

# Wirtszellantworten auf intrazelluläre Bakterien:

Chlamydiale Persistenz und vergleichende Analyse

von

*S. typhimurium* zu Chlamydien in der produktiven Infektion

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Jan Peters

geboren am 22.02.1976 in Hannover

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Koreferent: Prof. Dr. A. Klos

Tag der Promotion: 01. Dezember 2004

*„Es gibt nur eine Landstraße der Wissenschaft,  
und nur diejenigen haben Aussicht ihren hellen Gipfel zu erreichen,  
die die Ermüdung beim Erklettern ihrer steilen Pfade nicht  
scheuen.“*

(Karl Marx, 1818 – 1883)



## Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurden drei Aspekte der Interaktion von intrazellulären Chlamydien und Salmonellen mit ihren Wirtszellen untersucht.

Der erste und wichtigste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der chlamydialen Persistenz. Chlamydien sind humanpathogene, obligat intrazelluläre Bakterien mit einem biphasischem Entwicklungszyklus. Neben den extrazellulären Elementar- und den intrazellulären Retikularkörperchen gibt es jedoch eine weitere intrazelluläre, persistierende Form.

Chlamydien führen bei der produktiven Infektion innerhalb der Wirtszelle zu Veränderungen der Genregulation. Dies besonders bei Genen mit Schlüsselfunktionen in der Zelle oder für die bereits eine Beteiligung an Chlamydien-assoziierten, chronischen Erkrankungen, wie reaktiver Arthritis oder Atherosklerose, beschrieben worden ist. Bei diesen Erkrankungen spielt die chronisch persistierende Infektion eine wesentlichere Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten in HeLa-Zellen drei weit verbreitete Persistenzmodelle für die Analyse von Wirtszellantworten optimiert werden: Der Eisenentzug mittels Deferoxamin Mesylat (DAM), IFN- $\gamma$  und Penicillin G-induzierte Persistenz. Die Messung ausgewählter Wirtszellgene sollte klären, welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei der Veränderung der Genregulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei produktiver und persistierender Infektion vorliegen. Die Optimierung erlaubte bei *C. trachomatis* in allen Modellen eine Analyse der Wirtszell-Antworten bis 4 Tage und bei *C. pneumoniae* mit hoher Multiplicity of Infection (MOI 30) bis 7 Tage. Die Untersuchung der Wirtszell-Genexpression offenbarte zu späteren Zeitpunkten nach *C. pneumoniae* Infektion bei IFN- $\gamma$  und Penicillin G induzierter Persistenz eine Stummschaltung, bei Eisenentzug kam es jedoch überwiegend zu einer Daueraktivierung der Wirtsgene. Die unterschiedlichen Expressionsmuster in der Wirtszelle bei den einzelnen Persistenzmodellen könnten auf verschiedene *in vivo* Situationen hindeuten.

Ein weiterer Teil beschäftigte sich mit der Interaktion von Salmonellen und ihren Wirtszellen. Salmonellen sind fakultativ intrazelluläre Erreger, die zu Infektionen des Gastrointestinal-Traktes führen. Sie besitzen, im Gegensatz zu anderen gramnegativen Bakterien, zwei TypIII-Sekretionsapparate, die auf zwei verschiedenen Pathogenitätsinseln (SPI1 und SPI2) lokalisiert sind. Der Vergleich der Wirtszell-Expressionsprofile nach Infektion mit Chlamydien und den phylogenetisch entfernten Salmonellen sollte klären, ob es sich um Chlamydien-spezifische Veränderungen handelt oder diese allgemeine Reaktionen der Wirtszelle auf intrazelluläre Bakterien darstellen.

Von den untersuchten Genen wurden nur die Zytokine IL-6, IL-8 und Mip-2 $\alpha$  auch durch intrazelluläre Salmonellen induziert. Sie stellen somit allgemeinere Reaktionen der Wirtszellen gegenüber intrazellulären Pathogenen dar.

Wegen stark unterschiedlicher intrazellulärer Wachstumsraten konnte eine vergleichende Analyse der Wirtszell-Genexpression von Wildtyp und SPI2-*Knock-Out*-Mutante infizierten HeLa-Zellen mittels Micro-Arrays zur Untersuchung TypIII-Sekretionsapparat abhängiger Regulationen nur 4 h nach Infektion durchgeführt werden. Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch keine Wirtszell-Gene beim Wildtyp und der SPI2-Mutanten unterschiedlich reguliert.

Im letzten Teil wurde das chlamydiale putative Toxin CT166 untersucht. CT166 besitzt wie das Zytoskelett verändernde Toxin B von *C. difficile* ein Protein-Motiv für eine Glykosyltransferase. Es sollte überprüft werden, ob CT166 wie das chlostridiale Toxin, zur Zytoskelett-Änderung führt. Die Expression von CT166 in HeLa-Zellen verursachte bereits zu frühen Zeitpunkten nach Transfektion ein Abrunden der Zellen, wie es bei Toxin B beobachtet wurde.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die mögliche Bedeutung der chlamydialen Persistenz bei wichtigen chronischen Erkrankungen wie der Atherosklerose und veranschaulicht den weitreichenden, Erreger-abhängigen Einfluss von intrazellulären Chlamydien und Salmonellen auf ihre Wirtszellen.



## **Abstract:**

In this thesis, three aspects of the interaction between intracellular chlamydia and salmonella were under investigation.

The first and major part focussed on chlamydial persistence. Chlamydia are humanpathogenic, obligate intracellular bacteria with a bi-phasic life-cycle. Beside of the extracellular elementary and intracellular reticulate body, there is an additional intracellular, persistent form. During productive infection, chlamydia induces changes in host-cell gene regulation. These genes have key functions in the cell or participate in chlamydia-associated, chronic disease like reactive arthritis or atherosclerosis.

In this project, three common used persistence models were optimised in HeLa-cells for the analysis of host-cell reactions: Iron-depletion with deferoxamin mesylate (DAM), and further IFN- $\gamma$  and Penicillin G induced persistence. Measurements of selected host-cell genes should show which similarities and differences in changes of gene regulation exist between productive and persistent infection at different time points.

The optimization of the models allowed the analysis of host-cell responses for 4 days with *C. trachomatis*, or 7 days with *C. pneumoniae* using a high multiplicity of infection, respectively. The investigation of host-cell gene expression demonstrates the silencing of the genes during the late phase of IFN- $\gamma$  and Penicillin G induced persistence, and, in contrast to that, a long-lasting activation in iron-deficiency. These different expression patterns in the persistence models could indicate different *in vivo* situations.

Another part focussed on salmonella host-cell interaction. Salmonella are facultative intracellular bacteria which infect the gastro-intestinal tract. In contrast to other gram-negative bacteria, they possess two typeIII secretion systems on different pathogenicity islands (SPI1 and SPI2).

The comparison of the host-cell expression profiles after infection with chlamydia and the phylogenetically distant salmonella should clarify, whether the chlamydia-induced changes are chlamydia-specific or demonstrate common responses of the host-cell on intracellular bacteria. Only the cytokines IL-6, IL-8 and Mip-2 $\alpha$  showed also a salmonella-induced strong expression. They seem to be part of a more common reaction of the host-cell to intracellular pathogens.

Due to different intracellular growth-rates, the comparison of typeIII secretion system dependent gene expression of infected host-cells with wild type and SPI2-*knock-out* mutant was only possible until 4 h pi. However, at this time point, no host-cell genes were expressed differently.

In the last part, the chlamydial putative toxin CT166 was investigated. Like the cytoskeleton manipulating Toxin B of *C. difficile*, CT166 contains a protein-motif for a glycosyl-transferase.

Analysis should show whether CT166 like the chlostridial toxin induces cytoskeleton changes. The expression of CT166 in HeLa-cells causes the rounding of cells at early time points after transfection, as seen with Toxin B.

In this paper, the possible importance of chlamydial persistence in chronic diseases like atherosclerosis, and the far reaching pathogen-dependent influence of intracellular chlamydia and salmonella on their host-cells were demonstrated.



**Schlagworte:**

Chlamydien; Persistenz; Salmonellen

**Keywords:**

Chlamydia; persistence; Salmonella



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Die Ordnung der Chlamydiales</b>	<b>1</b>
1.1.1	Taxonomie	2
1.1.2	Molekularbiologie	3
1.1.3	Entwicklungszyklus	4
1.1.4	Die chlamydiale Persistenz	6
1.1.5	Pathogenese von Chlamydien	10
1.1.6	Wechselwirkung mit Wirtszellen	12
1.2	<b>Salmonellaceae</b>	<b>14</b>
1.2.1	Taxonomie	15
1.2.2	Molekularbiologie	15
1.2.3	Pathogenese	15
1.2.4	Der TypIII-Sekretionsapparat	16
1.3	<b>Zielsetzung</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>21</b>
2.1	<b>Geräte</b>	<b>21</b>
2.2	<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>22</b>
2.3	<b>Chemikalien</b>	<b>23</b>
2.4	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>24</b>
2.5	<b>Enzyme und Kits</b>	<b>26</b>
2.5.1	Primer	28
2.5.2	Vektoren	31
2.6	<b>Eukaryontische Zelllinien und Zellmedien</b>	<b>32</b>
2.7	<b>Bakterien</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>35</b>
3.1	<b>Molekularbiologische Methode</b>	<b>35</b>
3.1.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
3.1.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	35
3.1.3	Präzipitation von Nukleinsäuren	36
3.1.4	Agarosegelelektrophorese	37
3.1.5	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	38
3.1.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	38
3.1.7	Klonierung	40
3.1.8	TOPO-Cloning <sup>TM</sup>	43
3.1.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	44
3.1.10	Isolierung von genomischer DNA	45
3.1.11	Nachweis von Mykoplasmen	45
3.1.12	Molekularbiologische Unterscheidung einzelner C. trachomatis Biovare/Serovare	46
3.1.13	Arbeiten mit RNA	46
3.1.14	Isolierung von RNA aus adhärennten Zellen	47
3.1.15	Denaturierende RNA-Agarosegele	47
3.1.16	cDNA-Synthese	48
3.1.17	Verwendung von (cDNA-)Micro-Arrays	49
3.1.18	Real-Time RT-PCR	50
3.2	<b>Zell- und immunbiologische Methoden</b>	<b>54</b>
3.2.1	Kultivierung von eukaryonten Zellen	54
3.2.2	Präparation von primären humanen Monozyten	55
3.2.3	Bestimmung der Zellzahl und Überprüfung der Vitalität der Zellen	55
3.2.4	Entfernung von Mykoplasmen aus Zellkulturen	56
3.2.5	Gewinnung von Zellkulturproben zur Überprüfung auf Mykoplasmen-Kontamination	56

3.2.6	Transiente Transfektion von humanen Zelllinien	56
3.2.7	Zytoskelett-Färbung	59
3.2.8	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	60
<b>3.3</b>	<b>Methoden zum Arbeiten mit Chlamydien und Salmonellen</b>	<b>61</b>
3.3.2	Chlamydien	62
3.3.3	Salmonellen	66
3.3.4	Chlamydiale Persistenzmodelle	68
3.3.5	Fishers Exakter Test	70
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss persistierender Chlamydien auf ihre Wirtszellen</b>	<b>71</b>
4.1.1	Optimierung der Persistenzmodelle für <i>C. trachomatis</i> D/UW-3Cx in humanen epithelialen Zellen	72
4.1.2	Etablierung der Erzeugung von Persistenz bei <i>C. pneumoniae</i> mit hoher Bakterienzahl	79
4.1.3	Reaktivierung von persistierenden <i>C. pneumoniae</i> im IFN- $\gamma$ Modell durch Eisen	82
4.1.4	Reaktivierbarkeit von persistierenden <i>C. pneumoniae</i> im IFN- $\gamma$ Modell	83
4.1.5	Wirtszell-Antworten bei persistierenden und reaktivierten <i>C. pneumoniae</i>	87
<b>4.2</b>	<b>Einfluss intrazellulärer <i>S. typhimurium</i> auf HeLa-Zellen</b>	<b>100</b>
4.2.1	Etablierung der Infektion von HeLa-Zellen mit <i>S. typhimurium</i>	100
4.2.2	Affymetrix-Array intrazellulärer Salmonellen zur Analyse der Einflüsse unterschiedlicher TypIII-Apparate auf die Wirtszellen	112
4.2.3	Kinetik der IL-6 Gen-Expression nach Salmonellen-Infektion	114
4.2.4	Einfluss intrazellulärer <i>S. typhimurium</i> wt auf die Wirtszell-Genexpression	115
4.2.5	Indirekter Einfluss von <i>S. typhimurium</i> wt und Chlamydien infizierten Zellen auf nicht-infizierte Zellen	119
<b>4.3</b>	<b>Einfluss intrazellulärer <i>S. typhimurium</i> und <i>C. trachomatis</i> D auf ihre Wirtszellen mittels Effektorproteine oder Toxine</b>	<b>121</b>
4.3.1	Klonierung von Salmonella- Effektorproteinen und dem putativen Toxin CT166 aus <i>C. trachomatis</i> D und E	123
4.3.2	Klonierung des Effektorproteins SopE und dem putativen Toxin CT166 in einen IRES-Vektor	125
4.3.3	Effekt von SopE und CT166 auf HeLa-Zellen zu frühen Zeitpunkten nach Transfektion	126
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>129</b>
<b>5.1</b>	<b>Persistenz</b>	<b>129</b>
5.1.1	Optimierung von Persistenzmodellen bei Chlamydien	130
5.1.2	Zeitlicher Verlauf der Wirtszell-Genexpression bei <i>C. pneumoniae</i> Persistenz	132
5.1.3	Vitalität von Wirtszellen und Chlamydien	135
5.1.4	Verwendung von primären Zellen und Wechsel in ein Mausmodell	136
<b>5.2</b>	<b>Salmonella-Wirtszell Interaktion</b>	<b>138</b>
5.2.1	Aufbau des Salmonellen-Infektionsmodells	139
5.2.2	DNA-Micro-Array Analyse zur Identifikation von TypIII-Apparat-abhängigen Veränderungen der Wirtszell-Genexpression	140
5.2.3	Optimierungsmöglichkeiten der Micro-Array Analyse	142
5.2.4	Darstellungsmöglichkeiten der veränderten Wirtszell-Genexpression	142
5.2.5	Vergleich der Wirtszell-Genexpression bei Chlamydien und Salmonellen	143
<b>5.3</b>	<b>CT166</b>	<b>145</b>
5.3.1	Einfluss von CT166 auf eukaryonte Zellen	145
<b>Literatur</b>		<b>147</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>		<b>163</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>		<b>165</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>167</b>

<b>6 Anhang</b>	<b>169</b>
<b>Primer im CT166-Bereich</b>	<b>169</b>
<b>Generierte Plasmide</b>	<b>170</b>
<b>Zytokin-Sekretion bei persistierender Infektion (2.unabhängiges Experiment)</b>	<b>176</b>
<b>Zytokin-Sekretion nach Reaktivierung (2.unabhängiges Experiment)</b>	<b>178</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>181</b>
<b>Verzeichnis eigener Publikationen</b>	<b>183</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>187</b>



# 1 Einleitung

Im Rahmen dieser Dissertation soll die Wechselwirkung von intrazellulären Erregern mit ihren Wirtszellen untersucht werden. Schwerpunkt der Arbeit bildete die Optimierung von Persistenzmodellen und die Analyse der Genexpression Chlamydien-infizierter Zellen während der Persistenz. Des Weiteren wurde die Genexpression von Wirtszellen nach Infektion mit *S. typhimurium* untersucht und mit Chlamydien-induzierten Veränderungen der Expression verglichen.

Die Kochschen Postulate bildeten über Jahrzehnte die Grundlage zur eindeutigen Bestimmung der Verursacher bakteriell bedingter Krankheiten. Durch neue diagnostische Verfahren und Untersuchungsmöglichkeiten sowie epidemiologische Studien konnte auch bei Krankheiten, denen man lange Zeit nicht-mikrobielle Ursachen (wie Autoimmunität) zugeschrieben hatte, bakterielle Erreger als Verursacher nachgewiesen werden, die die Kochschen Postulate nicht erfüllten. Analog könnte dies auch bei Chlamydien der Fall sein. Deren Anwesenheit konnte bei Erkrankungen wie Arthritis, Atherosklerose, Multiple Sklerose und anderen Krankheiten gezeigt werden. Allerdings ist noch unklar, ob hier tatsächlich ein kausaler Zusammenhang besteht.

Bei vielen Erregern ist es möglich, Pathogenitätsfaktoren zu identifizieren, indem Gene gezielt verändert oder entfernt werden. Die Auswirkung der Mutation auf das Bakterium sowie die veränderte Wechselwirkung der Mutanten mit der Wirtszelle können im Anschluss analysiert werden. Durch Rekonstitution des ursprünglichen Gens lassen sich die eingetretenen Veränderungen zweifelsfrei auf das manipulierte Gen zurückführen.

Leider ist dies bei Chlamydien noch nicht möglich, da sich diese nicht gezielt genetisch manipulieren lassen. Um trotzdem Einblick in die Wirk- und Pathomechanismen von Chlamydien zu erhalten, sind in diesem Projekt die durch Chlamydien induzierten Veränderungen in den infizierten Wirtszellen in den Mittelpunkt der Untersuchungen gestellt worden. Dazu wurden bereits breite Analysen zur Genexpression nach chlamydialer Infektion während des *produktiven* Entwicklungszyklus der Chlamydien durchgeführt. Es wurde dabei eine veränderte Expression bei Genen gefunden, die eine Schlüsselfunktion in den Zellen besitzen oder die mit chlamydien-induzierten Krankheiten, wie der Arthritis oder Atherosklerose im Zusammenhang stehen.

## 1.1 Die Ordnung der Chlamydiales

Bei Chlamydien handelt es sich um obligat intrazelluläre, gramnegative Bakterien, die sich ebenso wie Viren ausschließlich in Wirtszellen vermehren können. Während ihres Entwicklungszyklus kommen sie in zwei morphologisch unterscheidbaren Formen vor: als

Elementarkörperchen (EK) und als intrazelluläres Retikularkörperchen (RK). Neben diesen beiden Hauptformen wurde eine dritte, persistierende Form entdeckt.

Chlamydien gehören zu den beim Menschen am häufigsten vorkommenden Bakterien. Sie lösen primär Erkrankungen der Schleimhäute im Augen-, Atemwegs- und Genitalbereich, mit teilweise schwerwiegenden Folgen wie Erblindung oder Unfruchtbarkeit, aus. Mittlerweile wird eine kausale Beteiligung der Chlamydien bei weiteren Erkrankungen, wie Arthritis, Atherosklerose, Alzheimer Krankheit und Multipler Sklerose, aus gutem Grund diskutiert. Dabei steht gerade die chronisch persistierende Infektion der Chlamydien im Mittelpunkt dieser Überlegungen.

### 1.1.1 Taxonomie

Chlamydien wurden 1907 das erste Mal von Halberstaedter und Prowazek beschrieben. Schon zu diesem Zeitpunkt konnten die beiden Entwicklungsformen, Elementar- und Retikularkörperchen, voneinander unterschieden werden [1]. Aufgrund ihrer geringen Größe und der Unfähigkeit, sich isoliert im Nährmedium zu vermehren, wurden sie jedoch als Viren eingestuft. Im Jahre 1966 wurden sie dann einer eigenen Ordnung, den *Chlamydiales*, zugeordnet [2]. Heute werden sie in die Gruppe der Eubakterien eingeordnet [3], sind aber mit anderen Vertretern dieser Gruppe nur entfernt verwandt. Die *Chlamydiales* wurden lange Zeit nur in eine Familie, die *Chlamydiaceae*, mit dem Genus *Chlamydia* unterteilt. Durch verbesserte molekularbiologische Techniken konnten durch phylogenetische Studien der 16S und 23S rRNA viele neue verwandte Stämme identifiziert werden. Dies führte 1999 zu einer überarbeiteten Taxonomie durch Everett et al. und Rurangirwa et al. [4;5].

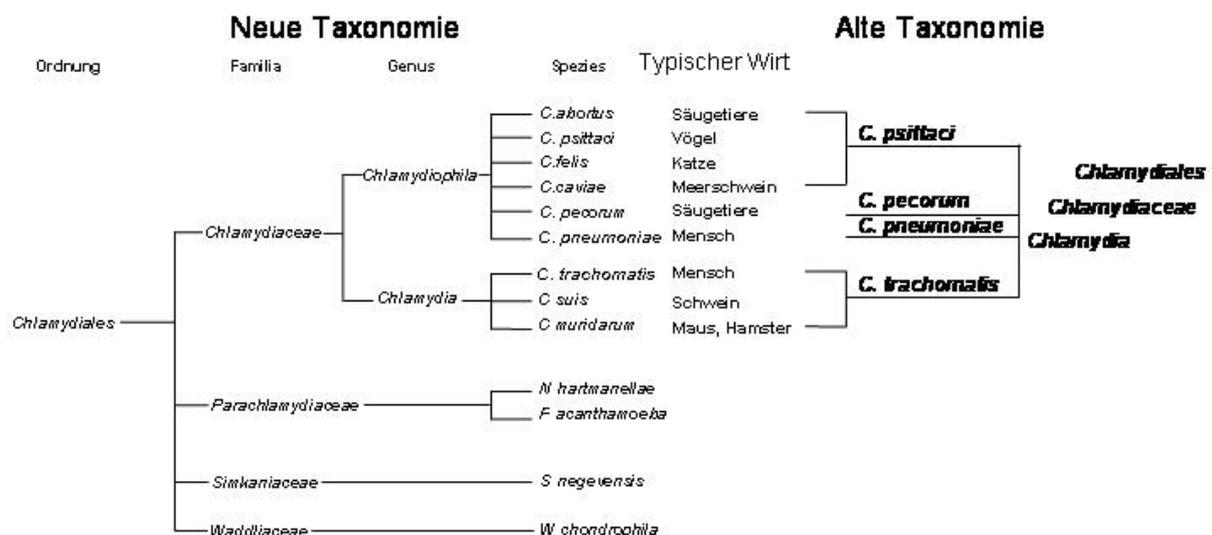


Abbildung 1.1 Taxonomie der Ordnung *Chlamydiales*

Die Ordnung der *Chlamydiales* wird nun in vier Familien unterteilt: *Waddliaceae*, *Simkaniaceae*, *Parachlamydiaceae* und *Chlamydiaceae*. Letztere wird in die Genera *Chlamydia* und *Chlamydophila* aufgesplittet und enthält als einzige humanpathogene Chlamydien. Die *Chlamydophila* gliedern sich in sechs Spezies von denen hauptsächlich *C. pneumoniae* Erkrankungen bei Menschen hervorruft. *C. abortus* und *C. psittaci* können jedoch auch auf den Menschen übertragen werden. Den *Chlamydia* werden drei Spezies zugeordnet: die humanpathogenen *C. trachomatis*, die schweinepathogenen *C. suis* und die mauspathogenen *C. muridarum* (ehemals *C. trachomatis* Maus Pneumonitis).

*C. trachomatis* wird in die Biovarianten (Biovar) Trachoma mit 14 Serovarianten (Serovare) und Lymphogranuloma venereum (LGV) mit 4 Serovaren unterteilt. Abgesehen von Genus-spezifischen Antigenen auf dem chlamydialen Lipopolysaccharid (LPS) sind die wichtigsten Serovar-, Subspezies- und Spezies-spezifischen Antigene alle auf das *major outer membrane protein* (MOMP) zurück zuführen [6].

### 1.1.2 Molekularbiologie

[7;8]

Mehrere Chlamydien-Isolate sind bereits sequenziert und annotiert worden, unter anderem die in der Arbeit verwendeten Stämme *C. pneumoniae* CWL029, *C. trachomatis* D/UW-3Cx und *C. trachomatis* L2/434/Bu (nur sequenziert). Die Sequenzdaten können unter <http://chlamydia-www.berkeley.edu:4231/> abgerufen werden. Für *C. pneumoniae* wurde ein Genom mit  $1,23 \times 10^6$  bp und 1073 möglichen kodierenden Sequenzen ermittelt. *C. trachomatis* D besitzt eine Genomgröße von  $1,04 \times 10^6$  bp mit 894 möglichen kodierenden Bereichen. Die Genomgröße der Chlamydien liegt nur wenig über der von Mykoplasmen, den kleinsten Prokaryonten ( $5,8 \cdot 10^5$  bp). Im Vergleich der möglichen kodierenden Sequenzen bei *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* zeigen etwa 80% ein Ortholog in der jeweils anderen Spezies. Dabei fanden sich 74 ORFs bei *C. trachomatis* ohne Entsprechung in *C. pneumoniae*, im umgekehrten Fall waren es sogar 241 ORFs. Wahrscheinlich ist die unterschiedliche Pathogenese der beiden Spezies auf diese Gene zurück zuführen.

Neben dem Chromosom besitzen die meisten *C. trachomatis* Stämme zusätzlich ein etwa 7,5 kb großes Plasmid. Da einige humanpathogene Stämme von *C. trachomatis* existieren, die dieses Plasmid nicht besitzen [9], scheint es weder für Wachstum noch für Pathogenität notwendig zu sein.

Die Genome von *C. trachomatis* D und L2 sind in großen Teilen identisch, wobei sich einige wenige Abschnitte jedoch nur in einem der beiden Genome finden lassen. Dies ist zum Beispiel im Genom von *C. trachomatis* D bei den Genen CT165, CT166 und CT167 der Fall, wo im homologen Bereich vom Serovar L2 eine Deletion vorhanden ist (Abbildung 1.2).

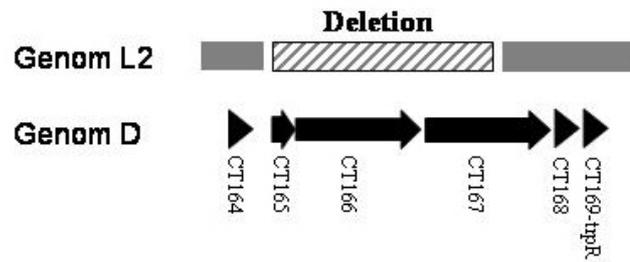


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des CT166-Bereiches bei *C. trachomatis* D und L2

Sowohl *C. trachomatis* als auch *C. pneumoniae* besitzen Gene in ihrem Genom, die homolog zu Genen von Komponenten des TypIII-Sekretionsapparates bei anderen Bakterien sind [10]. Große Ähnlichkeit besteht dabei zu Genen des TypIII-Sekretionsapparates von *S. typhimurium*. Überraschend war bei den Chlamydien, dass diese Gene nicht wie bei anderen gramnegativen Bakterien in einem Cluster vorliegen sondern in drei separaten Clustern lokalisiert sind. Elektronenmikroskopische Aufnahmen haben *spike*-ähnliche Oberflächenstrukturen gezeigt, die die Membran der Einschlusskörperchen durchspannen. Näheres zum TypIII-Apparat ist unter 1.2.4 beschrieben.

Die Identifikation möglicher Effektorproteine des chlamydialen TypIII-Sekretionsapparates und deren Wirkung auf die Wirtszellen ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

### 1.1.3 Entwicklungszyklus

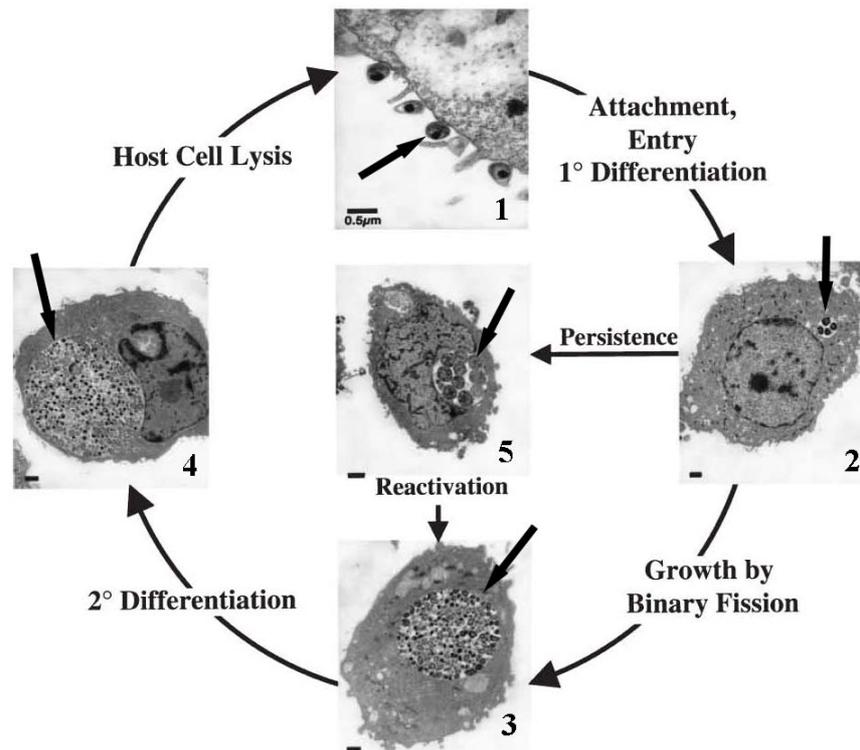
Während ihres Entwicklungszyklus nehmen Chlamydien zwei voneinander unterscheidbare Formen an: die infektiösen Elementarkörperchen (EK) und die intrazellulären Retikularkörperchen (RK), die nicht infektiös aber stoffwechselaktiv und vermehrungsfähig sind. Beide Formen können über Zwischenzustände ineinander übergehen. Die nachfolgende Tabelle aus Gsell/Krech/Mohr, Klinische Virologie [11] modifiziert nach Ward [12], zeigt die wesentlichen Unterschiede beider Formen auf:

Merkmal	Elementarkörperchen	Retikularkörperchen
Körper	0,2-0,3 µm	1 µm
Ultrastruktur	elektronendichter Kern, rigide Zellwand	aufgelockerte Kernstrukturen, dünne und durchlässige Zellwand
RNA:DNA	1:1	3:1
Metabolische Aktivität	inaktiv	aktiv
Infektiösität	infektiös	nicht infektiös
Teilungsfähigkeit	Nein	ja

Tabelle 1.1: Strukturelle Unterschiede von Elementar- und Retikularkörperchen

Den Beginn des Entwicklungszyklus stellt die Infektion der Wirtszelle mit dem EK dar. Bis dato herrscht noch Unklarheit über den genauen Eintrittsmechanismus in die Wirtszelle. Es sind sowohl Studien mit einer Mikrofilament-abhängigen, wie auch -unabhängigen Phagozytose beschrieben [13;14]. Es liegt daher die Annahme nahe, dass sich die Mechanismen zwischen den einzelnen Serovaren unterscheiden. Auch über die Rezeptoren, über die die Aufnahme erfolgt, ist wenig bekannt. Möglicherweise sind diese von Serovar zu Serovar bzw. je nach Zelltyp verschieden. Zhang und Stephens haben in ihren Studien gezeigt, dass eine Aufnahme über den Heparansulfat-Rezeptor erfolgt [15], wohingegen nach weiteren Veröffentlichungen eine Bindung und Aufnahme über den Fc $\gamma$ -Rezeptor nach Bindung von IgG erfolgen kann [16].

Das EK wird nach Bindung an die Zelloberfläche von der Zelle umschlossen und in diese aufgenommen. Anschließend verhindert das eingeschlossene EK die Verschmelzung des Vesikels mit Lysosomen, so dass kein Abbau der endozytierten Partikel erfolgt. Im peri-Golgi-Raum kommt es zu einer Fusion des Einschlusses mit Exozytose-Vesikeln. Hier konnte bisher nur gezeigt werden, dass die nach der Endozytose einsetzende Proteinsynthese für diese Vorgänge wichtig ist, eine genaue Steuerung konnte aber bisher noch nicht genügend aufgeklärt werden [16].



**Abbildung 1.3 Entwicklungszyklus von Chlamydien am Beispiel von *C. pneumoniae***

Die schwarzen Pfeile in den einzelnen Bildern deuten auf Elementarkörperchen auf der Zelle (Bild 1) bzw. auf chlamydiale Einschlüsse (Bilder 2-5). Die Elektronenmikroskopie-Aufnahmen wurden aus Belland *et al.*, Cellular Microbiology, Vol.6 (2004) entnommen [17] und modifiziert.

Die Umwandlung vom EK zum RK setzt in der Zelle ein. Das hochkondensierte Chromatin lockert auf und die Proteinsynthese der Chlamydien setzt ein. Die RK vermehren sich durch binäre Teilung. Anschließend wandeln sich die RK wieder in EK um, wobei neben diesen beiden Hauptformen auch Zwischenformen zu erkennen sind. Die EK werden nach der Zerstörung der Zelle freigesetzt und können neue Zellen infizieren.

Neben diesem Austrittsmechanismus wurde von Moulder *et al.* für *C. trachomatis* Biovar Trachoma auch ein Exozytose-ähnlicher Mechanismus beschrieben. Dabei sollen die EK durch Exozytose in den Extrazellularraum gelangen ohne dass es zu einer Zerstörung der Zelle kommt [13].

Die chlamydiale Persistenz wurde bereits *in vitro* eindeutig beschrieben und in verschiedenen Modellen untersucht. Aber es bestehen auch *in vivo* bei chronischen Erkrankungen Hinweise auf persistierende Chlamydien [13]. Auf die chlamydiale Persistenz wird unter 1.1.4 genauer eingegangen.

Chlamydien sind Energieparasiten, die Energie in Form von ATP von ihrer Wirtszelle benötigen [18]. Sie besitzen eine eigene Proteinsynthese und sind zum Wachstum nicht auf die Proteinsynthese der Wirtszelle angewiesen [19]. Eine Ausnahme stellen Sphingolipide aus dem Golgi-Netzwerk dar, die in die Membran der Chlamydien eingebaut werden [16]. Zusätzlich werden eigene Proteine von den Chlamydien in die Einschluss-Membran eingesetzt [20;21].

#### **1.1.4 Die chlamydiale Persistenz**

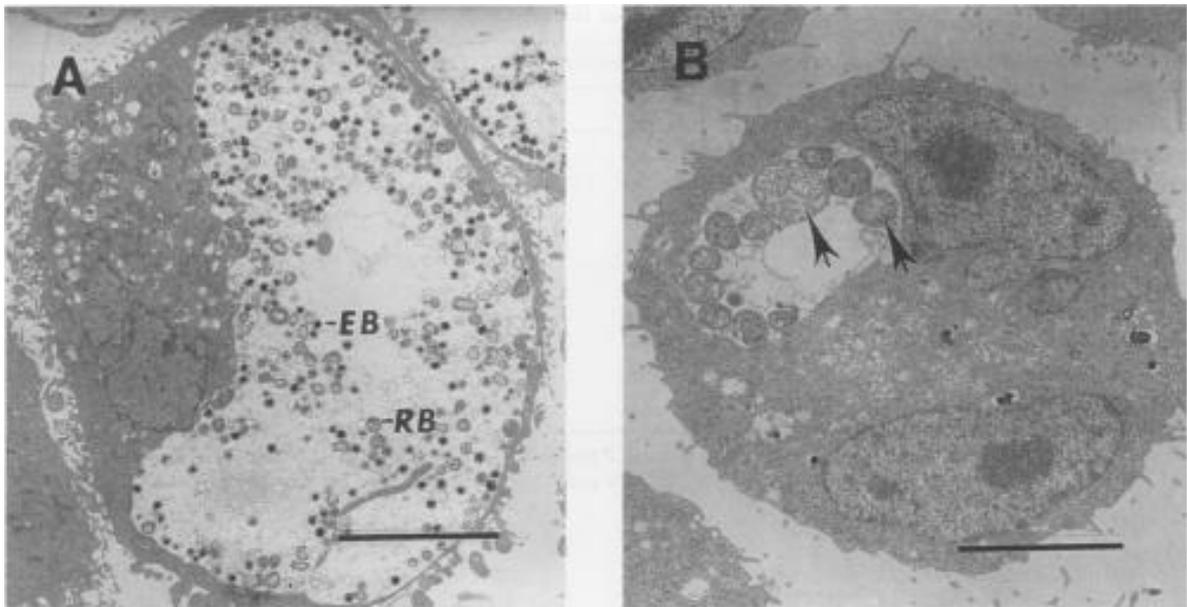
[22-24]

Bei der chlamydialen Infektion werden Zellen durch EK infiziert. Während des produktiven Entwicklungszyklus kommt es zur Generierung einer Vielzahl neuer EK. Diese infektiöse Form kann am Patienten nachgewiesen werden. Von vielen wird die produktive Infektion als der „Normalfall“ betrachtet. 1980 aber konnte Moulder erstmals zeigen, dass Chlamydien in einer aberranten Form (von ihm als „kryptische Formen“ bezeichnet) in Zellen persistieren. Bestimmte Faktoren können die Umwandlung von diesen Formen zurück zu Retikularkörperchen initiieren [25]. Unklarheit herrscht bezüglich der Struktur-Veränderung von persistierenden Chlamydien und der Wechselwirkung mit der Wirtszelle während der Persistenz. Es konnte bisher auch noch kein sicherer Bezug von *in vitro* Beobachtungen zur *in vivo* Situation bei chronischen Erkrankungen hergestellt werden.

Die chlamydiale Persistenz ist eine Langzeit-Beziehung zwischen Chlamydien und dem Wirt, bei der der Mikroorganismus vital bleibt, aber durch Kultur nicht anzuzüchten ist [22]. Der Grad der Persistenz ist abhängig von a) dem infizierten Zelltyp, b) der Chlamydien Spezies oder dem Biovar und c) dem Zustand der Chlamydien zum Zeitpunkt

der Aufnahme durch die Zelle. Wie bei der viralen Latenz ist der Entwicklungszyklus während der Persistenz unterbrochen, wobei es zur Ausbildung einer morphologisch veränderten Form kommt (aberrante Form). Die Verbesserung der Bedingungen für den Parasiten führen zu einer Wiederaufnahme des Entwicklungszyklus (Reaktivierung). Dies ist bereits *in vitro* gezeigt worden, konnte aber bisher nur im Mausmodell, nicht aber im Menschen demonstriert werden. Bei *C. pneumoniae*-infizierten Mäusen ließen sich die persistierenden Chlamydien nach einer Lungeninfektion durch Unterdrückung des Immunsystems mit Steroiden wieder reaktivieren [26;27]. Dies unterstützt die Möglichkeit, dass die detektierte DNA und Antigene bei chronischen Infektionen von persistierenden, vitalen Chlamydien stammen [26].

Molekularbiologisch wird bei der Persistenz häufig die Expression des MOMP-Gens (*major outer membrane protein*) und des chlamydialen Hsp60-Gens betrachtet. Für IFN- $\gamma$  induzierte Persistenz ist gezeigt worden, dass sich *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* hier unterscheiden. Während bei *C. trachomatis* die MOMP-Expression bei persistierenden Chlamydien verringert und von Hsp60 gleich bleibt oder leicht ansteigt, verändert sich die MOMP-Expression bei *C. pneumoniae* in der Persistenz nicht.



**Abbildung 1.4 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *C. trachomatis*-infizierten Zellen**

- (A) Typischer chlamydialer Einschluss mit kleinen Einschlusskörperchen (EB=Elementar- und RB=Retikularkörperchen) während produktiver Infektion
- (B) Chlamydialer Einschluss mit aberranten, vergrößerten Einschlusskörpern (Pfeile) nach Behandlung mit IFN- $\gamma$ . Die Elektronenmikroskopie-Aufnahmen wurden aus Beatty *et al.*, *Infection and Immunity*, Vol. 62 (1994) entnommen [28].

Für *in vitro* Untersuchungen stehen verschiedene Persistenz-Modelle zur Verfügung:

### **Antibiotika-induzierte Persistenz**

Generell können Antibiotika, die in die RNA- oder Protein-Synthese eingreifen, die Differenzierung von Elementar- zu Retikularkörperchen und umgekehrt nach *in vitro* Infektion inhibieren. Die Beeinflussung der DNA- oder Peptidoglykan-Synthese, beispielsweise durch Penicillin G, stoppt die binäre Teilung und hemmt die Umwandlung von Retikular- zu Elementarkörperchen.

Der Transfer in Antibiotika-freies Medium ermöglicht die Umwandlung zu typischen RK und nach Vermehrung durch binäre Teilung zu neuen infektiösen EK [29].

### **Mangel-induzierte Persistenz**

Beim Entzug von essentiellen Nährstoffen wird das Wachstum von Chlamydien und Wirtszellen arretiert bis der fehlende Nährstoff dem Medium wieder zugefügt wird [13]. Die Depletion von verschiedenen Aminosäuren führte bei *C. trachomatis* L2 in McCoy-Zellen zu einer abnormalen Entwicklung. Durch Zugabe von Blutplasma Konzentrationen der entfernten Aminosäuren gelang teilweise die Wiedererlangung der ursprünglichen Einschluss-Größe [30].

Im Gegensatz zu den okularen *C. trachomatis* Serovaren (A bis C) benötigen die genitalen Serovare (D bis I) kein Tryptophan für das normale Wachstum. Ursache ist die bei den genitalen, aber nicht bei den okularen Serovaren exprimierte Tryptophan-Synthase, die aus Indol Tryptophan herstellen kann. Diese ist auch ein Grund für den Gewebetropismus bei den *C. trachomatis* Serovaren. Im Auge können Chlamydien kein Indol beziehen, während dieses im Genitalbereich durch andere Bakterien zur Verfügung gestellt wird.

Besonderes Interesse einiger Labore ist auf den Eisenentzug gerichtet [31-34], wie er *in vivo* beispielsweise in endometrialem Gewebe durch Estradiol induziert wird [35] oder während inflammatorischer Prozesse vorkommt. Die Behandlung von *C. trachomatis* E infizierten endometrialem Epithel-Zellen mit dem Eisenchelator Deferoxamin Mesylat (DAM) führt zu einer Inhibierung der Infektiösität und zu einer morphologischen Änderung der Chlamydien. Diese morphologischen Änderungen unterscheiden sich aber generell von den Beobachtungen aus anderen Persistenzmodellen [33]. Auch bei *C. pneumoniae* in HeLa-Zellen konnte nach DAM Zugabe morphologische Änderungen beobachtet werden. Hier zeigten sich allerdings nicht alle morphologischen Eigenschaften wie sie für *C. trachomatis* Kulturen beschrieben worden sind [31].

Eisen-beladenes Transferrin (Holotransferrin) oder Eisensalz führte zu einer erneuten Infektiösität und produktiven Entwicklung bei beiden Spezies. Der depletierte Eisen-Pool der Zelle ist daher die Ursache für die Veränderung im Wachstum der Chlamydien [31;33]. Außerdem konnte eine durch Glukose-Depletion induzierte Persistenz gezeigt werden [36].

### **Persistenz durch immunmodulatorische Mediatoren**

Die Behandlung von Chlamydien-infizierten Zellen mit dem Zytokin IFN- $\gamma$  liefert *in vitro* ein System von indirekter Nährstoffmangel-induzierter Persistenz, die eine *in vivo* Situation widerspiegeln könnte.

Ein direkter Vergleich von IFN- $\gamma$ - und Aminosäure-Depletion-induzierter Persistenz bei *C. trachomatis* E und L2 in HeLa-Zellen zeigt unterschiedliche Wachstumscharakteristika zwischen den beiden Systemen [37].

Der wichtigste Mechanismus der IFN- $\gamma$ -induzierten Persistenz in humanen Zellen ist der Tryptophan-Entzug durch Aktivierung der Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO). Es konnte in Übereinstimmung mit den Daten von der Tryptophan-Depletion [38] gezeigt werden, dass *C. trachomatis* D, I und L2 aber nicht A in HeLa-Zellen nach IFN- $\gamma$  Zugabe durch Indol reaktiviert werden konnten [39]. Bei *C. pneumoniae* konnten ebenfalls nach IFN- $\gamma$  Behandlung aberrante Formen beobachtet werden [40;41].

Die Stärke der Inhibierung durch IFN- $\gamma$  ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Zum einen spielt der Stamm eine wesentliche Rolle [42]. Die Zugängigkeit von Indol und Fähigkeit des Stammes, es durch eine aktive Tryptophan-Synthase in L-Tryptophan umzusetzen [38;39] ist hier entscheidend. Auch bestimmt der Expressions-Level der IDO in der Wirtszelle [43] die Verfügbarkeit von Tryptophan. Zusätzlich beeinflussen andere Zytokine, wie TNF- $\alpha$  und IL-1 synergistisch das Wachstum der Chlamydien [44-46].

