bis 12 Stunden nach Infektion lag die Anzahl der regulierten Gene bei ungefähr 100. Nicht nur die Anzahl der Veränderungen, sondern auch deren Ausmaß nahmen zu späteren Zeitpunkten zu, wobei die stärkste vermehrte Genexpression mit Faktor 100 bei IL-8 nach 36 sowie 48 Stunden ermittelt werden konnte, die stärkste Verminderung beim *transcription elongation factor A* (TCEA2) mit –15 nach 48 Stunden.

	2h p.i. <sup>#</sup>	4h p.i.	12h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36h p.i.	48h p.i. 48h p.i. <sup>#</sup>
<b>Hochregulierte</b> Genspots insgesamt	68	34 + 5 (*)	25 + 8 (*)	242	144 + 95 (*)	242 + 198 (*) 463
davon > Faktor 3	-	-	4 (*)	49	26 + 53 (*)	36 + 78 (*) 84
davon > Faktor 10	-	-	-	7	2 + 13 (*)	4 + 19 (*) 9
<b>Runterregulierte</b> Genspots insgesamt	10	36 + 12 (*)	55 + 21 (*)	103	112 + 139 (*)	206 + 102 (*) 665
davon > Faktor 3	-	3 + 4 (*)	6 + 10 (*)	-	21 (*)	5 + 30 (*) 133
davon > Faktor 10	-	-	3 (*)	-	2 (*)	1 (*) 10

**Tabelle 26: Übersicht über die Anzahl der regulierten Gene auf U95A-Microarray-Chips (Affymetrix) von HeLa-Zellen, die mit *C. trachomatis* L2 infiziert wurden im Vergleich mit schein-infizierten Zellen. Das (\*) weist auf Regulationen hin, bei denen der Faktor der Regulation nicht exakt bestimmt werden kann, da die gemessenen Intensitäten der Genspots unter zwei lagen. Die Angaben, die mit (#) gekennzeichnet sind, stammen aus dem Wiederholungsexperiment.**

Bei dem Vergleich von Zellen, die mit **UV-inaktivierten *C. trachomatis*** behandelt wurden und schein-infizierten Zellen, welcher 4 und 24 Stunden „nach Infektion“ erfolgte, konnten jeweils 10 bis 20 Gene ermittelt werden, die reguliert waren (siehe Tabelle 27). Unter diesen konnten nur drei Gene gefunden werden, deren Regulation stärker war als Faktor drei.

	UV 4h p.i.	UV 24h p.i. <sup>#</sup>
<b>Hochregulierte</b> Genspots insgesamt	11	16
davon > Faktor 3	-	1
davon > Faktor 10	-	-
<b>Runterregulierte</b> Genspots insgesamt	18	10
davon > Faktor 3	-	2
davon > Faktor 10	-	-

**Tabelle 27:** Übersicht über die Anzahl der regulierten Gene auf U95A-Microarray-Chips (Affymetrix) von HeLa-Zellen, die mit UV-inaktivierten *C. trachomatis* behandelt wurden im Vergleich mit schein-infizierten Zellen. Die Angaben, die mit (#) gekennzeichnet sind, stammen aus dem Wiederholungsexperiment.

Bei dem Vergleich von *C. pneumoniae*-infizierten Zellen mit schein-infizierten ergab sich ein anderes Bild (Tabelle 28). Hier konnten schon 2 Stunden nach Infektion über 250 Genspots identifiziert werden, die vermehrt exprimiert wurden und über 150, deren Expression vermindert war. Das größte Ausmaß an differentiell exprimierten Genspots konnte ebenfalls 48 Stunden nach Infektion mit über 400 vermehrt bzw. vermindert exprimierten Genspots festgestellt werden. Generell waren hier die Unterschiede in der Genexpression nicht so groß. Die stärkste (Hoch-)Regulation lag beim *immediate early response protein 3* (IER3) vor mit einem Faktor von 6,3 nach 12 Stunden, die größte Verminderung der Genexpression konnte nach 60 Stunden bei dem *cyclin-dependent kinase inhibitor 1C* (CDKN1C) mit Faktor -4,7 ermittelt werden. Die Anzahl der durch *C. pneumoniae* verändert exprimierten Gene (Genspots) lag bei 1400 im gesamten Zeitraum, womit hier ungefähr 200 verändert exprimierte Genspots weniger detektiert wurden als bei den Experimenten mit *C. trachomatis*.

	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
<b>Hochregulierte</b> Genspots insgesamt	170 + 86 (*)	79 + 89 (*)	80 + 104 (*)	105 + 92 (*)	266 + 215 (*)	165 + 140 (*)
davon > Faktor 3	14 (*)	3 + 29 (*)	4 + 38 (*)	11 + 36 (*)	10 + 50 (*)	18 (*)
davon > Faktor 10	1 (*)	3 (*)	5 (*)	6 (*)	10 (*)	3 (*)
<b>Runterregulierte</b> Genspots insgesamt	131 + 22 (*)	42 + 22 (*)	65 + 47 (*)	110 + 86 (*)	231 + 199 (*)	188 + 122 (*)
davon > Faktor 3	1 + 2 (*)	-	1 + 4 (*)	3 + 15 (*)	6 + 27 (*)	3 + 24 (*)
davon > Faktor 10	-	-	-	2 (*)	3 (*)	7 (*)

**Tabelle 28:** Übersicht über die Anzahl der regulierten Gene auf U95A-Microarray-Chips (Affymetrix) von HeLa-Zellen, die mit *C. pneumoniae* infizierten wurden im Vergleich mit schein-infizierten Zellen. Das (\*)

weist auf Regulationen hin, bei denen der Faktor der Regulation nicht exakt bestimmt werden kann, da die gemessenen Intensitäten der Genspots unter zwei lagen.

Der Vergleich der Genregulation von mit UV-inaktivierten *C. pneumoniae* behandelten Zellen und schein-infizierten Zellen ergab jeweils über 30 Genspots, die nach 4 bzw. 36 Stunden vermehrt oder vermindert exprimiert waren (Tabelle 29). Dabei waren die Faktoren der Regulation allgemein niedrig, mit der stärksten Regulation bei dem Gen Nucleotidase NT5 mit einem Faktor von 9,9 nach 36 Stunden. Dieser Zahlenwert muß allerdings kritisch betrachtet werden, da die gemessenen Intensitäten, die verglichen wurden kleiner zwei waren und somit die Berechnung mit einem großen Fehler behaftet ist.

	UV 4h p.i.	36h p.i.
<b>Hochregulierte</b> Genspots insgesamt	36 + 16(*)	25 + 4(*)
davon > Faktor 3	2(*)	1(*)
davon > Faktor 10	-	-
<b>Runterregulierte</b> Genspots insgesamt	25 + 7(*)	26 + 9(*)
davon > Faktor 3	-	-
davon > Faktor 10	-	-

**Tabelle 29:** Übersicht über die Anzahl der regulierten Gene auf U95A-Microarray (Affymetrix)-Chips von HeLa-Zellen, die mit UV-inaktivierten *C. pneumoniae* behandelt wurden im Vergleich mit schein-infizierten Zellen. Das (\*) weist auf Regulationen hin, bei denen der Faktor der Regulation nicht exakt bestimmt werden kann, da die gemessenen Intensitäten der Genspots unter zwei lagen.

Es ist nicht einfach, die Masse an Daten und Ergebnissen aus insgesamt 17 Array-Analysen für den Leser nachvollziehbar und physiologisch sinnvoll darzustellen. Aus diesem Grund wurden die regulierten Gene in funktionelle Protein-Gruppen geordnet. Dabei wurde, neben den Informationen, die die Firma Affymetrix (bzw. Clontech) zu den Genen zur Verfügung stellt, noch auf eine Datenbank des NCBI zurückgegriffen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/locuslink>) und im Einzelfall zusätzliche Literatur zu den Genen herangezogen.

Folgende funktionelle Gruppen wurden gebildet:

- a) Transkriptionsfaktoren
- b) Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, deren Rezeptoren und assoziierte Proteine
- c) Proteine der intrazellulären Signaltransduktion
- d) Proteine der Zellzyklus-Regulation
- e) Proteine des Zytoskeletts und assoziierte Proteine
- f) Proteine der Extrazellulärmatrix und assoziierte Proteine

- g) Adhäsionsmoleküle
- h) Pro- und anti-apoptische Proteine
- i) Proteine mit bekanntem Bezug zu Arthritis
- j) Proteine mit bekanntem Bezug zu Atherosklerose
- k) weitere Gene, die in keine der bisherigen Gruppen unterteilt werden konnten, aber durch ihre starke Regulation von Bedeutung sind oder Gene, die in einem dervorangegangenen Microarray-Experimenten (Microarrays der Firma Clontech) reguliert waren.

Im Folgenden wird erst eine Übersicht über die Regulationen innerhalb der gebildeten funktionellen Gruppen gegeben und anschließend für jede Gruppe detailliert die ermittelten Regulationen aufgeführt. Diese Detailansichten sind tabellarisch dargestellt, mit jeweils einer Tabelle für die durch *C. trachomatis* induzierten Veränderungen und einer Tabelle für die Veränderungen durch *C. pneumoniae*. Nach der detaillierten Ansicht der Genregulationen, die durch lebende Chlamydien verursacht werden sind in zwei Tabellen die für diese Gene ermittelten Effekte durch UV-inaktivierte Chlamydien angefügt.

Die Übersicht über die Anzahl an regulierten Genen und deren Veränderung der Expression in den einzelnen funktionellen Gruppen bietet Tabelle 30. Dabei wurde auch die Anzahl an Genen aufgeführt, die sowohl nach Infektion mit *C. trachomatis* als auch nach Infektion mit *C. pneumoniae* reguliert wurden. Da sich der Entwicklungszyklus der beiden Chlamydienpezies unterscheidet (ca. 2 Tage bei *C. trachomatis* und ca. 3 Tage bei *C. pneumoniae*) ist es schwierig die Regulationsvorgänge in beiden Spezies direkt zu vergleichen. Daher wurden die Genregulationen in zwei Zeitintervallen betrachtet: Frühe Regulationen im Zeitraum bis 12 Stunden nach Infektion und späte Regulationen ab 24 Stunden nach Infektion. Nun können Gene, deren Genexpression durch beide Spezies beeinflusst wird unterteilt werden in Gene mit gleichgerichteter Beeinflussung und Gene mit unterschiedlich gerichteter Beeinflussung, d.h. ist ein Gen nach Infektion mit der einen Chlamydienpezies zu frühen Zeitpunkten vermindert exprimiert und nach Infektion mit der anderen Spezies im gleichen Zeitintervall vermehrt exprimiert, so weist die Genregulation eine andere Ausrichtung auf, sie ist unterschiedlich ausgerichtet. Gene, die in verschiedenen Zeitintervallen unterschiedlich ausgerichtet reguliert sind, werden dabei nicht erfasst.

Probleme bei dieser Bewertung treten dann auf, wenn sich die Ausrichtung der Genregulation innerhalb eines Zeitintervalls ändert.

funktionelle Gruppe	durch <i>C. trachomatis</i> regulierte Gene	durch beide reguliert (davon unterschiedlich ausgerichtet)	durch <i>C. pneumoniae</i> regulierte Gene
a) Transkriptionsfaktoren	<b>65</b> (↓27, ↑35)	<b>47</b> (13)	<b>58</b> (↓25, ↑24)
b) Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, deren Rezeptoren und assoziierte Proteine	<b>47</b> (↓15, ↑28)	<b>40</b> (12)	<b>47</b> (↓16, ↑23)
c) Proteine der intrazellulären Signaltransduktion	<b>45</b> (↓10, ↑31)	<b>30</b> (2)	<b>32</b> (↓ 5, ↑22)
d) Proteine der Zellzyklus-Regulation	<b>17</b> (↓11, ↑ 5)	<b>11</b> (4)	<b>15</b> (↓ 9, ↑ 3)
e) Proteine des Zytoskeletts und assoziierte Proteine	<b>29</b> (↓18, ↑11)	<b>28</b> (11)	<b>35</b> (↓ 9, ↑21)
f) Proteine der Extrazellulärmatrix und assoziierte Proteine	<b>16</b> (↓10, ↑ 5)	<b>16</b> (2)	<b>21</b> (↓11, ↑ 8)
g) Adhäsionsmoleküle	<b>8</b> (↓ 2, ↑ 5)	<b>7</b> (1)	<b>10</b> (↓ 1, ↑ 8)
h) Pro- und anti- apoptotische Proteine	<b>20</b> (↓ 5, ↑12)	<b>14</b> (1)	<b>18</b> (↓ 5, ↑10)
i) Proteine mit bekanntem Bezug zu Arthritis	<b>10</b> (↓ 9, ↑ 1)	<b>9</b> (2)	<b>9</b> (↓ 7, ↑ 2)
j) Proteine mit bekanntem Bezug zu Atherosklerose	<b>10</b> (↓ 1, ↑ 8)	<b>9</b> (2)	<b>11</b> (↓ 2, ↑ 7)
k) Proteine unter- schiedlicher Funktion	<b>24</b> (↓ 7, ↑12)	<b>21</b> (8)	<b>30</b> (↓ 7, ↑18)

**Tabelle 30:** Übersicht über die Gene in den einzelnen funktionellen Gruppen. Dargestellt ist jeweils die Anzahl der Gene, deren Expression durch die Infektion mit *C. trachomatis* oder *C. pneumoniae* verändert wurde und die Ausrichtung der Regulation, (↓) bezeichnet Gene, die nach Infektion vermindert exprimiert wurden, (↑) bezeichnet Gene mit vermehrter Expression. Die mittlere Spalte gibt die Anzahl der Gene an, die sowohl durch Infektion mit *C. trachomatis*, als auch mit *C. pneumoniae* verändert exprimiert werden, dabei gibt die Zahl in Klammern die Anzahl der Genspots an, bei der sich die Ausrichtung der Regulation der Genexpression unterscheidet.

Es sei explizit darauf hingewiesen, dass es sich bei den hier aufgeführten Genen nur um einen Teil der Ergebnisse aus den Array-Experimenten handelt (etwa ein Drittel der erfassten Regulationen). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde darauf verzichtet, alle durch die Arrays erhaltenen verändert exprimierten Gene darzustellen, so dass hier nur die Gene aufgeführt wurden, die einer der funktionellen Gruppen zugeordnet werden konnten. Diese Zuordnung erhebt dabei keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

### 3.1.2.4.1.3 Darstellung der Einzelergebnisse der Microarrays

Die nachfolgenden 21 Tabellen enthalten nun die detaillierte Aufschlüsselung der Regulationen in den einzelnen funktionellen Gruppen.

Um die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse klein zu halten, wurden in den Tabellen der funktionellen Gruppen a) bis k) nur Gene ausgewählt, bei denen in mindestens zwei Fällen eine Regulation vorlag und diese mindestens einmal den Faktor 1,5 erreichte oder überstieg. Die Gene der Gruppen g) könnten teilweise auch in e) und f) aufgenommen werden, darauf wurde hier verzichtet. Bei den Gruppen h) bis j) lagen auch teilweise Überlappungen mit anderen Gruppen vor, auf diese Gene, die in eine der Gruppen a) bis h) eingeteilt wurden, wird extra hingewiesen.

#### a) Transkriptionsfaktoren

Bei dem Vergleich von *C. trachomatis* infizierten mit schein-infizierten HeLa T-Zellen mittels Affymetrix U95A Microarrays konnten 65 Transkriptionsfaktoren ermittelt werden, deren Expression sich verändert hatte (siehe Tabelle 31). Von diesen Transkriptionsfaktoren wurden 27 ausschließlich vermindert und 35 ausschließlich vermehrt exprimiert, wobei die Faktoren der Regulation bei den hochregulierten Genen in der Regel größer waren als bei den vermindert exprimierten. Ein Großteil der Transkriptionsfaktoren (47) waren sowohl bei *C. trachomatis*-infizierten, als auch bei *C. pneumoniae*-infizierten Zellen, gegenüber schein-infizierten Zellen, reguliert, wobei die Expression im gleichen Zeitintervall bei 34 gleichgerichtet und bei 13 unterschiedlich gerichtet reguliert wurde.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
<b>E2F5</b> E2F transcription factor 5	U31556						-4,9 <sup>#</sup> /-3,2 <sup>#</sup>
<b>ETS2<sup>b</sup></b> v-ets oncogene homolog 2	J04102				-1,3		-6,9 <sup>#</sup>
<b>FOXF2<sup>b</sup></b> forkhead box F2	U13220						-3,4 <sup>#</sup>
<b>GTF2I<sup>b</sup></b> general transcription factor II, i	AF015553 U77948					-1,5 -1,8*	-1,7 <sup>#</sup> -1,5 <sup>#</sup>
<b>GTF3C1<sup>b</sup></b> general transcription factor IIIC, 1	U02619					-1,9*	
<b>JUND<sup>b</sup></b> jun D proto-oncogene	X56681			-1,8/-1,8			-2,4/-2,4
<b>LMO1<sup>b</sup></b> LIM domain only 1	M26682					-5,2*	
<b>LMO4<sup>b</sup></b>	U24576					-2,4*	-3,3 <sup>#</sup>

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
LIM domain only 4							
MAZ <sup>uv,b</sup> MYC-associated zinc finger protein	D85131 M94046 <sup>UV</sup>			-2,1* -1,5			-2,8* -1,7
MYBL1 <sup>b</sup> v-myb oncogene homolog-like 1	X66087						-2,5 <sup>#</sup>
NCOR1 nuclear receptor co- repressor 1	AF044209						-1,9 <sup>#</sup>
NCOR2 <sup>b</sup> nuclear receptor co- repressor 2	U37146						-2,1 <sup>#</sup>
<b>NR2F1</b> nuclear receptor subfamily 2, F, 1	X16155				-1,5		<b>-3,8</b>
SMARCA1 <sup>b</sup> SWI/SNF related actin dep. regulator of chromatin ,a, 1	M88163					-1,7*	-1,6 <sup>#</sup>
SMARCA4 <sup>bu</sup> SWI/SNF related actin dep. regulator of chromatin ,a, 4	U29175						-1,6 <sup>#</sup>
SREBF1 <sup>b</sup> sterol regulatory element binding transcription factor 1	U00968				-1,3		
STAT1 <sup>b</sup> signal transducer and activator of transcription 1	M97935						-1,5 <sup>#</sup>
TAF2N <sup>bu</sup> TATA box binding protein-associated factor	U51334		-2,2	-1,7		-2,6	-1,7 <sup>#</sup>
TCF12 <sup>b</sup> transcription factor 12	M80627					-1,4	-1,6*/-1,9 <sup>#</sup>
<b>TCFL5<sup>b</sup></b> transcription factor- like 5	AB012124					<b>-3,8*</b>	<b>-2,6*/-6,1<sup>#</sup></b>
<b>TFDP1<sup>c</sup></b> E2F dimerization partner 1	L23959					<b>-3,7*/-1,8</b>	<b>-2,5<sup>#</sup>/-3,9<sup>#</sup></b>
TIF1B <sup>bu</sup> KRAB-associated protein 1	X97548						-1,5
ZNF146 <sup>b</sup> zinc finger protein 146	X70394						-1,3 <sup>#</sup>
ZNF162 <sup>bu</sup> zinc finger protein 162	L49380				-1,2		
ZNF261 zinc finger protein 261	X95808				-1,4		-2,2 <sup>#</sup>
ZFX <sup>b,c</sup> zinc finger protein	X59739					-2,6*	

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
E2F2 transcription factor; ID3 inhibitor of DNA binding 3	AL021154		-1,3	-1,3	-1,3	-1,8	1,5 <sup>#</sup>
ID1 <sup>b</sup> inhibitor of DNA binding 1	X77956				1,3/1,4	1,9/1,8	1,6/1,4/-1,2 <sup>#</sup>
TCF3 <sup>bu</sup> transcription factor 3	M31523		1,7*			-1,4	-1,9 <sup>#</sup>
ATF3 <sup>bu</sup> activating transcription factor 3	L19871				1,7		4,4*/3,8 <sup>#</sup>
BACH 1 basic leucine zipper transcription factor 1	AB002803					2,3*	4,4*/1,8 <sup>#</sup>
CBF2 <sup>b</sup> CCAAT-box- binding transcription factor	M37197						1,7*
CEBPB <sup>bu</sup> CCAAT/enhancer binding protein β	X52560		1,4		1,5	1,4	
CEBPD <sup>b</sup> CCAAT/enhancer binding protein δ	M83667				1,6	2,2*	2,7*
COPEB core promoter element binding protein	AF001461					2,3*	2,4*/2,2 <sup>#</sup>
CREM <sup>b</sup> cAMP responsive element modulator	S68134 S68271					4,2/4,3 5,8	2,2/2,9 3,6/1,3 <sup>#</sup>
DR1 <sup>b</sup> down-regulator of transcription 1	M97388				1,2		1,6*/1,6 <sup>#</sup> / 1,6 <sup>#</sup>
EGR1 <sup>c</sup> early growth response protein 1	X52541					2,6*	2,6*
ETR101 <sup>b</sup> immediate early protein	M62831		1,4		2,7	2,7	1,9/1,6 <sup>#</sup>
ETV5 <sup>b</sup> ets variant gene 5	X96381				7,3	8,1*	9,5*
FOS <sup>bu</sup> v-fos oncogene homolog	K00650 V01512				1,9/2,8	4,9* 2,8 /2,9*	6,1*/2,2 <sup>#</sup> 2,8 /4,7*/ 2,5 <sup>#</sup> /1,8 <sup>#</sup>
FRA1 <sup>c</sup> fos-related antigen 1	X16707						2,0 <sup>#</sup>
GTF2B general transcription factor IIB	X59268 M76766						2,0 <sup>#</sup> 1,7 <sup>#</sup>
GTF3A <sup>b</sup> general transcription factor IIIA	D32257						2,2*
HIF1A <sup>bu</sup> hypoxia-inducible factor 1, α	U22431				1,2	1,7	1,6



Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
<b>HRY<sup>b</sup></b> hairy (Drosophila)-homolog	L19314				3,9		
<b>JUN<sup>c</sup></b> c-JUN proto-oncogene	J04111				5,6/5,5		
<b>JUNB<sup>b</sup></b> jun B proto-oncogene	M29039 X51345				2,9 3,6	4,5* 4,0	2,2*/4,1 <sup>#</sup> 3,0/2,4 <sup>#</sup>
<b>KLF5<sup>b</sup></b> Kruppel-like factor 5	D14520					4,1*	14,9*
<b>LOC51042<sup>b</sup></b> zinc finger protein	AI582831						4,9*
<b>NFIL3<sup>bu</sup></b> nuclear factor, IL-3 regulated	X64318					1,7*	2,5*/2,0 <sup>#</sup>
<b>NFKB1</b> nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	M58603				1,5	2,2*	8,3*
<b>NFKB2</b> nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2	S76638 X61498						2,8 <sup>#</sup> 2,0 <sup>#</sup>
<b>NFKBIA</b> NFKB inhibitor, $\alpha$	M69043				1,9	2,9*	8,1*/5,6 <sup>#</sup>
<b>NR4A1<sup>bu</sup></b> nuclear receptor subfamily 4, A, 1	L13740				2,0/2,1	5,1/7,2*	6,8/18,1*/ 4,2 <sup>#</sup> /3,6 <sup>#</sup>
<b>NR4A2</b> nuclear receptor subfamily 4, A, 2	S77154 X75918				13,0 17,4	9,4* 8,0*	13,3*/5,4 <sup>#</sup> 15,0*/2,8 <sup>#</sup>
<b>PIG7<sup>bu</sup></b> LPS-induced TNF- $\alpha$ factor	AL120815						1,7
<b>SRF<sup>b</sup></b> serum response factor	J03161						2,2/2,2*
<b>TIEG<sup>bu</sup></b> TGF- $\beta$ inducible early growth response	AF050110 S81439				1,6 1,5		
<b>TNRC3<sup>b</sup></b> trinucleotide repeat containing 3	AI743134				1,8	3,8	2,3/1,7 <sup>#</sup>
<b>ZFP36<sup>c</sup></b> zinc finger protein 36	M92843				3,6	16,4*	27,4*/5,8 <sup>#</sup>
<b>ZNF9<sup>b,uv</sup></b> zinc finger protein 9	U19765				1,4	1,4	2,0/1,7 <sup>#</sup>
<b>ZNF143</b> zinc finger protein 143	AF071771						3,9*/3,0 <sup>#</sup>
<b>ZNF259<sup>b</sup></b> zinc finger protein 259	AF019767						1,9 <sup>#</sup>

**Tabelle 31:** *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von Transkriptionsfaktoren ermittelt mit U95A Microarrays der Firma Affymetrix. In der ersten Spalte ist der Gennamen und die Abkürzung des Names, in Spalte zwei ist die GenBank-Accession-Nummer vermerkt. Zusätzliche Informationen zu einigen Genen sind im Anhang nachzulesen. In den weiteren Spalten stehen die Faktoren der Regulation des entsprechenden Gens von infizierten gegenüber schein-infizierten Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion. Im oberen Teil der Tabelle stehen Gene, deren Expression nach chlamydialer Infektion ausschließlich vermindert ist. Es folgen Gene, deren Ausrichtung der Regulation sich über den Erhebungszeitraum hinweg ändert und im unteren Teil der Tabelle befinden sich die Gene mit vermehrter Expression nach Infektion. Hervorgehoben sind Regulationen mit einem Faktor über 3,0. Das (\*) weist auf Regulationen hin, bei denen der Faktor der Regulation nicht exakt bestimmt werden kann, da die gemessenen Intensitäten der Genspots kleiner zwei waren. Das (#) weist darauf hin, dass diese Werte aus dem Wiederholungsexperiment mit *C. trachomatis*-infizierten HeLa-Zellen stammen. Mit (UV) sind Gene gekennzeichnet, bei denen auch ein Unterschied in der Genexpression vorlag beim Vergleich von schein-infizierten Zellen mit Zellen, die mit UV-inaktivierten Chlamydien behandelt wurden. Genabkürzungen mit (b) weisen auf Gene hin, die bei *C. pneumoniae*-infizierten HeLa-Zellen gleichgerichtet reguliert sind, (bu) weist auf Gene hin, bei denen in der anderen Spezies ebenfalls eine Regulation vorliegt, die sich aber in der Ausrichtung unterscheidet und (c) bezeichnet Gene, die auch in einem oder beiden Array-Experimenten reguliert waren, die mit Microarrays der Firma Clontech durchgeführt wurden.

Vergleicht man die Genexpression von Transkriptionsfaktoren bei *C. pneumoniae*-infizierten mit schein-infizierten Zellen, so kann man 58 regulierte Transkriptionsfaktoren ermitteln, von denen 25 ausschließlich vermindert und 23 ausschließlich vermehrt exprimiert werden (siehe Tabelle 32). Die Hochregulation von Transkriptionfaktoren ist dabei häufig stärker und setzt auch früher ein.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
<b>ATF3<sup>bu</sup></b> activating transcription factor 3	L19871				<b>-3,4*</b>		
<b>CEBPB<sup>bu</sup></b> CCAAT/enhancer binding protein $\beta$	X52560						-1,3
<b>ETS2<sup>b</sup></b> v-ets oncogene homolog 2	AF017257		-2,8*		-1,8*		
<b>FOXF2<sup>b,uv</sup></b> forkhead box F2	U13220		-1,5*		-1,9*		-2,1*
<b>GILZ</b> glucocorticoid-induced leucine zipper	AI635895				-2,8*	<b>-5,4*</b>	-2,1*
<b>GTF2I<sup>b</sup></b> general transcription factor II, i	AF015553		-1,4*				
<b>GTF3C1<sup>b</sup></b> general transcription factor IIIC, 1	U02619	-1,6					
<b>HIF1A<sup>bu</sup></b> hypoxia-inducible factor 1, $\alpha$						-1,7*	
<b>LMO1<sup>b</sup></b> LIM domain only 1	M26682			-2,5*	-2,2*	<b>-3,7*</b>	<b>-3,3*</b>
<b>LMO4<sup>b</sup></b> LIM domain only 4	U24576			-2,1*	-2,0	-2,4*	
<b>MAZ<sup>b</sup></b> MYC-associated zinc finger protein	M94046		-1,5				

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
MYBL1 <sup>b</sup> v-myb oncogene homolog-like 1	X66087					-2,7*	
NCOR2 <sup>b</sup> nuclear receptor co-repressor 2	U37146		-1,4*				
NFIL3 <sup>bu</sup> nuclear factor, IL-3 regulated	X64318					-2,1*	-1,6*
NFYB nuclear transcription factor Y, $\beta$	AA621555	-1,5				-1,5*	
SMARCA1 <sup>b</sup> SWI/SNF related actin dep. regulator of chromatin, a, 1	M88163					-1,6*	
SREBF1 <sup>b</sup> sterol regulatory element binding transcription factor 1	U00968		-1,7	-1,9	-2,0	-1,8	
SRF <sup>b</sup> serum response factor	J03161	-2,0*/-1,7					
STAT1 <sup>b</sup> signal transducer and activator of transcription 1	M97935					-1,5	
TCF12 <sup>b</sup> transcription factor 12	M80627				-1,6*	-1,9*	
TCF8 transcription factor 8	D15050		-1,4	-1,4	-1,5	-1,4	-1,7
TCFL5 <sup>b</sup> transcription factor-like 5	AB012124		-1,8*		-2,2*	-2,1*	-2,1*
ZNF146 <sup>b</sup> zinc finger protein 146	X70394	-1,8					
ZFX <sup>b,c</sup> zinc finger protein	X59739					-6,7*	
FOS <sup>bu</sup> v-fos oncogene homolog	V01512		3,4*/4,6*	2,0*/2,9*		-3,6*/-2,4*	-3,5*/-2,3*
ID1 <sup>b,uv</sup> inhibitor of DNA binding 1	X77956	-1,5/-1,5	1,7/1,7	1,4			
JUNDB <sup>b</sup> jun B proto-oncogene	X56681	1,2/1,3	-1,5/-1,5	-1,8/-1,7	-1,8/-1,7	-1,4/-1,3	-1,6/-1,6
NR4A1 <sup>bu</sup> nuclear receptor subfamily 4, A, 1	L13740	4,5*/7,2*					-2,7*
PIG7 <sup>bu</sup> LPS-induced TNF- $\alpha$ factor	AF010312	2,1*		-1,4* -1,5*		2,0*	-1,4*
TAF2N <sup>bu</sup> TATA box binding protein-associated factor	U51334	-2,8		1,5		1,4	1,8*

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
TCF3 <sup>bu</sup> transcription factor 3	M31523	-1,6				1,9*	
TIEG <sup>bu</sup> TGF-β inducible early growth response	AF050110 S81439	1,6*	1,6*			-1,7* -2,5*	-1,7*
TNRC3 <sup>uv,b</sup> trinucleotide repeat containing 3	AI743134	-1,3	2,0	2,9	<b>4,3</b>	<b>4,5</b>	2,7
AHR aryl hydrocarbon receptor	L19872					<b>3,6*</b>	<b>3,3*</b>
BRF2 EGF-response factor 2	U07802 X78992	2,0*	2,4*			2,0* <b>3,2*</b>	<b>5,2*</b>
CBF2 <sup>b</sup> CCAAT-box- binding transcription factor	M37197						1,8*/2,2*
CEBPD <sup>b</sup> CCAAT/enhancer binding protein δ	M83667	1,6*					
CREM <sup>b,uv</sup> cAMP responsive element modulator	S68134 S68271	1,8*	<b>4,1/6,0*</b> <b>4,8*</b>	2,6*/2,9* <b>3,2*</b>	<b>3,6/4,6*</b> <b>4,1</b>	1,6 1,4*	
DED apoptosis antagonizing transcription factor	U51698			1,4	1,6	1,6	1,5
DR1 <sup>b</sup> down-regulator of transcription 1	M97388			1,5*			
ETR101 <sup>uv,b</sup> immediate early protein	M62831	1,5	2,3	1,9	2,1	1,7	
ETV4 ets variant gene 4	D12765			<b>3,4*</b>	<b>9,1*</b>	<b>10,1*</b>	<b>3,5*</b>
ETV5 <sup>b</sup> ets variant gene 5	X96381			<b>4,5*</b>	<b>5,3*</b>	<b>4,0*</b>	<b>13,6*</b>
GTF3A <sup>b</sup> general transcription factor IIIA	D32257	1,5					
HRY <sup>b</sup> hairy (Drosophila)- homolog	L19314		<b>4,8*</b>				
JUNB <sup>b</sup> jun B proto- oncogene	M29039 X51345	2,9* <b>4,5*</b>					
KLF5 <sup>b</sup> Kruppel-like factor 5	D14520	2,5*					
LOC51042 <sup>b</sup> zinc finger protein	AI582831	<b>5,5*</b>					
NCOA3 nuclear receptor coactivator 3	AF012108						2,3*/1,7 <sup>#</sup>
NPAS2 neuronal PAS domain protein 2	U77970			2,5*	<b>5,4*</b>	<b>8,0*</b>	<b>4,0*</b>

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
SMARCA4 <sup>bu</sup> SWI/SNF related actin dep. regulator of chromatin ,a, 4	U29175					1,9	
TFAP2 transcription factor AP-2, $\gamma$	U85658					2,5*	1,9*
TIF1B <sup>uv, bu</sup> KRAB-associated protein 1	X97548					1,7	
VDR vitamin D receptor	J03258					2,6*	2,7
ZNF9 <sup>uv, b</sup> zinc finger protein 9	U19765				1,4	1,6	1,2
ZNF162 <sup>bu, uv</sup> zinc finger protein 162	L49380					2,0	
ZNF259 <sup>b</sup> zinc finger protein 259	AF019767					1,8*	

**Tabelle 32: *C. pneumoniae*-induzierte Veränderung der Genexpression von Transkriptionsfaktoren. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

### b) Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, ihre Rezeptoren und assoziierte Proteine

In dieser Gruppe konnten 47 Gene ermittelt werden, die durch *C. trachomatis*-Infektion reguliert wurden (siehe Tabelle 33). Von diesen Genen wurden 15 vermindert und 28 vermehrt exprimiert, wobei letztere viel stärkere Regulationen aufzeigten. Von diesen 47 Genen wurden 40 auch bei *C. pneumoniae*-infizierten Zellen reguliert und davon wiederum 12 mit unterschiedlicher Ausrichtung der Regulation innerhalb des selben Zeitintervalls.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
BMP5 <sup>bu</sup> bone morphogenetic protein 5	M60314						-3,0 <sup>#</sup>
CSF1R <sup>b</sup> colony stimulating factor 1 receptor	M33210				-1,6		-4,1 <sup>#</sup>
DLK1 <sup>b</sup> $\delta$ -like 1 homolog	U15979						-3,0 <sup>#</sup>
EBBP <sup>b</sup> estrogen-responsive B box protein	AF096870	-1,4					-1,8/-2,5*/ -1,6 <sup>#</sup> /-2,7 <sup>#</sup>
EGFL5 <sup>b</sup> epidermal growth factor domain like 5	AB011542					-3,2*	-11,5 <sup>#</sup>
GRB10 <sup>b</sup> growth factor receptor-bound protein 10	D86962						-1,5 <sup>#</sup>
GRN <sup>b</sup> granulin	AF055008				-1,3		-3,1
HASPP28 <sup>b</sup>	U41745			-1,7*			

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
PDGF associated protein							
IFI30 <sup>b</sup> interferon $\gamma$ inducible protein 30	J03909				-1,2/-1,2		-1,5/-1,3/ -1,2 <sup>#</sup>
IGF1 <sup>b</sup> insulin-like growth factor 1	X57025						-3,6 <sup>#</sup>
IGFBP5 <sup>b</sup> IGF binding protein 5	L27560						-12,2 <sup>#</sup> /-4,7 <sup>#</sup>
INSL4 <sup>b</sup> insulin-like 4	L34838						-2,5 <sup>#</sup>
IRS1 insulin receptor substrate 1	S62539						-4,1 <sup>#</sup> /-4,5 <sup>#</sup>
LOC51141 <sup>b</sup> insulin induced protein 2	AL080184						-1,6 <sup>#</sup>
TRIP7 <sup>b</sup> thyroid hormone receptor interactor 7	AA845349					-1,5	-1,5 <sup>#</sup>
HDGF <sup>bu</sup> hepatoma derived growth factor	D16431					1,4	-1,6
KOC1 <sup>bu</sup> IGF-II mRNA- binding protein 3	U97188				1,3		-1,5 <sup>#</sup>
TGFB1 <sup>bu</sup> transforming growth factor $\beta$ 1	M38449			-1,5		1,6	1,8/1,6 <sup>#</sup>
VEGF <sup>bu,c</sup> vascular endothelial growth factor	AF022375 AF024710 M63978				1,3 1,2		-1,8/-1,4 <sup>#</sup> -1,6 <sup>#</sup> 2,0 <sup>#</sup>
AREG amphiregulin	M30704					8,8*	12,1*/6,1 <sup>#</sup>
CTGF <sup>b</sup> connective tissue growth factor	X78947	1,3		5,3*	8,9	11,2*	9,8/2,0 <sup>#</sup>
CXCR4 <sup>bu,c</sup> cxc chemokine receptor 4	L06797				2,0	2,5	1,6
CYR61 <sup>b</sup> angiogenic inducer 61	Y11307			4,1*	4,3	7,8*	26,7/4,3 <sup>#</sup>
EGFR <sup>b</sup> epidermal growth factor receptor	X00588				1,8		
FGF2 fibroblast growth factor 2	M27968					3,4*	2,8 <sup>#</sup>
GH1,CSH1, GH2,CSH2 <sup>b</sup> human growth hormone 1, 2 and chorionic somato- mamotropin 1, 2, 5	J03071						1,5
HBP17 <sup>bu</sup>	M60047				1,6	1,9	2,6

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
heparin-binding growth factor binding protein 17							
IFITM1 <sup>b</sup> interferon induced transmembrane protein 1	J04164				1,3	2,0/2,7	1,4/2,0/1,7 <sup>#</sup>
IFITM2 <sup>b</sup> IFN induced transmembrane protein 2	X57351					2,9	1,6 <sup>#</sup>
IFITM3 <sup>b</sup> IFN induced transmembrane protein 3	X57352					2,1	1,5
IFNGR1 IFN- $\gamma$ receptor $\alpha$ chain	U19247						2,5*/1,8 <sup>#</sup>
IFRD1 IFN-related developmental regulator 1					1,4		1,5*/1,4 <sup>#</sup>
<b>IGFBP3</b> <sup>bu,c</sup> insulin like growth factor binding protein 3	M35878					<b>3,2*/3,6*</b>	
IGFBP4 <sup>bu</sup> IGF binding protein 4	M62403 U20982				1,2	1,9* 1,8	1,8 <sup>#</sup> 1,5 <sup>#</sup>
<b>IL4R</b> <sup>b</sup> interleukin 4 receptor	X52425				2,0	<b>3,6*</b>	
<b>IL6</b> interleukin 6	X04430				<b>9,6</b>	<b>16,2*</b>	<b>13,1*/3,8<sup>#</sup></b>
<b>IL8</b> <sup>b,c</sup> interleukin 8	M17017 M28130				<b>15,7</b> <b>33,4</b>	<b>17,5*</b> <b>100,0</b>	<b>32,6*/57,0<sup>#</sup></b> <b>93,5/100<sup>#</sup></b>
<b>IL11</b> <sup>b,c</sup> interleukin 11	X58377		2,0*		<b>18,6</b>	<b>28,9*</b>	<b>22,0*/6,0<sup>#</sup></b>
INSIG1 <sup>bu</sup> insulin induced gene 1	U96876				1,2		1,4
<b>ISG15</b> <sup>b</sup> interferon stimulated protein 15 kD	AA203213 M13755				<b>4,3</b> <b>3,2</b>	<b>9,3*</b> <b>4,0</b>	<b>7,4*/8,5<sup>#</sup></b> <b>5,1/7,4<sup>#</sup></b>
<b>ISG20</b> interferon stimulated protein 20 kD	U88964					<b>17,2*</b>	<b>8,3*/3,3<sup>#</sup></b>
<b>MIP-2<math>\alpha</math></b> <sup>b,c</sup> macrophage inflammatory protein 2 $\alpha$	M36820				<b>7,9</b>	<b>5,8*</b>	<b>12,6<sup>#</sup></b>
PBEF <sup>bu</sup> pre-B-cell colony-enhancing factor	U02020				1,5	1,6*	1,6 <sup>#</sup>
<b>PLAB</b> <sup>b</sup> prostate differentiation factor	AB000584				<b>4,6</b>	<b>5,2</b>	<b>4,5/3,4<sup>#</sup></b>
<b>PTGS2</b> <sup>bu</sup> prostaglandin-endo-peroxide synthase 2	U04636				<b>3,0</b>	<b>4,3*</b>	<b>3,3*/2,0<sup>#</sup></b>

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
TNFRSF1A <sup>b</sup> TNF receptor superfamily, 1a	M58286				1,5		
TSC22 <sup>b</sup> TGF-β-stimulated protein 22	AJ222700				1,2	2,1	1,8

**Tabelle 33: *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von Genen, die für Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, deren Rezeptoren und assoziierte Proteine kodieren. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

Die Infektion mit *C. pneumoniae* führte zur Veränderung der Expression von 47 Proteinen in der Gruppe der Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, ihrer Rezeptoren und assoziierter Proteine (siehe Tabelle 34). Dabei wurden weniger Gene vermindert (16) als vermehrt (23) exprimiert.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
<b>CSF1R<sup>b</sup></b> colony stimulating factor 1 receptor	M33210		-2,8*	-3,7*		-4,4*	-19,5*
<b>DLK1<sup>b</sup></b> δ-like 1 homolog	U15979					-11,8*	-14,9*
<b>EBBP<sup>b</sup></b> estrogen-responsive B box protein	AF096870		-1,5	-1,5	-1,4		-1,5
<b>EGFL5<sup>b</sup></b> epidermal growth factor domain like 5	AB011542		-1,8*	-1,9*			
<b>EPS15</b> EGF receptor pathway substrate 15	Z29064				-1,5*	-1,6*	
<b>GRB10<sup>b</sup></b> growth factor receptor-bound protein 10	D86962						-1,5*
<b>GRN<sup>uv,b</sup></b> granulin	AF055008				-2,3	-4,0	-2,9
<b>IGF1<sup>b</sup></b> insulin-like growth factor 1	X57025						-5,5*
<b>IGFBP3<sup>bu,c</sup></b> insulin like growth factor binding protein 3	M35878					-1,5	-3,5/-3,3
<b>IGFBP5<sup>b</sup></b> IGF binding protein 5	L27560						-4,6*/-3,7*
<b>INSL4<sup>b,uv</sup></b> insulin-like 4	L34838			-1,8*	-3,3*	-5,7*	-3,3*
<b>LOC51141<sup>b</sup></b> insulin induced protein 2	AL080184				-1,8*	-3,3*	-2,0*
<b>PBEF<sup>bu</sup></b> pre-B-cell colony-enhancing factor	U02020					-1,7*	



Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
TRIP7 <sup>b</sup> thyroid hormone receptor interactor 7	AA845349			-1,2		-1,6	
VEGF <sup>bu,c</sup> vascular endothelial growth factor	AF022375 AF024710				-1,4 -1,4	-1,9* -1,5*	-2,0 -1,7
WISP2 <sup>uv</sup> WNT1 inducible signaling pathway protein 2	AF100780			-1,6*	-2,1*	-2,6*	<b>-4,2*</b>
CXCR4 <sup>uv, bu, c</sup> cxc chemokine receptor 4	L06797	2,4	2,0		1,3	-1,3	-1,4
HASPP28 <sup>b</sup> PDGF associated protein	R98910 U41745	-1,5* -2,1*/-2,0				1,7*	
HBP17 <sup>bu</sup> heparin-binding growth factor binding protein 17	M60047		<b>4,4</b>	2,7*	2,5	1,5	-1,6
IFI30 <sup>uv, b</sup> interferon $\gamma$ inducible protein 30	J03909	1,3	-1,3	-1,5/-1,4	-1,6/-1,5	-1,8/-1,7	-1,6/-1,5
IGFBP4 <sup>bu</sup> IGF binding protein 4	M62403 U20982	2,5 2,0	1,4	1,8* 1,5			-1,5 -1,5
INSIG1 <sup>uv, bu</sup> insulin induced gene 1	U96876		1,4*	-1,4*		-1,9	-1,6
PTGS2 <sup>bu</sup> prostaglandin-endo-peroxide synthase 2	U04636	<b>3,7*</b>	<b>8,1*</b>	<b>6,3*</b>	<b>4,3*</b>	<b>3,3*</b>	-2,1*
TRIP6 thyroid hormone receptor interactor 6	AJ001902	-1,4				1,6	
BMP5 <sup>bu</sup> bone morphogenetic protein 5	M60314				1,6		
CTGF <sup>uv, b</sup> connective tissue growth factor	X78947	1,5	<b>3,0*</b>	<b>11,7*</b>	<b>10,7*</b>	<b>8,6*</b>	2,0*
CYR61 <sup>b</sup> angiogenic inducer 61	Y11307			<b>3,6*</b>	2,6*		
DKK1 Dickkopf-1	AB020315	2,3*		<b>6,4*</b>			
EGFR <sup>b</sup> epidermal growth factor receptor	X00588	2,8*	2,0*	2,5*		2,9*	
GH1, CSH1, GH2, CSH2 <sup>b</sup> human growth hormone 1, 2 and chorionic somatomammotropin 1, 2, 5	J03071		1,4*				
HDGF <sup>bu</sup> hepatoma derived growth factor	D16431					1,5	

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
IFITM1 <sup>b</sup> interferon induced transmembrane protein 1	J04164			1,2	1,4	1,3	
IFITM2 <sup>b,uv</sup> IFN induced transmembrane protein 2	X57351	1,6		1,4	2,0	2,6	1,5
IFITM3 <sup>b</sup> IFN induced transmembrane protein 3	X57352				1,4	1,2	
IFRD2 IFN-related developmental regulator 2	U09585					1,9	1,5
<b>IL4R<sup>b</sup></b> interleukin 4 receptor	X52425			<b>3,4*</b>	<b>3,2*</b>	<b>3,8*</b>	2,1*
<b>IL8<sup>b,c</sup></b> interleukin 8	M28130				<b>19,6*</b>	<b>17,6*</b>	
<b>IL11<sup>uv,b,c</sup></b> interleukin 11	X58377	2,6	<b>14,8*</b>	<b>15,3*</b>	<b>14,3*</b>	<b>6,2*</b>	
ISG15 <sup>b</sup> interferon stimulated protein 15 kD	M13755		1,8*	1,6*	2,1*	1,8*	
KOC1 <sup>bu,uv</sup> IGF-II mRNA-binding protein 3	U97188		1,5	2,0	1,5	1,4	1,3
<b>MIP-2<math>\alpha</math><sup>b,c</sup></b> macrophage inflammatory protein 2 $\alpha$	M36820	<b>4,7*</b>					
<b>NOV</b> nephroblastoma overexpressed gene	X96584			2,5*			<b>3,2*</b>
<b>NTSR1</b> neurotensin receptor 1	X70070		<b>6,1*</b>	<b>11,8*</b>		<b>18,9*</b>	<b>23,1*</b>
PLAB <sup>b</sup> prostate differentiation factor	AB000584	2,6*			1,8		
TGFB1 <sup>uv,bu</sup> transforming growth factor $\beta$ 1	M38449					1,7	
TNFRSF1A <sup>b</sup> TNF receptor superfamily, 1a	M58286					1,6*	
TSC22 <sup>uv,b</sup> TGF- $\beta$ -stimulated protein 22	AJ222700		1,8*	1,9*	1,4*		

**Tabelle 34:** *C. pneumoniae*-induzierte Veränderung der Genexpression von Genen, die für Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, deren Rezeptoren und assoziierte Proteine kodieren. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.