Neben dem Tryptophan-Katabolismus können andere Mechanismen wie der induzierbare NO-Synthese-Weg, der zum Eisen-Entzug führt, zu den IFN- $\gamma$  Eigenschaften beitragen. Diese zusätzlichen Faktoren in ihrer Gesamtheit deuten auf eine sehr komplexe *in vivo* Situation hin [45].

### **Monozyten**

Bei Monozyten kommt es direkt nach der Primärinfektion zur Persistenz. Dabei werden nur aberrante, aber keine normalen Körperchen gefunden. Es zeigte sich ein Verlust der Infektiösität über den gesamten Zeitraum der Infektion während dem weiterhin chlamydiale mRNA detektiert werden konnte [44;46]. Der Mechanismus der Persistenzerzeugung in Monozyten ist noch unklar. Weder die Zugabe von Tryptophan noch von Antikörpern gegen IFN- $\gamma$  (bei *C. trachomatis* zusätzlich auch Antikörper gegen TNF- $\alpha$ ) bei infizierten Monozyten [44;46] führten zu einer Reaktivierung der persistierende Chlamydien.

### 1.1.5 Pathogenese von Chlamydien

[3]

Eine chlamydiale Infektion verläuft beim Menschen meist symptomlos, kann aber in einigen Fällen auch schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen.

Durch Chlamydien erzeugte Erkrankungen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: 1) Erkrankungen durch eine akute produktive Infektion und 2) Erkrankungen bei chronischer Infektion (rezidivierend oder persistierend). Eine persistierende Infektion oder häufige Reinfektionen können zu einer stetigen, schwelenden Entzündung führen, die das Gewebe um den Entzündungsherd über längere Zeit schädigt.

In der Regel werden zuerst die Schleimhäute von Chlamydien befallen. Von dieser Eintrittspforte aus können sie sich weiter verbreiten, wobei der Verbreitungsmechanismus noch nicht abschließend geklärt ist. Man vermutet aber, dass die Ausbreitung über infizierte Monozyten bzw. Makrophagen erfolgt [46;47].

#### *C. trachomatis*:

Bei Infektionen mit den Biovarien von *C. trachomatis* zeigen sich unterschiedliche klinische Bilder: Das Trachoma-Biovar wird unterteilt in die Serovare A, B, Ba und C, welche Entzündungen des Auges (Trachome) hervorrufen. Die Serovare D bis K lösen Infektionen des Genitalbereiches aus.

Die Augenerkrankungen durch die Serovare A bis C sind der häufigste Grund für vermeidbare Erblindung. Dabei werden die Chlamydien oft durch Fliegen von Mensch zu Mensch weitergegeben. In betroffenen Gebieten (Nordafrika, mittlerer Osten, und Teile Indiens) kommt es dabei zu einer sehr hohen Durchseuchung. Bei chronisch persistierender Infektion der Augen kann die dauerhafte Entzündung und die darauf folgende Vernarbung zur Erblindung führen. In Abstrichen von Patienten, die eine chronische Konjunktivitis aufwiesen und aus denen keine Chlamydien kultiviert werden konnten, war Antigen und DNA [48;49], aber auch chlamydiale rRNA detektierbar [48;50;51].

Bei den Erkrankungen im Bereich des Genitaltraktes durch *C. trachomatis* Serovar D bis K handelt es sich um Salpingitis, Urethritis, Endometritis und Epididymitis. Durch längere Schädigung und Vernarbung bei Urogenitalentzündungen besteht eine erhöhte Inzidenz zur Unfruchtbarkeit (Infertilität) [52], schweren tubalen Erkrankungen oder ektopen Schwangerschaften. In Tubus Biopsien von Frauen mit tubaler Infertilität konnte die Anwesenheit von *C. trachomatis* Antigen oder DNA demonstriert werden [53-57].

Bei der Geburt besteht die Gefahr, dass die Infektion auf das Neugeborene übertragen wird und zur Konjunktivitis oder Pneumonie führt.

*C. trachomatis* ist außerdem bei der Entstehung von reaktiver Arthritis beteiligt [58]. Es konnte chlamydiale RNA in Biopsiematerial aus Synovial-Gewebe von Patienten mit reaktiver Arthritis, nicht aber bei anderen Formen von Arthritis gezeigt werden [59-61].

Mittels Immuno-Elektronenmikroskopie konnten aberrante Formen von Chlamydien in Makrophagen und Fibroblasten aus Synovial-Membranen beobachtet werden [60].

Das Biovar LGV (Serovare L1, L2a, L2 und L3 [62;63]), löst ebenfalls Entzündungen des Genitalbereiches aus. Dabei führt dies zu der Geschlechtskrankheit Lymphogranuloma venereum, in seltenen Fällen auch durch Streuung zu Meningitis, Arthritis, Pneumonitis und Konjunktivitis.

### *C. pneumoniae*:

Seroepidemiologische Studien zeigen eine weltweite Verbreitung von *C. pneumoniae*. So hatten mindestens 80 % der Erwachsenen in ihrem Leben schon einmal Kontakt mit diesem Bakterium. Es kann Erkrankungen des respiratorischen Trakts, wie Bronchitis, Pharyngitis und atypischen Pneumonien auslösen.

Es zeigte sich, dass *C. pneumoniae* selbst bei Therapie-üblichen Antibiotika nicht verlässlich eradiziert werden konnte. Bei Infektion im respiratorischen Trakt konnte nach Gabe von Tetrazyklin oder Doxzyklin Monate nach dem Abklingen der akuten Infektion weiter positive Kulturen nachgewiesen werden [64]. Eine ähnliche Beobachtung ist bei *Mycoplasma pneumoniae* bei Behandlung mit Tetrazyklin oder Erythromycin gemacht worden [65]. Solche infizierten Individuen könnten als Reservoir zur Ausbreitung von *C. pneumoniae* dienen.

Außerdem besteht eine Verbindung zwischen Infektionen mit *C. pneumoniae* und kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose [66-68]. In mehreren seroepidemiologischen Studien verschiedener Labore konnte mittels PCR, immunzytologischen Färbungen oder Elektronenmikroskopie die Anwesenheit von *C. pneumoniae* in atherosklerotischen Läsionen gezeigt werden [69-73]. *In vitro* Studien lassen vermuten, dass *C. pneumoniae* die Möglichkeit besitzt, persistierend vaskuläre Zellen zu infizieren. Ebenso kann der Erreger produktive Infektionen in Makrophagen, Endothel-Zellen und arteriellen glatten Muskelzellen, die alle Schlüsselzellen für Atherosklerose darstellen, auslösen [74;75].

Verschiedene Labore konnten die Freisetzung von Adhäsinen, Zytokinen und Proteasen von humanen vaskulären Endothel-Zellen und Monozyten wie auch Makrophagen demonstrieren [76-79]. Diese führen zu Verletzungen oder Aktivierung des Endothels, was die Adhärenz und Einwanderung von Monozyten/Makrophagen in das subendotheliale Gewebe zur Folge hat. Zusätzlich kommt es bei der Behandlung von Makrophagen aus gereiften Monozyten mit *C. pneumoniae* und im Anschluss durch Gabe von zusätzlichem *low-density* Lipoprotein (LDL) zur Bildung von Schaumzellen und der Ansammlung von Cholesterolester [80]. Über ultrastrukturelle Untersuchungen in atheromatösen Läsionen aus Aorten konnte *C. pneumoniae* in Schaumzellen und glatten Muskelzellen sowie in Makrophagen gezeigt werden.

Es besteht die Möglichkeit, dass *C. pneumoniae* **aktiv** bei der Entstehung von Atherosklerose beteiligt ist oder nur als **innocent bystander** („unbeteiligter Zuschauer“) zufällig am Ort des Geschehens in einer persistierenden Form vorliegt.

Auch konnte eine Gruppe von Forschern durch eine Reihe verschiedener Techniken wie Histologie, Elektronenmikroskopie und RT-PCR vitale *C. pneumoniae* in Gehirn-Gewebe von Alzheimer-Patienten lokalisieren [81]. Dabei wurden die Erreger nach immunohistochemischer Färbung in Perizyten, Mikroglia und Astrozyten nur von Alzheimer-betroffenen Gehirnen gefunden. Zusätzlich ließ sich eine monozytäre Zelllinie mit dem Homogenisat aus Alzheimer Gehirn infizieren.

*C. pneumoniae* steht außerdem im Verdacht, reaktive Arthritis auszulösen [82]. Allerdings sind die Nachweisraten von *C. trachomatis* DNA in dem Synovialgewebe bzw. in der Synovial-Flüssigkeit von Arthritis Patienten deutlich größer, als die von *C. pneumoniae* DNA [67;83].

### **1.1.6 Wechselwirkung mit Wirtszellen**

Bakterien haben verschiedene Möglichkeiten, um mit eukaryonten Zellen Wechselwirkungen einzugehen. Einerseits können Oberflächenmoleküle wie Lipopolysaccharid (LPS), Lipoteichonsäure, Geißeln, aber auch Hitzeschockproteine und Kapseln die Zelle beeinflussen („passiver“ Einfluss). Ihre Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche kann Signale in das Innere der Zielzelle weiterleiten und beispielsweise zur Freisetzung von Zytokinen und anderen Botenstoffen führen. Chlamydien besitzen wie alle gramnegative Bakterien LPS auf ihrer Oberfläche. Während aber das LPS anderer gramnegativer Bakterien zu den potentesten Stimulatoren der angeborenen Immunität zählt [84-86], besitzt das chlamydiale LPS eine wesentlich geringere Potenz [87;88].

Andererseits kann die Übertragung von Effektorproteinen durch einen TypIII-Sekretionsapparat oder die Freisetzung von Exotoxinen durch **vitale** Bakterien phänotypische Veränderungen der Zielzelle herbeiführen („aktiver“ Einfluss).

In den letzten Jahren richtete sich das Augenmerk stark auf die Interaktion von Chlamydien und ihren Wirtszellen. Dabei standen besonders die human-pathogenen Stämme *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* im Fokus. Die Analyse der Expression verschiedener Chlamydien-infizierter Zelllinien oder primärer Zellen erbrachte aber nur kleine Einblicke in die Beeinflussung durch diese Erreger auf ihre Wirtszellen, da hier nur einzelne Effekte untersucht werden konnten. Dabei standen vor allem immunmodulatorische Moleküle, wie Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren, oder Zytokinen, im Vordergrund der Forschung (Übersicht in Tabelle 1.2).

Zelltyp	Vermehrte Expression durch <i>C. trachomatis</i>	Vermehrte Expression durch <i>C. pneumoniae</i>
<i>Zytokine/Wachstumsfaktoren</i>		
Epithelzellen	IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-11, Gro- $\alpha$ , GM-CSF [89;90]	IL-8 [91]
Endothelzellen		IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MCP1, TNF- $\alpha$ [79;92;93]
Glatte Muskelzellen		bFGF, IFN- $\beta$ , IL-6 [92;94]
Synoviozyten (fibroblastenartig)	IFN- $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ , GM-CSF [95;96]	
Makrophagen/Monozyten/ PBMCs	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 [97;98]	IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, MCP1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ [77;93;99-102]
<i>Adhäsionsmoleküle</i>		
Epithelzellen		ICAM-1 [91]
Endothelzellen	ICAM-1, VCAM-1, MAdCAM-1 [103]	E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1 [78;104]
Makrophagen/Monozyten		ICAM-1 [105]

**Tabelle 1.2 Veröffentlichte Chlamydien-induzierte Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen sowie Wachstumsfaktoren und Zytokinen bei verschiedenen Wirtszellen**

(entnommen aus der Dissertation von S. Heß (2002) [106])

Chlamydien können die Apoptose von Wirtszellen beeinflussen. Für *C. trachomatis* L2 und *C. pneumoniae* wurde ein Schutz vor induzierter Apoptose in einer frühen Phase des Entwicklungszyklus beschrieben [107;108]. Ebenso konnte von Perfettini et al. gezeigt werden, dass zu späteren Zeitpunkten Apoptose von Chlamydien ausgelöst wird [109].

Zur Klärung der Mechanismen der Chlamydien-induzierten phänotypischen Veränderungen in der Wirtszelle wurden Signalwege in der eukaryonten Zelle untersucht. Dabei wurden beispielsweise Phosphorylierungen von Wirtszellproteinen [110], Aktivierung und Translokation vom Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B [91;92] oder Aktivierung von Caspasen nachgewiesen [111].

Durch DNA- oder Protein Arrays, 2D-Gelelektrophorese usw. ist es seit einigen Jahren möglich, **breite** Analysen der Wechselwirkung von Chlamydien und ihren Wirtszellen durchzuführen. Durch sie besteht die Möglichkeit, das komplizierte Netzwerk von Effekten während der Infektion in großem Maßstab zu untersuchen.

Erste Arbeiten sowohl auf der chlamydialen wie auch der eukaryonten Seite wurden bereits veröffentlicht (beispielsweise [112-114] auf genomischer und [115;116] auf proteomischer Seite). Solche breiten Analysen erlauben es im Anschluss, Verbindungen zu Krankheiten herzustellen und näher zu untersuchen, bei deren Entstehung Chlamydien möglicherweise eine Rolle spielen.

Durch diese Analysen wurde verdeutlicht, dass die Expression einer Vielzahl von Wirtszell-Genen bei einer produktiven Infektion mit Chlamydien stark verändert ist. Darunter Gene, die an essentiellen Immunprozessen beteiligt sind und einen Bezug zu **chronischen Erkrankungen** aufweisen.

Eine Auswahl dieser Gene wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht: die Zytokine IL-6, IL-8, IL-11 und LIF, die Transkriptionsfaktoren EGR-1 und ETV4 sowie der Wachstumsfaktor CTGF.

Für das Hervorrufen dieser Veränderungen der Genregulation könnten Effektorproteine des TypIII-Sekretionssystems verantwortlich sein. Als Beispiel für bakterielle Proteine mit Einfluss auf die Wirtszelle konnte Stenner-Liewen das chlamydiale Protein CADD (*Chlamydia protein associated with death domains*, CT610) identifizieren, das nach Expression in eukaryonten Zellen deren Apoptose induzierte [117]. Ein anderes, chlamydiales Protein ist CPAF (*chlamydial protease-like activity factor*), das im Zytosol der Wirtszelle nachgewiesen werden konnte und die Degradation von Transkriptionsfaktoren induziert [118].

Eine weitere Möglichkeit stellen Toxine dar. Es wurden zytotoxische Effekte nach chlamydialer Infektion bei einigen Spezies beobachtet [119]. Die Zytotoxizität konnte nur bei *C. trachomatis* D und *C. muridarum*, die homologe Gene zum Bereich um CT166 besitzen, nicht aber bei *C. trachomatis* L2 mit einer Deletion, gezeigt werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Genprodukte aus diesem Bereich eine entscheidende Rolle für die toxischen Effekte spielen. Außerdem konnten ähnliche toxische Effekte durch Exotoxine phylogenetisch weit entfernter Bakterien beobachtet werden.

Die beschriebenen Veränderungen wurden bisher meist nur bei der produktiven Infektion untersucht, stehen allerdings eher im Bezug zu chronischen Erkrankungen. Auch ist unklar, ob diese Veränderungen der Genregulation nicht auch von anderen Bakterien, wie beispielweise Salmonellen, ausgelöst werden können.

## 1.2 Salmonellaceae

[120]

Salmonellen sind fakultativ intrazelluläre Erreger, die unter bestimmten Bedingungen Wirtszellen infizieren können. Sie lassen sich ansonsten in Nährmedium anzüchten. Wie andere gramnegative Bakterien tragen sie einen TypIII-Sekretionsapparat, mit dem Effektorproteine vom bakteriellen ins Zytosol der Zielzelle übertragen werden können und zu Veränderungen innerhalb der Zelle führen.

*Salmonella* ist eine der meist untersuchtesten Bakterien-Spezies in Physiologie, Genetik, Zell-Struktur und Entwicklung. Es ist auch eine der am besten charakterisierten bakteriellen Pathogene und Hauptursache für bakteriell erzeugte Gastroenteritis. Trotzdem stehen die molekularen Untersuchungen zum Verständnis der Salmonellen-Interaktion mit

dem Mammalia-Wirt erst am Anfang. In den letzten Jahrzehnten hat der Einblick in die Genetik von Virulenz-Faktoren zu einem besseren Verständnis der molekularen Vorgänge der Bakterien-Wirt Wechselwirkung geführt, allerdings sind noch immer viele Fragen offen.

### **1.2.1 Taxonomie**

Salmonellen gehören zu den obligat pathogenen, gramnegativen Stäbchen aus der Familie der Enterobacteriaceae und sind nahe Verwandte von *E. coli*. Sie wurden zuerst 1880 von Eberth beschrieben und 1884 durch Gaffky angezüchtet [121]. Die Stämme sind durch ihre Reaktion mit Seren differenziert worden und viele Jahrzehnte wurde jedem Serotyp ein eigener Speziesname gegeben (z. B. *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. pullorum* und *S. dublin*). Es ist nun allgemein akzeptiert, dass es nur eine Spezies von *Salmonella* gibt (*S. enterica*) mit über 2000 benannten Serovaren [122]. Trotzdem werden auch heute noch aus klinisch-praktischen Gründen meist die alten „Spezies-Namen“ verwendet.

### **1.2.2 Molekularbiologie**

Von *S. typhimurium* wurde bisher der Stamm LT2 komplett sequenziert und annotiert, zwei weitere Sämme (DT104 und SL1344) werden zurzeit ausgewertet. Der Stamm LT2 besitzt ein Genom von 4,86 Mbp mit 4489 kodierenden Bereichen (inklusive 39 Pseudogenen). Neben dem Genom ist zusätzlich das Plasmid pSLT mit 108 kodierenden Bereichen (inklusive 6 Pseudogenen) vorhanden.

Das Chromosom von *S. typhimurium* enthält 5 Pathogenitäts-inseln (SPI, *Salmonella* Pathogenitätsinsel), von denen SPI1 und SPI2 zwei unabhängige TypIII-Sekretions-Systeme enthalten. *Salmonella* ist die einzige Bakterien-Spezies, die zwei dieser Systeme besitzt. Die beiden Systeme spielen bei der Infektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Rolle. Der SPI1-kodierte TypIII-Sekretionsapparat wird initial bei der Invasion der nicht-phagozytierenden Wirtszellen [123] und Enterophagozytose [124] benötigt. Der SPI2-kodierte Apparat ist wahrscheinlich wichtig für das intrazelluläre Überleben in (murinen) Makrophagen [125].

### **1.2.3 Pathogenese**

Während einige der Serotypen wie *S. typhi* und *S. pullorum* ein eingeschränktes Wirtsspektrum besitzen, infizieren die meisten Serotypen einen breiten Bereich an warmblütigen Tieren und können zu Krankheiten beim Menschen führen. Salmonellen verursachen eine Vielzahl an Krankheitssyndromen. Enterokolitis, Enteritisches Fieber (typhöses Fieber), Bakteriämie und fokale Infektionen. Ungefähr 2000 Serovare werden mit Enterokolitis in Verbindung gebracht. Von diesen verursacht aber nur ein Bruchteil

von 10 Serotypen den Hauptanteil der Infektionen (wie *S. typhimurium*, *S. enteritidis* und *S. heidelberg*) [126;127].

Salmonellen werden durch kontaminierte rohe Lebensmittel aufgenommen, wobei Geflügel und Roheiprodukten eine besondere Bedeutung zukommt. Zur Magenpassage und um mit der natürlichen Darmflora konkurrieren zu können werden hohe Dosen an Salmonellen ( $10^5$ - $10^{10}$  Bakterien [128]) benötigt.

Einer der herausragendsten Aspekte der Salmonellen-Pathogenese ist die Invasion von nicht-phagozytierenden Zellen, die morphologisch einer Phagozytose gleicht. Die M-Zellen in den Peyer's Patches sind die primären intestinalen, epithelialen Zielzellen für *Salmonella* in der Maus [129] und anderen Wirten. Nach Kontakt mit den intestinalen Zellen werden über den TypIII-Sekretionsapparat auf SPI1 verschiedene Effektorproteine übertragen. Diese manipulieren die Signaltransduktion der Wirtszelle und führen zur Zytoskelett-Reorganisation sowie veränderter Wirts-Genexpression [130]. Durch die Umorientierung des Zytoskeletts können die Salmonellen internalisieren. Die Manipulation des Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAP-Kinase)-Wegs bewirkt die Genexpression und Freisetzung von IL-8 [131] und benötigt den TypIII-Sekretionsapparat auf SPI1 [132]. Neben IL-8 werden zusätzlich die CXC-Chemokine  $GRO\alpha/\gamma$  wie auch das proinflammatorische Zytokin IL- $1\beta$  sekretiert [133]. Die Salmonellen durchwandern die Epithelialzelle und gelangen zur Lamina Propia. Dort werden sie von Makrophagen phagozytiert. In den Makrophagen können Salmonellen den Zelltod induzieren, wobei noch nicht hinreichend geklärt ist, ob es sich um Apoptose oder Nekrose handelt.

Die inflammatorische Reaktion und der transepitheliale Transport der neutrophilen Zellen führen zu einem Flüssigkeitseinfluss in das intestinale Lumen. Die Freisetzung von Prostaglandinen bewirkt durch Aktivierung der Adenylat Zykylase in den intestinalen Zellen [134] eine Inhibierung der  $Na^+$  Adsorption und Erhöhung der  $Cl^-$  Sekretion.

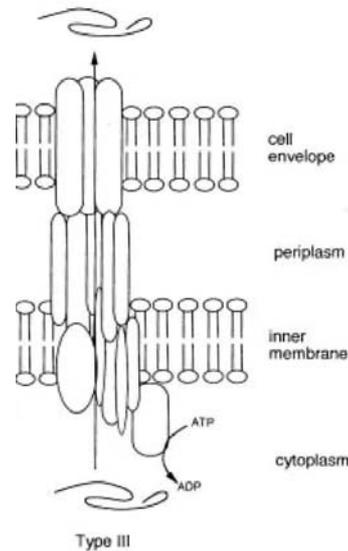
Vor allem Kinder unter einem Jahr und ältere Menschen über 60 Jahre leiden unter dem starken Flüssigkeitsverlust bei Durchfall und haben meist sehr schwere Infektionen (zusammengefasst in [135-138]).

#### **1.2.4 Der TypIII-Sekretionsapparat**

[139-141]

Nach genetischen Analysen sind die Gene von Virulenzfaktoren häufig in Gen-Clustern zu finden, die als Pathogenitätsinseln bezeichnet werden. Diese wurden während der Evolution über horizontalen Gentransfer an entfernt verwandte Bakterien weitergeben. Auf diesen Pathogenitätsinseln findet man bei gramnegativen Bakterien ein Set von etwa 20 Genen, die zusammen einen Pathogenitäts-Mechanismus ausbilden, der als TypIII-Sekretion bezeichnet wird. Dies ermöglicht den gramnegativen Bakterien die

Freisetzung von Proteinen in das umgebene Milieu oder die direkte Übertragung vom bakteriellen in das Zytosol der Zielzelle.



**Abbildung 1.5 Schematische Darstellung eines TypIII-Sekretionsapparats**

Die Darstellung wurde aus Meccas und Strauss, *Emerging Infectious Disease*, Vol. 2, Heft 4 (1996) entnommen [142]

Die Proteine des Sekretionsapparates sind überwiegend in der inneren Membran verankert. Diese zeigen Homologie zu den Bestandteilen des Flagellen Biosynthese Apparates. Bei der TypIII-Sekretion wird eine zytosolische, möglicherweise membranständige ATPase benötigt. Die Effektorproteine brauchen außerdem kleine zytosolische Chaperone, die eine verfrühte Interaktion mit anderen Komponenten des Sekretions-Systems verhindern.

Die sekretierten Proteine vom TypIII-Weg werden während der Sekretion nicht N-terminal prozessiert. Wahrscheinlich befindet sich das Sekretionssignal im 5'-Bereich der mRNA eines sekretierten Proteins [143]. Die Sekretion von Effektorproteinen über den Sekretionsapparat wird in einigen Fällen durch den Kontakt des Bakteriums mit der Zelloberfläche reguliert.

So ähnlich die Komponenten des TypIII-Sekretionsapparats zwischen den entfernt verwandten Bakterien sind, so verschieden sind die injizierten Effektorproteine und machen die Vielfalt von Krankheitsbildern aus. Viele der übertragenden Proteine gleichen oft eukaryonten Faktoren. Die Effekte, die durch diese Proteine ausgelöst werden, sind sehr vielseitig. Die meisten der Effektorproteine greifen (wie auch Toxine) in die Signaltransduktion der Zielzelle ein.

Beispielsweise werden von Salmonellen die Effektorproteine SopE bzw. SopE2 durch den TypIII-Apparat auf SPI1 in das Zytosol der eukaryonten Zelle übertragen. Die beiden Proteine sind sehr gute Guanin-Nukleotid Austauschfaktoren der GTPasen aus der Rho-Familie. Dort aktivieren sie hauptsächlich Cdc42 und Rac1. Die Aktivierung dieser

beiden GTPasen führt zur Zytoskelett-Umorientierung und zur Aufnahme der Salmonellen durch die Zelle.

Ein weiterer, wichtiger von Bakterien ausgelöster Einfluss ist die Steuerung der Apoptose. Die Blockade dieses Prozesses hilft dem intrazellulären Erreger beim Überleben in der Zelle während andere Bakterien Apoptose in Immunzellen (z. B. Makrophagen) auslösen, um eine Aufnahme zu verhindern. Aber auch der vesikuläre Verkehr kann von ihnen gestört werden.

Wie die Toxine zählen die Effektorproteine des TypIII-Sekretionssystems zu den wichtigsten Virulenzfaktoren von Bakterien und werden daher von vielen Laboren eingehend untersucht.

### 1.3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden drei Aspekte der Interaktion von Chlamydien und Salmonellen mit ihren Wirtszellen untersucht.

Chlamydien sind humanpathogene, obligat intrazelluläre Bakterien. Breite Expressionsanalysen haben starke Veränderungen der Genregulation Chlamydien-infizierter Zellen während einer produktiven Infektion gezeigt.

Viele dieser Gene besitzen Schlüsselfunktionen innerhalb der Wirtszelle. Oder es sind für sie bereits Beteiligungen bei der Entstehung von Chlamydien-assoziierten Erkrankungen beschrieben worden. Bei einigen wichtigen Krankheiten, wie der reaktiven Arthritis und Atherosklerose, spielt die chronisch persistierende Infektion eine wesentliche Rolle. Die Untersuchung des Einflusses von persistierenden Chlamydien auf ihre Wirtszelle stellt einen Schwerpunkt dieser Dissertation dar. Dabei soll die Rolle von Chlamydien bei der chronisch persistierenden Infektion aufgedeckt und ein besseres Verständnis des Pathomechanismus, der zur Entstehung dieser Krankheiten führt, gewonnen werden.

Bei der veränderten Genexpression der Wirtszellen durch die Chlamydien sind bei der Persistenz zwei alternative Hypothesen denkbar: 1) Eine Daueraktivierung der Genexpression wie in der Frühphase der produktiven Infektion könnte eine anhaltende Schädigung des Gewebes verursachen. 2) Alternativ könnten die persistierenden Chlamydien zu einer Stummschaltung der betreffenden Gene führen, um sich vor dem Immunsystem zu verbergen. Eine spätere Reaktivierung der Chlamydien könnte dann erneut eine erhöhte Genexpression induzieren und Schäden hervorrufen. Ein Wechselspiel von Persistenz und Reaktivierung über längere Zeit könnte so die beobachteten Symptome verursachen und zu der chronischen Erkrankung führen.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen sollten drei sehr verbreitete Persistenzmodelle für *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* für Langzeit-Untersuchungen optimiert werden. Durch die Anlehnung an das bestehende chlamydiale Infektionsmodell wurde ein Vergleich zu

Ergebnissen aus vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe zu Chlamydien-induzierten Veränderungen der Genregulation möglich.

Die Genregulation ausgewählter Wirtszell-Gene sollte mittels *Real-Time* RT-PCR und ELISA sowohl zu frühen als auch späten Zeitpunkten nach Infektion bei produktiver und persistierender Infektion analysiert und die Veränderungen verglichen werden. Dies sollte zeigen, ob es bei Persistenz zu einer Veränderung des Expressionsmusters von eukaryonten Genen gegenüber der produktiven Infektion kommt und ob Unterschiede bei der Expression zwischen den einzelnen Persistenzmodellen bestehen. Die Reaktivierung der persistierenden Chlamydien sollte zum einen klären, ob es dann erneut zu einer Veränderung der Genexpression kommt. Gleichzeitig sollte so bestätigt werden, dass sowohl Bakterien als auch Wirtszellen während der davorliegenden Persistenz-Phase vital waren.

Neben den Chlamydien-induzierten Veränderungen sollte auch die Wechselwirkung von fakultativ intrazellulären *S. typhimurium* mit ihren Wirtszellen untersucht werden. Es besteht bei den durch Chlamydien verursachten Veränderungen der Genexpression die Möglichkeit, dass diese relativ Chlamydien-spezifisch sind oder aber eine allgemeine Reaktion der Wirtszelle auf intrazelluläre Erreger, wie Salmonellen und Chlamydien, darstellt. Deshalb sollte ein Vergleich der Regulationsvorgänge in den Wirtszellen nach Infektion mit den phylogenetisch entfernten Salmonellen durchgeführt werden. Unterschiedlich regulierte Gene könnten eine Ursache für die verschiedene Pathogenese der beiden Bakterien darstellen.

Intrazelluläre Erreger müssen mit ihren Wirtszellen interagieren. Eine Möglichkeit ist die aktive Übertragung von Effektorproteinen über einen TypIII-Sekretionsapparat. Salmonellen besitzen im Gegensatz zu anderen Bakterien zwei unabhängige TypIII-Sekretionsapparate, die zu verschiedenen Zeitpunkten während der Infektion exprimiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Veränderungen der Wirtszell-Genexpression identifiziert werden, die von den beiden TypIII-Sekretionsapparaten abhängig sind. Dazu wurden breite Analysen der induzierten Genexpression von infizierten Wirtszellen im Vergleich mit Wildtyp und *Knock Out*-Mutanten der beiden Sekretionsapparate mit Micro-Arrays durchgeführt. Perspektivisch bestand hier die Option, später gezielt einzelne Effektormoleküle zu detektieren, um ihre Funktion besser zu erfassen.

Ein weiteres Ziel war die Analyse des putativen, chlamydialen Toxins CT166 und dessen Einfluss auf die Wirtszelle. Die Infektion mit *C. trachomatis* D, nicht aber mit L2, führt zu frühen Zeitpunkten (bis 4 h nach Infektion) zu Zytoskelett-Veränderungen in der Wirtszelle. CT166 besitzt wie Toxin B von *C. difficile*, das Zytoskelett-Änderungen herbeiführt, ein Protein-Motiv für eine Glykosyltransferase. Diese Glykosyltransferase ist

von entscheidender Bedeutung bei der Manipulation des Zytoskeletts. Es sollte überprüft werden, ob CT166 über einen ähnlichen Mechanismus wie das chlostridiale Toxin das Zytoskelett beeinflusst.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Affymetrix-Array Hardware (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)

Hybofen

Fluidic station 300

Scanner

Workstation

Bilddokumentationssystem:

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

Brutschränke:

Modell B 5061 E-C02 (Heraeus, Osterode)

Modell function line (Heraeus, Osterode)

CCD-Kamera

Typ DX2-H (Kappa, Gleichen)

Elektrophoresekammern:

Gelkammern für horizontale Agarosegele: verschiedene Modelle (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Schweden und Biometra/Biomed, Göttingen)

Gelkammer für horizontale RNA-Agarosegele (Keutz Laborgeräte, Reiskirch)

Gelkammer für vertikale Acrylamid-Gele (Sigma, Deisenhofen)

Elektroporationsgerät:

Gene Pulser 1 und 2 (Bio-Rad, München)

Heizblock:

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

Kühlzentrifuge:

Modell J2-21 (Beckmann, Glenrothes, UK)

Typ Rotanta 96 RSC (Hettich Zentrifugen, Tutlingen)

Biofuge fresco (Kendro, Osterode)

Mikroskope:

Unterschiedliche Modelle (Zeiss, Jena)

Mikrotiterplattenscanner:

Titertek Multiskan MCC/340 (Labsystems, Finnland)

PCR-Thermocycler:

Modell TVC 5x9 (Landgraf, Langenhagen)

Techne PCR-Thermocycler (Techne, Cambridge)

T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen)

pH-Meter:

761 Calimatic, digital (Knick)

Photometer:

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

*Real-time* RT-PCR-Geräte:

ABI-Prism 7000 Sequence Detection System<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Schüttelinkubator:

Incubator Shaker Model G25 (New Brunswick Scientific, Edison, USA)

Spannungsgeräte:

Electrophoresis Power Supply, Phero Stab 200 (Biotech Fischer)

Standard Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)

Speedvac:

Speedvac Concentrator SVC 100 (Savant, Faringdale, USA)

Spezielle Software:

Adobe Photoshop Version 7.0 (Adobe Systems)

Clone Manager 6.0 (Scientific & Education Software)

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

Abi-Prism 7000 SDS Software (Applied Biosystems)

Office XP (Microsoft)

Referenzmanager Version 10 (Research Information Systems)

SigmaPlot<sup>™</sup> Version 8.0 (Jandel Scientific Software)

WinMDI 2.1.3 (Copyright<sup>®</sup> by Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla)

Micro Array Suite 3.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)

Kappa ImageBase (Kappa, Gleichen)

Taumelschüttler:

Modell WT (Biometra, Göttingen)

Ultraschallgerät:

Sonifer B12 (Branson, Danbury, USA)

Wasserbad:

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Zentrifugen:

(Biofuge 15R, Biofuge 13, Minifuge T (Heraeus Sepatech, Osterode)

Mikro 22 (Hettich Zentrifugen, Tutlingen)

## 2.2 Verbrauchsmaterial

Küvetten:

Quarzküvetten (Helman, LAT, Garbsen)

Material für die *Real-Time* RT-PCR:

Optical Adhesive Covers; MicroAmp Optical Tubes und Optical Caps (Applied Biosystems, Weiterstadt)

**Plastikpipetten:**

5 ml, 10 ml und 25 ml (Greiner, Frickenhausen)

Reaktionsgefäße:

0.5 ml, 1.5 ml (Sarstedt, Nümbrecht)

12 ml Plastikröhrchen, Rundboden, steril (Greiner, Frickenhausen)

15 ml und 50 ml Falcontubes, steril (Greiner, Frickenhausen)

Mikrotiterplatten, Polystyrol, Rund- und Flachboden, mit und ohne Deckel, steril (Greiner, Frickenhausen)

Spritzen und Kanülen:

Spritzen: 5 ml, 10 ml, 20 ml, 25 ml (Braun, Melsungen)

Kanülen, Sterican®Luer-Lock (Braun, Melsungen)

Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen:

25 cm<sup>2</sup> Polystyrol, 50 ml (Greiner, Frickenhausen)

75 cm<sup>2</sup> Polystyrol, 250 ml (Greiner, Frickenhausen)

182 cm<sup>2</sup> Polystyrol, 650 ml (Greiner, Frickenhausen)

## 2.3 Chemikalien

Agarose, ultraPure (Life Technologies, Eggenstein); SeaKem LE (Bio Whittaker, Apen)

6-Aminohexansäure (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)

Ammoniumacetat (Merck, Darmstadt)

B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>P, 1-Bromo-3-Chloro-Propan (Sigma, Deisenhofen)

Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)

BSA (Boehringer, Mannheim)

DAM, Deferoxamine Mesylate (Sigma, Deisenhofen)

DEPC, Diethyl-pyrocbonat (Applichem, Darmstadt)

DNA-Marker: 2-log DNA-Ladder (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

DTT (Life Technologies, Eggenstein)

Entellan (Merck, Darmstadt)

Ethidiumbromid (Boehringer, Mannheim)

Fetales Kälberserum (FCS) (Life Technologies, Eggenstein)

Ficoll-Paque™ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

Gentamycin (Biochrom KG, Berlin)

Glukose, ultraPure, (Life Technologies, Eggenstein)

Glycerin (Merck, Darmstadt)

G418 (Calbiochem, Bad Soden)

**Holo**transferrin (Calbiochem, Bad Soden)

**IFN- $\gamma$**  (R&D Systems, Wiesbaden)

**Lachssperm**, gebrauchsfertige Lösung zum Hybridisieren (Boehringer, Mannheim)

**MOPS** (Merck, Darmstadt)

**Penicillin** (50 U/ml), (GibcoBRL, Eggenstein)

**Penicillin G** (1 Mega) (Grünenthal GmbH, Aachen)

**RNA-Marker**: 0,24 – 9,5 kb RNA-Ladder (Life Technologies, Eggenstein)

**SDS** (Serva, Heidelberg)

**Streptomycin** (50  $\mu$ g/ml), (GibcoBRL, Eggenstein)

**Tetracyclin**

**Tris** (Serva, Heidelberg)

**Triton X-100** (Serva, Heidelberg)

**Trizol** (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)

**Trypanblau** (Boehringer, Mannheim)

**Trypsin-EDTA** (GibcoBRL, Eggenstein)

**Tween 20** (Serva, Heidelberg)

**X-Gal** (Boehringer, Mannheim)

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

## 2.4 Puffer und Lösungen

<b>Blocking-Puffer</b>	1 %	BSA
	0,1 %	Triton X-100

Puffer wird in PBS angesetzt. Immer frisch ansetzen.

### **Deoxycholat-Lösung:**

0,5 %	Deoxycholat
-------	-------------

In dH<sub>2</sub>O ansetzen und unter Sterilbank steril filtrieren und bei RT lagern.

<b>5 x GEBS:</b>	20 %	Glycerin
	50 mM	EDTA
	0,05 %	Bromphenolblau
	0,5 %	N-Laurylsarcosyl

<b>2xHBS:</b>	280 mM	NaCl
	50 mM	HEPES
	1,5 mM	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O
	pH-Wert auf 7,2 einstellen	

<b>HEPES:</b>	je 20 mM	Hepes Salz und Säure mit HCl auf pH 7,4 einstellen
	125 mM	NaCl
	5 mM	KCl

**Kalium-Eisen(II)/Eisen(III)cyanid:**

8,45 g	$K_4Fe(CN)_6 \times 3 H_2O$
7,84 g	$K_3Fe(CN)_6$
auf 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen, sterilfiltrieren und lichtgeschützt bei 4°C lagern	

<b>5 x Laufpuffer (RNA):</b>	0,1 M	MOPS, pH 7,0
	40 mM	Natriumacetat
	5 mM	EDTA, pH 8,0

**Mowiol**

20 g	Mowiol 4-88 (Calbiochem, Bad Soden)
100 ml	PBS

Das Mowiol wurde über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde 40 ml Glycerin (H<sub>2</sub>O-frei, reinst) zugegeben und erneut über Nacht bei RT gerührt. Nach 1 h Zentrifugation bei 15000 rpm (Biofuge 15R, Biofuge 13, Minifuge T; Heraeus Sepatech, Osterode) wurde der Überstand abgenommen und bei -20 °C gelagert. Als Kontaminationsschutz wurde NaN<sub>3</sub> zugegeben.

**N-Propylgallat**

2,5 g	N-Propylgallat
100 ml	PBS

**Mowiol-Einbettmittel für Fluoreszenzmikroskopie**

3 Teile (v/v)	Mowiol
1 Teil (v/v)	N-Propylgallat

Nach dem Mischen wurde das Einbettmittel über Nacht stehen gelassen. Das Einbettmittel wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

**Probenauftragspuffer (RNA):**

50 %	Formamid
2,2 M	Formaldehyd (37 %ig)
10 mM	EDTA
20 %	Glycerin (87 %ig)
0,2 %	Bromphenolblau
50 µg/ml	Ethidiumbromid
die Lösung wird nach dem Durchmischen steril filtriert	

**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	ddH <sub>2</sub> O	
4,6 ml	Eisessig	Lagerung bei 4°C

**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

**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

**50 x TAE:**

2 M	Tris-Acetat pH 8
150 mM	EDTA pH 8,0

**10 x TBE:**

0,9 M	Tris
0,9 M	Borsäure
0,2 mM	EDTA pH 8,0

**T/E-Puffer 10/1:**

10 mM	Tris-HCl pH 8,0
1 mM	EDTA pH 8,0

**x-Gal-Lösung:**

40 mg/ml	x-Gal in N-N-Dimethylformamid
----------	-------------------------------

immer frisch ansetzen

**2.5 Enzyme und Kits**

RQ1 DNase, RNase-frei (Promega, Madison, USA)

10 x RQ1 RNase-freier DNase-Puffer (Promega, Madison, USA)

Ribonuklease Inhibitor, RNasin (Promega, Madison, USA)

RNase A (Qiagen, Hilden)

T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

10 x Buffer for T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

10 x EcoPol-Puffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main)  
DNA-Polymerase I, Large Fragment Klenow (New England Biolabs, Frankfurt am Main)  
*Calf intestinal alkaline phosphatase* CIAP (Life Technologies, Eggenstein)  
T4 Polynucleotide Kinase (New England Biolabs, Frankfurt am Main)  
T4-DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main)  
NEBuffer for T4 Polynucleotide Kinase 10 x (New England Biolabs, Frankfurt am Main)  
Superscript<sup>TM</sup> II RT (Life Technologies, Eggenstein)  
5 x *First Strand Buffer* (Life Technologies, Eggenstein)  
*Taq* DNA-Polymerase (Life Technologies, Eggenstein)  
10 x *Taq*-Polymerase-Puffer ohne Magnesium (Life Technologies, Eggenstein)  
*Pfu* und Turbo *Pfu* Polymerase (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

Superscript *double-strand* cDNA Synthesis Kit (GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe)  
RNA Bioarray High Yield Transcript Labelling Kit (Enzo Life Technologies Inc., New York, USA)  
Restriktionsenzyme und entsprechende Puffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

### **Transfektions-Kits**

Lipofectamine (Invitrogen, Karlsruhe)  
Metafecten (Biontex, München)

### **DNA und RNA Aufreinigung Kits**

Plasmid-Aufreinigung Midi/Maxi-Kit (Qiagen, Hilden)  
NucleoSpin Plasmid-Kit (Macherey&Nagel, Braunschweig)  
GFX<sup>TM</sup> DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA)  
RNeasy (Qiagen, Hilden)

### **SYBR<sup>®</sup> Green-Kits**

SYBR<sup>®</sup> *Green PCR Core Reagent Kit* und SYBR<sup>®</sup> *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Weiterstadt)  
SYBR<sup>®</sup> *Green PCR Core Kit* (Eurogentec ,Seraing, Belgien)

### **ELISA-Kits**

human IL-6 ELISA (R&D Systems, Wiesbaden)  
human IL-8 ELISA (R&D Systems, Wiesbaden)  
human IL-11 ELISA (R&D Systems, Wiesbaden)

### 2.5.1 Primer

#### Real-Time RT-PCR Primer

Gen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Produktlänge [bp]	Annealing-Temperatur [°C]
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 $\alpha$	TTTTAGGTCAAACCCAA GTTAGTT	TTCTTGGATTCCTCAGCC TCTATC	150	58
IL-6	CACCCCTGACCCAACCA CAAAT	TCCTTAAAGCTGCGCAG AATGAGA	105	58, 60
IL-8	GACCACACTGCGCCAAC ACA	CAGCCCTCTTCAAAAAC TTCTCCA	120	58
NR4A2	GTCAAGAGGGGGCAAGT CACA	AAGGGGGCTAGGAGGGT TACAGAA	93	58
RPS9*	CGCAGGCGCAGACGGTG GAAGC	CGAAGGGTCTCCGCGGG GTCACAT	ca. 90bp	60 (55,58)

**Abbildung 2.1** Liste der verwendeten Primer für die *Real-Time RT-PCR*

\*Bei dem Teilstück von RPS9 konnte die Länge nur in einem Agarosegel abgeschätzt werden, da dieses Primerpaar aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Buer (GBF, Braunschweig) übernommen wurde und uns keine weiteren Informationen dazu vorlagen.

Primer im CT166-Bereich (siehe Anhang):

Die Primer wurden zur Amplifikation von CT166 sowie zur Typisierung von *C. trachomatis* verwendet. In *C. trachomatis* Serovar D kommt eine Sequenz vor, in Serovar L2 aber nicht. Hierbei handelt es sich um eine Deletion der Gene CT165, CT166, CT167 und Teile von CT168.

Die Primer JP43/JP44 binden außerhalb der 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. Die weiteren Amplifikat-Längen können dem Anhang entnommen werden.

JP39: 5'-GGC AGA GAC TTC TAC TTC A-3'  
 JP40: 5'-TCA GCC CAG CAT ACA TGT C-3'  
 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'  
 JP46: 5'-ATA CTG TTC GAT CTC CTC A-3'

Primer zur Klonierung von CT166:

JP36 (5'-Primer CT166): 5'-AAG CTT ACC **GTG** AAC GTT CGT ACG TAC T-3'  
 JP36 neu (5'-Primer CT166): 5'-AAG CTT ACC **ATG** AAC GTT CGT ACG TAC TCT-3'  
 JP37 (5'-Primer CT166 mit Stop): 5'-GGG TAC CTC ATC TAA TAC CTA AGG TAC T-3'  
 JP38 (3'-Primer CT166 ohne Stop): 5'-GGG TAC CTC TAA TAC CTA AGG TAC TTA C-3'

Zur Amplifikation von CT166 wurden die Primer JP36 und JP37 (mit Stop) bzw. JP38 (ohne Stop) verwendet. Die Produktlänge betrug 1919 bp. Alle Primer haben eine Annealing-Temperatur von 55 °C

Primer zur Klonierung von SopE / SopE2:

JP30 (5'-Primer SopE): 5'-AAG CTT ACC ATG ACA AAA ATA ACT TTA TCT-3'  
 JP31 (3'-Primer SopE mit Stop): 5'-GGG TAC CGG GAG TGT TTT GTA TAT ATT T-3'  
 JP32 (3'-Primer SopE ohne Stop): 5'-GGG TAC CTC AGG GAG TGT TTT GTA TAT-3'

Produktlänge beträgt mit Stop 722 bp. Alle Primer haben eine Annealing-Temperatur von 58 °C

JP33 (5'-Primer SopE2): 5'-AAG CTT ACC ATG ACT AAC ATA ACA CTA TCC-3'  
 JP34 (3'-Primer SopE2 mit Stop): 5'-GGG TAC CGG AGG CAT TCT GAA GAT AC-3'  
 JP35 (3'-Primer SopE2 ohne Stop): 5'-GGG TAC CTC AGG AGG CAT TCT GAA GA-3'

Produktlänge beträgt mit Stop 738 bp. Alle Primer haben eine Annealing-Temperatur von 58 °C

Überprüfungsprimer für *S. typhimurium* prgH::TnPhoA (SPII-Mutante)

JP28 (prgH): 5'-CGT CGG TAT CTC GAG TAT ATC G-3'

JP29 (TnPhoA) 5'-ATC ACG CAG AGC GGC AGT CTG-3'

Die Primer wurden bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C verwendet.

MOMP-PCR Primer:

JP50 (5'-Primer): 5'-CTG TGG GAA TTC GG-3'

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

Die Primer wurden bei einer Annealing-Temperatur von 56 °C verwendet.

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 den Genus-spezifischen Nachweis von *C.pneumoniae*:

Cpn01B: 5'-AAA TCG TTG TTC ATG AAG GCC TAC T-3'

Cpn02B: 5'-TTT GCT GCA TAA CCT AGG TGT GTT T-3'

Cpn03(S): 5'-AGT TGA GCA TAT TCG TGA GG-3'

Cpn04(RAS): 5'-TTT ATT TCC GTG TCG TCC AG-3'

Diese Primer amplifizieren ein Teilstück des rpoB-Gens (Cpn0081) von *C. pneumoniae*.

Cpn01B und Cpn02B amplifizieren ein längeres Teilstück der rpoB Sequenz mit einer Länge von 487bp und haben eine Annealing-Temperatur von 60°C. Cpn03(S) und Cpn04(RAS) binden innerhalb dieses längeren Teilstücks und amplifizieren ein Stück von 126bp Länge. Sie haben eine Annealing-Temperatur von 55°C. Außerdem ist Cpn04(RAS) am 5'-Ende biotinyliert.

Cpn05(S): 5'-AGA TCA TGG TGT CAT TCG CCA A-3'

Dieser Primer (Hybridisierungssonde) bindet in dem Amplifikat und ist am 5'-Ende an Digoxigenin gekoppelt.

Cpn05(S)-DIGlab: 5'-AGA 5CA TGG TGT CAT 5CG CCA A-3'

Dieser Primer (Hybridisierungssonde) bindet in dem Amplifikat und ist am 5'-Ende sowie an den mit „5“ gekennzeichneten Stellen an Digoxigenin gekoppelt.

### Sequenzierprimer

Die beiden Sequenzierprimer wurden zur Sequenzierung von CT166 in pcDNA 3.1 CT-GFP-TOPO verwendet. Der Primer JP53 bindet in *sense*-Richtung innerhalb von CT166 während JP54 in *reverse*-Richtung im Vektor am 3'-Ende des inklonierten Gens annealt.

JP53: 5'-CTA CTT CTG GGT AGA TGA G-3'

JP54: 5'-ACT GTG CTG GAT ATC TGC-3'

### MOMP-Sequenzierprimer:

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

Der Sequenzierprimer bindet 11 bp unterhalb des 5'-Primers von MOMP (JP50).

### Sequenzierprimer zur Überprüfung inklonierter Inserts in den pSF91-IRES-eGFP-PRE

Vektor:

MS25: 5'-GTT AAG TAA TAG TCC CTC-3'

Pos. 1013 bis 1030 (Sense-Primer)

MS26: 5'-CGG CCA GTA ACG TTA GGG-3'

Pos. 2415 bis 2432 (RAS-Primer)

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

Oligo-(dT)<sub>24</sub> Primer 50 µM (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)

## 2.5.2 Vektoren

### **pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO<sup>TM</sup>** (Invitrogen, Karlsruhe)

Vektor (6,1 kb) mit CMV-Promotor und Ampicillin-Resistenz zur Einbringung von PCR-Amplifikaten über TOPO<sup>TM</sup>-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 (β-Galaktosidase) enthält

**pSF91-IRES-eGFP-PRE** (Prof. Dr. Baum, Molekulargenetik, MHH)

Dieser retrovirale Klonierungsvektor (7,1 kb) wurde freundlicherweise von Prof. Baum zur Verfügung gestellt. Er kodiert für das *enhanced green fluorescent proteine* und IRES. Der 5'-LTR stammt aus dem *spleen focus forming virus* SFFVp.

**2.6 Eukaryontische Zelllinien und Zellmedien**

Die eukaryontischen Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank gehalten. Die Inaktivierung des fetalen Kälberserums (Sigma) erfolgte durch 30minütiges Erhitzen bei 56°C. Die Zelllinien wurden zur Erhaltung in Antibiotika-freiem Medium kultiviert. Falls es die Versuchsbedingungen erforderten, wurde Penicillin in einer Endkonzentration von 50 U/ml und Streptomycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Die verwendeten Medien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Biochrom KG und GibcoBRL bezogen.

**HeLa T** (erhalten von Fr. Prof. Dr. R. Heilbronn, FU Berlin):

Humane Zelllinie epithel-artiger Morphologie, die aus einem Cervix-Karzinom isoliert wurde; Subklon von HeLa 229, der hohe Transformationseffizienz aufweist.

Medium: MEM-10

**HEp-2** (ATCC CCL-23):

Permanente, adhärenzte Zelllinie, die als Epidermis-Carcinoma-Linie etabliert wurde, bei der sich aber herausgestellt hat, dass sie durch Kontamination mit HeLa-Zellen entstand

Medium: siehe HeLa T

**HEK293** (ATCC CRL 1573):

Permanente, adhärenzte Linie aus humanem, frühembryonalen Nierengewebe; transformiert mit gescherter DNA des humanen Adenovirus Typ 5, hypotriploid (modale Chromosomenzahl 64) [*J. Gen. Virol.* (1977): **36**: 59; *Virology* (1977): **77**: 319].

Medium: DMEM

Panserin 401 (Cytogen, Sinn)

MEM-10: MEM Eagle with Earle's BSS, 2,2 g/l Natriumbicarbonat, 2 mM Glutamin, 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren (NEAS), 1 mM Natriumpyruvat, 10% FCS

MEM-5 MEM Eagle with Earle's BSS, 2,2 g/l Natriumbicarbonat, 5% FCS, 1% NEAS, 2mM Glutamin

RPMI 1640 (PBMC) RPMI 1640, 10 % FCS, 40 ng/ml GM-CSF

RPMI "Spezial": RPMI 1640 mit 10% FCS, 1% nicht essentiellen Aminosäuren,  
10 mM Hepes

DMEM: DMEM HAM's F12 (1:1), 10 % FCS, 1 mM Natriumpyruvat,  
2 mM Glutamin

## 2.7 Bakterien

*E. coli* Top10F' (Invitrogen, Karlsruhe), chemisch kompetent:

Genotyp: F{*laql*<sup>q</sup>*Tn10*(Tet<sup>R</sup>)} *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74*  
*deoR recA1 araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)1697 *galU galK rpsL endA1 nupG*

Kulturmedium: 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

*E. coli* TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe), chemisch kompetent:

Genotyp: F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lac80lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *deoR recA1*  
*araD139 (ara-leu)*7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*

Kulturmedium: siehe *E. coli* Top10F'

*Chlamydia trachomatis* D/UW-3/Cx, ATCC-Nummer: VR-885 :

Einfriermedium: 1 l PBS, 10 ml Phenolrot, 68,5 g Saccharose, 40µg/ml Gentamicin, 20 ml FCS

Infektionsmedium: Panserin 401 (Cytogen, Sinn), Serum-freies, definiertes Medium

Anzuchtmedium: Panserin 401\*:Panserin 401mit 20 µg/ml Cycloheximid (CHX, Sigma Chemicals,  
Deisenhofen)

*Chlamydia trachomatis* L2/434/Bu, ATCC-Nummer: VR-902B:

Medien: siehe *C. trachomatis* D

*Chlamydophila pneumoniae* CWL-029, ATCC-Nummer: VR-1310:

Medien: siehe *C. trachomatis* D

*Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* (*S. typhimurium*) wt, ATCC14028, wurde von  
Prof. Dr. Hück (CREATOGEN AG, Augsburg) zur Verfügung gestellt:

Anzuchtmedium: LB-Medium: 10 g/L Bacto-Trypton (Difco), 5 g/L Hefe-Extrakt (Merck) und 10 g/L NaCl

Infektionsmedium: Panserin 401

MEM Eagle with Earle's BSS, 2,2 g/l Natriumbicarbonat, 2 mM Glutamin, 0,1 mM nicht  
essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat

*S. typhimurium* prgH::TnPhoA (SPI1-Mutante, ATCC14028-Hintergrund), wurde von Prof. Dr. Hück (CREATOGEN AG, Augsburg) zur Verfügung gestellt:

Anzuchtmedium: LB-Medium: 10 g/L Bacto-Trypton (Difco), 5 g/L Hefe-Extrakt (Merck) und 10 g/L NaCl, 50 µg/ml Kanamycin

Infektionsmedium: wie *S. typhimurium* wt

*S. typhimurium* NpssV (SPI2-Mutante, ATCC14028-Hintergrund), wurde von Prof. Dr. Hensel (Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen) zur Verfügung gestellt:

Anzuchtmedium: LB-Medium: 10 g/L Bacto-Trypton (Difco), 5 g/L Hefe-Extrakt (Merck) und 10 g/L NaCl, 50 µg/ml Kanamycin

Infektionsmedium: wie *S. typhimurium* wt

*Salmonella enterica* Serovar *dublin* (eingefrorener Referenzstamm aus der Diagnostik, Med. Mikrobiologie Hannover, Med. Hochschule Hannover)

Anzuchtmedium: LB-Medium: 10 g/L Bacto-Trypton (Difco), 5 g/L Hefe-Extrakt (Merck) und 10 g/L NaCl

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>
- Beschreibung von Zytokinen: <http://www.copewithcytokines.de>
- Internet Seiten zur Array-Auswertung und Gen-Annotierung:  
<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>  
<http://apps1.niaid.nih.gov/david/>

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methode

#### 3.1.1 *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 und bei reiner RNA zwischen 1,9 und 2,0 liegen.

#### 3.1.2 *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 verbleibenden Phenols kann eine Nachextraktion mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) angeschlossen werden.

### **3.1.3 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.

#### **3.1.3.1 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 20 µg) 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 und photometrisch bestimmt.

#### **3.1.3.2 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 Waschschrift 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.

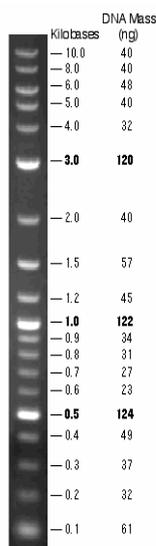
### 3.1.4 Agarosegelelektrophorese

Bei vielen natürlich vorkommenden Makromolekülen handelt es sich um geladene Teilchen, sie wandern daher im elektrischen Feld. Auf diesem Phänomen basiert eine sehr wichtige Methode zur Trennung und Analyse von Proteinen und Nukleinsäuren, die Elektrophorese.

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuregemischen nach Molekülgröße und elektrophoretischer Beweglichkeit. Die Temperatur, der pH-Wert und die Ionenstärke des Puffers, die Konformation der Nukleinsäure und vor allem die Dichte der Agarosegelmatrix bestimmen das Wanderungsverhalten.

Die Agarose wurde je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente (100 – 50.000 bp) in einer Konzentration von 0,8 % - 2,0 % (w/v in TBE-Puffer) eingesetzt, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit annähernd proportional dem Logarithmus des Molekulargewichts der DNA ist. Die Feldstärke betrug ca. 5 V/cm.

Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Agarosemenge in TBE-Puffer aufgeköcht und nach einem Abkühlen auf ca. 60°C in die vorbereitete Gelform gegossen. Nachdem die Agarose auspolymerisiert war, wurde das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Horizontalgelkammer gelegt. Die Nukleinsäureproben wurden mit 5x GEBS (final 1x GEBS) versetzt, in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese gestartet. Nach Beendigung wurde das Gel für 15 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (400 µl/300 ml H<sub>2</sub>O) gefärbt, für 10 Minuten im Wasserbad das überschüssige Ethidiumbromid entfernt und das Gel auf dem UV-Tisch mit dem E.A.S.Y.-Bildokumentationssystem abgelichtet.



Die DNA ist nach einer Färbung mit Ethidiumbromid auf UV-Illuminatoren bei 312 nm detektierbar. Ethidiumbromid ist ein planares, aromatisches Molekül, welches bevorzugt zwischen G:C-Basenpaare, interkaliert. Durch die reversible Einlagerung des Ethidiumbromids in den Nukleinsäurestrang erhöht sich dessen Fluoreszenzkraft etwa um den Faktor 20. Somit ist in Anwesenheit eines internen Standards eine semiquantitative Bestimmung der DNA-Konzentration möglich.

Zur Abschätzung der Fragmentgröße wurde die 2-log DNA-Ladder der Firma New England Biolabs eingesetzt (siehe links).

Zur Quantitativen Abschätzung der DNA-Konzentration wurde der  $\lambda$ -Hind III-Marker (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) verwendet:

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

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>-Bildokumentationssystems durchgeführt werden.

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

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

[144]

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 Ausgangs-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  $T_{M, \text{errechnet}} \pm 4 \text{ °C}$  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:

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

### 3.1.7 Klonierung

#### 3.1.7.1 Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die kurze DNA-Sequenzen erkennen, diese sequenz-spezifisch in beiden Strängen spalten. Man unterscheidet drei Gruppen von Restriktionsenzymen, die aus historischen Gründen als Typ I, II und III bezeichnet werden. In der Molekularbiologie finden hauptsächlich die Typ II-Restriktionsenzyme Verwendung, sie erkennen kurze, meist palindrome Sequenzen (4-6 bp) und spalten innerhalb oder in unmittelbarer Umgebung dieses Bereiches.

Alle Restriktionsendonukleasen benötigen  $Mg^{2+}$ -Ionen als Kofaktoren. Sie können den DNA-Strang entweder glatt durchschneiden, so dass „stumpfe“ Enden („*blunt-ends*“) entstehen oder sie spalten die beiden Stränge versetzt, wobei einzelsträngige komplementäre Enden („*sticky-ends*“) gebildet werden.

Für einen Restriktionsverdau wurden pro 1  $\mu$ g DNA 10 U des gewünschten Restriktionsenzym eingesetzt. Die Reaktion wurde unter den vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen durchgeführt, wobei der Glycerin-Gehalt im Gesamtvolumen maximal 5 % betrug. Je nachdem ob der Verdau zur Kontrolle einer Ligation oder zur Herstellung von geschnittenen Inserts bzw. Vektoren dienen sollte, wurde der Reaktionsansatz für ein bis 20 Stunden inkubiert und anschließend durch Zugabe von 5 x GEBS oder Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym gestoppt.

#### 3.1.7.2 Auffüllen von 5'-Überhängen mit Klenow-Fragment

Das Klenow-Fragment ist das größere Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli*, es kann zum Auffüllen von 5'-Überhängen an DNA-Stücken eingesetzt werden, die z. B. für eine „*blunt-end*“-Ligation benötigt werden, wenn sich Vektor und Insert nicht mit dem gleichen Restriktionsenzym schneiden lassen.

#### Beispielansatz (20 $\mu$ l-Ansatz)

16 $\mu$ l	Vektor bzw. Insert
2 $\mu$ l	10x EcoPol-Puffer (NEB)
1 $\mu$ l	2 mM dNTP
1 $\mu$ l	DNA PolymeraseI, Large Fragment (Klenow)

Der Ansatz wurde für 15 min bei 25°C inkubiert. Das Enzym wurde bei einer anschließenden Erwärmung auf 75°C für 20 min. hitzeinaktiviert.

### 3.1.7.3 Verdau von 3'-Überhang mit T4-DNA-Polymerase

Einige Restriktionsenzyme (z.B. *KpnI*) hinterlassen 3'-überhängende Enden, die für eine *blunt-end* Ligation abgedaut werden müssen. Das Klenow-Fragment besitzt nur geringe 3'-5'-Exonukleaseaktivität, das Abschneiden des 3'-überhängenden Endes ist daher nur bedingt möglich. Bei 3'-überhängenden Enden wird deshalb die T4-DNA-Polymerase verwendet. Wie beim Auffüllen von 5'-überhängenden Enden darf die Größe des Ansatzes 20 µl nicht überschreiten.

#### Beispielansatz (20 µl-Ansatz)

16 µl	Vektor bzw. Insert
2 µl	10x T4-DNA-Pol-Puffer (NEB)
1 µl	2 mM dNTP
1 µl	T4-DNA Polymerase (3 U/µl)

Der Ansatz wurde für 15 min bei 25°C im Wasserbad inkubiert und das Enzym im Anschluss für 20 min bei 75°C im Heizblock hitzeinaktiviert.

### 3.1.7.4 CIAP-Behandlung

Bei dem Restriktionsverdau eines Vektors entstehen kompatible Enden, die bei einer anschließenden Ligation mit sich selbst religieren können und somit den Anteil an Wunschklonen stark minimieren. Um dieses Problem zu verringern, kann der Vektor nach dem Verdau dephosphoryliert werden, d. h. die am 5'-Ende zurückbleibenden Phosphatreste, die für eine Ligation notwendig sind, werden abgespalten. Hierzu findet die *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (CIAP) ihren Einsatz. Zu dem geschnittenen und eventuell mit Klenow aufgefüllten Vektor wurden je 1/10 des Endvolumens an Enzym und 10 x Dephosphorylierungspuffer gegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. Es schloss sich eine 10-minütige Hitzeinaktivierung bei 75°C an.

### 3.1.7.5 Ligation

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-OH-Ende des einen DNA-Fragmentes und der 5'-Phosphatgruppe des anderen DNA-Stückes. Eine Ligation dient der Generierung neuer DNA-Konstrukte. Hierbei wird ein beliebiges entweder per PCR oder Restriktionsverdau hergestelltes Insert in einen durch enzymatische Spaltung geöffneten Vektor eingebracht. Es kann zwischen einer „*sticky*“- und einer „*blunt-end*“-Ligation unterschieden werden. Von dem verdauten mit CIAP-behandelten und wenn nötig mit Klenow-aufgefüllten Vektor wurden 10 µg/Ansatz in einem Gesamtvolumen von mindestens 10 µl eingesetzt. Das geschnittene Insert wurde in 3-, 10- oder 20-fachem molaren Überschuss zugegeben und bei „*blunt-end*“-Ligationen

zuvor ebenfalls mit Klenow aufgefüllt oder T4-DNA-Polymerase verdaut. Die Ligation wurde in 1 x Ligationspuffer unter Zugaben von 200 U (bei „*sticky-end*“-) bzw. 400 U (bei „*blunt-end*“-Ligationen) T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) durchgeführt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Als Kontrollen wurden zusätzlich der unverdaute Vektor, der Vektor mit Ligase und der Vektor ohne Zugabe des Enzyms mitgeführt.

### 3.1.7.6 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Die Transformation von *E. coli* erfolgte gerade nach „*blunt-end*“-Ligationen über die sehr effiziente Methode der Elektroporation [145], bei der die Zellmembranen durch kurze elektrische Pulse hoher Feldstärke für DNA-Moleküle durchlässig gemacht werden.

Für diese Art der Transformation wurden 40 µl elektrokompente Bakterien auf Eis kurz aufgetaut, mit der vorbereiteten DNA (2 µl gefällter Ligationsansatz oder 5 – 10 ng Plasmid-DNA) vorsichtig vermischt und 2 min auf Eis inkubiert. Nach Überführung in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Invitrogen, d = 2 mm) erfolgte die Elektroporation unter folgenden Bedingungen im GenePulser (Biorad): Widerstand  $R = 400 \Omega$ , Kondensatorkapazität  $C = 25 \mu\text{F}$  und Ausgangsspannung  $U = 2,5 \text{ kV/cm}$ . Die elektroporierten Zellen wurden sofort in 1 ml SOC-Medium überführt und bei 37°C zur Stabilisierung und zur Ausbildung der Plasmid-kodierten Antibiotikaresistenz 30 - 45 min im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit LB-Medium je nach erwarteter Kolonienzahl verdünnt, und je 100 µl auf vorgewärmte Selektionsagar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.1.7.7 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* (100µl) wurde in noch gefrorenem Zustand mit 2 - 5 µl Plasmid-DNA versetzt, gelegentlich gemischt und dabei für 30 – 60 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C, danach wurden die Zellen sofort auf Eis abgeschreckt und anschließend mit 900 µl LB-Medium (+ 20 mM Glucose) versetzt und zur Expression der Antibiotikaresistenz für 30 - 60 min bei 37°C im Schüttelinkubator erwärmt. Je nach erwarteter Kolonienzahl wurden 100 µl unverdünnt, 1:10 verdünnt und eventuell der gesamte Rest (hierzu wurde die Suspension 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert) auf Selektionsagar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.1.8 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.

#### 3.1.8.1 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 1 U *Taq* pro 100 µl Ansatz durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde durch eine Gelelektrophorese und anschließende Aufreinigung aus dem Gel isoliert.

#### 3.1.8.2 Durchführung der Klonierung

Die Klonierung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem CT-GFP Fusion TOPO-Cloning<sup>TM</sup> 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  ATG/GTG  NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