### c) Proteine der intrazellulären Signaltransduktion

Bei der Verwendung von Affymetrix Microarrays (U95A) konnten 45 Gene der intrazellulären Signaltransduktion ermittelt werden, die durch Infektion mit *C. trachomatis* verändert exprimiert wurden (siehe Tabelle 35). Von diesen wurde bei 10 Genen die Expression vermin-

dert und bei 32 vermehrt, wobei die Faktoren der Hochregulation meist stärker waren. Die meisten Gene (30) wurden auch nach Infektion mit *C. pneumoniae* bei HeLa-Zellen reguliert, von denen nur 2 sich in der Ausrichtung der Regulation von dem durch *C. trachomatis*-induzierten Effekt unterschieden.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
CALM3 calmodulin 3	J04046				-1,4	-1,7	-2,8*
<b>PRKACB</b> PKA, catalytic, $\beta$	M34181					-2,9*	<b>-4,9<sup>#</sup></b>
PRKARIA <sup>b</sup> PKA, type I, $\alpha$ , regulatory subunit	M33336						-1,6/-1,4/ -1,3/-1,5 <sup>#</sup> / -1,4 <sup>#</sup> /-1,5 <sup>#</sup>
<b>PTPN13</b> protein tyrosine phosphatase, non- receptor type 13	U12128						-2,0*/-3,0 <sup>#</sup>
RAB5C <sup>b</sup> member Ras oncogene family	U18420			-2,9			
RAGA <sup>b</sup> Ras-related GTP- binding protein	U41654					-1,4	-2,5/-2,1 <sup>#</sup>
RGS2 <sup>b</sup> regulator of G- protein signalling 2	L13463						-1,4 <sup>#</sup>
TOB1 <sup>b,c</sup> transducer of ERBB2, 1	D38305					-1,3	-1,5
YWHAH <sup>b</sup> 14-3-3 protein eta	D78577					-1,2	-1,2/-2,0 <sup>#</sup>
YWHAQ <sup>b</sup> 14-3-3 protein tau	X56468						-1,4/-1,4/ -1,5 <sup>#</sup> /-1,4 <sup>#</sup>
ARHGDI <sup>a</sup> Rho GDP dissoci- ation inhibitor $\alpha$	X69550			-1,7			1,8 <sup>#</sup>
SFN <sup>bu,c</sup> 14-3-3 protein sigma, stratifin	X57348		1,4/1,3		-1,1	-1,4/-1,4	-1,4/-1,2
<b>YWHAE<sup>bu</sup></b> 14-3-3 protein $\epsilon$	U54778		<b>-3,0</b>	-2,2			-2,1/1,5 <sup>#</sup>
<b>AKAP2<sup>b</sup></b> A kinase (PKA) anchor protein 2	AB023137				1,9		<b>6,2*/2,7<sup>#</sup></b>
<b>AKAP12</b> A kinase (PKA) anchor protein 12	U81607				1,7	<b>3,2*</b>	2,5/2,2 <sup>#</sup>
ARHC <sup>b</sup> Ras homolog gene family, member C	L25081				1,2	1,9	1,8/1,6 <sup>#</sup>
AXL <sup>c</sup> tyrosine-protein kinase receptor UFO	M76125				1,2	1,9*	
<b>BCAR3<sup>b</sup></b> breast cancer anti- estrogen resistance 3	U92715				<b>6,3</b>	<b>8,6*</b>	<b>20,3*/1,8<sup>#</sup></b>

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
<b>DUSP1<sup>b</sup></b> dual specificity phosphatase 1	X68277				5,2	8,1	9,2/5,7 <sup>#</sup>
<b>DUSP2<sup>b</sup></b> dual specificity phosphatase 2	L11329				4,0	16,0*	30,9*/16,0 <sup>#</sup>
<b>DUSP4<sup>b</sup></b> dual specificity phosphatase 4	U48807				4,4	16,1*	14,4/2,7 <sup>#</sup>
<b>DUSP5</b> dual specificity phosphatase 5	U15932				12,9	25,1*	32,1/7,5 <sup>#</sup>
<b>DUSP6<sup>b</sup></b> dual specificity phosphatase 6	AB013382				3,9		
<b>FHL2<sup>b</sup></b> four and a half LIM domains 2	U29332			2,0*	2,1	2,6*	3,3*/1,6 <sup>#</sup>
<b>GADD45A<sup>c</sup></b> growth arrest and DNA-damage-inducible 45	M60974				1,4	1,7*	2,1/2,1 <sup>#</sup>
<b>GEM<sup>b,c</sup></b> Ras-like protein KIR	U10550				2,3	7,8*	6,0*/3,6 <sup>#</sup>
<b>GNAI1</b> G protein, $\alpha$ inhibiting activity, 1	AL049933	1,4					2,0 <sup>#</sup>
<b>LNK<sup>b,c</sup></b> lymphocyte adaptor protein	AF055581				2,3		3,6*
<b>MAP2K3<sup>b</sup></b> mitogen-activated protein kinase kinase 3	D87116 L36719				2,1 1,5	19,3*	16,1*/3,7 <sup>#</sup> 2,6 <sup>#</sup>
<b>MAPK6</b> mitogen-activated protein kinase 6	X80692				1,3		1,7
<b>MAPKAPK2<sup>b</sup></b> MAPK-activated protein kinase 2	U12779				1,2	2,0	2,2/2,3 <sup>#</sup>
<b>NF1</b> neurofibromin 1	D12625						2,6*/ 9,8 <sup>#</sup> /3,5 <sup>#</sup>
<b>NRAS</b> neuroblastoma RAS v-ras homolog	X02751						2,3*/3,9 <sup>#</sup>
<b>PSCD1<sup>b</sup></b> pleckstrin homology	M85169				3,0	3,5*	3,6*/2,2 <sup>#</sup>
<b>RAB31<sup>b</sup></b> Ras family member	U59877						1,9
<b>RAC1<sup>b</sup></b> Ras family member	D25274 M29870					1,4 1,5	1,5/1,2 <sup>#</sup> 1,7/1,3 <sup>#</sup>
<b>RALA</b> v-ral homolog A	M29893						3,5*/2,3 <sup>#</sup>
<b>RAP1B</b> Ras family member	AL080212						1,5/1,3 <sup>#</sup>

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
<b>SGK</b> <sup>b,c</sup> serum/glucocorticoid-regulated protein kinase	Y10032				2,5	3,1	1,5/1,6 <sup>#</sup>
<b>SHC1</b> <sup>b</sup> Src homology 2 domain-containing transforming protein 1	U73377					1,6	1,4
<b>TGM2</b> <sup>b</sup> transglutaminase 2, C	M55153				5,1	11,2*	9,0*/3,6 <sup>#</sup>
<b>TM4SF1</b> <sup>b</sup> transmembrane 4 superfamily, 1	AI445461 M90657			1,7*	3,7 4,0	5,6 8,3	7,7/2,2 <sup>#</sup> 8,5/3,7 <sup>#</sup>
<b>TRIP15</b> thyroid receptor interacting protein 15	AF084260 L40388						1,5/1,6 <sup>#</sup> 1,6 <sup>#</sup>
<b>UGCG</b> UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	D50840				1,9	2,6*	5,6/2,6 <sup>#</sup>
<b>YWHAZ</b> <sup>b</sup> 14-3-3 protein zeta	U28964						1,2 <sup>#</sup>

**Tabelle 35:** *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen der intrazellulären Signaltransduktion. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.

32 Gene der intrazellulären Signaltransduktion konnten ermittelt werden, die durch die Infektion von HeLa-Zellen mit *C. pneumoniae* verändert reguliert wurden. Von diesen wurden nur bei 5 die Expression vermindert, und dies mit sehr geringen Faktoren und bei 22 die Expression verstärkt (siehe Tabelle 36).

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
<b>PRKAR1A</b> <sup>b</sup> PKA, type I, $\alpha$ , regulatory subunit	M33336	-1,4*					
<b>SFN</b> <sup>bu,c</sup> 14-3-3 protein sigma, stratifin	X57348	-1,2/-1,2					
<b>TOB1</b> <sup>b,c</sup> transducer of ERBB2, 1	D38305			-1,3	-1,7		
<b>YWHAH</b> <sup>b</sup> 14-3-3 protein eta	D78577	-1,2					
<b>YWHAQ</b> <sup>b</sup> 14-3-3 protein tau	X56468	-1,6					
<b>ARHGDI</b> <sup>uv,b</sup> Rho GDP dissociation inhibitor $\alpha$	X69550		-1,4			2,8	1,8
<b>MAPKAPK2</b> <sup>b</sup> MAPK-activated protein kinase 2	U12779	-1,7				2,0*	
<b>RAB5C</b> <sup>b</sup> member Ras oncogene family	U18420		-1,9	2,2		1,6	1,7*
<b>RGS2</b> <sup>b,uv</sup>	L13463	1,7			-1,4*	-1,7*	-1,6*

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
regulator of G-protein signalling 2							
YWHAE <sup>uv,bu</sup> 14-3-3 protein ε	U54778	1,9*	-1,4*		-1,5*		
<b>AKAP2<sup>b</sup></b> A kinase (PRKA) anchor protein 2	AB023137				<b>3,2*</b>	<b>5,2*</b>	
ARHC <sup>b</sup> Ras homolog gene family, member C	L25081	1,7	1,4	1,5	1,5	1,4	
<b>BCAR3<sup>uv,b</sup></b> breast cancer anti-estrogen resistance 3	U92715		<b>5,4*</b>	<b>8,6*</b>	<b>7,2*</b>	<b>7,4*</b>	2,4*
<b>DUSP1<sup>b</sup></b> dual specificity phosphatase 1	X68277	<b>6,7*</b>	<b>6,4*</b>				
<b>DUSP2<sup>b</sup></b> dual specificity phosphatase 2	L11329	<b>24,2*</b>					
<b>DUSP4<sup>b</sup></b> dual specificity phosphatase 4	U48807	<b>3,2*</b>	<b>11,8*</b>	<b>18,1*</b>	<b>12,2*</b>	<b>14,2*</b>	2,7*
<b>DUSP6<sup>b</sup></b> dual specificity phosphatase 6	AB013382		<b>6,4*</b>		<b>9,2*</b>	<b>8,1*</b>	<b>5,5*</b>
FHL2 <sup>b</sup> four and a half LIM domains 2	U29332	1,7		1,9*	1,7*		
<b>GEM<sup>b,c</sup></b> Ras-like protein KIR	U10550	<b>6,7*</b>					
<b>IRAK1</b> IL-1 receptor-associated kinase 1	L76191				1,9*	<b>4,1</b>	2,1*
LNK <sup>b,c</sup> lymphocyte adaptor protein	AF055581		2,6*		2,6*	2,8*	
MAP2K3 <sup>b</sup> mitogen-activated protein kinase kinase 3	D87116 L36719	1,8 2,2*	1,8*	2,4*	2,3*	2,6*	
MAPKAPK3 MAPK-activated protein kinase 3	U09578					2,4*	1,9*
<b>PSCD1<sup>b</sup></b> pleckstrin homology	M85169		1,7*	<b>3,1*</b>	2,0*		
RAB31 <sup>b</sup> Ras family member	AI189226 U59877			1,4	1,4		
RAC1 <sup>b</sup> Ras family member	M29870	1,4				1,3	
<b>SGK<sup>b,c</sup></b> serum/glucocorticoid-regulated protein kinase	Y10032		2,8	1,9*	<b>3,3</b>	1,7*	
SHC1 <sup>b</sup> Src homology 2 domain-containing transforming protein 1	U73377			1,3	1,4	1,7	

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
<b>TGM2<sup>b</sup></b> transglutaminase 2, C	M55153		<b>8,8*</b>		<b>7,7*</b>	<b>12,8*</b>	2,2*
<b>TM4SF1<sup>b</sup></b> transmembrane 4 superfamily, 1	AI445461 M90657	1,3	2,1 2,6	<b>3,8</b> <b>4,0</b>	<b>3,6</b> <b>4,0</b>	2,2 <b>3,4</b>	1,3 1,6
YWHAB 14-3-3 protein $\beta$	X57346	1,5				1,4	
YWHAZ <sup>b</sup> 14-3-3 protein zeta	M86400 U28964				1,2	1,4 1,5	

**Tabelle 36: *C. pneumoniae*-induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen der intrazellulären Signaltransduktion. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

#### **d) Proteine der Zellzyklus-Kontrolle**

Es konnten 17 Proteine der Zellzyklus-Kontrolle ermittelt werden, deren Expression sich durch die Infektion mit *C. trachomatis* veränderte (siehe Tabelle 37). Von diesen wurden 11 Gene ausschließlich vermindert und 5 vermehrt exprimiert. 11 wurden auch durch Infektion mit *C. pneumoniae* reguliert und 4 davon anders gerichtet als bei *C. trachomatis* infizierten Zellen.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
CCNB1 cyclin B1	M25753					-1,3	-1,6/-2,1 <sup>#</sup> / -2,1 <sup>#</sup>
CCND1 <sup>bu,uv</sup> cyclin D1	M73554 X59798						-2,0 <sup>#</sup> -2,0 <sup>#</sup>
CCNE2 <sup>b</sup> cyclin E2	AF091433					-2,6*	
CCNF cyclin F	Z36714				-1,3		-2,9 <sup>#</sup>
CDC20 <sup>bu,c</sup> cell division cycle 20	U05340						-1,8 <sup>#</sup>
CDC7L1 cell division cycle 7-like 1	AB003698						-1,6*/-2,0 <sup>#</sup>
CDKN1B <sup>b</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	AI304854						-1,9 <sup>#</sup> / -2,9 <sup>#</sup>
CDKN2C <sup>b</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor 2C	AF041248				-1,2	-2,0	-2,4*/-1,9 <sup>#</sup>
CDKN3 <sup>b</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor 3	L25876					-1,8*	-2,3 <sup>#</sup>
<b>GAR22<sup>bu</sup></b> GAS2-related on chromosome 22	Y07846						<b>-3,4<sup>#</sup></b>
<b>GAS1<sup>b</sup></b> growth arrest-specific 1	L13698				-1,8/-1,6	<b>-12,5*/-4,6*</b>	<b>-4,7*/-7,4<sup>#</sup></b>

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
CDKN1C <sup>b</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	D64137 U22398			1,5	-1,3 -1,2	-1,6 -1,6/-1,5	-2,5/1,3 <sup>#</sup> -2,0/ -1,8/1,3 <sup>#</sup>
CCNH cyclin H	U11791				1,2		2,3/1,8 <sup>#</sup>
CDK7 cyclin-dependent kinase 7	L20320 X77743						2,2*/1,6 <sup>#</sup> 2,2*/1,8 <sup>#</sup>
CKS1 <sup>bu</sup> CDC28 protein kinase 1	AA926959						1,5
<b>GADD34<sup>b</sup></b> growth arrest and DNA-damage-inducible 34	U83981				1,8	<b>3,3*</b>	<b>4,2*/4,9<sup>#</sup></b>
<b>SNK</b> serum-inducible kinase	AF059617						<b>8,4*/8,5<sup>#</sup></b>

**Tabelle 37: *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von Genen, die bei der Kontrolle des Zellzyklus eine Rolle spielen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

Nach Infektion mit *C. pneumoniae* konnten 16 Proteine der Zellzyklus-Kontrolle mit unterschiedlicher Expression (verglichen mit schein-infizierten Zellen) ermittelt werden (siehe Tabelle 38). Bei 9 Proteinen wurde die Expression nach Infektion ausschließlich vermindert, bei 4 Proteinen ausschließlich vermehrt, wobei die Verminderung der Genexpression mit größeren Faktoren behaftet ist.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
CCNE2 <sup>b</sup> cyclin E2	AF091433					-2,6*	
CCNG1 cyclin G1	X77794					-1,7*	-1,4*
CCNG2 cyclin G2	U47414				-2,0*	-2,5*	-1,8*
CDC2 cell division cycle 2	D88357 X05360					-1,5	-1,6* -1,5
CDKN1B <sup>b</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	AI304854				-1,6*	-2,5*	-1,8*
<b>CDKN1C<sup>b</sup></b> cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	D64137 U22398			<b>-3,0*</b> <b>-3,4/-2,6</b>	<b>-4,0</b> <b>-3,5/-3,4</b>	<b>-4,7</b> <b>-4,1/-3,8</b>	-2,3 -2,8/-2,6
CDKN2C <sup>b</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor 2C	AF041248		-1,6	-1,6	-2,2	-1,7	-1,7
CDKN3 <sup>b</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor 3	L25876			-1,4		-1,4	
<b>GAS1<sup>b</sup></b> growth arrest-specific 1	L13698		-2,7*	<b>-3,5*/-2,3*</b>	<b>-12,8*/-2,3*</b>	-2,0*	<b>-3,0*/-2,0*</b>



Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
<b>CCND1</b> <sup>bu</sup> cyclin D1	M64349	2,4*	2,1*	1,9*	2,8*	2,6*	2,0*
	M73554		1,4	2,9	<b>4,3</b>	<b>3,3</b>	2,7
	X59798	-1,3	1,4	2,1	2,2	2,7	2,1
<b>CDKN1A</b> <sup>uv</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	U03106	2,5*		-1,8*		<b>-4,3</b>	<b>-3,8</b>
<b>CKS1</b> <sup>bu</sup> CDC28 protein kinase 1	AA926959		1,5			-1,3	-1,3
<b>CDC20</b> <sup>bu,c</sup> cell division cycle 20	U05340	1,3				1,4	
<b>GADD34</b> <sup>b</sup> growth arrest and DNA-damage- inducible 34	U83981	2,3*		1,9*			
<b>GAR22</b> <sup>bu</sup> GAS2-related on chromosome 22	Y07846					1,9*	1,9*
<b>GSPT1</b> G1 to S phase transition 1	X17644					2,4*	1,4*

**Tabelle 38: *C. pneumoniae*-induzierte Veränderung der Genexpression von Genen, die bei der Kontrolle des Zellzyklus eine Rolle spielen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

#### e) Proteine des Zytoskelett und assoziierte Proteine

Es wurden 29 Gene ermittelt, die zum Zytoskelett zählen oder in Assoziation mit diesem stehen und deren Genexpression nach Infektion mit *C. trachomatis* verändert war (siehe Tabelle 39). Ein größerer Anteil der Gene zeigte eine verminderte (18), ein kleinerer eine vermehrte (11) Expression. Bis auf ein Gen (Actin  $\alpha$ 1) wurden alle auch nach Infektion mit *C. pneumoniae*, im Vergleich mit schein-infizierten Zellen, verändert exprimiert, wobei sich die Ausrichtung der Expressions-Änderung zwischen *C. pneumoniae*-infizierten und *C. trachomatis*-infizierten Zellen gegenüber schein-infizierten Zellen in 11 Fällen innerhalb des gleichen Zeitintervalls unterschied.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
<b>ACTA1</b> actin, $\alpha$ 1	W25984					<b>-4,0*</b>	<b>-8,9<sup>#</sup></b>
<b>DNCI2</b> <sup>b</sup> dynein, intermediate polypeptide 2	AI986201						-1,5
<b>KNSL1</b> <sup>b</sup> kinesin-like 1	U37426					-2,2*	-2,9*/-4,6 <sup>#</sup>
<b>LMNA</b> <sup>bu</sup> lamin A/C	M13452			-1,7*			
<b>LMNB1</b> <sup>bu</sup> lamin B1	L37747					-1,5*	-2,1*/-2,9 <sup>#</sup>
<b>MAP7</b> <sup>b</sup> microtubule- associated protein 7	X73882						-2,0 <sup>#</sup>

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
MYO10 <sup>bu</sup> myosin X	AB018342						-2,8 <sup>#</sup>
MYPT1 <sup>b</sup> myosin phosphatase, target subunit 1	D87930					-2,0*	-2,7 <sup>#</sup>
PPL <sup>b</sup> periplakin	AF001691						-11,7 <sup>#</sup>
SPTAN1 <sup>b</sup> spectrin, $\alpha$	J05243				-1,4	-2,0*	-2,2*/-1,9 <sup>#</sup>
TBCD <sup>b</sup> tubulin-specific chaperone d	AB023205						-3,0*
TUBA1 <sup>bu</sup> tubulin, $\alpha$ 1	X06956						-1,6/-1,4 <sup>#</sup>
TUBA3 <sup>b</sup> tubulin, $\alpha$ 3	X01703					-1,9	-2,5/-1,7 <sup>#</sup>
TUBB <sup>b</sup> tubulin, $\beta$	J00314 V00599 X79535		-1,3				-1,8/1,5 <sup>#</sup> -1,5 1,8 <sup>#</sup>
TUBB2 <sup>bu</sup> tubulin, $\beta$ , 2	X02344		-1,3/-1,2		-1,2/-1,1	-1,3	-1,7/-1,7 -1,8 <sup>#</sup> /-1,6 <sup>#</sup>
TUBB4 <sup>bu</sup> tubulin, $\beta$ , 4	U47634		-1,3		-1,1		-1,6/-1,5 <sup>#</sup>
TUBB5 <sup>bu</sup> tubulin, $\beta$ , 5	X00734						-1,7/-1,6 <sup>#</sup>
TUBG1 <sup>bu</sup> tubulin, $\gamma$ 1	M61764						-1,3 <sup>#</sup>
ACTN1 <sup>b</sup> actinin, $\alpha$ 1	M95178 X15804				1,2 1,2	1,7*	1,9* 2,4*
ACTR2 <sup>bu</sup> actin-related protein 2	AF006082	1,3					
ARPC2 <sup>b</sup> actin related protein 2/3 complex, subunit 2	U50523					1,6	1,6
DMD <sup>b</sup> dystrophin	M18533				3,8	5,4*	4,5*
KIFC3 <sup>b</sup> kinesin family C3	AL041493				1,6	2,0	2,7
KRT10 <sup>uv,b</sup> keratin 10	X14487					1,6	2,2/1,6 <sup>#</sup>
KRT17 <sup>bu</sup> keratin 17	Z19574				1,4	2,8	2,1/1,8 <sup>#</sup>
KRT18 <sup>b</sup> keratin 18	M26326				1,1		1,6
MAP1ALC3 <sup>bu</sup> microtubule-ass. proteins 1A, 1B	W28807					1,4	1,5/1,3 <sup>#</sup>
MLCB <sup>b</sup> myosin, light polypeptide	X54304				1,4	1,7	1,8

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
<b>S100A11<sup>b</sup></b> calgizzarin	D38583					17,5*	4,2/2,0 <sup>#</sup>

**Tabelle 39: *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen des Zytoskeletts und assoziierten Proteinen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

Nach Infektion mit *C. pneumoniae* konnten 35 Gene des Zytoskeletts ermittelt werden, deren Genexpression sich, im Vergleich zur Genexpression bei schein-infizierten Zellen, verändert hatte (siehe Tabelle 40). Von diesen Genen wurden 9 vermindert und 21 vermehrt exprimiert.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
ACTR2 <sup>b</sup> actin-related protein 2	AF006082	-1,5*					
DNCI2 <sup>b</sup> dynein, intermediate polypeptide 2	AI986201					-1,3	
KNSL1 <sup>b</sup> kinesin-like 1	U37426					-1,5*	
MAP1ALC3 <sup>bu</sup> microtubule-ass. proteins 1A, 1B	W28807					-1,6	-1,6
MAP7 <sup>b</sup> microtubule-associated protein 7	X73882				-1,9*		-2,2*
MYL1 myosin, light polypeptide 1	AI127424					-1,5*	-1,4*
MYPT1 <sup>b</sup> myosin phosphatase, target subunit 1	D87930					-2,1*	
<b>PPL<sup>b</sup></b> periplakin	AF001691				-2,5*	-2,2*	<b>-4,4*</b>
TBCD <sup>b</sup> tubulin-specific chaperone d	AB023205						-1,4*
ACTC actin, $\alpha$ -cardiac	J00073	2,1*	-2,2*				
KIFC3 <sup>b</sup> kinesin family C3	AL041493	-1,5		1,6		1,9	
KRT17 <sup>bu</sup> keratin 17	Z19574	1,8				-2,0	-2,8
SPTAN1 <sup>b</sup> spectrin, $\alpha$	J05243	1,9*	-1,5*				
TUBA3 <sup>uv,b</sup> tubulin, $\alpha$ 3	X01703		1,2	-1,8	-2,1	-2,5	-2,0
ACTN1 <sup>b</sup> actinin, $\alpha$ 1	M95178 X15804	1,7 1,6	1,6	1,4 1,6	1,7 1,6	2,2	
ACTN4 <sup>uv</sup> actin, $\alpha$ 4	U48734	1,4				1,5	
ARPC2 <sup>b</sup> actin related protein 2/3 complex, subunit 2	U50523	1,4			1,3		

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
<b>DCAMKL1</b> doublecortin and CaM kinase-like 1	AB002367		3,2*	6,6*	5,6*		
<b>DMD<sup>b</sup></b> dystrophin	M18533		2,7*	4,4*	6,2*	5,0*	3,0*
KRT7 keratin 7	AJ238246	1,6*		1,6*			
KRT10 <sup>uv,b</sup> keratin 10	X14487	1,4				1,3	
KRT18 <sup>b</sup> keratin 18	M26326	1,4	1,8	1,6	1,6	2,1	1,6
LMNA <sup>bu</sup> lamin A/C	M13452			1,5		1,4	
LMNB1 <sup>bu</sup> lamin B1	L37747					1,4	
MLCB <sup>b</sup> myosin, light polypeptide	X54304	1,4	1,3	1,5	1,4		
MYO10 <sup>bu</sup> myosin X	AB018342		1,4*				
<b>MYRL2</b> myosin regulatory light chain 2	J02854	6,5*					
PLEC1 <sup>uv</sup> plectin 1	U53204 U53204	1,7 2,8*				1,8 2,5*	
<b>S100A11<sup>b</sup></b> calgizzarin	D38583	2,4		2,0	2,6	3,1	1,5
TUBA1 <sup>bu</sup> tubulin, $\alpha$ 1	X06956	1,3		1,2			
TUBB <sup>b</sup> tubulin, $\beta$	X79535	1,5					
TUBB2 <sup>bu</sup> tubulin, $\beta$ , 2	X02344	1,4/1,6		1,2		1,3/1,6	
TUBB4 <sup>bu</sup> tubulin, $\beta$ , 4	U47634	1,4				1,3	
TUBB5 <sup>bu</sup> tubulin, $\beta$ , 5	X00734	1,4				1,4	
TUBG1 <sup>bu</sup> tubulin, $\gamma$ 1	M61764					1,7	

**Tabelle 40:** *C. pneumoniae*-induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen des Zytoskeletts und assoziierten Proteinen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.

#### f) Proteine der Extrazellulärmatrix und assoziierte Proteine

Es wurden 16 Gene ermittelt, die zur Extrazellulärmatrix gehören oder dazu assoziiert sind, und nach Infektion mit *C. trachomatis* bei HeLa-Zellen eine Änderung in der Expression aufweisen (siehe Tabelle 41). Von diesen wurden 10 vermindert und 5 vermehrt exprimiert. Bei allen Genen konnte auch eine Regulation nach Infektion mit *C. pneumoniae* aufgezeigt werden, wobei sich die Ausrichtung der Regulation bei 2 dieser Gene unterschied.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
BSG <sup>bu</sup> basigin	X64364		-1,7	-2,0			-2,6
CMAR <sup>bu</sup> cell matrix adhesion regulator	X65784					-2,1*	-2,6 <sup>#</sup>
COL3A1 <sup>b</sup> collagen, type III, $\alpha$ 1	X14420					-1,4	-1,4/-1,5 <sup>#</sup>
<b>COL9A3<sup>b</sup></b> collagen, type IX, $\alpha$ 3	L41162					<b>-3,7*</b>	<b>-7,6<sup>#</sup></b>
COL16A1 <sup>b</sup> collagen, type XVI, $\alpha$ 1	M92642 AI982638				-1,2	-1,4	-1,4/-1,6 <sup>#</sup> -1,5 <sup>#</sup>
FBN1 <sup>b</sup> fibrillin 1	X63556						-1,6 <sup>#</sup>
MFAP2 <sup>b</sup> microfibrillar-associated protein 2	U19718				-1,1	-1,7	-1,7/-1,4 <sup>#</sup>
PCOLCE <sup>b</sup> procollagen C-endopeptidase enhancer	L33799					-1,4	-2,1/-1,7 <sup>#</sup>
PLOD2 <sup>b</sup> procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	U84573						-1,6*/-1,3 <sup>#</sup>
<b>TIMP2<sup>b</sup></b> tissue inhibitor of metalloproteinase 2	U44385 M32304			-2,8* -1,7			<b>-5,6*</b> -1,6
COL4A2 <sup>b</sup> collagen, type IV, $\alpha$ 2	X05610		1,5				-1,5 <sup>#</sup>
LAMB1 <sup>b</sup> laminin, $\beta$ 1	M61916				1,7		1,8*
<b>PLAUR<sup>b</sup></b> urokinase-type plasminogen receptor	U09937				2,4	<b>7,2</b>	<b>4,7/4,6<sup>#</sup></b>
<b>SERPINE1<sup>b</sup></b> plasminogen activator inhibitor 1	J03764 M14083				<b>4,2</b> <b>3,0</b>	<b>7,8*</b>	<b>6,4*/7,5<sup>#</sup></b>
SERPINH2 <sup>b</sup> serine/cysteine proteinase inhibitor, 2	D83174					1,6	
TIMP1 <sup>b</sup> tissue inhibitor of metalloproteinase 1	D11139				1,2	2,6	2,9/1,5 <sup>#</sup>

**Tabelle 41: *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen der Extrazellulär-matrix. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

Nach Infektion von HeLa-Zellen mit *C. pneumoniae* konnten 21 Gene der Extrazellulär-matrix bzw. dazu assoziierte Gene ermittelt werden, die eine Veränderung der Genexpression aufzeigten gegenüber schein-infizierten Zellen (siehe Tabelle 42). Von diesen Genen wurden 11 nach Infektion vermindert und 8 vermehrt exprimiert.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
COL1A1 collagen, type I, $\alpha$ 1	Y15915		-2,0				-2,3*
COL3A1 <sup>b</sup> collagen, type III, $\alpha$ 1	X14420					-1,3	-1,2
COL4A2 <sup>b</sup> collagen, type IV, $\alpha$ 2	X05610						-1,6
<b>COL9A3<sup>uv,b</sup></b> collagen, type IX, $\alpha$ 3	L41162			<b>-3,7*</b>	<b>-4,6*</b>	-2,8*	
COL16A1 <sup>uv,b</sup> collagen, type XVI, $\alpha$ 1	AI982638 M92642	-1,7			-1,4	1,5	-1,4* -1,4
FBN1 <sup>b</sup> fibrillin 1	X63556	-1,6					
P4HA1 procollagen-proline, $\alpha$ , 1	M24486					-2,0*	-1,9
P4HA2 procollagen-proline, $\alpha$ , 2	U90441				-1,4*	-2,4*	-2,4
PCOLCE <sup>b</sup> procollagen C- endopeptidase enhancer	L33799				-1,4	-1,3	-1,7
PLOD2 <sup>b</sup> procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5- dioxygenase 2	U84573				-1,7*	-2,7*	-1,6*
TIMP2 <sup>b</sup> tissue inhibitor of metalloproteinase 2	M32304	-1,7					
BSG <sup>uv, bu</sup> basigin	X64364	1,2					-1,5
MFAP2 <sup>uv,b</sup> microfibrillar- associated protein 2	U19718	1,7	-1,4	-1,8	-1,7	-2,4	-2,3
CMAR <sup>bu</sup> cell matrix adhesion regulator	X65784					1,5	
COL4A6 collagen, type IV, $\alpha$ 6	D21337					1,9*	2,1*
CTSL cathepsin L	X12451		1,4	1,6	2,1	1,9	1,6
LAMB1 <sup>b</sup> laminin, $\beta$ 1	M61916		1,8*	2,7*	2,4*	2,4*	
<b>PLAUR<sup>b</sup></b> urokinase-type plasminogen receptor	U09937	2,6	2,4*	2,9*	<b>3,8*</b>		
SERPINE1 <sup>b</sup> plasminogen activator inhibitor 1	M14083	2,0*	2,4*	2,7*			
SERPINH2 <sup>b</sup> serine/cysteine pro- teinase inhibitor, 2	D83174						1,6

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
TIMP1 <sup>b</sup> tissue inhibitor of metalloproteinase 1	D11139	1,7	1,4	1,7	2,0	1,6	1,4

**Tabelle 42: *C. pneumoniae*-induzierte Veränderung der Genexpression von von Proteinen der Extrazellulärmatrix. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

### g) Adhäsionsmoleküle

Die Expression von 8 Adhäsionsmolekülen wurde durch die Infektion mit *C. trachomatis* verändert, wobei 2 dieser Adhäsionsmoleküle vermindert und 5 vermehrt exprimiert wurden (siehe Tabelle 43). Nur bei Catenin- $\beta$  wurde ausschließlich eine Veränderung der Genexpression nach *C. trachomatis*-Infektion und nicht nach *C. pneumoniae*-Infektion nachgewiesen. Bei Fibronectin 1 unterschied sich die Ausrichtung der Regulation von der bei *C. pneumoniae*-infizierten HeLa-Zellen.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
FN1 <sup>bu</sup> fibronectin 1	M10905					-1,9*	
ITGB3BP <sup>b</sup> integrin $\beta$ 3 binding protein	U37139					-1,7	-1,6/-1,6 <sup>#</sup>
CTNNB1 catenin, $\beta$ 1	X87838		-1,5	-2,0		1,3	
5T4 <sup>b</sup> oncofetal trophoblast glycoprotein	Z29083					3,5*	2,6*
CLECSF2 <sup>b</sup> lectin, C-type	X96719					6,4*	9,5*/4,6 <sup>#</sup>
ITGA6 <sup>b</sup> integrin, $\alpha$ 6	X53586					3,0*	2,9*
ITGB4BP <sup>b</sup> integrin $\beta$ 4 binding protein	AF022229				1,2		
JUP <sup>b</sup> junction plakoglobin	M23410						2,2 <sup>#</sup>

**Tabelle 43: *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von Adhäsionsmolekülen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

Bei *C. pneumoniae*-infizierten HeLa-Zellen konnte die veränderte Expression von 10 Adhäsionsmolekülen nachgewiesen werden, von denen nur eines ausschließlich vermindert und 8 vermehrt exprimiert wurden (siehe Tabelle 44).

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
ITGB3BP <sup>b</sup> integrin $\beta$ 3 binding protein	U37139					-1,5	
FN1 <sup>bu</sup> fibronectin 1	M10905 X02761			1,7 1,8*	1,4*		-1,7 -1,5*

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
<b>5T4<sup>b</sup></b> oncofetal trophoblast glycoprotein	Z29083		4,7*	4,5*	3,9*	3,1*	
<b>CDH13</b> cadherin 13 (heart)	U59289			2,3*	3,2*		3,6*
<b>CLECSF2<sup>b</sup></b> lectin, C-type	X96719		2,2*	3,5*	3,3*		
<b>ITGA3</b> integrin, $\alpha$ 3	M59911					2,4* 2,7*	2,6*
<b>ITGA6<sup>b</sup></b> integrin, $\alpha$ 6	X53586 S66213		3,3*	4,1* 3,2*	3,9*	3,2* 9,5*	3,7* 6,8*
<b>ITGB4BP<sup>b</sup></b> integrin $\beta$ 4 binding protein	AF022229				1,3	1,6	
<b>ITGB5</b> integrin $\alpha$ 5	M35011 X53002		1,7* 2,2*	2,3* 3,1*	2,5* 3,0*	2,6* 2,7*	1,6* 2,0*
<b>JUP<sup>b</sup></b> junction plakoglobin	M23410					3,1*	1,9*

**Tabelle 44:** *C. pneumoniae*-induzierte Veränderung der Genexpression von Adhäsionsmolekülen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.

#### h) Proteine mit pro-oder anti-apoptotischer Wirkung

Es konnten 20 Proteine mit pro- oder anti-apoptotischer Wirkung ermittelt werden, deren Genexpression in HeLa-Zellen durch Infektion mit *C. trachomatis* verändert wurde (siehe Tabelle 45). Von diesen wurden 5 ausschließlich vermindert und 12 vermehrt exprimiert, wobei die Zunahme der Expression meist mit größeren Regulationsfaktoren behaftet war. 14 dieser Gene wurden ebenso nach Infektion mit *C. pneumoniae* reguliert, davon nur eins mit einer anderen Ausrichtung der Regulation.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
<b>BAG5<sup>b</sup></b> BCL2-associated athanogene 5	AB020680						-1,6 <sup>#</sup>
<b>BAX</b> BCL2-associated X protein	U19599					-2,0*	-1,4 <sup>#</sup>
<b>BNIP3<sup>b,uv</sup></b> BCL2-interacting protein 3	AF002697					-1,4	-2,2/1,7 <sup>#</sup>
<b>PRKR</b> IFN-inducible RNA-dependent protein kinase	U50648		-1,9	-2,6			
<b>BAG2</b> BCL2-associated athanogene 1	AL050287	1,5					-1,6 <sup>#</sup>
<b>PDCD6<sup>b</sup></b> programmed cell death 6	AF035606			1,4			-1,6 <sup>#</sup>



Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
BAG1 BCL2-associated athanogene 1	Z35491						1,9/1,5 <sup>#</sup>
<b>CASP4<sup>b,c</sup></b> caspase 4	U28014					<b>4,5*</b>	
DAP <sup>b</sup> death-associated protein	X76105				1,2		
DAXX <sup>b</sup> death-associated protein 6	U26162				1,2	1,5	1,9/1,5 <sup>#</sup>
<b>EPHA2<sup>b,c</sup></b> ephrin type-A receptor 2	M59371				<b>3,1</b>	<b>9,4*</b>	<b>5,3*/3,9<sup>#</sup></b>
<b>IER3<sup>b,c</sup></b> immediate early response 3	S81914			<b>4,0*</b>	<b>9,5</b>	<b>13,9*</b>	<b>8,7*/2,4<sup>#</sup></b>
<b>MCL1<sup>b,c</sup></b> myeloid cell leukemia sequence 1	L08246			1,4	<b>3,1/3,0</b>	<b>6,9/7,2</b>	<b>5,0/5,1/ 2,1<sup>#</sup>/2,0<sup>#</sup></b>
<b>PHLDA1<sup>b</sup></b> pleckstrin homology-like domain, A, 1	Z50194					<b>23,9*</b>	<b>31,2*/21,2<sup>#</sup></b>
PRKRI <sup>bu</sup> IFN-inducible RNA- dependent protein kinase inhibitor	AI095508						2,6/1,6 <sup>#</sup>
<b>TNFAIP3</b> TNF, $\alpha$ -induced protein 2	M59465				2,9	<b>7,5*</b>	<b>6,4*/3,8<sup>#</sup></b>
TNFRSF10B <sup>b</sup> TNF receptor superfamily, 10b	AF016266				1,4	1,8	2,0/1,5 <sup>#</sup>
<b>TSSC3<sup>b</sup></b> tumor suppressing subtransferable 3	AF001294 AF035444		1,3		1,7 1,7	2,4 <b>7,5*</b>	2,6/1,9 <sup>#</sup> <b>6,4*/2,9<sup>#</sup></b>

**Tabelle 45: *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen. Die Daten für TGM2 und PTPN13 finden sich in Tabelle 35. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31**

Die Veränderung der Genexpression bei HeLa-Zellen von Proteinen mit pro- oder anti-apoptotischer Wirkung nach Infektion mit *C. pneumoniae* konnte bei 18 Genen nachgewiesen werden, von denen bei 5 die Expression vermindert und bei 12 vermehrt wurden (siehe Tabelle 46). Dabei waren die Faktoren der Hochregulation meist größer.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
BAG5 <sup>b</sup> BCL2-associated athanogene 5	AB020680	-1,6					
BNIP3 <sup>b</sup> BCL2-interacting protein 3	AF002697				-1,7	-1,9	-1,9
BNIP3L BCL2-interacting protein 3-like	AF079221			-1,3	-1,4	-2,0	-2,1
PDCD6 <sup>b,uv</sup> programmed cell death 6	AF035606					-1,2	
PRKRI <sup>bu</sup> IFN-inducible RNA- dependent protein kinase inhibitor	AI095508	-1,8					
<b>CASP4<sup>b,c</sup></b> caspase 4	U28014			<b>6,7*</b>	<b>4,0*</b>	<b>9,6*</b>	<b>2,7*</b>
DAP <sup>b</sup> death-associated protein	X76105		1,5	1,5	1,4	1,6	
DAXX <sup>b</sup> death-associated protein 6	U26162	1,4	1,3				
<b>EPHA2<sup>b,c</sup></b> ephrin type-A receptor 2	M59371		<b>4,0*</b>	<b>6,1*</b>	<b>10,0*</b>		
<b>IER3<sup>uv,b,c</sup></b> immediate early response 3	S81914	2,4	<b>6,3</b>	<b>6,4*</b>	2,7	1,3	
<b>MCL1<sup>uv,b,c</sup></b> myeloid cell leukemia sequence 1	L08246	1,3/1,3	2,5/2,5	2,2/2,6	2,9/3,1	2,2/2,3	
<b>PHLDA1<sup>b</sup></b> pleckstrin homology-like domain, A, 1	Z50194				<b>13,1*</b>	<b>18,1*</b>	
TNFAIP2 TNF $\alpha$ -induced protein 2	M92357			1,7*		2,1*	
TNFRSF10B <sup>b</sup> TNF receptor superfamily, 10b	AF016266		1,4		1,4		
<b>TSSC3<sup>b,uv</sup></b> tumor suppressing subtransferable 3	AF001294 AF035444	1,7 2,5*	1,7 2,7*	1,5 2,2*	1,7 <b>3,3*</b>	1,6 2,4*	1,2 1,7

**Tabelle 46: *C. pneumoniae*-induzierte Veränderung der Genexpression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen. Die Daten für CDKN1A finden sich in Tabelle 38, für DED in Tabelle 32 und für TGM2 in Tabelle 36. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

### **i) Proteine mit bekanntem Bezug zu Arthritis**

Es konnten 10 Gene ermittelt werden, die einen bekannten Bezug zu Arthritis haben und nach *C. trachomatis*-Infektion eine veränderte Genexpression aufzeigten (siehe Tabelle 47). Davon wurden 9 vermehrt und nur eines vermindert exprimiert. Bei 9 dieser Gene wurde auch nach

Infektion mit *C. pneumoniae* eine veränderte Genexpression aufgezeigt, wobei bei 2 eine Abweichung in der Ausrichtung der Veränderung vorlag.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
CAPN2 <sup>b</sup> calpain 2	M23254				1,2	2,1	2,3/1,4 <sup>#</sup>
CD44 <sup>b,c</sup> CD44 antigen	AF098641 M59040 L05424				1,4 1,3 1,4	1,7* 1,8* 1,7*	2,2*/2,0 <sup>#</sup> 2,1/1,6 <sup>#</sup> 2,2/1,8 <sup>#</sup>
DAF <sup>b</sup> decay accelerating factor for complement	M31516				1,5	1,8	1,9/1,3 <sup>#</sup>
<b>MT2A<sup>b</sup></b> metallothionein 2A	AI547258				2,8	<b>3,7*</b>	<b>6,4*/2,9<sup>#</sup></b>

**Tabelle 47: *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen, die einen bekannten Bezug zu Arthritis haben. Die Daten für CXCR4, FGF2, PTGS2 und VEGF finden sich in Tabelle 33, die Daten für SERPINE1 und PLAUR in Tabelle 41. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

Nach Infektion mit *C. pneumoniae* konnten 9 Gene mit bekanntem Bezug zu Arthritis ermittelt werden, deren Genexpression sich, gegenüber schein-infizierten Zellen, verändert hatte (siehe Tabelle 48). Von diesen wurden 7 vermehrt exprimiert und bei 2 änderte sich die Ausrichtung der Regulation über den Erhebungszeitraum (CXCR4, PTGS).

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
CAPN2 <sup>uv,b</sup> calpain 2	M23254		1,4	1,6	1,7	2,4	1,7
DAF <sup>uv,b</sup> decay accelerating factor for complement	M31516	1,6	1,7	2,1	2,4	1,9	
<b>MT2A<sup>b</sup></b> metallothionein 2A	AI547258	2,8*	2,3*	<b>3,0*</b>	<b>3,8*</b>	<b>4,5*</b>	

**Tabelle 48: *C. pneumoniae*-induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen, die einen bekannten Bezug zu Arthritis haben. Die Daten für CXCR4, PTGS2 und VEGF finden sich in Tabelle 34, die Daten für SERPINE1 und PLAUR in Tabelle 42, die Daten für CD44 in Tabelle 49. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

#### **j) Proteine mit bekanntem Bezug zu Atherosklerose**

Es konnten 11 Gene mit bekanntem Bezug zu Atherosklerose ermittelt werden, deren Genexpression bei *C. pneumoniae*-infizierten HeLa-Zellen gegenüber schein-infizierten Zellen verändert war (siehe Tabelle 49). Von diesen wurden 7 ausschließlich hochreguliert, 2 wurden vermindert gebildet und 2 änderten die Ausrichtung der Regulation über den Beobachtungszeitraum. Von diesen 11 Genen wurden 9 auch bei *C. trachomatis*-infizierten Zellen verändert reguliert. Die Ausrichtung dieser Regulation war in 7 Fällen gleich (CD44, CTGF, KLF5, PLAUR, SERPINE1, TIMP1, TIMP2) und unterschied sich nur bei PTGS2 und VEGF. Diese Gene wurden hier nicht extra aufgeführt. Zusätzlich wurde in den Microarrays ausschließlich

bei *C. trachomatis* eine vermehrte Bildung von EGR1, einem weiteren Protein mit Bezug zu Atherosklerose, nachgewiesen (siehe Tabelle 31).

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
CD44 <sup>uv,b,c</sup> CD44 antigen	AF098641		1,4*	2,2*	1,8*	2,6*	1,6*
	M59040		1,4*	2,3*	1,8*	2,0*	1,6*
	L05424 <sup>UV</sup>		1,4/1,5	1,8/2,2	1,8/1,8*	2,3/2,5	1,5/1,6
NT5 <sup>uv</sup> 5' nucleotidase	X55740		8,8*	32,0*	23,6*	28,0*	37,1*

**Tabelle 49: *C. pneumoniae*-induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen, die einen Bezug zu Atherosklerose haben. Die Daten für KLF5 finden sich in Tabelle Tabelle 32, die für CTGF, PTGS2 und VEGF in Tabelle 34, für CDKN1A in Tabelle 38 und die Daten für PLAUR, SERPINE1, TIMP1 und TIMP2 in Tabelle 42. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

### k) Proteine mit unterschiedlicher Funktion

In Tabelle 50 sind 24 Gene zusammengefaßt, deren Genexpression sich nach *C. trachomatis*-Infektion verändert hat und die durch ihre hohe Regulation oder ihre Funktion auffallen oder bereits in einem der vorangegangenen Array-Experimente mit Microarrays der Firma Clontech reguliert waren, aber nicht zu einer der anderen Gruppen (a-j) gehören. Für 21 der Gene konnte auch eine veränderte Genexpression nach *C. pneumoniae*-Infektion ermittelt werden, wobei in 8 Fällen die Ausrichtung der Regulation von der bei *C. trachomatis*-infizierten Zellen abwich. 3 der Gene zeigten auch eine veränderte Genexpression in einem der Experimente mit Microarrays der Firma Clontech.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
CALR <sup>bu</sup> calreticulin	M84739		-1,7	-1,7			
HMMR hyaluronan-mediated motility receptor	AF032862				-1,2	-3,5*	-5,0*/-5,0 <sup>#</sup>
LDLR <sup>bu</sup> low density lipoprotein receptor	L00352						-2,2 <sup>#</sup>
PAFAH1B1 <sup>b</sup> platelet-activating factor acetylhydrolase, Ib	L13385					-11,6*	-12,1 <sup>#</sup>
SEMA3C <sup>b</sup> semaphorin 3C	AB000220					-3,6*/-2,3*	-5,4*/-3,3* -3,4 <sup>#</sup> /-2,9 <sup>#</sup>
SLC1A4 <sup>c</sup> neutral amino acid transporter A	AA978353						-2,9 <sup>#</sup>
STK15 <sup>b,uv</sup> serine/threonine kinase 15	AF011468				-1,2/-1,3		-1,6/-1,4/ -2,8 <sup>#</sup> /-3,1 <sup>#</sup>
BHLHB2 <sup>bu</sup> basic helix-loop-helix domain containing, B, 2	AB004066				1,7	1,5	-1,6 <sup>#</sup>

Gen	GenBank-Accession	2h p.i. <sup>#</sup>	4 h p.i.	12 h p.i.	24h p.i. <sup>#</sup>	36 h p.i.	48 h p.i.
<b>HSPA1A<sup>bu</sup></b> heat shock 70kD protein 1A	M11717				-1,8		3,6/1,6 <sup>#</sup>
<b>HSPA1B<sup>bu</sup></b> heat shock 70kD protein 1B	M59830				-1,7		3,6
<b>HSPA8<sup>b</sup></b> heat shock 70kD protein 8	W28493 Y00371			<b>-16,2*</b>			1,3
<b>HSPCB<sup>bu</sup></b> heat shock 90kD protein 1, $\beta$	J04988 W28616		<b>-6,3/-6,1</b>	<b>-8,2/-7,0</b>			-1,2 <b>-3,5/-3,5/ 1,6<sup>#</sup></b>
<b>ADM<sup>bu</sup></b> adrenomedullin	D14874				1,8	2,4	<b>4,1*/2,2<sup>#</sup></b>
<b>ANXA1<sup>b</sup></b> annexin A1	X05908				1,3	1,9	2,2/1,3 <sup>#</sup>
<b>CLK1<sup>bu</sup></b> CDC-like kinase 1	M59287					1,4	2,9/1,6 <sup>#</sup>
<b>CSRPI<sup>b</sup></b> cysteine and glycine-rich protein 1	M33146				2,0	<b>4,1</b>	<b>5,1/2,4<sup>#</sup></b>
<b>EBI2<sup>b</sup></b> EBV-induced G protein-coupled receptor 2	L08177				<b>6,1</b>		
<b>GLRX<sup>b,c</sup></b> glutaredoxin	X76648				2,8	<b>7,8*</b>	<b>4,7*/2,2<sup>#</sup></b>
<b>HSPF1<sup>b,c</sup></b> heat shock 40kD protein 1	D85429						1,6
<b>MAFF<sup>b</sup></b> v-maf oncogene family protein F  <b>(bK447C4.2)</b>	AL021977				<b>10,2</b>	<b>8,2*</b>	<b>10,4*/3,9<sup>#</sup></b>
<b>MT1A<sup>b</sup></b> metallothionein 1A	K01383				2,5	<b>6,9</b>	<b>4,4/3,0<sup>#</sup></b>
<b>NAF1</b> Nef-associated factor 1	AJ011896					2,3	<b>4,2/30,2*/ 4,8<sup>#</sup></b>
<b>RAI3<sup>b</sup></b> retinoic acid induced 3	AF095448				1,9	<b>4,8*</b>	<b>6,0<sup>#</sup></b>
<b>TOP1<sup>b</sup></b> topoisomerase I	U07806					1,9	1,8/1,6 <sup>#</sup>

**Tabelle 50: *C. trachomatis*-induzierte Veränderung der Genexpression von unterschiedlichen Proteinen, die durch ihre hohe Regulation oder ihre Funktion auffallen oder dadurch, auch in einem der vorangegangenen Array-Experimente reguliert gewesen zu sein, die aber nicht in eine der bisherigen Kategorien eingeteilt werden konnten. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

In Tabelle 51 sind 30 Gene zusammengefaßt, deren Genexpression sich nach *C. pneumoniae*-Infektion verändert hat und die durch ihre hohe Regulation oder ihre Funktion auffallen oder dadurch, auch in einem der vorangegangenen Array-Experimente mit Microarrays der Firma Clontech reguliert gewesen zu sein, die aber nicht in eine der bisherigen Kategorien (a-j) ein-

geteilt werden konnten. 5 der Gene zeigten auch eine veränderte Genexpression in einem der Experimente mit Microarrays der Firma Clontech auf.

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
ADM <sup>bu</sup> adrenomedullin	D14874				-1,5	-2,7*	-2,0
CLK1 <sup>bu</sup> CDC-like kinase1	M59287					-2,8*	-1,6*
<b>CSRP2<sup>uv</sup></b> cysteine and glycine-rich protein2	U57646		-2,2*	-2,5*	<b>-4,6*</b>	<b>-4,1*</b>	
<b>EFNA1</b> ephrin-A1	M57730				<b>-4,1*</b>	<b>-3,7*</b>	<b>-3,5*</b>
PAFAH1B1 <sup>b</sup> platelet-activating factor acetylhydrolase, Ib	L13385	-1,7					
SEMA3C <sup>uv,b</sup> semaphorin 3C	AB000220		-1,7*/-1,6*	-1,8*/-1,7*	-2,6*/-2,4*	<b>-3,8*/-2,9*</b>	-2,2*/-2,0*
STK15 <sup>b</sup> serine/threonine kinase 15	AF011468	-1,6					
<b>BHLHB2<sup>uv, bu</sup></b> basic helix-loop-helix domain containing, B, 2	AB004066	2,1*			-1,4	<b>-3,1</b>	-2,0
CALR <sup>bu</sup> calreticulin	M84739	1,5	-1,4				
<b>HSPA1A<sup>bu</sup></b> heat shock 70kD protein 1A	M11717	<b>-3,2*</b>				1,6*	1,6*
<b>HSPA1B<sup>bu</sup></b> heat shock 70kD protein 1B	M59830	<b>-3,9</b>				1,8*	
PTMS <sup>uv,c</sup> parathyrosin	M24398	1,5	-1,4				
<b>ANPEP</b> alanyl aminopeptidase	M22324		1,8*	2,2	2,2	<b>3,3</b>	2,2
ANXA1 <sup>b</sup> annexin A1	X05908		1,5	1,9	1,5*	1,6	1,5
<b>CSRP1<sup>b</sup></b> cysteine and glycine-rich protein1	M33146		1,4	2,3	2,8	<b>3,3</b>	1,6
<b>EBI2<sup>b</sup></b> EBV-induced G protein-coupled receptor 2	L08177	2,8*	<b>6,2*</b>				
<b>GLRX<sup>b,c</sup></b> glutaredoxin	X76648		<b>3,3*</b>	<b>3,7*</b>	2,5*	2,0*	1,4*
<b>GPR44</b> G protein-coupled receptor 44	AA195301	1,8*				<b>15,2*</b>	2,8*
HSPA8 <sup>b</sup> heat shock 70kD protein 8	Y00371					1,5	1,5
HSPCA <sup>c</sup> heat shock 90kD	X15183						1,4

Gen	GenBank-Accession	2h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.
protein 1, $\alpha$							
HSPCB <sup>bu</sup> heat shock 90kD protein 1, $\beta$	M16660					1,2	
HSPF1 <sup>b,c</sup> heat shock 40kD protein 1	D85429					1,6	
LDLR <sup>bu,uv</sup> low density lipoprotein receptor	L00352	2,5*	1,8*				
<b>LRP8</b> apolipoprotein E receptor 2	D86407 Z75190			1,9*	1,9* 2,0*	3,0* <b>3,0*</b>	1,8* 2,4*
<b>MAFF<sup>uv,b</sup></b> v-maf oncogene family protein F  <b>(bK447C4.2)</b>	AL021977	1,9*	<b>5,9*</b>	<b>4,5*</b>			
<b>MT1A<sup>b</sup></b> metallothionein 1A	K01383		2,1	<b>3,7</b>	<b>4,0</b>	<b>3,1</b>	
NOL1 <sup>c</sup> proliferating cell nucleolar antigen	X55504			1,4*	1,6*	2,0*	
<b>RAI3<sup>b</sup></b> retinoic acid induced 3	AF095448		<b>3,6*</b>	<b>3,6*</b>			
<b>SEMA3A</b> semaphorin 3A	L26081		<b>16,0*</b>	<b>4,4*</b>	<b>4,2*</b>	<b>4,6*</b>	
<b>TOP1<sup>uv,b</sup></b> topoisomerase I	U07804		1,5	1,5	1,7	<b>15,4*/2,5</b>	1,6

**Tabelle 51: *C. pneumoniae*-induzierte Veränderung der Genexpression von unterschiedlichen Proteinen, die durch ihre hohe Regulation oder ihre Funktion auffallen oder dadurch, auch in einem der vorangegangenen Array-Experimente reguliert gewesen zu sein, die aber nicht in eine der bisherigen Kategorien eingeteilt werden konnten. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

### **Beeinflussung durch UV-inaktivierte Chlamydien**

In den beiden nachfolgenden Tabellen sind die Gene in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt, die in einer der Tabellen a) bis k) erwähnt werden, also deren Expression durch Infektion mit lebenden Chlamydien beeinflusst wird, und deren Genexpression zusätzlich durch die Behandlung mit UV-inaktivierten Chlamydien verändert wird.

Die durch *C. trachomatis* hervorgerufene Veränderung der Genexpression (siehe Tabelle 52) beschränkt sich hier auf 5 Gene, alle mit sehr geringen durch UV-inaktivierte Chlamydien ausgelösten Regulationen.

Gen-Abkürzung	GenBank-Accession	2h p.i.	4h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	Verweis auf Tabellen a) – k)
BNIP3	AF002697				1,2			h) Apoptose
CCND1	X59798		1,3					d) Zellzyklus
KRT10	X14487		-1,3					e) Zytoskelett
STK15	AF011468				-1,2			k) unterschiedliche Proteine
ZNF9	U19765				1,2			a) Transkriptionsfaktor

**Tabelle 52: Alphabetische Auflistung der Gene, deren Expression sowohl durch lebende, als auch durch UV-inaktivierte *C. trachomatis* beeinflusst wird. In Spalte eins ist die Abkürzung des Gennamens angegeben, der ausgeschriebene Genname findet sich in der Tabelle, in der die Werte von infizierten gegenüber nicht-infizierten Zellen angegeben sind. Auf die entsprechende Tabelle wird in der letzten Spalte verwiesen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

Es werden in den vorangegangenen Tabellen 49 Gene aufgeführt, deren Expression sowohl durch lebende, als auch durch UV-inaktivierte *C. pneumoniae* verändert wird (siehe Tabelle 53). Nur zwei von diesen zeigen bei dem Vergleich von Zellen mit UV-inaktivierten *C. pneumoniae* mit schein-infizierten Zellen eine Veränderung der Genexpression mit einem Faktor größer drei auf.

Gen-Abkürzung	GenBank-Accession	4h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.	Verweis auf Tabellen a) – k)
ACTN4	U48734	-1,7						e) Zytoskelett
ARHGDI A	X69550	-2						c) Signaltransduktion
BAG1	Z35491				-1,4			h) Apoptose, nur bei <i>C. trachomatis</i>
BCAR3	U92715	1,6						c) Signaltransduktion
BHLHB2	AB004066	1,6*						k) unterschiedliche Proteine
BSG	X64364	-1,3						f) Extrazellulärmatrix
CAPN2	M23254				1,3			i) Arthritis
CD44	L05424				1,4/1,4			j) Atherosklerose, i) Arthritis
CDKN1A	U03106	1,8*						d) Zellzyklus
COL9A3	L41162				-2,3*			f) Extrazellulärmatrix
COL16A1	M92642				-1,3			f) Extrazellulärmatrix
CREM	S68271	1,4*						a) Transkriptionsfaktor
CSRP2	U57646				-1,4*			k) unterschiedliche Proteine
CTGF	X78947	1,4						b) Zytokine, u.ä.
CXCR4	L06797	1,5						b) Zytokine, u.ä.
DAF	M31516	1,3			1,4			i) Arthritis
ETR101	M62831	1,6						a) Transkriptionsfaktor
FOXF2		-1,4*						a) Transkriptionsfaktor
GRN	AF055008				-1,7			b) Zytokine, u.ä.
ID1	X77956	1,2						a) Transkriptionsfaktor
IER3	S81914	1,8						h) Apoptose



Gen-Abkürzung	GenBank-Accession	4h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	36h p.i.	48h p.i.	60h p.i.	Verweis auf Tabellen a) – k)
IFI30	J03909				1			b) Zytokine, u.ä.
IFITM2	X57351				1,6			b) Zytokine, u.ä.
<b>IL11</b>	X58377	<b>3,1</b>						b) Zytokine, u.ä.
INSIG1	U96876	2,1*			1,3			b) Zytokine, u.ä.
INSL4	L34838				-2,1*			b) Zytokine, u.ä.
KOC1	U97188	1,3						b) Zytokine, u.ä.
LDLR	L00352	2,5*						k) unterschiedliche Proteine
MAFF, bK447C4.2	AL021977	2,0*						k) unterschiedliche Proteine
MAZ	M94046	-1,7*						a) Transkriptionsfaktor
MCL1	L08246	1,6/1,5						h) Apoptose
MFAP2	U19718				-1,4			f) Extrazellulärmatrix
<b>NT5</b>	X55740	<b>9,9*</b>						j) Atherosklerose
PDCD6	AF035606	1,2						h) Apoptose
PLEC1	U53204	-1,3						e) Zytoskelett
PTMS	M24398	-1,6						k) unterschiedliche Proteine
RGS2	L13463	1,5			-1,8*			c) Signaltransduktion
SEMA3C	AB000220				-1,3*			k) unterschiedliche Proteine
TGFB1	M38449	-1,5						b) Zytokine, u.ä.
TIF1B	X97548	-1,3						a) Transkriptionsfaktor
TNRC3	AI743134	1,2/2,8						a) Transkriptionsfaktor
TOP1	U07806	1,3						k) unterschiedliche Proteine
TSC22	AJ222700	1,5						b) Zytokine, u.ä.
TSSC3	AF001294 AF035444	1,2 1,5			1,2			h) Apoptose
TUBA3	X01703				-1,4			e) Zytoskelett
WISP2	AF100780				-1,7*			b) Zytokine, u.ä.
YWHAE	U54778	-1,4*						c) Signaltransduktion
ZNF9	U19765	1,4						a) Transkriptionsfaktor
ZNF162	L49380	1,6						a) Transkriptionsfaktor

**Tabelle 53: Alphabetische Auflistung der Gene, deren Expression sowohl durch lebende, als auch durch UV-inaktivierte *C. pneumoniae* beeinflusst wird. In Spalte eins ist die Abkürzung des Gennamens angegeben, der ausgeschriebene Genname findet sich in der Tabelle, in der die Werte von infizierten gegenüber nicht-infizierten Zellen angegeben sind. Auf die entsprechende Tabelle wird in der letzten Spalte verwiesen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.**

### 3.1.2.5 Überprüfung der gefundenen Regulationen mit unabhängigen Methoden und Vergleich der Regulation bei verschiedenen Chlamydienstämmen

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Array Experimente wurde für einige Gene eine *Real-Time*-RT-PCR etabliert und durchgeführt. Dazu wurden sowohl neu im U95A Microarray

reguliert gefundene Gene ausgewählt als auch nochmal einige der schon bei den Clontech-Arrays näher betrachteten Gene. Diese Experimente wurden für Infektionen mit den bislang verwendeten *C. trachomatis* L2, mit *C. pneumoniae* und mit dem ursprünglich für die ersten Experimente vorgesehenen *C. trachomatis* Serovar D durchgeführt. Dadurch ist sowohl ein direkter Vergleich der Unterschiede innerhalb einer Spezies, als auch zwischen den beiden Genera der Familie der *Chlamydiales* möglich.

Parallel dazu erfolgten gleichartige Untersuchungen an (fakultativ) intrazellulären *Salmonella typhimurium* in einer laufenden Dissertation von J. Peters, womit eine Unterscheidung zwischen allgemeinen Antworten der Wirtszelle auf intrazelluläre Bakterien und Chlamydien-spezifischen Antworten möglich sein sollte, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen wird. Dazu wurde RNA aus HeLa T-Zellen gewonnen, von denen über 90 % mit Chlamydien infiziert waren (*C. trachomatis* L2: MOI 1, *C. trachomatis* D: MOI 1, *C. pneumoniae*: MOI 3,5) bzw. die mit einer gleichen Menge an UV-inaktivierten EK von *C. trachomatis* L2 oder *C. pneumoniae* behandelt oder die schein-infiziert wurden. Dies geschah für die Chlamydien- und schein-infizierten Zellen zu den Zeitpunkten 4, 24 und 48 Stunden nach Infektion und für die Zellen, die mit abgetöteten Chlamydien behandelt wurden, zu den Zeitpunkten 4 und 24 Stunden nach Infektion.

Es wurden die Gene EPHA2, EGR1, IER3, LIF, MCL1 und MIP-2 $\alpha$  mit bereits etablierten *Real-Time*-PCRs untersucht, sowie für die Betrachtung der Gene CTGF, DUSP4, DUSP5, ETV4, GAS1, NR4A2 neue *Real-Time*-PCRs entwickelt.

In der *Real-Time*-RT-PCR für *C. trachomatis* L2 lagen schon Daten aus vorherigen *Real-Time*-PCRs vor (siehe 3.1.2.2.1), die sich reproduzieren ließen. Von den sechs zusätzlich untersuchten Genen erbrachten fünf eine Bestätigung der Array-Ergebnisse. Für das sechste Gen, ETV4, konnte eine Regulation durch *C. trachomatis* L2 gezeigt werden, die nicht im Array gemessen worden war.

Für die *C. pneumoniae*-induzierten Regulationen konnte für sechs Gene eine Bestätigung durch die *Real-Time*-PCR erbracht werden: CTGF, EPHA2, ETV4, IER3, MCL1 und Mip-2 $\alpha$ . Für drei Gene konnte eine Regulation in der PCR aufgezeigt werden, die nicht im Array vorlag, wobei die vermehrte Expression von DUSP5 und NR4A2 in der *Real-Time*-PCR nur sehr schwach war. Die Regulation von EGR1, die im Array nicht nachgewiesen werden konnte, war hingegen deutlich zu messen. Für zwei Gene, DUSP4 und GAS1 konnte die im Array gefundene veränderte Expression nach *C. pneumoniae* Infektion nicht bestätigt werden. Für LIF lagen keine Ergebnisse aus dem Array vor, da es auf dem Affymetrix-Microarray nicht enthalten ist.

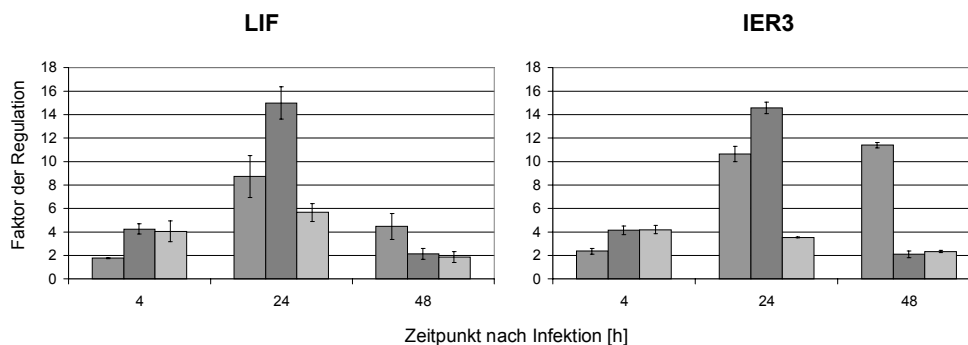
Der Vergleich der durch *C. trachomatis* Serovar L2 und Serovar D hervorgerufenen Regulationen der Genexpression ergab ein sehr ähnliches Bild, wobei die Antworten auf die Infektion mit Serovar D meist früher einsetzen und früher abflauen und teilweise stärker waren.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 54 sowie Abbildung 9 dargestellt.

	4h p.i.			24h p.i.			48h p.i.		
	C. tr L2	C. tr D	C. pn	C. tr L2	C. tr D	C. pn	C. tr L2	C. tr D	C. pn
CTGF	0	+	+	++	+++	++	+	+	0
EPHA2	(+)	+	+	++	+++	+	++	+	0
EGR1	+	+	(+)	+++	++++	+++	+	0	0
ETV4	0	+	+	+++	+++	++	(+)	++	+
IER3	(+)	+	+	+++	+++	+	+++	(+)	(+)
LIF	0	+	+	++	+++	++	+	(+)	0
MCL1	0	+	0	(+)	+	0	+	+	(+)
Mip-2 $\alpha$	(+)	++	+	++	+++	(+)	+++	+	0
NR4A2	0	(+)	0	++	++	(+)	+	(+)	0

**Tabelle 54:** Semiquantitative Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs der Expression ausgewählter Gene mittels *Real-Time-RT-PCR* von HeLa-Zellen infiziert mit *C. trachomatis* L2, *C. trachomatis* D oder *C. pneumoniae* im Vergleich zu Schein-infizierten Zellen. Die Faktoren der Genregulation ergeben sich aus Doppelwerten zweier unabhängiger Experimente mit (+) Faktor 2-3, + Faktor 3-5, ++ Faktor 5-10, +++ Faktor 10-30, ++++ Faktor 30-100

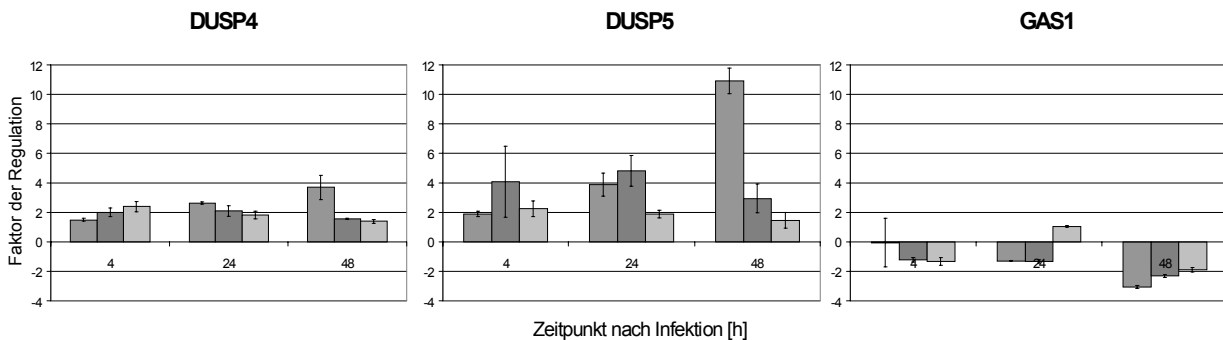
Der zeitliche Verlauf der Regulation der Genexpressionen läßt sich dabei für die verschiedenen Gene in Muster einteilen. Ein Großteil der Regulationen zeigt einen Anstieg der Expression, der 24 Stunden nach Infektion maximal ist und zum 48 Stunden Zeitpunkt wieder abfällt. Bei *C. trachomatis* L2 ist dieser Verlauf ein wenig zu den späteren Zeitpunkten hin verschoben. Für die veränderte Expression von Mip-2 $\alpha$  durch *C. pneumoniae* gilt ebenfalls ein leicht anderer Verlauf mit dem Maximum nach 4 Stunden. Ein typischer Verlauf der Regulation ist in Abbildung 8 dargestellt und die Regulationen der Genexpression dieser Gruppe in Tabelle 54 zusammengefaßt.



**Abbildung 8:** Darstellung eines typischen Verlaufs der Expression der Genregulationen beim Vergleich von HeLa-Zellen infiziert mit *C. trachomatis* L2, *C. trachomatis* D oder *C. pneumoniae* im Vergleich zu Schein-infizierten Zellen mittels *Real-Time-RT-PCR* am Beispiel der veränderten Expression von LIF und

**IER3.** Der erste Balken zu jedem Analysezeitpunkt stellt jeweils die Regulation dar, die durch Infektion mit *C. trachomatis* Serovar L2, der zweite Balken die Regulation durch *C. trachomatis* Serovar D und der letzte Balken die durch *C. pneumoniae*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Für DUSP4, DUSP5 und GAS1 sieht das Regulationsmuster etwas anders aus und ist graphisch dargestellt in Abbildung 9. Hier liegt nur bei *C. trachomatis* L2 eine nennenswerte Regulation vor, die zu späteren Zeitpunkten hin zunimmt.



**Abbildung 9:** Darstellung des Verlauf der Genexpression von DUSP4, DUSP5 und GAS1 nach der Infektion von HeLa-Zellen infiziert mit *C. trachomatis* L2, *C. trachomatis* D oder *C. pneumoniae* im Vergleich zu Schein-infizierten Zellen ermittelt durch *Real-Time-RT-PCR*. Der erste Balken zu jedem Analysezeitpunkt stellt jeweils die Regulation dar, die durch Infektion mit *C. trachomatis* Serovar L2, der zweite Balken die Regulation durch *C. trachomatis* Serovar D und der letzte Balken die durch *C. pneumoniae*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die im Rahmen der Dissertation von J. Peters erhaltenen Regulationen der Genexpression, die durch *S. typhimurium* hervorgerufen wurden, unterschieden sich interessanterweise stark von den durch Chlamydien verursachten Veränderungen der Genexpression (Publikation in Vorbereitung).

Eine Auswertung der durch UV-inaktivierte Chlamydien ausgelösten Genexpressionen ergab, dass dort nur minimale Regulationen vorhanden waren und dies meist zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Behandlung mit den UV-inaktivierten Chlamydien. Diese vermehrte Genexpression lag in den meisten Fällen zwischen Faktor 1,5 bis 3, also in einem Bereich, der hier als zweifelhafte Regulation angesehen wird. Nur bei EGR1, LIF und Mip-2 $\alpha$  konnte eine stärkere Regulation mit Faktoren knapp über 3 aufgezeigt werden (für EGR1 24 Stunden nach Behandlung mit UV-inaktivierten *C. pneumoniae*, LIF 4 Stunden nach Behandlung mit UV-inaktivierten *C. pneumoniae* und Mip-2 $\alpha$  4 Stunden nach Behandlung mit UV-inaktivierten *C. trachomatis* L2).

Durch die zeitaufgelöste Untersuchung der *C. trachomatis*- und *C. pneumoniae*-induzierten Genexpression bei HeLa-Zellen konnten mehrere hundert verändert exprimierte Gene ermittelt werden, die teilweise sehr starke Unterschiede in der Genexpression aufweisen. Die Analyse mittels Microarrays der Firma Affymetrix und die anschließend durchgeführten *Real-Time*-RT-PCRs für ausgewählte Gene erweitern stark das durch den ersten Versuchsblock mit Clontech-Arrays entstandene Bild der Wirtszellbeeinflussung. Es konnte gezeigt werden, dass kaum Effekte durch UV-inaktivierte Chlamydien hervorgerufen werden und dass die durch *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* hervorgerufenen Beeinflussungen des Wirtszelltranskriptoms zwar häufig übereinstimmen, aber dass es durchaus auch Unterschiede gibt.

Die hier vorgenommene Auswahl an Regulationen und die Einteilung der regulierten Gene in funktionelle (Protein-)Gruppen, sowie die Gegenüberstellung der durch *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* induzierten Beeinflussungen ermöglicht nun die Verwendung der Daten als stabile Basis für die Auswahl von Genen für weiterführende Analysen, wie dies in ersten Ansätzen schon durch die durchgeführten *Real-Time*-RT-PCRs gezeigt wurde.

### 3.2 Teil 2:

#### **Untersuchungen zur Identifizierung von Faktoren, die zum Eindringen und Überleben der Chlamydien in der Wirtszelle notwendig sind**

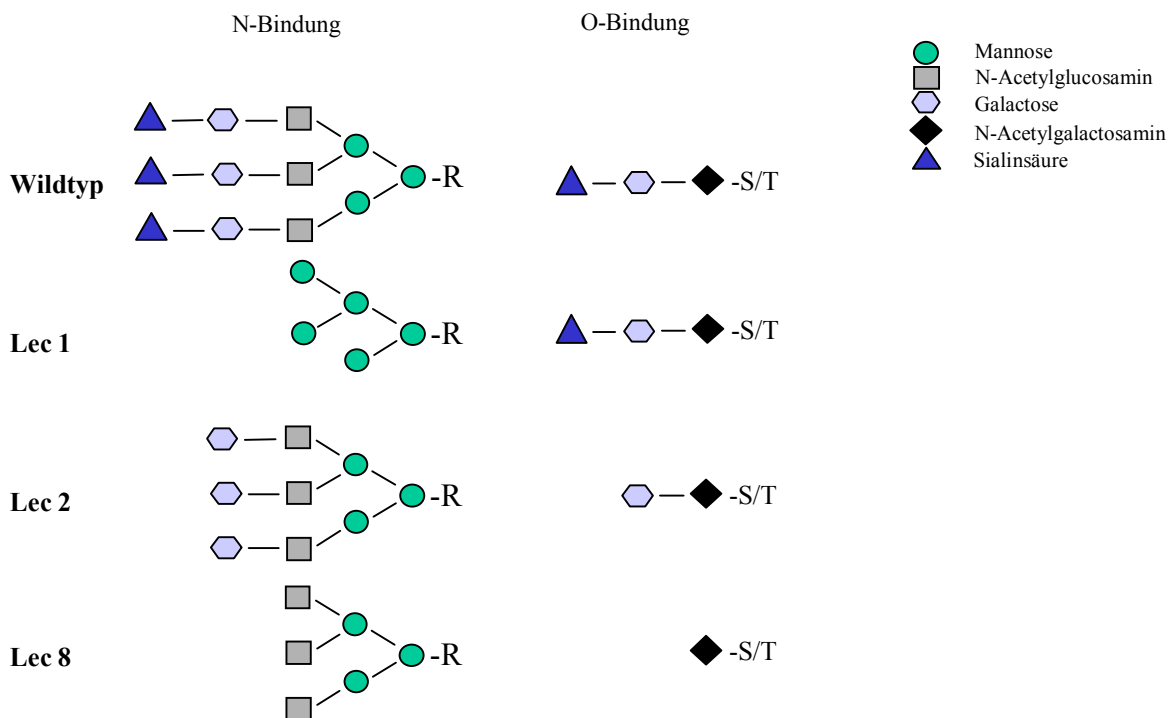
Ziel dieser Versuche war es, Aufschluss über Faktoren zu erhalten, die für das Eindringen der Chlamydien in die Wirtszelle oder für das intrazelluläre Überleben essentiell sind. Dazu wurde die *chinese hamster ovary* (CHO) Zelllinie verwendet. Zum einen gibt es von dieser Zelllinie eine Reihe von Subklonen, die Enzym-Defekte haben, die zu veränderten Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche führen. Da bekannt ist, dass einige Bakterien über solche Zuckerstrukturen an ihre Zielzelle binden, sollte untersucht werden, ob diese Zuckerstrukturen auch zur Anheftung der Chlamydien notwendig sind und ihr Fehlen eine Infektion verhindert.

Zum anderen eignet sich diese funktionell haploide Zelllinie hervorragend für Mutageneseexperimente. So sollte über chemische Mutagenese eine Zelllinie erzeugt werden, die nicht mehr in der Lage ist, Chlamydien aufzunehmen. Anschließend ist es möglich über Substitution des betroffenen Gens den entsprechenden Defekt der Zelle zu isolieren, zu charakterisieren und so den verantwortlichen Phänotyp zu ermitteln, der für eine chlamydiale Infektion essentiell ist.

In einem Vorexperiment wurde überprüft, dass sich CHO-Zellen vergleichbar gut mit *C. trachomatis* L2 infizieren lassen, wie HeLa- oder HEp-2-Zellen.

### 3.2.1 Überprüfung der Infizierbarkeit verschiedener CHO-Zell-Mutanten

Für diesen Versuch wurden drei CHO-Mutanten verwendet, die Enzymdefekte aufweisen, die zu unterschiedlich starken Beeinträchtigungen bei den N- und O-glykosidisch gebundenen Zuckerstrukturen an der Zelloberfläche führen. Auf diese Zelllinien konnte direkt zugegriffen werden, da sie bei der im gleichen Institut ansässigen Arbeitsgruppe von Prof. R. Gerardy-Schahn verwendet wurden. Eine Darstellung der verbliebenen Zuckerstrukturen der verwendeten lec-Mutanten (lec von Lectin-bindend) lec1, lec2 und lec8 und der Vergleich mit den Wildtyp-CHO-Zellen bietet Abbildung 10.



**Abbildung 10: Übersicht über die N- und O-gebundene Zuckerstrukturen an der Zelloberfläche verschiedener hier verwendeter CHO-Zelllinien**

Die CHO-Mutanten sowie Wildtyp-Zellen wurden mit einer Verdünnungsreihe an *C. trachomatis* L2 in Röhrchen infiziert. Zur Infektion wurde krudes Chlamydienmaterial mit nicht genau bestimmter Konzentration in den Mengen 200, 100, 60, 30 und 10  $\mu$ l verwendet. Nach zwei Tagen wurde die Infektionsrate vergleichend über eine FITC-Markierung der Chlamydien bestimmt.

Alle CHO-Zelllinien ließen sich mit *C. trachomatis* L2 infizieren und es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Infizierbarkeit der einzelnen CHO-Zelllinien ermittelt werden.

### 3.2.2 Mutagenese-Experimente mit CHO-Zellen zur Generierung einer Chlamydien-resistenten Mutante

Zur Generierung von neuen CHO-Mutanten mußte das Verfahren der chemischen Mutagenese mittels EMS zuerst in der Arbeitsgruppe etabliert werden. Hierbei halfen freundlicherweise Frau Gerardy-Schahn und ihr ehemaliger Mitarbeiter M. Eckhard.

Um eine gute Ausbeute an mutagenisierten Zellen zu erhalten, musste die optimale Dosis EMS ermittelt werden. Anschließend musste ein Verfahren gefunden werden, mit dem sich die resistenten Klone selektieren ließen.

#### 3.2.2.1 Austestung der optimalen Konzentration an EMS zur Mutagenese

CHO-Zellen wurden in 24-Loch-Platten (bzw. bei 700 – 2000 µg/ml EMS in 96-Loch-Platten) ausgesät, mit verschiedenen Mengen an EMS (2000 bis 150 µg/ml, gelöst in Medium, siehe Tabelle 55) behandelt und das Überleben der Zellen 5 Tage lang verfolgt.

Konzentration EMS [µg/ml]	Aussehen der Zellen nach 1 Tag	Aussehen der Zellen nach 5 Tagen
0	normales Zellwachstum	normales Zellwachstum
150	keine Unterschiede zu Kontrolle	keine Unterschiede zu Kontrolle
200	s.o.	s.o.
300	s.o.	s.o.
350	s.o.	s.o.
500	s.o.	einige Zellen abgestorben
700	s.o.	merkbar weniger Zellen
1000	s.o.	nur wenige Zellen leben noch
2000	fast alle Zellen abgestorben	alle Zellen abgestorben

**Tabelle 55: Dargestellt ist das Ergebnis einer Dosis-Wirkungskurve mit EMS zur Ermittlung der optimalen Konzentration des Mutagens**

Die richtige Konzentration des Mutagens liegt dann vor, wenn ein Großteil der Zellen überlebt, wobei das Absterben einiger Zellen auf eine erfolgreiche Mutagenese hinweist. Hier liegen dann Mutationen in lebenswichtigen Genen vor, oder aber die Zellen sind von multiplen Mutationen betroffen, die die Zelle so stark schädigen, dass sie abstirbt.

Bei 500 µg/ml EMS überlebte ein Großteil der CHO-Zellen, daher wurde diese Konzentration für die weiteren Experimente gewählt.

#### 3.2.2.2 Chemische Mutagenese und Versuch der Selektion von Chlamydien-resistenten Klonen

Ein erster Ansatz sah eine Mutation der Zellen in Zellkulturflaschen mit 185 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche vor. Nach Ausbildung des durch Mutation erhaltenen neuen Phänotyps (nach sechs Tagen) wurden die Zellen noch einmal passagiert und nach einem weiteren Tag mit krudem

Chlamydienmaterial infiziert. Es wurde gewartet bis ein Großteil der Zellen, bedingt durch die chlamydiale Infektion, abgestorben war und sich wieder einzelne Zellkolonien aus überlebenden Zellen auf dem Flaschenboden herausgebildet hatten. Nun wurde die Infektion wiederholt und erneut gewartet. Nach vier Infektionsrunden wurden die nachgewachsenen Zellen aus den Flaschen herausgelöst und in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) ausgesät. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz wachsen gelassen und erneut infiziert. Hierbei konnten keine resistenten Zellen ermittelt werden.

In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen nach erfolgter chemischer Mutagenese in 96-Loch-Platten durch limiting-dilution auf Einzelzell-Ebene ausgedünnt und mehrfach nach dem oben beschriebenen Prinzip infiziert. Auch durch diesen Ansatz konnten leider keine Chlamydien-resistenten Klone isoliert werden.

### **3.3 Teil 3:**

#### **Erzeugung von chlamydialen GFP-Fusionsproteinen**

Diese Experimente zielten auf die Identifizierung von chlamydialen Effektorproteinen ab, die phänotypische Änderungen in den Wirtszellen auslösen. Dazu sollten eukaryonte Expressionsvektoren mit chlamydialen Genen erzeugt, in eukaryonten Zellen exprimiert und die Zellen auf eine daraus resultierende Veränderung hin untersucht werden. Über ihre potentielle Funktion identifizierte Kandidaten müssten natürlich anschließend näher charakterisiert werden, insbesondere müsste überprüft werden, ob sie tatsächlich nach chlamydialer Infektion im Wirtszellzytosol zu finden sind.

Für diese Experimente wurde die gleiche Zelllinie wie für die Array-Experimente gewählt, damit dort identifizierte phänotypische Änderungen, die durch eine chlamydiale Infektion hervorgerufen wurden in dieses Modell direkt übertragbar sind. Aus diesem Grund wurde bei der verwendeten Zelllinie auch auf gute genetische Manipulierbarkeit geachtet.

Um überprüfen zu können, ob die ausgewählten chlamydialen Gene in unserem Vektorsystem überhaupt von eukaryonten Zellen exprimiert werden, wurden diese zuerst als Fusions-Proteine mit dem *green fluorescent protein* (GFP) erzeugt, wobei das GFP-Protein C-terminal auf das chlamydiale Protein folgt. Die gleichen chlamydialen Proteine wurden ebenfalls als Einzelproteine erzeugt, um bei erfolgreicher Expression diese ebenfalls in eukaryonten Zellen zu exprimieren. So sollte sicher gestellt werden, dass auch ein Effekt, der einen freien C-Terminus des Proteins benötigt, auftreten kann.



### 3.3.1 Vorarbeiten zur Expression von GFP-Fusionsproteinen

Das Verfahren zielt darauf ab in einem Screening möglichst viele Proteine in kurzer Zeit herzustellen und zu untersuchen. Deswegen wurden die ausgewählten Gene über das schnelle Verfahren des TOPO-Cloning in den Expressions-Vektor pCDNA3.1-CT-GFP-TOPO inkloniert. Um eine Sequenzierung jedes einzelnen Gens (bei 20-30 geplanten) zu umgehen, wurden jeweils mehrere Klone des selben Gens vereinigt und anschließend auf ihre Expression hin überprüft. Ein Einzelklon sollte erst nach positiver Überprüfung eines Effekts auf die Zelle isoliert werden. Im Gemisch sollte ein Einzelklon, der einen funktionell wirksamen Defekt hat, nicht so stark ins Gewicht fallen. Außerdem wurde wegen der deutlich kleineren Fehlerrate *Pfu*- statt *Taq*-Polymerase bei der Amplifikation der einzelnen Gene in der PCR vor der Klonierung in den Vektor verwendet.

Um zu überprüfen, ob ein Effekt durch ein eingebrachtes chlamydiales Gen in einer Zellkultur auch dann noch messbar ist, wenn nicht alle Zellen einen intakten Expressionsvektor aufnehmen, folglich kein Protein exprimieren, wurde ein Vorversuch durchgeführt. Hierbei wurde ein Kontrollvektor, der  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert (pCDNA3.1 HisB-lacZ) mit einem Leervektor (pCDNA3.1 HisB) „verdünnt“, transient transfiziert und über einen  $\alpha$ -Gal-Assay überprüft, wieviele Zellen noch  $\beta$ -Galaktosidase positiv waren.