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) NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

```

### 3.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

[146]

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.

#### 3.1.9.1 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.

#### 3.1.9.2 Plasmid-Mini-Präparation

Von einer 3 ml Übernachtskultur mit den Plasmid-haltigen Bakterien werden 2 ml verwendet und die Bakterien, nach Sedimentation (13.000 rpm, 4 °C, 2 min Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, Osterode), durch eine alkalische Lösung lysiert. Nach Abzentrifugation (13.000 rpm, 4 °C, 5 min Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, Osterode) der Bakterienreste erfolgt eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit nachfolgender ethanolischer Fällung. Alternativ zu Phenol-Chloroform kann die Plasmid-DNA auch erst mit Isopropanol und anschließend mit Ethanol gefällt werden. Die Plasmid-DNA wird in der Regel in 20-25 µl Ampullen-Wasser resuspendiert.

### 3.1.10 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.

### 3.1.11 Nachweis von Mykoplasmen

Das hier angewandte Verfahren basiert auf einer PCR von Huniche *et al.* [147] 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 Chlamydien-Stocks, direkt zur Isolierung genomischer DNA (siehe 3.1.10) eingesetzt, oder aber bei Zellkulturproben wie unter 3.2.5 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.

### ***3.1.12 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 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.

### ***3.1.13 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.

### **3.1.14 Isolierung von RNA aus adhärennten Zellen**

[148]

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 Guanidiniumthiocyanat, welches die Zellen lysiert, dabei RNasen hemmt (Guanidiniumthiocyanat) 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.

### **3.1.15 Denaturierende RNA-Agarosegele**

Die Elektrophorese von RNA in denaturierenden Agarosegelen verläuft nach dem gleichen Prinzip wie die Gelelektrophorese in nicht denaturierenden Gelen (siehe 3.1.4).

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.

### 3.1.16 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird über eine Reverse Transkription (RT) aus RNA ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) erzeugt. Hierzu wird das Enzym Reverse Transkriptase verwendet, welches ebenso wie die DNA-Polymerase an einen kurzen doppelsträngigen Nukleotidstrang (hier aus DNA und RNA) bindet und den komplementären Gegenstrang zur RNA synthetisiert. Da sämtliche eukaryontische mRNA mit einem poly-A-Schwanz endet, kann hier ein 16-18 Nukleotide langes Oligo-dT-Stück als komplementäre DNA verwendet werden. Die RNA und Primer wurden in folgenden Volumina zusammen pipettiert und für zehn Minuten auf 70°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen:

5 µg	Gesamt-RNA
1 µl	Oligo dT <sub>15</sub> -Primer (0,5 mg/ml, Promega)
ad 12,6 µl	mit DEPC-Wasser

Die Proben wurden sofort für zwei Minuten auf Eis abgekühlt und mit einem zuvor hergestellten Mix aus nachstehenden Lösungen versetzt:

4 µl	5 x Superscript-Puffer
2 µl	0,1 M DTT
1 µl	10 mM Nukleotid-Mix
0,4 µl	RNase-Inhibitor (40 U/µl)

Nach einer zweiminütigen Vorinkubation auf 42°C wurde 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) zugegeben. Die gesamte Lösung wurde für weitere 35 Minuten auf 42 °C erhitzt und danach mit 40 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase folgte eine letzte Inkubation für fünf Minuten auf 90°C. Die cDNA wurde bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Zur Überprüfung der cDNA-Synthese und zur Kontrolle, ob eine Verunreinigung mit genomischer DNA vorliegt, wurde folgende PCR angeschlossen:

Reagenz	Volumen
10 x <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH 8,4)	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,4 µl
Primer-Mix (enthält je 5 pmol/µl der beiden zusammengehörigen Primer)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
ddH <sub>2</sub> O	4,5 µl

Der Mix wurde auf Eis angesetzt. 0,2 – 5 µl der cDNA wurden ebenfalls auf Eis mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt und mit dem Mix versetzt. Der Thermocycler wurde vor der Zugabe der Proben auf 94°C erhitzt und die PCR mit Zykluszeiten von 10 Sekunden sofort gestartet.

### 3.1.17 Verwendung von (cDNA-)Micro-Arrays

Micro-Arrays werden verwendet, um die Anwesenheit und Menge einer bestimmten RNA oder DNA in einer Probe zu ermitteln, wobei bei dieser 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 wurde der Micro-Array der Firma Affymetrix verwendet.

Die eingesetzten U95A Arrays der Firma Affymetrix verwenden 25 bp lange Oligonukleotiden, die photolithographisch auf einen Glasträger aufgebracht sind. Die zu untersuchende RNA wird mit T7-Oligo-dT<sub>24</sub>-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.

#### 3.1.17.1 Durchführung von Affymetrix Micro-Arrays

Die U95A-Micro-Arrays von Affymetrix wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Dabei wurden 8 µg Gesamt-RNA erst durch eine Reverse Transkription mit T7-dT<sub>24</sub>-Primern in cDNA mit dem Superscript *double-stranded* cDNA Synthesis Kit (GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben 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 cDNA wieder in cRNA mittels

T7-RNA-Polymerase umgeschrieben (RNA Bioarray High Yield RNA Transcript labeling Kit, Enzo Life Technologies Inc., New York, USA), wobei nur biotinylierte Nukleotide eingesetzt wurden. Die (c)RNA- und cDNA-Proben wurden auf einem Bioanalyzer 2100 mit einem Lab-on-a-chip (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) überprüft. Die Durchführung erfolgte dabei nach Herstellerangaben.

Nach einer Aufreinigung der cRNA mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) wurde die cRNA fragmentiert und mit den Affymetrix Arrays hybridisiert. Das Waschen der Arrays und die Inkubation mit Streptavidin-gekoppeltem Phycoerythrin erfolgte in der Fluidic Station 300 (Affymetrix). 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 Micro-Arrays erfolgte in dem Array-Scanner von Affymetrix mit Hilfe der Affymetrix Microarray Suite Software (Version 3.0). Die Auswertung der Rohdaten wurde von Dr. Jörg Lauber an der GBF, Braunschweig durchgeführt. Die Auswertung der regulierten Gene erfolgte über NetAffx (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>).

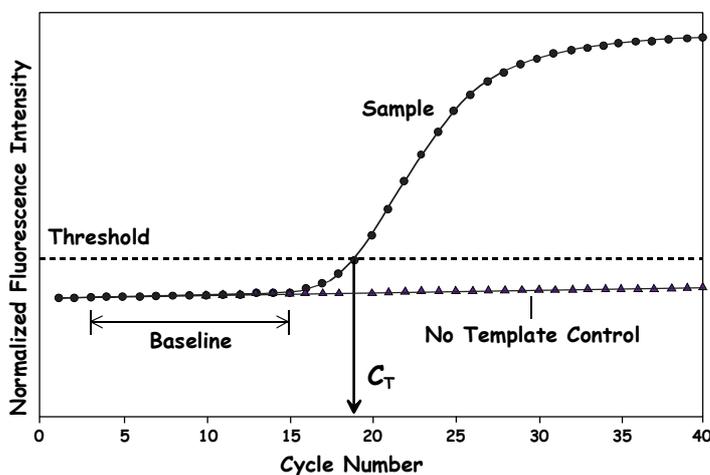
### **3.1.18 Real-Time RT-PCR**

Die *Real-Time* Quantitative PCR stellt eine geeignete Methode zur Untersuchung von Expressionskinetiken auf mRNA-Ebene dar.

Während der gesamten PCR wird die Menge an gebildetem Produkt über die Messung der Zunahme des Fluoreszenzsignals detektiert. Als Fluoreszenzfarbstoffe können z. B. so genannte TaqMan-Sonden oder interkalierende Heterozyklen eingesetzt werden. Bei den TaqMan-Sonden handelt es sich um Oligonukleotide, die sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende an Fluorophore gekoppelt sind. Ist die TaqMan-Sonde intakt, so befinden sich die beiden Fluorophore in räumlicher Nähe, wobei das eine als Donor beim Fluoreszenz Resonanzenergie Transfer (FRET) und das andere als Akzeptor fungiert. Die Fluoreszenz wird am Maximum des Donors aufgezeichnet, das heißt, solange der Energie-Transfer stattfindet und die Fluoreszenz „gequencht“ wird, ist das Signal minimal. Wird die Sonde während der Extension durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase abgebaut, so nimmt das Fluoreszenzsignal der gebildeten Template-Menge entsprechend zu [149]. Interkalierende Farbstoffe wie Ethidiumbromid oder das innovative SYBR<sup>®</sup> Green, welches ein wesentlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis liefert, werden unspezifisch in doppelsträngige DNA eingelagert, wodurch es zu einer starken Erhöhung der Quantenausbeute kommt [150]. Für diese Arbeit wurde ausschließlich SYBR<sup>®</sup> Green verwendet.

Die Quantifizierung erfolgt nicht über die Messung der absoluten Mengen an PCR-Produkt. Stattdessen nutzt man die Kinetik der PCR-Reaktion aus: In den frühen PCR-

Runden findet eine weitgehend exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt. Akkumuliert das Produkt, so steigen auch die störenden Einflüsse. Der Prozess verlangsamt sich zu einem linearen Wachstum und kommt dann gar zum Stillstand. Zeichnet man das Fluoreszenzsignal gegen die Zyklenzahl auf, so erhält man einen Amplifikations-Plot. Die ABI Prism 7000 SDS Software (Copyright Applied Biosystems) analysiert diesen Plot und bestimmt den Zyklus der PCR, in dem die Fluoreszenz der Probe erstmals signifikant über einen bestimmten Schwellenwert hinaus ansteigt, dieser Wert wird als *Threshold Cycle* ( $C_T$ ) bezeichnet. Der Schwellenwert ist als der Mittelwert des Fluoreszenzsignals der ersten Zyklen plus zehn Standardabweichungen definiert. Bei dem  $C_T$ -Wert handelt es sich um einen quantitativen Wert, je größer die Menge an anfänglich eingesetztem Template ist, desto früher steigt die Fluoreszenz über das Hintergrundrauschen hinaus, dies entspricht einem kleineren  $C_T$ -Wert.



**Tabelle 3.1** Schematische Darstellung des Ergebnisses eines *Real-Time* RT-PCR Laufes.

Aufgetragen ist die Zyklenzahl 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 Zyklenzahl bei der das Fluoreszenzsignal der Probe aus dem Hintergrund (Threshold) heraustritt, wurde hier durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Eine Probe, welche bekannte Mengen an Template enthält, wird zur Erzeugung einer Standard-Kurve herangezogen werden. Den  $C_T$ -Werten kann damit die entsprechende Konzentration zugeordnet werden. Trägt man die  $C_T$ -Werte gegen den Logarithmus der Template-Konzentrationen auf, so erhält man eine Gerade. Mittels der Gradengleichung lässt sich für jeden beliebigen  $C_T$ -Wert die zugehörige Konzentration berechnen.

Hierzu musste die Gesamt-RNA wie 3.1.16 erläutert in cDNA umgeschrieben werden, um anschließend in einem speziellen Thermocycler der Firma Applied Biosystems (ABI Prism 7000) amplifiziert zu werden. Das Fluoreszenzsignal, welches die Menge an gebildetem Template widerspiegelt, wird mit dem angeschlossenen ABI Prism 7000 Sequence Detektion System aufgezeichnet.

Bei Verwendung von SYBR<sup>®</sup> Green wird zusätzlich eine Schmelzkurve aufgezeichnet, anhand derer kontrolliert werden kann, ob tatsächlich nur ein spezifisches Produkt gebildet wurde. Die am häufigsten auftretenden unerwünschten Produkte entstehen bei der Amplifikation von sich teilweise überlappenden Primerteilstücken. Diese weisen jedoch einen niedrigeren Schmelzpunkt als die spezifischen Produkte auf und können in der Schmelzkurve identifiziert werden.

#### Generierung und Austestung der *Real-Time* RT-PCR-Primer und Sonden

Die für die *Real-Time* RT-PCR verwendeten Außen-Primer müssen einige spezielle Kriterien erfüllen:

- Sie sollten etwa zwischen 17 und 24 Nukleotide lang sein.
- Das Annealing sollte bei einer einheitlichen Temperatur stattfinden (60°C).
- Der von ihnen eingeschlossene Template-Bereich sollte zwischen 90 und 150 Bp lang sein.
- Der zu amplifizierende Bereich sollte eher am 3'-Ende des Gens liegen, um sicher zu sein, dass er während der Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben wurde.
- Der zu amplifizierende Bereich sollte sich nach Möglichkeit über eine Intron-Exon-Grenze erstrecken, so dass ein Amplifikat aus genomischer DNA eine andere Länge aufweist als das gewünschte cDNA-Produkt.

Ebenso müssen die TaqMan-Sonden nach ganz speziellen Vorgaben designed werden:

- Die Schmelztemperatur sollte 10°C über den Außen-Primern liegen.
- Es dürfen maximal drei gleiche aufeinander folgende Nukleotide vorkommen.
- Die Sonde darf maximal 30 bp lang sein.
- Der Abstand zum *sense*-Primer darf nicht größer als 50 bp sein.
- Am 5'-Ende darf kein G vorkommen (Quenching).

Zunächst wird in einer Standard-PCR überprüft, ob die Primer bei der gewünschten Annealing-Temperatur verwendbar sind und dabei keine weiteren unerwünschten Produkte entstehen. Daraufhin wird das Primerverhältnis gesucht, bei dem die Differenz der C<sub>T</sub>-Werte mit und ohne Template möglichst groß ist, das heißt der  $\Delta C_T$ -Wert. Bei ungünstigen Primerverhältnissen wird das Genstück wesentlich schlechter amplifiziert, und es können sogar unerwünschte Nebenprodukte aus Primerselbstamplifikation entstehen.

Die so genannte Primer-Matrix wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Von der nach folgendem Pipettierschema (Tabelle 3.2) erstellten Probe wurden in Doppelansätzen von je

25 µl eines Oligonukleotidgemisches mit angegebenem Verhältnis pro Ansatz mit 25 µl SYBR® Green PCR Mastermix (Applied Biosystems) versetzt und in einem *Real-Time* PCR-Lauf analysiert.

Primer-Verhältnis (3': 5'-Primer)	Template-Menge (1:100 von 10 ng/µl)	5'-Primer (5 pmol/µl)	3'-Primer (5 pmol/µl)	ddH <sub>2</sub> O
50 : 50 K	—	1,25 µl	1,25 µl	60 µl
50 : 50	2,5 µl	1,25 µl	1,25 µl	57,5 µl
50 : 300 K	—	1,25 µl	7,5 µl	53,75 µl
50 : 300	2,5 µl	1,25 µl	7,5 µl	51,25 µl
50 : 900 K	—	1,25 µl	22,5 µl	38,75 µl
50 : 900	2,5 µl	1,25 µl	22,5 µl	36,25 µl
300 : 50 K	—	7,5 µl	1,25 µl	53,75 µl
300 : 50	2,5 µl	7,5 µl	1,25 µl	51,25 µl
300 : 300 K	—	7,5 µl	7,5 µl	47,5 µl
300 : 300	2,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	45 µl
300 : 900 K	—	7,5 µl	22,5 µl	32,5 µl
300 : 900	2,5 µl	7,5 µl	22,5 µl	30 µl
900 : 50 K	—	22,5 µl	1,25 µl	38,75 µl
900 : 50	2,5 µl	22,5 µl	1,25 µl	36,25 µl
900 : 300 K	—	22,5 µl	7,5 µl	32,5 µl
900 : 300	2,5 µl	22,5 µl	7,5 µl	30 µl
900 : 900 K	—	22,5 µl	22,5 µl	17,5 µl
900 : 900	2,5 µl	22,5 µl	22,5 µl	15 µl

**Tabelle 3.2 Pipettierschema für die Aufstellung der Primer-Matrix.**

In der ersten Spalte sind die unterschiedlichen Primer-Verhältnisse in fmol/Ansatz aufgeführt. Das K bedeutet, dass der Probe kein Template zugefügt wurde. Die Konzentrationsangaben der Primer beziehen sich auf die verwendete Vorverdünnung.

### 3.1.18.1 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 (3,16; 1; 0,316; 0,1 und 0,0316 µl ebenfalls auf 5 µl mit Ampullen-Wasser aufgefüllt) ermittelt und anschließend die Menge über ein *Housekeeping*-Gen normiert. Hierbei werden die C<sub>T</sub>-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 das humane ribosomale 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.

## 3.2 Zell- und immunbiologische Methoden

### 3.2.1 Kultivierung von eukaryonten Zellen

Bei allen verwendeten Zelllinien handelte es sich um adhärenente 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 2.6).

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.

### 3.2.2 *Präparation von primären humanen Monozyten*

Für die Präparation von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) wurde das Blut aus einem *Buffy Coat* von gesunden Spendern 1:5 mit PBS (2 mM EDTA) verdünnt. Je 30 ml des verdünnten Blutes wurden sehr vorsichtig in einem 50 ml Polypropylenröhrchen über 20 ml Ficoll-Paque™ (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Schweden) geschichtet. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 400xg und 18°C wurde die Bande von mononukleären Zellen mit einer Kanüle abgenommen und in ein sauberes 50 ml Polypropylenröhrchen überführt. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (2 mM EDTA) gewaschen (Zentrifugation für 10 min. bei 400xg, 4°C) und in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> in entsprechendem Medium (die Optimierung erfolgte in dieser Arbeit) in Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen ausgesät.

Monozyten adhäreren im Gegensatz zu lymphozytären Zellen an Kunststoffoberflächen. Diese Eigenschaft kann ausgenutzt werden, um die beiden Zellfraktionen voneinander zu trennen.

Nachdem die Zellen für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden, folgte ein zweimaliges Waschen mit vorgewärmtem PBS. Bei diesem Schritt wurde ein Großteil der nichtadhärenenten lymphozytären Zellen fortgespült. Die in der Zellkulturflasche verbleibenden adhärenenten Monozyten wurden erneut mit vorgewärmtem Medium bedeckt und bis zum Gebrauch bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Standardmäßig besitzen die aufgereinigten Monozyten eine Reinheit von 75-80%. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Monozyten wurden von Myriam Schaefer zur Verfügung gestellt.

### 3.2.3 *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 mm<sup>3</sup> (Kammerhöhe = 0,1 mm; Kammerfläche = 4 mm<sup>2</sup>). In der Regel wurden die Zellen mit einem gleichen Teil Trypanblau verdünnt.

### **3.2.4 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 20-50 µg/ml für zwei Wochen kultiviert.

Anschließend werden die Zellen zwei weitere Wochen ohne Antibiotikum kultiviert und danach überprüft, ob die Behandlung erfolgreich war (siehe 3.1.11). Sollten noch Mykoplasmen nachgewiesen werden wird die Behandlung wiederholt und dabei die Konzentration an Ciprofloxazin nach Möglichkeit erhöht.

### **3.2.5 Gewinnung von Zellkulturproben zur Überprüfung auf Mykoplasmen-Kontamination**

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

### **3.2.6 Transiente Transfektion von humanen Zelllinien**

Das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryote Zellen wird als Transfektion bezeichnet und kann über verschiedene Methoden (Calciumphosphat-, die DEAE-Dextran-, die Liposomen-Technik sowie die Elektroporation von Zellen) erfolgen. Es wird zwischen der transienten Transfektion, bei der ein Plasmid vorübergehend in die Zelle eingeschleust wird und der stabilen Transfektion, bei der die DNA dauerhaft in das Genom der Zielzelle integriert wird, unterschieden.

Die Wahl der Transfektions-Methode ist in erster Linie abhängig von der verwendeten Zelllinie. Die Calciumphosphat-Methode bietet den eindeutigen Vorteil, dass sie am billigsten ist, da sämtliche Lösungen selbst hergestellt werden können, allerdings hat man mit höheren Schwankungen der Transfektionseffizienz zu rechnen.

Die Effizienz der transienten Transfektionen wurde mittels des  $\beta$ -Galaktosidase-Assays gemessen.

### 3.2.6.1 Transiente Transfektion nach der Lipofectamine™-Methode

Bei der Lipofectamine™-Methode handelt es sich um eine Liposomen-vermittelte Transfektions-Methode, welche auf der Interaktion zwischen negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA-Moleküle (hier Plasmiden) und der positiven Oberfläche von Liposomen beruht. Die Liposomen setzen sich hierbei aus kationischen und neutralen Lipiden zusammen. Der Weg auf dem die DNA anschließend in die Zelle gelangt, ist unklar: Wahrscheinlich interagieren die restlichen, freien positiven Ladungen auf den Liposomen mit Sialinsäureresten der Zelloberflächen und bringen so die DNA an die Zelle heran. Die Aufnahme der DNA in die Zelle erfolgt daraufhin durch Endozytose oder durch das Verschmelzen der Liposomen mit der Zellmembran.

In dieser Arbeit wurden HEK293 und HeLa-Zellen mit dem Lipofectamine™-Reagenz der Firma Invitrogen transfiziert. Das folgende Protokoll bezieht sich auf eine 6-Lochplatte. Am Vortag der Transfektion wurden  $2 \times 10^5$  (HeLa) bzw.  $5,1 \times 10^5$  (HEK293) Zellen je well ausgesät. Am nächsten Morgen wurden in einem ersten Reaktionsgefäß 1 µg DNA auf 100 µl (HeLa) bzw. 0,77 µg auf 77 µl (HEK293) mit Optimem (bei Verwendung des Lipofectamine™-Reagenz muss auf den Zusatz von Penicillin/Streptomycin verzichtet werden) aufgefüllt und gut durchmischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurde eine Lösung aus 6 µl Lipofectamine™ und 94 µl Optimem (HeLa) bzw. 4,6 µl Lipofectamine™ und 72,6 µl Optimem (HEK293) erstellt, ebenfalls gut durchmischt und vorsichtig auf den Untergrund geklopft, so dass sich die beiden Lösungen bei der tropfenweisen Zugabe der DNA-Lösung vermischen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei RT. Kurz vor dem Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und daraufhin tropfenweise mit dem DNA/Lipofectamine™-Gemisch versetzt, dem zuvor noch 800 µl (HeLa)/ 460 µl (HEK) Optimem zugefügt worden sind. Nach einer fünfstündigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte eine Zugabe von 1 ml (HeLa)/1,35 ml (HEK293) Medium mit 20 % FCS. 18 – 24 Stunden nach dem Transfektions-Start wurde das Medium komplett abgenommen und gegen frisches Medium mit 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin ausgetauscht.

Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> belassen.

### 3.2.6.2 Metafecten-Transfektion

Wie bei Lipofectamine™ handelt es sich bei Metafecten™ (Biontex, München) um eine Liposomen-vermittelte Transfektions-Methode. Ausschließlich HeLa-Zellen wurden mit Metafecten™ transfiziert. Die Transfektionen wurden in 6- und 24-Lochplatten mit den in Tabelle 3.3 angegebenen Bedingungen verwendet. Diese wurden unter Angaben des Herstellers durch Ermittlung der höchsten Transfektionseffizienz (β-Galaktosidase-Assay) nach Transfektion ausgetestet.

	Zellzahl (Transfektionstag)	Plasmid- DNA	Füllvolumen 1	Metafecten	Füllvolumen 2	Kultur- medium
6-Loch	$4 \times 10^5$	3 $\mu\text{g}$	auf 100 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$	auf 100 $\mu\text{l}$	2 ml
24-Loch	$8 \times 10^4$	0,5 $\mu\text{g}$	auf 30 $\mu\text{l}$	1,5 $\mu\text{l}$	auf 25 $\mu\text{l}$	0,5 ml

**Tabelle 3.3 Bedingungen für Metafecten-Transfektion bei HeLa-Zellen**

Die Zellen wurden am Vortag (18-24 h vor der Transfektion) in den Lochplatten ausgesät. Pro Transfektionsansatz werden zwei Reaktionsgefäße benötigt:

- Gefäß A:** Plasmid-DNA auffüllen mit **serum- und antibiotikafreiem** Kulturmedium auf Füllvolumen 1
- Gefäß B:** Metafecten auffüllen mit **serum- und antibiotikafreiem** Kulturmedium auf Füllvolumen 2

Die reinen Plasmid-DNA und Metafecten-Lösungen sollten nicht lange mit den Gefäßwänden in Kontakt stehen. Daher werden beide Lösungen innerhalb von 5 min vereinigt und gut gemischt. Der Transfektionsansatz sollte 15-20 min bei RT inkubieren. Die Transfektionsansätze werden anschließend in das frische Kulturmedium entsprechend Tabelle 3.3 getropft und gut verteilt. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter inkubiert und nach 24 h das Medium gewechselt.

### 3.2.6.3 Transiente Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode

Bei der Calciumphosphat-Methode wird die DNA mit Calciumchlorid und einer phosphathaltigen Pufferlösung vermischt. Dabei bilden sich feine DNA-Calciumphosphat-Kristalle, die sich, wenn sie mit Zellen in Kontakt kommen, auf der Zelloberfläche niederschlagen. Die eigentliche Einschleusung der DNA findet daraufhin über einen Endozytoseprozeß statt.

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  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA wurden mit TE-Puffer auf 80  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit 11,5  $\mu\text{l}$  CaCl<sub>2</sub>-Lösung (2 M) versetzt. Unter stetiger Luftzufuhr (hier erreicht durch die Verwendung einer Spritze mit Kanüle) wurden 91,5  $\mu\text{l}$  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.

#### 3.2.6.4 Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels $\beta$ -Galaktosidase-Assay

Das *lacZ*-Gen aus *E. coli* kodiert ein Enzym, die  $\beta$ -Galaktosidase, welches die hydrolytische Spaltung von  $\beta$ -Galaktosiden in  $\beta$ -Galaktose und einen Rest katalysiert. So kann nach einer Transfektion überprüft werden, ob die Zellen  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren und somit die Transfektion erfolgreich war. Als Reportermolekül wurde hier das x-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranose) verwendet, welches durch  $\beta$ -Galaktosidase in  $\beta$ -Galaktose und den tiefblauen Farbstoff 5-Bromo-4-chloro-indigo gespalten wird.

Für die Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden Zellen mit dem Plasmid pcDNA3.1- His/LacZ transient transfiziert. Um den Zellen Zeit zu geben,  $\beta$ -Galaktosidase zu exprimieren, erfolgte der Nachweis des entsprechenden Farbstoffs erst drei Tage nach der Transfektion. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit PBS-Glutaraldehyd für 10 min fixiert und nach anschließendem zweimaligem 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 entspricht dem Anteil der blau-gefärbten Zellen an der Gesamtheit der Zellen.

#### 3.2.7 Zytoskelett-Färbung

Das Zytoskelett ist ein komplexes Netzwerk verschiedener Proteinfilamentsysteme, welches der eukaryontischen Zelle die Fähigkeit verleiht sowohl die Form zu verändern, wie auch koordinierte und zielgerichtete Bewegungen durchzuführen.

Zur Färbung des Zytoskeletts wird Phalloidin-TRITC (Sigma Chemicals, Deisenhofen) verwendet. Phalloidin, das Gift des weißen Knollenblätterpilzes, bindet an F-Aktin (filamentöses Aktin). Durch Kopplung von Phalloidin an das Fluorochrom TRITC (Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat) ist eine Lokalisierung von Aktin in den untersuchten Zellen möglich, die rot fluoreszierend erscheinen.

Zur Färbung wird das Medium von den transfizierten Zellen komplett abgenommen und diese PBS gewaschen. Die Zellen werden mit 4 % Paraformaldehyd für 15 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wird das Paraformaldehyd abgenommen und erneut mit PBS gewaschen. Die Zellen werden mit Blocking-Puffer für 30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen.

Die Deckgläschen werden auf einen Objektträger mit Entellan geklebt. Auf ein Gläschen wird Phalloidin-TRITC (1 mg/ml) in Blocking-Puffer (1:400) verteilt und der Objektträger in einer lichtgeschützten Schale auf feuchten Tüchern in den Brutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) gestellt.

Nach 30 min Inkubation wird der Objektträger 3x durch jeweils 10faches Eintauchen mit PBS gewaschen, anschließend vorsichtig abgewischt und lichtgeschützt getrocknet. Nach dem vollständigen Trocknen wird die Deckflüssigkeit (MOWIOL) auf das Gläschen gegeben und ein Deckglas auf den Objektträger aufgebracht. MOWIOL sollte mindestens 1 h, besser 24 h bei RT lichtgeschützt eintrocknen. Über Fluoreszenzmikroskopie (Excitation bei 550 nm und Emission bei 570 nm) kann das Zytoskelett betrachtet werden.

### 3.2.8 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.

#### 3.2.8.1 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.

#### 3.2.8.2 Durchführung des ELISA

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

Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl/Loch eines monoklonalen Antikörpers (*capture antibody*) für die nachzuweisende Substanz beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden für eine Stunde mit einem sogenannten Blocking-Reagenz (PBS + 1 % BSA + 5 % Sucrose) abgesättigt (300 µl/Loch). Nach einer zweistündigen Inkubation mit 100 µl/Loch der Probe bzw. des Standards wurden 100 µl des zweiten biotinylierten Antikörpers (*detection antibody*) in jedes Loch pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde wiederum bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation mit 100 µl/Loch des an Streptavidin gekoppelten Enzyms Meerrettich-Peroxidase. In einer anschließenden Nachweisreaktion wurden 100 µl/Loch der Substrat-Lösung (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Tetramethylbenzidine, R&D Systems) gegeben. Die Farb-Reaktion wurde nach etwa 30 Minuten durch die Zugabe von 50 µl/Loch der Stop-Lösung (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) beendet. Dreimaliges Waschen mit je 400 µl/Loch des Waschpuffers (0,05 % Tween 20 in PBS, pH 7,4) nach jedem Inkubationsschritt gewährleistet die Entfernung von nicht gebundenen Substanzen. Demnach sollte der Substratumsatz direkt proportional zur Menge des eingesetzten Enzyms, also auch zur Menge der nachzuweisenden Substanz sein.

### 3.3 Methoden zum Arbeiten mit Chlamydien und Salmonellen

Alle Arbeiten mit lebenden Chlamydien und Salmonellen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Arbeiten außerhalb der Sicherheitswerkbank wurden in aerosoldichten Behältnissen ausgeführt. 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 Chlamydien-Stämmen und auch bei Salmonellen-Infektion genutzt werden kann. Außerdem führte sie zu einer sehr hohen Infektionsrate und der Zeitpunkt der Infektion kann sehr genau ermittelt werden. Die Zellen werden 24 h vor Infektion 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.

#### 3.3.1.1 Abtöten von Chlamydien und Salmonellen durch Bestrahlung mit UV-Licht

Um die passiven Beeinflussungen der Wirtszellen durch Chlamydien und Salmonellen zu untersuchen, wie etwa die Zellantwort auf LPS oder Hitzeschockproteine, müssen die Bakterien abgetötet werden. Dies muss allerdings schonend ablaufen, damit die Proteine auf der Oberfläche der Chlamydien nicht denaturiert werden. Daher ist es nicht möglich die Bakteriensuspension stark zu erhitzen. Andere Möglichkeiten zum Abtöten von Bakterien sind die radioaktive Bestrahlung. 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 Suspension in einem Eppendorfgesäß auf Eis in den UV-Stratalinker (Stratagen, La Jolla, USA) gestellt und mit einer Energie von 10 kJ bestrahlt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Bakterien immer gekühlt blieben. Anschließend wurden die abgetöteten Chlamydien oder Salmonellen direkt in einen Versuch eingesetzt oder bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.3.2 Chlamydien

#### 3.3.2.1 Infektion von adhärennten Zellen mit Chlamydien

Chlamydien-Stämme unterscheiden sich sehr stark in ihrer Infektiosität. Daher können, je nach Chlamydien-Stamm, verschiedene Verfahren zur Infektion angewandt werden. Bei sehr infektiösen Chlamydien-Stämmen 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.

Bei einer Anzucht der Chlamydien zur Stock-Herstellung wurde dabei Panserin 401-Medium mit Cycloheximid (Panserin 401\*) 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 Panserin 401 ohne Zusätze verwendet, da so definierte Bedingungen vorlagen. Die Zellen wurden mit den Chlamydien bei 2000xg und  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  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  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bei *C. pneumoniae*  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank.

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  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit neuem Medium versorgt. Es können Zellen in beliebigem Kulturgeäß verwendet werden.

#### 3.3.2.2 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 beigefügt, 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 Fluoreszenz-Mikroskop 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.

### 3.3.2.3 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 und Chlamydien-Spezies, 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

#### 3.3.2.4 Aufreinigung von Elementarkörperchen (EK)

Da Chlamydien obligat intrazellulär wachsen, ist es schwierig eine reine Chlamydien-Suspension zu erhalten. Dies ist aber für Experimente, bei denen die Auswirkungen von Chlamydien auf eukaryonte 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 Chlamydien-Material, Bandenmaterial, semireinen und hochreinen Chlamydien unterschieden.

#### 3.3.2.5 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 1 h 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.

#### 3.3.2.6 Erzeugung von semireinem Material

Beim semireinen Material handelt es sich um Chlamydien, die von Zelltrümmern befreit sind. Dazu wird der infizierte Zellrasen, mit überwiegend Elementarkörperchen, vom Boden des Kulturgefäßes abgeschabt, und die Zellen in 50 ml Falcons durch Glasperlen (1,7 bis 2 mm, Roth, Karlsruhe) mechanisch zerstört. Die Zelltrümmer werden bei 500xg für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand mit den infektiösen Chlamydien wird bei 12000 rpm, 4 °C in 1 h sedimentiert (Modell J2-21, Rotor JA-20, Beckman Coulter, Unterschleißheim). Das Sediment wird mit Einfriermedium gewaschen, erneut bei

12000 rpm, 4 °C in 1 h sedimentiert und in Einfriermedium bei -70 °C gelagert. Da dieses Material eine große Anzahl infektiöse Chlamydien enthält, wird es bei Versuchen mit hohen Bakterienzahlen verwendet.

### 3.3.2.7 Aufreinigung von Chlamydien durch Ultrazentrifugation

Die anderen beiden Sorten von Chlamydien-Material, hochreine Chlamydien und Bandenmaterial, entstehen bei der Auftrennung von Chlamydien und Zelltrümmern durch Ultrazentrifugation (UZ) durch ein Urografen-Kissen. Diesem Verfahren liegt zugrunde, dass die verschiedenen Bestandteile eines solchen Chlamydien-Zell-Gemisches während der Zentrifugation unterschiedlich schnell in Urografen 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 Urografen isoliert werden, die ebenfalls Chlamydien enthält, aber nicht ganz frei von Zelltrümmern ist. Dieses Gemisch wird als Bandenmaterial bezeichnet.

Die Ausbeute an hochreinem Chlamydien-Material liegt in der Regel bei 1 % bis maximal 10 % des Ausgangsmaterials, 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 meisten 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 nochmal mit wenig frischem Medium abgespült und das Medium zu der Chlamydien-Suspension 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 Urografen (Schering, Berlin) gefüllt, dies mit 1 ml 10%igem Urografen vorsichtig überschichtet und anschließend 4 ml krudes Chlamydien-Material 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. Die beiden Fraktionen Bandenmaterial wurden auf 50 ml mit Einfriermedium aufgefüllt und die Chlamydien in 1 h bei 4 °C und 12000 rpm (Modell J2-21, Rotor JA-20, Beckman Coulter, Unterschleißheim) erneut sedimentiert. Sowohl das Bandenmaterial wie auch das pelletierte reine Chlamydien-Material wurde in Einfriermedium resuspendiert, eine Sterilkontrolle auf Kochblut durchgeführt und in Zellkulturmedium angelegt (1 Woche Inkubation bei 37 °C). Das hochreine Material wurde aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Das Pellet wurde in Einfriermedium resuspendiert, es wurde ebenfalls eine Sterilkontrolle angelegt und das Material aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Sowohl das semireine Material wie auch alle Fraktionen aus **einem** UZ-Lauf, beide Fraktionen reines Material und Bandenmaterial, werden als Stock bezeichnet. Von ihnen 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.

Alle verwendeten Chlamydien-Stöcke sind mittels eines *Nested*-PCR Verfahrens mit einer Empfindlichkeit von 10 Erregern negativ auf Mycoplasmen (Methoden, 3.1.11) getestet worden. Außerdem wurden die *C. trachomatis* D und L2-Stöcke mit einem in einer laufenden Dissertation von K. Endlich etablierten PCR-Verfahren auf das chlamydiale Gen CT166 überprüft. Die Stöcke wurden mit dem CT166-PCR-Verfahren mit einer Reinheit von 99,99% auf *C. trachomatis* D bzw. L2 getestet. Zusätzlich wurden Teile aus dem variablen Bereich des MOMP-Gens, das ebenfalls zur Unterscheidung dienen kann, in den Vektor pcDNA3.1 CT-GFP-TOPO durch TOPO-Cloning inkloniert und sequenziert.

### 3.3.3 *Salmonellen*

Im Gegensatz zu Chlamydien benötigen Salmonellen zur Vermehrung keine Zellen sondern lassen sich in LB-Medium über Nacht kultivieren. Die Infektiosität ist dabei vom TypIII-Sekretionsapparat auf der Pathogenitätsinsel SPI1 abhängig, dessen Expression vom pH-Wert und Sauerstoffgehalt abhängig ist [151]. Die Optimierung und Anpassung der Salmonellen-Infektion war Bestandteil dieser Dissertation und wird unter 4.2.5 genauer erläutert.

#### 3.3.3.1 Aufarbeitung

Für Salmonellen Infektionsversuche müssen immer frisch aufgearbeitete Stöcke verwendet werden. Dazu werden Kulturen in möglichst luftdichten Kulturröhrchen ohne Schütteln in LB-Medium angezogen (mikroaerophile Bedingungen). Während der Wildtypstamm ohne

Antibiotika inkubiert wird, werden der SPI1- und SPI2-Mutante 50 µg/ml Kanamycin zugefügt. Nach 16 h findet die Aufarbeitung statt. Es wird durch photometrische Messung bei 600 nm die Gesamt-Menge CFU (*colony forming units*, Kolonie bildende Einheiten) bestimmt, wobei  $1 \text{ OD}_{600} = 1,1 \times 10^9 \text{ CFU/ml}$  entspricht. Die Salmonellen werden bei 5000xg, 4 °C für 5 min abzentrifugiert und einmal mit eisgekühlten PBS einmal gewaschen. Nach Zentrifugation bei 5000xg, 4 °C für 5 min wird der Überstand komplett abgenommen und das Pellet in eisgekühltem serumfreien Medium (MEM mit Zusätzen aber ohne FCS, oder Panserin 401) resuspendiert. Aus diesem Stock können je nach Versuch weitere Vorverdünnungen in serumfreien Medium angesetzt werden. Bis zur Infektion werden die Salmonellen weiter auf Eis gehalten. Zur Kontrolle der Stock- und Verdünnungs-CFU wird ein Aliquot in einer Verdünnungsreihe auf LB-Agar ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank über Nacht kultiviert.

### 3.3.3.2 Infektion adhärenter Zellen und Monozyten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das bestehende Infektionsprotokoll der **AG Hück** an das Infektionsmodell für Chlamydien angepasst (**angepasstes Protokoll**). Alle vorgestellten Arbeiten mit Salmonellen wurden mit dem angepassten Protokoll durchgeführt. Vor Infektion wurden die verwendeten Zellen mit eisgekühlten PBS gewaschen und das entsprechende gekühlte Medium vorgelegt. Die Salmonellen werden je nach MOI (*multiplicity of infection*, Bakterien je Zelle) zum Medium gegeben.

#### **Protokoll AG Hück**

Nach Zugabe der Salmonellen in das Medium wurden die Zellen 5 min bei 37 °C mit 500xg zentrifugiert. Die Zellen wurden erst 30 min bei 4 °C und dann 1 h bei 37 °C inkubiert. Extrazelluläre Salmonellen sind nach dem Waschen der Zellen durch 100 µg/ml Gentamycin in Medium für 15 min abgetötet worden (Ende der Infektion, Zeitpunkt 0 h).

#### **Angepasstes Protokoll**

Die Zellen wurden nach Zugabe der Salmonellen in das Medium 15 min bei 4 °C mit 2000xg zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurden extrazelluläre Salmonellen durch 100 µg/ml Gentamycin in Medium für 15 min abgetötet. Nach dem Abtöten der extrazellulären Salmonellen (Ende der Infektion, Zeitpunkt 0 h) wurden die Infektionsversuche, sofern nicht anders angegeben, mit 10 µg/ml Gentamycin im Medium weiter kultiviert.

Zur Infektion von Monozyten (MOI 25) werden diese am Tag der Infektion mit Trypsin/EDTA abgelöst und  $4 \times 10^5$  Monozyten in 24-Lochplatten in RPMI 1640 ohne AB-Serum verteilt. Die weitere Infektion wird wie bei adhärenen Zellen beschrieben fortgeführt.