Verhältnis von pCDNA3.1 HisB-lacZ : HisB	$\beta$ -Galactosidase-positive Zellen
0:1	0
1:0	20 %
1:1	10 %
1:10	1 %
1:100	unter 1 %
1:1000	ca. 0,001 %
1:10000	0

**Tabelle 56: Ergebnis der transienten Transfektion ( $\text{Ca}^{2+}$ -Methode) von HeLa T-Zellen mit dem Vektor pCDNA3.1 HisB-lacZ gemischt mit pCDNA3.1 HisB. Dargestellt sind die  $\beta$ -Galaktosidase-positiven Zellen in Prozent, also die Zellen, die das Plasmid mit lacZ aufgenommen haben. Der Nachweis erfolgte über einen  $\alpha$ -Gal-Assay. Die Prozentangaben basieren auf visuellen Abschätzungen unter dem Lichtmikroskop und ließen sich in einem Wiederholungsexperiment bestätigen.**

Aus diesem Vorexperiment folgt, dass bei einer Transfektion, in die nur 10 % des gewünschten Plasmids eingesetzt werden unter diesen Bedingungen ( $\text{Ca}^{2+}$ -Transfektion, HeLa T-Zellen) nur ein Prozent der Zellen dieses Plasmid aufnimmt/exprimiert. Bei der Verwendung von einem Gemisch von fünf Vektoren, die alle das gewünschte chlamydiale Plasmid exprimieren sollten, sollten, bei nur einem intakten Vektor/Gen noch zwei Prozent der Zellen dieses exprimieren (entsprechend mehr Zellen bei mehr als einem intakten Vektor).

### 3.3.2 Auswahl möglicher chlamydialer Effektorproteine

Wie schon in der Einleitung (Kapitel 1.5) dargelegt, ist es fast unmöglich chlamydial Effektorproteine, vornehmlich des Typ III Sekretionsapparates, alleine über ihre Sequenz zu ermitteln. Hier wurden daher Proteine ausgewählt, die sich entweder durch ihre genomische Nähe zu identifizierten Proteinen des Typ III Sekretionsapparates auszeichnen, da in vielen Bakterien so eine räumliche Anordnung bekannt ist, oder Proteine bei denen bereits Anhaltspunkte bestehen, dass sie in das Wirtszellzytosol sekretiert bzw. in die Membran des Einschlusses inseriert werden.

### 3.3.3 Expression der GFP-Fusionsproteine

Es konnten bisher sieben Konstrukte als GFP-Fusionsproteine erzeugt werden (siehe Tabelle 57). Eine Überprüfung der Konstrukte durch transiente Transfektion zeigte in allen Fällen grün-fluoreszierende Zellen, also eine Expression der Fusionsproteine.

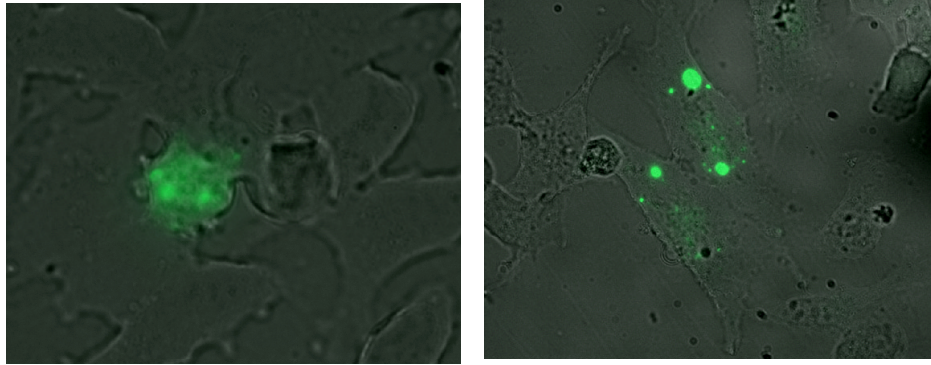
Genbezeichnung	Genname	Länge des Gens [bp]	aus Organismus
CT089	lcrE	1272	<i>C. trachomatis</i> L2
CT119	incA	822	<i>C. trachomatis</i> L2
CT232	incB	348	<i>C. trachomatis</i> L2
CT233	incC	537	<i>C. trachomatis</i> L2
CT249	-	350	<i>C. trachomatis</i> L2
CT354	ksgA	830	<i>C. trachomatis</i> L2
CPn0585	-	1997	<i>C. pneumoniae</i>

**Tabelle 57: Chlamydiale Proteine, die als GFP-Fusionsproteine in eukaryonten Zellen durch transiente Transfektion exprimiert wurden.**

Die Zellen wurden dabei auf Glasplättchen wachsen gelassen und drei Tage nach transients Transfektion aus dem Kulturgefäß genommen und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei zeigte sich, dass die Verteilung der verschiedenen chlamydialen Proteine in den Zellen sehr unterschiedlich war, wobei alle Konstrukte nur in einer relativ geringen Anzahl von Zellen (1-10 % grün-fluoreszierende Zellen) exprimiert waren.

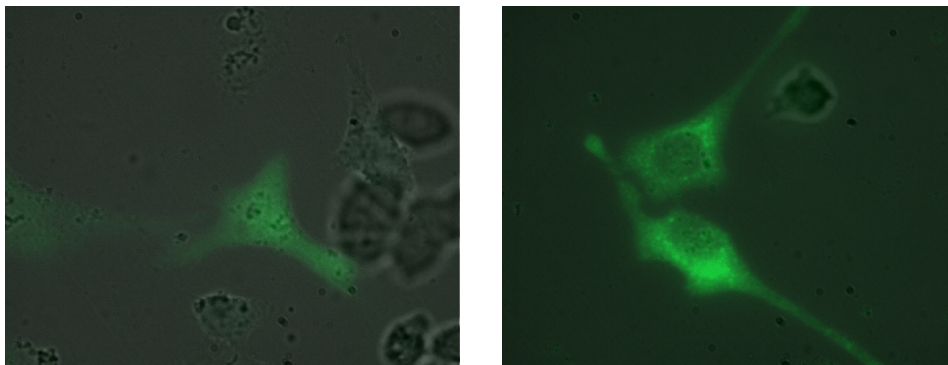
Bei drei der Proteine (CT233, CT249 und CT354) waren die Zellen, die grün-fluoreszierende Proteine exprimierten, nach drei Tagen stark verformt und wahrscheinlich abgestorben. Hier konnte keine konkrete Aussage mehr über die Verteilung der GFP-Fusionsproteine getroffen werden, wobei es aber so aussah, als ob die Verteilung der grün-fluoreszierenden Proteine innerhalb der Zellen unterschiedlich war (siehe Abbildung 11 links).

Die Expression von CT119 (incA) und CT232 (incB) führte zu einem Expressionsmuster, bei dem sich die Fluoreszenz auf kleine Bereiche in der Zelle konzentriert, wobei unklar ist, ob diese Bereiche einem bestimmten Zellkompartiment zuzuordnen sind (siehe Abbildung 11 rechts).



**Abbildung 11:** Bilder von HeLa-Zellen drei Tage nach transienter Transfektion mit Plasmiden für die chlamydiale GFP-Fusionsprotein von CT249 (links) und CT119 (rechts), aufgenommen an einem Fluoreszenzmikroskop

Bei Zellen, die das Fusionsprotein von CT089 (*lcrE*) exprimierten waren hingegen die ganzen Zellen ausgefüllt mit grün-fluoreszierenden Proteinen (siehe Abbildung 12 links). Bei der Expression des Proteins aus *C. pneumoniae* Cpn0585 verteilte sich das Protein ebenfalls über die ganze Zelle, wobei hier ein Bereich ausgespart wurde, der vermuten lässt, dass keine Fusionsproteine im Zellkern vorlagen (siehe Abbildung 12 rechts).



**Abbildung 12:** Bilder von HeLa-Zellen drei Tage nach transienter Transfektion mit Plasmiden für die chlamydialen GFP-Fusionsprotein von CT089 (links) und Cpn0585 (rechts), aufgenommen an einem Fluoreszenzmikroskop

Von allen Konstrukten gibt es auch ein Plasmid, bei dem ein Stopp zwischen dem chlamydialen Protein und dem GFP eingefügt wurde, so dass ein freies chlamydiales Protein bei der Expression entsteht.

Die geplante Überprüfung der Effekte dieser Konstrukte auf HeLa-Zellen, wie ein möglicherweise durch sie induzierter Anstieg der Interleukin 8- oder 6-Sekretion oder eine andere der im Array identifizierten Antworten, konnte aus zeitlichen Gründen während dieser Dissertation nicht mehr durchgeführt werden.



## 4 Diskussion

### 4.1 Untersuchungen zur Chlamydien-induzierten Genexpression

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Beeinflussung der Genexpression einer Wirtszelle durch Chlamydien untersucht werden. Dabei sollten sowohl die Auswirkungen einer Infektion mit *C. trachomatis* als auch mit *C. pneumoniae* zu unterschiedlichen Zeitpunkten vergleichend analysiert werden.

Durch die Verwendung von Microarrays war es möglich, ein zeitaufgelöstes Bild der durch Chlamydieninfektion ausgelösten Regulationsvorgänge auf mRNA-Ebene zu erhalten. Es konnten über 1500 Gene ermittelt werden, deren Expression nach Infektion mit Chlamydien verändert erschien. Parallel wurde ein Teil der Experimente auch mit abgetötete Chlamydien durchgeführt, um im Vergleich die Regulationen zu identifizieren, die von Chlamydien aktiv hervorgerufen werden. Ein Teil der mittels Microarrays gefundenen Veränderungen der Genexpression wurde anschließend durch die Verwendung der *Real-Time*-RT-PCR weiter analysiert oder auf Proteinebene durch ELISA untersucht. Dies hatte zum Ziel Wirtszellgene zu identifizieren, die möglicherweise eine tragende Rolle bei einer chlamydialen Infektion und daraus resultierenden Krankheiten spielen.

Um eine Aussage über die Zuverlässigkeit dieser Ergebnisse und ihre physiologische Bedeutung treffen zu können, muss man verschiedene Faktoren berücksichtigen. Ein erster wichtiger Punkt ist die Güte der durchgeführten Arrays, also die Verlässlichkeit der durch sie ermittelten Regulationen der Genexpression. Daran schließt sich die Frage an, in wie weit die in HeLa-Zellen ermittelten Regulationsvorgänge auf andere Zellen übertragbar sind und in wie weit sich dann Hinweise und Rückschlüsse auf die Pathogenese von Krankheitsbilder treffen lassen. Letztlich ist noch von Interesse, ob es sich bei den gefundenen Regulationen um Beeinflussungen der Wirtszelle handelt, die ausschließlich durch Chlamydien ausgelöst werden und nicht generell auch durch andere Bakterien und ob es wiederum innerhalb der Familie der *Chlamydiaceae* Genus- bzw. Spezies-spezifische Regulationsvorgänge gibt.

#### 4.1.1 Güte der Ergebnisse

##### 4.1.1.1 Array-Ergebnisse

Microarrays liefern in nur einem Experiment eine große Menge an Daten. Bedingt durch den Einzelexperiment-Charakter dieser Methode kann bei den Ergebnissen ein relativ hoher stati-

stischer Fehler entstehen. Zusätzlich können systematische Fehler für die Regulationen einzelner Gene vorliegen. Die Beurteilung des statistischen Fehlers kann durch Vergleich mehrerer Microarray Experimente untereinander erfolgen, systematische Fehler lassen sich nur durch den Vergleich mit anderen Methoden aufdecken. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bei biologischen Experimenten die Versuchsbedingungen nicht völlig konstant gehalten werden können. Hier konnte beispielsweise nicht für alle Experimente dieser Arbeit auf den selben Chlamydienstock zurückgegriffen werden. Auch wenn natürlich versucht wurde, alle Versuchsparameter so konstant wie möglich zu halten, können kleine, unvermeidbare Unterschiede in der Chlamydienzahl zu einer leichten Verschiebung der Kinetik der Chlamydienentwicklung und somit zu Verschiebungen in der Kinetik der Regulationsvorgänge führen.

Ein wichtiger Punkt bei der Bewertung der im Array ermittelten Regulationen der Genexpression ist der ermittelte Regulationsfaktor. Hier ist die Überlegung wichtig, ab welchem Faktor die aufgezeigten Regulationen mit hoher Wahrscheinlichkeit als signifikant aufzufassen sind und nicht mehr nur Ausdruck der statistischen Schwankung sind.

Da die Verwendung von Microarrays noch eine relativ neue Methode ist und wegen des hohen zeitlichen und finanziellen Aufwandes statistische Untersuchungen nur in Ausnahmefällen möglich sind, gibt es hierfür keine allgemein gültigen Richtlinien. Das Problem, ab wann die gemessenen Regulationen als verlässlich gelten, wurde hier in einem pragmatischen Ansatz angegangen. Es wurde als unterer Grenzwert zur ersten Betrachtung eines Gens der Faktor 1,5 gewählt. Zusätzlich wurden zur Reduktion falsch positiver Resultate und zur Fokussierung auf substantielle Regulationsvorgänge Gene mit einem Faktor  $\geq 3$  hervorgehoben. Im weiteren wird dargelegt, dass diese Einteilungen gut in der Praxis verwendbar sind.

#### 4.1.1.1.1 *Statistische Bewertung der Array-Ergebnisse*

Um statistische Fehler bei der Auswertung der Arrays zu minimieren, wäre eine häufige Wiederholung der einzelnen Array-Experimente sinnvoll. Ein solches Vorgehen ist allerdings aus finanziellen Gründen den wenigsten Arbeitsgruppen möglich. In unserem Fall verzichteten wir – insbesondere im zweiten Analyseblock – bewußt, bei einer limitierten Anzahl von uns zur Verfügung stehenden Arrays zu Gunsten einer zeitlich umfassenderen Analyse weitgehend auf Wiederholungsexperimente.

Für den zentralen Array des ersten Versuchsblocks, 24 Stunden nach Infektion von HeLa-Zellen mit *C. trachomatis* erfolgte eine Wiederholung. Es wurde, wie in Kapitel 3.1.2.1.2.1 dargelegt, eine statistische Bewertung mittels Fishers Exaktem Test durchgeführt. Dieser Test ergab, dass bei Genen, die in beiden Array-Experimenten mit einem Faktor  $\geq 3$  reguliert wa-

ren, diese Regulation mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ( $p < 0,00005$ ) signifikant ist. Diese Analyse war hier besonders wichtig, da der Clontech-Array durch seinen Aufbau – jedes Gen ist nur durch ein cDNA-Stück repräsentiert – eher anfällig ist für statistische Fehler. Diese Überprüfung zeigt eindeutig, dass die so ermittelten Regulationen dennoch sehr zuverlässig und gut verwertbar sind.

Bei den Microarrays der Firma Affymetrix bietet das Design der Arrays an sich schon eine höhere Sicherheit: Pro Gen werden hier mehr als 10 unterschiedliche Oligonukleotide verwendet. Zusätzlich erfolgt eine Kontrolle der unspezifischen Fehlbindungen an dieses Oligonukleotid über die Paarung von *perfect match* und *mismatch*. Aus diesen Angaben wird ein Intensitätswert sowie eine Wertung für die Güte dieses Datenpunktes ermittelt. Somit werden hier statistische Fehler schon sehr früh berücksichtigt. Zusätzlich gibt es Gene, für die (teils unter unterschiedlichen Accession-Nummern) mehrere Datensätze in einem Durchgang produziert werden, wie in Kapitel 3.1.2.4.1.2 ausgeführt. Sie können zur internen Kontrolle herangezogen werden. So wurden für das Gen CD44 bis zu drei Datensätze parallel ermittelt, die alle sehr ähnliche Regulationsfaktoren ergaben.

Für einen der Affymetrix-Arrays, den Vergleich von HeLa-Zellen 48 Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis*, wurde zusätzlich eine Wiederholung durchgeführt. Die vorgesehene exemplarische statistische Auswertung der Daten über Fishers Exakten Test war aber leider nicht möglich, da trotz mehrmaliger Nachfragen nicht alle dafür benötigten Informationen von der Firma GSK, bei der in Kooperation die Affymetrix-Arrays durchgeführt wurden, zu erhalten waren. Doch können hier zusätzlich andere Beurteilungskriterien für eine Bewertung der Daten der Affymetrix-Arrays herangezogen werden:

Ein solches Beurteilungskriterium fußt in der Annahme, dass Genregulationen in der Regel über einen gewissen Zeitraum hinweg auftreten. Bei der Untersuchung der Genexpression mittels Affymetrix-Arrays wurden mehrere, relativ dicht aufeinander folgende Zeitpunkte betrachtet. Es ist daher anzunehmen, dass eine tatsächliche Regulation nicht nur isoliert zu einem Zeitpunkt vorliegt, sondern zu mehreren aufeinander folgenden Zeitpunkten. Ergebnisse, die dieses Verhalten zeigten, erhalten damit ein stärkeres Gewicht als Einzelergebnisse. Betrachtet man beispielsweise die durch Infektion mit *C. trachomatis* verändert exprimierten Transkriptionsfaktoren, so erhält man 65 Gene, die mindestens zweimal reguliert sind und davon mindestens einmal mit einem Regulationsfaktor  $\geq 1,5$ . Verschärft man nun die Auswahlkriterien dadurch, dass das Gen zu zwei direkt aufeinander folgenden Zeitpunkten reguliert sein muss (oder aber in beiden 48 Stunden Arrays), so reduziert sich die Liste auf 33

Transkriptionsfaktoren die mit größerer – wenn auch nicht exakt berechenbarer - Wahrscheinlichkeit tatsächliche Regulationsvorgänge darstellen. Verschärft man nun die Bedingungen weiter, indem man nur Regulationen betrachtet, die einmal einen Faktor  $\geq 3$  aufweisen und sich damit deutlich vom statistischen Rauschen abheben, so bleiben 16 Gene übrig. Diese konservative Vorgehensweise nimmt den Verlust an Informationen in Kauf, dafür sind aber die verbliebenen Regulationen wesentlich wahrscheinlicher. Will man die Informationen des Arrays verwenden, um Gene für eine weiterführende Analyse auszuwählen, so sollte man mit dieser Herangehensweise in der Lage sein vielversprechende Kandidaten herauszufiltern. Dies wurde mittels RT-PCRs letztendlich auch exemplarisch bestätigt (siehe 4.1.1.1.3).

Eine andere Möglichkeit, sich ein Bild über die Güte der an lebenden Chlamydien erhaltenen Ergebnisse zu machen, ist deren Gegenüberstellung mit durch UV-inaktivierten Chlamydien erzeugten (siehe Abbildung 13). Die im Array ermittelte Beeinflussung der Genexpression durch UV-inaktivierte Chlamydien war minimal. Die solcherart behandelten EK können nicht mehr in die Zelle eindringen und diese aktiv beeinflussen. Zudem sind die unter anderem auch aus diesem Grund gewählten epithelialen HeLa-Zellen, wenn überhaupt, nur sehr gering LPS responsiv. Fast alle ermittelten Regulationsfaktoren liegen unter Faktor drei. Dies bestätigt die Annahme, dass bei Faktoren größer drei von einer tatsächlichen Regulation ausgegangen werden kann.

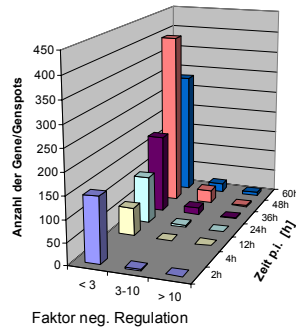
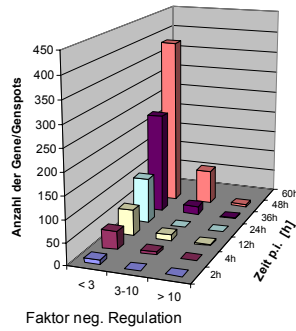
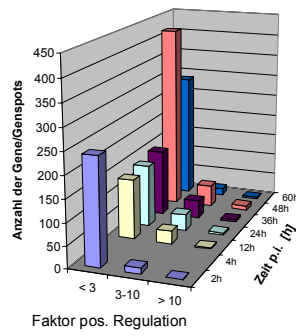
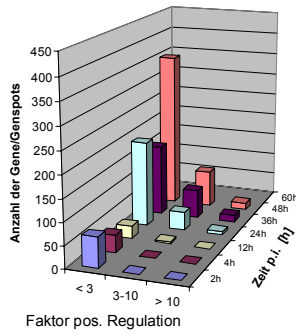
Damit können die Arrays dazu dienen, einen Eindruck vom aktiv induzierten Genexpressionsprofil zu erhalten, und, insbesondere bei der Einführung der geschilderten strengen Auswahlkriterien, Gene für weiterführende Analysen zu selektionieren.



*C. trachomatis*

lebende EK

*C. pneumoniae*



UV-inaktivierte EK

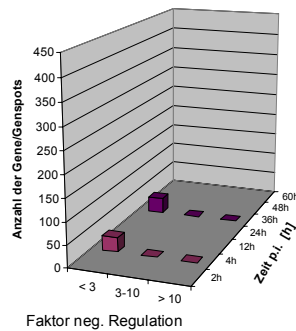
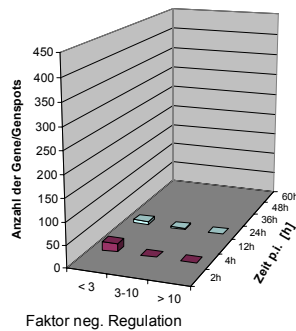
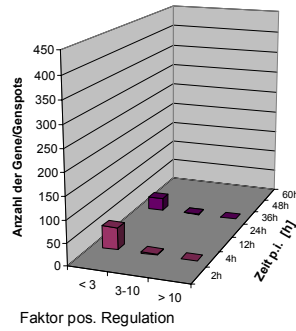
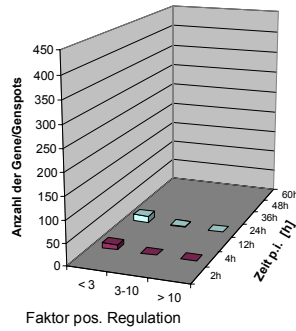


Abbildung 13: Zahlenmäßige Übersicht der durch die Microarrays der Firma Affymetrix ermittelten Veränderungen der Genexpression durch Chlamydien. In der oberen Hälfte sind die Veränderungen der Genexpression bei HeLa T-Zellen durch Infektion mit lebenden *C. trachomatis* bzw. *C. pneumoniae* (im Vergleich mit schein-infizierten HeLa-Zellen) dargestellt, in den unteren vier Abbildungen sind die Veränderungen, die durch die Behandlung mit UV-inaktivierten EK der beiden Spezies resultieren. Aufgetragen ist die Anzahl der Regulationen mit dem jeweiligen Faktor der Regulation gegen die Analyse-Zeitpunkte nach Infektion (p.i.).

#### 4.1.1.1.2 Abgleich der Ergebnisse der Clontech und der Affymetrix-Arrays

Da in den beiden Experimentblöcken mit Arrays der Firma Clontech und Arrays der Firma Affymetrix der selbe Chlamydienstamm (Serovar L2) verwendet wurde, sollten bei den in beiden Arrays repräsentierten Genen im Wesentlichen übereinstimmende Ergebnisse erzielt worden sein. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass es sich methodisch um zwei unterschiedliche Array-Systeme handelt, die einzelne Gene unterschiedlich gut detektieren. Insbesondere sind die Sensitivitäten der beiden Array-Systeme verschieden: Der wesentlich kleinere Clontech-Array, mit nur etwa 10 % der Gene des Affymetrix-Arrays, weist durch Verwendung von  $^{32}\text{P}$ -markierten Proben eine höheren Sensitivität auf. Dafür ist der Affymetrix-Array durch die Verwendung von mehr als 10 Oligonukleotiden pro Gen und einer *Mismatch*-Kontrolle spezifischer. Ein Fehlen einer Regulation in einem der beiden Arrays muß also nicht unbedingt einen Widerspruch darstellen. Ein weiterer Aspekt, der schon erwähnt wurde, ist die Verwendung verschiedener Chlamydienstocks für die Experimente, die zu einer leichten Verschiebung der Kinetik führen kann. Somit kann ein Gen in dem einen Fall schon nach 12 Stunden reguliert sein und in dem anderen Experiment erst nach 24 Stunden.

Trotz dieser Einschränkungen in der Vergleichbarkeit der durchgeführten Microarray-Analysen ergaben sich sehr gute Übereinstimmungen. Vergleicht man die Ergebnisse der 24 Stunden Clontech-Arrays mit den Affymetrix-Arrays so erhält man eine Übereinstimmung von 82 %. Bei diesem Vergleich wurden die 18 Gene betrachtet, die reproduzierbar mit einem Faktor  $\geq 3$  in den beiden 24 Stunden-Clontech-Arrays reguliert waren. Von diesen Genen sind 17 ebenfalls in den Affymetrix-Arrays enthalten und 14 davon (82 %) sind in mindestens einem Affymetrix-Array mit *C. trachomatis* gleichgerichtet reguliert. Beschränkt man sich ausschließlich auf den direkten Vergleich der 24 Stunden-Arrays, so lassen sich immerhin noch 11 dieser Gene in dem Versuch mit Affymetrix-Arrays wiederfinden.

Bezieht man in diese Analyse auch die Gene ein, die nur reproduzierbar mit einem Faktor  $\geq 1,5$  in den 24 Stunden-Clontech-Arrays reguliert sind, also Gene, die nur sehr schwache Regulationen zeigen, so können von diesen 59 Genregulationen zumindest noch 46 % direkt bestätigt werden. Auch dies zeigt, dass das von uns in der Regel gewählte stringente Vorgehen (Faktor  $\geq 3$ ) wesentlich vorteilhafter und sicherer ist. Nur für ein einziges Gen (Stratifin) besteht ein Widerspruch zu den Ergebnissen der Clontech-Arrays, wobei die aufgezeigten Regulationen in den Affymetrix-Arrays unterhalb der durch uns gesetzten Grenze von Faktor 1,5 liegen.

Demnach ergibt der Vergleich von Genregulationen mit einem Faktor  $\geq 3$  sehr gut reproduzierbare Ergebnisse zwischen den beiden Array-Systemen. Nur bei Genen mit sehr geringen Regulationen kam es zu Abweichungen.

#### 4.1.1.1.3 Vergleich der Ergebnisse der Real-Time-RT-PCRs und der Array-Experimente

Es wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit zwei experimentelle Blöcke mit *Real-Time-RT-PCRs* durchgeführt, um einerseits die in den Arrays ermittelten Ergebnisse mit einer zweiten unabhängigen Methode zu verifizieren, aber auch, um neue Informationen durch das Hinzufügen von Analyse-Zeitpunkten oder Proben mit anderen Spezies bzw. Serovaren zu erhalten. Durch die Amplifikation des nachzuweisenden Gens ist diese Methode um einiges sensitiver als ein Microarray. So ist zu erwarten, dass mit der *Real-Time-PCR* schon Regulationen nachweisbar sind, die im Array erst zu späteren Zeitpunkten auftreten oder aber auch, dass für Gene, die keine Regulation zeigten, aber auch nahe der Nachweisgrenze des Arrays lagen, mittels *Real-Time-PCR* Unterschiede in der Expression detektierbar werden.

In der ersten experimentellen Versuchsreihe von *Real-Time-RT-PCRs*, in dem die Ergebnisse der Clontech-Arrays überprüft werden sollten, konnte eine sehr gute Übereinstimmung von Arrays und *Real-Time-RT-PCR* ermittelt werden: acht der neun untersuchten Gene fanden eine Bestätigung. Für das einzige Gen, das sich nicht bestätigen ließ (Cadherin 3), war auch keine Regulation in den anschließend durchgeführten Affymetrix-Arrays nachzuweisen.

Im zweiten Block von *Real-Time-RT-PCRs* wurde ebenfalls eine gute Übereinstimmung erzielt. Ein Großteil der Affymetrix-Array-Ergebnisse fand hier Bestätigung. Zusätzlich konnte, wie erwartet, die Regulation einiger Gene aufgezeigt werden, die an der jeweils anderen Spezies im Array nicht detektierbar gewesen waren.

Nur in zwei Fällen konnte eine im Array ermittelte Regulation in der *Real-Time-PCR* nicht bestätigt werden und zwar für die veränderte Expression von DUSP4 und GAS1 nach Infektion mit *C. pneumoniae*. Bei beiden Genen sind die Faktoren der Regulation in den Arrays in der primären Auswertung durch GSK jedoch als unsicher („\*“) markiert. Das sind Fälle bei denen in den Arrays nur geringe, schlecht quantifizierbare Signale vorlagen. Dies bestätigt, dass solche Messergebnisse tatsächlich mit größerer Vorsicht zu betrachten sind.

#### 4.1.1.2 Überprüfung der Array-Ergebnisse durch ELISA

Als weitere unabhängige Methode zur Bestätigung und weiteren Analyse der durch den Einsatz von Microarrays ermittelten Veränderungen der Genexpression wurden hier ELISA durchgeführt. Dabei wurde in Zellkulturüberständen von infizierten und nicht infizierten Zel-

len der Gehalt an freigesetzten Zytokinen gemessen und damit exemplarisch die Veränderung der Genexpression auch auf Proteinebene betrachtet.

Es konnte die vermehrte Expression von IL-11 und IL-8, die in beiden Blöcken von Array-Experimenten aufgezeigt wurde, über einen ELISA bestätigt werden. Die vermehrte Expression von LIF, die in den Clontech-Arrays vorlag, konnte für infizierte HeLa-Zellen so nicht verifiziert werden: Für HeLa-Zellen war im ELISA nur ein Trend der vermehrten Expression von LIF aufzuzeigen. Dafür konnte aber bei Verwendung anderer Zellen diese Regulation nachvollzogen werden: Bei primären Chondrozyten und einer Synovialfibroblastenlinie kam es zu einem deutlich meßbaren Anstieg der LIF-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Infektion mit *C. trachomatis*.

Der Nachweis eines Anstiegs der IL-6-Sekretion nach Infektion mit Chlamydien, der in den Affymetrix-Arrays zu sehen war, aber nicht in den Clontech-Arrays, konnte ebenfalls erbracht werden. Durch die engen Zeiträume der Probenentnahme für den IL-6 ELISA konnte auch gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infektion kein großer Unterschied in der IL-6-Sekretion zwischen infizierten und der spontanen Sekretion bei nicht infizierten Zellen besteht. Dies könnte die negativen Ergebnisse des Clontech-Arrays erklären.

Zusammengenommen zeigt die Überprüfungen von Ergebnissen der Microarrays über ELISA exemplarisch, dass sich ermittelte Regulationen der mRNA-Expression prinzipiell auch auf Proteinebene und auch in anderen, für chlamydiale Infektion relevanten Zellarten wiederfinden lassen.

#### **4.1.1.3 Vergleich mit Literaturangaben**

Ein Vergleich mit in der Literatur beschriebenen, durch Infektion mit Chlamydien ausgelösten Veränderungen der Genexpression ist nicht ganz einfach, da dort häufig andere Zellen und Chlamydienstämme für diese Versuche verwendet wurden. Zusätzlich unterschieden sich häufig weitere Versuchsbedingungen: so wurden die Zellen beispielsweise nicht in einem Zentrifugationsschritt infiziert und danach „gewaschen“ und somit synchronisiert, oder es wurden andere Mengen an Chlamydien zur Infektion verwendet.

Nichtsdestoweniger zeigt sich für einige wenige Gene, die im Vorfeld von anderen schon untersucht worden waren, dass die von uns in den Arrays ermittelten Chlamydien-induzierten Regulationen mit den in den Einzelexperimenten ermittelten Zellantworten gut übereinstimmen.

Für die Effekte von *C. trachomatis* auf Epithelzellen gibt es einige Veröffentlichungen, die schon in Kapitel 1.4.1 erwähnt wurde. So konnte der Anstieg von IL-6, IL-8 und IL-11 ge-

zeigt werden [15,16], ebenso wie ein Anstieg der Expression von IL-8, PTGS2 und ICAM1 nach Infektion mit *C. pneumoniae* [17].

Bei SMCs konnte durch Infektion mit *C. pneumoniae* ein Anstieg an FGF2 nachgewiesen werden [21], ebenso bei Endothelzellen, dort kam es weiterhin zu einer vermehrten Expression von IGFBP4 und HASPP28 [57]. Ein Anstieg an SERPINE1 wurde bei VSMCs nach *C. pneumoniae*-Infektion ermittelt [20] und bei Mesothelzellen nach *C. trachomatis*-Infektion [58].

Es wurden in der Literatur allerdings auch eine Anzahl von Regulationen genannt, die in den hier durchgeführten Versuchen nicht aufgezeigt wurden. Dies kann eine Reihe von Gründen haben, wie die Wahl der Zellen, der Chlamydienstämme und insbesondere der Sensitivität der Nachweismethode.

Natürlich läßt sich nicht jede Veränderung der Genexpression mit Microarrays ermitteln, da einerseits Gene unterhalb der Nachweisgrenze des Arrays reguliert sein können, oder Regulationen in der gewählten Zelle nicht auftreten. Außerdem können sich die Regulationsvorgänge auch auf posttranskriptioneller Ebene abspielen. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Verwendung von Microarrays eine Vielzahl von Daten liefert, die für eine weitere Analyse der Regulationsvorgänge in der Wirtszelle sehr nützlich sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich diese in den Arrays ermittelten Regulationen insbesondere dazu eignen, Gene für eine weitere Analyse auszuwählen, um so beispielsweise durch die Verwendung von *Real-Time-RT-PCRs* oder *ELISAs* weiter Informationen zu erhalten.

#### **4.1.2 Bedeutung der veränderten Genexpressionen**

Durch die Verwendung von Microarrays konnten mehr als 1500 Gene aufgezeigt werden, deren Expression durch eine Infektion der Wirtszelle mit Chlamydien beeinflusst wird. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf dieser vermehrten oder verminderten Genexpression, so finden die meisten Reaktionen zu späteren Zeitpunkten (ab 12 bzw. 24 Stunden nach Infektion) statt, wobei zu diesen Zeitpunkten auch die Stärke der Regulation zunimmt. Vergleicht man dabei die Veränderungen, die durch *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* ausgelöst werden, so ist auffallend, dass bei *C. pneumoniae* schon 2 Stunden nach Infektion eine ganze Reihe von Genen verändert exprimiert wird. Dies ist überraschend, da *C. pneumoniae* wesentlich mehr Zeit für einen vollständigen Entwicklungszyklus benötigt als *C. trachomatis*.

Betrachtet man nun die Auswirkungen durch abgetötete Chlamydien, so sieht man kaum Veränderungen in der Genexpression. (Zur Übersicht dient Abbildung 13.) Daher müssen die Beeinflussungen durch lebende Organismen aktiv ausgelöst werden, also entweder durch das

Eindringen in die Wirtszelle oder durch Mechanismen, die die Chlamydien innerhalb der Zelle auslösen.

Die hier verglichenen Chlamydienstämme unterscheiden sich sowohl in ihrem Genom als auch in den durch sie hervorgerufenen Krankheitsbildern. Daher ist von großem Interesse, welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den ausgelösten Regulationen der Genexpression innerhalb der Spezies *C. trachomatis* oder innerhalb der Familie der *Chlamydiaceae* oder aber zwischen durch Chlamydien verursachten Änderungen der Genexpression und Veränderungen, die andere Bakterien bei ihren Wirtszellen hervorrufen, bestehen.

Die Vorgänge bei einer chlamydialen Infektion *in vivo* unterscheiden sich natürlich stark von der chlamydialen Infektion einer Zelllinie *in vitro*. Zum einen kann das Verhalten einer Zelllinie schon von dem einer primären Zelle gleichen Ursprungs abweichen. Zum anderen treten *in vivo* auch verschiedene Zellarten miteinander in Kontakt und beeinflussen sich gegenseitig. So würden bei einer chlamydialen Infektion Zellen des Immunsystems an den Entzündungsort einwandern und dort mit infizierten Zellen in Kontakt treten. Diese Aspekte werden in unserem Modell vollkommen vernachlässigt. Es ist daher notwendig, die bei einer Zelllinie gefundenen Regulationen daraufhin zu überprüfen, ob sie kein Artefakt eben dieser Zelllinie sind sondern bei einer anderen Zelllinie gleichen Ursprungs oder primären Zellen ebenfalls nachgewiesen werden können. Die Übertragung auf Zellen anderen Ursprungs, die ebenfalls *in vivo* Wirtszellen für Chlamydien sind, ist ein weiterer Schritt. Und letztlich müssten solche Regulationsvorgänge auch *in vivo* analysiert werden.

Wie sich nun eine bestimmte vermehrte oder verminderte Genexpression auf das Verhalten der Zelle bzw. den Ablauf einer chlamydialen Infektion *in vivo* oder auch schon *in vitro* auswirkt, kann nicht exakt vorhergesagt werden. Wählt man beispielsweise die Beeinflussung der Expression eines anti-apoptotischen Gens aus, so kann hier nicht vorhergesagt werden, ob die alleinige vermehrte Expression dieses Gens die Wirtszelle vor Apoptose schützt. Vielmehr bietet der Array die Möglichkeit Gene zu ermitteln, die mit einem aufgezeigten Phänomen, wie dem Schutz vor induzierter Apoptose oder auch mit einem Krankheitsbild, in Verbindung stehen könnten. Diese Gene können nun gezielt auf ihre Beeinflussung dieses Phänomens hin untersucht werden.

Als Beispiel wird hier ein Krankheitsbild aufgegriffen, von dem vermutet wird, das es im Zusammenhang mit Chlamydien steht: Atherosklerose. Es ist noch nicht geklärt, ob *C. pneumoniae* an der Entstehung dieser Krankheit oder dem späteren Verlauf ursächlich beteiligt ist. Es

soll hier jedoch eine mögliche inhaltliche Beziehung zwischen Genen deren Expression im Array als durch *C. pneumoniae* beeinflusst ermittelt wurde und Genen, die bei der Entstehung oder im Verlauf einer Atherosklerose eine Rolle spielen, hergestellt werden.

#### **4.1.2.1 Vergleich von Regulationen, die durch *C. trachomatis* L2 oder D verursacht werden**

Die Ergebnisse der *Real-Time*-RT-PCRs, die parallel mit den *C. trachomatis*-Serovaren L2 und D durchgeführt wurden, zeigen keine großen Unterschiede zwischen diesen Serovaren. Zwar unterscheiden sich die durch die beiden Serovare ausgelösten Genexpressionen zu den verglichenen Zeitpunkten teilweise, zumeist geringfügig, in ihrer Stärke, doch gab es bei den untersuchten Genen keine Regulationen, die bei dem einen Serovar vorlagen und bei dem anderen nicht, oder gar Regulationen, die unterschiedlich ausgerichtet waren. Dies legt nahe, dass sich viele der im Array ermittelten Regulationen durch *C. trachomatis* L2 auch auf eine Infektion mit *C. trachomatis* D übertragen lassen.

#### **4.1.2.2 Vergleich der Regulationen, die durch *C. trachomatis* oder *C. pneumoniae* ausgelöst werden**

Die Durchführung der Microarrays hatte insbesondere eine Gegenüberstellung der Veränderungen der Genexpression, die durch *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* ausgelöst werden, zum Ziel. Wie in Kapitel 3.1.2.4.1.2 in Tabelle 30 dargelegt, wird ein Großteil der gefundenen Veränderungen der Genexpression sowohl durch *C. trachomatis* als auch durch *C. pneumoniae* ausgelöst. Es konnten aber auch Gene ermittelt werden, die im Vergleich der Affymetrix-Arrays bei Infektion mit der einen Spezies eine Veränderung der Genexpression ergaben, bei Infektion mit der anderen Spezies aber nicht. Zusätzlich konnten Gene ermittelt werden, bei denen sich die Ausrichtung der Regulation zwischen den beiden Spezies unterschied, d.h. dass ein Gen nach Infektion mit *C. trachomatis* beispielsweise vermehrt und nach Infektion mit *C. pneumoniae* vermindert exprimiert wurde.

Betrachtet man nun die Gruppe von Genen, die im Array nur durch Infektion mit der einen Spezies verändert exprimiert werden und vergleicht die dort erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen aus den *Real-Time*-PCRs, so muß man feststellen, dass in den ausgesuchten Fällen auch eine Regulation durch die andere Spezies nachgewiesen werden konnte. Beispielsweise zeigte sich eine vermehrte Expression von EGR1 im Array nur nach Infektion der HeLa-Zellen mit *C. trachomatis*; in der sensitiveren *Real-Time*-PCR konnte aber auch eine vermehrte Expression des Gens durch *C. pneumoniae* detektiert werden. Ebenso wurde im Array nur durch die Infektion mit *C. pneumoniae* eine Steigerung der Expression von ETV4

verzeichnet; in der *Real-Time*-PCR wurde gezeigt, dass dieses Gen aber auch durch den Einfluß von *C. trachomatis* vermehrt exprimiert wird. Bei DUSP5 und NR4A2, die beide im Array ausschließlich durch die Beeinflussung von *C. trachomatis* vermehrt gebildet wurden, konnte in der wesentlich empfindlicheren *Real-Time*-PCR zumindest ein sehr schwacher Anstieg der Expression durch *C. pneumoniae* ermittelt werden. Diese Ergebnisse lassen daran zweifeln, dass ein Gen, welches im Array ausschließlich nach Infektion mit der einen Spezies eine Änderung der Expression zeigt auch tatsächlich nur durch diese Spezies verändert wird und nicht auch durch die andere. Eine nicht nachweisbare Regulation im Array ist also nicht gleichzusetzen mit dem Fehlen einer Regulation. Falsch negative Ergebnisse sind offensichtlich wesentlich schwerer zu verhindern als falsch positive. Dies erschwert eine Aussage mit den Arrays als Grundlage über Unterschiede in der Beeinflussung der Genexpression durch *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* natürlich erheblich.

Ein anderer Ansatz, um aus den Informationen der Arrays einen Unterschied zwischen *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* im Expressionsmuster bestimmter Gene ableiten zu können, ist die Konzentration auf Gene, bei denen die Unterschiede zwischen *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* in der Ausrichtung der hervorgerufenen Veränderung liegen. Legt man der Auswahl der Gene sehr konservative Kriterien zugrunde, beschränkt sich also auf deutlich regulierte Gene, die einen Faktor der Regulation  $\geq 3$  aufweisen und mindestens zu zwei aufeinander folgenden Zeitpunkten reguliert sind, wobei sie in der anderen Spezies ebenfalls mindestens einen Faktor der Regulation  $\geq 3$  aufweisen, bleiben nur noch zwei Gene, die unterschiedlich reguliert sind: die beiden Transkriptionsfaktoren FOS und NR4A1. Beide Gene werden von HeLa-Zellen ab 24 Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis* vermehrt exprimiert und durch die Infektion mit *C. pneumoniae* erst auch vermehrt exprimiert zum Zeitpunkt 12 und 24 Stunden bei FOS bzw. 2 Stunden nach Infektion bei NR4A1, dann aber nach 48 Stunden bzw. 60 Stunden vermindert gebildet. Hier steht jedoch die Bestätigung mittels einer zweiten Methode noch aus.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Array alleine nicht in der Lage ist, eindeutige Informationen über das unterschiedliche Verhalten einzelner Gene zu liefern. Wenn überhaupt, wäre dies nur durch zahlreiche kostspielige Wiederholungsexperimente möglich. Dazu ist eine zweite Nachweismethode besser geeignet. Hier wurde die *Real-Time*-RT-PCR gewählt, um exemplarisch ein genaueres Bild über die Regulationsvorgänge zu erhalten, da diese Methode sensitiver ist. Schließt man die dort gewonnen Daten in die Betrachtung ein, so sieht man tat-



sächlich ein partiell unterschiedliches Expressionsmuster nach Infektion mit *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*.

Bei fünf der zwölf in der *Real-Time*-PCR betrachteten Gene waren die durch *C. pneumoniae*-Infektion erhaltenen Veränderungen der Genexpression wesentlich schwächer als die durch *C. trachomatis*. Besonders gilt dies für IER3 und Mip-2 $\alpha$ , in abgeschwächtem Maße auch für EPHA2, ETV4 und MCL1. Diese Unterschiede in der Stärke der ausgelösten Antwort sind auch erheblich größer als die Unterschiede zwischen den beiden *C. trachomatis* Serovaren. Es scheinen, bei einem ähnlichen Grundmotiv, also tatsächlich zumindest quantitative Unterschiede zu bestehen zwischen den Antworten der Wirtszelle auf eine Infektion mit *C. trachomatis* und mit *C. pneumoniae*.

#### 4.1.2.3 Vergleich mit Genregulationen bei Infektion mit anderen Bakterien

Es konnte gezeigt werden, dass bei den näher betrachteten Regulationen der Genexpression durch zwei unterschiedliche Serovare von *C. trachomatis*, Serovar D und Serovar L2 keine großen Unterschiede bestehen. Weiterhin wurden die durch *C. trachomatis* bei der Wirtszelle hervorgerufenen Muster der Genexpression verglichen mit den Änderungen der Genexpression, die durch *C. pneumoniae* ausgelöst werden. Hierbei wurde gezeigt, dass zwar ein Großteil der hervorgerufenen Regulationen durch beide Spezies gleichermaßen ausgelöst wird, dass es aber auch einige Unterschiede in der induzierten Zellantwort gibt.

Dies wirft die Frage auf, ob die gefundenen Regulationen allgemeinen Infektionsreaktionen der Zelle entspringen oder ob es sich um Chlamydien-spezifische Vorgänge handelt. Um diese Frage beantworten zu können, werden einerseits Vergleiche mit der Literatur herangezogen und andererseits Ergebnisse laufender Arbeiten von J. Peters, bei denen ein direkter Vergleich zwischen Genexpressionen in HeLa T-Zellen durch Chlamydien und fakultativ intrazellulären Salmonellen mittels *Real-Time*-RT-PCR durchgeführt wird. Bei diesen Arbeiten, auf die hier nicht weiter eingegangen wird, ergab sich für die untersuchten 14 Gene interessanterweise, dass Salmonellen eine völlig andere Zellantwort auslösen, die sich einerseits in der Stärke der hervorgerufenen Änderungen in der Genexpression auszeichnet, aber auch dadurch, dass die Expression einiger Gene, die durch die Infektion mit Chlamydien angeregt wird nach Infektion mit Salmonellen nicht beeinflusst wird. Daneben gibt es Gene, die durch Salmonellen stark induziert werden, nicht aber durch Chlamydien. (Die Publikation dieser Daten ist in Vorbereitung.)

Ein Vergleich mit veröffentlichten Microarray-Studien zur Bestimmung von Wirtszellantworten auf unterschiedliche Bakterien ist in Tabelle 58 dargestellt.

Bakterium	Wirtszelle	Analysezeitpunkt/ verwendeter Array	gemeinsam regulierte Gene (gesamt aufgeführte Regulationen)	Literatur- verweis
enteropathogene <i>Escherichia coli</i>	HeLa-Zellen (ATCC- Nr. CCL2)	3 h p.i.  humaner 1.2 Atlas Array (Clontech)	EGR1, IL-8, MIP-2 $\alpha$ , ETR101, IER3 (6)	[59]
uropathogene <i>Escherichia coli</i>	Infektion der Maus, Zellen der Blase	3,5 h p.i. (* ebenfalls 1,5 h p.i.)  Mu11K Genechip (Affymetrix)	CEBPB, CEBPD, DUSP6, EGR1*, GADD45, IL-6, JunB*, MIP-2 $\alpha$ , NR4A2, PHLDA1*, PLAUR*, TNFAIP3, ZFP36 (56)	[60]
<i>Salmonella dublin</i>	humane kolorektale Epithelzellen HT-29	3 h p.i.  Cytokin Microarray (Clontech)	CXCR4, EPHA2, IL- 8, LIF, Mip-2 $\alpha$ (25)	[61]
<i>Bordetella pertussis</i>	humane broncho- epitheliale Zelllinie BEAS-2B	3 h p.i.  HU6800 (Affymetrix)	EFNA1, ICAM-1, IL- 6, IL-8, Mip-2 $\alpha$ , NFKBIA, TNFAIP3, CCNG2, hier Verminderung der Expression (100)	[62]
<i>Helicobacter pylori</i>	humane Magen- Adenocarcinoma Zelllinie AGS	24 h p.i.  humaner Atlas Array (Clontech)	c-Jun, EGR1, ETR101, FRA1, KLF5, MAP2K3, ZFP36 ID2, hier Verminderung der Expression (38)	[63]
<i>Listeria monocytogenes</i>	humane promyelotische Zelllinie THP1	2 h p.i.  HU6800 (Affymetrix)	CTGF, ICAM-1, IER3, IL-8, JUNB, LIF, MCL1, Mip-2 $\alpha$ , NFKB1, SERPINE1, TNFAIP3, UPAR (97)	[64]

**Tabelle 58:** Auflistung einiger Ergebnisse aus Microarray Studien mit anderen Bakterien und Wirtszellen aus der Literatur. Herausgehoben sind Gene, die sowohl in diesen Experimenten durch die Infektion mit Bakterien verändert exprimiert wurden als auch bei der Infektion von HeLa-Zellen mit Chlamydien. So nicht anders angegeben, wurden die Gene nach Infektion vermehrt exprimiert.

Als Beispiele der Beeinflussung durch andere gramnegative Bakterien werden hier Untersuchungen mit *Escherichia coli*, *Salmonella dublin*, *Bordetella pertussis* und *Helicobacter pylori* angeführt. Als Vertreter einer Beeinflussung durch grampositive Bakterien wird die veränderte Genexpression durch *Listeria monocytogenes* erwähnt. Diese Ergebnisse sind natürlich nur beschränkt übertragbar, da ihnen jeweils andere Versuchsbedingungen (Zellen, Analysezeitpunkte, Nachweismethode, Versuchsaufbau) zugrunde liegen.

Es scheint bei unterschiedlichen Zellen einige Gene zu geben, die häufig nach Infektion mit verschiedenen Bakterien vermehrt exprimiert werden, wie beispielsweise Mip-2 $\alpha$ , IL-8 oder EGR1. Die Genregulationen gehören somit eher zu einer generellen Reaktion der Zelle auf Bakterien. Dabei ist interessant, dass sich die Antwort von HeLa-Zellen auf *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* gerade bei Mip-2 $\alpha$  in den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten stark unterscheidet.

Betrachtet man nun die große Menge an Ergebnissen, so bleiben allerdings auch viele Zellantworten ausschließlich auf ein Bakterium beschränkt. Es ist anzunehmen, dass ein Teil dieser Unterschiede durch die Verwendung anderer Wirtszellen und Meßmethoden hervorgerufen wird. Um eine eindeutige Antwort darauf geben zu können, ob die Reaktionen der Wirtszelle spezifisch für die Infektion mit diesem Bakterium sind, müssten standardisierte Versuchsbedingungen gewählt werden. Trotzdem legen diese Ergebnisse nahe, dass es auch Spezies-spezifische Zellantworten gibt, was beispielsweise durch die Freisetzung unterschiedlicher Zytokine das Krankheitsbild maßgeblich beeinflussen könnte.

#### **4.1.2.4 Übertragbarkeit auf andere Zellen**

Es konnte durch die Verwendung von ELISAs gezeigt werden, dass sich die im Array ermittelten Regulationen der Sekretion von IL-6, IL-11 und LIF nach Infektion mit *C. trachomatis* bei epithelialen HeLa-Zellen auch auf andere Zelltypen übertragen lassen. Bei den hier verwendeten Zellen handelt es sich um primäre Chondrozyten und eine Synovialfibroblastenlinie, also Zellen, die bei einer reaktiven Arthritis durch Chlamydien infiziert werden könnten.

Diese Ergebnisse zeigen exemplarisch, dass Antworten auf eine chlamydiale Infektion, die in einem artifiziellen Modell ermittelt wurden, nämlich bei einer Infektion einer immortalisierten Zelllinie, *in vitro* durchaus auch auf andere Zellen übertragbar sind. Gerade die Antworten von primären Chondrozyten lassen vermuten, dass es zu ähnlichen Zellantworten auch *in vivo* kommen könnte.

#### **4.1.2.5 Zusammenhang aufgezeigter Regulationen der Genexpression mit Atherosklerose**

Die Atherosklerose ist ein krankhafter Prozeß in der Arterienwand, bei dem es zur Verengung von Arterien kommt. Solche verengten Passagen können zum kompletten Verschuß der Arterie führen oder aber aufbrechen und eine Thrombusbildung auslösen, die wiederum das Gefäß verschließt. So wird die Blutzufuhr an dieser Stelle unterbrochen und im betroffenen Bereich stirbt Gewebe ab; bei dem Verschuß von Koronararterien kommt es zu einem Herzinfarkt.

Der Verengung der Arterien geht eine Schädigung der Arterienwand voraus. Diese Läsion führt zu einer Reihe von Reaktionen des Gewebes, wie der Proliferation von Bindegewebe und Muskelzellen mit gesteigerter Kollagen- und Elastinsynthese; es wandern Monozyten ein und differenzieren zu Makrophagen, die sich durch die Aufnahme von LDL in Schaumzellen umwandeln und im Gewebe abgelagern. Es kommt zur Ausbildung einer atherosklerotischen Plaque in der Gefäßwand die abgeschlossen ist durch eine Kappe aus glatten Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) und der von ihnen produzierter Extrazellulärmatrix. Sind erst einmal Schädigungen aufgetreten, führen diese häufig zu Folgeschäden, die eine immer stärkere Verengung der Arterie hervorrufen.

Wie die ursprüngliche Schädigung entsteht ist noch nicht hinreichend geklärt. Aber es sind eine Reihe von Risikofaktoren für das Entstehen von Atherosklerose bekannt. Dazu zählen erhöhter Cholesterinspiegel, Diabetes und Nikotinkonsum. Darüber hinaus gibt es jedoch auch Fälle von Atherosklerose, die ohne diese Risikofaktoren auftreten. Daher werden weitere Risikofaktoren vermutet. Ein solcher zusätzlicher Risikofaktor könnte eine Infektion mit *C. pneumoniae* sein. *C. pneumoniae* wurden in atherosklerotischen Plaque (vereinzelt sogar kulturell) nachgewiesen und könnten dort direkt verantwortlich sein für das Entstehen primärer Läsionen. Dieses Bakterium könnte aber auch durch ein Persistieren in solchen Arterien eine lang anhaltende Immunantwort auslösen, die zur wiederholten Schädigung der Gefäßwände führen würde.

In den hier vorgestellten Microarray Experimenten konnten eine Reihe von Genen ermittelt werden, deren Expression *in vitro* durch *C. pneumoniae*-Infektion verändert wird und bei denen eine direkte Verbindung zu Atherosklerose bekannt ist. Weiterhin wurden allgemeine Entzündungsmediatoren gefunden, die bei der Pathogenese einer Läsion der Arterienwand mitwirken könnten.

#### 4.1.2.5.1 Immunmodulatoren

Es wurde im Array der induzierte Anstieg der mRNA der Botenstoffe *macrophage inflammatory protein* (MIP) 2 $\alpha$ , Interleukin (IL) 8, IL-11, *connective tissue growth factor* (CTGF), *cystein-rich angiogenic inducer* (CYR) 61, *neuroblastoma overexpressed gene* (NOV), sowie die verminderte Expression der mRNA für Adrenomedullin (ADM) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ermittelt. Weitere durch die Microarrays aufgezeigten Immunmodulatoren, die durch *C. pneumoniae* vermehrt gebildet werden, sind Annexin A1 (ANXA1), Metallothioneine (MT) 1A und 2A sowie *decay accelerating factor for complement* (DAF). Durch die *Real-Time-RT-PCR* konnte zusätzlich ein Anstieg der mRNA des Zytokins *leukemia inhibitory factor* (LIF) nach Infektion mit *C. pneumoniae* nachgewiesen werden. Von

diesen Regulationen war bisher nur der durch *C. pneumoniae* induzierte Anstieg von IL-8 bekannt.

IL-8 und MIP-2 $\alpha$  gehören zu den **Chemokinen** und wirken chemotaktisch auf Leukozyten, wodurch die Immunantwort bei einer Entzündung verstärkt wird. IL-8 induziert zusätzlich die Adhäsion von Monozyten und die Proliferation und Migration von SMCs, beides Phänomene in einer sich entwickelnden atherosklerotischen Plaque. Außerdem hat IL-8 angiogene Effekte [65].

Die Zytokine IL-11 und LIF, genauso wie IL-6, gehören zur Familie der **gp130-Zytokine**, die sich durch eine gemeinsame Struktur und die gemeinsame Verwendung der signalweiterleitenden Rezeptoruntereinheit gp130 auszeichnet. Ebenfalls zu dieser Familie gehören Oncostatin M, Cardiotrophin 1 und *ciliary neurotrophic factor*. Die Zytokine dieser Familie haben vielfältige Aufgaben bei Differenzierung, Wachstumsstopp, Zellüberleben und der Induktion von Akute-Phase-Proteinen, wobei sich die Wirkspektren nur teilweise überlappen. (Für eine Übersicht [66-68]). Dadurch wirken sie aktiv an der Modulation eines entzündlichen Prozesses mit.

CTGF, CYR61 und NOV sind die drei namensgebenden Mitglieder der **CCN-Familie**, einer Gruppe von sekretierten, Cystein-reichen Proteinen, die sowohl mitogene Effekte haben als auch als Adhäsionsmoleküle wirken. Weitere Vertreter dieser Gruppe sind ELM-1 (*expressed in low-metastatic cells*), WISP-2 (*WNT1 inducible signaling pathway protein*) und WISP-3. (Für eine Übersicht [69].) CTGF und CYR61 können sich nach ihrer Sekretion in der Extrazellulärmatrix verankern und dann über Bindung von Integrinen als Adhäsionsmoleküle für aktivierte Thrombozyten, Fibroblasten und Endothelzellen wirken, wobei sie bei Fibroblasten noch die Sekretion von Matrix Metalloprotease (MMP) 1 (auch Typ I Kollagenase) und MMP3 (auch Stromelysin) anregen [70-73]. MMPs bauen Bestandteile der Extrazellulärmatrix ab und können somit zur Remodellierung der Gefäßwand beitragen. Zusätzlich haben CTGF und CYR61 einen chemotaktischen Effekt auf mikrovaskuläre Endothelzellen, wirken angiogen und regulieren die Expression von Komponenten der Extrazellulärmatrix [69], was die Bildung und Struktur der schützenden Kappe einer Plaque beeinflussen kann, genauso wie die Freisetzung von MMPs. CTGF wirkt zusätzlich noch synergetisch mit TGF- $\beta$ , EGF, PDGF, IGF-1 und FGF-2 und hat mitogene Effekte bei VSMCs, Fibroblasten und Epithelzellen [74]. Andererseits wurde auch gezeigt, dass CTGF das Wachstum von SMCs der Aorta

inhibiert und eine Überexpression sogar zu Apoptose führt [75]. CTGF wurde in erhöhter Konzentration in atherosklerotischem Gewebe nachgewiesen [76,77].

Von NOV ist bekannt, dass es die Adhäsion von VSMCs vermittelt [78]. Ein weiteres Mitglied der CCN-Familie, WISP-2, wird nach *C. pneumoniae*-Infektion vermindert exprimiert. Die genaue Funktion dieses Proteins ist aber noch unklar.

Ein **weiterer Immunmodulator**, ANXA1 hat eine anti-inflammatorische Wirkung; es unterdrückt die Eicosanoid-Produktion und inhibiert die Leukozyten-Migration [79]. Neben diesen Wirkungen führt es bei Endothelzellen im entzündlichen Prozeß noch zum Ablösen von Neutrophilen und zu einer verringerten Adhäsion und Emigration dieser Zellen [80]. Die Bildung von ANXA1 wird durch IL-6 stimuliert [81].

Metallothioneine wirken in vielen Stresssituationen protektiv auf die Zellen ein [82]. Ihre Sekretion wird ebenfalls durch IL-6 angeregt, kann aber auch durch IL-11 und LIF in Zusammenarbeit mit Dexamethason stimuliert werden, wobei dies in Hepatozyten der Ratten ermittelt wurde [83].

DAF hat eine wichtige Rolle in der Inhibition der Komplement-Kaskade und kann somit in den entzündlichen Prozeß eingreifen.

ADM, welches durch *C. trachomatis*-Infektion vermehrt exprimiert wird, scheint durch *C. pneumoniae* vermindert exprimiert zu werden. Es ist ein vasodilatorisches Peptid, welches in vielen entzündlichen Reaktionen vermehrt produziert wird, auf Zellwachstum und Hormonregulation einwirkt und in der Regel eine anti-inflammatorische Wirkung hat. Es verringert die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-6 bei Makrophagen und erhöht die Sekretion von IL-6 bei Fibroblasten [84,85].

Die Expression von VEGF wurde durch *C. pneumoniae* vermindert. Dies passt allerdings nicht recht in das Bild, da im Rattenmodelle eine Verstärkung der Atherosklerose durch VEGF erreicht werden konnte durch die Rekrutierung von Monozyten in das betroffene Gewebe [86].

#### 4.1.2.5.2 Adhäsionsmoleküle

Zwei Adhäsionsmoleküle, die in Zusammenhang mit Atherosklerose stehen, werden ebenfalls durch Infektion mit *C. pneumoniae* vermehrt exprimiert. Eine kontinuierliche, wenn auch schwache vermehrte Expression von CD44, dem Rezeptor für Hyaluronsäure, konnte in den Microarray Experimenten aufgezeigt werden. Es fördert die VCAM-1-Expression bei SMCs und rekrutiert Makrophagen zu atherosklerotischen Läsionen, wodurch es die Atherosklerose

fördert [87]. Durch IL-1 $\beta$  kann ein Anstieg an CD44 bei SMCs der Aorta hervorgerufen werden [88].

Als zweites Adhäsionsmolekül wurde die 5' Nukleotidase (NT5) vermehrt exprimiert. NT5 konnte ebenfalls in erhöhter Konzentration im Endothel von atherosklerotischen Aorten nachgewiesen werden [89].

#### 4.1.2.5.3 Transkriptionsfaktoren

In der Gruppe mit Transkriptionsfaktoren mit direktem Bezug zu Atherosklerose bzw. entzündlichen Prozessen wurden die Transkriptionsfaktoren *core promoter element binding protein* (COPEB), *early growth response protein 1* (EGR1), *ets variant gene 4* (ETV4) und *Krüppel-like factor 5* (KLF5) vermehrt gebildet.

COPEB wird ebenfalls vermehrt in verletzten Arterien exprimiert und führt dort zur Expression von *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) [90]. uPA ist eine Serinprotease, die Plasminogen spaltet und dadurch Plasmin entstehen lässt, eine weitere Protease, die wiederum für den Abbau einer Reihe von Komponenten der Extrazellulärmatrix verantwortlich ist.

EGR1 wird in der Regel nur transient, sehr früh nach einem Stimulus (*immediate early gene*), vermehrt exprimiert. Nach Infektion von HeLa-Zellen mit *C. pneumoniae* kam es zu einer lang anhaltenden vermehrten Expression, wie in der *Real-Time-RT-PCR* gezeigt werden konnte. Bei vielen im entzündlichen Prozeß wichtigen Genen konnte eine Bindungsstelle im Promotorbereich für EGR1 gefunden werden. So führt EGR1 zu einer vermehrten Expression von PDGFA und B, TGF- $\beta$ , FGF-2, LH- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ICAM-1, CD44, TF, uPA, p53 und MMP-1 [91,92]. Auch konnte EGR1 in geschädigten Gefäßwänden vermehrt nachgewiesen werden [93], genauso wie in atherosklerotischen Läsionen bei LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen bei induzierter Atherosklerose [94].

ETV4, ein Mitglied der ETS-Familie von Transkriptionsfaktoren, führt zur Aktivierung von CDKNA1 und MMPs (MMP3, MMP1 und 92 kD Typ IV Kollagenase) [95,96].

KLF5 aktiviert in SMCs PAI-1, iNos, PDGF-A, EGR1, VEGF-R [97]. Er ist ein positiver Regulator der Proliferation und Differentiation von SMCs und konnte auch bei durch Ballondilatation verletzten Aorten nachgewiesen werden. Bei KLF5-positiven Patienten konnten höhere Restenose-Raten ermittelt werden [98]. Zusätzlich wirkt KLF5 proliferierend bei Fibroblasten [99].

#### 4.1.2.5.4 Enzyme und assoziierte Proteine

Es wurde die mRNA einer Reihe von Enzymen, von denen zu vermuten ist, dass sie bei der Entwicklung von Atherosklerose eine Rolle spielen, durch die Infektion mit *C. pneumoniae*

vermehrt gebildet. Zu diesen Enzymen zählen Aminopeptidase N (ANPEP), Calpain 2 (CAPN2) und Cyclooxygenase/Prostaglandinendoperoxid-Synthase 2 (COX2/PTGS2).

ANPEP ist eine membrangebundene Metalloprotease und kann zum Abbau der Extrazellulärmatrix beitragen. Außerdem hat ANPEP eine chemotaktische Wirkung auf Leukozyten [100]. Somit kann sie auf zwei Wegen in die Prozesse der Entstehung und Weiterentwicklung einer Atherosklerose einwirken.

Von CAPN2 ist in diesem Zusammenhang ausschließlich bekannt, dass es die Proliferation von VSMCs fördert [101].

PTGS2 wirkt vasoprotektiv durch die Synthese von Prostacyclin. Dadurch kommt es zur Inhibition der Thrombozyten-Aggregation, Aktivierung, Leukozytenadhäsion und Akkumulation von Cholesterin in Zellen der Gefäßwand [102]. In LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen fördert PTGS2 allerdings die Bildung von atherosklerotischen Läsionen [103] und eine vermehrte Expression konnte auch in humanen atherosklerotischen Läsionen gezeigt werden [104]. Eine Zunahme der Expression konnte bereits in Atemwegsepithelzellen nach Infektion mit *C. pneumoniae* nachgewiesen werden [17], sowie in *C. pneumoniae*-positiven atherosklerotischen Plaque [105].

Von vier Proteinen, die einen Zusammenhang mit Extrazellulärmatrix abbauenden Enzymen haben, wurde ebenfalls vermehrt mRNA nach Infektion mit *C. pneumoniae* gebildet: *urokinase-type plasimogen activator receptor* (PLAUR), *plasminogen activator inhibitor type 1* (SERPINE1), sowie *tissue inhibitor of metalloproteinase 1* (TIMP1). TIMP2 wurde hingegen vermindert exprimiert.

PLAUR, der Rezeptor für uPA, wurde vermehrt in atherosklerotischem Gewebe nachgewiesen und es konnte ein Zusammenhang zwischen PLAUR und der erhöhten Migration von Zellen und dadurch erhöhter Stenose/Restenose-Rate in Arterien hergestellt werden [106].

SERPINE1 wird ebenfalls vermehrt exprimiert bei verschiedenen akuten und chronischen Koronararterien-Erkrankungen [107]. Bei diesem Enzym konnte schon gezeigt werden, dass es nach *C. pneumoniae*-Infektion vermehrt in VSMCs exprimiert wird [20].

TIMP1 und TIMP2 inhibieren beide Typ IV Kollagenasen (MMP2). Es konnte in peripherem Blut bei Atherosklerose eine Erhöhung der Konzentration an TIMP1, sowie eine Verringerung der Konzentration an TIMP2 festgestellt werden [108].

Ein weiteres Protein mit Bezug zu Atherosklerose ist der *cyclin dependent kinase inhibitor 1A* (CDKN1A). CDKN1A, welches zum Zeitpunkt zwei Stunden nach *C. pneumoniae*-Infektion noch vermehrt, ab 24 Stunden nach Infektion aber vermindert exprimiert wird, kann auch in



atherosklerotischen Plaque nachgewiesen werden [109]. Es interagiert mit p53 bei der Auslösung von Apoptose und G1-Arrest [110]. Eine Überexpression reduziert die SMC-Proliferation und Restenose [111].

Einen Einfluß auf die Vorgänge innerhalb einer atherosklerotischen Plaque könnte auch die durch *C. pneumoniae* induzierte verminderte Expression von einer Reihe von Mitgliedern der Kollagen-Familie, besonderen COL9A3 haben.

#### 4.1.2.5.5 Zusammenfassung

Es konnten eine Reihe von Genen aufgezeigt werden, die durch chlamydiale Infektion verändert exprimiert werden und die mit einem entzündlichen Prozeß oder direkt mit Atherosklerose in Zusammenhang stehen. Dies bietet Hinweis darauf, dass Chlamydien, die Zellen innerhalb der Arterienwand infizieren dort einen entzündlichen Prozeß auslösen könnten, der für das Entstehen von Atherosklerose (mit-)verantwortlich ist. Auch könnten Chlamydien, die sich innerhalb einer bestehenden atherosklerotischen Plaque befinden zu einem Aufbrechen dieser Plaque führen und somit eine Verschlimmerung der Atherosklerose oder auch einen Verschuß der Arterie bewirken. Um aber mit Sicherheit sagen zu können, dass Chlamydien eine aktive Rolle bei der Entstehung oder der Weiterentwicklung von Atherosklerose spielen, müssten die hier aufgezeigten Effekte *in vivo* überprüft werden. Ein erster Schritt wäre allerdings auch schon die Übertragung der Effekte auf Zellen, die *in vivo* bei einer Atherosklerose wichtig sind, wie glatte Muskelzellen oder Endothelzellen. (Entsprechende Versuche sind geplant.)

In ähnlicher Weise könnten Zusammenhänge für andere Phänomene, wie Apoptose oder reaktive Arthritis aufgeführt werden, wie dies in Kapitel 3.1.2.4.1.3 Tabelle 45 bis Tabelle 48, angedeutet ist. Aber schon diese Auswahl zeigt, wie wegweisend diese Array-Daten für weiterführende Untersuchungen sein können.

## 4.2 Chemische Mutagenese zur Erzeugung Chlamydien-resistenter Zellen

In diesem Teil der Arbeit wurden Versuche unternommen, Mechanismen aufzudecken, die zur Aufnahme und zum Überleben der Chlamydien in der Wirtszelle essentiell sind.

Dazu wurde zuerst die Zugänglichkeit verschiedener Mutanten einer Zelllinie überprüft. Diese Mutanten haben unterschiedlich stark ausgeprägte Zuckerstrukturen an ihrer Oberfläche. Es sollte untersucht werden, inwieweit sich diese Mutanten noch durch Chlamydien infizieren lassen. Es fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in ihrer Infizierbarkeit.

Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die unterschiedlich ausgeprägten Zuckerstrukturen (das Fehlen von N- sowie O-glykosidisch verknüpften Sialinsäuren und Galaktose) für das hier verwendete *C. trachomatis* Serovar L2 nicht essentiell sind zur Anheftung und zum Eindringen in die Wirtszelle.

In einem zweiten Ansatz sollte versucht werden durch chemische Mutagenese eine Zelllinie zu generieren, die resistent gegen Chlamydien ist. Diese Mutagenese wurde bisher hauptsächlich genutzt, um Untersuchungen zu Zellmetabolismus und Zellwachstum durchzuführen. Hier sollte dieses Verfahren in einem neuen Kontext angewandt werden.

Dazu wurde eine chemische Mutagenese (500 µg/ml EMS) der funktional haploiden Zelllinie CHO-K1 durchgeführt. Anschließend wurde durch wiederholte Infektion der mutierten Zellen mit *C. trachomatis* L2 versucht, auf resistente Zellen hin zu selektionieren. Da in einem gesetzten zeitlichen Rahmen von sechs Monaten keine positiven Klone isoliert werden konnten, wurde das Projekt zu Gunsten der Microarray-Experimente eingestellt.

Es wurde vermutet, dass es für das Eindringen von Chlamydien in die Wirtszelle mehrere, eventuell gleichberechtigte, Wege gibt und somit mehrere Gene gleichzeitig mutiert werden müssten, um einen sichtbaren Effekt zu erzeugen, ein statistisch seltenes Ereignis.

Im Herbst 2001 erschien jedoch eine Veröffentlichung von Carabeo und Hackstadt [112], die in einem sehr ähnlichen Ansatz erfolgreich resistente Klone ermittelt haben. Dabei wurden ebenfalls CHO-K1-Zellen verwendet und mit EMS in ähnlicher Konzentration (400 µg/ml) mutiert. Die Infektion mit Chlamydien (*C. trachomatis* L2, MOI 3) erfolgte nach 5 Tagen. Es wurde gewartet, bis ein Großteil der Zellen durch die Chlamydien abgetötet und neue Zellen nachgewachsen waren, und der Infektionsvorgang mit der Ausgangsmenge an Chlamydien dreimal wiederholt. Es wurde eine *limiting dilution* der überlebenden Zellklone durchgeführt und diese erneut infiziert. Dabei konnten Klone isoliert werden, die noch unterschiedlich zugänglich bzw. resistent gegen eine Chlamydieninfektion waren. Ein resistenter Klon wurde ausgewählt und näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass dieser zwar resistent gegenüber einer Infektion mit *C. trachomatis* L2 ist, nicht aber gegenüber *C. trachomatis* Serovar D oder B oder *C. muridarum*.

Diese Veröffentlichung zeigt, dass der in dieser Dissertation gewählte neue Ansatz prinzipiell richtig war. Details in der Durchführung der Experimente könnten möglicherweise für die negativen Ergebnisse verantwortlich sein. Auch wird in der Veröffentlichung nicht auf den zeitlichen Aufwand und den Umfang der Experimente eingegangen, der möglicherweise wesentlich größer bemessen war.

### 4.3 Expression chlamydialer GFP-Fusionsproteine

Ziel dieses Teilprojektes war die Expression chlamydialer Proteine in einer Zelllinie, die sich auch mit Chlamydien infizieren läßt. Anschließend sollte die Zelle auf solche phänotypische Veränderungen hin untersucht werden, die Chlamydien nach einer Infektion bei ihr auslösen. Um zu überprüfen, ob die chlamydialen Proteine überhaupt in eukaryonten Zellen exprimiert werden können, wurden diese Proteine erst als GFP-Fusionsproteine konstruiert.

Leider war es im Rahmen dieser Doktorarbeit zeitlich nicht möglich, die erzeugten chlamydialen GFP-Fusionsproteine bzw. die alleine exprimierten chlamydialen Proteine auf die Beeinflussung der „Wirtszelle“ hin zu untersuchen. Die unterschiedliche Verteilung der Proteine in der Zelle könnte hierbei allerdings ein erster Hinweis auf unterschiedliche Funktionen der Proteine sein.

Von einem der Proteine, *incA* (CT119), konnte jetzt von Fields et al. gezeigt werden, dass es nach chlamydialer Infektion in der Membran des Einschlusses exprimiert wird und wichtig ist bei der Fusion von mehreren Einschlüssen in der selben Zelle [113,114]. Diese Anwesenheit in der Membran des Einschlusses ermöglicht einen Kontakt mit der Wirtszelle und somit die Möglichkeit zu einer Interaktion.

Mit der gelungenen Expression chlamydialer Proteine in einer eukaryonten Zelle wurde aber der Grundstein gelegt für eine weiterführende Analyse der Chlamydien-Wirtszell-Interaktion. Durch die Verwendung der gleichen Zelllinie, die für die breite Analyse der Chlamydien-induzierten Genexpression durch Microarrays gewählt wurde können die dort erhaltenen Ergebnisse direkt verwendet werden. Mögliche chlamydiale Effektorproteine können auf die in den Arrays ermittelten phänotypischen Veränderungen der Wirtszelle hin untersucht werden. Dabei können nun gezielt gut detektierbare phänotypische Änderungen mit starken induzierten Regulationen zur Überprüfung ausgewählt werden.

Dieser Ansatz wird in der Arbeitsgruppe innerhalb von anderen Diplomarbeiten und Dissertationen weiter verfolgt.



## 5 Literatur

- [1] Berger,L., Volp,K., Mathews,S., Speare,R. & Timms,P. Chlamydia pneumoniae in a free-ranging giant barred frog (*Mixophyes iteratus*) from Australia. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2378-2380 (1999).
- [2] Halberstaedter,L. & Prowazek,S.v. Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. *Arb. Gesundheitsamt.* **26**, 44-47 (1907).
- [3] Storz,J. & Page,L.A. Taxonomy of the Chlamydiae: Reasons for classifying organisms of the genus Chlamydia, family Chlamydiaceae, in a separate order, Chlamydiales ord. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**, 332-334 (1971).
- [4] Everett,K.D., Bush,R.M. & Andersen,A.A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49 Pt 2**, 415-440 (1999).
- [5] Rurangirwa,F.R., Dilbeck,P.M., Crawford,T.B., McGuire,T.C. & McElwain,T.F. Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of Waddliaceae fam. nov., Waddlia chondrophila gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49 Pt 2**, 577-581 (1999).
- [6] Kalman,S. *et al.* Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis. *Nat. Genet.* **21**, 385-389 (1999).
- [7] Hackstadt,T. Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. Stephens,R.S. (ed.), pp. 101-138 (ASM Press, Washington, D.C., USA,1999).
- [8] Hatch,T.P. Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. Stephens,R.S. (ed.), pp. 29-68 (ASM Press, Washington, D.C., USA,1999).
- [9] Koehler,L. *et al.* Ultrastructural and molecular analyses of the persistence of Chlamydia trachomatis (serovar K) in human monocytes. *Microb. Pathog.* **22**, 133-142 (1997).
- [10] Airene,S. *et al.* Chlamydia pneumoniae infection in human monocytes [published erratum appears in Infect Immun 1999 Dec;67(12):6716]. *Infect. Immun.* **67**, 1445-1449 (1999).
- [11] Ward,M.E. Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. Stephens,R.S. (ed.), pp. 171-210 (ASM Press, Washington, D.C., USA,1999).
- [12] Schachter,J. Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. Stephens,R.S. (ed.), pp. 139-169 (ASM Press, Washington, D.C., USA,1999).
- [13] Apfalter,P. *et al.* Multicenter Comparison Trial of DNA Extraction Methods and PCR Assays for Detection of Chlamydia pneumoniae in Endarterectomy Specimens. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 519-524 (2001).
- [14] Kalayoglu,M.V. & Byrne,G.I. Induction of macrophage foam cell formation by Chlamydia pneumoniae. *J. Infect. Dis.* **177**, 725-729 (1998).
- [15] Dessus-Babus,S., Knight,S.T. & Wyrick,P.B. Chlamydial infection of polarized HeLa cells induces PMN chemotaxis but the cytokine profile varies between disseminating and non-disseminating strains. *Cell Microbiol.* **2**, 317-327 (2000).
- [16] Rasmussen,S.J. *et al.* Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J. Clin. Invest* **99**, 77-87 (1997).

- [17] Jahn,H.U. *et al.* Infection and activation of airway epithelial cells by chlamydia pneumoniae. *J. Infect. Dis.* **182**, 1678-1687 (2000).
- [18] Quinn,T.C. & Gaydos,C.A. In vitro infection and pathogenesis of Chlamydia pneumoniae in endothelial cells. *Am. Heart J.* **138**, S507-S511 (1999).
- [19] Molestina,R.E., Dean,D., Miller,R.D., Ramirez,J.A. & Summersgill,J.T. Characterization of a strain of Chlamydia pneumoniae isolated from a coronary atheroma by analysis of the omp1 gene and biological activity in human endothelial cells. *Infect. Immun.* **66**, 1370-1376 (1998).
- [20] Dechend,R. *et al.* Chlamydia pneumoniae infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI- 1 expression: a potential link to accelerated arteriosclerosis. *Circulation* **100**, 1369-1373 (1999).
- [21] Rodel,J. *et al.* Production of basic fibroblast growth factor and interleukin 6 by human smooth muscle cells following infection with Chlamydia pneumoniae. *Infect. Immun.* **68**, 3635-3641 (2000).
- [22] Rodel,J. *et al.* Beta interferon is produced by Chlamydia trachomatis-infected fibroblast-like synoviocytes and inhibits gamma interferon-induced HLA- DR expression. *Infect. Immun.* **66**, 4491-4495 (1998).
- [23] Rodel,J., Straube,E., Lungershausen,W., Hartmann,M. & Groh,A. Secretion of cytokines by human synoviocytes during in vitro infection with Chlamydia trachomatis. *J. Rheumatol.* **25**, 2161-2168 (1998).
- [24] Rothermel,C.D., Schachter,J., Lavrich,P., Lipsitz,E.C. & Francus,T. Chlamydia trachomatis-induced production of interleukin-1 by human monocytes. *Infect. Immun.* **57**, 2705-2711 (1989).
- [25] Bianchi,A. *et al.* Chlamydia trachomatis growth stimulates interleukin 8 production by human monocytic U-937 cells. *Infect. Immun.* **65**, 2434-2436 (1997).
- [26] Kaukoranta-Tolvanen,S.S. *et al.* Growth of Chlamydia pneumoniae in cultured human peripheral blood mononuclear cells and induction of a cytokine response. *Microb. Pathog.* **21**, 215-221 (1996).
- [27] Heinemann,M., Susa,M., Simnacher,U., Marre,R. & Essig,A. Growth of Chlamydia pneumoniae induces cytokine production and expression of CD14 in a human monocytic cell line. *Infect. Immun.* **64**, 4872-4875 (1996).
- [28] Caspar-Bauguil,S. *et al.* Chlamydia pneumoniae induces interleukin-10 production that down-regulates major histocompatibility complex class I expression. *J. Infect. Dis.* **182**, 1394-1401 (2000).
- [29] Netea,M.G. *et al.* Acellular components of Chlamydia pneumoniae stimulate cytokine production in human blood mononuclear cells. *Eur. J. Immunol.* **30**, 541-549 (2000).
- [30] Redecke,V., Dalhoff,K., Bohnet,S., Braun,J. & Maass,M. Interaction of Chlamydia pneumoniae and human alveolar macrophages: infection and inflammatory response. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**, 721-727 (1998).
- [31] Kelly,K.A. & Rank,R.G. Identification of homing receptors that mediate the recruitment of CD4 T cells to the genital tract following intravaginal infection with Chlamydia trachomatis. *Infect. Immun.* **65**, 5198-5208 (1997).
- [32] Kaukoranta-Tolvanen,S.S., Ronni,T., Leinonen,M., Saikku,P. & Laitinen,K. Expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated by Chlamydia pneumoniae. *Microb. Pathog.* **21**, 407-411 (1996).
- [33] Krull,M. *et al.* Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with Chlamydia pneumoniae. *J. Immunol.* **162**, 4834-4841 (1999).
- [34] Yamaguchi,H., Haranaga,S., Widen,R., Friedman,H. & Yamamoto,Y. Chlamydia pneumoniae infection induces differentiation of monocytes into macrophages. *Infect. Immun.* **70**, 2392-2398 (2002).

- [35] Fan, T. *et al.* Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J. Exp. Med.* **187**, 487-496 (1998).
- [36] Rajalingam, K. *et al.* Epithelial Cells Infected with *Chlamydia pneumoniae* (Chlamydia pneumoniae) Are Resistant to Apoptosis. *Infect. Immun.* **69**, 7880-7888 (2001).
- [37] Perfettini, J.L. *et al.* Role of Bcl-2 family members in caspase-independent apoptosis during Chlamydia infection. *Infect. Immun.* **70**, 55-61 (2002).
- [38] Stenner-Liewen, F. *et al.* CADD, a Chlamydia protein that interacts with death receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 9633-9636 (2002).
- [39] Fawaz, F.S., van Ooij, C., Homola, E., Mutka, S.C. & Engel, J.N. Infection with *Chlamydia trachomatis* alters the tyrosine phosphorylation and/or localization of several host cell proteins including cortactin. *Infect. Immun.* **65**, 5301-5308 (1997).
- [40] Lu, H., Shen, C. & Brunham, R.C. Chlamydia trachomatis infection of epithelial cells induces the activation of caspase-1 and release of mature IL-18. *J. Immunol.* **165**, 1463-1469 (2000).
- [41] Belland, R.J. *et al.* Chlamydia trachomatis cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 13984-13989 (2001).
- [42] Zhong, G., Fan, P., Ji, H., Dong, F. & Huang, Y. Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J. Exp. Med.* **193**, 935-942 (2001).
- [43] Hueck, C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379-433 (1998).
- [44] Galan, J.E. & Zhou, D. Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by Salmonella 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 8754-8761 (2000).
- [45] Fields, K.A. & Hackstadt, T. Evidence for the secretion of chlamydia trachomatis CopN by a type III secretion mechanism. *Mol. Microbiol.* **38**, 1048-1060 (2000).
- [46] Matsumoto, A. Electron microscopic observations of surface projections and related intracellular structures of Chlamydia organisms. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* **30**, 315-320 (1981).
- [47] Chang, J.J., Leonard, K.R. & Zhang, Y.X. Structural studies of the surface projections of Chlamydia trachomatis by electron microscopy. *J. Med. Microbiol.* **46**, 1013-1018 (1997).
- [48] Subtil, A., Parsot, C. & Dautry-Varsat, A. Secretion of predicted Inc proteins of Chlamydia pneumoniae by a heterologous type III machinery. *Mol. Microbiol.* **39**, 792-800 (2001).
- [49] Haas, C., Aicher, W.K., Dinkel, A., Peter, H.H. & Eibel, H. Characterization of SV40T antigen immortalized human synovial fibroblasts: maintained expression patterns of EGR-1, HLA-DR and some surface receptors. *Rheumatol. Int.* **16**, 241-247 (1997).
- [50] Saiki, R.K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988).
- [51] Birnboim, H.C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523 (1979).
- [52] Huniche, B.S., Jensen, L.T., Birkelund, S. & Christiansen, G. Mycoplasma contamination of Chlamydia pneumoniae isolates. *Scand. J. Infect. Dis.* **30**, 181-187 (1998).
- [53] Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987).
- [54] Thompson, L.H. Mutant isolation. *Methods Enzymol.* **58**, 308-322 (1979).

- [55] Sachs,L. *Angewandte Statistik*. Springer Verlag, Berlin (1997).
- [56] Koller,M. *et al.* Expression of adhesion molecules on synovial fluid and peripheral blood monocytes in patients with inflammatory joint disease and osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **58**, 709-712 (1999).
- [57] Coombes,B.K. & Mahony,J.B. cDNA array analysis of altered gene expression in human endothelial cells in response to Chlamydia pneumoniae infection. *Infect. Immun.* **69**, 1420-1427 (2001).
- [58] van Westreenen,M., Pronk,A., Diepersloot,R.J., de Groot,P.G. & Leguit,P. Chlamydia trachomatis infection of human mesothelial cells alters proinflammatory, procoagulant, and fibrinolytic responses. *Infect. Immun.* **66**, 2352-2355 (1998).
- [59] de Grado,M., Rosenberger,C.M., Gauthier,A., Vallance,B.A. & Finlay,B.B. Enteropathogenic Escherichia coli infection induces expression of the early growth response factor by activating mitogen-activated protein kinase cascades in epithelial cells. *Infect. Immun.* **69**, 6217-6224 (2001).
- [60] Mysorekar,I.U., Mulvey,M.A., Hultgren,S.J. & Gordon,J.I. Molecular regulation of urothelial renewal and host defenses during infection with uropathogenic Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **277**, 7412-7419 (2002).
- [61] Eckmann,L., Smith,J.R., Housley,M.P., Dwinell,M.B. & Kagnoff,M.F. Analysis by high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria Salmonella. *J. Biol. Chem.* **275**, 14084-14094 (2000).
- [62] Belcher,C.E. *et al.* From the cover: the transcriptional responses of respiratory epithelial cells to Bordetella pertussis reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 13847-13852 (2000).
- [63] Chiou,C.C. *et al.* Helicobacter pylori infection induced alteration of gene expression in human gastric cells. *Gut* **48**, 598-604 (2001).
- [64] Cohen,P. *et al.* Monitoring cellular responses to Listeria monocytogenes with oligonucleotide arrays. *J. Biol. Chem.* **275**, 11181-11190 (2000).
- [65] Reape,T.J. & Groot,P.H. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **147**, 213-225 (1999).
- [66] Gadiant,R.A. & Patterson,P.H. Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells* **17**, 127-137 (1999).
- [67] Hermanns,H.M., Radtke,S., Schaper,F., Heinrich,P.C. & Behrmann,I. Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. The adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 40742-40748 (2000).
- [68] Hirano,T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int. Rev. Immunol.* **16**, 249-284 (1998).
- [69] Lau,L.F. & Lam,S.C. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp. Cell Res.* **248**, 44-57 (1999).
- [70] Babic,A.M., Chen,C.C. & Lau,L.F. Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol. Cell Biol.* **19**, 2958-2966 (1999).
- [71] Chen,C.C., Chen,N. & Lau,L.F. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **276**, 10443-10452 (2001).
- [72] Jedsadayamata,A., Chen,C.C., Kireeva,M.L., Lau,L.F. & Lam,S.C. Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3). *J. Biol. Chem.* **274**, 24321-24327 (1999).



- [73] Kireeva,M.L., Lam,S.C. & Lau,L.F. Adhesion of human umbilical vein endothelial cells to the immediate-early gene product Cyr61 is mediated through integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3. *J. Biol. Chem.* **273**, 3090-3096 (1998).
- [74] Brigstock,D.R. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr. Rev.* **20**, 189-206 (1999).
- [75] Hishikawa,K. *et al.* Overexpression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* **100**, 2108-2112 (1999).
- [76] Oemar,B.S. & Luscher,T.F. Connective tissue growth factor. Friend or foe?. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 1483-1489 (1997).
- [77] Oemar,B.S. *et al.* Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation* **95**, 831-839 (1997).
- [78] Ellis,P.D., Chen,Q., Barker,P.J., Metcalfe,J.C. & Kemp,P.R. Nov gene encodes adhesion factor for vascular smooth muscle cells and is dynamically regulated in response to vascular injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1912-1919 (2000).
- [79] Flower,R.J. & Rothwell,N.J. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 71-76 (1994).
- [80] Lim,L.H., Solito,E., Russo-Marie,F., Flower,R.J. & Perretti,M. Promoting detachment of neutrophils adherent to murine postcapillary venules to control inflammation: effect of lipocortin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 14535-14539 (1998).
- [81] de Coupade,C., Ajuebor,M.N., Russo-Marie,F., Perretti,M. & Solito,E. Cytokine modulation of liver annexin 1 expression during experimental endotoxemia. *Am. J. Pathol.* **159**, 1435-1443 (2001).
- [82] Zafarullah,M., Martel-Pelletier,J., Cloutier,J.M., Gedamu,L. & Pelletier,J.P. Expression of c-fos, c-jun, jun-B, metallothionein and metalloproteinase genes in human chondrocyte. *FEBS Lett.* **306**, 169-172 (1992).
- [83] Coyle,P., Philcox,J.C. & Rofe,A.M. Metallothionein induction in cultured rat hepatocytes by arthritic rat serum, activated macrophages, interleukin-6, interleukin-11 and leukaemia inhibitory factor. *Inflamm. Res.* **44**, 475-481 (1995).
- [84] Elsasser,T.H. & Kahl,S. Adrenomedullin has multiple roles in disease stress: Development and remission of the inflammatory response. *Microsc. Res. Tech.* **57**, 120-129 (2002).
- [85] Minamino,N., Kangawa,K. & Matsuo,H. Adrenomedullin: a new peptidergic regulator of the vascular function. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **23**, 95-102 (2000).
- [86] Zhao,Q. *et al.* Vascular endothelial growth factor is necessary in the development of arteriosclerosis by recruiting/activating monocytes in a rat model of long-term inhibition of nitric oxide synthesis. *Circulation* **105**, 1110-1115 (2002).
- [87] Cuff,C.A. *et al.* The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. *J. Clin. Invest* **108**, 1031-1040 (2001).
- [88] Foster,L.C. *et al.* Regulation of CD44 gene expression by the proinflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$  in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 20341-20346 (1998).
- [89] Babal,P. & Pechanova,O. Activity of ATPase and 5'nucleotidase in endothelium of human atherosclerotic aortas. *Cor Vasa* **34**, 238-245 (1992).
- [90] Kojima,S. *et al.* Transcriptional activation of urokinase by the Kruppel-like factor Zf9/COPEB activates latent TGF- $\beta$ 1 in vascular endothelial cells. *Blood* **95**, 1309-1316 (2000).