### 3.3.3.3 Bestimmung der Anzahl intrazellulärer Salmonellen

Um ein Maß für die Infektiösität der Salmonellen zu erhalten, wird die Anzahl an intrazellulären Salmonellen bestimmt. Dies ist zum einen durch Färbung der Salmonellen mit Antikörpern oder durch Zellyse und anschließender Bestimmung der CFU in den Lysaten möglich. Bei Färbung müssen die Zellen auf Glasplättchen ausgesät und infiziert werden. Da bei der Färbung die Unterscheidung extra- und intrazellulärer Erreger bei hohen Bakterienzahlen nicht möglich war, wurde in allen Infektionsversuchen die Infektiösität durch Zellyse ermittelt. Zur Bestimmung der Infektionsrate wurden die Zellen nach der Infektion (Zeitpunkt 0 h) lysiert und in Verdünnungsreihen auf LB-Agar ausgestrichen. Die Infektionsrate entspricht der Anzahl intrazellulärer Salmonellen auf Gesamt-Zellzahl am Infektionstag.

#### **Färbung**

Zur Detektion der Salmonellen wurde als erster Antikörper Kaninchen-Anti-Antigen O (*Salmonella*) (Difco) verwendet. Die infizierten Zellen auf Glasplättchen werden nach Abnahme des Mediums mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen werden auf einen Objektträger mit Entellan geklebt. Der erste Antikörper wird 1:1000 in Blocking-Puffer verdünnt auf dem Glasplättchen verteilt. Anschließend wird der Färbe-Ansatz in einer feuchten Schale für 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wird als zweiter Antikörper Ziege-Anti-Kaninchen, FITC-markiert (Dianova, Hamburg) 1:4000 in Blocking-Puffer (mit 25 ng/ml Evans Blue) auf dem Glasplättchen verteilt. Die Färbung wird lichtgeschützt bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer feuchten Schale inkubiert. Die Zellen werden mehrfach mit PBS gewaschen und lichtgeschützt getrocknet. Anschließend wurden sie mit dem Chlamydien-Eindeckmedium versehen, mit einem Deckgläschen abgedeckt und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Excitation bei 490 nm, Emission bei 520 nm) beurteilt.

#### **Zellyse durch Deoxycholat**

Infizierte Zellen werden nach Waschen mit 0,5 % Deoxycholat-Lösung überspült und die Zellen komplett lysiert. Das Lysat wird in Verdünnungsreihen in PBS auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### **3.3.4 Chlamydiale Persistenzmodelle**

Zur Erzeugung von Persistenz bei Chlamydien stehen verschiedene Modelle zur Verfügung. Die Eisen-Mangel induzierte Persistenz mit Deferoxamin Mesylat, IFN- $\gamma$ - und Antibiotika-induzierte Persistenz (mittels Penicillin G) sind dabei sehr verbreitete Methoden. Die Etablierung der drei wichtigsten Persistenzmodelle bei *C. trachomatis* und

*C. pneumoniae* ist Bestandteil dieser Dissertation. Genauere Angaben zur Optimierung werden daher unter 4.1.1 erläutert.

### **C. trachomatis D (MOI 1)**

#### **DAM:**

16 h vor Infektion wird das Medium gegen MEM-5 mit 250 µM DAM ausgetauscht und die Zellen weiter inkubiert. Die Infektion mit *C. trachomatis* D findet im DAM-haltigen Medium statt. Nach der Zentrifugation werden die Zellen gewaschen und mit MEM-5 mit 250 µM DAM bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 30 min wird das Medium ohne Waschen erneut gewechselt (MEM-5 mit 250 µM DAM). Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter inkubiert.

Zur Reaktivierung wird der Überstand abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen werden mit neuem MEM-5 ohne DAM, aber mit 400 µg/ml Holo-transferrin kultiviert.

#### **IFN-γ:**

Die Zellen werden ohne IFN-γ in RPMI „Spezial“ Medium infiziert. 30 min nach Infektion wird das Medium gewechselt und RPMI „Spezial“ mit der finalen Konzentration von 200 U/ml IFN-γ zugegeben. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter inkubiert.

Zur Reaktivierung wird der Überstand abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen werden mit neuem RPMI „Spezial“ ohne IFN-γ, aber mit 200 µg/ml L-Tryptophan kultiviert.

#### **Penicillin G:**

Die Zellen werden ohne Penicillin G in RPMI „Spezial“ Medium infiziert. 30 min nach Infektion wird das Medium gewechselt und RPMI „Spezial“ mit der finalen Konzentration von 500 U/ml Penicillin G zugegeben. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter inkubiert.

Zur Reaktivierung wird der Überstand abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen werden mit neuem RPMI „Spezial“ ohne Zusätze kultiviert.

### **C. pneumoniae (MOI 30)**

#### **DAM:**

Die Infektion mit *C. pneumoniae* findet in RPMI „Spezial“ mit 250 µM DAM statt. Nach der Zentrifugation werden die Zellen gewaschen und mit MEM-5 mit 250 µM DAM bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 30 min wird das Medium ohne Waschen erneut gewechselt (MEM-5 mit 250 µM DAM). Die Zellen werden bei 35 °C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter inkubiert.

Zur Reaktivierung wird der Überstand abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen werden mit neuem MEM-5 ohne DAM, aber mit 800 µg/ml Holotransferrin kultiviert.

#### **IFN- $\gamma$ :**

Die Zellen werden in RPMI „Spezial“ Medium infiziert. 30 min nach Infektion wird das Medium gewechselt und RPMI „Spezial“ mit der finalen Konzentration von 100 U/ml IFN- $\gamma$  zugegeben. Die Zellen werden bei 35 °C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter inkubiert.

Zur Reaktivierung wird der Überstand abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen werden mit neuem RPMI „Spezial“ ohne IFN- $\gamma$ , aber (sofern nicht anders angegeben) mit 200 µg/ml L-Tryptophan kultiviert.

#### **Penicillin G:**

Die Zellen werden in RPMI „Spezial“ Medium infiziert. 30 min nach Infektion wird das Medium gewechselt und RPMI „Spezial“ mit der finalen Konzentration von 500 U/ml Penicillin G zugegeben. Die Zellen werden bei 35 °C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter inkubiert. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter inkubiert. Zur Reaktivierung wird der Überstand abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen werden mit neuem RPMI „Spezial“ ohne Zusätze kultiviert

Bei allen Modellen wurde alle 24 h das Medium gewechselt. Die Kultur erfolgte bei 35 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### **3.3.5 *Fishers Exakter Test***

[152]

Fishers Exakter Test kann verwendet werden um zu bestimmen, inwieweit eine experimentell gefundene Korrelation hier die Regulation bzw. Nichtregulation eines Genes 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.

## 4 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit gliedern sich in drei Abschnitte auf. Der erste und wichtigste Teil umfasst den Aufbau von chlamydialen Persistenzmodellen bei *C. trachomatis* D/UW-3Cx und der Analyse von Wirtszellantworten während Persistenz und nach Reaktivierung persistierender *C. pneumoniae*.

Der zweite Abschnitt zeigt die Ergebnisse von Untersuchungen zur Interaktion von fakultativ intrazellulären Salmonellen mit ihren Wirtszellen. Es wird die Expression ausgewählter Gene nach Infektion mit Salmonellen vorgestellt und Unterschiede zur Chlamydien-induzierten Expression bei akuter produktiver Infektion aufgezeigt.

Im Anschluss werden im dritten Teil die Arbeiten mit dem chlamydialen putativen Toxin CT166 und dessen Einfluss auf epitheliale Zellen vorgestellt.

### 4.1 Einfluss persistierender Chlamydien auf ihre Wirtszellen

Dieser Teil der Ergebnisse beschäftigt sich mit der chlamydialen Beeinflussung ihrer Wirtszellen während der Persistenz. In einer vorangegangenen Dissertation (S. Heß: „Untersuchungen zur Chlamydien-Wirtszell-Interaktion“) wurden die Wirtszellantworten bei einer chlamydialen Infektion während eines **produktiven** Entwicklungszyklus von Chlamydien untersucht. Die folgenden Analysen sollen aufbauend auf den Ergebnissen dieser Dissertation Aufschluss über die Rolle von **persistierenden** Chlamydien bei der Erzeugung chronischer Krankheiten aufzeigen. Zur Untersuchung der Persistenz stehen verschiedene Modelle zur Verfügung. Es ist nicht bekannt, welches Persistenzmodell die *in vivo* Situation am besten beschreibt.

Daher wurden die drei wichtigsten Modelle in unserem Labor optimiert und die veränderte Wirtszell-Genexpression während der chlamydialen Persistenz untersucht. Der Vergleich zur produktiven Infektion soll darstellen, welche Gene durch die persistierenden Chlamydien verändert reguliert werden. Dies ermöglicht weitere Untersuchungen der Wirk- und Pathomechanismen bei Chlamydien-induzierten chronischen Erkrankungen bzw. soll eine Beteiligung von Chlamydien bei der Erzeugung dieser Krankheiten nahe legen.

Im Gegensatz zu anderen Laboren, die zumeist Analysen 1 oder 2 Tage nach Infektion durchführen, wurden diese 3 Persistenzmodelle in unserem Labor für Analysen eines längeren Zeitraumes etabliert. Variiert wurden Medien, Zeitpunkt der Zugabe von Reagenzien und Menge der Persistenzinduktoren. Vorversuche zur Persistenz-Erzeugung wurden bei *C. trachomatis* L2 durchgeführt, da dieses Serovar sehr infektiös ist und die Chlamydien-Stöcke schneller hergestellt werden konnten. *C. trachomatis* D ist aber in Deutschland und anderen Industrieländern der Stamm, bei dem die chlamydiale Persistenz

eine wesentlichere Rolle spielt. Daher wurde die Optimierung der Persistenzmodelle später nur mit diesem Stamm fortgesetzt.

Außerdem hat sich gezeigt, dass die Verwendung von hohen Bakterienzahlen (MOI  $\gg 1$ ) bei Infektion von HeLa-Zellen zu einer Erhöhung der messbaren mRNA in der *Real-Time* RT-PCR führt [112]. Ein Anstieg der Hintergrund-Menge an mRNA fand dabei nicht statt. Dadurch sind wesentlich sensitivere Messungen möglich. Die Persistenzmodelle wurden daher für die Verwendung hoher Bakterienzahlen zur Infektion mit *C. pneumoniae* weiter optimiert.

#### **4.1.1 Optimierung der Persistenzmodelle für *C. trachomatis* D/UW-3Cx in humanen epithelialen Zellen**

Für die Untersuchung der Wirtszellantworten bei chlamydialer Persistenz wurden die drei wichtigsten Persistenzmodelle, Eisenentzug mit DAM, L-Tryptophan-Entzug mit IFN- $\gamma$  und Antibiotika-induzierte Persistenz mit Penicillin G, in unserem Labor optimiert. Der Aufbau für die Persistenz in der humanen, epithelialen Zelllinie HeLa T für *C. trachomatis* D wurde im Rahmen dieser Arbeit (und parallel für *C. pneumoniae* im Rahmen einer Medizinischen Dissertation von K. Endlich) durchgeführt.

Es wurde versucht, möglichst gleiche Bedingungen in den Persistenzmodellen zu erhalten. Dies sollte einen Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Modelle, aber auch zwischen den Spezies ermöglichen. Die Zelllinie wurde bereits für Untersuchungen der produktiven Infektion herangezogen [112] und dient als Zellkulturmodell einer chlamydialen Infektion. Für die Persistenz von Chlamydien wurden folgende Kriterien zu Grunde gelegt:

1. Morphologische Veränderung der chlamydialen Einschlüsse („aberrante Formen“)
2. Stopp im Entwicklungszyklus mit Ausbleiben der Entwicklung infektiöser Elementarkörperchen
3. Reaktivierbarkeit der persistierenden Chlamydien und, durch Fortführen des Entwicklungszyklus, erneute Bildung infektiöser Elementarkörperchen

Für alle Modelle wurden Angaben aus der Literatur verwendet. Die Protokolle wurden an das im Labor bestehende Zellkultur-Modell angepasst und für Langzeit-Untersuchungen optimiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden die HeLa-Zellen mit MOI 1 infiziert, was in einer Infektionsrate  $>90\%$  resultierte. Die morphologischen Veränderungen der Einschlüsse wurden nach Färbung der Chlamydien (Methoden, 3.3.2.2) durch Fluoreszenzmikroskopie beurteilt.

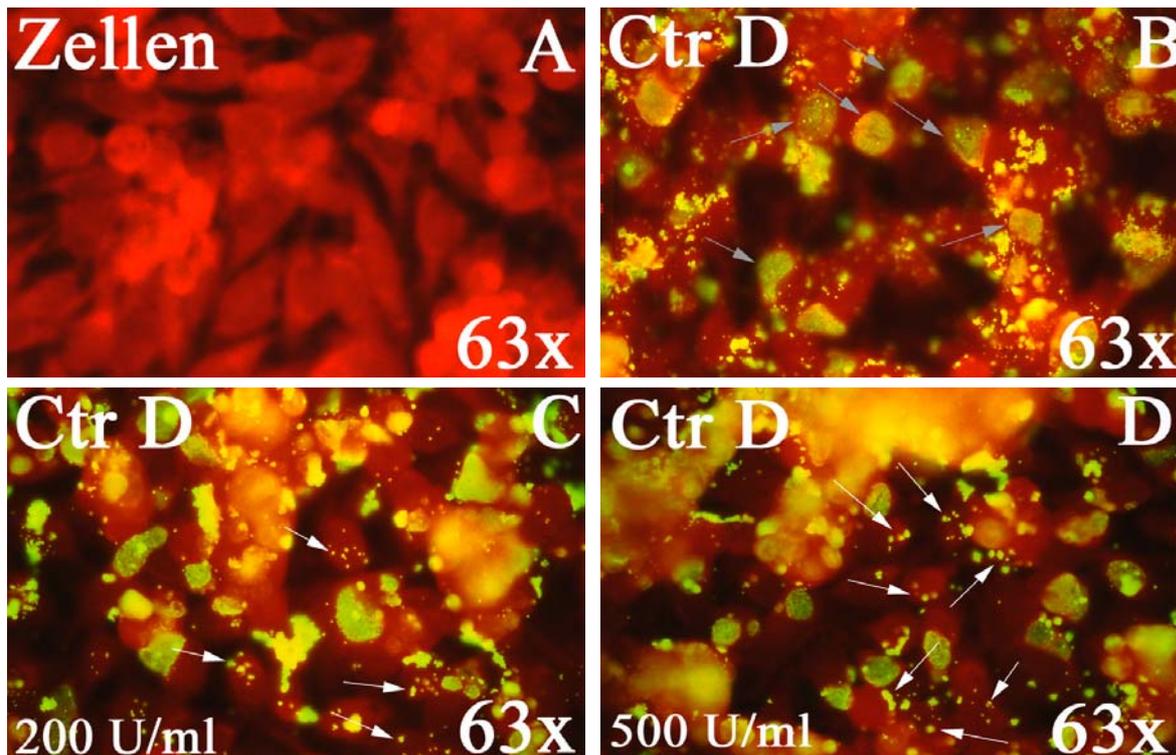
#### 4.1.1.1 Persistenzerzeugung bei *C. trachomatis* D durch IFN- $\gamma$

Für das IFN- $\gamma$  Modell zur Erzeugung von Persistenz bei *C. trachomatis* D und L2 wurde die Veröffentlichung von Beatty *et al.* zugrunde gelegt [153]. Zu Beginn wurde das Medium Panserin 401 verwendet, um definierte Infektions- und Persistenzbedingungen zu haben. Dadurch sollte ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit denen aus vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe ermöglicht werden. Das Medium wurde alle 24 h gewechselt, um den Zellen optimale Nährbedingungen zu garantieren. Außerdem wurde durch die Zugabe von frischem IFN- $\gamma$  während des Mediumwechsels der Tryptophan-Entzug sichergestellt.

Nach Zugabe von 5 U/ml [153], 50 U/ml und 500 U/ml IFN- $\gamma$  1 h nach Infektion mit *C. trachomatis* D und L2 waren nach 2 Tagen keine morphologischen Veränderungen der Einschlüsse im Vergleich zur produktiven Infektion zu erkennen. Auch die Verwendung vom MEM-10 Medium führte zu keiner Veränderung der Einschlüsse nach IFN- $\gamma$  Gabe. Zusätzlich zeigte sich bei 1000 U/ml IFN- $\gamma$  ein starkes Ablösen der Zellen. Diese Konzentration und höhere sind daher zur Persistenzerzeugung ungeeignet.

Um zu überprüfen, ob Persistenz mit den verfügbaren *C. trachomatis*-Stämmen überhaupt durch IFN- $\gamma$  induziert werden kann, wurde die humane, epitheliale Zelllinie Hep-2 verwendet. Diese wird ebenfalls häufig für Analysen der chlamydialen Persistenz benutzt [115;154;155]. In RPMI „Spezial“ (in ersten Versuchen mit 10  $\mu$ g/ml Gentamicin und 25  $\mu$ g/ml Vancomycin) wurde 30 min nach Infektion von Hep-2 Zellen mit *C. trachomatis* D und L2 50 U/ml IFN- $\gamma$  zugegeben. Unter diesen Bedingungen waren nach 2 Tagen viele kleine Einschlüsse im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu erkennen.

In HeLa-Zellen waren überwiegend kleine Einschlüsse hingegen erst bei 200 und 500 U/ml IFN- $\gamma$  zu beobachten (Abbildung 4.1 C und D). Beispiele für die kleineren Einschlüsse sind mit weißen Pfeilen in Abbildung 4.1 veranschaulicht. Bei beiden Konzentrationen lagen neben den kleinen noch größere Einschlüsse vor, die bei 500 U/ml im Vergleich zu 200 U/ml IFN- $\gamma$  behandelten Zellen geringer und kleiner waren. Ein vergleichbares morphologisches Bild war auch bei der Infektion mit *C. trachomatis* L2 zu beobachten (Bilder nicht gezeigt).



**Abbildung 4.1** Fluoreszenzbilder von persistierenden Chlamydien durch Behandlung mit IFN- $\gamma$

Die Bilder zeigen chlamydiale Einschlüsse 2 Tage nach Infektion in 63facher Vergrößerung bei **A** schein-infizierte Zellen, bei **B** produktiver Infektion von *C. trachomatis* D, bei **C** *C. trachomatis* D mit 200 U/ml und bei **D** mit 500 U/ml IFN- $\gamma$ . Bei **B** sind typische chlamydiale Einschlüsse bei produktiver Infektion mit grauen Pfeilen markiert. Die weißen Pfeile in Abbildungen **C** und **D** deuten auf Beispiele von sichtlich verkleinerten Einschlüssen mit persistierenden Chlamydien. Bei **C** und **D** sind neben den kleinen Einschlüssen noch vergrößerte Einschlüsse zu erkennen.

Zur Überprüfung der Infektiösität wurden die Zellen nach 2 Tagen Persistenz im Überstand aufgenommen und nach Aufarbeitung in Verdünnungsreihen neue HeLa-Zellen infiziert. Sowohl bei 200 als auch 500 U/ml IFN- $\gamma$  konnten weniger als 1 % an infektiösen Chlamydien im Vergleich zur produktiven Infektion nachgewiesen werden.

Zum Test auf Reaktivierbarkeit wurde Persistenz bei *C. trachomatis* D mit 200 U/ml IFN- $\gamma$  30 min nach Infektion induziert. Die Zellen wurden am Tag 2 nach Infektion einmal mit warmem PBS-Puffer gewaschen und frisches RPMI „Spezial“ auf die Zellen gegeben.

Bei der produktiven Infektion waren keine weiteren Zusätze, bei der persistierenden Infektion weiter 200 U/ml IFN- $\gamma$  und bei den zu reaktivierenden Chlamydien 200  $\mu$ g/ml L-Tryptophan enthalten. Am 2. Tag nach Reaktivierung (4 Tage nach Infektion) wurde die Infektiösität überprüft.

	2. Tag nach Infektion	4. Tag nach Infektion
Prod. Infektion	<b>100 %</b> ( $3,4 \times 10^8$ IFU)	<b>100 %</b> ( $1,7 \times 10^8$ IFU)
200 U/ml IFN- $\gamma$	<b>2,7 %</b> ( $9,2 \times 10^6$ IFU)	<b>0,5 %</b> ( $8,8 \times 10^5$ IFU)
200 $\mu$ g/ml L-Tryptophan	-	<b>64,7 %</b> ( $1,1 \times 10^8$ IFU)

**Tabelle 4.1 Bildung infektiöser Chlamydien nach Persistenzerzeugung durch IFN- $\gamma$  und Reaktivierung persistierender Chlamydien mit L-Tryptophan bei *C. trachomatis D* in HeLa-Zellen**

Die Tabelle zeigt die Bildung infektiöser Chlamydien (IFU) nach Reinfektion. Persistenz von *C. trachomatis D* wurde mit 200 U/ml IFN- $\gamma$  induziert und am 2. und 4. Tag nach Infektion von HeLa-Zellen überprüft. Zur Reaktivierung wurde ein Teil der persistierenden Chlamydien nach 2 Tagen mit 200  $\mu$ g/ml L-Tryptophan für 2 Tage (4. Tag nach Infektion) behandelt. Dargestellt ist der prozentual gebildete Anteil an infektiösen Chlamydien im Vergleich zur produktiven Infektion am gleichen Tag und in Klammern die gebildete Gesamt-Menge infektiöser Chlamydien aus Doppelwerten eines Einzelexperimentes.

Sowohl am 2. wie auch 4. Tag der Persistenz wurden nur wenige Chlamydien bei den IFN- $\gamma$  behandelten infizierten Zellen bestimmt. Die Gabe von L-Tryptophan zur Reaktivierung führte zu einer Erhöhung der Infektiösität auf knapp 65 % der produktiven Infektion (Tabelle 4.1). Demnach mussten die persistierenden Chlamydien am 2. Tag nach Infektion noch vital gewesen sein und konnten wieder reaktiviert werden. Dies zeigt eine Arretierung des chlamydialen Entwicklungszyklus trotz der in der Immunfluoreszenz beobachteten großen Einschlüsse.

Zusammengefasst:

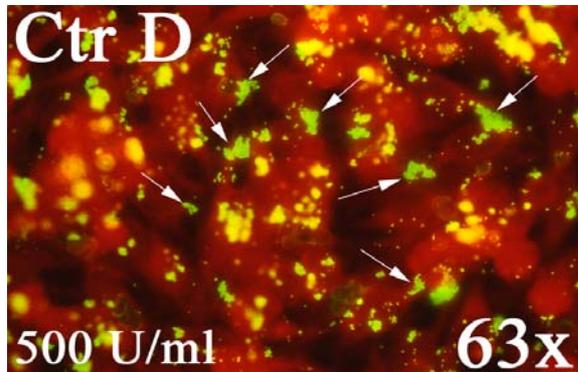
Für *C. trachomatis D* konnte mit 200 U/ml IFN- $\gamma$  in RPMI „Spezial“ Medium Persistenz in HeLa-Zellen induziert werden. Nach 2 Tagen ist nur noch eine Restinfektiösität von weniger als 3 % gemessen worden. Reaktiviert man für 2 Tage mit 200  $\mu$ g/ml L-Tryptophan, so erhält man 65 % infektiöse Chlamydien zurück während bei der persistierenden Infektion zur selben Zeit nur 0,5 % infektiöse Chlamydien nachweisbar sind.

#### 4.1.1.2 Persistenzerzeugung bei *C. trachomatis D* durch Penicillin G

Penicillin G ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Dieses bindet an bei Bakterien vorkommenden Penicillin bindenden Proteinen (PBP) und hemmt dessen enzymatische Funktion, wie die Synthese und Modifizierung des Zellwand-Bestandteils Murein [156]. Die Inhibierung des bakteriellen Zellwand-Aufbaus führt zur Blockade des Bakterienwachstums und dadurch zum Bakterientod. Im Falle der Chlamydien kann aber **Persistenz** induziert werden.

Grundlage zur Penicillin G-induzierten Persistenz war die Veröffentlichung von Airene *et al.* [157]. Wie in der Veröffentlichung beschrieben wurde Penicillin G mit der Konzentration 200 U/ml und zusätzlich 500 U/ml verwendet. Nach Gabe des Antibiotikums 30 min nach Infektion in MEM-10 und in RPMI „Spezial“ zeigten

Fluoreszenzaufnahmen nach 2 Tagen aberrante Formen der Einschlüsse (siehe Abbildung 4.2). Diese unterscheiden sich deutlich von den großen Einschlüssen bei der produktiven Infektion (Abbildung 4.1, Bild B)



**Abbildung 4.2** Fluoreszenzbilder von persistierenden Chlamydien durch Behandlung mit Penicillin G

Das Bild zeigt chlamydiale Einschlüsse 2 Tage nach Infektion in 63facher Vergrößerung mit 500 U/ml Penicillin G. Die weißen Pfeile deuten auf Beispiele von sichtlich verkleinerten Einschlüssen mit persistierenden Chlamydien.

Bei *C. trachomatis* D wurde wie bei *C. pneumoniae* im Anschluss mit 500 U/ml Penicillin G in RPMI „Spezial“ weiter gearbeitet. Unter diesen Bedingungen ließen sich nur 0,01 % infektiöse Chlamydien nach Reinfektion nachweisen.

Nach zweitägiger Reaktivierung durch einen Mediumwechsel ohne weitere Zusätze konnten wieder 0,8 % infektiöse EK erhalten werden. Die Menge an reaktivierten Chlamydien ist zwar sehr gering, doch sind die reaktivierten Chlamydien nur nach 2 Tagen Reaktivierung untersucht worden. Demnach ist die Vitalität zumindest eines Teils der Chlamydien durch dieses Experiment sichergestellt. Bei den persistierenden Chlamydien konnten zum gleichen Zeitpunkt keine EK gefunden werden.

	2. Tag nach Infektion	4. Tag nach Infektion
Prod.	<b>100 %</b> ( $3,4 \times 10^8$ IFU)	<b>100 %</b> ( $1,7 \times 10^8$ IFU)
Penicillin G	<b>&gt;0,001 %</b> ( $1,6 \times 10^4$ IFU)	<b>0,0 %</b> (0 IFU)
Mediumwechsel	-	<b>0,8 %</b> ( $1,4 \times 10^6$ IFU)

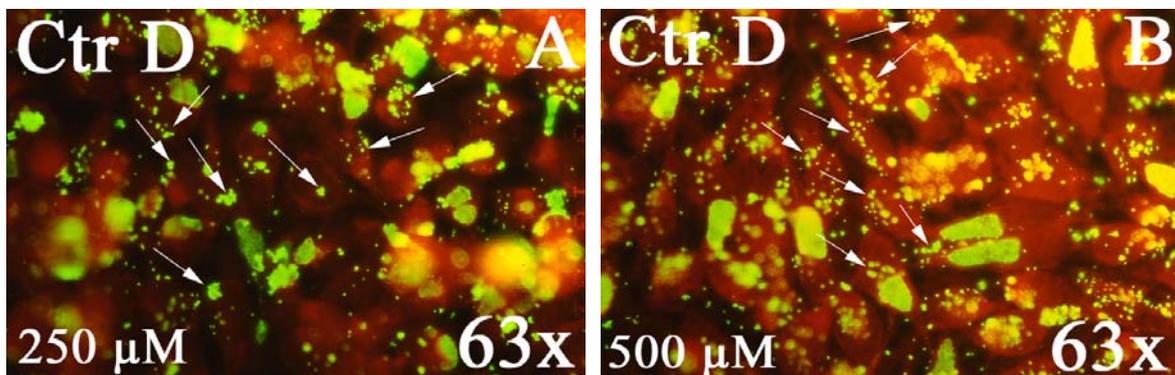
**Tabelle 4.2** Bildung infektiöser Chlamydien nach Persistenzerzeugung durch Penicillin G und Reaktivierung persistierender Chlamydien durch Mediumwechsel bei *C. trachomatis* D in HeLa-Zellen

Die Tabelle zeigt die Bildung infektiöser Chlamydien nach Reinfektion. Persistenz von *C. trachomatis* D wurde durch 500 U/ml Penicillin G induziert und am 2. und 4. Tag nach Infektion überprüft. Die Reaktivierung von einem Teil der persistierenden Chlamydien wurde durch einen Mediumwechsel für 2 Tage (4. Tag nach Infektion) durchgeführt. Dargestellt wird der prozentual gebildete Anteil an infektiösen Chlamydien im Vergleich zur produktiven Infektion am gleichen Tag und in Klammern die gebildete Gesamt-Menge infektiöser Chlamydien aus Doppelwerten eines Einzelexperimentes.

#### 4.1.1.3 Persistenzerzeugung bei *C. trachomatis* D durch DeferoxaminMesylat (DAM)

Eisen ist für viele bakterielle Proteinfunktionen essentiell. Der Entzug von Eisen durch den Eisen-Chelator Deferoxamin-Mesylat führt zu einer Mangelercheinung bei den Bakterien und zur Verringerung oder dem Stopp der Proteinfunktion. Dies führt bei Chlamydien zur **Persistenz**.

Zur Erzeugung von Persistenz durch Eisenentzug wurden HeLa-Zellen mit *C. trachomatis* D in MEM-10 direkt nach der Infektion mit 200 und 500  $\mu\text{M}$  [32] und zusätzlich mit 250  $\mu\text{M}$  DAM versetzt. Nach 2 Tagen in Kultur konnten bei den DAM-behandelten infizierten Zellen deutlich kleinere Einschlüsse (Abbildung 4.3, Beispiele sind durch weiße Pfeile markiert) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 4.1, Bild B) gesehen werden. Allerdings lagen neben den kleineren Einschlüssen auch noch größere Einschlüsse wie bei der produktiven Infektion vor.



**Abbildung 4.3 Fluoreszenzbilder von persistierenden Chlamydien durch Behandlung mit DAM**

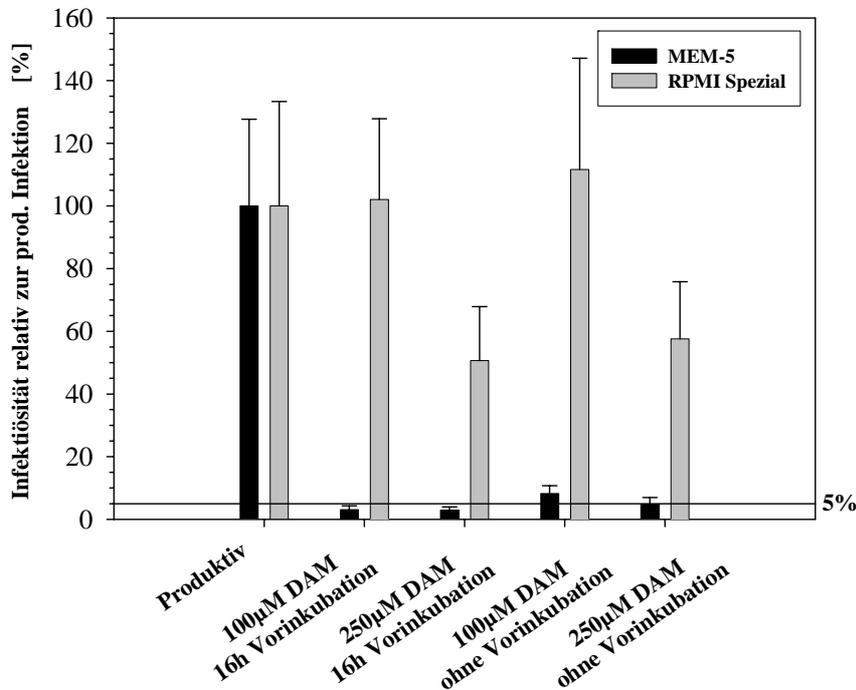
Die Bilder veranschaulichen die chlamydialen Einschlüsse 2 Tage nach Infektion in 63facher Vergrößerung bei **A** *C. trachomatis* D (MOI 1) infizierte HeLa-Zellen mit 250  $\mu\text{M}$  und bei **B** mit 500  $\mu\text{M}$  DAM. In den Bildern deuten die weißen Pfeile auf sichtlich verkleinerte Einschlüsse mit persistierenden Chlamydien. Bei **A** und **B** sind neben den kleinen noch vergrößerte Einschlüsse zu erkennen.

Persistenz wurde im Anschluss mit 250 und 500  $\mu\text{M}$  DAM während der Infektion bei *C. trachomatis* D in MEM-10 erzeugt. Bei beiden Konzentrationen konnten noch nach 2 Tagen über 30 % infektiöse Chlamydien, bezogen auf die produktive Infektion, durch Reinfektion gefunden werden. Die Verwendung von DAM Konzentrationen über 500  $\mu\text{M}$  schädigt die Zellen [32]. Da außerdem mit 500  $\mu\text{M}$  keine Verringerung der infektiösen Chlamydien erreicht werden konnte, wurde mit einer maximalen Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  DAM weiter gearbeitet.

Auch mit RPMI „Spezial“ (hier mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Gentamicin und 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Vancomycin) oder Panserin 401 wurde bei Konzentrationen von 100 und 250  $\mu\text{M}$  DAM der Anteil an großen Einschlüssen nicht geringer.

Erst die Verwendung von MEM-5 als Medium [31] führte zu einer deutlichen Verringerung der infektiösen Elementarkörperchen am 2. Tag der Infektion. Der Anteil infektiöser Chlamydien betrug bei 100  $\mu\text{M}$  etwa 8 % und bei 250  $\mu\text{M}$  DAM 5 % im Vergleich zur produktiven Infektion.

Eine 16 stündige Vorinkubation mit entsprechenden Konzentrationen an DAM ergab eine weitere Verringerung der Restinfektiösität auf 3% (100  $\mu$ M DAM) bzw. 2 % (250  $\mu$ M DAM). RPMI Spezial zeigte weder mit noch ohne Vorinkubation eine Verringerung unter 50 %.



**Abbildung 4.4 Vergleich von MEM-5 und RPMI Spezial als Infektionsmedium mit und ohne Vorinkubation mit DAM zur Persistenzerzeugung bei *C. trachomatis* D**

HeLa-Zellen wurden 16 h vor Infektion mit PBS gewaschen und entweder MEM-5 oder RPMI „Spezial“ zugegeben. Für die Vorinkubation wurde 100 bzw. 250  $\mu$ M DAM in das entsprechende Medium zugegeben. Nach 16 h erfolgte bei allen Proben Infektion mit MOI 1 in 100 bzw. 250  $\mu$ M DAM-haltigem MEM-5 oder RPMI „Spezial“. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichung der Infektiösität im Vergleich zur produktiven Infektion nach Reinfektion neuer HeLa-Zellen am Tag 2 nach Infektion aus einem Einzelexperiment mit Doppelwerten.

Im Anschluss wurde mit 250  $\mu$ M in MEM-5 weiter gearbeitet, um vergleichbare Konzentrationen an DAM wie bei *C. pneumoniae* einzusetzen. Die 16stündige Vorinkubation sollte eine geringe Anzahl an nicht-persistierenden Chlamydien sicherstellen.

Nach 2 Tagen Reaktivierung (ab Tag 2 nach Infektion) mit 400  $\mu$ g/ml Holotransferrin bzw. durch einen Mediumwechsel ohne weitere Zusätze konnten etwa 17 % infektiöse EK nachgewiesen werden. Bei den persistierenden Chlamydien war nach 2 und 4 Tagen nur etwa 1 % Restinfektiösität zu messen (Tabelle 4.3).

	2. Tag nach Infektion	4. Tag nach Infektion
Produktiv	<b>100 %</b> ( $1,4 \times 10^8$ IFU)	<b>100 %</b> ( $5 \times 10^7$ IFU)
DAM	<b>1,4 %</b> ( $2,0 \times 10^6$ IFU)	<b>1,1 %</b> ( $5,6 \times 10^5$ IFU)
Holotransferrin	-	<b>17,6 %</b> ( $8,8 \times 10^6$ IFU)
Mediumwechsel	-	<b>16,4 %</b> ( $8,2 \times 10^6$ IFU)

**Tabelle 4.3 Bildung infektiöser Chlamydien nach Persistenzerzeugung durch DAM und Reaktivierung persistierender Chlamydien mit Holotransferrin und Mediumwechsel bei *C. trachomatis* D in HeLa-Zellen**

Die Tabelle zeigt die Gesamt-Menge an infektiösen Chlamydien nach Reinfektion. Persistenz von *C. trachomatis* D wurde durch 250  $\mu$ M DAM induziert und am 2. und 4. Tag nach Infektion überprüft. Zur Reaktivierung wurde ein Teil der persistierenden Chlamydien für 2 Tage (4. Tag nach Infektion) mit 400  $\mu$ g/ml Holotransferrin behandelt bzw. ein Mediumwechsel ohne Zusätze durchgeführt. Dargestellt wird der prozentual gebildete Anteil an infektiösen Chlamydien im Vergleich zur produktiven Infektion am gleichen Tag und in Klammern die gebildete Gesamt-Menge infektiöser Chlamydien aus Doppelwerten eines Einzelexperimentes.

Wie auch bei den anderen beiden Modellen wurde die Reaktivierung nur zu einem Zeitpunkt analysiert. Es werden sicherlich bereits früher und besonders später als der untersuchte 2. Tag nach Reaktivierung noch weitere infektiöse Chlamydien freigesetzt. Dieser Versuchsaufbau verdeutlicht bereits die Vitalität der persistierenden Chlamydien am 2. Tag nach Infektion.

Zusammengefasst:

Beim DAM-Modell musste im Gegensatz zu den anderen Modellen MEM-5 Medium verwendet werden. Zur Persistenzinduktion von *C. trachomatis* D wurden die Zellen in dem Medium 16 h mit 250  $\mu$ M DAM vorinkubiert und ohne weiteren Mediumwechsel infiziert. Nach 2 Tagen erhält man nur noch eine Restinfektiösität von etwa 1 %. Bei der Reaktivierung für 2 Tage kann man sowohl bei Verwendung von 400  $\mu$ g/ml Holotransferrin als auch beim Mediumwechsel ohne Zusätze etwa 17 % infektiöse Chlamydien nachweisen. Im gleichen Zeitraum blieb es bei der persistierenden Infektion bei einer Infektiösität um 1 %.

#### **4.1.2 Etablierung der Erzeugung von Persistenz bei *C. pneumoniae* mit hoher Bakterienzahl**

In der Dissertation von K. Endlich wurden die 3 Persistenzmodelle für *C. pneumoniae* etabliert und die Wirtszellantworten von epithelialen Zellen bei einer persistierenden Infektion untersucht. Dabei konnten bei den untersuchten Genen unter diesen Bedingungen nur recht schwache Regulationen gemessen werden.

Zur Erhöhung der Sensitivität wurden die etablierten *C. pneumoniae* Persistenzmodelle für hohe MOI optimiert.

Für die Infektion mit hohen MOI werden große Mengen an Chlamydien benötigt. Aus diesem Grund ist nicht das hochaufgereinigte **reine Material** aus der Ultrazentrifugation verwendet worden, sondern es wurden **semireine** Chlamydien-Stöcke hergestellt (Methoden, 3.3.2.6).

#### 4.1.2.1 Persistenzinduktion und Reaktivierung bei *C. pneumoniae* mit hoher Bakterienzahl

Die Infektion von HeLa-Zellen in RPMI „Spezial“ mit MOI 30 resultierte in einer Infektionsrate von >90 %. Persistenz wurde wie unter 3.3.4 beschrieben induziert. Zwar sollte das Antibiotikum Vancomycin, das nur bei grampositiven Bakterien wirkt, und Gentamycin, das nicht von eukaryonten Zellen aufgenommen wird, das Wachstum von Chlamydien nicht beeinflussen. Trotzdem wurde wie bei *C. trachomatis* D bei allen weiteren Infektionsversuchen sicherheitshalber auf diese Zusätze im Medium verzichtet.

Am 4. Tag nach Infektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Bei einem Teil der Zellen wurde die Persistenz durch 250 µM DAM, 100 U/ml IFN- $\gamma$  oder 500 U/ml Penicillin G weiter erhalten. Zum anderen Teil wurde zur Reaktivierung der persistierenden Chlamydien neues Medium mit 200, 400 und 800 µg/ml Holotransferrin (**DAM Modell**), 200 µg/ml L-Tryptophan (**IFN- $\gamma$  Modell**) oder keine weiteren Zusätze (**Penicillin G Modell**) zugefügt. Am 4., 7. und 11. Tag nach Infektion wurden die Zellen mit dem Überstand aufgearbeitet und die Infektiosität bestimmt (Tabelle 4.4).

Zu allen Zeitpunkten konnten bei den persistierenden Infektionen nur wenige infektiöse Chlamydien nachgewiesen werden, die im höchsten Fall 0,2 % bei IFN- $\gamma$  am 2. Tag nach Infektion betrug. Nach Reaktivierung ließen sich beim DAM-Modell nur wenige persistierende *C. pneumoniae* wieder reaktivieren, die im höchsten Fall bei 800 µg/ml 0,1 % zur produktiven Infektion ergaben. Daher wurde in späteren Experimenten mit dieser Konzentration Holotransferrin weiter gearbeitet. Die Zahl der reaktivierten Chlamydien durch Holotransferrin erhöhte sich am 11. Tag nicht.

Die Zellen ließen sich 7 Tage mit DAM in Kultur halten. Bis zu diesem Zeitpunkt waren keine starken morphologischen Veränderungen der Zelle zu beobachten, die auf eine Schädigung der Zelle schließen ließen. Zu späteren Zeitpunkten veränderten sich die Zellen nach Schein-Infektion und Infektion morphologisch und lösten sich teilweise vom Boden der Kulturplatten ab. In weiteren Experimenten wurde deshalb nur über 3 Tage im DAM-Modell reaktiviert.

	<b>4 Tage nach Infektion</b>	<b>7 Tage nach Infektion</b>	<b>11 Tage nach Infektion</b>
<b>Produktive Infektion</b>	<b>100 %</b> ( $4,1 \times 10^8$ IFU)	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>
<b>250 <math>\mu</math>M DAM</b>	<b>0,03 %</b> ( $1,1 \times 10^4$ IFU)	<b>&lt;0,001 %</b> ( $1,3 \times 10^4$ IFU)	<b>&lt;0,001 %</b> ( $1,1 \times 10^3$ IFU)
<b>200 <math>\mu</math>g/ml Holotransferrin</b>	<b>n.d.</b>	<b>&lt;0,001 %</b> ( $1,2 \times 10^4$ IFU)	<b>0,01 %</b> ( $5,5 \times 10^4$ IFU)
<b>400 <math>\mu</math>g/ml Holotransferrin</b>	<b>n.d.</b>	<b>0,01 %</b> ( $4,0 \times 10^4$ IFU)	<b>0,01 %</b> ( $5,3 \times 10^4$ IFU)
<b>800 <math>\mu</math>g/ml Holotransferrin</b>	<b>n.d.</b>	<b>0,1 %</b> ( $5,1 \times 10^5$ IFU)	<b>0,02 %</b> ( $1,0 \times 10^5$ IFU)
<b>100 U/ml IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>0,2 %</b> ( $8,3 \times 10^4$ IFU)	<b>&lt;0,001 %</b> ( $2,2 \times 10^3$ IFU)	<b>n.d.</b>
<b>200 <math>\mu</math>G/ml L-Tryptophan</b>	<b>n.d.</b>	<b>3,9 %</b> ( $1,6 \times 10^7$ IFU)	<b>n.d.</b>
<b>500 U/ml Penicillin G</b>	<b>&lt;0,001 %</b> ( $1,1 \times 10^3$ IFU)	<b>- % (-)</b>	<b>&lt;0,001 %</b> ( $1,1 \times 10^3$ IFU)
<b>Mediumwechsel</b>	<b>n.d.</b>	<b>&lt;0,001 %</b> ( $5,4 \times 10^2$ IFU)	<b>&lt;0,001 %</b> ( $1,4 \times 10^4$ IFU)

**Tabelle 4.4 Bildung infektiöser Chlamydien nach Persistenzerzeugung und Reaktivierung persistierender Chlamydien bei *C. pneumoniae* nach Infektion von HeLa-Zellen mit hohen Bakterienzahlen**

Die Tabelle zeigt die Bildung infektiöser Chlamydien während der Persistenz von *C. pneumoniae* und Reaktivierung der persistierenden Chlamydien nach Reinfektion. Die Infektiösität wurde an den Tagen 4 und 7 p.i. für DAM, IFN- $\gamma$  und Penicillin G und am Tag 11 (DAM und Penicillin G) untersucht. Persistenz wurde durch 250  $\mu$ M DAM während der Infektion mit MOI 30 bzw. 200 U/ml IFN- $\gamma$  oder 500 U/ml Penicillin G 30 min nach Infektion erzeugt. Die persistierenden Chlamydien wurden am 4. Tag p.i. nach Waschen der Zellen mit PBS durch 200-800  $\mu$ g/ml Holotransferrin (DAM), 200  $\mu$ g/ml L-Tryptophan (IFN- $\gamma$ ) oder mit Mediumwechsel (Penicillin G) reaktiviert. Dargestellt ist der prozentual gebildete Anteil an infektiösen Chlamydien im Vergleich zur produktiven Infektion am Tag 4 nach Infektion und in Klammern die gebildete Gesamt-Menge infektiöser Chlamydien aus den Doppelwerten eines Einzelexperimentes.

Im Gegensatz zum DAM-Modell konnten durch L-Tryptophan 3,9 % bezogen auf die produktive Infektion reaktiviert werden. Andere Zeitpunkte nach Reaktivierung wurden nicht in diesem Experiment betrachtet. Aus einem späteren Experiment (4.1.4, Abbildung 4.6) ist aber ersichtlich, dass sowohl zu früheren wie auch späteren Zeitpunkten infektiöse EK frei gesetzt werden.

Bei Penicillin G waren zu den analysierten Zeitpunkten durch den Mediumwechsel nur wenige Chlamydien reaktiviert worden.

#### 4.1.2.2 Ausdünnen von Zellen nach Infektion mit hoher MOI

Messergebnisse der Vergangenheit haben gezeigt, dass bei einigen Genen die Menge an mRNA von infizierten, aber auch von schein-infizierten Zellen im Verlauf der untersuchten Zeit ansteigt. Dies macht es schwierig, Chlamydien-induzierte Zellreaktionen zu erfassen. Dabei ist die folgende Hypothese denkbar: Durch das Weiterwachsen der schein-infizierten Zellen führt das dichte Wachstum möglicherweise zu einer Stress-Situation. Dieser Stress bewirkt eine veränderte Genregulation während die infizierten

Zellen kein oder nur geringes Wachstum zeigen und dem Stress daher nicht so stark ausgesetzt sind.

Der Proteinsynthese-Hemmer Cycloheximid, der das Zellwachstum unterbindet, konnte hier nicht verwendet werden. Da Cycloheximid die Proteinsynthese hemmt, wird auch die Verfügbarkeit von regulatorisch wichtigen Proteinen unterbunden. Dadurch beeinflusst der Inhibitor auch die Genregulation der Wirtszelle und würde Ergebnisse verändern. Aus diesem Grund soll untersucht werden, ob infizierte wie auch schein-infizierte Zellen nach Ausdünnen von 6-Lochplatten (9 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) auf kleine Flaschen (25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) analysiert werden können. Dazu muss vorher in allen Persistenzmodellen überprüft werden, ob die Bedingungen für die Persistenz-Erzeugung modifiziert werden müssen.

Nach der Trypsin-Behandlung 6 h p.i. war nach dem Umsetzen vor allem bei den infizierten Zellen ein schlechtes Anheften am Boden der Platten zu beobachten gewesen. Besonders stark trat dies beim DAM Modell auf, wo bereits 24 h nach Infektion nur ein Viertel der Zellen noch am Boden zu finden waren.

Für die Untersuchung der Wirtszellantworten werden große Mengen an RNA aus vielen Zellen benötigt. Außerdem kann die RNA eine schlechtere Qualität besitzen, wenn die Zellen eine geringe Vitalität aufweisen. In weiteren Experimenten wurden deshalb die Zellen nach der Infektion nicht ausgedünnt.

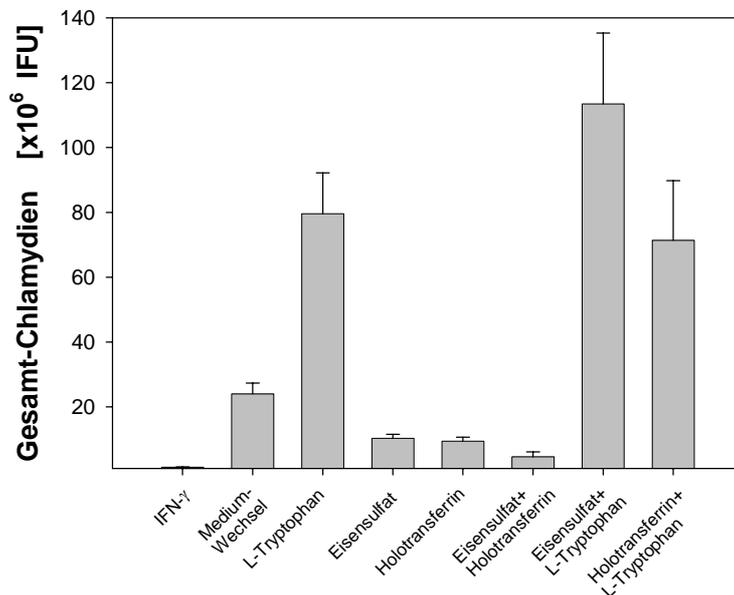
#### **4.1.3 Reaktivierung von persistierenden *C. pneumoniae* im IFN- $\gamma$ Modell durch Eisen**

Es ist bekannt, dass IFN- $\gamma$  in epithelialen Zellen die Indolamin-2,3 dioxygenase (IDO) aktiviert und zum Entzug von Tryptophan führt. Bei Dimier und Bout wurde an Enterozyten gezeigt, dass neben Tryptophan auch Eisen eine wesentliche Rolle bei der durch IFN- $\gamma$  Behandlung hervorgerufenen Inhibierung der *Toxoplasma gondii* Replikation spielt [158]. In ihrer Veröffentlichung führte die Gabe von Eisen sowohl in Form von Eisensulfat als auch durch Holotransferrin zur erneuten Replikation der Toxoplasmen, was auf eine Eisen-Limitierung durch IFN- $\gamma$  bei Enterozyten deutet.

Es soll nun geklärt werden, ob durch die Zugabe von Eisensalz oder Holotransferrin noch mehr persistierende Chlamydien in HeLa-Zellen reaktiviert werden können. Es besteht die Hoffnung, dass dadurch Einflüsse auf die Wirtszelle aufgrund der größeren Anzahl reaktiver Chlamydien besser analysiert werden können.

Bei HeLa-Zellen wurde nach Infektion mit MOI 30 Persistenz durch IFN- $\gamma$  induziert (Methoden, 3.3.4). Am 4. Tag nach Infektion wurden die Überstände abgenommen und einmal mit PBS gewaschen. Auf die Zellen wurde entweder allein oder in Kombination 200  $\mu$ g/ml L-Tryptophan, 100  $\mu$ M Eisensulfat oder 800  $\mu$ g/ml Holotransferrin in RPMI „Spezial“ Medium gegeben. Als Kontrollen erhielten infizierte Zellen weiterhin 100 U/ml IFN- $\gamma$  zum Erhalt der chlamydialen Persistenz oder es wurden keine weiteren

Zusätze zum Medium zugegeben. Die Überprüfung der gebildeten Elementarkörperchen erfolgte durch Reinfektion neuer HeLa-Zellen.



**Abbildung 4.5 Vergleich von L-Tryptophan, Eisensulfat und Holotransferrin zur Reaktivierung von persistierenden *C. pneumoniae* nach IFN- $\gamma$  Behandlung**

Dargestellt ist die Gesamt-Menge an infektiösen Elementarkörpern nach Reinfektion neuer HeLa-Zellen am Tag 7 nach Infektion. Persistenz bei *C. pneumoniae* wurde für 4 Tage durch 100 U/ml IFN- $\gamma$  induziert und die Chlamydien für 3 Tage mit 200  $\mu$ g/ml L-Tryptophan, 100  $\mu$ M Eisensulfat, 800  $\mu$ g/ml Holotransferrin oder in Kombination reaktiviert. Zum Vergleich wurden persistierende Chlamydien am Tag 4 weiter mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  behandelt oder zur Reaktivierung Medium ohne weitere Zusätze mitgeführt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Verwendung von Eisensulfat oder Eisen-beladenem Holotransferrin zur Reaktivierung persistierender Chlamydien in HeLa-Zellen allein oder in Kombination führte zu keiner höheren Menge an infektiösen Elementarkörperchen. Sie ist sogar niedriger, als wenn nur Medium ohne Zusätze verwendet wird. Einzig die Verwendung von L-Tryptophan zeigte eine starke Erhöhung der infektiösen Chlamydien, die durch Kombination mit Eisensulfat oder Holotransferrin nicht wesentlich erhöht werden konnte.

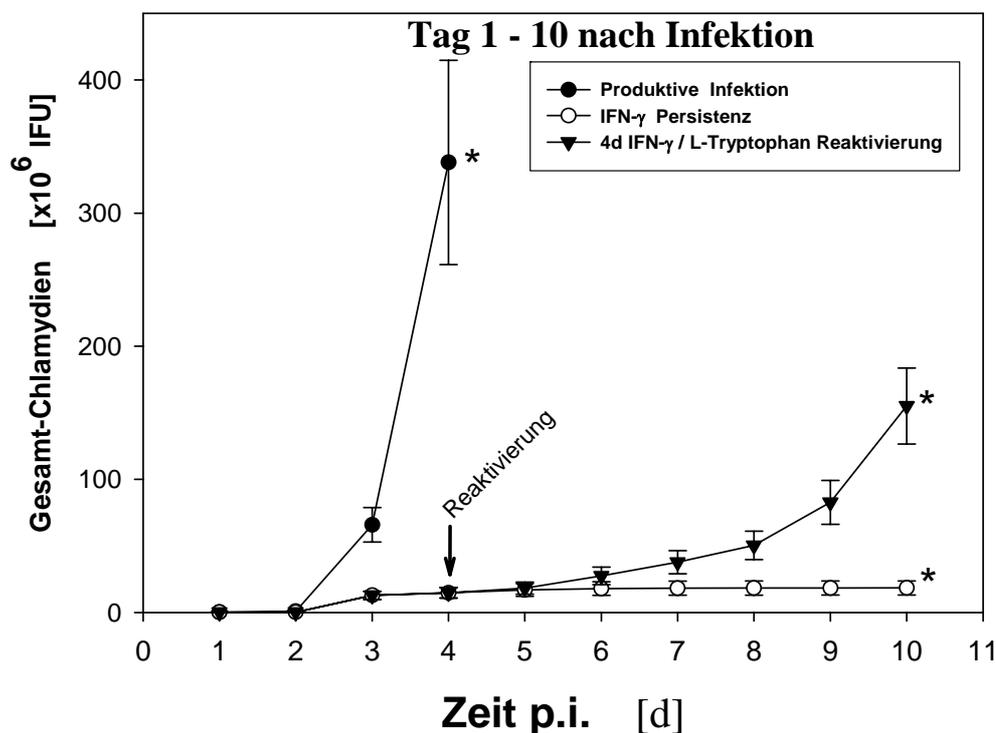
#### 4.1.4 Reaktivierbarkeit von persistierenden *C. pneumoniae* im IFN- $\gamma$ Modell

In vorherigen Experimenten zur Persistenz wurden die reaktivierten Chlamydien nur zu einzelnen Zeitpunkten nach Reaktivierung betrachtet. Je nach Modell konnten unterschiedlich viele Chlamydien nach 3 Tagen Reaktivierung wieder nachgewiesen werden.

Es ist aber davon auszugehen, dass sowohl an den Tagen vorher wie auch später weitere persistierende Chlamydien reaktiviert werden können. Außerdem ist nicht bekannt, ob bei der Reaktivierung Chlamydien nur aus wenigen Zellen freigesetzt werden und es nur in

diesen Zellen zu einer Veränderung des Expressionsmusters kommen kann. Oder ob sich die Chlamydien in allen Zellen gleichmäßig reaktivieren lassen.

HeLa-Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen mit MOI 30 semireinen Materials von *C. pneumoniae* in 24-Lochplatten infiziert, Persistenz durch IFN- $\gamma$  induziert und nach 4 Tagen ein Teil reaktiviert (Methoden, 3.3.4). Die Überstände wurden alle 24 h nach Infektion gewechselt und durch Reinfektion der Anteil an infektiösen EK bestimmt. Nur am Tag 4 nach Infektion wurden die Zellen der produktiven und der persistierenden Infektion bzw. am Tag 10 bei persistierenden und reaktivierten Chlamydien im Überstand aufgenommen und aufgearbeitet (Abbildung 4.6, markiert mit \*).



**Abbildung 4.6 Bildung infektiöser Chlamydien während produktiver und persistierender Infektion mit IFN- $\gamma$  von *C. pneumoniae* am 1. bis 10. Tag nach Infektion aus dem Überstand und den Zellen**

Dargestellt ist die kumulierte Gesamt-Menge an infektiösen Elementarkörpern nach Reinfektion neuer HeLa-Zellen an den Tagen 1 bis 10 nach Infektion, während produktiver und persistierender Infektion mit 100 U/ml IFN- $\gamma$ , sowie nach Reaktivierung mit 200  $\mu$ g/ml L-Tryptophan von persistierenden Chlamydien ab Tag 4 p.i.. An den Tagen 1-3 wurden die infektiösen Chlamydien aus dem Überstand der Zellen mit produktiver Infektion bzw. Tag 1-9 aus dem Überstand der Zellen mit persistierenden und reaktivierten Chlamydien bestimmt. Am Tag 4 (produktive Infektion) bzw. Tag 10 (persistierende und reaktivierte Chlamydien) wurden die infektiösen Chlamydien aus Überstand und Zellen (\*) gemessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Am 1. Tag nach Infektion konnten in Infektionen nur geringe Mengen infektiöser Chlamydien nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf zeigten sich deutlich weniger infektiöse Chlamydien bei der persistierenden als der produktiven Infektion. Am 3. Tag nach Infektion ist ein Anstieg der infektiösen Chlamydien auch bei der persistierenden Infektion gefunden worden. Dieser Anstieg ist aber im Vergleich zur Freisetzung an

Elementarkörperchen bei der produktiven Infektion nur sehr gering. Am Tag 4 wurden bei der persistierenden Infektion die infektiösen Chlamydien im Überstand alleine, aber auch in Überstand und Zellen bestimmt. Es zeigten sich hier nur geringe Unterschiede (Daten nicht gezeigt), weswegen nur die Daten aus den Überständen in die Grafik mit einbezogen wurden.

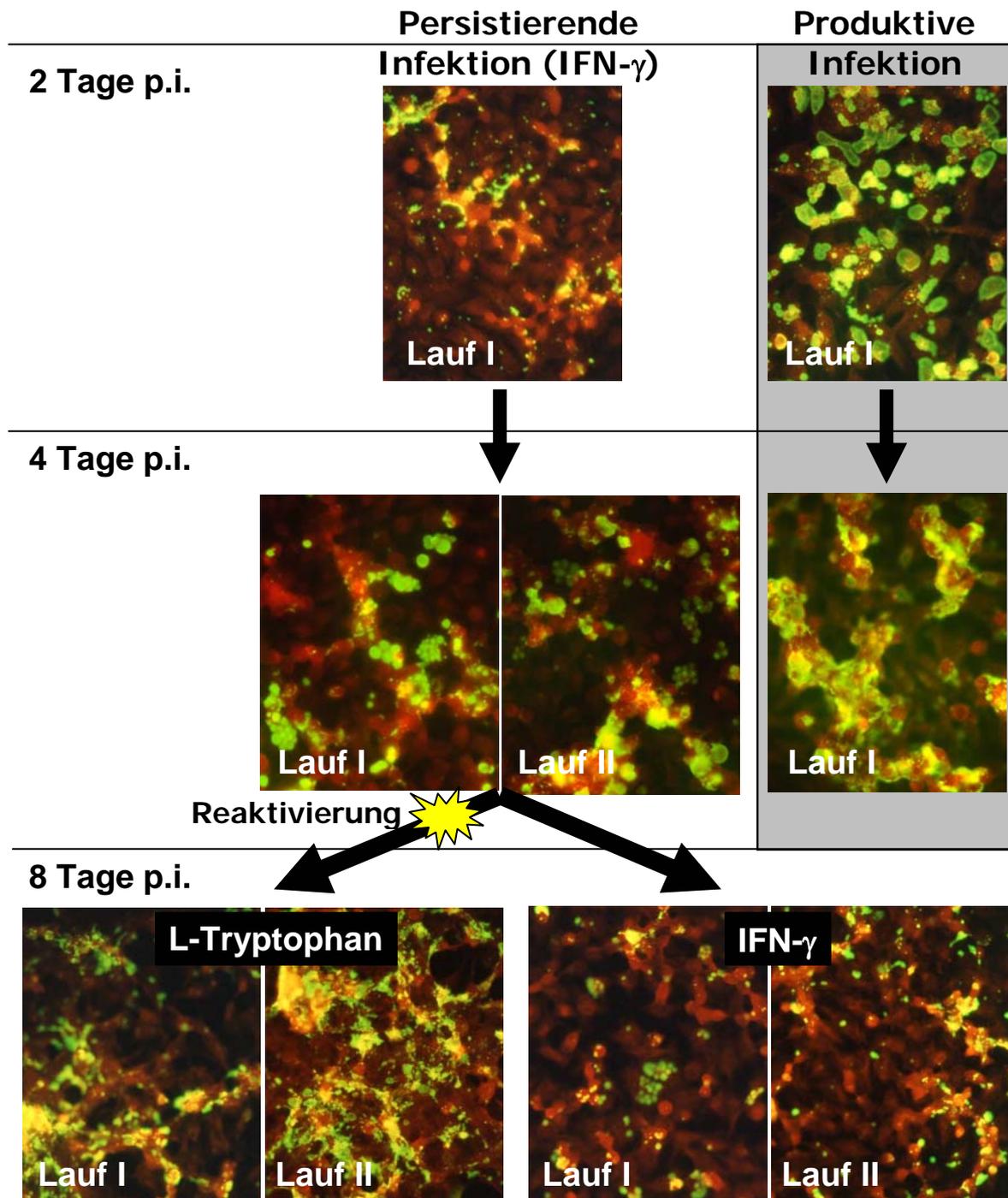
Im gesamten Verlauf von Tag 1 bis 4 konnten nur 4 % infektiöse Chlamydien in der persistierenden Infektion im Vergleich zur produktiven Infektion gefunden werden, die zu einem Großteil am Tag 3 im Überstand waren.

Während der Reaktivierung von Tag 5 bis Tag 10 konnten insgesamt  $1,4 \times 10^8$  IFU reaktiviert werden. Dies entspricht **41,2 %** im Vergleich zur gesamten Menge an gebildeten Chlamydien bei der produktiven Infektion ( $3,4 \times 10^8$  IFU). Die Langzeit-Analyse verdeutlicht gegenüber vorherigen Reaktivierungsversuchen eine weitere Freisetzung reaktivierter Chlamydien zu frühen und vor allem späten Zeitpunkten. Der Anteil an vitalen Chlamydien ist demnach wesentlich höher, als es in der „Momentaufnahme“ zu einem Zeitpunkt erscheint.

Nach Färbung der Proben an den einzelnen Tagen zeigten sich am Tag 1 der Infektion bei der produktiven wie auch bei der persistierenden Infektion vergleichbar kleine Einschlüsse (Bilder nicht gezeigt). Erst an Tag 2 können bei der produktiven Infektion große Einschlüsse erkannt werden, die nahezu die gesamte Zelle ausfüllen. Im Gegensatz dazu sieht man bei der persistierenden Infektion nur kleine Einschlüsse, die sich auch zu Tag 4 hin nicht wesentlich vergrößern.

Bei der produktiven Infektion sind nach 4 Tagen keine Einschlüsse mehr zu finden und die Zellen sind fast komplett zerstört. Die bei der persistierenden Infektion deutlich kleineren Einschlüsse variierten hinsichtlich ihrer Größe. Dies ist in einigen Fällen auf ein Verschmelzen der Einschlüsse zurückzuführen. Der Stopp im Entwicklungszyklus zu unterschiedlichen Zeitpunkten ist eine weitere Möglichkeit.

Bei der kontinuierlich weiter induzierten Persistenz vergrößerten sich die Einschlüsse nicht mehr. Die Behandlung mit L-Tryptophan zur Reaktivierung führte hingegen zu einer deutlichen Vergrößerung der Einschlüsse und zur Zell-Zerstörung (in Abbildung 4.7 exemplarisch für Tag 8).



**Abbildung 4.7** Fluoreszenzbilder persistierender Chlamydien durch IFN- $\gamma$  und reaktivierter *C.pneumoniae* nach L-Tryptophan Behandlung

Dargestellt werden Fluoreszenzaufnahmen von infizierten Zellen während der produktiven Infektion (2. und 4. Tag), bei Persistenz durch IFN- $\gamma$  (2., 4. und 8. Tag) und nach Reaktivierung am 4. Tag mit L-Tryptophan (8. Tag). Gezeigt werden die Bilder eines Experimentes, ähnliche Beobachtungen wurden in einem zweiten unabhängigen Experiment gemacht (hier zusätzlich mit abgebildet für die Persistenz der 4. und 8. Tag sowie für die Reaktivierung der 8. Tag).

Zusammengefasst:

Während der Persistenz durch IFN- $\gamma$  können bis zu 10 Tage nach Infektion nur wenige infektiöse Chlamydien im Überstand nachgewiesen werden. Die Menge beträgt nur 4 % zur gebildeten Anzahl EK bei der produktiven Infektion (bis Tag 4), und wurde vor allem am 3. Tag freigesetzt. Nach Reaktivierung mit L-Tryptophan ist dagegen wieder ein deutlicher Anstieg von infektiösen Chlamydien zu messen, der insgesamt >40 % zur produktiven Infektion ausmacht. Im zeitlichen Verlauf der Reaktivierung wurden ab dem 2. Tag nach Reaktivierung infektiöse EK freigesetzt.

Die Menge der EK erhöhte sich deutlich nach 3 Tagen Reaktivierung und später. Morphologisch fanden sich während der IFN- $\gamma$  Persistenz erkennbar kleinere Einschlüsse, die sich deutlich von der produktiven Infektion unterschieden. Eine Vergrößerung der Einschlüsse persistierender Chlamydien war bis zu 10 Tagen nicht zu beobachten. Nach Reaktivierung zeigte sich eine Vergrößerung der Einschlüsse und die Zerstörung der Zellen.

#### ***4.1.5 Wirtszell-Antworten bei persistierenden und reaktivierten *C. pneumoniae****

Bei der Genexpression der Wirtszelle während der Persistenz sind zwei alternative Hypothesen denkbar: Zum einen könnte eine **Daueraktivierung** der Wirtszellen zu einer stetigen Expression der entsprechenden Proteine führen. Dies könnte, etwa über die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, eine ständige Schädigung des umliegenden Gewebes hervorrufen und so zu den beobachteten Krankheitsbildern beitragen. Oder aber die Gene werden durch die persistierenden Chlamydien „**stumm geschaltet**“ und diese können sich in einer latenten Form der Immunabwehr des Körpers entziehen.

Demnach könnte es während der Persistenz durch geringe oder keine chlamydial-induzierte Genexpression der Wirtszelle zu einer schwachen oder keiner Schädigung von Gewebe kommen. Bei Reaktivierung würden die persistierenden Chlamydien die Wirtszellexpression erneut induzieren. Ein Wechselspiel von Persistenz und Reaktivierung der Chlamydien würde so im Verlauf einer chronischen Infektion zu einer langfristigen Schädigung des umliegenden Gewebes führen und wie in der ersten Hypothese die Krankheitsbilder verursachen.

Bisherige Untersuchungen der Wirtszellantworten wurden bisher meist bei der produktiven Infektion durchgeführt. Auch wurden bei Analyse der Persistenz **verschiedene** Modelle verwendet. Die Untersuchung der Wirtszellantworten während der Persistenz und der Vergleich der einzelnen Modelle soll aufklären, welche Gene gegenüber der produktiven Infektion verändert exprimiert werden. Dabei kann es während der Persistenz zu einer Daueraktivierung oder einer Stummschaltung der Wirtszell-Gene kommen. Zur Untersuchung dieser zwei eingangs gestellten Hypothesen wurde eine Auswahl an Genen,

die bei der produktiven Infektion reguliert waren, mit den optimierten Persistenzmodellen im Vergleich zur produktiven Infektion untersucht.

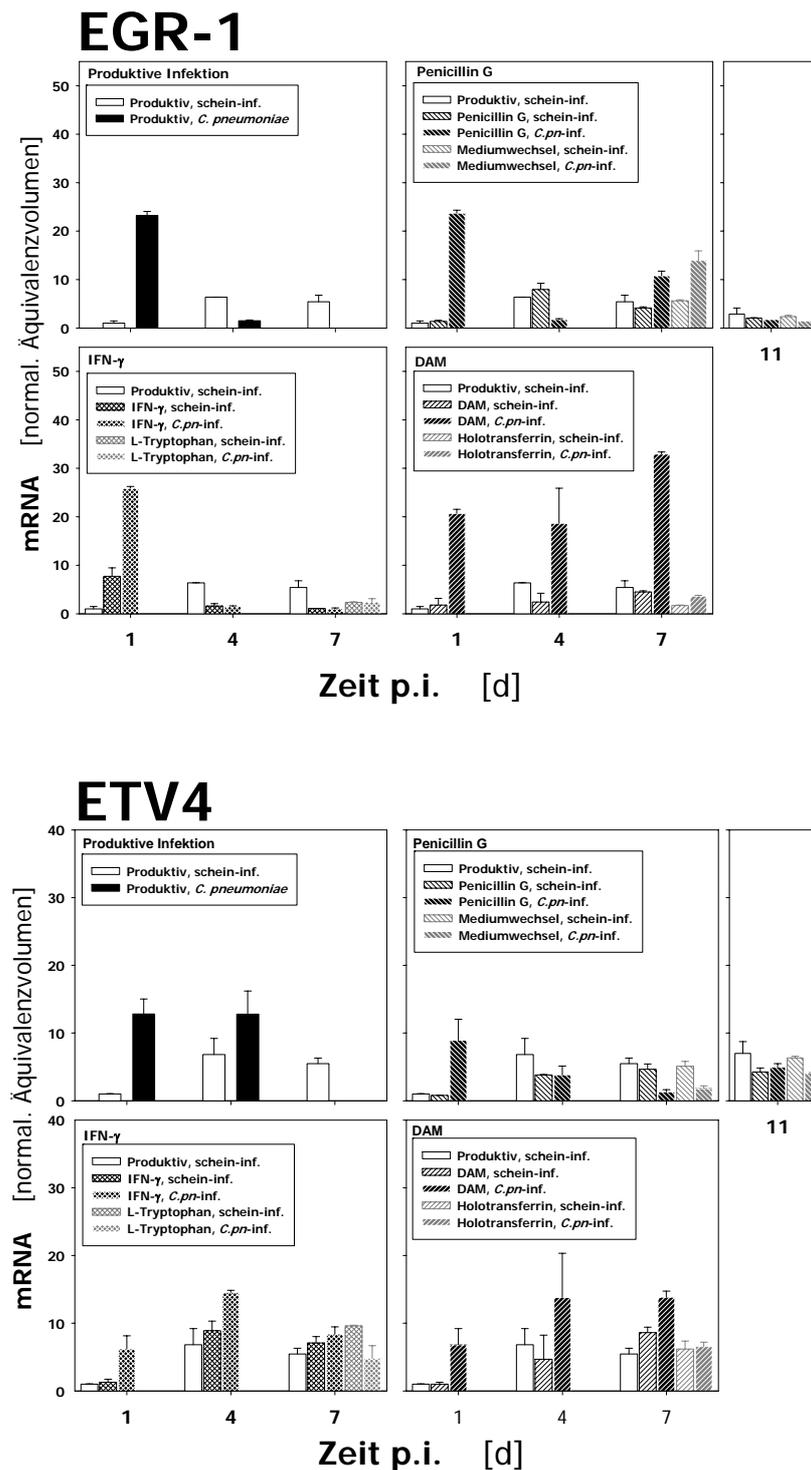
#### 4.1.5.1 Einfluss persistierender *C. pneumoniae* auf ihre Wirtszellen

HeLa-Zellen wurden mit semireinen *C. pneumoniae* mit MOI 30 in RPMI „Spezial“ Medium infiziert (resultierte in >90 % infizierter Zellen). Persistenz wurde wie unter 3.3.4 beschrieben induziert. Bei der produktiven Infektion wurden die Zellen weiter in RPMI „Spezial“ kultiviert. Alle 24 h wurden die Überstände abgenommen und zellfrei nach 3.2.8.1 zur Bestimmung von Zytokinen weggefroren.

Für die produktive Infektion wurde am Tag 1 und 4, für die Persistenz-Untersuchung bei DAM und IFN- $\gamma$  am 1., 4. und 7. Tag und für Penicillin G am 1., 4., 7. und zusätzlich am 11. Tag nach Infektion die Zellen lysiert. Die Reaktivierung wurde bei DAM und IFN- $\gamma$  am 7. Tag und Penicillin G am 7. und 11. Tag analysiert. Die RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben (Methoden, 3.1.14 und 3.1.16)

##### 4.1.5.1.1 Messung der Genexpression durch Real-Time RT-PCR

Abbildung 4.8 bis Abbildung 4.10 zeigen die Ergebnisse von *Real-time* RT-PCRs aus zwei biologisch unabhängigen Experimenten für die Gene CTGF, EGR-1, ETV4, LIF und IL-8. Bei der produktiven Infektion wurde nur der Tag 1 und Tag 4 nach Infektion analysiert, da die Zellen am Tag 7 komplett zerstört vorlagen und keine RNA mehr isoliert werden konnte.



**Abbildung 4.8** Genexpression von EGR-1 und ETV4 bei *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen während produktiver und persistierender Infektion sowie nach Reaktivierung

Die Abbildung zeigt den Vergleich der Genexpression nach Infektion in Form der gemessenen Menge an mRNA von schein-infizierten und infizierten HeLa-Zellen mit MOI 30 von *C. pneumoniae* während produktiver und persistierender Infektion mit 250  $\mu$ M DAM, 100 U/ml IFN- $\gamma$  oder 500 U/ml Penicillin G sowie Reaktivierung ab dem 4. Tag mit 800  $\mu$ g/ml Holotransferrin, 200  $\mu$ g/ml L-Tryptophan oder Mediumwechsel. Aufgetragen ist die mRNA als normalisiertes Äquivalenzvolumen an den Tagen 1, 4, und 7 nach Infektion. Am Tag 7 ist bei der produktiven Infektion nur die Genexpression der schein-infizierten Zellen dargestellt, da zu diesem Zeitpunkt bei infizierten Zellen keine Zellen mehr zur RNA-Isolierung geerntet werden konnten. Bei Penicillin G wurde zusätzlich der Tag 11 nach Infektion analysiert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei biologisch unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten.

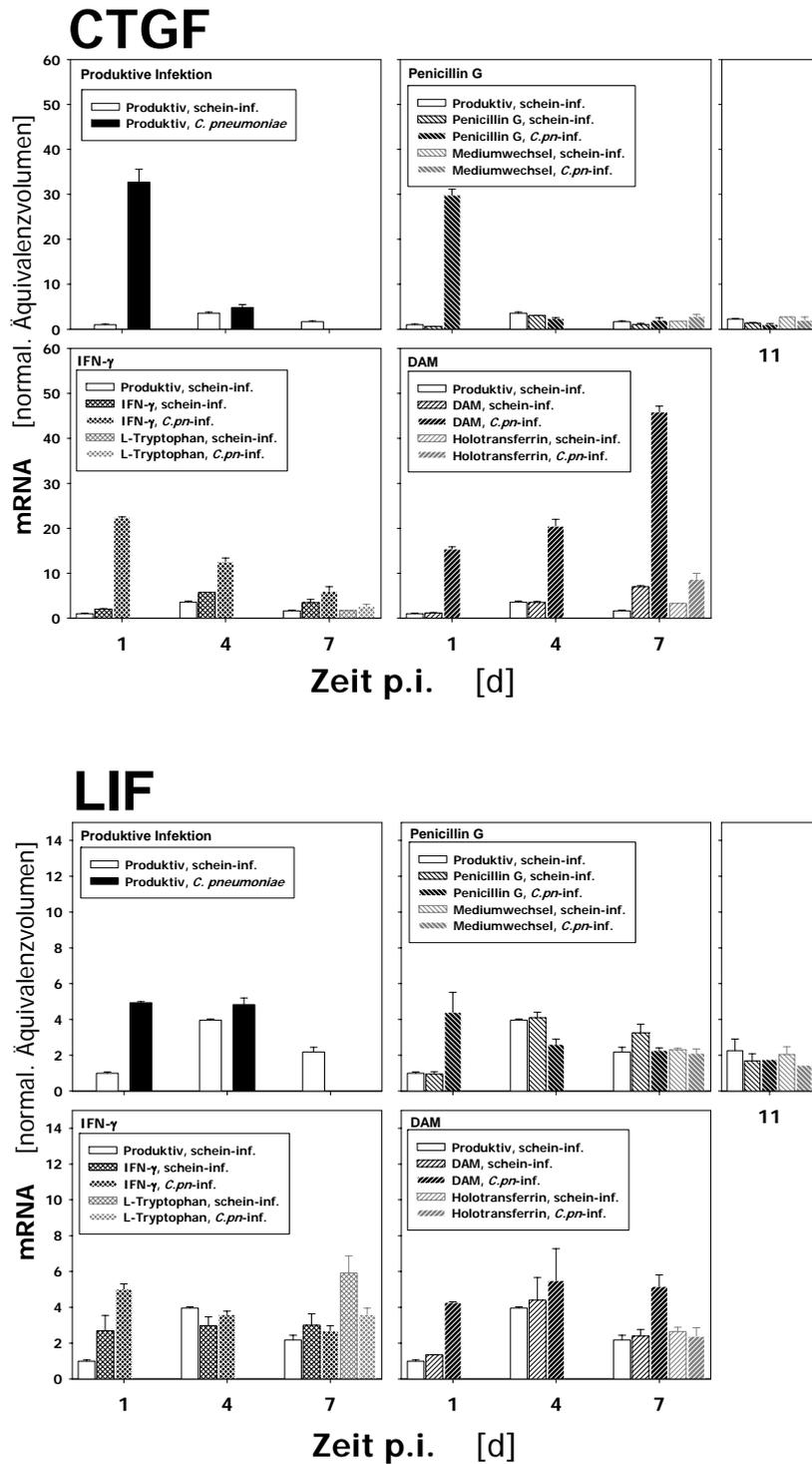
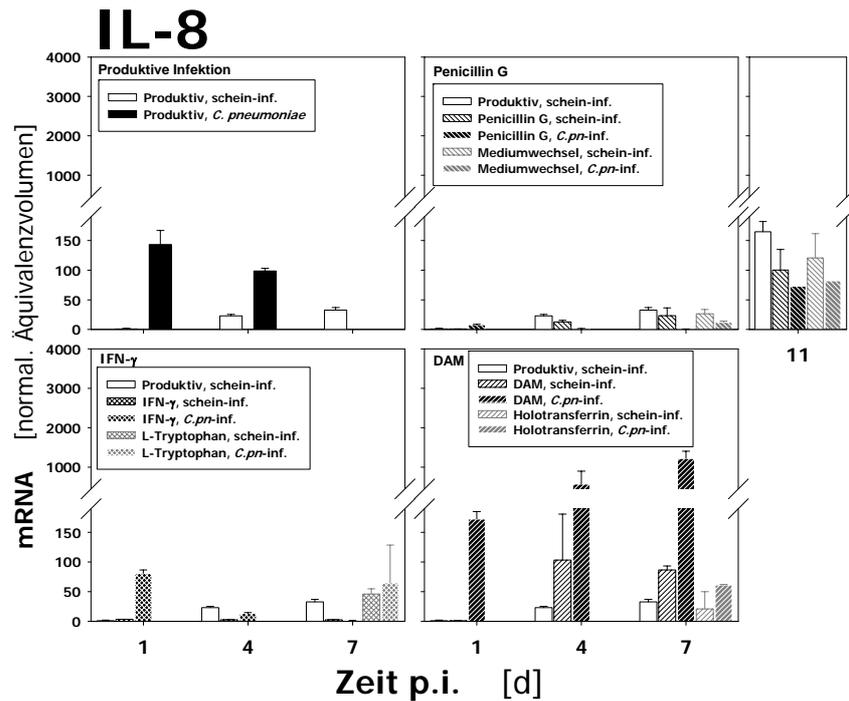


Abbildung 4.9 Genexpression von CTGF und LIF bei *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen während produktiver und persistierender Infektion sowie nach Reaktivierung

Beschreibung siehe Abbildung 4.8



**Abbildung 4.10** Genexpression von IL-8 bei *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen während produktiver und persistierender Infektion sowie nach Reaktivierung

Beschreibung siehe Abbildung 4.8

Generell ist bei der produktiven Infektion, beim IFN- $\gamma$  Modell und beim Penicillin G Modell eine verringerte und beim DAM Modell eine stetige oder sogar erhöhte Expression der Wirtszell-Gene zu beobachten gewesen.

Vergleicht man die Genexpression während der Persistenz in den verschiedenen Persistenz-Modellen und der produktiven Infektion genauer, so kann man je nach Persistenzmodell ein bestimmtes Expressionsmuster erkennen. Bei allen Genen konnte am 1. Tag nach Infektion in den Zellen eine vergleichbar hohe Expression des betrachteten Gens in allen Modellen beobachtet werden. Diese lag in derselben Größenordnung wie bei der produktiven Infektion. Eine Ausnahme bildeten nur die infizierten Zellen bei IL-8 im Penicillin G Modell, wo nur geringe Mengen an mRNA gemessen werden konnten.

Bei den schein-infizierten Zellen waren nur kleine Mengen an mRNA des entsprechenden Gens nachweisbar, deutlich geringer als bei den infizierten Zellen. Nur beim Cytokin LIF war die mRNA Menge der schein-infizierten Zellen im Vergleich zu den infizierten Zellen nach 4 und 7 Tagen recht hoch.

Am 4. Tag waren deutliche Unterschiede in den drei Modellen zu erkennen. Abgesehen von ETV4 im IFN- $\gamma$  Modell konnte weniger mRNA in den infizierten Zellen als am 1. Tag nachgewiesen werden. Bei ETV4 war bei allen Modellen in den schein-infizierten Zellen eine höhere mRNA Menge im Vergleich zum 1. Tag gemessen worden. Dadurch wurde der Unterschied bei der Genexpression im IFN- $\gamma$  Modell von infizierten und

schein-infizierten Zellen am 4. Tag kleiner als am 1. Tag. Im DAM Modell blieb die Genexpression in den infizierten Zellen bei EGR-1, ETV4 und bei LIF gleich stark bzw. wurde bei CTGF sowie IL-8 sogar stärker. Um dies besser darstellen zu können, musste bei IL-8 sogar die Skalierung ab 490 Volumenäquivalenten geändert werden.

Dieses Verhalten der Genexpression wurde auch in den Modellen am 7. Tag beobachtet. Bei IFN- $\gamma$  und Penicillin G war bei den meisten Genen eine geringere Expression zu sehen, die der Expression der schein-infizierten Zellen entsprach. Ausnahme bildete hier nur EGR-1 im Penicillin G Modell. Hier war eine höhere mRNA Menge als am 4. Tag nach Infektion zu messen. Diese lag deutlich über dem mRNA Gehalt der schein-infizierten Zellen am Tag 4. Am Tag 7 war allerdings wesentlich weniger mRNA in den infizierten Zellen als am 1. Tag nach Infektion vorhanden. Im DAM Modell kam es weiter zu einer konstanten Expression bei ETV4 und LIF oder sogar zu einer deutlich verstärkten Bildung von mRNA bei EGR-1, CTGF und IL-8.

Auch am Tag 11 zeigte sich im Penicillin G Modell kein Unterschied bei der Genexpression von infizierten und schein-infizierten Zellen. Eine Besonderheit war bei IL-8 am 11. Tag zu sehen. Dort zeigten alle untersuchten Proben, auch die schein-infizierten Zellen mit Medium ohne Zusätze, eine starke IL-8 mRNA Bildung. Demnach ist die IL-8 Expression wahrscheinlich eher auf die lange Kulturzeit zurückzuführen.

Nach der Reaktivierung war bei Penicillin G auch weiterhin kein Unterschied bei der Genexpression von infizierten und schein-infizierten Zellen zu beobachten. Bei den persistierenden und den reaktivierten Chlamydien wurden vergleichbare Mengen an mRNA nachgewiesen.

Im IFN- $\gamma$  Modell ergab die Reaktivierung eine minimal niedrigere Expression von CTGF gegenüber der Persistenz, wobei kein Unterschied zwischen infizierten und schein-infizierten Zellen zu erkennen war. Auch bei der Genexpression der Transkriptionsfaktoren kam es im Vergleich zur Persistenz zu keiner Veränderung der Expression von infizierten und schein-infizierten Zellen. Bei LIF und IL-8 stieg der Gehalt an mRNA in den Zellen nach der Reaktivierung deutlich an. Demnach sind die Zellen am Reaktivierungstag (Tag 4 nach Infektion) noch vital gewesen. Bei LIF unterschied sich die Expression infizierter und schein-infizierter aber nicht voneinander. Bei IL-8 kann dazu keine Aussage getroffen werden, da hier die Standardabweichung zu groß ist.

Im DAM-Modell führte die Reaktivierung mit Holotransferrin zu einem deutlichen Unterschied in der Genexpression gegenüber der Persistenz. Lag während der Persistenz ein Unterschied bei der Genexpression zwischen infizierten und schein-infizierten Zellen

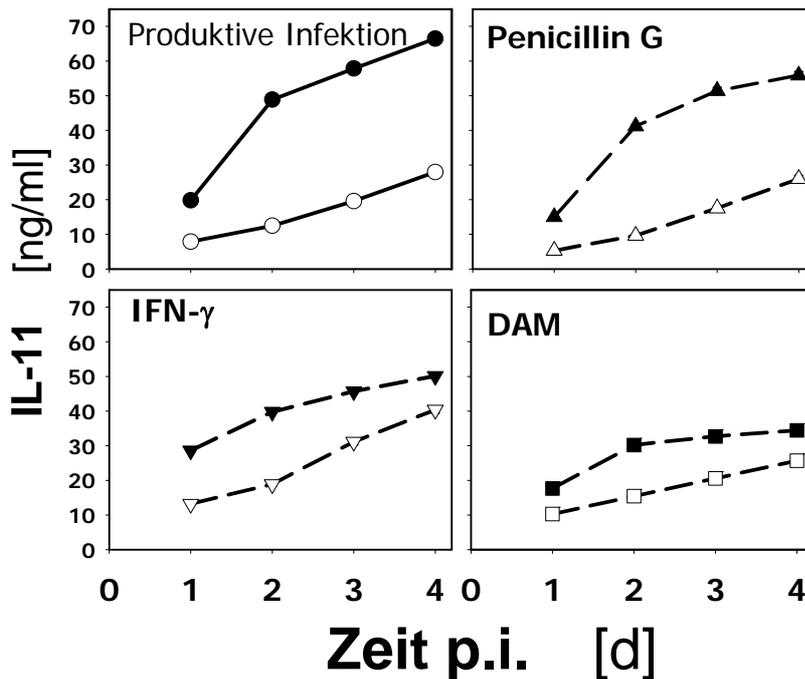
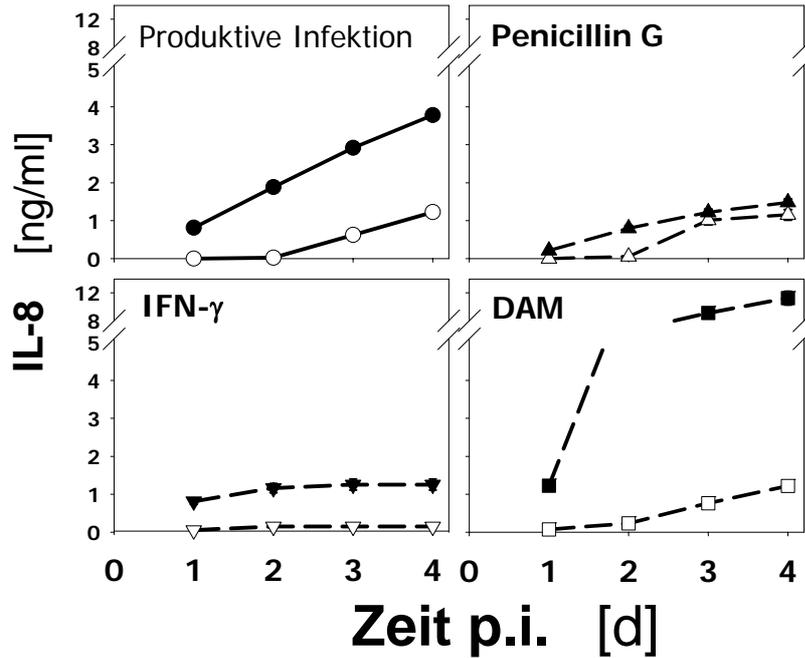
vor, so war dies nach der Reaktivierung nicht mehr der Fall. Auch exprimierten die Zellen nur noch geringe Mengen an mRNA.

Zusammengefasst:

Während der Persistenz zeichnen sich in den einzelnen Modellen deutliche Expressionsmuster nach Infektion heraus. Am Tag 1 liegt eine Genexpression in etwa der Größenordnung wie bei der produktiven Infektion vor. Unterschiede zwischen den einzelnen Modellen sind am Tag 4 und Tag 7 zu beobachten. Während die Expression der infizierten Zellen im DAM Modell weiter bestehen bleibt oder sogar ansteigt, ist beim IFN- $\gamma$  und Penicillin G Modell eine geringere oder keine Expression zu messen gewesen. Nach Reaktivierung war im DAM Modell keine Chlamydien-induzierte Genexpression mehr zu beobachten. Auch bei IFN- $\gamma$  und Penicillin G ergaben sich keine Unterschiede zwischen infizierten und schein-infizierten Zellen. Bei den Zytokinen LIF und IL-8 führte die Reaktivierung bei IFN- $\gamma$  mit L-Tryptophan zu einer generellen Erhöhung der Expression bei infizierten und schein-infizierten Zellen.

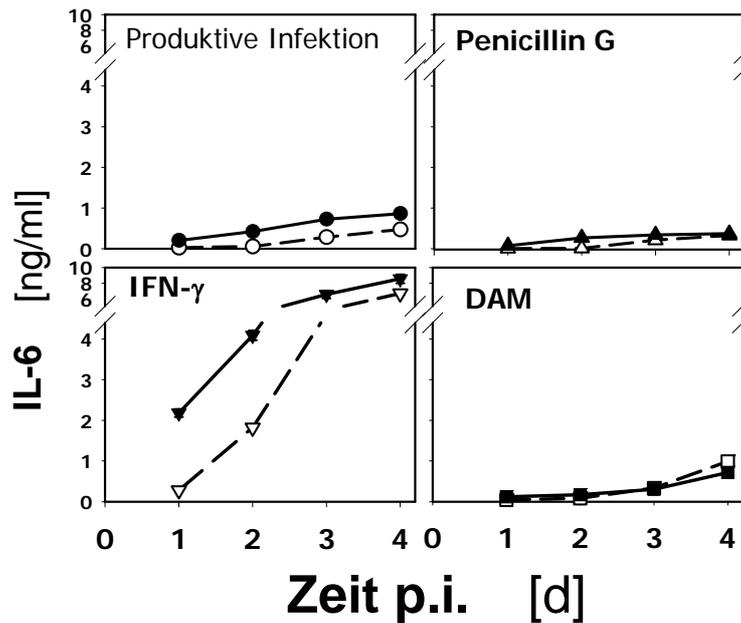
#### 4.1.5.1.2 Messung von Zytokinen in Zell-Überständen bei persistierender Infektion

Aus den zellfreien Überständen wurden durch ELISA (Methoden, 3.2.8.2) die Konzentrationen an IL-8, IL-11 und IL-6 bestimmt. In Abbildung 4.11 bis Abbildung 4.12 sind die Ergebnisse der Interleukin-Sekretion von Tag 1 bis 4 nach Infektion aus Doppelwerten dargestellt. Gezeigt sind nur die Verläufe des 1. Experimentes, diese konnten aber in einem zweiten, biologisch unabhängigen Wiederholungsexperiment bestätigt werden (siehe Anhang). Da der Verlauf der Sekretion 5 bis 7 Tage nach Infektion sich im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten nicht mehr geändert hat, wird zu Gunsten einer übersichtlicheren Darstellung auf die Abbildung dieser Zeitpunkte an dieser Stelle verzichtet.



**Abbildung 4.11 IL-8 und IL-11 Freisetzung schein-infizierter und infizierter HeLa-Zellen während produktiver und persistierender Infektion von *C. pneumoniae***

Dargestellt ist der Verlauf der IL-8 und IL-11 Sekretion von Tag 1 bis Tag 4 nach Infektion aus den Überständen von schein-infizierten (offene Symbole) und infizierten (geschlossene Symbole) HeLa-Zellen mit MOI 30 von *C. pneumoniae*. Verglichen wird die freigesetzte Menge an IL-8 während produktiver Infektion (Kreis-Symbol, durchgezogene Linie) und bei Persistenz (gestrichelte Linie) von *C. pneumoniae* durch 250  $\mu$ M DAM (Quadrat-Symbol), 100 U/ml IFN- $\gamma$  (Dreieck-Symbol, Spitze nach unten) oder 500 U/ml Penicillin G (Dreieck-Symbol, Spitze nach oben). Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines biologischen Replikats mit Doppelwerten. Der Verlauf der IL-8 Sekretion konnte in einem Wiederholungsexperiment reproduziert werden.



**Abbildung 4.12 IL-6 Freisetzung schein-infizierter und infizierter HeLa-Zellen während produktiver und persistierender Infektion von *C. pneumoniae***

Beschreibung siehe Abbildung 4.11

Abbildung 4.11 verdeutlicht einen Anstieg der IL-8 Konzentration bei allen Persistenzmodellen wie auch der produktiven Infektion bis zwei Tage nach Infektion. Am 3. Tag ist bei der produktiven Infektion wie auch bei IFN- $\gamma$  und Penicillin G induzierter Persistenz ein vergleichbar hoher Anstieg an IL-8 bei infizierten und schein-infizierten Zellen messbar. Im Gegensatz dazu zeigt sich beim DAM-Modell ein starker Anstieg 2 Tage nach Infektion bei den infizierten Zellen. Dieser hielt auch zu späteren Zeitpunkten weiter an, während bei den schein-infizierten Zellen nur eine schwache Sekretion vorlag (Änderung der Skalierung).

Im Gegensatz zu IL-8 zeigte die IL-11 Sekretion bei allen Persistenz-Modellen und der produktiven Infektion einen ähnlichen Verlauf. Bis 2 Tage nach Infektion wurde IL-11 von den infizierten Zellen sekretiert. Ab dem 3. Tag nach Infektion ist die IL-11 Sekretion der Zellen bei der persistierenden wie auch der produktiven Infektion nicht mehr Chlamydien-induziert.

Nur 1 und 2 Tage nach Infektion wurde bei der produktiven Infektion wie auch beim Penicillin G Modell stärker IL-6 bei den infizierten Zellen freigesetzt (Abbildung 4.12). Im DAM-Modell hingegen wurde IL-6 nicht Chlamydien-induziert sekretiert. Im Vergleich dazu kann bei Verwendung von IFN- $\gamma$  1 Tag nach Infektion durch die infizierten Zellen ein starker Anstieg an IL-6 im Überstand nachgewiesen werden, der sogar deutlich höher ist

als bei der produktiven Infektion. 2 Tage nach Infektion war im IFN- $\gamma$  Modell bei infizierten und schein-infizierten Zellen ein vergleichbarer Anstieg an IL-6 zu messen.

Zusammengefasst:

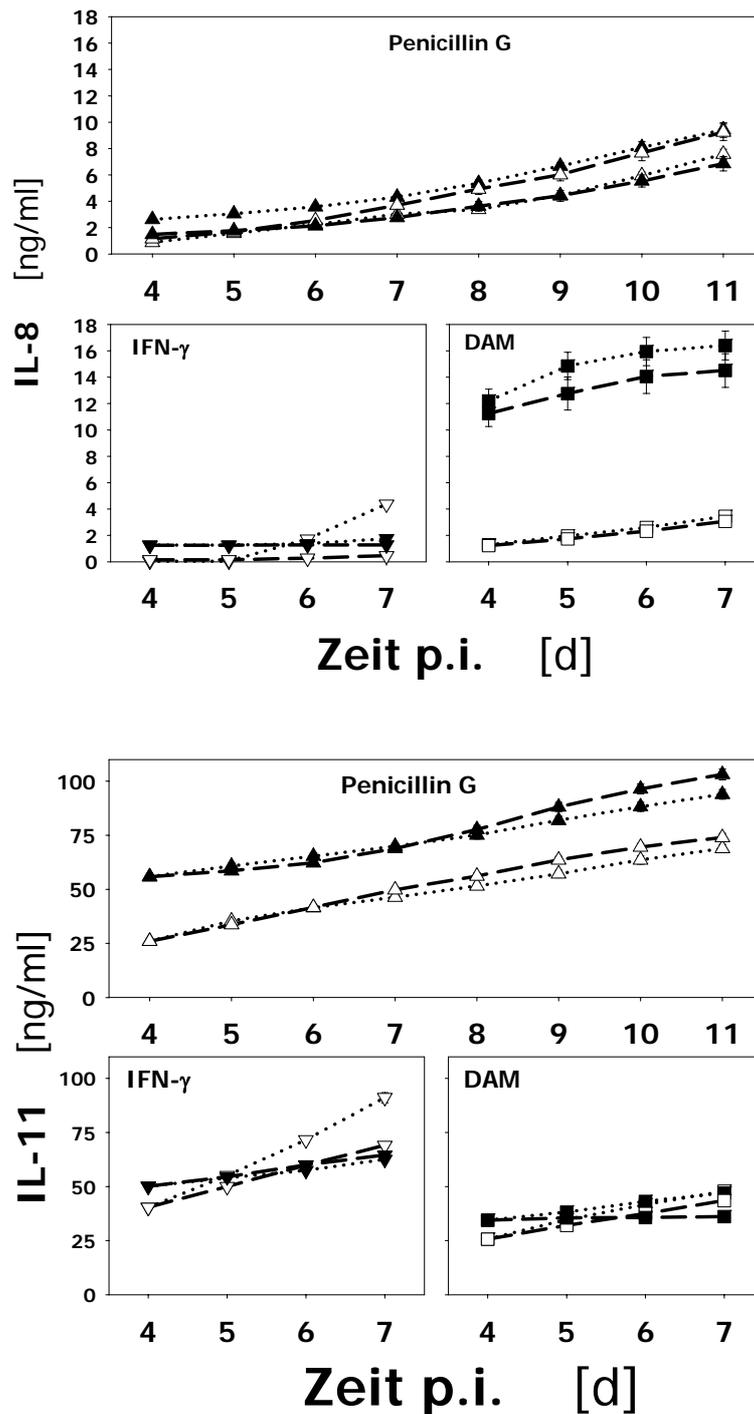
Auch bei der Bestimmung der Zytokin-Menge im Überstand konnten bei IL-8 die Expressionsmuster der Persistenzmodelle und der produktiven Infektion beobachtet werden.

Für IL-6 und IL-11 hingegen zeigte sich ein Unterschied zu den anderen analysierten Genen. Hier wurde nur bis zum 2. Tag eine Chlamydien-induzierte Freisetzung gemessen. Besonderheit im IFN- $\gamma$  Modell war der deutliche Anstieg der Chlamydien-induzierten IL-6 Sekretion nach einem Tag, der sogar höher lag als bei der produktiven Infektion.

#### 4.1.5.1.3 Messung der Expression durch Proteinbestimmung aus Zell-Überständen nach Reaktivierung

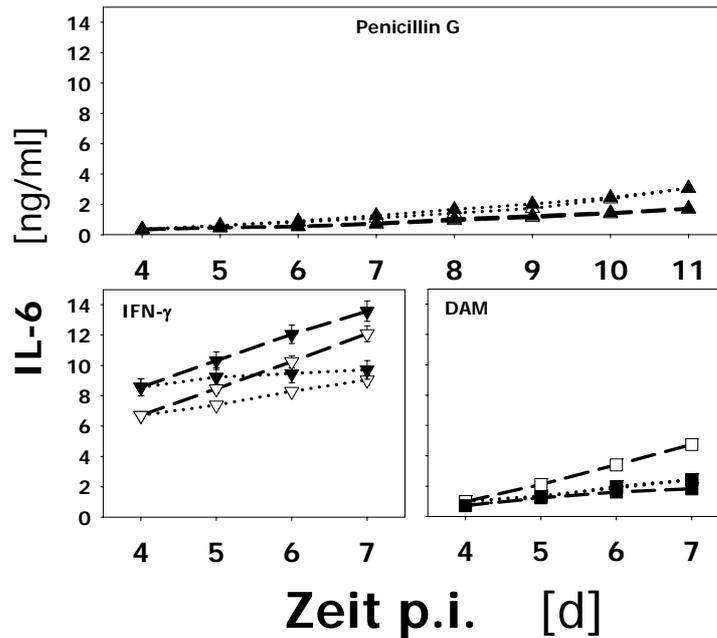
Aus den zellfrei eingefrorenen Überständen wurden durch ELISA (Methoden, 3.2.8.2) die Konzentrationen an IL-8, IL-11 und IL-6 bestimmt. In Abbildung 4.13 bis Abbildung 4.14 sind die Verläufe der Interleukin-Sekretion in allen Persistenz-Modellen von Tag 4 bis Tag 7, für Penicillin G zusätzlich noch für Tag 7 bis 11 nach Infektion aus einem Experiment mit Doppelwerten dargestellt. Diese konnten in einem zweiten, biologisch unabhängigen Wiederholungsexperiment bestätigt werden (siehe Anhang).

Zu beachten ist, dass beim DAM Modell am Tag 5 nach Infektion bei den infizierten Zellen nur noch ein Zehntel der Zellen am Boden haftete. Daher kann ein direkter Vergleich der Sekretion nur zwischen den infizierten bzw. zwischen den schein-infizierten Zellen durchgeführt werden. Nur in Ausnahmefällen, bei wesentlich stärkerer Sekretion von infizierten Zellen zu schein-infizierten Zellen können direkt Rückschlüsse auf das Expressionsverhalten gezogen werden. Beim IFN- $\gamma$  und Penicillin G Modell waren vergleichbare Zellmengen bei infizierten und schein-infizierten Zellen vorhanden.



**Abbildung 4.13** Freisetzung von IL-8 und IL-11 schein-infizierter und infizierter HeLa-Zellen bei persistierender Infektion und nach Reaktivierung persistierender *C. pneumoniae*

Dargestellt ist der Verlauf der IL-8 und IL-11 Sekretion von Tag 4 bis Tag 7, für Penicillin G von Tag 4 bis 11 nach Infektion aus den Überständen von schein-infizierten (offene Symbole) und infizierten (geschlossene Symbole) HeLa-Zellen mit MOI 30 während persistierender Infektion (gestrichelte Linien) und nach Reaktivierung (gepunktete Linien). Verglichen wurde die IL-8 bzw. IL-11 Freisetzung bei Persistenz und nach Reaktivierung in den 3 Modellen: Persistenz mit 250  $\mu$ M DAM während der Infektion und nach 4 Tagen p.i. Reaktivierung mit 800  $\mu$ g/ml Holotransferrin (Quadrat-Symbol), Persistenz mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  30 min nach Infektion und Reaktivierung mit 200  $\mu$ g/ml L-Tryptophan (Dreieck-Symbol, Spitze nach unten) sowie Persistenz mit 500 U/ml Penicillin G und Reaktivierung durch Mediumwechsel ohne Zusätze (Dreieck-Symbol, Spitze nach oben). Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines biologischen Replikats mit Doppelwerten. Der Verlauf der IL-8 und IL-11 Sekretion konnte in einem unabhängigen Wiederholungsexperiment reproduziert werden.



**Abbildung 4.14** Freisetzung von IL-6 schein-infizierter und infizierter HeLa-Zellen bei persistierender Infektion und nach Reaktivierung persistierender *C. pneumoniae*

Beschreibung siehe Abbildung 4.13

Bei IL-8 (Abbildung 4.13) Penicillin G Modell wurde nach Reaktivierung ein vergleichbarer Anstieg an IL-8 bei infizierten wie schein-infizierten Zellen gemessen, während die mit Penicillin G weiter behandelten schein-infizierten Zellen mehr IL-8 freisetzen als die infizierten Zellen.

Unter IFN- $\gamma$  Behandlung sekretierten die schein-infizierten Zellen nahezu kein IL-8. Nach Zugabe von L-Tryptophan war sowohl bei den infizierten wie schein-infizierten Zellen ein Anstieg an IL-8 zu messen. Allerdings ist die Sekretion bei den infizierten Zellen deutlich geringer als bei den schein-infizierten Zellen.

Interessanterweise zeigten die infizierten Proben keine deutlichen Unterschiede bei der IL-8 Sekretion von Zellen mit persistierenden und reaktivierten *C. pneumoniae* im DAM-Modell, obwohl zuvor bei der Messung der mRNA deutlich weniger IL-8 Expression bei den Holotransferrin behandelten Zellen gemessen worden ist. Hier könnte die geringe Zellmenge der Grund für die Diskrepanz sein.

Bei Penicillin G sekretieren sowohl infizierte wie schein-infizierte Zellen nach Reaktivierung etwas mehr IL-11 als infizierte und schein-infizierte Zellen während der Persistenz (Abbildung 4.13). Ein Unterschied nach Reaktivierung zwischen infizierten und schein-infizierten Zellen war hier nicht zu erkennen.

Im IFN- $\gamma$  Modell war keine veränderte IL-11 Sekretion bei infizierten Zellen mit persistierenden und reaktivierten Chlamydien zu beobachten. Die schein-infizierten Zellen setzten nach Zugabe von L-Tryptophan deutlich mehr IL-11 ab Tag 5 nach Infektion frei.

Im Fall des DAM-Modells führte die Reaktivierung der persistierenden Chlamydien mit Holotransferrin zu einem Anstieg an IL-11 wenn nur die Sekretion der infizierten Zellen untereinander verglichen wird. Auf die schein-infizierten Zellen hatte die Behandlung mit Holotransferrin keinen Einfluss. Die sekretierte Menge an IL-11 blieb zu allen Zeitpunkten gleich.

Bei Zellen mit persistierenden und reaktivierten Zellen ist im Penicillin G Modell kein Unterschied zwischen infizierten und schein-infizierten Zellen bei der IL-6 Sekretion (Abbildung 4.14) messbar. Die IL-6 Freisetzung bei Penicillin G behandelten Zellen ist geringer als bei den Zellen ohne Penicillin G.

Bei Zugabe von L-Tryptophan wird bei infizierten wie auch den schein-infizierten Zellen deutlich weniger IL-6 freigesetzt als bei den IFN- $\gamma$  behandelten Zellen. Dabei ist bei den schein-infizierten Zellen eine größere IL-6 Sekretion zu beobachten als bei den infizierten Zellen. Im IFN- $\gamma$ -Modell war bei infizierten und schein-infizierten Zellen unter Persistenzbedingungen eine stetige IL-6 Sekretion gemessen worden. Dieser Anstieg wird jedoch nicht durch die Chlamydien hervorgerufen.

Die Behandlung mit DAM führte zu einer Sekretion von IL-6, die aber nicht Chlamydien-induziert war. Bei Zellen mit Holotransferrin reaktivierten Chlamydien war nur ein leichter Anstieg an IL-6 im Vergleich zu den persistierenden Proben nachzuweisen.

Zusammengefasst:

Nach Reaktivierung kommt es bei keinem der untersuchten Interleukine zu einer Chlamydien-induzierten Freisetzung. Bei IL-8 und IL-11 kann bei den schein-infizierten Zellen nach L-Tryptophan Gabe eine höhere Sekretion als bei den infizierten Zellen beobachtet werden. Im IFN- $\gamma$  Modell verringerte sich nach Reaktivierung bei infizierten und schein-infizierten Zellen die IL-6 Freisetzung.

#### Zusammenfassung chlamydiale Persistenz:

Die Optimierung der Persistenzmodelle erlaubte bei *C. trachomatis* D eine Analyse der Wirtszell-Antworten bis 4 Tage nach Infektion. Bei *C. pneumoniae* können Untersuchungen bei hoher MOI (MOI 30) bis zu 7 Tage (IFN- $\gamma$  und DAM-Modell) bzw. 11 Tage (Penicillin G Modell) durchgeführt werden.

Dabei offenbarte die Analyse der Wirtszell-Genexpression nach *C. pneumoniae* Infektion mit hohen MOI, dass in den 3 verschiedenen Persistenzmodellen und der produktiven Infektion charakteristische Expressionsmuster beobachtet werden können. Beim IFN- $\gamma$  und Penicillin G Modell werden die Gene stumm geschaltet während sie im DAM-Modell

daueraktiviert bleiben. Ausnahme bildete nur IL-6 und IL-11, wo nach 2 Tagen in allen Modellen keine Chlamydien-induzierte Genexpression messbar war. Die IFN- $\gamma$  Zufuhr führte dabei zu einer deutlich höheren IL-6 Sekretion der Wirtszellen durch die Chlamydien gegenüber der produktiven Infektion.

Nach Reaktivierung war in allen Modellen kein Unterschied zwischen infizierten und schein-infizierten Zellen zu beobachten.

## 4.2 Einfluss intrazellulärer *S. typhimurium* auf HeLa-Zellen

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Interaktion von **fakultativ** intrazellulären Salmonellen und ihren Wirtszellen. Wie **obligat** intrazelluläre Erreger (z. B. Chlamydien) müssen sie mit ihren Wirtszellen interagieren und führen zu phänotypischen Veränderungen.

Viele dieser Veränderungen können durch Effektorproteine hervorgerufen werden, die zuvor über den TypIII-Sekretionsapparat in das eukaryote Zytosol übertragen worden sind. Zur Identifikation von Veränderungen der Genexpression bei infizierten Zellen soll die Genregulation nach Infektion mit *S. typhimurium* Wildtyp und *Knock-Out*-Mutanten der beiden TypIII-Sekretionssysteme bei Salmonellen verglichen werden. Diese Analysen könnten die Möglichkeit bieten, die Bedeutung der TypIII-Systeme und den Pathomechanismus der übertragenen Effektorproteine bei Salmonellen-Infektion genauer zu untersuchen.

Es ist vielfach noch nicht geklärt, welche Veränderungen **spezifisch** von entsprechenden Erregern verursacht werden oder ob diese **allgemeinen** Reaktionen der Zelle durch intrazelluläre Bakterien darstellen. Daher soll die Wirtszell-Genexpression von einer Auswahl an Chlamydien-induzierten Genen nach Infektion mit den phylogenetisch entfernten Salmonellen untersucht werden. Weiter soll überprüft werden, welchen Einfluss passive Faktoren, wie Oberflächenmoleküle (z. B. Lipopolysaccharide) und Hitzeschock-Proteine auf die Wirtszelle haben. Aber auch der Einfluss von freigesetzten Mediatoren im Überstand infizierter Zellen auf die infizierte (autokrin) oder benachbarte (parakrin) Zelle wird analysiert.

### 4.2.1 Etablierung der Infektion von HeLa-Zellen mit *S. typhimurium*

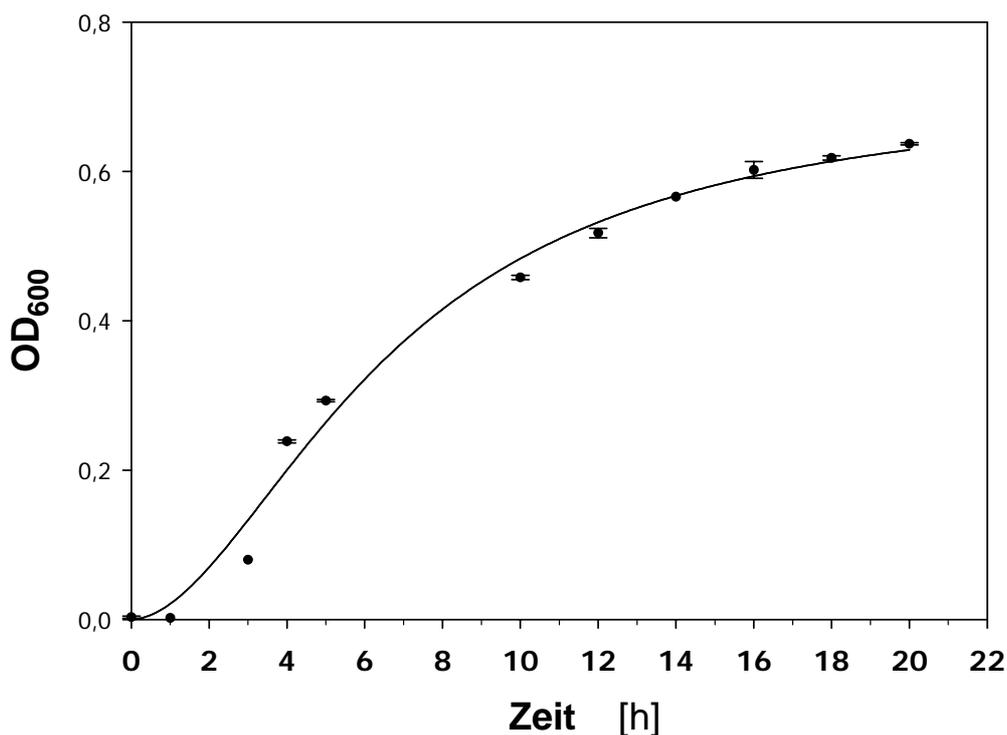
Für die Untersuchung von intrazellulären Salmonellen im HeLa T-Infektionsmodell musste das bestehende Infektionsprotokoll für Salmonellen angepasst werden. Grundlage für die Etablierung war das Protokoll von Prof. Hück (Methoden, 3.3.3.2), das an die bestehenden Bedingungen der Infektion von HeLa-Zellen mit Chlamydien zur besseren Vergleichbarkeit historischer Ergebnisse angeglichen werden sollte.

Im DNA-Micro-Array sollen später die Regulationsvorgänge in den eukaryoten Zellen nach Infektion mit *S. typhimurium* wt und der beiden Mutanten miteinander verglichen

werden. Um am Analysezeitpunkt eine vergleichbare Anzahl an intrazellulären Salmonellen vorliegen zu haben, muss die Infektion weiter optimiert werden.

#### 4.2.1.1 Wachstumsverhalten von *S. typhimurium* wt unter mikroaerophilen Bedingungen

Die Infektiösität von Salmonellen ist bei minimalen Sauerstoffkonzentrationen beim Wachstum in Medium durch die Hochregulation des SPII-TypIII-Sekretionsapparates am größten. Daher wurde eine Wachstumskurve unter mikroaerophilen Bedingungen aufgenommen, um den Aufarbeitungszeitpunkt mit den infektiösesten Salmonellen zu bestimmen. Hierzu wurden 40 ml LB-Medium mit 40  $\mu$ l *S. typhimurium* wt angeimpft und je 3 ml auf Röhren verteilt. Diese wurden ohne Schütteln und mit Parafilm verschlossen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten ist eine Probe in Doppelwerten bei 600 nm im Photometer gegen LB-Medium gemessen worden. Zusätzlich wurde zu 3 h und 12 h aus den entsprechenden Proben die CFU (*colony forming unit*) durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen bestimmt. Diese Bestimmung sollte es später ermöglichen, durch photometrische Messung die CFU abzuschätzen.



**Abbildung 4.15** Mikroaerophile Wachstumskurve von *S. typhimurium* wt

Dargestellt ist die Trübungsmessung bei 600 nm im Photometer von 1 ml *S. typhimurium* wt Bakteriensuspension zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten während des Wachstums unter mikroaerophilen Bedingungen. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen eines Einzelexperimentes mit Doppelwerten.

Das erste Wachstum der Salmonellen war ab 3 h nach Start der Inkubation zu messen. Nach 4 h sieht man deutliches Wachstum der Salmonellen durch einen steilen Anstieg der Extinktion, wobei es sich zu diesem Zeitpunkt noch um aerobes Wachstum durch den

Rest-Sauerstoff im Röhrchen handelt. Erst wenn dieser aufgebraucht ist, wachsen die Salmonellen unter mikroaerophilen Bedingungen. Dies war zu späteren Zeitpunkten (ab 12 h) der Fall. Hier war der Anstieg der Extinktion nur noch schwach und die Wachstumskurve flachte zunehmend ab. Nach 17 h war nur noch eine minimale Extinktionsänderung zu messen. Die Salmonellen sind ab diesem Zeitpunkt in der stationären Phase. Der Bereich zwischen 12 h und 16 h erschien daher für die Aufarbeitung am besten geeignet. Für die OD<sub>600</sub>-Bestimmung wurde für 1 OD eine lebende Bakterienzahl von  $1,1 \times 10^9$  CFU/ml aus den ausplattierten Verdünnungsreihen zu 3 und 12 h ermittelt.

Zur Infektion wurden *S. typhimurium* wt nach 12 h und 16 h aufgearbeitet (Methoden, 3.3.3.1) und die Zellen mit MOI 1, 5 und 10 durch Zentrifugation infiziert.

Im Infektions-Protokoll der AG Hück sind die Zellen für 5 min bei 35°C mit 500xg zentrifugiert und anschließend erst 30 min bei 4 °C, dann 1 h bei 37 °C inkubiert worden.

Im angepassten Infektions-Protokoll wurden Kühl- und Zentrifugationsschritt zusammengefasst. Dazu wurden die Zellen mit den Salmonellen für 15 min bei 4°C mit 2000xg zentrifugiert. Die Zentrifugationsdauer von 15 min stellt einen Kompromiss der Zentrifugations- und Kühldauer zum ursprünglichen Infektionsprotokoll dar. Direkt im Anschluss sind die infizierten Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert worden. In beiden Protokollen erfolgte die Abtötung extrazellulärer Salmonellen nach Waschen mit PBS durch Zugabe von Gentamicin (finale Konzentration 100 µg/ml) und 15 min Inkubation bei 37 °C. Durch die Gentamicin-Behandlung überlebten im Überstand nach Ausplattieren weniger als 1 % der ursprünglich eingesetzten Salmonellen.

Wie zu erwarten, zeigten sich nach Immunfärbung der Salmonellen mit steigender MOI sowohl nach 12 h wie auch 16 h Aufarbeitung in beiden Protokollen mehr intrazelluläre Erreger. Bei der Aufarbeitung nach 16 h mikroaerophilen Wachstums wurden allerdings deutlich mehr intrazelluläre Erreger gefunden als zu der früheren Aufarbeitung. Die Infektion nach dem Hück-Protokoll ergab gegenüber dem angepassten Protokoll nach visueller Abschätzung eine um 20-30 % geringere Infektionsrate. Auch wurden in beiden Protokollen bei der hohen MOI meist mehr als 3 Bakterien je infizierter Zelle beobachtet. Nachfolgende Infektionsversuche wurden daher nach 16 h Wachstum der Salmonellen mit dem **angepassten Protokoll** durchgeführt.

Bei sehr hohen MOI ist die Unterscheidung von extra- und intrazellulären Erregern bei der Immunfärbung schwierig. Die Fluoreszenz der extrazellulären Salmonellen konnte weder durch Inkubation mit Trypanblau [159] oder Ethidiumbromid [160] unterdrückt werden. Aus diesem Grund wurde die Infektionsrate bei allen anschließenden Experimenten durch Zelllyse mit 0,5 %iger Deoxycholat-Lösung und Ausplattieren von Verdünnungsreihen bestimmt.

#### 4.2.1.2 Vergleich der Infektiösität von *S. typhimurium* wt und TypIII-Mutanten

Für die Untersuchungen des intrazellulären Einflusses der beiden TypIII-Sekretionsapparate standen neben dem Wildtyp auch *Knock-Out*-Mutanten des TypIII-Apparates auf den Pathogenitätsinseln SPI1 und SPI2 zur Verfügung. Zuerst wurde die Infektiösität der beiden Mutanten und des Wildtyps überprüft und miteinander verglichen. Die Salmonellen wurden aufgearbeitet und HeLa-Zellen in 24-Lochplatten mit MOI 5 infiziert (Methoden, 3.3.3.2). Methodisch bedingt kann die tatsächlich eingesetzte MOI erst 24 h nach Infektion durch Auszählen von ausplattierten Verdünnungsreihen auf LB-Platten bestimmt werden. Daher ist neben der Soll MOI auch die tatsächlich eingesetzte Haben MOI angegeben.

<i>S. typhimurium</i>	Soll MOI	Haben MOI	Intrazelluläre Erreger (CFU)	Infizierte Zellen [%]
Wildtyp	5	6	$1,3 \times 10^5$	33
SPI1-Mutante	5	5	$3,9 \times 10^4$	10
SPI2-Mutante	5	6	$6,8 \times 10^4$	17

**Tabelle 4.5 Infektiösität von *S. typhimurium* wt und Mutanten nach Infektion von HeLa-Zellen mit MOI 5**

Dargestellt wird der Vergleich der Infektiösität von *S. typhimurium* wt und den TypIII-Sekretionsapparat *Knock-Out*-Mutanten (SPI1-Mutante und SPI2-Mutante) nach Infektion von HeLa-Zellen mit Soll MOI 5. Die Bestimmung der intrazellulären Erreger erfolgte nach 0,5 %iger Deoxycholat-Lyse der Zellen und Ausplattieren von Verdünnungsreihen auf LB-Agar. Die prozentualen Angaben der infizierten Zellen ergibt sich rechnerisch aus den intrazellulären Erregern auf die Zellzahl von  $4 \times 10^5$  Zellen am Tag der Infektion. Die Ergebnisse dieses Vortests stammen aus einem Einzelexperiment.

Bereits beim Wildtyp wurde mit MOI 6 nur etwa ein Drittel der Zellen rechnerisch infiziert. Der Anteil an infizierten Zellen war bei den Mutanten sogar kleiner als 20 %. Die beiden Mutanten scheinen daher geringer infektiös als der Wildtyp zu sein.

#### 4.2.1.3 Bestimmung der optimalen Bakterienzahl zur Infektion von HeLa-Zellen mit *S. typhimurium* wt und den Mutanten

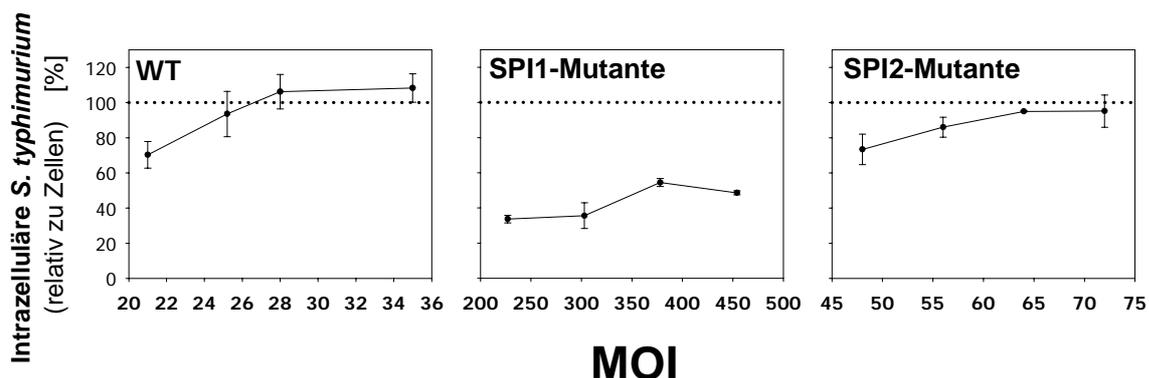
Es müssen zur Untersuchung von Veränderungen in der Zelle nach Infektion möglichst viele Zellen infiziert werden. Zur Bestimmung der MOI an Salmonellen, bei der nahezu 100 % der Zellen infiziert (optimale MOI), wurden verschiedene Bakterien-Mengen eingesetzt. Nach der Aufarbeitung der Salmonellen wurden HeLa-Zellen in 24-Lochplatten mit verschiedenen MOIs infiziert und unmittelbar nach der Infektion die Anzahl der intrazellulären Erreger bestimmt.

<i>S. typhimurium</i>	Soll MOI	Haben MOI	Intrazelluläre Erreger	Infizierte Zellen [%]
Wildtyp	5	5	$8,7 \times 10^4$	22
	10	11	$2,4 \times 10^5$	60
	25	26	$3,1 \times 10^5$	78
SPI1-Mutante	50	42	$8,2 \times 10^4$	21
	100	83	$1,1 \times 10^5$	28
	200	167	$1,3 \times 10^5$	33
SPI2-Mutante	20	19	$1,4 \times 10^5$	35
	40	38	$3,1 \times 10^5$	78
	50	47	$5,1 \times 10^5$	“128”

**Tabelle 4.6 Infektiösität von *S. typhimurium* wt und Mutanten nach Infektion von HeLa-Zellen mit verschiedenen MOI**

Dargestellt wird der Vergleich der Infektiösität von *S. typhimurium* wt und den TypIII-Sekretionsapparat *Knock-Out*-Mutanten (SPI1-Mutante und SPI2-Mutante) nach Infektion von HeLa-Zellen mit verschiedenen Soll MOI. Die Bestimmung der intrazellulären Erreger erfolgte nach 0,5 %iger Deoxycholat-Lyse der Zellen und Ausplattieren von Verdünnungsreihen auf LB-Agar. Die prozentuale Angabe der infizierten Zellen ergibt sich rechnerisch aus den intrazellulären Erregern auf die Zellzahl von  $4 \times 10^5$  Zellen am Tag der Infektion. Die Ergebnisse dieses Vortests stammen aus einem Einzelexperiment.

Selbst bei der höchsten verwendeten MOI beim Wildtyp und der SPI1-Mutanten werden rechnerisch nicht alle Zellen infiziert. Beim Wildtyp liegt der Anteil an infizierten Zellen bei MOI 25 um 78 %, bei der SPI1-Mutanten bei MOI 200 nur um 33 %. Der Anteil infizierter Zellen bei MOI 50 ergab bei der SPI2-Mutanten bereits über 100 %. Dies lässt auf mehrfache Infektion von Einzelzellen schließen. In einem weiteren Titrationsexperiment sollten höhere MOIs eingesetzt und die bereits erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden.