- [91] Khachigian,L.M. & Collins,T. Inducible expression of Egr-1-dependent genes. A paradigm of transcriptional activation in vascular endothelium. *Circ. Res.* **81**, 457-461 (1997).
- [92] Haas,T.L., Stitelman,D., Davis,S.J., Apte,S.S. & Madri,J.A. Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *J. Biol. Chem.* **274**, 22679-22685 (1999).
- [93] Khachigian,L.M. & Collins,T. Early growth response factor 1: a pleiotropic mediator of inducible gene expression. *J. Mol. Med.* **76**, 613-616 (1998).
- [94] McCaffrey,T.A. *et al.* High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *J. Clin. Invest* **105**, 653-662 (2000).
- [95] Higashino,F., Yoshida,K., Noumi,T., Seiki,M. & Fujinaga,K. Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters. *Oncogene* **10**, 1461-1463 (1995).
- [96] Funaoka,K. *et al.* Activation of the p21(Waf1/Cip1) promoter by the ets oncogene family transcription factor E1AF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 79-82 (1997).
- [97] Kawai-Kowase,K., Kurabayashi,M., Hoshino,Y., Ohyama,Y. & Nagai,R. Transcriptional activation of the zinc finger transcription factor BTEB2 gene by Egr-1 through mitogen-activated protein kinase pathways in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **85**, 787-795 (1999).
- [98] Hoshino,Y. *et al.* Regulated expression of the BTEB2 transcription factor in vascular smooth muscle cells: analysis of developmental and pathological expression profiles shows implications as a predictive factor for restenosis. *Circulation* **102**, 2528-2534 (2000).
- [99] Sun,R., Chen,X. & Yang,V.W. Intestinal-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 5) is a positive regulator of cellular proliferation. *J. Biol. Chem.* **276**, 6897-6900 (2001).
- [100] Tani,K., Ogushi,F., Shimizu,T. & Sone,S. Protease-induced leukocyte chemotaxis and activation: roles in host defense and inflammation. *J. Med. Invest* **48**, 133-141 (2001).
- [101] Ariyoshi,H. *et al.* Possible involvement of m-calpain in vascular smooth muscle cell proliferation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 493-498 (1998).
- [102] Hinz,B. & Brune,K. Cyclooxygenase-2--10 years later. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 367-375 (2002).
- [103] Burleigh,M.E. *et al.* Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* **105**, 1816-1823 (2002).
- [104] Baker,C.S. *et al.* Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 646-655 (1999).
- [105] Song,Y.G. *et al.* Serologic and histopathologic study of Chlamydia pneumoniae infection in atherosclerosis: a possible pathogenetic mechanism of atherosclerosis induced by Chlamydia pneumoniae. *Yonsei Med. J.* **41**, 319-327 (2000).
- [106] Kusch,A. & Gulba,D.C. [Significance of the uPA/uPAR system for development of arteriosclerosis and restenosis]. *Z. Kardiol.* **90**, 307-318 (2001).
- [107] Huber,K., Christ,G., Wojta,J. & Gulba,D. Plasminogen activator inhibitor type-1 in cardiovascular disease. Status report 2001. *Thromb. Res.* **103 Suppl 1**, S7-19 (2001).
- [108] Noji,Y. *et al.* Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis. *Clin. Chem. Lab Med.* **39**, 380-384 (2001).
- [109] Ihling,C. *et al.* Topographical association between the cyclin-dependent kinases inhibitor P21, p53 accumulation, and cellular proliferation in human atherosclerotic tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 2218-2224 (1997).

- [110] el Deiry, W.S. *et al.* WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* **54**, 1169-1174 (1994).
- [111] Condorelli, G., Aycock, J.K., Frati, G. & Napoli, C. Mutated p21/WAF/CIP transgene overexpression reduces smooth muscle cell proliferation, macrophage deposition, oxidation-sensitive mechanisms, and restenosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E knockout mice. *FASEB J.* **15**, 2162-2170 (2001).
- [112] Carabeo, R.A. & Hackstadt, T. Isolation and characterization of a mutant Chinese hamster ovary cell line that is resistant to Chlamydia trachomatis infection at a novel step in the attachment process. *Infect. Immun.* **69**, 5899-5904 (2001).
- [113] Fields, K.A., Fischer, E. & Hackstadt, T. Inhibition of fusion of Chlamydia trachomatis inclusions at 32 degrees C correlates with restricted export of IncA. *Infect. Immun.* **70**, 3816-3823 (2002).
- [114] Rockey, D.D., Viratyosin, W., Bannantine, J.P., Suchland, R.J. & Stamm, W.E. Diversity within inc genes of clinical Chlamydia trachomatis variant isolates that occupy non-fusogenic inclusions. *Microbiology* **148**, 2497-2505 (2002).
- [115] Tomoda, Y., Isumi, Y., Katafuchi, T. & Minamino, N. Regulation of adrenomedullin secretion from cultured cells. *Peptides* **22**, 1783-1794 (2001).
- [116] Kim, D.W. *et al.* The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene* **19**, 5498-5506 (2000).
- [117] Alldridge, L.C., Harris, H.J., Plevin, R., Hannon, R. & Bryant, C.E. The annexin protein lipocortin 1 regulates the MAPK/ERK pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 37620-37628 (1999).
- [118] Zawel, L. *et al.* DEC1 is a downstream target of TGF-beta with sequence-specific transcriptional repressor activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 2848-2853 (2002).
- [119] Shen, M. *et al.* Induction of basic helix-loop-helix protein DEC1 (BHLHB2)/Stra13/Sharp2 in response to the cyclic adenosine monophosphate pathway. *Eur. J. Cell Biol.* **80**, 329-334 (2001).
- [120] Johnson, B.A., Stehn, J.R., Yaffe, M.B. & Blackwell, T.K. Cytoplasmic localization of Tristetraprolin involves 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* (2002).
- [121] Fukui, I., Tanaka, K. & Murachi, T. Extracellular appearance of calpain and calpastatin in the synovial fluid of the knee joint. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**, 559-566 (1989).
- [122] Ishikawa, H. *et al.* Inflammatory cytokines induced down-regulation of m-calpain mRNA expression in fibroblastic synoviocytes from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 341-346 (1999).
- [123] Jain, M. *et al.* Role of CD44 in the reaction of vascular smooth muscle cells to arterial wall injury. *J. Clin. Invest* **97**, 596-603 (1996).
- [124] Fujii, K., Fujii, Y., Hubscher, S. & Tanaka, Y. CD44 is the physiological trigger of Fas up-regulation on rheumatoid synovial cells. *J. Immunol.* **167**, 1198-1203 (2001).
- [125] DeGrendele, H.C., Estess, P., Picker, L.J. & Siegelman, M.H. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J. Exp. Med.* **183**, 1119-1130 (1996).
- [126] Lazaar, A.L. *et al.* T lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis. *J. Exp. Med.* **180**, 807-816 (1994).
- [127] Eichler, W., Ruschpler, P., Wobus, M. & Drossler, K. Differentially induced expression of C-type lectins in activated lymphocytes. *J. Cell Biochem.* **81**, 201-208 (2001).

- [128] Kim, Y. *et al.* Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J. Biol. Chem.* **273**, 33750-33758 (1998).
- [129] Nakanishi, T. *et al.* Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture. *Endocrinology* **141**, 264-273 (2000).
- [130] Kijowski, J. *et al.* The SDF-1-CXCR4 axis stimulates VEGF secretion and activates integrins but does not affect proliferation and survival in lymphohematopoietic cells. *Stem Cells* **19**, 453-466 (2001).
- [131] Kanbe, K., Takagishi, K. & Chen, Q. Stimulation of matrix metalloprotease 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4. *Arthritis Rheum.* **46**, 130-137 (2002).
- [132] Davies, M.E., Horner, A., Loveland, B.E. & McKenzie, I.F. Upregulation of complement regulators MCP (CD46), DAF (CD55) and protectin (CD59) in arthritic joint disease. *Scand. J. Rheumatol.* **23**, 316-321 (1994).
- [133] Mason, J.C., Lidington, E.A., Yarwood, H., Lublin, D.M. & Haskard, D.O. Induction of endothelial cell decay-accelerating factor by vascular endothelial growth factor: a mechanism for cytoprotection against complement-mediated injury during inflammatory angiogenesis. *Arthritis Rheum.* **44**, 138-150 (2001).
- [134] Mason, J.C. *et al.* Induction of decay-accelerating factor by cytokines or the membrane-attack complex protects vascular endothelial cells against complement deposition. *Blood* **94**, 1673-1682 (1999).
- [135] Seifert, P.S. & Hansson, G.K. Decay-accelerating factor is expressed on vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest* **84**, 597-604 (1989).
- [136] Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E.G. & McGeer, P.L. Complement components, but not complement inhibitors, are upregulated in atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1214-1219 (2001).
- [137] Lin, P.T., Gleeson, J.G., Corbo, J.C., Flanagan, L. & Walsh, C.A. DCAMKL1 encodes a protein kinase with homology to doublecortin that regulates microtubule polymerization. *J. Neurosci.* **20**, 9152-9161 (2000).
- [138] Cheng, N. & Chen, J. Tumor necrosis factor-alpha induction of endothelial ephrin A1 expression is mediated by a p38. *J. Biol. Chem.* **276**, 13771-13777 (2001).
- [139] Aicher, W.K. *et al.* Serum response elements activate and cAMP responsive elements inhibit expression of transcription factor Egr-1 in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients. *Int. Immunol.* **11**, 47-61 (1999).
- [140] Aicher, W.K. *et al.* Overexpression of zinc-finger transcription factor Z-225/Egr-1 in synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *J. Immunol.* **152**, 5940-5948 (1994).
- [141] Dohn, M., Jiang, J. & Chen, X. Receptor tyrosine kinase EphA2 is regulated by p53-family proteins and induces apoptosis. *Oncogene* **20**, 6503-6515 (2001).
- [142] Rosenberg, I.M., Goke, M., Kanai, M., Reinecker, H.C. & Podolsky, D.K. Epithelial cell kinase-B61: an autocrine loop modulating intestinal epithelial migration and barrier function. *Am. J. Physiol* **273**, G824-G832 (1997).
- [143] Latinkic, B.V., Zeremski, M. & Lau, L.F. Elk-1 can recruit SRF to form a ternary complex upon the serum response element. *Nucleic Acids Res.* **24**, 1345-1351 (1996).
- [144] Chung, K.C., Gomes, I., Wang, D., Lau, L.F. & Rosner, M.R. Raf and fibroblast growth factor phosphorylate Elk1 and activate the serum response element of the immediate early gene pip92 by mitogen-activated protein kinase-independent as well as -dependent signaling pathways. *Mol. Cell Biol.* **18**, 2272-2281 (1998).

- [145] Hanzawa,M. *et al.* Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. *Carcinogenesis* **21**, 1079-1085 (2000).
- [146] Chikazu,D. *et al.* Fibroblast growth factor (FGF)-2 directly stimulates mature osteoclast function through activation of FGF receptor 1 and p42/p44 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 31444-31450 (2000).
- [147] Kobayashi,T. *et al.* Differential regulation of Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synoviocytes by tumor necrosis factor alpha and basic fibroblast growth factor is associated with the expression of apoptosis-related molecules. *Arthritis Rheum.* **43**, 1106-1114 (2000).
- [148] Manabe,N. *et al.* Involvement of fibroblast growth factor-2 in joint destruction of rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology. (Oxford)* **38**, 714-720 (1999).
- [149] Newberry,E.P., Willis,D., Latifi,T., Boudreaux,J.M. & Towler,D.A. Fibroblast growth factor receptor signaling activates the human interstitial collagenase promoter via the bipartite Ets-AP1 element. *Mol. Endocrinol.* **11**, 1129-1144 (1997).
- [150] Yamashita,A. *et al.* Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *J. Immunol.* **168**, 450-457 (2002).
- [151] Powers,C.J., McLeskey,S.W. & Wellstein,A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat Cancer* **7**, 165-197 (2000).
- [152] Scholl,F.A., McLoughlin,P., Ehler,E., de Giovanni,C. & Schafer,B.W. DRAL is a p53-responsive gene whose four and a half LIM domain protein product induces apoptosis. *J. Cell Biol.* **151**, 495-506 (2000).
- [153] Muller,J.M. *et al.* The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus. *EMBO J.* **21**, 736-748 (2002).
- [154] Amaar,Y.G. *et al.* Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) interacts with a four and a half LIM protein 2 (FHL2). *J. Biol. Chem.* **277**, 12053-12060 (2002).
- [155] Gius,D. *et al.* Transcriptional activation and repression by Fos are independent functions: the C terminus represses immediate-early gene expression via CA<sub>r</sub>G elements. *Mol. Cell Biol.* **10**, 4243-4255 (1990).
- [156] Jochum,W. *et al.* Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat. Med.* **6**, 980-984 (2000).
- [157] Del Sal,G. *et al.* Gas1-induced growth suppression requires a transactivation-independent p53 function. *Mol. Cell Biol.* **15**, 7152-7160 (1995).
- [158] Grossi,M. *et al.* Role of Gas1 down-regulation in mitogenic stimulation of quiescent NIH3T3 cells by v-Src. *Oncogene* **17**, 1629-1638 (1998).
- [159] Fischer,R., Wei,Y., Anagli,J. & Berchtold,M.W. Calmodulin binds to and inhibits GTP binding of the ras-like GTPase Kir/Gem. *J. Biol. Chem.* **271**, 25067-25070 (1996).
- [160] Mittelstadt,P.R. & Ashwell,J.D. Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J. Biol. Chem.* **276**, 29603-29610 (2001).
- [161] Bateman,A. & Bennett,H.P. Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. *J. Endocrinol.* **158**, 145-151 (1998).
- [162] Lu,R. & Serrero,G. Mediation of estrogen mitogenic effect in human breast cancer MCF-7 cells by PC-cell-derived growth factor (PCDGF/granulin precursor). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 142-147 (2001).

- [163] Wu,M.X., Ao,Z., Prasad,K.V., Wu,R. & Schlossman,S.F. IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science* **281**, 998-1001 (1998).
- [164] Arlt,A. *et al.* Expression of the NF-kappa B target gene IEX-1 (p22/PRG1) does not prevent cell death but instead triggers apoptosis in HeLa cells. *Oncogene* **20**, 69-76 (2001).
- [165] Schafer,H., Diebel,J., Arlt,A., Trauzold,A. & Schmidt,W.E. The promoter of human p22/PACAP response gene 1 (PRG1) contains functional binding sites for the p53 tumor suppressor and for NFkappaB. *FEBS Lett.* **436**, 139-143 (1998).
- [166] Krause,A. *et al.* Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB. *J. Biol. Chem.* **273**, 23681-23689 (1998).
- [167] Chabaud,M., Fossiez,F., Taupin,J.L. & Miossec,P. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J. Immunol.* **161**, 409-414 (1998).
- [168] Okamoto,H. *et al.* The synovial expression and serum levels of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **40**, 1096-1105 (1997).
- [169] van de Loo,F.A., Kuiper,S., van Enkevort,F.H., Arntz,O.J. & van den Berg,W.B. Interleukin-6 reduces cartilage destruction during experimental arthritis. A study in interleukin-6-deficient mice. *Am. J. Pathol.* **151**, 177-191 (1997).
- [170] Du,X. & Williams,D.A. Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use. *Blood* **89**, 3897-3908 (1997).
- [171] Hermann,J.A., Hall,M.A., Maini,R.N., Feldmann,M. & Brennan,F.M. Important immunoregulatory role of interleukin-11 in the inflammatory process in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **41**, 1388-1397 (1998).
- [172] Maier,R., Ganu,V. & Lotz,M. Interleukin-11, an inducible cytokine in human articular chondrocytes and synoviocytes, stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **268**, 21527-21532 (1993).
- [173] Waring,P.M., Carroll,G.J., Kandiah,D.A., Buirski,G. & Metcalf,D. Increased levels of leukemia inhibitory factor in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum.* **36**, 911-915 (1993).
- [174] Huang,X., Li,Y., Tanaka,K., Moore,K.G. & Hayashi,J.I. Cloning and characterization of Lnk, a signal transduction protein that links T-cell receptor activation signal to phospholipase C gamma 1, Grb2, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 11618-11622 (1995).
- [175] Lin,M.T., Juan,C.Y., Chang,K.J., Chen,W.J. & Kuo,M.L. IL-6 inhibits apoptosis and retains oxidative DNA lesions in human gastric cancer AGS cells through up-regulation of anti-apoptotic gene mcl-1. *Carcinogenesis* 1947-1953 (2001).
- [176] Leu,C.M., Chang,C. & Hu,C. Epidermal growth factor (EGF) suppresses staurosporine-induced apoptosis by inducing mcl-1 via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* **19**, 1665-1675 (2000).
- [177] Simpkins,C.O. Metallothionein in human disease. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* **46**, 465-488 (2000).
- [178] Fukushi,M. *et al.* Identification and cloning of a novel cellular protein Naf1, Nef-associated factor 1, that increases cell surface CD4 expression. *FEBS Lett.* **442**, 83-88 (1999).
- [179] Pekarsky,Y. *et al.* Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 3690-3694 (2001).

- [180] McEvoy, A.N. *et al.* Activation of nuclear orphan receptor NURR1 transcription by NF-kappa B and cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding protein in rheumatoid arthritis synovial tissue. *J. Immunol.* **168**, 2979-2987 (2002).
- [181] Cheng, L.E., Chan, F.K., Cado, D. & Winoto, A. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J.* **16**, 1865-1875 (1997).
- [182] Arvilommi, A.M., Salmi, M., Airas, L., Kalimo, K. & Jalkanen, S. CD73 mediates lymphocyte binding to vascular endothelium in inflamed human skin. *Eur. J. Immunol.* **27**, 248-254 (1997).
- [183] Johnson, S.M., Patel, S., Bruckner, F.E. & Collins, D.A. 5'-Nucleotidase as a marker of both general and local inflammation in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology. (Oxford)* **38**, 391-396 (1999).
- [184] Poinot-Chazel, C. *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinase couples neurotensin receptor stimulation to induction of the primary response gene Krox-24. *Biochem. J.* **320 ( Pt 1)**, 145-151 (1996).
- [185] Wang, R., Zhang, L., Yin, D., Mufson, R.A. & Shi, Y. Protein kinase C regulates Fas (CD95/APO-1) expression. *J. Immunol.* **161**, 2201-2207 (1998).
- [186] Park, C.G., Lee, S.Y., Kandala, G., Lee, S.Y. & Choi, Y. A novel gene product that couples TCR signaling to Fas(CD95) expression in activation-induced cell death. *Immunity.* **4**, 583-591 (1996).
- [187] Slot, O., Brunner, N., Loch, H., Oxholm, P. & Stephens, R.W. Soluble urokinase plasminogen activator receptor in plasma of patients with inflammatory rheumatic disorders: increased concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **58**, 488-492 (1999).
- [188] Gil, J. & Esteban, M. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis.* **5**, 107-114 (2000).
- [189] Hmama, Z., Knutson, K.L., Herrera-Velitz, P., Nandan, D. & Reiner, N.E. Monocyte adherence induced by lipopolysaccharide involves CD14, LFA-1, and cytohesin-1. Regulation by Rho and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 1050-1057 (1999).
- [190] Saxne, T., Lecander, I. & Geborek, P. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in synovial fluid. Difference between inflammatory joint disorders and osteoarthritis. *J. Rheumatol.* **20**, 91-96 (1993).
- [191] Cerinic, M.M. *et al.* Synoviocytes from osteoarthritis and rheumatoid arthritis produce plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 and display u-PA receptors on their surface. *Life Sci.* **63**, 441-453 (1998).
- [192] Nanda, N. *et al.* Targeted inactivation of Gh/tissue transglutaminase II. *J. Biol. Chem.* **276**, 20673-20678 (2001).
- [193] Cook, T., Gebelein, B., Belal, M., Mesa, K. & Urrutia, R. Three conserved transcriptional repressor domains are a defining feature of the TIEG subfamily of Sp1-like zinc finger proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 29500-29504 (1999).
- [194] Guedez, L. *et al.* In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J. Clin. Invest.* **102**, 2002-2010 (1998).
- [195] Zhang, X.A., Bontrager, A.L. & Hemler, M.E. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J. Biol. Chem.* **276**, 25005-25013 (2001).
- [196] Zetoune, F.S. *et al.* A20 inhibits NF-kappa B activation downstream of multiple Map3 kinases and interacts with the I kappa B signalosome. *Cytokine* **15**, 282-298 (2001).

- [197] Lademann,U., Kallunki,T. & Jaattela,M. A20 zinc finger protein inhibits TNF-induced apoptosis and stress response early in the signaling cascades and independently of binding to TRAF2 or 14-3-3 proteins. *Cell Death. Differ.* **8**, 265-272 (2001).
- [198] Chatterjee,D. *et al.* Induction of apoptosis in 9-nitrocamptothecin-treated DU145 human prostate carcinoma cells correlates with de novo synthesis of CD95 and CD95 ligand and down-regulation of c-FLIP(short). *Cancer Res.* **61**, 7148-7154 (2001).
- [199] Koch,A.E. *et al.* Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* **152**, 4149-4156 (1994).
- [200] Seghezzi,G. *et al.* Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J. Cell Biol.* **141**, 1659-1673 (1998).
- [201] Sone,H. *et al.* Elevated levels of vascular endothelial growth factor in the sera of patients with rheumatoid arthritis correlation with disease activity. *Life Sci.* **69**, 1861-1869 (2001).
- [202] Kumar,S. *et al.* Identification and initial characterization of 5000 expressed sequenced tags (ESTs) each from adult human normal and osteoarthritic cartilage cDNA libraries. *Osteoarthritis. Cartilage.* **9**, 641-653 (2001).
- [203] Carballo,E., Lai,W.S. & Blackshear,P.J. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* **281**, 1001-1005 (1998).
- [204] Johnson,B.A., Geha,M. & Blackwell,T.K. Similar but distinct effects of the tristetraprolin/TIS11 immediate-early proteins on cell survival. *Oncogene* **19**, 1657-1664 (2000).



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ordnung <i>Chlamydiales</i> .....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von Chlamydien.....	5
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Bilder von <i>C. trachomatis</i> in HeLa T-Zellen (freundlicherweise erstellt von Dr. M. Rohde). Auf der linken Seite sieht man einen chlamydialen Einschluß 24 Stunden nach Infektion. Auf der rechten Seite ist ein Einschluß 48 Stunden nach Infektion abgebildet .....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ergebnisses einer Fluoreszenz-Messung während einer <i>Real-Time-PCR</i> . Aufgetragen ist die Zyklenzahl der PCR ( <i>Cycle Number</i> ) gegen die normalisierte Fluoreszenz-Intensität ( <i>Normalized Fluorescence Intensity</i> ) für eine Probe ( <i>Sample</i> ) und eine Negativ-Kontrolle ohne cDNA ( <i>No Template Control, NTC</i> ). Der $C_T$ -Wert, die Zyklenzahl bei der das Fluoreszenz-Signal der Probe aus dem Hintergrund ( <i>Threshold</i> ) heraustritt wurde hier durch einen Pfeil gekennzeichnet .....	39
Abbildung 5: Standardkurve für das Gen MCL1, aufgetragen ist der Logarithmus des eingesetzten Volumens an cDNA gegen den $C_T$ -Wert der Probe, ermittelt aus Doppelwerten. Die Geradengleichung und die Anpassung der Standardgerade an die Punkte sind angegeben .....	72
Abbildung 6: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von IL-11 und IL-6 im Überstand von HeLa T-Zellen, primären humanen Chondrozyten und der Synovialfibroblast-Zelllinie K4IM nach Infektion mit lebenden <i>C. trachomatis</i> , Behandlung mit durch UV-Bestrahlung abgetöteten Chlamydien oder Scheininfektion. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung von Dreifach-Werten, wobei die Ergebnisse in einem Wiederholungsexperiment bestätigt werden konnten .....	75
Abbildung 7: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von LIF im Überstand von primären humanen Chondrozyten und der Synovialfibroblast-Zelllinie K4IM nach Infektion mit lebenden <i>C. trachomatis</i> , Behandlung mit durch UV-Bestrahlung abgetöteten Chlamydien oder Scheininfektion. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung von Dreifach-Werten, wobei die Ergebnisse in einem Wiederholungsexperiment bestätigt werden konnten.....	77
Abbildung 8: Darstellung eines typischen Verlaufs der Expression der Genregulationen beim Vergleich von HeLa-Zellen infiziert mit <i>C. trachomatis</i> L2, <i>C. trachomatis</i> D oder <i>C. pneumoniae</i> im Vergleich zu Schein-infizierten Zellen mittels <i>Real-Time-RT-PCR</i> am Beispiel der veränderten Expression von LIF und .....	123
Abbildung 9: Darstellung des Verlauf der Genexpression von DUSP4, DUSP5 und GAS1 nach der Infektion von HeLa-Zellen infiziert mit <i>C. trachomatis</i> L2, <i>C. trachomatis</i> D oder <i>C. pneumoniae</i> im Vergleich zu Schein-infizierten Zellen ermittelt durch <i>Real-Time-RT-PCR</i> . Der erste Balken zu jedem Analysezeitpunkt stellt jeweils die Regulation dar, die durch Infektion mit <i>C. trachomatis</i> Serovar L2, der zweite Balken die Regulation durch <i>C. trachomatis</i> Serovar D und der letzte Balken die durch <i>C. pneumoniae</i> . Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten .....	124
Abbildung 10: Übersicht über die N- und O-gebundene Zuckerstrukturen an der Zelloberfläche verschiedener hier verwendeter CHO-Zelllinien.....	126
Abbildung 11: Bilder von HeLa-Zellen drei Tage nach transients Transfektion mit Plasmiden für die chlamydiale GFP-Fusionsprotein von CT249 (links) und CT119 (rechts), aufgenommen an einem Fluoreszenzmikroskop .....	131
Abbildung 12: Bilder von HeLa-Zellen drei Tage nach transients Transfektion mit Plasmiden für die chlamydialen GFP-Fusionsprotein von CT089 (links) und Cpn0585 (rechts), aufgenommen an einem Fluoreszenzmikroskop .....	131
Abbildung 13: Zahlenmäßige Übersicht der durch die Microarrays der Firma Affymetrix ermittelten Veränderungen der Genexpression durch Chlamydien. In der oberen Hälfte sind die Veränderungen der Genexpression bei HeLa T-Zellen durch Infektion mit lebenden <i>C. trachomatis</i> bzw. <i>C. pneumoniae</i> (im Vergleich mit Schein-infizierten HeLa-Zellen) dargestellt, in den unteren vier Abbildungen sind die Veränderungen, die durch die Behandlung mit UV-inaktivierten EK der beiden Spezies resultieren. Aufgetragen ist die Anzahl der Regulationen mit dem jeweiligen Faktor der Regulation gegen die Analysezeitpunkte nach Infektion (p.i.) .....	137

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die bisher zugänglichen Genome verschiedener Chlamydienstämme.....	4
Tabelle 2: Publierte Chlamydien-induzierte Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen sowie der Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren bei verschiedenen Wirtszellen.....	9
Tabelle 3: Verwendete Zelllinien und primären Zellen mit Angaben zu den eingesetzten Kulturmedien .....	17
Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme mit Angaben zu den eingesetzten Kulturmedien .....	18
Tabelle 5: Primer für die spezifische Amplifikation von Teilstücken von cDNA in der <i>Real-Time</i> -PCR, angegeben sind die Namen der Gene (Abkürzung) für die Primer entwickelt wurden, sowie die Primersequenz, die Produktlänge und die Temperatur, die für das Annealing in der PCR verwendet wurde. Bei dem Teilstück von RPS9 konnte die Länge nur in einem Agarosegel abgeschätzt werden, da dieses Primerpaar aus der Arbeitsgruppe von J. Buer (GBF, Braunschweig) übernommen wurde und uns keine weiteren Informationen dazu vorlagen.....	20
Tabelle 6: Primer für die Amplifikation von chlamydialen Genen zur Erzeugung von eukaryonten Expressionsvektoren. Angegeben sind die Bezeichnungen der chlamydialen Gene für die Primer entwickelt wurden, sowie die Primersequenz, die Produktlänge und die Temperatur, die für das Annealing in der PCR verwendet wurde. ....	20
Tabelle 7: Verwendete Lösungen mit ihren Zusammensetzungen .....	23
Tabelle 8: Pipettierschema für die Primermatrix, wobei in Spalte eins das Primerverhältnis im Ansatz in fmol/Ansatz angegeben ist. ....	42
Tabelle 9: Effizienzen der transienten Transfektion durch verschiedene Methoden bei unterschiedlichen Zelllinien. Die Prozentangaben basieren auf visuellen Abschätzungen unter dem Lichtmikroskop und ließen sich in einem Wiederholungsexperiment bestätigen.....	60
Tabelle 10: Ergebnisse eines cDNA-Array Experiments von HeLa-Zellen zwölf Stunden nach Infektion mit <i>C. trachomatis</i> L2 bei Verwendung von human 1.2 Atlas Arrays der Firma Clontech/BD. Der angegebene Regulationsfaktor ist das Verhältnis der Genexpression infizierter gegenüber schein-infizierter Zellen bei hochregulierten, und der negative Kehrwert dieses Verhältnisses bei runterregulierten Genen, wobei hier alle Gene mit einem Faktor größer 1,5 (bzw. kleiner -1,5) aufgeführt sind. Die Gene sind in funktionelle Gruppen unterteilt. In der ersten Spalte steht der Gennamen und dessen Abkürzung, in der zweiten Spalte die GenBank-Accession-Nummer; zusätzliche Informationen zu den Genen finden sich im Anhang. Hervorgehoben sind Gene mit einer Regulation größer Faktor drei, (ap) steht dabei für eine Regulation des selben Gens beim Vergleich von <i>C. pneumoniae</i> -infizierten mit schein-infizierten HeLa-Zellen durch später durchgeführte Microarrays der Firma Affymetrix, (at) bei einer Regulation durch <i>C. trachomatis</i> und (a) markiert Gene, deren Regulation sowohl durch <i>C. trachomatis</i> als auch durch <i>C. pneumoniae</i> verändert wird. ....	63
Tabelle 11: Dargestellt sind die Transkriptionsfaktoren und die Faktoren ihrer Regulation beim Vergleich mittels cDNA-Array (Atlas human 1.2 Array, Clontech/BD) infizierter HeLa-Zellen gegenüber nicht infizierte Zellen 24 Stunden nach Infektion mit <i>C. trachomatis</i> L2 in zwei unabhängigen Experimenten (Exp.1 und Exp.2). In der ersten Spalte steht der Gennamen und die Abkürzung des Gens, in der zweiten Spalte die GenBank-Accession-Nummer; weitere Informationen zu den Genen finden sich im Anhang. Spalte 4 und 5 geben die Faktoren der Regulation in den beiden Experimenten an. Zuerst werden Gene aufgeführt, die nach Infektion vermindert exprimiert werden, dann folgen vermehrt exprimierte Gene. Hervorgehoben sind Gene mit einer Regulation größer Faktor drei. (ap) steht für eine Regulation des selben Gens beim Vergleich von <i>C. pneumoniae</i> -infizierten mit schein-infizierten HeLa-Zellen durch später durchgeführte Microarrays der Firma Affymetrix, (at) bei einer Regulation durch <i>C. trachomatis</i> und (a) markiert Gene, deren Regulation sowohl durch <i>C. trachomatis</i> als auch durch <i>C. pneumoniae</i> verändert wird. ....	65
Tabelle 12: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, ihren Rezeptoren und assoziierten Proteinen, ermittelt durch Atlas Arrays (Clontech). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 11. ....	65
Tabelle 13: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen der Zellzykluskontrolle, ermittelt durch Atlas Arrays (Clontech). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 11.....	66
Tabelle 14: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen der intrazellulären Signaltransduktion, ermittelt durch Atlas Arrays (Clontech). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 11.....	66
Tabelle 15: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen der Adäsionsmolekülen, ermittelt durch Atlas Arrays (Clontech). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 11.....	67
Tabelle 16: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von pro- oder anti-apoptotischen Proteinen, ermittelt durch Atlas Arrays (Clontech). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 11 .....	67
Tabelle 17: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen mit bekanntem Bezug zu Arthritis, ermittelt durch Atlas Arrays (Clontech). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 11 .....	67

Tabelle 18: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen unterschiedlicher Funktion, die in keine der anderen Gruppen eingeteilt werden konnten, ermittelt durch Atlas Arrays (Clontech). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 11 .....	68
Tabelle 19: Vier-Felder-Tafel zur statistischen Bewertung der Ergebnisse der Arrays 24 Stunden nach Infektion mit <i>C. trachomatis</i> mittels Fishers Exaktem Test. Dargestellt ist die Anzahl der Gene in den beiden Array-Experimenten, aufgeschlüsselt nach dem Faktor der Regulation in beiden Experimenten. (419 Gene waren in beiden Experimenten auswertbar, das heißt beim Vergleich der zusammen gehörenden Membranen konnte auf mindestens einer von zwei Membranen ein Signal gemessen werden und somit bestimmt werden, ob eine Regulation vorliegt.).....	69
Tabelle 20: Ergebnisse der Primermatrix für MCL1. In der ersten Spalte stehen das Primerverhältnis (in pmol/ml im Endansatz) und die Angabe, ob der Ansatz cDNA enthält oder nicht (K). Es folgen die C <sub>T</sub> -Werte der einzelnen Primerkombinationen, deren Mittelwerte und Standardabweichungen. In der letzten Spalte sind die Differenzen der C <sub>T</sub> -Werte der gleichen Primerkombination mit und ohne cDNA aufgeführt, der Wert mit der größten Differenz ist hervorgehoben. Für Proben bei denen kein Amplifikat entstand wurde die maximale Zykluszahl (40) eingesetzt.....	71
Tabelle 21: Ergebnisse der Primermatrizes für die verwendeten Primerpaare. Die beiden mit (*) gekennzeichneten Primerpaar mit entsprechenden Angaben wurden von der Arbeitsgruppe von J. Buer (GBF, Braunschweig) übernommen. # Bei ZFP36 gab es ein unerwünschtes Amplifikat bei der Primeraustestung, daher wurde das Primerpaar im Folgenden nicht mehr verwendet.....	72
Tabelle 22: Semiquantitative Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs der Expression ausgewählter Gene mittels <i>Real-Time</i> -RT-PCR von HeLa-Zellen infiziert mit <i>C. trachomatis</i> L2 (bzw. UV-inaktivierten Chlamydien) versus nicht infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (p.i.). Die Faktoren der Genregulation ergeben sich aus Doppelwerten zweier unabhängiger Experimente mit + Faktor 2-3, ++ <10, +++ <30, ++++ <100, +++++ >100 .....	73
Tabelle 23: Übersicht über die Versuchsplanung des ersten Blocks an Affymetrix-Microarray-Experimenten. Angegeben sind die Bedingungen unter denen aus HeLa-Zellen RNA gewonnen und mit Affymetrix U95A-Microarray-Chips untersucht wurde. Die Angabe in Klammern weist auf einen Versuch hin, bei dem die Hybridisierung mit einem Chip versagt hat und somit keine Daten vorliegen.....	79
Tabelle 24: Übersicht über die Versuchsplanung des zweiten Blocks an Affymetrix-Microarray-Experimenten. Angegeben sind die Bedingungen unter denen aus HeLa-Zellen RNA gewonnen und mit Affymetrix U95A-Microarray-Chips untersucht wurde. Die Angaben in Klammern weisen auf die Versuche hin, bei denen die Hybridisierung mit einem Chip versagt hat und somit keine Daten vorliegen.....	79
Tabelle 25: Übersicht über die Versuchsplanung der Wiederholungsexperimente des zweiten Blocks an Affymetrix-Microarray-Experimenten. Angegeben sind die Bedingungen unter denen aus HeLa-Zellen RNA gewonnen und mit Affymetrix U95A-Microarray-Chips untersucht wurde.....	80
Tabelle 26: Übersicht über die Anzahl der regulierten Gene auf U95A-Microarray-Chips (Affymetrix) von HeLa-Zellen, die mit <i>C. trachomatis</i> L2 infizierten wurden im Vergleich mit schein-infizierten Zellen. Das (*) weist auf Regulationen hin, bei denen der Faktor der Regulation nicht exakt bestimmt werden kann, da die gemessenen Intensitäten der Genspots unter zwei lagen. Die Angaben, die mit (#) gekennzeichnet sind, stammen aus dem Wiederholungsexperiment.....	81
Tabelle 27: Übersicht über die Anzahl der regulierten Gene auf U95A-Microarray-Chips (Affymetrix) von HeLa-Zellen, die mit UV-inaktivierten <i>C. trachomatis</i> behandelt wurden im Vergleich mit schein-infizierten Zellen. Die Angaben, die mit (#) gekennzeichnet sind, stammen aus dem Wiederholungsexperiment.....	82
Tabelle 28: Übersicht über die Anzahl der regulierten Gene auf U95A-Microarray-Chips (Affymetrix) von HeLa-Zellen, die mit <i>C. pneumoniae</i> infizierten wurden im Vergleich mit schein-infizierten Zellen.....	82
Tabelle 29: Übersicht über die Anzahl der regulierten Gene auf U95A-Microarray (Affymetrix)-Chips von HeLa-Zellen, die mit UV-inaktivierten <i>C. pneumoniae</i> behandelt wurden im Vergleich mit schein-infizierten Zellen. Das (*) weist auf Regulationen hin, bei denen der Faktor der Regulation nicht exakt bestimmt werden kann, da die gemessenen Intensitäten der Genspots unter zwei lagen.....	83
Tabelle 30: Übersicht über die Gene in den einzelnen funktionellen Gruppen. Dargestellt ist jeweils die Anzahl der Gene, deren Expression durch die Infektion mit <i>C. trachomatis</i> oder <i>C. pneumoniae</i> verändert wurde und die Ausrichtung der Regulation, (↓) bezeichnet Gene, die nach Infektion vermindert exprimiert wurden, (↑) bezeichnet Gene mit vermehrter Expression. Die mittlere Spalte gibt die Anzahl der Gene an, die sowohl durch Infektion mit <i>C. trachomatis</i> , als auch mit <i>C. pneumoniae</i> verändert exprimiert werden, dabei gibt die Zahl in Klammern die Anzahl der Genspots an, bei der sich die Ausrichtung der Regulation der Genexpression unterscheidet.....	85
Tabelle 31: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Transkriptionsfaktoren ermittelt mit U95A Microarrays der Firma Affymetrix. In der ersten Spalte ist der Gennamen und die Abkürzung des Names, in Spalte zwei ist die GenBank-Accession-Nummer vermerkt. Zusätzliche Informationen zu einigen Genen sind im Anhang nachzulesen. In den weiteren Spalten stehen die Faktoren der Regulation des entsprechenden Gens von infizierten gegenüber schein-infizierten Zellen zu den angegebenen	

Zeitpunkten nach Infektion. Im oberen Teil der Tabelle stehen Gene, deren Expression nach chlamydialer Infektion ausschließlich vermindert ist. Es folgen Gene, deren Ausrichtung der Regulation sich über den Erhebungszeitraum hinweg ändert und im unteren Teil der Tabelle befinden sich die Gene mit vermehrter Expression nach Infektion. Hervorgehoben sind Regulationen mit einem Faktor über 3,0. Das (*) weist auf Regulationen hin, bei denen der Faktor der Regulation nicht exakt bestimmt werden kann, da die gemessenen Intensitäten der Genspots kleiner zwei waren. Das (#) weist darauf hin, dass diese Werte aus dem Wiederholungsexperiment mit <i>C. trachomatis</i> -infizierten HeLa-Zellen stammen. Mit (UV) sind Gene gekennzeichnet, bei denen auch ein Unterschied in der Genexpression vorlag beim Vergleich von scheininfizierten Zellen mit Zellen, die mit UV-inaktivierten Chlamydien behandelt wurden. Genabkürzungen mit (b) weisen auf Gene hin, die bei <i>C. pneumoniae</i> -infizierten HeLa-Zellen gleichgerichtet reguliert sind, (bu) weist auf Gene hin, bei denen in der anderen Spezies ebenfalls eine Regulation vorliegt, die sich aber in der Ausrichtung unterscheidet und (c) bezeichnet Gene, die auch in einem oder beiden Array-Experimenten reguliert waren, die mit Microarrays der Firma Clontech durchgeführt wurden. ....	90
Tabelle 32: <i>C. pneumoniae</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Transkriptionsfaktoren. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	93
Tabelle 33: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Genen, die für Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, deren Rezeptoren und assoziierte Proteine kodieren. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	96
Tabelle 34: <i>C. pneumoniae</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Genen, die für Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, deren Rezeptoren und assoziierte Proteine kodieren. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	98
Tabelle 35: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen der intrazellulären Signaltransduktion. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	101
Tabelle 36: <i>C. pneumoniae</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen der intrazellulären Signaltransduktion. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	103
Tabelle 37: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Genen, die bei der Kontrolle des Zellzyklus eine Rolle spielen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	104
Tabelle 38: <i>C. pneumoniae</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Genen, die bei der Kontrolle des Zellzyklus eine Rolle spielen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	105
Tabelle 39: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen des Zytoskeletts und assoziierten Proteinen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	107
Tabelle 40: <i>C. pneumoniae</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen des Zytoskeletts und assoziierten Proteinen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	108
Tabelle 41: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen der Extrazellulärmatrix. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	109
Tabelle 42: <i>C. pneumoniae</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von von Proteinen der Extrazellulärmatrix. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	111
Tabelle 43: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Adhäsionsmolekülen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	111
Tabelle 44: <i>C. pneumoniae</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Adhäsionsmolekülen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	112
Tabelle 45: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von pro- und anti-apoptischen Proteinen. Die Daten für TGM2 und PTPN13 finden sich in Tabelle 35. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	113
Tabelle 46: <i>C. pneumoniae</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von pro- und anti-apoptischen Proteinen. Die Daten für CDKN1A finden sich in Tabelle 38, für DED in Tabelle 32 und für TGM2 in Tabelle 36. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	114
Tabelle 47: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen, die einen bekannten Bezug zu Arthritis haben. Die Daten für CXCR4, FGF2, PTGS2 und VEGF finden sich in Tabelle 33, die Daten für SERPINE1 und PLAUR in Tabelle 41. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	115
Tabelle 48: <i>C. pneumoniae</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen, die einen bekannten Bezug zu Arthritis haben. Die Daten für CXCR4, PTGS2 und VEGF finden sich in Tabelle 34, die Daten für SERPINE1 und PLAUR in Tabelle 42, die Daten für CD44 in Tabelle 49. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	115
Tabelle 49: <i>C. pneumoniae</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von Proteinen, die einen Bezug zu Atherosklerose haben. Die Daten für KLF5 finden sich in Tabelle Tabelle 32, die für CTGF, PTGS2 und VEGF in Tabelle 34, für CDKN1A in Tabelle 38 und die Daten für PLAUR, SERPINE1, TIMP1 und TIMP2 in Tabelle 42. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31. ....	116
Tabelle 50: <i>C. trachomatis</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von unterschiedlichen Proteinen, die durch ihre hohe Regulation oder ihre Funktion auffallen oder dadurch, auch in einem der vorangegangenen	