**Abbildung 4.16 Infektiösität von *S. typhimurium* wt und Mutanten nach Infektion von HeLa-Zellen mit verschiedenen MOI**

Dargestellt wird der Vergleich der Infektiösität von *S. typhimurium* wt und den TypIII-Sekretionsapparat *Knock-Out*-Mutanten (SPI1-Mutante und SPI2-Mutante) nach Infektion von HeLa-Zellen mit verschiedenen Soll MOI. Die Bestimmung der intrazellulären Erreger erfolgte nach 0,5 %iger Deoxycholat-Lyse der Zellen und Ausplattieren von Verdünnungsreihen auf LB-Agar. Die prozentuale Angabe der infizierten Zellen ergibt sich rechnerisch aus den intrazellulären Erregern auf die Zellzahl von  $4 \times 10^5$  Zellen am Tag der Infektion. Die Ergebnisse dieses Vortests stammen aus einem Einzelexperiment. Die gepunktete Linie in der Abbildung veranschaulicht die 100 %-Grenze von intrazellulären Salmonellen.

Die optimale Bakterienzahl liegt beim Wildtyp bei MOI 25. Im ersten Experiment lag der Anteil infizierter Zellen rechnerisch bei 80 % (Tabelle 4.6) und im Wiederholungsexperiment bei etwa 95 % (Abbildung 4.16). Eine höhere MOI führte zu Mehrfach-Infektion der Zellen. Dies sollte aber verhindert werden, um später keine unterschiedliche intrazelluläre Bakterienzahl zu haben.

Bei der SPI2-Mutanten lag im ersten Experiment bei MOI 50 die Anzahl intrazellulärer Salmonellen deutlich über der Zahl an zu infizierenden Zellen (Tabelle 4.6), während beim zweiten Experiment etwa 100 % der Zellen rechnerisch infiziert worden sind (Abbildung 4.16). Um eine Überinfektion von Zellen zu verhindern wird bei der SPI2-Mutanten mit MOI 40 weiter gearbeitet, so dass die Infektionsrate in etwa der des Wildtyps entspricht.

Auch beim zweiten Experiment war selbst bei der hohen MOI 450 der SPI1-Mutanten nur eine maximale Infektionsrate von 45 % gemessen worden. Es ist daher zu überprüfen, ob noch höhere MOIs für die Infektion überhaupt möglich sind, oder ob bereits die Menge an Bakterien zu einer Wirtszellantwort führt.

#### Zusammengefasst:

Es wurde in unserem Labor die Infektion von epithelialen Zellen mit *S. typhimurium* an das bestehende Infektionsmodell von Chlamydien angepasst. Dazu wurden die Salmonellen über Nacht unter mikroaerophilen Bedingungen angezogen und nach der Aufarbeitung der Bakterien die Zellen durch Zentrifugation infiziert. Extrazelluläre Erreger wurden durch das Antibiotikum Gentamicin abgetötet.

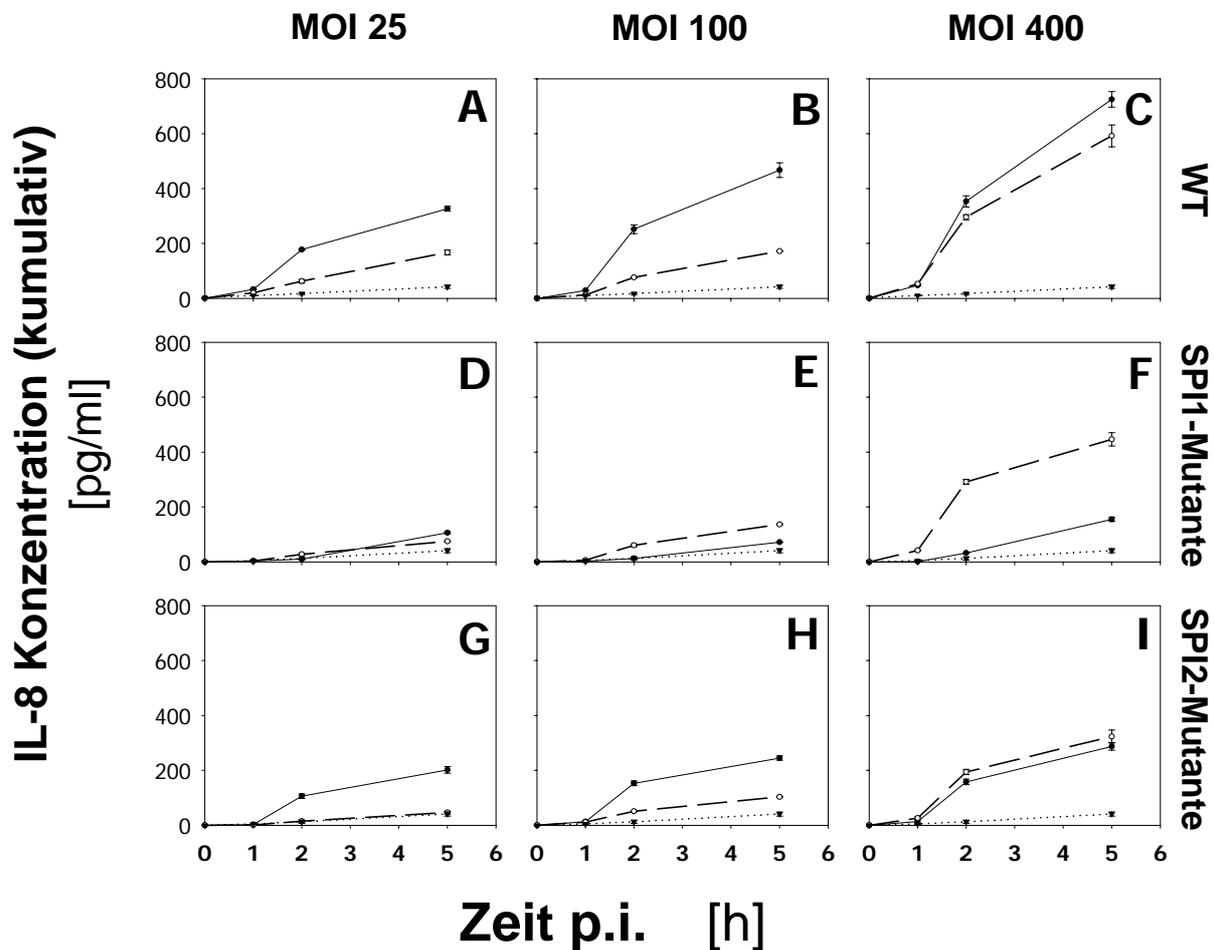
Die verwendeten *Knock-Out* Mutanten der beiden TypIII-Sekretionsapparate von *S. typhimurium* auf den Pathogenitätsinseln SPI1 und SPI2 waren gegenüber dem Wildtyp-Stamm geringer infektiös. Für den Wildtyp wurde MOI 25 und für die SPI2-Mutante MOI 40 benötigt, um eine vergleichbare Anzahl von etwa 80 % an Zellen zu infizieren. Bei der SPI1-Mutante konnte selbst bei hohen Bakterienzahlen (MOI 450) nur 30-40 % der Zellen infizieren werden.

#### 4.2.1.4 Einfluss vitaler und UV-inaktivierter *S. typhimurium* wt auf die IL-8 Freisetzung

Zur Überprüfung des passiven Einflusses wurde *S. typhimurium* wt durch UV-Bestrahlung inaktiviert. Lipopolysaccharide auf der Oberfläche und Hitzeschock-Proteine bleiben nach dieser Behandlung intakt. Bereits nach zweifacher Bestrahlung war kein Wachstum mehr zu beobachten während die unbehandelten Salmonellen ein sehr starkes Wachstum auf den LB-Platten zeigten.

Um zu überprüfen, ob bei Zellen mit UV-inaktivierten Salmonellen eine Wirtszell-Antwort messbar ist, wurde der Wildtyp-Stamm und die beiden TypIII-Sekretionsapparat Mutanten (SPI1 und SPI2) wie unter 3.3.3.1 beschrieben aufgearbeitet. Ein Teil der jeweiligen Salmonellen wurde mit  $3 \times 10^8$  kJ auf Eis mit UV-Licht bestrahlt. HeLa-Zellen wurden in 24-Lochplatten mit MOI 25, 100 und 400 an vitalen und UV-inaktivierten *S. typhimurium* wt, SPI1- oder SPI2-Mutanten behandelt (Methoden, 3.3.1.1).

Direkt nach der Infektion (0 h) sowie nach 1 h, 2 h und 5 h wurde der Überstand abgenommen und die Konzentration an IL-8 bestimmt.



**Abbildung 4.17** Vergleich der IL-8 Freisetzung von HeLa-Zellen mit vitalen sowie UV-inaktivierten *S. typhimurium* wt und Mutanten bei MOI 25, 100 und 400

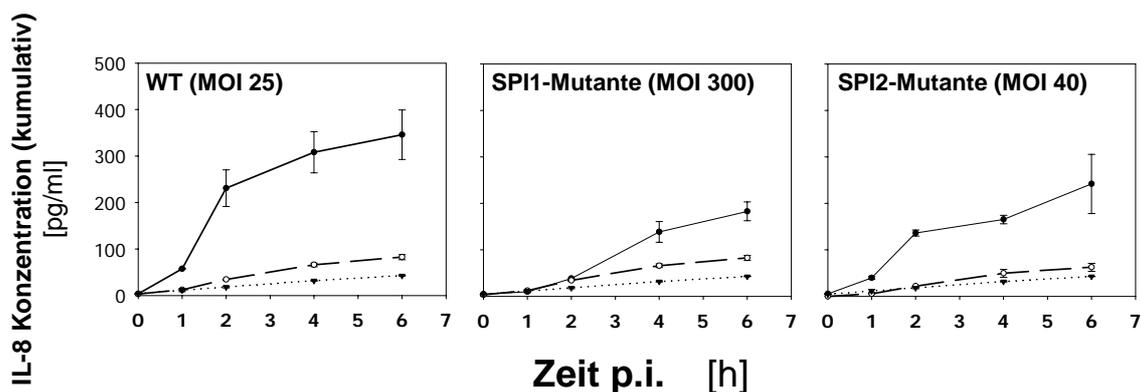
Dargestellt ist der Verlauf der IL-8 Sekretion 0 h, 1 h, 2 h und 5 h nach Infektion aus den Überständen von infizierten HeLa-Zellen mit MOI 25, 100 oder 400 von *S. typhimurium* wt (A – C), SPI1-Mutante (D – F) und SPI2-Mutante (G – I). Dabei wird in den Abbildungen der Verlauf der Kontroll-Zellen (gepunktete Linie), der Zellen mit UV-inaktivierten Salmonellen (gestrichelte Linie) und der Zellen mit vitalen Salmonellen (durchgezogene Linie) veranschaulicht. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen eines Einzelexperimentes mit Doppelwerten.

Wie in Abbildung 4.17 (A–C) beim Wildtyp zu erkennen ist, steigt mit höherer Bakterienzahl bei der Infektion auch die Konzentration an IL-8 im Überstand durch die vitalen Salmonellen. Bei den Zellen mit UV-inaktivierten Bakterien bei MOI 25 und 100 (A und B) blieb die IL-8 Sekretion etwa gleich und es wurde deutlich weniger IL-8 freigesetzt als bei vitalen Salmonellen. Bei Zellen mit MOI 400 an UV-behandelten Salmonellen stieg die Konzentration an IL-8 auf etwa die gleiche Konzentration wie bei den lebenden Salmonellen. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der SPI2-Mutanten (G bis I). Hier waren die IL-8 Antworten bei den vitalen Salmonellen jedoch nicht so stark wie beim Wildtyp.

Bei der Infektion mit der SPI1-Mutante ist ein etwas anderes Bild zu beobachten gewesen (Abbildung 4.17, D – F). Bei MOI 25 war noch keine starke Freisetzung an IL-8 bei Infektion mit UV-inaktivierten oder vitalen Salmonellen messbar (D). Die Infektion mit MOI 100 bestätigte die IL-8 Freisetzung bei lebenden Salmonellen wie bei MOI 25. Zellen mit UV-inaktivierten Bakterien sekretierten leicht mehr IL-8 als bei MOI 25. Die Sekretion lag hier bereits über der von lebenden Salmonellen (E). Wie beim Wildtyp führte MOI 400 zu einer starken IL-8 Sekretion bei Zellen mit UV-inaktivierten Salmonellen. Diese lag sehr deutlich über der Menge an IL-8 aus den Überständen von Zellen mit vitalen Salmonellen (F).

Wie der Wildtyp und die beiden Mutanten in diesem Experiment gezeigt haben, wird bei der Behandlung bis zu MOI 100 durch UV-inaktivierte Salmonellen nur eine sehr schwache IL-8 Sekretion bei den Zellen hervorgerufen. Erst bei MOI 400 wurde von den Zellen mit inaktivierten Salmonellen viel IL-8 freigesetzt. Demnach müssen große Mengen an Oberflächenmolekülen vorhanden sein, um bei HeLa-Zellen eine Wirtszellantwort durch inaktivierte Salmonellen zu induzieren. Für die SPI1-Mutante kann daher nur eine geringere Bakterienmenge als MOI 400 für die Infektion eingesetzt werden.

Es muss nun geprüft werden, wie sich die IL-8 Freisetzung mit den gewünschten MOIs bei den Infektionsversuchen verhält. HeLa-Zellen wurden mit lebenden und UV-inaktivierten Salmonellen behandelt. Für *S. typhimurium* wt wurde MOI 25 (Infektionsrate >90 %), für die SPI1-Mutante MOI 300 (Infektionsrate >30 %) und für die SPI2-Mutante MOI 40 (Infektionsrate >90 %) verwendet.



**Abbildung 4.18 IL-8 Freisetzung von HeLa-Zellen mit vitalen sowie UV-inaktivierten *S. typhimurium* wt und Mutanten**

Dargestellt ist der Verlauf der IL-8 Sekretion 0 h, 1 h, 2 h, 4 h und 6 h nach Infektion aus den Überständen von infizierten HeLa-Zellen mit *S. typhimurium* wt (MOI 25), SPI1-Mutante (MOI 300) und SPI2-Mutante (MOI 40). Dabei wird in den Abbildungen der Verlauf der Kontroll-Zellen (gepunktete Linie), der Zellen mit UV-inaktivierten Salmonellen (gestrichelte Linie) und der Zellen mit vitalen Salmonellen (durchgezogene Linie) veranschaulicht. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen eines Einzelexperimentes mit Doppelwerten.

Für den Wildtyp war nach 2, 4 und 6 h nach Infektion ein deutlicher Unterschied zwischen der IL-8 Freisetzung von Zellen mit lebenden und inaktivierten Salmonellen zu messen. Ein Unterschied in der IL-8 Sekretion, wenn auch nicht ganz so deutlich, zeigte sich ebenfalls zu diesem Zeitpunkt bei der SPI2-Mutanten.

Bei den Zellen, die mit der SPI1-Mutanten infiziert waren, konnte hingegen nur nach 4 und 6 h ein Unterschied in der IL-8 Sekretion von Zellen mit vitalen Salmonellen beobachtet werden. Dieser lag nur wenig über der Interleukin-Freisetzung von UV-behandelten Salmonellen. Bei den Zellen mit UV-inaktivierten Bakterien ist generell nur eine geringe IL-8 Freisetzung zu messen gewesen. Diese entsprach der Sekretion von unbehandelten Kontrollzellen.

#### 4.2.1.5 Inhibierung der Aufnahme von *S. typhimurium* mittels Zytoskelett-Inhibitoren

Selbst bei hohen MOI werden nur wenige Zellen mit der SPI1-Mutanten infiziert. Höhere Bakterienzahlen führen jedoch bereits zu einer Zellantwort durch die inaktivierten Salmonellen. Der TypIII-Sekretionsapparat auf SPI1 spielt zu frühen Zeitpunkten der Infektion (bei der Invasion) eine wichtige Rolle. Bei der Aufnahme der Salmonellen durch die Zelle ist das Zytoskelett besonders wichtig.

Der Einsatz von Zytoskelett-Inhibitoren verhindert die Umorientierung des Zytoskeletts und dadurch die Makropinozytose der Salmonellen durch die Zellen. Es wurden verschiedene Zytoskelett-Inhibitoren in dieser Arbeit ausgetestet, um die Aufnahme der Salmonellen möglichst vollständig zu verhindern. Ziel war es, sowohl den Wildtyp-Stamm als auch die SPI1-Mutanten nur extrazellulär vorliegen zu haben. Unter diesen Bedingungen könnte es möglich sein, die Wirtszell-Genexpression unabhängig von der unterschiedlichen Infektionsrate von Wildtyp und Mutante infizierten Zellen zu untersuchen.

HeLa-Zellen wurden mit Cytochalasin B bis zu einer Konzentration von 1 µg/ml für 1 h bei 37 °C vorbehandelt. Die Zellen mit Cytochalasin E (bis 0,4 µg/ml), Colchicin (bis 20 µM) oder Chloroquin (200 µg/ml) wurden für 30 min bei 37 °C mit dem Inhibitor vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen in inhibitorhaltigem MEM-10 (ohne FCS) infiziert.

Die Inhibitoren müssen in Konzentrationen verwendet werden, die das Zytoskelett inhibieren, selbst aber keinen starken Einfluss auf die Wirtszellantworten haben. Es zeigte sich kein verändertes Wachstum der Salmonellen bei Behandlung der Bakterien mit den Inhibitoren in LB- oder im Infektionsmedium. Allerdings konnte bei allen verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren die Infektionsrate von *S. typhimurium* wt nicht unter 15 % gesenkt werden.

Erst die Verwendung von 10 µg/ml Cytochalasin E alleine führte zu einer Infektionsrate unter 3 %, in Kombination mit 20 µg/ml Colchicin und 200 µg/ml Chloroquin konnte die

Infektionsrate noch unter 1 % gesenkt werden. Bei Cytochalasin E und den kombiniert eingesetzten Inhibitoren starben allerdings zweidrittel der Zellen ab. Diese Konzentrationen konnten deshalb zur Inhibierung nicht verwendet werden. Hier muss von einer starken Beeinflussung der Zellen durch den Inhibitor ausgegangen werden. Durch diese Ergebnisse wurden weitere Versuche mit der SPI1-Mutanten eingestellt und die Analysen nur mit dem Wildtyp und der SPI2-Mutanten fortgeführt.

#### Zusammengefasst:

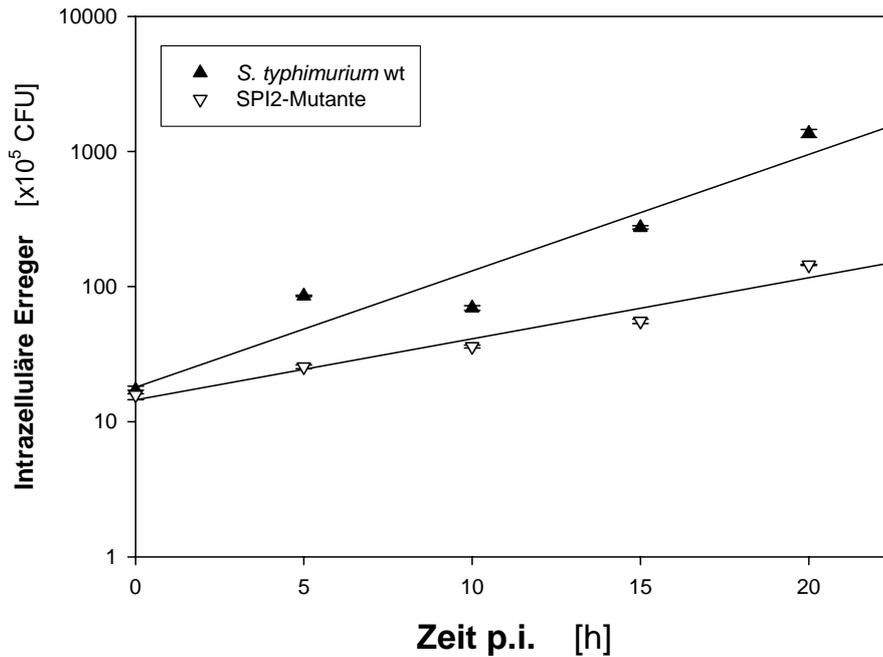
HeLa-Zellen sekretieren bei der Behandlung mit UV-inaktivierten Salmonellen kein IL-8. Erst bei einer großen Anzahl an Salmonellen (MOI 400) wurde bereits bei den UV-Inaktivierten Erregern IL-8 freigesetzt. Für die SPI1-Mutante muss die zu verwendende MOI < 400 sein. Bei Verwendung von MOI 300 zur Infektion der Zellen mit der SPI1-Mutanten führte dies bei der IL-8 Sekretion nur zu geringen Unterschieden zwischen vitalen und UV-inaktivierten Bakterien. Im Gegensatz dazu waren beim Wildtyp-Stamm mit MOI 25 und der SPI2-Mutanten mit MOI 40 deutliche Unterschiede in der IL-8 Sekretion von vitalen und inaktivierten Salmonellen messbar.

Die Inhibierung des Zytoskeletts zur Verhinderung der vollständigen Aufnahme vom Wildtyp und der SPI1-Mutante gelang nur bei Konzentrationen der verwendeten Inhibitoren, die zum Absterben der Zellen führten. Mit der SPI1-Mutanten wurden daher keine weiteren Experimente durchgeführt.

#### 4.2.1.6 Bestimmung des optimalen Zeitpunkts für Micro-Array-Analysen

Zum Erhalt möglichst großer Mengen an RNA sollte die Infektion in 6-Lochplatten stattfinden. Zur Überprüfung der optimierten Bedingungen wurden die Zellen in 6-Lochplatten beim Wildtyp mit MOI 25 und bei der SPI2-Mutanten mit MOI 40 infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Anzahl der intrazellulären Salmonellen bestimmt. Ziel war es, den Zeitpunkt mit der gleichen Anzahl intrazellulärer Erreger zu bestimmen.

In einem Einzelexperiment (Infektionsrate von >70 %) lagen nach Auszählen von Verdünnungsreihen beim Wildtyp und der Mutanten 3-4 h nach Infektion etwa gleiche Mengen an Salmonellen intrazellulär vor (Zahlenwerte nicht gezeigt). In einem weiteren Experiment wurde der Verlauf der Anzahl intrazellulärer Salmonellen zu späteren Zeitpunkten (bis 20 h) analysiert.



**Abbildung 4.19** Vergleich der Anzahl von intrazellulären *S. typhimurium* wt und SPI2-Mutante zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion

Dargestellt ist die Menge intrazellulärer Erreger nach Auszählen von Kolonien auf LB-Agar aus Verdünnungsreihen nach Lyse der infizierten Zellen mit 0,5 %-Deoxycholatlösung. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen eines Einzelexperimentes mit Doppelwerten.

Zu späteren Zeitpunkten ist ein deutlich stärkeres Wachstum des Wildtyps erkennbar (Abbildung 4.19). Aus diesem Grund konnten keine späteren Zeitpunkte als 4 h nach Infektion verwendet werden. Eventuelle Unterschiede bei der Genregulation im Array könnten sonst auch auf die unterschiedliche Anzahl intrazellulärer Bakterien zurückgeführt werden.

#### 4.2.1.7 Infektion von Monozyten zur Bestimmung der IL-8 Freisetzung

Die von uns verwendete HeLa-Zelllinie, die aus Cervix-Epithel stammt, stellt *in vivo* nicht die normale Zielzelle von Salmonellen dar. Sie bietet aber den Vorteil, keine Toll-like Rezeptoren 2 und 4 zu exprimieren, die auf Oberflächenmoleküle der Bakterien (wie LPS) reagieren. Außerdem lässt sie sich hervorragend infizieren.

Zur Analyse natürlicher Zielzellen wären beispielsweise Monozyten als Immunabwehrzellen eher geeignet, könnten aber bereits durch Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (wie Toll-like Rezeptoren) mit bakteriellen Oberflächenmolekülen interagieren und zu einer Wirtszellantwort führen. Um zu überprüfen, ob Monozyten zur Analyse von Wirtszellantworten verwendet werden können, wurden  $4 \times 10^5$  aufgereinigte Monozyten aus Vollblut (Methoden, 3.2.2) durch Zentrifugation mit MOI 25 infiziert. Verwendet wurden UV-inaktivierte und zwei verschiedene Aliquots vitaler *S. typhimurium* wt. Die Infektionsrate lag bei den infizierten Salmonellen bei >60 %. Direkt nach der Infektion

sowie 1½ und 4 h später wurde das Medium abgenommen und zellfrei zentrifugiert. Aus den Überständen wurde die IL-8 Konzentration bestimmt.

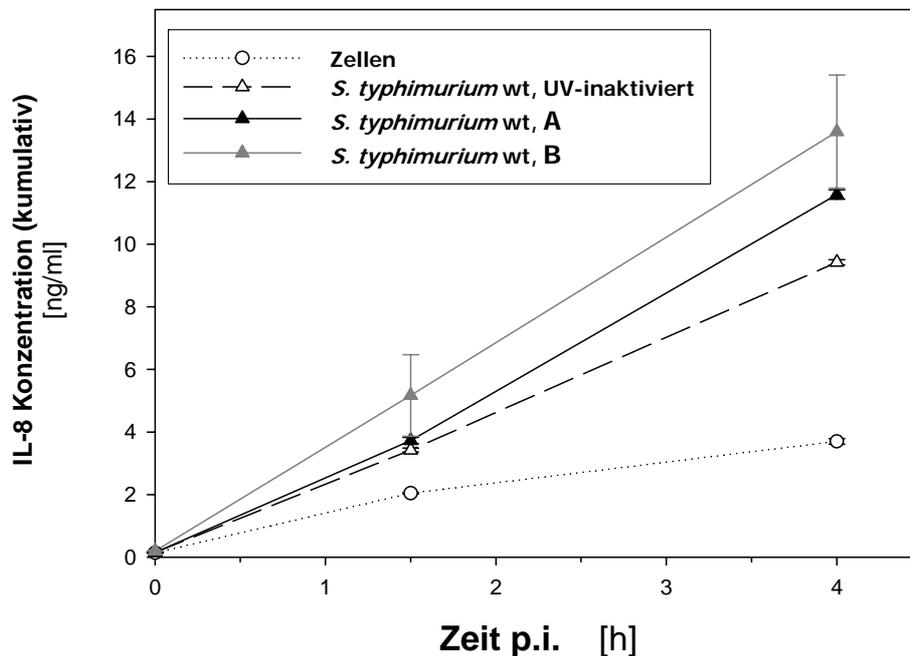


Abbildung 4.20 IL-8 Freisetzung von Monozyten mit vitalen und UV-inaktivierten *S. typhimurium* wt

Dargestellt ist der Verlauf der IL-8 Sekretion 0 h, 1½ h und 4 h nach Infektion aus den Überständen von infizierten Monozyten mit 2 verschiedenen Aliquots *S. typhimurium* wt (MOI 25) und UV-inaktivierten Salmonellen. Dabei wird in den Abbildungen der Verlauf der Kontroll-Zellen (gepunktete Linie), der Zellen mit UV-inaktivierten Salmonellen (gestrichelte Linie) und der Zellen mit vitalen Salmonellen (durchgezogene Linie) veranschaulicht. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen eines Einzelexperimentes mit Doppelwerten.

Bereits durch die Bearbeitung der Monozyten wurde von diesen IL-8 sekretiert. Ab 1½ h nach Infektion war in den Überständen der schein-infizierten Zellen ein Anstieg an IL-8 nachweisbar. Die Infektion mit vitalen *S. typhimurium* wt führte 1½ und 4 h nach Infektion zu einer erhöhten Freisetzung an IL-8 gegenüber den schein-infizierten Zellen. Diese unterschied sich allerdings nur unwesentlich von der Sekretion UV-inaktivierter Salmonellen. Monozyten sind daher ungeeignet, da eine Unterscheidung zwischen einer „aktiven“ Beeinflussung durch vitale Salmonellen und „passiven“ Faktoren (wie LPS) nicht möglich ist. Gerade die Unterscheidung der „aktiven“ Effekte ist vom großen Interesse, da diese beispielsweise durch Effektorproteine des TypIII-Sekretionssystems hervorgerufen werden. Die Manipulation der eukaryonten Zellen durch chlamydiale und Salmonellen-Effektorproteine steht im besonderen Interesse der Forschungsarbeiten der AG Klos.

#### 4.2.2 Affymetrix-Array intrazellulärer Salmonellen zur Analyse der Einflüsse unterschiedlicher TypIII-Apparate auf die Wirtszellen

Die Infektiösität der SPI1-Mutante von maximal 40 % reicht für Analysen der Genexpression von Wirtszellen nicht aus. Die Expression der nicht-infizierten Zellen würde die der infizierten Zellen in der Probe „heraus verdünnen“. Aus diesem Grund wurden weitere Analysen nur mit dem Wildtyp und der SPI2-Mutanten durchgeführt.

HeLa-Zellen wurden sowohl mit vitalen als auch UV-inaktivierten *S. typhimurium* wt (MOI 25) und der SPI2-Mutante (MOI 40) in 6-Lochplatten mit einer Infektionsrate von über 90 % infiziert. Die Zellen wurden 4 h nach Infektion lysiert und die RNA isoliert. Die RNA wurde anschließend zur Analyse auf Affymetrix Micro-Arrays eingesetzt

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde bei den Micro-Arrays die Stärke der Fluoreszenzsignale verwendet. Als Maß der Regulation dient der Regulationsfaktor, der das Verhältnis der Genexpression von Probe 1 zu Probe 2 darstellt. Bei einem Faktor größer 1 liegt eine positive Regulation vor. Die Genexpression von Probe 1 ist höher als die von Probe 2. Bei verringerter Regulation ist der Faktor kleiner 1. Dies ist bei einer geringeren Expression von Probe 1 zu Probe 2 der Fall. Zur besseren Darstellung wurde bei der verringerten Regulation der negative Kehrwert des Faktors verwendet und als negative Regulation bezeichnet.

Tabelle 4.7 zeigt die Anzahl an regulierten Genen, die einen p-Value der Regulation <0,001 und einen Faktor der Regulation > 2 bei positiver und < -2 bei negativer Regulation besaßen.

Probe 1 / Probe 2	p-Value < 0,001, Reg. Faktor > 2	p-Value < 0,001, Reg. Faktor < -2
<i>S. typhimurium</i> wt / Schein-Infektion	113	2
<i>S. typhimurium</i> wt UV / Schein-Infektion	68	3
SPI2-Mutante / Schein-Infektion	44	4
SPI2-Mutante UV / Schein-Infektion	68	-
SPI2-Mutante / SPI2-Mutante UV	4	9
SPI2-Mutante / WT UV	4	13
WT / SPI2-Mutante UV	18	5
WT / WT UV	21	8
WT / SPI2-Mutante	13	2
WT UV / SPI2 UV	Nicht durchgeführt	

**Tabelle 4.7 Übersicht über die Anzahl der regulierten Gene auf U95A-Micro-Array (Affymetrix)-Chips nach Array-Auswertung**

In der Tabelle ist die Anzahl der regulierten Gene von HeLa-Zellen beim Vergleich von zwei Proben dargestellt. Als Proben wurden infizierte HeLa-Zellen mit vitalen *S. typhimurium* wt und SPI2-Mutante, Zellen mit UV-inaktivierten *S. typhimurium* wt und SPI2-Mutante und Schein-Infektion analysiert. Die regulierten Gene hatten einen Regulationsfaktor von >2 bei positiver bzw. <-2 bei negativer Regulation und besaßen ein p-Value von p<0,001.

Beim Vergleich der einzelnen Proben gegen die Schein-Infektion waren immer mehr positiv regulierte Gene zu finden. Aber auch die Anzahl der regulierten Gene in Zellen mit UV-inaktivierten Salmonellen ist recht hoch. Da die Effekte in den Wirtszellen durch UV-inaktivierte Salmonellen nicht zur Fragestellung dieser Dissertation gehörten, wurde auf eine weitere Auswertung verzichtet.

Nur wenige regulierte Gene waren beim Vergleich der Mutanten zum Wildtyp gefunden worden. Diese Gene zeigten weder eine Regulation bei Wildtyp- noch bei Mutante-infizierten Zellen gegen die entsprechenden schein-infizierten Zellen.

Um auszuwerten, bei welchen Genen die Expression **aktiv** durch lebende Salmonellen beeinflusst wird, wurden die Micro-Array-Auswertungen miteinander verglichen. Durch den Wildtyp regulierte Gene mussten eine Regulation der Expression bei Zellen mit *S. typhimurium* wt gegen Schein-Infektion und *S. typhimurium* wt gegen Wildtyp (UV-inaktiviert) aufweisen.

	GenBank Accession	Regulation		Funktion
		WT gegen Schein-Inf.	WT gegen WT-UV	
<b>IL-6</b> <i>Interleukin 6 (Interferon Beta 2)</i>	M18403	5,13	4,00	Zytokin
<b>JUNB</b> <i>JunB Proto-Onkogen</i>	BC009566	2,13/1,87 <sup>#</sup>	1,97 <sup>#</sup> /2,11	Transkriptions Faktor
<b>MAG</b> <i>Myelin assoziiertes Glycoprotein</i>	M29273	2,77	2,93	Membran- Protein
<b>SOCS3</b> <i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i>	AB004904	2,08	14,42	Signal- transduktion
<b>KIAA0963</b>	AC005390	3,53	3,03	unbekannt

**Tabelle 4.8 Übersicht der regulierten Gene in HeLa-Zellen durch vitale *S. typhimurium* wt**

In der Tabelle sind die durch *S. typhimurium* wt regulierten Gene in HeLa-Zellen nach Vergleich der Array-Auswertungen von *S. typhimurium* wt gegen Kontroll-Zellen, *S. typhimurium* wt gegen wt UV-inaktiviert und *S. typhimurium* wt gegen SPI2-Mutante UV-inaktiviert dargestellt. Die <sup>#</sup>-markierten Faktoren hatten einen Regulationsfaktor der nur knapp unter 2 lag, aber mehrfach reguliert in den Micro-Arrays vorlag.

Von den 115 durch *S. typhimurium* wt regulierten Genen gegenüber der Schein-Infektion wurden nur 5 Gene ausschließlich durch vitale *S. typhimurium* wt reguliert, bei denen von 4 Genen die Funktion bekannt oder untersucht worden ist. Bei den regulierten Genen handelt es sich überwiegend um Gene aus dem Bereich der Zytokine und deren Regulation.

Der Regulationsfaktor von JUNB lag in einigen Array-Auswertungen von vitalem Wildtyp infizierten Zellen gegen die UV-inaktivierten Salmonellen unter 2. Dieses Gen wurde aber mehrfach im Micro-Array reguliert vorgefunden. Außerdem ist JunB durch seine Verbindung über AP1 zur Signaltransduktion bei bzw. durch Zytokine interessant.

Durch die SPI2-Mutante regulierte Gene mussten eine Regulation im Expressionsprofil von SPI2-Mutante gegen schein-infizierte Zellen und SPI2-Mutante gegen SPI2-Mutante UV-inaktiviert aufweisen.

	GenBank Accession-Nr.	Regulation		Funktion
		SPI2 Mut. gegen Schein-Infektion	SPI2 Mut. gegen SPI2 Mut. UV	
<b>IL-6</b> <i>Interleukin 6 (Interferon Beta 2)</i>	M18403	3,92	4,71	Zytokin

**Tabelle 4.9 Übersicht der regulierten Gene in HeLa-Zellen durch die vitale SPI2-Mutante**

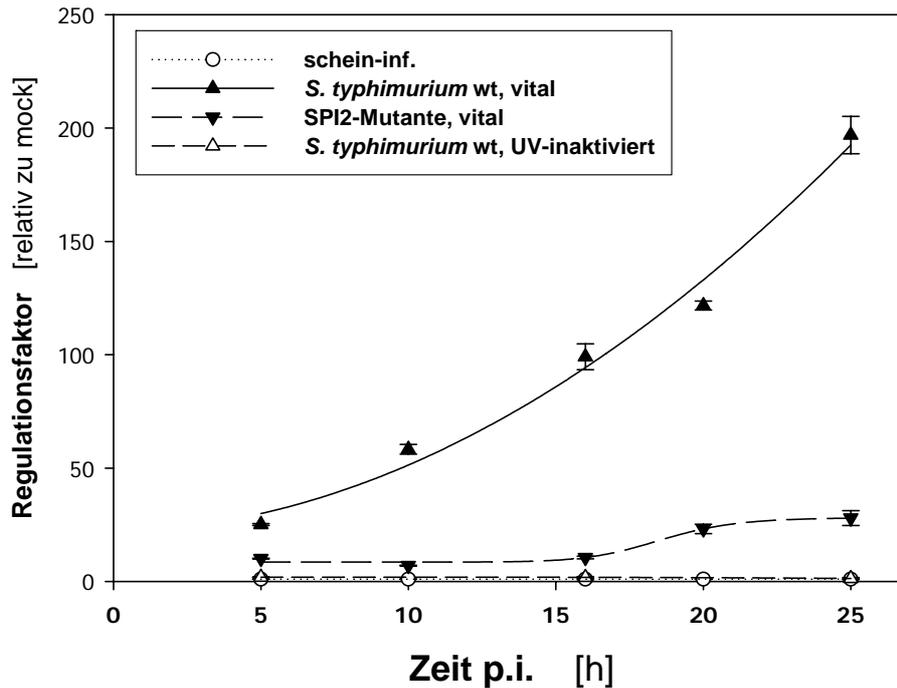
In der Tabelle sind die durch *S. typhimurium* wt regulierten Gene in HeLa-Zellen nach Vergleich der Array-Auswertungen von SPI-Mutante gegen Schein-Infektion, SPI-Mutante gegen wt UV-inaktiviert und SPI-Mutante gegen SPI2-Mutante UV-inaktiviert dargestellt.

Hier wurde nur IL-6 (Interferon Beta 2) sicher reguliert, welches auch beim Wildtyp gefunden worden ist. Der Einfluss von Salmonellen auf die Genexpression von IL-6 in Makrophagen und epithelialen Zellen ist bereits bekannt [161]. Die anderen durch vitale *S. typhimurium* wt regulierten Gene wurden nach Infektion mit der SPI2-Mutanten nicht reguliert, waren aber auch nicht beim Vergleich Wildtyp gegen Mutante gefunden worden. Zum frühen Zeitpunkt (4 h nach Infektion) konnten nur wenige Änderungen der Genregulation im Micro-Array ermittelt werden. Aus diesem Grund wurde das Experiment nicht wiederholt.

#### 4.2.3 Kinetik der IL-6 Gen-Expression nach Salmonellen-Infektion

Zu dem gewählten Zeitpunkt sind nur wenige Gene reguliert vorgefunden worden. Für viele dieser Gene wurde nur ein geringer Regulationsfaktor zwischen 2-3 bestimmt. Der frühe Zeitpunkt ist für Analysen des Expressionsverhaltens nach Salmonellen-Infektion zum Vergleich von Wildtyp und SPI2-Mutante wahrscheinlich eher ungeeignet.

Es soll nun geklärt werden, zu welchem Zeitpunkt eine vergleichende Untersuchung der Genexpression von *S. typhimurium* wt und SPI2-Mutante infizierten Zellen am besten geeignet wäre. Dazu wird zu mehreren Zeitpunkten nach Infektion die Expression von IL-6 in der *Real-Time* RT-PCR gemessen. IL-6 ist für diese Untersuchung gut geeignet. Die Regulation durch Salmonellen ist bereits bekannt und es wurde als einziges Gen nach der Array-Auswertung sowohl von *S. typhimurium* wt als auch SPI2-Mutante reguliert. Nach Aufarbeitung der Salmonellen und Infektion von HeLa-Zellen (Infektionsrate >70 %) wurden die Zellen nach 5 h, 10 h, 16 h, 20 h und 25 h lysiert und die RNA isoliert. Nach Synthese der cDNA wurde die IL-6 Genexpression durch *Real-Time* RT-PCR gemessen.



**Abbildung 4.21** Zeitlicher Verlauf der IL-6 Expression bei *S. typhimurium* wt und SPI2-Mutante infizierten HeLa-Zellen

Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Regulationsfaktoren von IL-6 in infizierten HeLa-Zellen nach Infektion mit *S. typhimurium* wt, SPI2-Mutante und UV-inaktivierten *S. typhimurium* wt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung eines Einzelexperimentes mit Doppelwerten.

Die mit dem Wildtyp infizierten Zellen zeigten bereits zu 5 h nach Infektion eine höhere IL-6 Expression als die Mutante-infizierten Zellen. Die Expression steigt zu späteren Zeitpunkten weiter stark an. Im Gegensatz dazu ist bei den Zellen mit der SPI2-Mutante nur eine leichte Regulation zu 5 h nach Infektion nachweisbar. Diese stieg bis zu 16 h nicht weiter an. Erst ab 20 h konnte eine höhere Regulation gemessen werden. Zellen, die mit UV-inaktivierten Salmonellen behandelt worden sind, und schein-infizierte Zellen zeigten über den gesamten Zeitraum keine IL-6 Expression.

#### 4.2.4 Einfluss intrazellulärer *S. typhimurium* wt auf die Wirtszell-Genexpression

Es sollte die Frage geklärt werden, ob die durch Chlamydien regulierten Gene eine allgemeine Wirtszellantwort auf intrazelluläre Erreger darstellen oder eine Besonderheit der Chlamydien sind. Dabei sollten Gene aus den Gruppen für Transkriptionsfaktoren (EGR-1, ETV4, NR4A2), Zytokine (IL-6, IL-8, LIF, Mip-2 $\alpha$ ), Nukleäre Phosphatasen (Dusp5), Wachstumsfaktoren (CTGF) und Gene mit Bezug zur Apoptose (EPA2, IER3) zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden.

Da in diesem Experiment die genaue Anzahl an intrazellulären Erregern nicht wichtig war, wurde zur Erzeugung einer möglichst hohen Infektionsrate eine höhere MOI eingesetzt. Dazu wurden nach Aufarbeitung der Salmonellen HeLa-Zellen mit *S. typhimurium* wt

(MOI 40) in 6-Lochplatten infiziert (Infektionsrate >70 %). Die infizierten und schein-infizierten Zellen wurden dabei in Panserin 401 mit 50 µg/ml Gentamicin weiter inkubiert und nach 4 h, 24 h und 48 h lysiert. Die RNA wurde isoliert und die cDNA nach Synthese zur Bestimmung der Genexpression in der *Real-Time* RT-PCR eingesetzt.

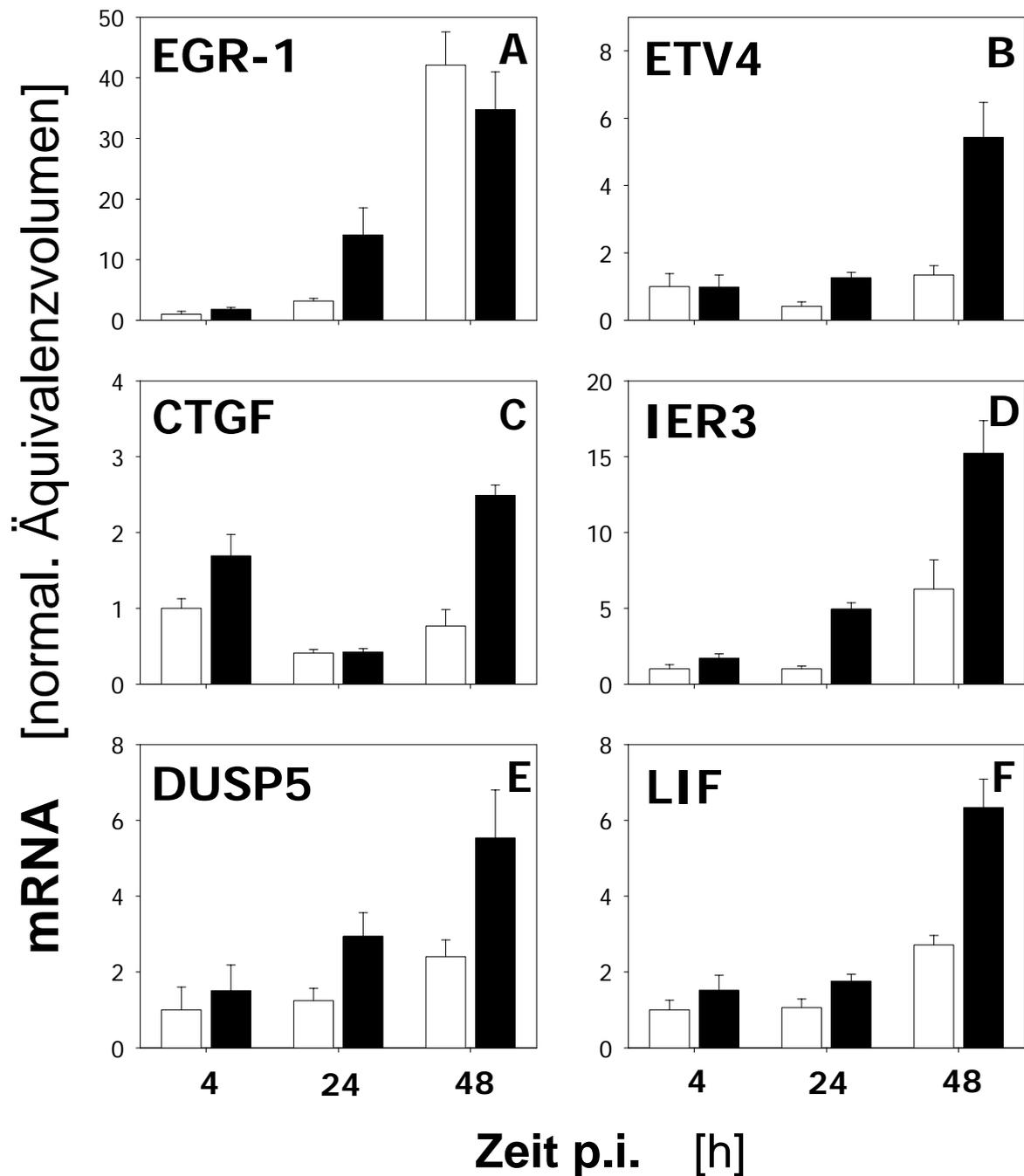
Gen	Regulationsfaktor [relativ zu mock]		
	4 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.
EGR-1 ( <i>early growth response protein 1</i> )	0	+	0
ETV4 ( <i>ets variant 4</i> )	0	+	+
NR4A2 ( <i>nuclear receptor subfamily 4, A, 2</i> )	0	0	0
CTGF ( <i>connective tissue growth factor</i> )	0	0	+
DUSP5 ( <i>dual specific phosphatase 5</i> )	0	(+)	(+)
EPHA2 ( <i>ephrin type-A receptor 2</i> )	0	0	0
IER3 ( <i>immediate early response 3</i> )	0	+	(+)
LIF ( <i>leukemia inhibitory factor</i> )	0	0	+
MIP-2α ( <i>macrophage inflammatory protein 2α</i> )	(+)	(+)	+++
IL-8 ( <i>interleukin 8</i> )	++	++++	++
IL-6 ( <i>interleukin 6</i> )	++	+++++	++++

**Tabelle 4.10** Darstellung der Regulation ausgewählter Gene in der *Real-Time* RT-PCR nach Infektion von HeLa-Zellen mit *S. typhimurium* wt

Die Tabelle zeigt die semiquantitative Darstellung der Genexpression von infizierten HeLa-Zellen nach Infektion mit *S. typhimurium* wt im Vergleich zu schein-infizierten Zellen. Bei den weiß unterlegten Genen war nur eine geringe und bei den grau unterlegten eine starke Regulation der Genexpression zu messen. Die Faktoren ergeben sich aus Doppelwerten von drei unabhängigen Messungen mit 0 keine Regulation, (+) Faktor 2-3, + Faktor 3-5, ++ Faktor 5-10, +++ Faktor 10-30, ++++ Faktor 30-100 und +++++ Faktor >100

In Tabelle 4.10 sind die erhaltenen Ergebnisse aus der *Real-Time* RT-PCR als Regulationsfaktoren in semiquantitativer Form dargestellt, um sie mit den Ergebnissen aus der Dissertation von S. Heß und der Literatur vergleichen zu können.

Zusätzlich wurde zur Analyse der Genexpression die Menge an mRNA in den Zellen aufgetragen. Dabei wurde entsprechend Tabelle 4.10 in die nicht oder schwach, und die stark regulierten Gene unterteilt. Die Gene NR4A2 und EPHA2 zeigten keine veränderte Expression bei den infizierten Zellen und werden daher nicht mit aufgeführt.



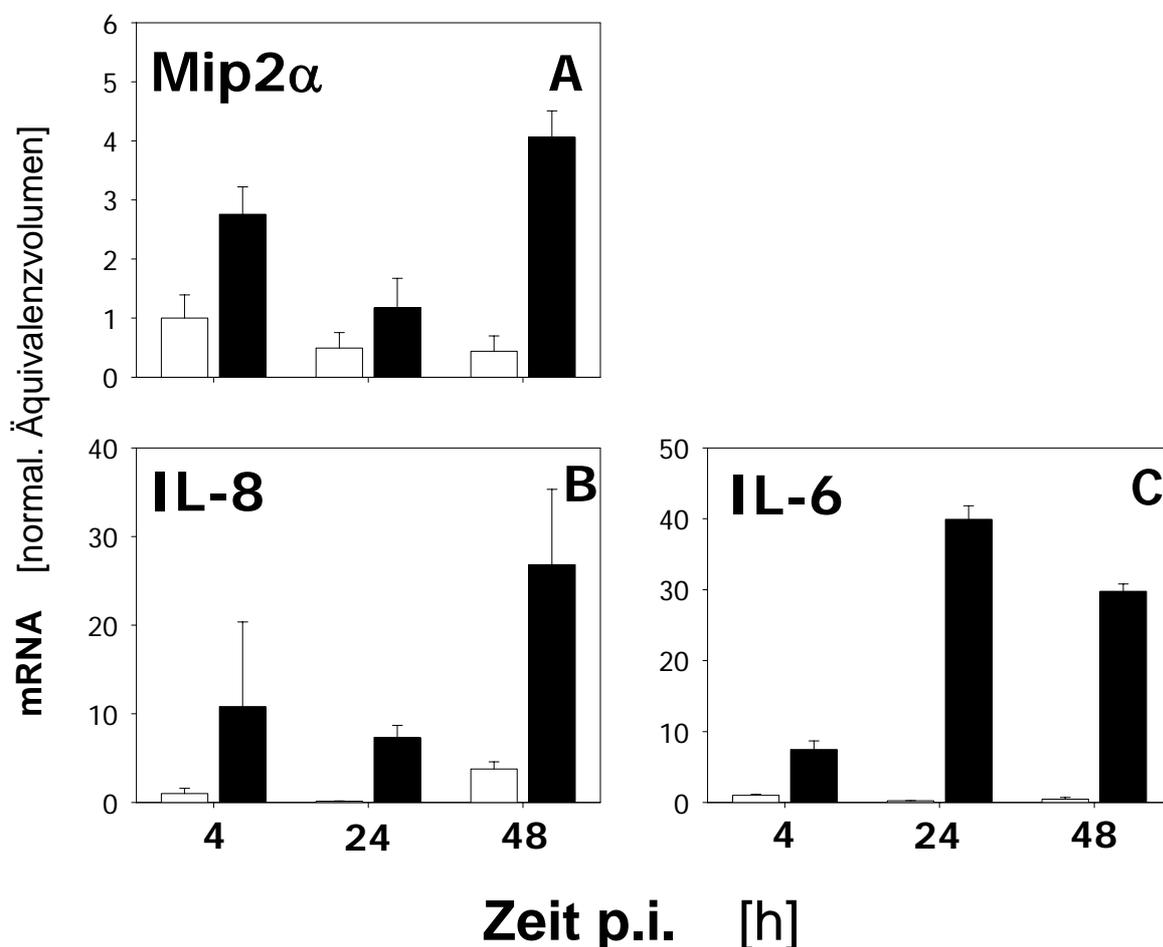
**Abbildung 4.22** Darstellung der Genexpression der schwach regulierten Gene nach Infektion von HeLa-Zellen mit *S. typhimurium* wt

Die Abbildung zeigt den Vergleich der Expression nach Infektion in Form der gemessenen Menge an mRNA von schein-infizierten (weiße Balken) und infizierten HeLa-Zellen (schwarze Balken) mit MOI 40 von *S. typhimurium* wt. Aufgetragen ist die mRNA als normalisiertes Äquivalenzvolumen zu 4, 24 und 48 h nach Infektion. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten.

Zu 4 h nach Infektion war in infizierten und schein-infizierten Zellen kein Unterschied an mRNA der untersuchten Gene nachweisbar. Erst zu 24 h nach Infektion konnte eine höhere Expression von EGR-1, IER3, DUSP5 in den infizierten Zellen gemessen werden. Bei CTGF und LIF war auch nach 24 h keine Veränderung der Genexpression bei infizierten

zu schein-infizierten Zellen zu beobachten. Bei ETV4 war im Vergleich zum frühen Zeitpunkt in den infizierten Zellen nicht mehr mRNA gemessen worden. Durch die geringere Menge mRNA in den schein-infizierten Zellen erhält man hier aber trotzdem eine Regulation der Genexpression (Tabelle 4.10).

48 h nach Infektion war bei allen Genen eine deutlich stärkere Expression in den infizierten Zellen zu messen. Allerdings ist auch die mRNA in den schein-infizierten Zellen angestiegen. Dies zeigte sich besonders bei EGR-1, wo in den infizierten und schein-infizierten Zellen die gleiche Menge an mRNA nachgewiesen werden konnte. Bei IER3 und DUSP5 war der Unterschied zwischen der Genexpression von nicht-infizierten und infizierten Zellen nur gering, wodurch Regulationsfaktoren  $<3$  erhalten worden sind. CTGF, ETV4 und LIF zeigten zu 24 h keine und nach 48 h nur eine geringe Regulation der Expression um Faktor 3-5.



**Abbildung 4.23** Darstellung der Genexpression der stark regulierten Gene nach Infektion von HeLa-Zellen mit *S. typhimurium* wt

Die Abbildung zeigt den Vergleich der Expression nach Infektion in Form der gemessenen Menge an mRNA von schein-infizierten (weiße Balken) und infizierten HeLa-Zellen (schwarze Balken) mit MOI 40 von *S. typhimurium* wt. Aufgetragen ist die mRNA als normalisiertes Äquivalenzvolumen zu 4, 24 und 48 h nach Infektion. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten.

Bei MIP2- $\alpha$  war gegenüber den vorherigen untersuchten Genen ein etwas anderes Expressionsverhalten zu beobachten. Hier wurde zu 4 h und 24 h nach Infektion nur unwesentlich mehr mRNA in den infizierten als in den schein-infizierten Zellen gebildet. Erst nach 48 h war ein deutlicher Unterschied zu beobachten. Dieser lag wesentlich höher als bei den vorher betrachteten Genen. Bei IL-6 und IL-8 ist dies noch stärker zu beobachten. Der Faktor der Genregulation war bereits zu 4 h höher als bei den anderen untersuchten Genen über den gesamten betrachteten Zeitraum. Nach 24 h wurde bei beiden Genen nur eine geringe Genexpression bei den schein-infizierten Zellen ermittelt.

Dadurch stieg der Regulationsfaktor bei den Zytokinen an, obwohl bei IL-8 die Salmonellen-induzierte mRNA Bildung zu 4 h etwa gleich geblieben war. Der Anstieg der Genexpression bei den schein-infizierten Zellen nach 48 h führte bei gleich starker Expression der infizierten Zellen zu einem geringeren Regulationsfaktor.

Im Anschluss wurde für IL-6, IL-8 und Mip-2 $\alpha$  überprüft, ob die gemessene Veränderung der Genexpression bei UV- (alle Oberflächenmoleküle und Hitzeschockproteine intakt) oder Hitze-inaktivierten (LPS intakt) Salmonellen nachgewiesen werden kann.

Nur bei IL-8 war eine sehr schwache Genexpression bei Zellen mit Hitze- wie auch UV-inaktivierten Salmonellen zu messen gewesen. Diese lag aber nur wenig über der Genexpression von mock-infizierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassung:

Bei der Salmonellen Infektion wurden die meisten durch Chlamydien verändert regulierten Gene nur schwach oder gar nicht von den Salmonellen beeinflusst. Nur IL-6, IL-8 und Mip-2 $\alpha$  wurden durch die Salmonellen stark verändert reguliert. Diese Veränderungen wurden aber nicht oder nur sehr schwach durch UV- bzw. Hitze-inaktivierten Salmonellen ausgelöst.

#### **4.2.5 Indirekter Einfluss von *S. typhimurium* wt und Chlamydien infizierten Zellen auf nicht-infizierte Zellen**

Wie die vorherigen Ergebnisse gezeigt haben, kommt es bei der Infektion von intrazellulären Erregern bei den untersuchten Bakterien zu einer Freisetzung von Zytokinen und anderen Mediatoren. Diese können autokrin auf die infizierte oder parakrin auf Nachbarzellen wirken und ebenfalls die Genexpression verändern.

Um zu überprüfen, ob diese Mediatoren einen indirekten Einfluss auf die Expression der hier untersuchten Gene haben, wurden die Überstände von Chlamydien und Salmonellen infizierten Zellen auf neue nicht-infizierte Zellen übertragen. Die Genexpression dieser Zellen wurde im Anschluss untersucht.

HeLa-Zellen wurden mit MOI 1 von *C. trachomatis* D (Infektionsrate >90 %), MOI 3,5 von *C. pneumoniae* (Infektionsrate >70 %) sowie MOI 40 von *S. typhimurium* wt

(Infektionsrate >70 %) infiziert. Der Überstand wurde 24 h nach Infektion von den infizierten Zellen abgenommen und anschließend zellfrei nach 3.2.8.1 zentrifugiert. Zur Entfernung von Bakterien wurden die Überstände bei 4 °C mit 13000xg für 30 min erregerefrei zentrifugiert. Der aufgearbeitete Überstand wurde 1:3 verdünnt mit frischem Medium auf nicht-infizierte Zellen gegeben. Nach 3 Blindpassagen bei Chlamydien lag der Anteil noch vorhandener Bakterien bei *C. trachomatis* D unter MOI 0,001 und bei *C. pneumoniae* unter MOI 0,0035. Bei Salmonellen konnte in unverdünnt ausplattiertem Überstand weniger als 1 % der anfänglich eingesetzten Bakterien gefunden werden. Die mit Überstand behandelten Zellen wurden nach 24 h lysiert und die RNA isoliert. Nach der cDNA-Synthese wurde die Expression von allen unter 4.2.4 beschriebenen Genen in der *Real-Time* RT-PCR gemessen. Bei Zellen mit den Salmonellen-Überständen wurden nur die IL-6 und IL-8 Expression bestimmt, da nur diese beiden Gene eine deutliche Regulation der Genexpression gezeigt hatten (Abbildung 4.23). Bei Chlamydien wurde bei keinem der untersuchten Gene eine Regulation in den Zellen durch die Zugabe von Überstand der Chlamydien-infizierten Zellen gefunden. Die Überstände von Salmonellen-infizierten Zellen führten bei IL-8 nach Inkubation mit Überstand zu einer sehr schwachen Regulation der Genexpression, die aber deutlich unter der Regulation infizierter Zellen lag (Daten nicht gezeigt).

#### **Zusammenfassung Salmonellen-Wirtszell-Interaktion:**

Die Salmonellen Infektion konnte an das bestehende HeLa-Infektionsmodell angepasst werden. Die Untersuchung mit Monozyten als eigentliche *in vivo* Zielzellen war nicht möglich, da die Monozyten bereits auf inaktivierte Salmonellen reagieren.

Die Analyse der Genexpression von Wirtszellen durch Micro-Arrays erbrachte keine Unterschiede zwischen *Salmonella* Wildtyp und SPI2-Mutanten des TypIII-Sekretionsapparat 4 h nach Infektion. Eine Untersuchung der SPI1-Mutanten war aufgrund der geringen Anzahl intrazellulärer Salmonellen bei dieser Mutanten nicht möglich.

Nach Infektion wurde die Wirtszell-Expression der analysierten Gene, die durch Chlamydien vermehrt exprimiert werden, von Salmonellen nur schwach oder gar nicht beeinflusst. Ausnahme bildete nur Mip2 $\alpha$ , IL-6 und IL-8. Die erhöhte Genexpression wurde kaum durch Hitze- oder UV-inaktivierte Salmonellen hervorgerufen. Der Überstand Chlamydien- oder Salmonellen infizierter Zellen führte ebenfalls zu keiner oder nur zu einer sehr schwach veränderten Genexpression.

### 4.3 Einfluss intrazellulärer *S. typhimurium* und *C. trachomatis* D auf ihre Wirtszellen mittels Effektorproteine oder Toxine

Im dritten Teil dieser Arbeit wird die Wirkung des putativen Toxins CT166 von *C. trachomatis* D auf das Wirtszell-Zytoskelett analysiert. Bakterien können durch Übertragung von Effektorproteinen oder durch die Freisetzung von Toxinen zu Veränderungen des Zytoskeletts der Wirtszelle ausführen. Bei Salmonellen werden diese Zytoskelett-Veränderung beispielsweise durch das Effektorprotein SopE bzw. SopE2 des TypIII-Sekretionsapparat zur Invasion von Zellen benötigt. Ein Beispiel für die Toxin-induzierte Reorganisation des Zytoskeletts stellt Toxin B von *C. difficile* dar.

Um eine mögliche Funktion von CT166 zu untersuchen, wurde mittels Protein-BLAST die Homologie zu Proteinen von anderen Bakterien *in silico* untersucht.

Bakterien	Protein-Name	Funktion	Homologie [%]
<i>Chlamydiaceae</i>			
<i>C. muridarum</i>	TCO438	Adhärenz Faktoren?	83
	TCO437	Adhärenz Faktoren?	67
	TCO439	Adhärenz Faktoren?	64
<i>C. caviae</i>	CCA00558	Putatives Zytotoxin	69
<i>E. coli</i>			
EHEC	EHEC Faktor für Adhärenz	Adhärenz Faktoren	57
	Efa1-Lymphostatin-like Toxin	Adhärenz/Toxin ?	57
	Lymphostatin	Toxin	57
	Efa1	Adhärenz	57
	Efa1-LifA-Tox Protein	Adhärenz/Toxin ?	57
Clostridien			
<i>C. difficile</i>	Toxin B	Toxin	40
	Toxin A	Toxin	38

**Tabelle 4.11 Homologievergleich von CT166 zu anderen bakteriellen Proteinen**

Gezeigt werden homologe Proteine aus anderen Bakterienspezies, die homolog zu CT166 sind. Die Auswertung der Homologie erfolgte über Protein-Protein BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Als prozentuale Homologie wurde der Anteil an gleichen Aminosäuren oder mit gleichen Eigenschaften („positive Aminosäuren“) verwendet.

CT166 zeigt Homologien zu einer Reihe von Proteinen, die eine (mögliche) toxische Wirkung auf Zellen haben oder eine Rolle bei der Adhärenz des Bakteriums spielen. Unter den homologen Proteinen sind die chlamydialen Proteine TCO437 bis 439 von *C. muridarum*, die wahrscheinlich für Zytoskelett-Veränderungen verantwortlich sind [119], aber auch ein putatives Zytotoxin aus einer anderen Chlamydien-Spezies.

Interessanterweise ist CT166 vor allem zu den Adhärenzfaktoren oder Toxinen von *E. coli*- und Clostridien-Spezies, hier vor allem *C. difficile*, homolog. Alle homologen Proteine

besitzen das Protein-Motiv für eine Glykosyltransferase mit dem DXD-Motiv, welches für die Bindung von Glukose-Derivaten wichtig ist.