Array-Experimente reguliert gewesen zu sein, die aber nicht in eine der bisherigen Kategorien eingeteilt werden konnten. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.....	117
Tabelle 51: <i>C. pneumoniae</i> -induzierte Veränderung der Genexpression von unterschiedlichen Proteinen, die durch ihre hohe Regulation oder ihre Funktion auffallen oder dadurch, auch in einem der vorangegangenen Array-Experimente reguliert gewesen zu sein, die aber nicht in eine der bisherigen Kategorien eingeteilt werden konnten. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.....	119
Tabelle 52: Alphabetische Auflistung der Gene, deren Expression sowohl durch lebende, als auch durch UV-inaktivierte <i>C. trachomatis</i> beeinflusst wird. In Spalte eins ist die Abkürzung des Gennamens angegeben, der ausgeschriebene Genname findet sich in der Tabelle, in der die Werte von infizierten gegenüber nicht-infizierten Zellen angegeben sind. Auf die entsprechende Tabelle wird in der letzten Spalte verwiesen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.....	120
Tabelle 53: Alphabetische Auflistung der Gene, deren Expression sowohl durch lebende, als auch durch UV-inaktivierte <i>C. pneumoniae</i> beeinflusst wird. In Spalte eins ist die Abkürzung des Gennamens angegeben, der ausgeschriebene Genname findet sich in der Tabelle, in der die Werte von infizierten gegenüber nicht-infizierten Zellen angegeben sind. Auf die entsprechende Tabelle wird in der letzten Spalte verwiesen. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 31.....	121
Tabelle 54: Semiquantitative Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs der Expression ausgewählter Gene mittels <i>Real-Time</i> -RT-PCR von HeLa-Zellen infiziert mit <i>C. trachomatis</i> L2, <i>C. trachomatis</i> D oder <i>C. pneumoniae</i> im Vergleich zu Schein-infizierten Zellen. Die Faktoren der Genregulation ergeben sich aus Doppelwerten zweier unabhängiger Experimente mit (+) Faktor 2-3, + Faktor 3-5, ++ Faktor 5-10, +++ Faktor 10-30, ++++ Faktor 30-100.....	123
Tabelle 55: Dargestellt ist das Ergebnis einer Dosis-Wirkungskurve mit EMS zur Ermittlung der optimalen Konzentration des Mutagens.....	127
Tabelle 56: Ergebnis der transienten Transfektion (Ca <sup>2+</sup> -Methode) von HeLa T-Zellen mit dem Vektor pCDNA3.1 HisB-lacZ gemischt mit pCDNA3.1 HisB. Dargestellt sind die $\beta$ -Galaktosidase-positiven Zellen in Prozent, also die Zellen, die das Plasmid mit lacZ aufgenommen haben. Der Nachweis erfolgte über einen x-Gal-Assay. Die Prozentangaben basieren auf visuellen Abschätzungen unter dem Lichtmikroskop und ließen sich in einem Wiederholungsexperiment bestätigen.....	129
Tabelle 57: Chlamydiale Proteine, die als GFP-Fusionsproteine in eukaryonten Zellen durch transiente Transfektion exprimiert wurden.....	130
Tabelle 58: Auflistung einiger Ergebnisse aus Microarray Studien mit anderen Bakterien und Wirtszellen aus der Literatur. Herausgehoben sind Gene, die sowohl in diesen Experimenten durch die Infektion mit Bakterien verändert exprimiert wurden als auch bei der Infektion von HeLa-Zellen mit Chlamydien. So nicht anders angegeben, wurden die Gene nach Infektion vermehrt exprimiert.....	146
Tabelle 59: Alphabetische Übersicht der im Ergebnisteil genannten Gene, deren Expression durch Infektion mit Chlamydien beeinflusst wird. Aufgelistet werden Genabkürzung, bekannte Synonyme, GenBank-Accession-Nummer, Genname, bekannte Funktionen des Gens und der Verweis auf die Tabelle(n) in denen das Gen im Ergebnisteil der Microarrays genannt wird, wobei die Tabelle, in der die Informationen über die Faktoren der Regulation in den Microarrays genannt wird durch Fettdruck hervorgehoben ist. Die Abkürzungen 12-C bzw. 24-C weisen auf Tabellen mit Ergebnissen hin, die mit Arrays der Firma Clontech 12 Stunden (12-C) bzw. 24 Stunden (24-C) nach Infektion mit <i>C. trachomatis</i> erhalten wurden. Alle anderen Tabellenverweise beziehen sich auf Ergebnisse, die mit Arrays der Firma Affymetrix erlangt wurden. Die aufgeführten Funktionen der Gene stammen, so nicht anders angegeben, entweder von den Firmen der verwendeten Arrays (Clontche/BD bzw. Affymetrix) oder wurden aus einer Datenbank des NCBI unter <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink</a> entnommen.....	209

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AK	Antikörper
Amp	Ampecillin
AP	Alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCP	1-Bromo-3-Chloro-Propan
bFGF	<i>basic fibroblast growth-factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
CADD	<i>Chlamydia protein associated with death domains</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	„cluster of differentiation“
cDNA	Komplementäre DNA
CHO	<i>chinese hamster ovary cells</i>
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
CPAF	<i>chlamydial protease- or proteasome-like activity factor</i>
cpm	registrierte Zerfälle pro Minute (counts per minute)
C <sub>T</sub>	<i>Threshold-Cycle</i>
CTP	Cytidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DR	<i>death receptor</i>
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Elementarkörperchen
ELISA	<i>enzym-linked immunosorbent assay</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung 9,81m/s <sup>2</sup>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
GEBS	Glycerin, EDTA, Bromphenolblau, Sarcosyl
GFP	<i>green fluorescent protein</i> ; Grün-fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Markrophagen koloniestimulierender Faktor
GSK	GlaxoSmithKline
GTP	Guanosintriphosphat
hsp	<i>heat shock protein</i> , Hitzeschockprotein
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
IFU	<i>infection forming unit</i> , infektiöse Einheiten
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kbp	Kiobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LGV	Lymphogranuloma venerum
LPS	Lipopolysaccharid

MAdCAM	<i>mucosalvascular addressin cell adhesion molecule</i>
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min	Minuten
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Anzahl an infektiösen Einheiten pro Zelle
MOMP	<i>major outer membrane protein</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mRNA	<i>messengerRNA</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF	nuklearer Faktor
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OA	Osteoarthritis
OD	optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
p.a.	pro Analys
PAI	<i>plasminogen inhibitor</i>
p.i.	<i>post infectionem</i> , nach Infektion
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes PBS Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
PKC	Proteinkinase C
R	Rezeptor
RA	rheumatoide Arthritis
ReA	reaktive Arthritis
RK	Retikularkörperchen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SMC	<i>smooth muscle cells</i> , glatte Muskelzellen
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TF	<i>Tissuefactor</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TNFR	Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
U	Uracil
uPA	<i>urokinase plasminogen activator</i>
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i> , vaskuläre glatte Muskelzellen
v/v	Volumen pro Volumen bei Prozentangaben
w/v	Masse pro Volumen bei Prozentangaben
x-Gal	5-Bromo-4-chloro-indoyl- $\beta$ -D-Galactosid





## Anhang

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
5T4	TPBG	Z29083	5T4 oncofetal trophoblast glycoprotein	verantwortlich für Zell-Zell-Kontakt, Beweglichkeit; interagiert mit dem Zytoskelett; Transmembranprotein	Adhäsionsmolekül
ACTA1		W25984	actin, $\alpha$ 1, skeletal muscle		Zytoskelett
ACTC		J00073	actin, $\alpha$ -cardiac, gene exon 6 and 3' flank.		Zytoskelett
ACTN1		M95178, X15804	actinin, $\alpha$ 1		Zytoskelett
ACTN4		U48734	actinin, $\alpha$ 4		Zytoskelett
ACTR2		AF006082	ARP2 (actin-related protein 2, yeast) homolog		Zytoskelett
ADM	AM	D14874	adrenomedullin	beteiligt an Zellwachstum, Entzündung; reguliert den Blutdruck; wird stimuliert durch inflammatorische Zytokine (IL-1, TNF- $\alpha$ ) und LPS [115]; bei vielen Entzündungen erhöht, greift ein in Hormon-Regulation [84]; ADM verringert LPS-induzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-6 bei Makrophagen, erhöht Sekretion von IL-6 bei Fibroblasten, vasodilatatorisches (gefäßweiterendes) Peptid [85]	Proteine unterschiedlicher Funktion
AHR		L19872	aryl hydrocarbon receptor	vermittelt biologische/toxische Effekte von Dioxinen; aktiviert c-myc, zusammen mit RelA/NF $\kappa$ B [116]; der Apoptose vorgeschaltet	Transkriptionsfaktor
AKAP2	AKAPKL, AKAP-KL, KIAA0920, DKFZp564L0716	AB023137	A kinase (PRKA) anchor protein 2	rekrutiert PKA, PKC; geleitet PKA an Mitochondrien	Signaltransduktion
AKAP12		U81607	A kinase (PRKA) anchor protein 12 (gravin)	koordiniert die Lokalisation von Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC)	Signaltransduktion

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
ANPEP	CD13, PEPN, GPI50	M22324	alanyl aminopeptidase (membrane); aminopeptidase N; aminopeptidase M; microsomal aminopeptidase	transmembranes Ectoenzym, N-terminale Peptidase; Leukozytenchemotaxis; möglicher Entzündungsmediator [100]	Proteine unterschiedlicher Funktion
ANXA1	ANX1, LPC1, LC1	X05908	annexin A1; lipocortin 1	aktiviert über Glucocorticoide, anti-inflammatorische Wirkung, unterdrückt Eicosanoid-Produktion, inhibiert Leukozyten-Migration, greift ein in Zellwachstumskontrolle, [79]; führt zu Ablösen von Neutrophilen von Endothel in entzündlichem Prozeß, ebenso weniger Adhäsion und Emigration [80]; Aktivierung von MEK, ERK1/2, dabei abhängig von LPS [117]; wird durch IL-6 hochreguliert [81]	Proteine unterschiedlicher Funktion
APP	APPI, PN-II	Y00264	protease nexin-II; Alzheimer's disease amyloid A4 protein precursor;		24-C unterschiedliche
AREG	SDGF	M30704	amphiregulin; schwannoma-derived growth factor	stimuliert Wachstum von Fibroblasten, Epithelzellen	Wachstumsfaktor
ARHB	AHR6	X06820	transforming protein rhoB		24-C Signaltransduktion
ARHC	ARH9, RHOH9, RhoC	L25081	ras homolog gene family, member C		Signaltransduktion
ARHGDI	GDIA1	X69550	Rho GDP dissociation inhibitor $\alpha$		Signaltransduktion
ARPC2		U50523	actin related protein 2/3 complex, subunit 2 (34 kD)		Zytoskelett
ATF3		L19871	activating transcription factor 3	gehört zu CREB-Familie	Transkriptionsfaktor
AXL	UFO	M76125	tyrosine-protein kinase receptor UFO precursor; axl oncogene	vermittelt Signale ins Zytosol; induziert Zelltransformation bei Überexpression; bindet an Wachstumsfaktoren	Signaltransduktion, 12-C Signaltransduktion
BACH1		AB002803	basic leucine zipper transcription factor 1; BTB and CNC homology 1		Transkriptionsfaktor
BAG1		Z35491	BCL2-associated athanogene 1	interagiert mit BCL2; bindet an HGF- und PDGF-Rezeptor; könnte Wachstumsfaktor-Signalweg und BCL2-bedingte apoptotische Prozesse beeinflussen	Apoptose

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
BAG2		AL050287	BCL2-associated athanogene 2	verwandt mit BAG1; inhibiert Hsc70 Chaperon-Aktivität durch Bindung an die ATPase-Domäne	Apoptose
BAG5	BAG-5, KIAA0873	AB020680	BCL2-associated athanogene 5	verwandt mit BAG1	Apoptose
BAX		U19599	BCL2-associated X protein; apoptosis regulator bax	interagiert mit BCL2; könnte Caspasen aktivieren durch Erhöhung der mitochondrialen Permeabilität	Apoptose
BCAR3	NSP2, SH2D3B	U92715	breast cancer anti-estrogen resistance 3	beinhaltet SH2-Domänen	Signaltransduktion
BHLHB2	DECI, STRA14, STRA13, Sharp2	AB004066	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	TGF- $\beta$ nachgeschalteter Regulator [118]; interagiert mit cAMP; Rolle in Proliferation/Differenzierung von Chondrozyten, Fibroblasten [119]	Proteine unterschiedlicher Funktion
BMP5		M60314	bone morphogenetic protein 5	Mitglied der TGF- $\beta$ -Familie	Wachstumsfaktoren
BNIP3	NIP3	AF002697	BCL2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3	pro-apoptotisch	Apoptose
BNIP3L	NIX, BNIP3A	AF079221	BCL2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3-like	pro-apoptotisch	Apoptose
BRF2	ZFP36L2, ERF2, ERF-2, TIS11D	X78992, U07802	EGF-response factor 2; butyrate response factor 2	möglicher Transkriptionsfaktor; könnte Wachstumsfaktor-Antworten regulieren; bindet an 14-3-3eta [120]	Transkriptionsfaktor
BSG	OK, 5F7, CD147, EMMPRIN	X64364	basigin	induziert Matrixmetalloproteinase 1 (MMP1), MMP2	Extrazellulärmatrix
CALM3	PHKD	J04046	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, $\delta$ )		Signaltransduktion
CALR	RO, SSA, cC1qR	M84739	calreticulin	fungiert als $Ca^{2+}$ -bindendes/speicherndes Protein im Lumen des Endoplasmatischen Reticulums; bindet und inhibiert den Androgen-Rezeptor	Proteine unterschiedlicher Funktion
CAPN2	mCANP, CANPL2, CANPML	M23254	calpain 2, (m/II) large subunit; calcium-dependent cysteine (thiol) protease	vermehrte Konzentration bei RA in Synovialflüssigkeit [121]; könnte Knorpelschäden verursachen; wird runterreguliert durch IL-1 + TNF, IL-1 + TGF [122]; beteiligt an Proliferation von VSMCs [101]	Arthritis

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
CASP4	TX, ICH-2, Mh1/TX, ICEREL-II, ICE(rel)II	U28014, U28014 (+ U28015)	caspase 4 precursor; ICH-2 protease; apoptosis-related cysteine protease; TX protease; ICE(REL)-II (+ caspase-5 precursor; ICH-3 protease; TY protease; ICE(REL)-III)		Apoptose, 24-C Apoptose
CASP10	MCH4, ICE-LAP4, FLICE2	U60519	caspase-10 precursor; apoptotic protease MCH4; ICE-LIKE apoptotic protease 4; fas-associated death domain protein; interleukin-1- $\beta$ -converting enzyme 2	pro-apoptotisch	24-C Apoptose
CBF2		M37197	CCAAT-box-binding transcription factor		Transkriptionsfaktor
CCNB1	CCNB	M25753	cyclin B1	bildet Komplex mit cdc2, um M-phase promoting factor/ maturation-promotion factor (MPF) zu bilden; zwei unterschiedliche Transkripte beschrieben, eines konstitutiv, eines während G2/M-Phase	Zellzyklus-Kontrolle
CCND1	BCL1, PRAD1, U21B13, D11S287E	M64349, M73554, X59798	cyclin D1; parathyroid adenomatosis 1	bildet Komplexe mit und reguliert CDK4, CDK6; verantwortlich für G1-S-Übergang	Zellzyklus-Kontrolle
CCNE2	CYCE2	AF091433	cyclin E2	interagiert mit CDK2, CDK3; wirkt besonders während G1-Phase	Zellzyklus-Kontrolle
CCNG1	CCNG	X77794	cyclin G1	wird transkriptionell aktiviert von p53	Zellzyklus-Kontrolle
CCNG2		U47414	cyclin G2	wirkt besonders während der S-Phase	Zellzyklus-Kontrolle
CCNH	CAK, p34, p37	U11791	cyclin H; CDK-activating kinase		Zellzyklus-Kontrolle
CCNF	FBX1, FBXO1	Z36714	cyclin F		Zellzyklus-Kontrolle
CCNK	CPR4	AF060515	cyclin K		12-C Zellzyklus
CD44	IN, MC56, MDU2, LHR, MDU3, MIC4, PGP1,	AF098641, M59040, L05424	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system); hyaluronan receptor; phagocytic glycoprotein I; hermes antigen;	fördert Atherosklerose durch Rekrutierung von Makrophagen zu atherosklerotischen Läsionen, VCAM-1-Expression bei SMCs [87]; erhöht bei VSMCs nach Ballon-Dilatation	Arthritis, Atherosklerose, Adhäsion,

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
	ECMR-III		extracellular matrix receptor-III; GP90 lymphocyte homing/adhesion receptor	[123]; Anstieg durch IL-1 $\beta$ bei SMCs der Aorta [88]; vermehrt exprimiert auf Makrophagen des peripheren Bluts bei ReA gegenüber OA [56]; Vernetzung bei RA-Synoviozyten führt zu Fas-vermittelter Apoptose, vermehrter Expression von Fas [124]; führt zu Lymphozyten „rolling“ auf Endothel, Adhäsionsmolekül für Lymphozyten [125]; T-LYmphozyten binden über CD44 an Atemwegsepithelzellen und aktivieren diese [126]	24-C Arthritis
CDC2	CDK1	D88357, X05360	cell division cycle 2	wichtig beim Übergang von G1 nach S und G2 nach M	Zellzyklus-Kontrolle
CDC20	p55CDC	U05340	CDC20 (S. cerevisiae, homolog)		Zellzyklus-Kontrolle, 12-C Zellzyklus
CDC2L5	KIAA1791	M80629	CDC2-related protein kinase CHED; CDC2-like 5		24-C Zellzyklus
CDC7L1	CDC7, Hsk1, HsCDC7, huCDC7	AB003698	CDC7 (cell division cycle 7, S. cerevisiae, homolog)-like 1	Serin/Threonin-Kinase; phosphoryliert Histon H1, Aktivität nimmt während S-Phase zu	Zellzyklus-Kontrolle
CDH13	CDHH	U59289	cadherin 13, H-cadherin (heart)		Adhäsionsmolekül
CDH3	CDHP, HJMD, PCAD	X63629	cadherin 3 (CDH3); placental cadherin precursor (P-cadherin)		24-C Adhäsionsmolekül
CDK4	CMM3, PSK- J3, MGC14458	M14505	cyclin-dependent kinase 4		12-C Zellzyklus
CDK7	CAK1, STK1, CDKN7, p39M015	L20320, X77743	cyclin-dependent kinase 7 (homolog of Xenopus MO15 cdk-activating kinase)	bildet einen trimären Komplex mit Cyclin H und MAT1, der als Cdk-activating kinase (CAK) fungiert; essentielle Komponente des Transkriptionsfaktors TFIIF	Zellzyklus-Kontrolle

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
CDKN1A	P21, CIP1, SDI1, WAF1, CAP20, CDKN1, MDA-6	U03106	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	inhibiert Apoptose, anwesend in atherosklerotischen Plaque, zusammen mit p53 [109]; interagiert mit p53 bei Apoptose und G1-Arrest, inhibiert CDKs [110]; Überexpression reduziert SMC-Proliferation und Restenosis [111]; führt zu Chondrozyten-Differenzierung; wird aktiviert durch ETV4 [96]	Zellzyklus-Kontrolle, Apoptose, Atherosklerose
CDKN1B	KIP1, CDKN4, P27KIP1	A1304854	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	verhindert die Aktivierung von Komplexen aus Cyclin E-CDK2 oder Cyclin D-CDK4; vermittelt TGF- $\beta$ -induzierten G1-Phase-Stopp	Zellzyklus-Kontrolle
CDKN1C	BWS, P57, KIP2	D64137, U22398	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	inhibiert G1-spezifische CDK-Cyclin-Komplexe	Zellzyklus-Kontrolle
CDKN2C	p18, INK4C, p18-INK4C	AF041248	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C	interagiert mit/inhibiert CDK4 oder CDK6, kontrolliert G1-Fortschritt	Zellzyklus-Kontrolle
CDKN3	KAP, CDI1, CIP2, KAP1	L25876	cyclin-dependent kinase inhibitor 3; CDK2-associated dual specificity phosphatase	dephosphoryliert CDK2-Kinase; „dual specificity“ Phosphatase	Zellzyklus-Kontrolle
CEBPB	LAP, TCF5, NFIL6, IL6DBP, NF-IL6	X52560	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), $\beta$		Transkriptionsfaktor
CEBPD	CELF, CRP3	M83667	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), $\delta$		Transkriptionsfaktor
CKS1		AA926959	CDC28 protein kinase 1	bindet und reguliert CDK2-Cyclin A-Komplexe	Zellzyklus-Kontrolle
CLECSF2	AICL, HP10085	X96719	lectin, C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain), superfamily member 2 (activation-induced)	hochreguliert in aktivierten NK-Lymphozyten [127]	Adhäsionsmolekül
CLK1	CLK, STY	M59287	CDC-like kinase1	„dual-specificity“ Kinase	Proteine unterschiedlicher Funktion
CMAR	CAR	X65784	cell matrix adhesion regulator	fördert Adhäsion von Zellen an Komponenten der Extrazellulärmatrix	Extrazellulärmatrix
COL1A1	O14	Y15915	collagen, type I, $\alpha$ 1	Komponente des Typ I-Kollagens; liegt vor in Knorpel, Bindegewebe	Extrazellulärmatrix

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
COL3A1		X14420	collagen, type III, $\alpha$ 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)		Extrazellulärmatrix
COL4A2		X05610	collagen, type IV, $\alpha$ 2		Extrazellulärmatrix
COL4A6		D21337	collagen, type IV, $\alpha$ 6		Extrazellulärmatrix
COL9A3	MED, EDM3, DJ885L7.4.1	L41162	collagen, type IX, $\alpha$ 3		Extrazellulärmatrix
COL16A1		AI982638, M92642	collagen, type XVI, $\alpha$ 1		Extrazellulärmatrix
COP5S	JAB1, SGN5	U65928	jun activation domain binding protein		24-C Transkriptionsfaktor
COPEB	GBF, ZF9, BCD1, CPBP, KLF6	AF001461	core promoter element binding protein	führt zur Expression von urokinase plasminogen activator (uPA), darüber Aktivierung von TGF- $\beta$ 1, wird aktiviert in verletzten Arterien [90], führt zu Expression von TGF- $\beta$ -Rezeptor [128]	Transkriptionsfaktor
CREB1		M34356	cAMP-response element binding protein		24-C Transkriptionsfaktor
CREM		S68134, S68271	cAMP responsive element modulator		Transkriptionsfaktor
CSF1R	FMS, CD115	M33210	colony stimulating factor 1 receptor, gene, exon 5	Rezeptor für M-CSF	Zytokin
CSRP1	CSRP, DIS181E	M33146	cysteine and glycine-rich protein 1	enthält zwei Zinkfinger-LIM-Domänen; könnte beteiligt sein an Genregulation, Zellwachstum und somatischer Differentiation	Proteine unterschiedlicher Funktion
CSRP2	LMO5, (CRP2)	U57646	cysteine and glycine-rich protein 2	könnte beteiligt sein an Zellwachstum; interagiert mit JAK/STAT-Signalweg	Proteine unterschiedlicher Funktion
CTGF	CCN2, NOV2, IGFBP8	X78947	connective tissue growth factor	erhöht in atherosklerotischem Gewebe [76,77]; wird von Fibroblasten, VSMCs sekretiert; inhibiert Wachstum in SMCs der Aorta, Überexpression führt zu Apoptose [75]; wird aktiviert durch TGF- $\beta$ ; CYR61 und CTGF wirken als Adhäsionsmoleküle für Fibroblasten über $\alpha_6\beta_1$ -Integrine, lösen Expression von MMP1 und 3 bei Fibroblasten aus und fördern Aktin-Zytoskelett-Reorganisation [71]; ebenso wirkt	<b>Wachstumsfaktor</b> , Atherosklerose

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
				CTGF als Adhäsionsmolekül für Thrombozyten über $\alpha_{1b}\beta_3$ -Integrine [72], sowie über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine bei Endothelzellen [70,73]; fördert Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten [129]; CTGF wirkt synergistisch bei TGF- $\beta$ , EGF, PDGF, IGF-I, FGF-2, mitogener Effekt bei VSMCs, Fibroblasten, Epithelzellen [74]; chemotaktisch für mikrovaskuläre Endothelzellen, reguliert Expression von Extrazellulärmatrix-Komponenten, angiogene Effekte [69]	
CTNNB1		X87838	catenin, $\beta$ 1 (cadherin-associated protein), 88kD		Adhäsionsmolekül
CTSL		X12451	cathepsin L	lysosomale Cystein(-Thiol)-Protease, spaltet Kollagen und Elastin	Extrazellulärmatrix
CXCR4	HM89, NPYR, LCRI, SDF1R, LESTR, NPY3R, HSY3RR	L06797, D10924	chemokine (C-X-C motif), receptor 4; fusin; stromal cell derived factor 1 receptor; leukocyte-derived seven transmembrane domain receptor	Rezeptor für SDF-1; Hochregulation durch FGF-2, Runterregulation durch TNF- $\alpha$ ; SDF-1/CXCR4 aktiviert MAPK, PI3K-AKT-Signalweg [130], induziert bei Ligandenbindung MMP3-Freisetzung in Chondrozyten bei OA, RA [131]	Zytokine, Arthritis, 24-C Zytokine
CYP11A	P450(SCC), CYP11A1	M14565	mitochondrial cytochrome P450 X1A1 precursor; cholesterol side-chain cleavage enzyme; cholesterol desmolase CYP11A1		24-C unterschiedliche
CYR61	CCN1, GIG1, IGFBP10	Y11307	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	ein „immediate early“ Gen; bindet an Integrin $\alpha_{1b}\beta_3$ , darüber beteiligt an Adhäsion von aktivierten Thrombozyten [72]; CYR61 und CTGF wirken als Adhäsionsmoleküle für Fibroblasten über $\alpha_6\beta_1$ -Integrine, lösen Expression von MMP1 und 3 bei Fibroblasten aus und fördern Aktin-Zytoskelett-Reorganisation [71]; binden an Endothel über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine [70,73]; chemotaktisch für mikrovaskuläre Endothelzellen, reguliert Expression von Extrazellulärmatrix-Komponenten, angiogene Effekte, fördert Chondrozyten-Differenzierung [69]	Wachstumsfaktor



Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
DAF	CR, TC, CD55	M31516	decay accelerating factor for complement (Cromer blood group system)	CD97-Rezeptor; inhibiert die Amplifikation der Komplement-Kaskade; hochreguliert in arthritischen Gelenken bei Chondrozyten [132]; durch TNF- $\alpha$ , VEGF, IFN- $\gamma$ hochreguliert in Endothelzellen (Signalweg über PKC, MAPK p38) [133,134]{Mason, Yarwood, et al. 1999 90 /id}; konnte in artherosklerotischen Plaque nachgewiesen werden [135], aber im Vergleich zu normalen Arterien keine erhöhte Expression [136]	Arthritis
DAP		X76105	death-associated protein	könnte IFN- $\gamma$ -induziert Apoptose vermitteln	Apoptose
DAXX	DAP6, BING2	U26162	death-associated protein 6	aktiviert Apoptose durch JNK-Signalweg; bindet an Fas-Zelloberflächen-Rezeptor	Apoptose
DBP	TAXREB302	D28468	DNA-binding protein TAXREB302; albumin D box-binding protein		24-C unterschiedliche
DCAMKL1	K1AA0369	AB002367	doublecortin and CaM kinase-like 1	Proteinkinase mit doublecortin (DCX)-Domäne; reguliert Mikrotubuli-Polymerisation [137]	Zytoskelett
DED	AATF, CHE-1	U51698	apoptosis antagonizing transcription factor	inhibiert Apoptose	Transkriptionsfaktor, Apoptose
DKK1	SK	AB020315	Homo sapiens Dickkopf-1 (hdkk-1), gene, 3 <sup>rd</sup> , 4 <sup>th</sup> coding region and complete cds.	inhibiert den wnt-Signalweg (wnt-Proteine sind sekretierte Signalproteine)	Wachstumsfaktor
DLK1	FAI, PG2, ZOG, PREF1	U15979	$\delta$ -like 1 homolog (Drosophila); preadipocyte factor (fetal antigen 1)	inhibiert Adipozyten und möglicherweise Neuroendokrine Differentiation; EGF-like Familie	Wachstumsfaktor
DMD	BMD, DXS142, DXS164, DXS230	M18533	dystrophin (muscular dystrophy, Duchenne and Becker types), includes DXS142, DXS164, DXS206, DXS230, DXS239, DXS268, DXS269, DXS270, DXS272	gehört zu Spectrin-Familie, der Membran-assoziierten Zytoskelett-Proteine	Zytoskelett
DNC12		AI986201	dynein, cytoplasmic, intermediate polypeptide 2		Zytoskelett
DR1	NC2	M97388	down-regulator of transcription 1, TBP-binding (negative cofactor 2, $\beta$ subunit)	wirkt als transkriptioneller Repressor, zusammen mit DRAP1; interagiert mit TFIID	Transkriptionsfaktor

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
DUSP1	HVH1, CL100, MKP-1, PTPN10	X68277	dual specificity phosphatase 1		Signaltransduktion
DUSP2	PAC1, PAC-1	L11329	dual specificity phosphatase 2	inaktiviert ERK1, ERK2; lokalisiert im Nukleus	Signaltransduktion
DUSP4	TYP1, HVH2, MKP2, MKP-2	U48807	dual specificity phosphatase 4	inaktiviert ERK1, ERK2, JNK; lokalisiert im Nukleus	Signaltransduktion
DUSP5	HVH3	U15932	dual specificity phosphatase 5	inaktiviert ERK1; lokalisiert im Nukleus	Signaltransduktion
DUSP6	MKP3, MKP-3, PYST1	AB013382	dual specificity phosphatase 6	inaktiviert ERK2; lokalisiert im Zytoplasma	Signaltransduktion
E2F1	RBP3, E2F-1, RBBP3	M96577	PRB-binding protein E2F1; retinoblastoma-binding protein 3		12-C Transkriptionsfaktor
E2F2; ID3	IR21, HEIR-1	AL021154	Homo sapiens DNA sequence from PAC 15005 on chromosome 1p36.13-36.22. Contains the E2F2 gene for transcription factor E2F-2 and the ID3 gene for inhibitor of DNA binding 3 (dominant negative helix-loop-helix protein). Contains ESTs, STSs, GSSs, a CA repeat polymorphism, and genomic markers DIS482 and DIS2838, complete sequence		Transkriptionsfaktor
E2F5	E2F-5	U31556	E2F transcription factor 5, p130-binding	bindet p130; involviert in Zellzyklus-Regulation	Transkriptionsfaktor
EBBP	TRIM16	AF096870	estrogen-responsive B box protein; tripartite motif-containing 16		Hormone
EBI2		L08177	Epstein-Barr virus (EBV) induced gene 2; EBV-induced G protein-coupled receptor 2; lymphocyte-specific G protein-coupled receptor	G-Protein gekoppelter Rezeptor; eng verwandt mit Thrombin-Rezeptor	Proteine unterschiedlicher Funktion

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
EFNA1	B61, ECKLG, EPLG1, LERK1, TNFAIP4	M57730	ephrin-A1; ephrin-related receptor tyrosine kinase ligand 1; tumor necrosis factor, $\alpha$ -induced protein 4	wird aktiviert über MAPK (keine Aktivierung über NF $\kappa$ B) [138]; induziert durch TNF- $\alpha$ ; führt zu Proliferation von Epithelzellen; Ligand von EPHA2	Proteine unterschiedlicher Funktion
EGFL5		AB011542	epidermal growth factor-like-domain, multiple 5		Wachstumsfaktor
EGFR	ERBB	X00588	epidermal growth factor receptor (avian erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog)	aktiviert Phosphatidylinositol- und Ras-Signalweg; beteiligt an Aktin-Reorganisation	Wachstumsfaktor
EGR1	TIS8, NGFI-A, KROX-24, ZIF-268, ETR103	X52541, M62829	early growth response protein 1; transcription factor ETR103	„immediate early“ Gen; führt zu Expression von PDGFA und B, TGF- $\beta$ , FGF-2, LH- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ICAM-1, CD44, TF, uPA, p53 [91]; reguliert MMP-1 hoch in Endothel (Invasivität der Zellen wird erhöht) [92]; wird hochreguliert in geschädigten Gefäßwänden von Arterien [93]; wird hochreguliert in LDLR- $\delta$ -Mäusen bei induzierter Atherosklerose in atherosklerotischen Läsionen [94]; erhöht bei Synovialfibroblasten bei RA, aber bisher nicht nachgewiesen bei ReA [139,140]	<b>Transkriptionsfaktor</b> , Atherosklerose <b>12-C</b> <b>Transkriptionsfaktor</b> <b>24-C</b> <b>Transkriptionsfaktor</b>
EPHA2	ECK	M59371, M36395	ephrin type-A receptor 2 precursor; epithelial cell kinase; tyrosine-protein kinase receptor	könnte pro-apoptotisch sein, p53 bindet in Promotorregion [141]; wirkt ein auf Epithelzell-Entwicklung, Migration und Schrankenfunktion [142]	Apoptose, 24-C Apoptose
EPS15		Z29064	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15		Wachstumsfaktor
ERG1		M21535	ets-related gene transforming protein		24-C Transkriptionsfaktor
ETR101	pip92, Ier2, Chx1	M62831	immediate early protein	„immediate early“ Gen; aktiviert durch FGF, Raf, über Elk1/SRF (MAPK/JNK oder SRE in Promotor) [143,144]	Transkriptionsfaktor 24-C Transkriptionsfaktor
ETS2		AF017257, J04102	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2		Transkriptionsfaktor
ETV4	E1A-F	D12765	ets variant gene 4; E1A enhancer-binding protein	aktiviert CDKNA1 (p21), MMPs (Stromelysin, Typ I Kollagenase, 92 kD Typ IV Kollagenase) [95,96]; wird aktiviert durch hepatocyte growth factor (HGF) [145]	Transkriptionsfaktor

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
ETV5	ERM	X96381	ets variant gene 5		Transkriptionsfaktor
FBN1	FBN, SGS, MASS, MFS1, OCTD	X63556	fibrillin 1 (Marfan syndrome)	strukturelles Protein der Mikrofibrillen des Bindegewebes	Extrazellulärmatrix
FGF2	BFGF, FGFB, HBGH-2	M27968	fibroblast growth factor 2 (basic)	stimuliert Osteoclasten (Knochenresorption), fördert dort Expression von MMP9, Cathepsin K [146]; vermittelt/beeinflusst Fas-regulierte Apoptose in Synoviozyten [147]; erhöht in schwerer RA, gegenüber leichter RA, führt zu Osteoclasten-Neubildung, dadurch Gelenkerstörung [148]; reguliert, aktiviert MMP1, MMP13 [149]; verstärkt Adjuvanz-induzierte RA [150]; induziert uPA in Endothelzellen und Fibroblasten, induziert Expression von Vitronectin/ $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin-Komplexen auf Endothelzellen, mitogene Aktivität bei Fibroblasten [151]; wird hochreguliert durch <i>C. pneumoniae</i> bei SMCs [21]	<b>Wachstumsfaktor</b> , Arthritis
FHL2	DRAL, SLIM3	U29332	four and a half LIM domains 2	p53-responsiv, ektope Expression führt zu Apoptose [152]; Signalübermittler von Rho [153]; Adaptor-Protein für Integrine, interagiert mit IGFBP5 [154]	Signaltransduktion
FN1		M10905, X02761	fibronectin 1		Adhäsionsmolekül
FOS		K00650, V01512	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Teil des heterodimeren Transkriptionsfaktors AP-1	Transkriptionsfaktor
FOXF2	FKHL6, FREAC2	U13220	forkhead box F2; forkhead (Drosophila)-like 6		Transkriptionsfaktor
FRA1	FOSL1	X16707	fos-related antigen 1	gehört zu FOS-Familie, Teil des heterodimeren Transkriptionsfaktors AP-1; FRA1 und FOS führen zu Verminderung der EGRI-Expression [155]; wirkt mit bei Osteoclasten-Neubildung [156]	Transkriptionsfaktor 24-C Transkriptionsfaktor
GADD34	PPP1R15A	U83981	growth arrest and DNA-damage-inducible 34	könnte beteiligt sein an Apoptose; wird hochreguliert bei Stress, Wachstums-Stopp	Zellzyklus-Kontrolle

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
GADD45A	DDIT1, GADD45	M60974	growth arrest and DNA-damage-inducible 45, $\alpha$ ; DNA-damage-inducible transcript 1	interagiert mit PCNA; reagiert auf Umweltbelastungen durch MTK1/MEKK4-Kinasen-vermittelte Aktivierung von p38/JNK-Signalwegen	Signaltransduktion, 24-C Signaltransduktion
GAR22	GAS2L1	Y07846	GAS2-related on chromosome 22; growth arrest-specific 2 like 1		Zellzyklus-Kontrolle
GAS1		L13698	growth arrest-specific 1	blockiert den Übergang von der G0 zur S Phase; interagiert mit p53 [157]; bei Runterregulation in Fibroblasten setzt Proliferation ein [158]	Zellzyklus-Kontrolle
GEM		U10550	GTP-binding protein overexpressed in skeletal muscle; ras-like protein KIR	Ras-Familienmitglied; „immediate early“ Gen; bindet Calmodulin [159]	Signaltransduktion, 24-C Signaltransduktion
GHI, CSH1, GH2, CSH2	J03071		Human growth hormone (GH-1 and GH-2) and chorionic somatomammotropin (CS-1, CS-2 and CS-5) genes, complete cds.		Wachstumsfaktor
GILZ	DIP, DSIPL, TSC-22R	AI635895	glucocorticoid-induced leucine zipper	transkriptioneller Regulator; inhibiert Egr2, Egr3, NF $\kappa$ B, NFAT, AP-1, Fas-Ligand mRNA [160]	Transkriptionsfaktor
GLRX	GRX	X76648	glutaredoxin; Thioltransferase		Proteine unterschiedlicher Funktion, 24-C unterschiedliche
GLUT1		K03195	erythrocyte glucose transporter 1		24-C unterschiedliche
GNAI1		AL049933	guanine nucleotide binding protein (G protein), $\alpha$ inhibiting activity polypeptide 1	Komponente des Pertussis-Toxin-sensitiven heterotrimeren G-Protein-Komplexes	Signaltransduktion
GPR44	CRTH2, FLJ22321, MGC2574	AA195301	G protein-coupled receptor 44; hypothetical protein MGC2574		Proteine unterschiedlicher Funktion
GRB10	RSS, IRBP, KIAA0207	D86962	growth factor receptor-bound protein 10	interagiert mit IGF1R, PDGFRB, EGFR; enthält PH-, SH2-, SH3-Domänen	Wachstumsfaktor
GRN	PCDGF	AF055008	granulin	Wachstumsfaktor für Epithelzellen [161]; aktiviert Cyclin D1 [162]	Wachstumsfaktor

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
GSPT1	GST1, ERF3A, ETF3A	X17644	G1 to S phase transition 1	GTP-bindendes Protein	Zellzyklus-Kontrolle
GSTA1	GTH1	M25627	glutathione S-transferase A1; HA subunit 1; GST-ε		24-C unterschiedliche
GSTM1	GSTM1, GST1, GTH4	X68676, S01719	glutathione S-transferase mu1; HB subunit 4		24-C unterschiedliche
GTF2B		X59268, M76766	general transcription factor IIB		Transkriptionsfaktor
GTF2I		AF015553, U77948	general transcription factor II, i		Transkriptionsfaktor
GTF3A		D32257	general transcription factor IIIA		Transkriptionsfaktor
GTF3C1		U02619	general transcription factor IIIC, polypeptide 1 (α subunit, 220kD)		Transkriptionsfaktor
HASPP28	PAP, PAP1, PDAP1	R98910, U41745	platelet-derived growth factor associated protein	verstärkt die mitogene Wirkung von PDGF-A, schwächt die von PDGF-B	Wachstumsfaktor
HBP17	FGFBP1	M60047	heparin-binding growth factor binding protein	bindet an HBGF-1 und-2, inhibiert deren biologische Funktion	Wachstumsfaktor
HDGF	HMG1L2	D16431	hepatoma-derived growth factor; high-mobility group protein 1-like	bindet Heparin und wirkt als Mitogen für Fibroblasten	Wachstumsfaktor
HIF1A	MOP1, HIF-1ALPHA, HIF1-ALPHA	U22431	hypoxia-inducible factor 1, α subunit	vermittelt transkriptionelle Antworten auf Hypoxia und Dioxin-Signalwirkung; „basic helix-loop-helix“ Transkriptionsfaktor	Transkriptionsfaktor
HINT1	PKCII	U51004	hint protein; protein kinase C inhibitor 1		24-C Signaltransduktion
HMMR	RHAMM	AF032862	hyaluronan-mediated motility receptor	notwendig für Zellbeweglichkeit; führt bei murinen Fibroblasten zu Migration, Transformation und metastatischer Verbreitung	Proteine unterschiedlicher Funktion
HRY	HES1, FLJ20408	L19314	hairy (Drosophila)-homolog	transkriptionaler Repressor der „helix-loop-helix“-Familie	Transkriptionsfaktor

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
HSPA1A	HSPA, HSP70-1	M11717	heat shock 70kD protein 1A	verhindert Abbau von AU-reicher mRNA	Proteine unterschiedlicher Funktion
HSPA1B	HSP70-2	M59830	heat shock 70kD protein 1B		Proteine unterschiedlicher Funktion
HSPA8	HSC70, HSC71, HSP73, HSPA10	W28493, Y00371	heat shock 70kD protein 8		Proteine unterschiedlicher Funktion
HSPCA	HSPN, HSP86, HSPC1, HSPCAL1, HSP90A	X15183, X07270	heat shock 90kD protein 1, $\alpha$		Proteine unterschiedlicher Funktion, 24-C unterschiedliche
HSPCB	HSPC2, D6S182, HSP90- BETA	J04988, M16660, W28616	heat shock 90kD protein 1, $\beta$		Proteine unterschiedlicher Funktion
HSPF1	DNAJB1	D85429, D49547	heat shock 40kD protein 1		Proteine unterschiedlicher Funktion, 24-C unterschiedliche
ICAM1	BB2, CD54	J03132	intercellular adhesion molecule-1 precursor	bindet an Integrine, CD11a/CD18 (LFA-1) und CD113/CD18	24-C Adhäsionsmolekül
ID1		X77956	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein		Transkriptionsfaktor
ID2		M97796	DNA-binding protein inhibitor Id-2	„helix-loop-helix“-Protein	24-C unterschiedliche
ID3	1R21, HEIR-1	AL021154	Homo sapiens DNA sequence from PAC 15005 on chromosome 1p36.13-36.22. Contains the E2F2 gene for transcription factor E2F-2 and the ID3 gene for inhibitor of DNA binding 3 (dominant negative helix-loop-helix protein). Contains ESTs, STSs, GSSs, a CA repeat polymorphism, and genomic markers DIS482 and DIS2838, complete sequence		Transkriptionsfaktor
E2F2					

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
IER3	DIF2, PRG1, DIF-2, GLY96, IEX-1L, IEX1,	S81914, AF039067, AF071596	immediate early response 3; IEX-1L anti-death protein	aktiviert durch NF- $\kappa$ B; hat sowohl pro- als auch anti-apoptotische Effekte, beschleunigt Wachstum von HeLa-Zellen [163,164]; p53 bindet im Promotorbereich [165]	Apoptose, 24-C Apoptose
IF130	GILT, IP30, IP-30, IFI-30	J03909	interferon, $\gamma$ -inducible protein 30		Zytokine
IFITM1	9-27, IFI17, LEU13	J04164	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)		Zytokine
IFITM2		X57351	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)		Zytokine
IFITM3		X57352	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)		Zytokine
IFNGR1	IFNGR	U19247	interferon- $\gamma$ receptor $\alpha$ chain gene, exon 7 and complete cds	kodiert für die Liganden-bindende Kette des heterodimeren IFN-Rezeptors (IFNGR2 kodiert andere Kette.)	Zytokine
IFRD1	PC4	Y10313	interferon-related developmental regulator 1		Zytokine
IFRD2	SMI5, IFNRP, SKMC15	U09585	interferon-related developmental regulator 2		Zytokine
IGF1		X57025	insulin-like growth factor 1 (somatomedia C)	aktiviert Zellproliferation und -differentiation	Wachstumsfaktor
IGFBP3	IBP3	M31159, M35877	insulin-like growth factor-binding protein 3 precursor		Wachstumsfaktor, 24-C Wachstumsfaktor
IGFBP4		M62403, U20982	insulin-like growth factor-binding protein 4		Wachstumsfaktor
IGFBP5	IBP5	L27560	insulin-like growth factor binding protein 5		Wachstumsfaktor
IL-4R	CD124	X52425	interleukin 4 receptor	bildet zusammen mit IL2RG hoch affinen IL4-Rezeptor	Zytokine
IL-6	BSF2, IFNB2	X04430	interleukin 6; interferon, $\beta$ 2	wird aktiviert durch IL-1 über SAPK/JNK [166]; wird induziert durch IL- $\beta$ , IL-17 in Synovialfibroblasten [167]; vermehrt bei RA, gegenüber OA, von Fibroblasten sekretiert [168]; reduziert Knorpelschädigung bei Zymosan-induzierter Arthritis [169]	Zytokine



Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
IL-8	LECT, LUCT, MDNCF, SCYB8, TSG-1	M17017, M28130, Y00787	interleukin 8	aktiviert Lymphozyten; wird aktiviert durch IL-1 über SAPK/JNK [166]; wirkt chemotaktisch auf Monozyten, induziert Adhäsion von Monozyten, aktiviert T-Zellen, stimuliert SMC-Migration und -Proliferation, angiogener Faktor [65]	Zytokine, 24-C Zytokine
IL-11	AGIF	X58377, M57765	interleukin-11; adipogenesis inhibitory factor	wird stimuliert durch TGF- $\beta$ , über AP-1-Weg, IL-1 führt zu Stabilisierung von IL-11-mRNA, führt zu Aktivierung von EGR-1, ZFP36, JunB, MAPK phosphatase 3CH134, beteiligt an Differenzierung verschiedener hämatopoetischer Zellen, führt zu Osteoclasten-Neubildung (Knochenresorption) [170]; vermehrt bei RA, gegenüber OA, von Fibroblasten sekretiert [168]; protektiv in RA: führt bei RA-Synovialfibroblasten zu Inhibition von MMP-1 und -3, hebt Inhibition von TIMP-1 durch TNF- $\alpha$ auf [171]; wird in Chondrozyten, Fibroblasten durch TGF- $\beta$ , IL-1 induziert, führt zu Expression von TIMP-1 [172]	Zytokine, 24-C Zytokine
INSIG1	CL-6	U96876	insulin induced gene 1	hat große Ähnlichkeit mit LOC51141	Hormone
INSL4		L34838	insulin-like 4 (placenta)		Hormone
IRAK1	IRAK, pelle	L76191	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	beteiligt an Hochregulation von NF $\kappa$ B/RelA durch IL-1	Signaltransduktion
IRS1	HIRS-1	S62539	insulin receptor substrate 1		Hormone
ISG15		AA203213, M13755	interferon-stimulated protein, 15 kD	könnte beteiligt sein an Interferon-Signalweiterleitung	Zytokine
ISG20	HEM45	U88964	interferon stimulated gene, 20kD	könnte beteiligt sein an Interferon-Signalweiterleitung, Zellproliferation und Differentiation	Zytokine
ITGA3	CD49C, VLA3A	M59911	integrin, $\alpha$ 3; $\alpha$ 3 subunit of VLA-3 receptor	wirkt als Rezeptor für Collagen, Laminin und Fibronectin	Adhäsionsmolekül
ITGA5	VLA5, CD49E, FNRA	X06256	integrin $\alpha$ 5; fibronectin receptor $\alpha$ subunit		24-C Adhäsionsmolekül
ITGA6		S66213, X53586	integrin, $\alpha$ 6	Laminin-Rezeptor; beteiligt an Zelladhäsion und Zelloberflächen-Signalweiterleitung; interagiert mit ITGB4,	Adhäsionsmolekül

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
ITGB3BP		U37139	integrin $\beta$ 3 binding protein; $\beta$ 3-endonexin	um TSP180-Komplex zu bilden, mit ITGB1, um VLA-6	Adhäsionsmolekül, 24-C Adhäsionsmolekül
ITGB4BP		AF022229	integrin $\beta$ 4 binding protein		Adhäsionsmolekül
ITGB5		M35011, X53002	integrin, $\beta$ 5		Adhäsionsmolekül
JUN		J04111	c-JUN proto-oncogene; v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog	Teil des heterodimeren Transkriptionsfaktors AP-1	Transkriptionsfaktor 24-C Transkriptionsfaktor
JUNB		M29039, X51345	jun B proto-oncogene	Teil des heterodimeren Transkriptionsfaktors AP-1	Transkriptionsfaktor
JUND		X56681	jun D proto-oncogene	Teil des heterodimeren Transkriptionsfaktors AP-1	Transkriptionsfaktor
JUP	DP3, PDGB, PKGB, DPHII, GAMMA- CATENIN	M23410	junction plakoglobin	bindet an Cadherine (CDH1, CDH2, Dsg1); gehört zur Catenin-Familie	Adhäsionsmolekül
KIFC3		AL041493	kinesin family member C3		Zytoskelett
KLF5	CKLF, IKLF, BTB2	D14520	Kruppel-like factor 5 (intestinal); basic transcription element-binding protein 2; GC-box binding protein 2	führt in SMCs zur Aktivierung von PAI-1, iNos, PDGF-A, Egr1, VEGF-R, aktiviert von MEK1, Egr1 durch MAPK [97]; positiver Regulator der Proliferation; Kennzeichen für Proliferation/Differenzierung in SMCs, auch bei durch Ballon-Dilatation verletzten Aorten, höhere Restenose-Rate in KLF5-positiven Patienten [98]; wirkt proliferierend bei Fibroblasten [99]	Transkriptionsfaktor, 24-C Transkriptionsfaktor
KNSL1	EG5, HKSP, TRIP5	U37426	kinesin-like 1	wirkt an Ausbildung der mitotischen Spindel	Zytoskelett
KOC1	IMP-3	U97188	IGF-II mRNA-binding protein 3	könnte IGF-II Translation in später Entwicklungsphase unterdrücken, bindet an 5' UTR der IGF-II leader 3' mRNA	Wachstumsfaktor
KRT10		X14487	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)		Zytoskelett
KRT17		Z19574	keratin 17		Zytoskelett

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
KRT18		M26326	keratin 18		Zytoskelett
KRT7		AJ238246	keratin 7		Zytoskelett
LAMB1		M61916	laminin, $\beta$ 1		Extrazellulärmatrix
LCK	p56-lck, LSK	U07236	proto-oncogene tyrosine-protein kinase lck; lymphocyte-specific protein tyrosine kinase; T-cell-specific protein-tyrosine kinase		24-C Signaltransduktion
LDLR	FH, FHC	L00352	low density lipoprotein receptor gene, exon 18	beteiligt an Cholesterin-Regulation; vermittelt Degradation und Aufnahme von „high density“ Lipoproteinen (HDL)	Proteine unterschiedlicher Funktion
LFA-1	CD11A, CD11a, ITGAL, LFA1A	M15395	leukocyte adhesion glycoprotein LFA-1 $\alpha$ subunit precursor; leucocyte function-associated antigen-1, $\alpha$ subunit	bildet zusammen mit CD18 LFA-1	12-C Adhäsionsmolekül
LIF	CDF, HILDA	X13967, M63420	leukemia inhibitory factor precursor	vermehrt in Synovialflüssigkeit bei RA [173]; vermehrt bei RA, gegenüber OA, von Fibroblasten sekretiert [168]; induziert pro-inflammatorische Zytokine, reguliert Knochen-Neubildung, stimuliert Knorpel-Abbau, Osteoblasten-Differenzierung [66]; zeigt ebenfalls anti-inflammatorische Wirkung; wird induziert durch IL-1 $\beta$ , IL-17 in Synovialfibroblasten [167]	12-C Zytokine 24-C Zytokine
LIG1	DNL1	M36067	DNA ligase I; polydeoxyribonucleotide synthase (ATP)		24-C unterschiedliche
LIMK-1		D26309	LIM domain kinase 1		24-C Signaltransduktion
LMNA		M13452	lamin A/C		Zytoskelett
LMNB1		L37747	lamin B1, gene, exon 11, complete cds		Zytoskelett
LMO1	TTG1, RBTN1, RHOM1	M26682	LIM domain only 1; rhombotin 1	transkriptioneller Regulator; könnte beteiligt sein an Zellwachstum, Differentiation	Transkriptionsfaktor
LMO4		U24576	LIM domain only 4	könnte Zellproliferation regulieren	Transkriptionsfaktor
LNK		AF055581	Ink adaptor protein; lymphocyte adaptor protein	vermittelt Signalweiterleitung bei mehreren Rezeptor; könnte Grb2, Phospholipase C- $\gamma$ 1, und Phosphatidylinositol 3-Kinase	Signaltransduktion, 24-C Signaltransduktion

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
LOC51042		AI582831	zinc finger protein		
LOC51141		AL080184	insulin induced protein 2		Transkriptionsfaktor
LRP8	APOER2, HSZ75190	D86407, Z75190	Homo sapiens DNA for apoER2, complete cds, and exon 19; apolipoprotein E receptor 2	hat große Ähnlichkeit zu INSIG1	Wachstumsfaktor
MAFF; bK447C4.2		AL021977	Human DNA sequence from clone CTA-447C4 on chromosome 22q12.2-13.2 Contains the MAFK gene for v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene family protein F, the last exon of the gene for a novel protein similar to C. elegans F40E10.6, ESTs, an STS, GSSs and two putative CpG islands, complete sequence		Proteine unterschiedlicher Funktion
MAP1ALC 3		W28807	Microtubule-associated proteins 1A and 1B, light chain 3		Zytoskelett
MAP7	EMAP115, E-MAP-115	X73882	microtubule-associated protein 7	stabilisiert Mikrotubuli; könnte bei Ausbildung der Zellpolarität epithelialer Zellen helfen	Zytoskelett
MAP2K3		D87116, L36719	mitogen-activated protein kinase kinase 3	phosphoryliert/aktiviert MAPK p38	Signaltransduktion
MAPK6	ERK3, PRKM6, P97MAPK	X80692	mitogen-activated protein kinase 6	wird aktiviert als Antwort auf Wachstumsfaktoren	Signaltransduktion
MAPKAPK 2		U12779	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2		Signaltransduktion
MAPKAPK 3		U09578	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3		Signaltransduktion
MAZ	PUR1, ZF87	D85131, M94046	MYC-associated zinc finger protein	Purin-bindender Transkriptionsfaktor	Transkriptionsfaktor

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
MCL1	EAT	L08246	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	anti-apoptotisch, vermittelt Effekte von IL-6 [175] und EGF [176]	Apoptose, 24h Array-Clontech
MFAP2	MAGP, MAGP1	U19718	microfibrillar-associated protein 2		Extrazellulärmatrnx
MIP2- $\alpha$	GRO2, SCYB2	M36820, X53799	macrophage inflammatory protein 2 $\alpha$ ; growth-regulated protein $\beta$ (GRO- $\beta$ ); GRO2 oncogene,	chemotaktisch	Zytokine 24-C Zytokine
MLCB		X54304	myosin, light polypeptide, regulatory, non-sarcomeric (20kD)		Zytoskelett
MT1A	(MT1)	K01383	metallothionein 1A (functional)	MT-Synthese wird angeregt durch IL6, IL-11, in geringem Maße LIF, in Zusammenarbeit mit Dexmethason (bei Hepatozyten in arthritischen Ratten) [83]; wirkt protektiv auf Zellen in vielen Stresssituationen [177]	Proteine unterschiedlicher Funktion
MT2A	MT2	AI547258	metallothionein 2A	erhöht in OA in Chondrozyten [82]; wird durch Metallionen, Glucocorticoide induziert	Arthritis
MYBL1	A-MYB	X66087	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1	transkriptioneller Aktivator	Transkriptionsfaktor
MYL1		AI127424	myosin, light polypeptide 1, alkali, skeletal, fast		Zytoskelett
MYO10		AB018342	myosin X		Zytoskelett
MYPT1	PPP1R12A	D87930	myosin phosphatase, target subunit 1	Myosin-bindende Einheit der Phosphatase; reguliert Interaktion von Aktin und Myosin	Zytoskelett
MYRL2		J02854	myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform		Zytoskelett
NAF1	KIAA0113	AJ011896	Nef-associated factor 1	interagiert mit Nef, Nef reguliert CD4 runter, Naf1 hoch [178]; könnte NF $\kappa$ B inhibieren	Proteine unterschiedlicher Funktion
NCOA3	ACTR, CTG26, RAC3, CAGH16, TRAM-1,	AF012108	nuclear receptor coactivator 3	Mitglied der SRC-1-Familie von transkriptionellen Koaktivatoren	Transkriptionsfaktor

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
	TNRC16, TNRC14				
NCOR1	NCOR, TRAC1, KIAA1047, hCIT529110	AF044209	nuclear receptor co-repressor 1; thyroid hormone- and retinoic acid receptor-associated corepressor 1	inhibiert Transkription durch Hormonrezeptoren in Abwesenheit von deren Liganden	Transkriptionsfaktor
NCOR2	SMRT, CTG26, SMRTE, TRAC1, TNRC14	U37146	nuclear receptor co-repressor 2; silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors	interagiert mit Rezeptoren für Retinoid und Thyroid, inhibiert Transkription	Transkriptionsfaktor
NF1	WSS, VRNF	D12625	neurofibromin 1 (neurofibromatosis, von Recklinghausen disease, Watson disease)	Negativer Regulator der RAS-Signaltransduktion	Signaltransduktion
NFIL3	E4BP4, IL3BP1, NFIL3A, NF-IL3A	X64318	nuclear factor, interleukin 3 regulated	bindet im Promotorbereich von IFN- $\gamma$ , IL-3-Genen	Transkriptionsfaktor
NFKB1	KBF1	M58603	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	Teil des heterodimeren Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B	Transkriptionsfaktor
NFKB2	LYT10	S76638, X61498	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	49 kD DNA-bindende Untereinheit des heterodimeren Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B; Komplex reguliert inflammatorische und immunregulatorische Gene	Transkriptionsfaktor
NFKBIA	IKBA, MAD-3, NFKBI	M69043	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, $\alpha$	inhibiert NF $\kappa$ B-Aktivität durch Bindung an Rel-Domänen	Transkriptionsfaktor
NFYB	HAP3, CBF-A, CBF-B, NF-YB	AA621555	nuclear transcription factor Y, $\beta$	Teil des CCAAT-binding protein (NF-Y, CPI)	Transkriptionsfaktor
NFYC	HSM, CBF, HAP5, CBF-C, NF-YC, HITF2A	Z74792	CCAAT transcription binding factor $\gamma$ subunit	Teil des CCAAT-binding protein; trägt bei zur Zellzyklus-abhängigen Regulation von hsp70	12-C Transkriptionsfaktor

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
NOL1	NOP120	X55504	proliferating cell nucleolar antigen P120		Proteine unterschiedlicher Funktion, 12-C unterschiedliche Wachstumsfaktor
NOV	CCN3, IGFBP9	X96584	nephroblastoma overexpressed gene	vermittelt Adhäsion von VSMCs [78]	Wachstumsfaktor
NPAS2	MOP4	U77970	neuronal PAS domain protein 2		Transkriptionsfaktor
NR2F1	EAR3, SVP44, ERBAL3, TFCOUP1, COUP-TFI	X16155	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	Steroid-/Thyroidrezeptor-Familie	Transkriptionsfaktor
NR4A1	HMR, N10, TR3, NP10, GFRP1, NAK-1, NGFIB, NUR77, TIS1	L13740	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Steroidrezeptor-Familie; beteiligt an Thymozyten-Apoptose; Akt inaktiviert NR4A1 durch Phosphorylierung [179]; wird wahrscheinlich aktiviert durch Bindung von Elk/SRF-Komplex an SRE im Promotorbereich [143]; „immediate early“ Gen	Transkriptionsfaktor
NR4A2	NOT, RNR1, HZF-1, NURR1, TINOR, TINUR	S77154, X75918	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	Steroidrezeptor-Familie; aktiviert durch PGE2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ (durch CREB-1, NF $\kappa$ B) und Corticotropin, erhöhte Konzentrationen bei RA, PsA in Synovium [180]; „immediate early“ Gen; wirkt mit bei Fas-abhängiger T-Zell-Apoptose [181];{Huang, Li, et al. 1995 95 /id}	Transkriptionsfaktor
NRAS	N-ras, NRAS1	X02751	N-ras; transforming p21 protein; Ras family member	Mitglied der Ras-Familien	Signaltransduktion 12-C Signaltransduktion
NT5	CD73	X55740	5' nucleotidase	Adhäsionsmolekül für Lymphozyten [182]; Entzündungsmediator, erhöhte Konzentrationen in Synovia von RA Patienten [183] und im Endothel von atherosklerotischen Aorten [89]	Arthritis, Atherosklerose
NTSR1	NTR	X70070	neurotensin receptor 1 (high affinity)	aktiviert MAPK, Egr1 [184]	Hormone

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
P4H1A1		M24486	procollagen-proline; 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), $\alpha$ polypeptide I	katalysiert die Bildung von 4-Hydroxyproline in Kollagenen	Extrazellulärmatrix
P4H1A2		U90441	procollagen-proline; 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), $\alpha$ polypeptide II	katalysiert die Bildung von 4-Hydroxyproline in Kollagenen	Extrazellulärmatrix
PAFAH1B1	LIS1, MDCR, PAFAH	L13385	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, $\alpha$ subunit (45kD)	Untereinheit des zytosolischen, heterotrimeren Enzyms, dass platelet-activating factor inaktiviert	Proteine unterschiedlicher Funktion
PBEF		U02020	pre-B-cell colony-enhancing factor	erhöht die pre-B-Zell-Koloniebildende-Aktivität von stem cell factor (MGF) und Interleukin 7	Zytokine
PCOLCE		L33799	procollagen C-endopeptidase enhancer		Extrazellulärmatrix
PDCD6	ALG-2	AF035606	programmed cell death 6	bindet an Fas	Apoptose
PDE3B		U38178	cGMP-inhibited 3',5'-cyclic phosphodiesterase B		12-C unterschiedliche
PHLDA1	TDAG51, DTIP1B11	Z50194	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	aktiviert durch PKC [185], führt zu Fas-Expression, Apoptose, koppelt TCR und Fas-Expression [186]	Apoptose
PIG7	LITAF, SIMPLE	AF010312, AL120815	LPS-induced TNF- $\alpha$ factor		Transkriptionsfaktor
PLAB	PDF, MIC1, GDF15, NAG-1, PTGFB	AB000584	prostate differentiation factor; macrophage inhibitory cytokine; nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated protein 1	gehört zur TGF- $\beta$ Superfamilie	Zytokine
PLAUR	CD87, UPAR, URKR	U09937	urokinase-type plasminogen receptor, exon 7.	erhöhte Konzentration bei Arthritis, lösliches PLAUR nur erhöht bei RA, nicht ReA [187]; Expression aktiviert durch FGF-2, TNF- $\alpha$ , Endothelin-1, EGF, TGF- $\beta$ 1, PDGF-A, $\alpha$ -Thrombin, Interferon, erhöhte Konzentration in atherosklerotischen Geweben, urokinase plasminogen activator (uPA), ist Serinprotease, die an uPAR bindet, dadurch gerichtete Funktion/Konzentration von uPA möglich, diese baut Extrazellulärmatrix ab, führt zu Migration	<b>Extrazellulärmatrix</b> , Arthritis, Atherosklerose



Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
PLCG1	PLC-II, PLC-148	M34667	phospholipase C $\gamma$ 1; 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase $\gamma$ 1	von Zellen, dadurch auch erhöhte Stenose/Restenose in Arterien [106]	24-C unterschiedliche
PLEC1	PCN, PLTN	U53204, Z54367	plectin 1; intermediate filament binding protein, 500kD	vernetzt Zytoskelett mit der Plasmamembran	Zytoskelett
PLOD2		U84573	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase) 2	katalysiert die Bildung von Hydroxylysin in Collagen	Extrazellulärmatrix
POLE2		AF025840	DNA polymerase $\epsilon$ subunit B; DNA polymerase II subunit B		24-C unterschiedliche
PPL		AF001691	periplakin	Mitglied der Plakin-Familie von Intermediärfilament-assoziierten Proteinen	Zytoskelett
PPM1A	PP2C- $\alpha$	S87759	protein phosphatase 2C $\alpha$ isoform		24-C unterschiedliche
PRKACB		M34181	protein kinase, cAMP-dependent (PKA), catalytic, $\beta$		Signaltransduktion
PRKAR1A	CAR, CNC1, TSE1, PRKAR1	M33336	protein kinase, cAMP-dependent(PKA), type I, $\alpha$ , regulatory subunit (tissue specific extinguisher 1)		Signaltransduktion
PRKAR1B		M65066	cAMP-dependent protein kinase type I $\beta$ , regulatory subunit (PKA)		12-C Signaltransduktion
PRKR	PKR, EIF2AK1	U50648	Human interferon-inducible RNA-dependent protein kinase, gene, exon 17 and complete cds	Apoptose-Induktion, hochreguliert durch Fas, Bax, p53 [188]	Apoptose
PRKRI	P58, HP58, P58IPK, DNAJC3- PENDING, DNAJC3	AI095508	protein-kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent inhibitor; DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	inhibiert die Autophosphorylierung von PKR und der $\alpha$ -Untereinheit von eIF-2	Apoptose

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
PSCD1	B2-1, SEC7, D17S811E, CYTHOSIN-1	M85169	pleckstrin homology; Sec7 and coiled/coil domains 1	beteiligt an Interaktion zwischen ICAM1/LFA1; PIP3-bindend, Rolle in LPS-induzierter Adhärenz bei monozytärer Zelllinie THP1 [189]; beteiligt an Membran-Transport; <i>inside-out signaling</i>	Signaltransduktion
PTGS2	COX2, COX-2, PHS-2, PGG/HS, PGHS-2	U04636	prostaglandin-endoperoxide synthase 2; prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase	Schlüsselenzym in der Prostaglandin-Biosynthese; wird bei entzündliche Reaktionen hochreguliert; aktiviert durch Zytokine, LPS, Wachstumsfaktoren, hat Bindungsstellen im Promotor für NFκB, NF-IL-6, CREB, vasoprotektiv, synthetisiert Prostacyclin, dadurch Inhibition von Thrombozyten-Aggregation, Aktivierung, Leukozytenadhäsion, Akkumulation von Cholesterin in Zellen der Gefäßwand [102]; in LDLR <sup>-/-</sup> Mäusen fördert PTGS2 die Bildung von atherosklerotischen Läsionen [103]; vermehrt exprimiert in atherosklerotischen Läsionen [104]; wird vermehrt exprimiert bei Atemwegsepithelzellen nach Infektion mit <i>C. pneumoniae</i> [17] und in <i>C. pneumoniae</i> -positiven atherosklerotischen Plaque [105]	<b>Hormone</b> , Arthritis, Atherosklerose
PTMS		M24398	parathymosin		Proteine unterschiedlicher Funktion, 12-C unterschiedliche
PTPN13	PNP1, FAP-1, PTPIE, PTPL1, PTPL2, PTP-BAS, PTP-BL	U12128	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 (APO-1/CD95 (Fas)-associated phosphatase); Fas-associated phosphatase-1; protein tyrosine phosphatase 1E; protein tyrosine phosphatase PTPL1	dephosphoryliert Fas-Rezeptor, IκB-α; wahrscheinlich beteiligt an Fas-vermittelter Apoptose; möglicherweise Regulator des Rho-Signalwegs	Signaltransduktion, Apoptose
PURA		M96684	purine-rich single-stranded DNA-binding protein α		24-C unterschiedliche
RAB31	RAB22B	AI189226, U59877	RAB31, member RAS oncogene family	Mitglied der Ras-Familie	Signaltransduktion
RAB5C	RABL, RAB5CL	U18420	RAB5C, member RAS oncogene family	Mitglied der Ras-Familie	Signaltransduktion

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
RAC1	TC-25	D25274, M29870	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; small GTP binding protein Rac1	Mitglied der Rho-Familie	Signaltransduktion
RAGA	FIP-1	U41654	Ras-related GTP-binding protein		Signaltransduktion
RAI3	RAIG1, GPCR5A	AF095448	retinoic acid induced 3	möglicher G-Protein gekoppelter Rezeptor; könnte beteiligt sein an embryonaler Entwicklung und Epithelzell-Differenziation	Proteine unterschiedlicher Funktion
RALA	RAL	M29893	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)	Mitglied der Ras-Familie	Signaltransduktion
RAP1B	K-REV, DKFZp586H0723	AL080212	RAP1B, member of RAS oncogene family	Mitglied der Ras-Familie	Signaltransduktion
RG2	G0S8	L13463	regulator of G-protein signalling 2, 24kD	negative Regulation des G-Protein gekoppelten Signalwegs	Signaltransduktion
ROBO1		AF040990	roundabout 1		24-C unterschiedliche
S100A11	MLN70, S100C	D38583	S100 calcium-binding protein A11; calgizzarin	könnte in Tubulin-Polymerisation, Beweglichkeit, Invasion mitwirken; enthält zwei EF-Hand Calcium-bindende Motive	Zytoskelett
SEMA3A	SEMD, SEMA1, SEMA2, SEMA3, COLL-1, HSEMA-1, SEMAIII	L26081	semaphorin 3A; sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted 3A	Mitglied der Semaphorin-Familie von „chemorepellent“-Proteinen	Proteine unterschiedlicher Funktion
SEMA3C	SEME, SEMAE	AB000220	semaphorin 3C; sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted 3C	Mitglied der Semaphorin-Familie von „chemorepellent“-Proteinen	Proteine unterschiedlicher Funktion
SERPINE1	PAI, PAII, PLANHI	J03764, M14083	plasminogen activator inhibitor type 1, member 1; serine (or cysteine) proteinase inhibitor; clade E; nexin	beteiligt an Thrombusbildung, erhöhte Konzentration in RA, im Gegensatz zu OA-Patienten [190, 191]; Genexpression wird angeregt durch Endotoxin, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , Insulin und weitere Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone, erhöht bei verschiedenen akuten und chronischen CAD [107]; wird vermehrt exprimiert nach Infektion von VSMC mit C.	<b>Extrazellulärmatrix</b> , Arthritis, Atherosklerose

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
SERPINH2	CBP2, HSP47	D83174	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, member 2; clade H; heat shock protein 47; colligin-2	pneumoniae [20], ebenso bei Infektion von Mesothelzellen mit <i>C. trachomatis</i> [58] Kollagen-bindendes Protein, wirkt als Hitzeschock-Protein	Extrazellulärmatrix
SFN		X57348, AF029082	stratifin; 14-3-3 protein sigma; epithelial cell marker protein 1	könnte beteiligt sein an Proteinkinase-Signalweg; hat Ähnlichkeit mit 14-3-3-Proteinen	Signaltransduktion 24-C Signaltransduktion
SGK		Y10032, AJ000512	serum/glucocorticoid-regulated serine/threonine protein kinase		Signaltransduktion, 24-C Signaltransduktion
SHC1	SHC, SHCA	U73377	Src homology 2 domain-containing transforming protein 1	Adaptorprotein, koppelt aktivierte Wachstumsfaktor-Rezeptoren an Signalwege	Signaltransduktion
SLC1A4	SATT, ASCT1	L14595	neutral amino acid transporter A; alanine/serine/cysteine/threonine transporter		Proteine unterschiedlicher Funktion ; 24-C unterschiedliche
SMARCA1	SWI2, SNF2L, SNF2L1, SNF2LB	M88163	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	könnte Transkription über Effekte auf die Chromatinstruktur regulieren	Transkriptionsfaktor
SMARCA4	BRG1, BRG-1, BAF190, SNF2L4, SNF2LB	U29175	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	aktiviert Transkription in Kooperation mit nuklearen Rezeptoren	Transkriptionsfaktor
SNAP-25	SUP	L19761	synaptosomal-associated protein 25; super protein SUP		24-C unterschiedliche
SNK		AF059617	serum-inducible kinase	sehr ähnlich der cytokine-inducible serine/threonine kinase; könnte beteiligt sein an Zellzyklus-Kontrolle	Zellzyklus-Kontrolle
SPTAN1		J05243	spectrin, $\alpha$ , non-erythrocytic 1; $\alpha$ -fodrin	könnte Aktinproteine des Membran-assoziierten Zytoskeletts vernetzen	Zytoskelett
SQMI	NDUFB7, CI-B18	M33374	NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit; complex I-B18; cell adhesion protein SQMI		24-C Adhäsionsmoleküle

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
SREBF1	SREBP1	U00968	sterol regulatory element binding transcription factor 1	aktiviert Gene, die beteiligt sind am Lipidmetabolismus	Transkriptionsfaktor
SRF		J03161	serum response factor; c-fos serum response element-binding transcription factor	bildet Komplex mit Elk1, um dann an SRE in Promotorbereich verschiedener Gene, wie ETR101, NR4A1, zu binden [143]	Transkriptionsfaktor
STAT1	ISGF-3, STAT91	M97935	signal transducer and activator of transcription 1, 91kD		Transkriptionsfaktor
STK15	BTAK	AF011468	serine/threonine kinase 15	Centrosomen-assoziierte Serin/Threonin-Kinase	Proteine unterschiedlicher Funktion
TAF2N	RBP56, TAF15, TAFII68, HTAFII68	U51334	TATA box binding protein (TBP)-associated factor; RNA polymerase II, N, 68kD; RNA-binding protein 56		Transkriptionsfaktor
TAF5L		AF069736	PCAF-associated factor 65 $\beta$		24-C Transkriptionsfaktor
TBCD	KIAA0988	AB023205	tubulin-specific chaperone d		Zytoskelett
TCF3		M31523, M65214	transcription factor 3; E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47		Transkriptionsfaktor
TCF8	BZP, ZEB, AREB6, NIL-2-A	D15050	transcription factor 8	unterdrückt IL-2-Expression in T-Lymphozyten	Transkriptionsfaktor
TCF12	HEB, HTF4	M80627	transcription factor 12; helix-loop-helix transcription factors 4		Transkriptionsfaktor
TCFL5	E2BP-1	AB012124	transcription factor-like 5	„basic helix-loop-helix“ Transkriptionsfaktor	Transkriptionsfaktor
TFAP2		U85658	transcription factor AP-2 $\gamma$ ; activating enhancer-binding protein 2 $\gamma$		Transkriptionsfaktor
TFDP1	DP1, DP-1, DRT1	L23959	transcription factor Dp-1, E2F dimerization partner 1; DRTF1-polypeptide 1	dimerisiert mit E2F; transaktiviert Gene der Zellzyklus-Kontrolle bei G1- zu S-Phase übertritt	Transkriptionsfaktor 12-C Transkriptionsfaktor

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
TGFB1	CED, DPD1, TGFB	M38449	transforming growth factor, $\beta$ 1	reguliert Zellproliferation, Differentiation, und Apoptose	Zytokine
TGFB2	G- TSF	M19154, M22045, M22046, Y00083	transforming growth factor, $\beta$ 2, precursor; glioblastoma –derived T-cell suppressor factor ; bsc-1 cell growth inhibitor; polyergin; cetermin		24-C Wachstumsfaktor
TGM2		M55153	transglutaminase 2, C polypeptide; protein-glutamine- $\gamma$ -glutamyltransferase	könnte beteiligt sein an Signaltransduktion, Apoptose, Knochenneubildung, Wundheilung, Zelladhäsion und Zellausbreitung [192]	Signaltransduktion, Apoptose
TIEG	EGRA, KLF10	AF050110, S81439	transforming growth factor $\beta$ inducible early growth response	transkriptionaler Repressor, gehört zu Sp1-artigen Zinkfinger-Proteinen, hat drei „transcription-repressor sites“ [193]	Transkriptionsfaktor
TIF1B	TRIM28, KAP1, TF1B	X97548	KRAB-associated protein 1	transkriptioneller Regulator; interagiert mit ZNF10	Transkriptionsfaktor
TIMP1	EPA, EPO, HCL, CLGI, TIMP	D11139	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)	inhibiert Typ IV Kollagenasen (MMP2); inhibiert bei B-Zellen CD95-abhängige und –unabhängige Apoptose [194]; erhöht in peripherem Blut bei Atherosklerose, ebenso wie MMP9 [108]	Extrazellulärmatrix, Atherosklerose
TIMP2		U44385, M32304	tissue inhibitor of metalloproteinases-2, (gene, exon 5 and complete cds)	inhibiert MMP2; verringert in peripherem Blut bei Atherosklerose, ebenso wie MMP2 und 3 [108]	Extrazellulärmatrix, Atherosklerose
TM4SF1	L6, M3S1, TAAL6	AI445461, M90657	transmembrane 4 superfamily member 1	verbindet als Adaptor Integrine und PKC [195]	Signaltransduktion
TNFAIP2	B94	M92357	tumor necrosis factor, $\alpha$ -induced protein 2		Apoptose
TNFAIP3	A20, (TNFAIP2?)	M59465	tumor necrosis factor, $\alpha$ -induced protein 3	anti-apoptotisch; interagiert mit IKK- $\alpha$ und $\beta$ , inhibiert NF $\kappa$ B-Aktivierung [196]; inhibiert TNF-induzierte Apoptose [197]; interagiert mit JNK, 14-3-3-Proteinen	Apoptose
TNFRSF1A	TNFR, TNFR1, CD120a, TNF-R-I, FPF, p55	M58286	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	vermittelt proinflammatorische zelluläre Antworten	Zytokine

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
TNFRSF10B	DR5, KILLER, TRICKB, TRAILR2, TRICK2A, TRICK2B, TRAIL-R2	AF016266	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	induziert Apoptose nach Ligandenbindung (TRAIL); bindet an chlamydiales Protein CADD [38]	Apoptose
TNRC3	GDN, CAGH3, ERDA3	AI743134	trinucleotide repeat containing 3	Protease	Transkriptionsfaktor
TOB1	TOB, TROB, TROB1	D38305	transducer of ERBB2, 1	hat anti-proliferative Aktivität; interagiert mit der Rezeptor-Tyrosinkinase ERBB2	Signaltransduktion 24-C Signaltransduktion
TOP1		U07804, U07806	topoisomerase (DNA) I	Inhibition führt zu Apoptose [198]	Proteine unterschiedlicher Funktion
TRIP6	OIP1, ZRP-1	AJ001902	thyroid hormone receptor interactor 6		Hormone
TRIP7	HMG3	AA845349	thyroid hormone receptor interactor 7		Hormone
TRIP15	SGN2, ALIEN, COPS2	AF084260, L40388	thyroid receptor interacting protein 15	Untereinheit des COP9 Signosom-Komplexes; beteiligt an Signaltransduktion	Signaltransduktion
TSC2		X75621	tuberin; tuberous sclerosis 2 protein		24-C Signaltransduktion
TSC22		AJ222700	transforming growth factor $\beta$ -stimulated protein TSC-22		Wachstumsfaktor
TSSC3	IPL, BWR1C, HLDA2, PHLDA2	AF001294, AF035444	tumor suppressing subtransferable candidate 3	hat Ähnlichkeit mit PHLDA1; könnte an Apoptose beteiligt sein	Apoptose
TUBA1	FLJ30169	X06956	tubulin, $\alpha$ 1 (testis specific)	bildet Heterodimere, um Mikrotubuli zu formen	Zytoskelett
TUBA3	FLJ25113, B-ALPHA-1	X01703	tubulin, $\alpha$ 3, brain-specific	bildet Heterodimere, um Mikrotubuli zu formen	Zytoskelett

Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
TUBB		J00314, V00599, X79535	tubulin, $\beta$ polypeptide	bildet Heterodimere, um Mikrotubuli zu formen	Zytoskelett
TUBB2		X02344	tubulin, $\beta$ , 2	bildet Heterodimere, um Mikrotubuli zu formen	Zytoskelett
TUBB4		U47634	tubulin, $\beta$ , 4	bildet Heterodimere, um Mikrotubuli zu formen	Zytoskelett
TUBB5		X00734	tubulin, $\beta$ , 5	bildet Heterodimere, um Mikrotubuli zu formen	Zytoskelett
TUBG1	TUBG	M61764	tubulin, $\gamma$ 1	wichtig bei Mikrotubuli-Organisation	Zytoskelett
UGCG	GCS	D50840	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	hat Rolle bei Differentiation; interagiert mit NF $\kappa$ B, IkK	Signaltransduktion
VDR	NR1I1	J03258	vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor		Transkriptionsfaktor
VEGF	VEGFA, VPF	AF022375, AF024710, M32977, M27281	vascular endothelial growth factor, precursor; vascular permeability factor	erhöhte Konzentration in RA (gegenüber OA), wirkt mitogen auf Endothelzellen [199]; FGF-2 führt zu Expression bei Endothelzellen [200]; fördert Entwicklung von atherosklerotischen Plaques durch Rekrutierung von Monozyten in Rattenmodell [86]; erhöhte Konzentration in Serum bei RA [201]	<b>Wachstumsfaktor</b> , Arthritis, Atherosklerose <b>24-C Wachstumsfaktor</b>
WISP2	CCN5, Ct58, CTGF-L	AF100780	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	beteiligt an Regelung der Knochenerneuerung; wurde in OA-Knorpeln nachgewiesen [202]	Wachstumsfaktor
YWHAB	14-3-3 $\beta$ , (HS1)	X57346	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, $\beta$ polypeptide	interagiert mit ZFP36, BRF2 [120]	Signaltransduktion
YWHAE	14-3-3 $\epsilon$	U54778	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, $\epsilon$ polypeptide	interagiert mit ZFP36, BRF2 [120]	Signaltransduktion
YWHAH	14-3-3 $\eta$ , YWHAI		tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, $\eta$ polypeptide	interagiert mit ZFP36, BRF2 [120]	Signaltransduktion
YWHAQ	14-3-3 $\theta$ , (HS1)	X56468	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, $\theta$ polypeptide	interagiert mit ZFP36, BRF2 [120]	Signaltransduktion



Gen-Abkürzung	Alias	GenBank-Accession	Genname	Zusätzliche Informationen	Verweis auf Tabellen
YWHAZ	14-3-3 zeta	M86400	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	interagiert mit ZFP36, BRF2 [120]	Signaltransduktion
ZFP36	TTP, GOS24, TIS11, NUP475	M92843	zinc finger protein homologous to Zfp-36 in mouse; tristetraproline; growth factor-inducible nuclear protein 475	„immediate early“ Gen; hat Einfluß auf Apoptose, inhibiert in Makrophagen TNF- $\alpha$ -Produktion [203], destabilisiert TNF- $\alpha$ mRNA [204]; interagiert mit 14-3-3-Proteinen [120]	Transkriptionsfaktor 24-C Transkriptionsfaktor
ZFX		X59739	zinc finger protein, X-linked	könnte transkriptioneller Aktivator sein	Transkriptionsfaktor 24-C Transkriptionsfaktor
ZNF9	DM2, CNBP, CNBP1	U19765	zinc finger protein 9 (a cellular retroviral nucleic acid binding protein)	bindet an sterol regulatory element	Transkriptionsfaktor
ZNF143	SBF, STAF	AF071771	zinc finger protein 143 (clone pHZ-1)		Transkriptionsfaktor
ZNF146	OZF	X70394	zinc finger protein 146		Transkriptionsfaktor
ZNF162	ZFM1, SF1, D11S636	L49380	zinc finger protein 162		Transkriptionsfaktor
ZNF259	ZPRI	AF019767	zinc finger protein 259		Transkriptionsfaktor
ZNF261	MYM, DXS6673E, KIAA0385	X95808	zinc finger protein 261		Transkriptionsfaktor

**Tabelle 59: Alphabetische Übersicht der im Ergebnisteil genannten Gene, deren Expression durch Infektion mit Chlamydien beeinflusst wird. Aufgelistet werden Gen-abkürzung, bekannte Synonyme, GenBank-Accession-Nummer, Genname, bekannte Funktionen des Gens und der Verweis auf die Tabelle(n) in denen das Gen im Ergebnisteil der Microarrays genannt wird, wobei die Tabelle, in der die Informationen über die Faktoren der Regulation in den Microarrays genannt wird durch Fettdruck hervorgehoben ist. Die Abkürzungen 12-C bzw. 24-C weisen auf Tabellen mit Ergebnissen hin, die mit Arrays der Firma Clontech 12 Stunden (12-C) bzw. 24 Stunden (24-C) nach Infektion mit *C. trachomatis* erhalten wurden. Alle anderen Tabellenverweise beziehen sich auf Ergebnisse, die mit Arrays der Firma Affimetrix erlangt wurden. Die aufgeführten Funktionen der Gene stammen, so nicht anders angegeben, entweder von den Firmen der verwendeten Arrays (Clontech/BD bzw. Affymetrix) oder wurden aus einer Datenbank des NCBI unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink> entnommen.**



# Lebenslauf

von Simone Heß, geb. 25.09.1972 in Frankfurt am Main

Schulbildung:	1979-1983	Grundschule, Sankt Augustin
	1983-1992	integrierte Gesamtschule, Bonn-Beuel
Schulabschluß:	1992	Abitur
Studium:	10/1992-4/1993	Studium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn im Magisterstudiengang für Geschichte, Anglistik und Germanistik
	seit 10/1993	Studium an der Universität Hannover im Diplomstudiengang Biochemie
	11/1995	Vordiplom
	6/1998	Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Biophysikalische Chemie und Immunologie
	6/1998-12/1998	Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie der MHH mit dem Thema: <i>Chlamydieninduzierte phänotypische Änderungen der Wirtszelle</i>
Studienabschluß:	12/1998	Diplom in der Fachrichtung Biochemie
Promotion:	seit 1/1999	im Rahmen der Promotion angestellt als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Medizinischen Mikrobiologie der MHH, Thema der Dissertation: <i>Untersuchungen zur Chlamydien-Wirtszell-Interaktion</i>



## Verzeichnis eigener Publikationen

### Bisherige Publikationen:

**Hess S**, Rheinheimer C, Tidow F, Bartling G, Kaps C, Lauber J, Buer J, Klos A. The reprogrammed host: Chlamydia trachomatis-induced up-regulation of glycoprotein 130 cytokines, transcription factors, and antiapoptotic genes. *Arthritis Rheum*; **44**:2392-2401 (2001).

### Abstracts:

**Heß S.**, Rheinheimer C., Tidow F., Klos A.: Analysis of Chlamydia-induced host-cell regulation by cDNA arrays. *Proceedings fourth meeting of the european society for chlamydial research*, Helsinki, Finland, August 2000 (Abstract und Poster)

**Hess S.**, Rheinheimer C., Tidow F., Bartling G., Kaps C., Lauber J., Buer J., Klos A.: Host-pathogen interaction analyzed by cDNA-arrays: Upregulation of the cytokines IL-11, LIF and Mip-2alpha in human host cells by the bacterium *C. trachomatis*; Joint annual meeting 2000 of the German and Dutch Societies of Immunology, Düsseldorf, November 2000; veröffentlicht in *Immunobiology*; **203** (1-3): 139 (2001) (Abstract und Poster)

**Hess S.**, Rheinheimer C., Tidow F., Bartling G., Kaps C., Lauber J., Buer J., Klos A.: The reprogrammed host;; *Chlamydia trachomatis*-induced up-regulation of gp 130-cytokines, transcription-factors and anti-apoptotic genes; 53. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Aachen, Oktober 2001; veröffentlicht in *International Journal of Medical Microbiology*; **291**, Suppl. No. 32: V53 (2001) (Abstract und Vortrag)

**Heß S.**, Rheinheimer C., Bartling G.,Dietrich-Kruppa C., Hedge P. Magid-Slav M., Tal-Singer R., Klos A.: Comparative analysis of *C. pneumoniae* and *C. trachomatis* effects on host cell transcriptome; 54. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Heidelberg, Oktober 2002; veröffentlicht in *International Journal of Medical Microbiology*; **292**, Suppl. No. 34: MPV11 (2002) (Abstract und Vortrag)

Kuipers J.G., Schrader S., Bialowons A., Zeidler H., **Hess S.**, Klos A.: *Chlamydia trachomatis* induced gene expression during productive and persistent infection in human monocytes – results of semiquantitative realtime RT-PCR; 66<sup>th</sup> annual scientific meeting of the American College of Rheumatology, New Orleans, Oktober 2002; veröffentlicht in *Arthritis Rheum*; **46** (9), Suppl.: 570 (2002) (Abstract und Vortrag)



## Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Bitter-Suermann für die Möglichkeit danken, diese Arbeit im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Müller möchte ich ganz herzlich für die Übernahme der Doktorvaterschaft danken und dafür, dass er mich durch mein ganzes Studium begleitet hat.

Bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Andreas Klos möchte ich mich für die Unterstützung und die wertvollen Diskussionen und Einfälle bedanken.

Ich danke ganz herzlich den ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Klos (Alexander Akur, Bettina Sohns, Britta Settmacher, Camilla Dietrich, Claudia Rheinheimer, Daniel Bock, Felicitas Tidow, Gerda Bartling, Henning Hamacher, Jan Peters, Katja Endlich, Myriam Schaefer, Stephanie Konrad und unserem Adoptivkind Anja Schlotzhauer) für die gemeinsam verbrachte Zeit, den Teamgeist, die Unterstützung (auch nachts und an den Wochenenden) und den Spaß, den wir zusammen hatten. Dabei möchte ich besonders danken:

Claudia, für ihr umfassendes Wissen, mit dem sie mir häufig weiterhalf.

Gerda, für die tatkräftige und unermüdliche Unterstützung und Camilla für die Chlamydien.

Daniel für die meisterliche Betreuung noch in der Zeit bevor es richtig losging.

Jan, Myriam und Steffi fürs Zuhören und Mitdenken.

Henning für seine aufmunternde Art und Felicitas und Katja für ihre unerschöpfliche Hilfsbereitschaft.

Zusätzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene bedanken, die mich in vielen Punkten unterstützt haben.

Bei Frau Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn und ihrer Arbeitsgruppe möchte ich mich ebenfalls für Hilfestellungen und Beratungen bedanken.

P.D. Dr. Jan Buer und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und die stets freundliche Aufnahme als Gast-Arbeiterin, besonders möchte ich mich hier bei Patricia Gatzlaff für die ausgesprochene Hilfsbereitschaft und bei Dr. Jörg Lauber für die Hilfestellungen bei der Durchführung und Primär-Auswertung von Clontech Microarrays bedanken.

Dr. Christian Kaps möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die zur Verfügung gestellten Zellen danken.

Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Firma GlaxoSmithKline danke ich für eine gute Zusammenarbeit, besondere Dank gilt dabei Ruth Thal-Singer, Priti Hedge und Michal Maghid-Slav, sowie Bob Ames, ohne den es wahrscheinlich kein gemeinsames Projekt gegeben hätte.

Meiner Familie möchte ich für die jahrelange liebevolle Unterstützung danken. Ebenfalls möchte ich der Familie Schaffrath für ihre Unterstützung danken.

Besonderer Dank gilt Niklas Schaffrath, der mir die ganze Zeit zur Seite stand, mir fast immer zuhörte, meine Arbeit kritisch mit mir diskutierte, Microsoftprobleme löste, auf viel freie Zeit verzichtete und mich immer wieder aufgemuntert hat.





## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Untersuchungen zur Chlamydien-Wirtszell-Interaktion" selbständig verfasst, sowie alle benutzten Hilfsmittel und Institutionen vollständig angegeben habe. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, Oktober 2002

(Simone Heß)