```
CT166      : I KDI KELOSMKQARNVYNYEQEMFL-RWNYAAATDQI RMYMLEELGGLYTDLDMMPSYSQEVL
            I D +L+S+ + Y + QE F R N AAA+D +R +L + GG+Y D D++P S + L
Gly-Transf.: I LDTPDLESFLKNTPNYPWFQEAFFSSRPNLAAASDFLRYAI LYKYGGVYLDTDVI PLKSLDPL
```

#### Abbildung 4.24 Homologievergleich von CT166 zum Glykosyltransferase-Motiv

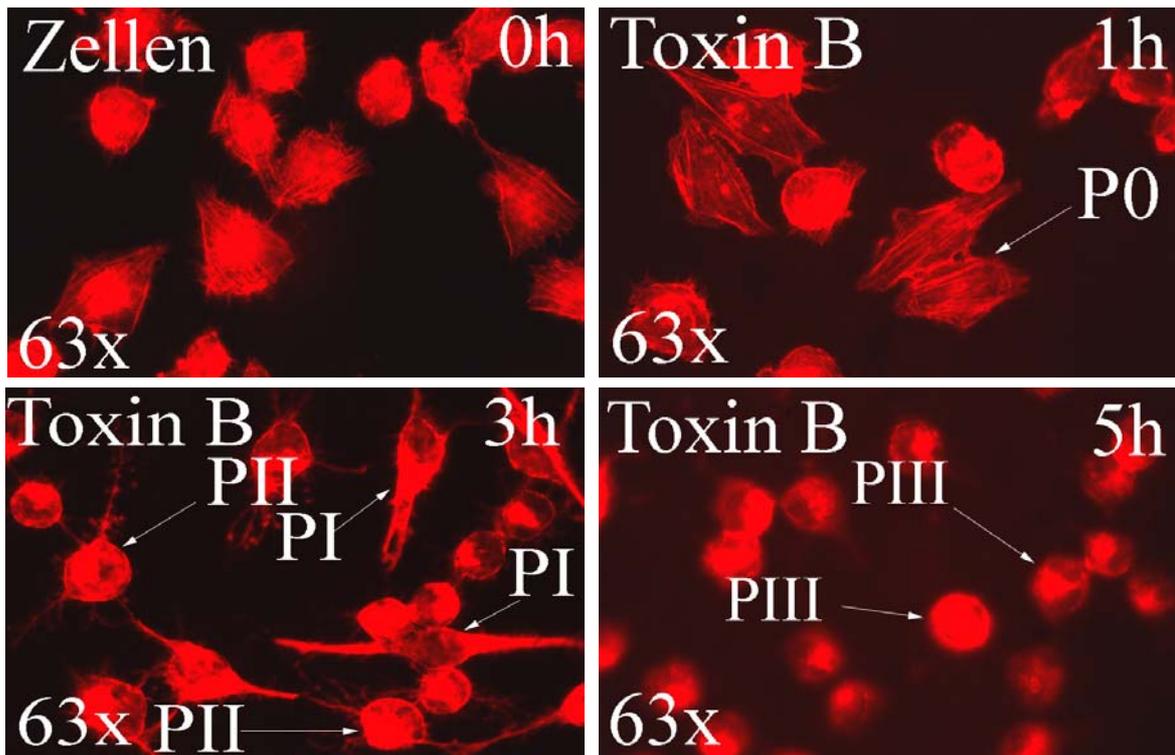
Gezeigt wird der homologe Bereich von CT166 zum Glykosyltransferase-Motiv. Die Auswertung der Homologie erfolgte über BLAST2Sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Die homologen Aminosäuren sind zwischen den beiden Sequenzen zu finden. Identische Aminosäuren sind ausgeschrieben während Aminosäuren mit gleichen Eigenschaften mit + markiert sind. Die unterstrichenen Aminosäuren zeigen das Glukose-bindene DXD-Motiv.

Wie anhand des Vergleichs von CT166 mit dem Glykosyltransferase-Motiv zu sehen ist, stimmen große Teile des CT166-Bereichs mit dem Protein-Motiv für die Glykosyltransferase überein oder die Aminosäuren besitzen ähnliche Eigenschaften. Proteine mit Glykosyltransferase-Aktivität führen zur Glykosylierung wichtiger Proteine innerhalb von Signaltransduktionswegen. Zielproteine sind beispielsweise kleine GTPasen, die durch die Glykosylierung aktiviert werden und zur Zytoskelett-Umorientierung führen, wie es zum Beispiel für Toxin B beschrieben worden ist [162;163].

Um später die Zytoskelett-Veränderungen von CT166 beurteilen zu können wurden HeLa-Zellen mit Toxin B von *C. difficile* behandelt und die morphologischen Veränderungen nach Zytoskelett Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

Durch die Zugabe von 0,001 ng/ml Toxin B auf HeLa-Zellen zeigten sich die in Abbildung 4.25 dargestellten morphologischen Veränderungen zu den entsprechenden Zeitpunkten nach Zugabe des Toxins.

Bei der Intoxikation mit Toxin B kann die Zytoskelett-Veränderung in vier Phasen eingeteilt werden. Die **Phase 0** stellt dabei die Zellen ohne Zytoskelett-Änderung dar, dies ist noch nach 1 h bei den Zellen mit Toxin B Behandlung zu beobachten. Ab ca. 3 h begann die **Phase I** wo der Zellkörper anfängt, sich einzuschnüren. In der **Phase II** bildeten die Zellen eine abgerundete Form an zwei Filamentsträngen. In der **Phase III**, hier nach 5 h, ist die Zelle komplett angerundet und löst sich leicht vom Boden ab.



**Abbildung 4.25** Zytoskelett-Änderungen nach Behandlung mit Toxin B von *C. difficile*

Die Abbildung zeigt HeLa-Zellen nach Behandlung mit 0,001 ng/ml Toxin B von *C. difficile* zu den Zeitpunkten 0 h, 1 h, 3 h und 5 h nach Toxin-Zugabe. Bei den Zellen wurden nach den angegebenen Zeitpunkten das Zytoskelett angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Zu beobachtende Phasen: P0 = keine Zytoskelett-Änderungen; PI = Einschnüren des Zellkörpers; PII = runder Zellkörper an zwei Filamentsträngen, PIII = komplett abgerundeter Zelle

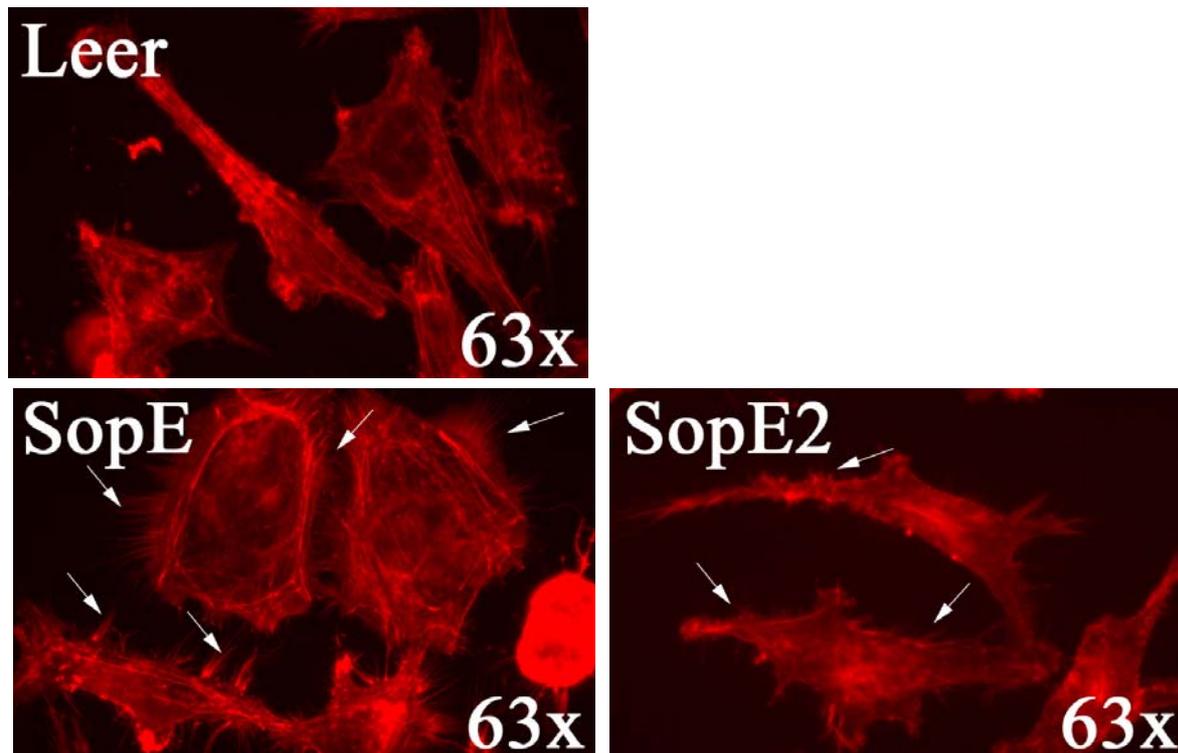
Bei den PBS behandelten Zellen änderte sich die Zell-Morphologie nicht (Bilder nicht gezeigt). Die beobachteten Effekte sind abhängig von der eingesetzten Konzentration an Toxin B. Bei höheren Konzentrationen von 0,1 und 0,01 ng/ml von Toxin B zeigten die Zellen bereits nach 1 h die Phase III (Bilder nicht gezeigt).

#### 4.3.1 Klonierung von *Salmonella*- Effektorproteinen und dem putativen Toxin CT166 aus *C. trachomatis D* und *E*

Chlamydien lassen sich über molekularbiologische Methoden (wie *Knock-Out*-Mutanten) nicht manipulieren. Um die Funktion von Genen zu untersuchen wird der Ansatz gewählt, interessante Gene in geeignete Vektoren zu klonieren und das Protein nach Transfektion in einer eukaryonten Zelle zu exprimieren. In geeigneten Testverfahren sollen Veränderungen der Zelle (wie Zytoskelett-Veränderung, Freisetzung von Zytokinen, Veränderungen der Genregulation usw.) im Anschluss gemessen werden. Da nicht bekannt ist, wie gut prokaryonte Gene in eukaryonten Zellen exprimiert werden, wird das interessante Gen als Fusionsprotein mit einem C-terminalen grün-fluoreszierenden Protein (GFP) exprimiert. Die Fluoreszenz kann im Anschluss unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert werden.

Das putative Toxin CT166 aus *C. trachomatis* D, und zusätzlich SopE aus *Salmonella dublin* und SopE2 *S. typhimurium*, wurden mit und ohne Stop-Kodon amplifiziert. Die Amplifikate wurden in einen TOPO-Vektor inkloniert und über Sequenzierungen überprüft. Die inklonierten Gene von CT166, SopE und SopE2 zeigten keine Mutationen auf Protein-Ebene.

Von SopE und SopE2 ist bereits bekannt, dass sie in eukaryonten Zellen zur Zytoskelett-Veränderung führen [164]. Sie wurden daher als Positiv-Kontrolle verwendet. Dies konnte auch nach Transfektion von SopE-GFP und SopE2-GFP in HeLa-Zellen (Abbildung 4.26) beobachtet werden.



**Abbildung 4.26** Zytoskelett-Änderungen nach Transfektion von SopE und SopE2

Dargestellt werden Fluoreszenzaufnahmen der Zytoskelett-Änderung nach Transfektion von SopE und SopE2. Beispiele für Ausläufer sind mit einem Pfeil markiert. Die Bilder stammen aus einem Einzelexperiment.

Nur wenige der Zellen (<2 %) zeigten im Vergleich zu Leervektor transfizierten Zellen bei SopE sehr starke Ausläufer nach 72 h oder waren sogar abgerundet (Abbildung 4.26, Ausläufer mit Pfeilen markiert). Diese Ausläufer sind auch bei Transfektion von SopE2 in wenigen der Zellen zu sehen gewesen. Jedoch scheint bei SopE2 der Effekt bei der Zytoskelett-Veränderung schwächer zu sein. Nur wenige Zellen waren GFP-positiv (<5 %). Bei diesen konnte allerdings keine Zytoskelett-Veränderung beobachtet werden. Umgekehrt zeigten die Zellen mit morphologischer Änderung des Zytoskeletts keine grüne Fluoreszenz.

Die Fluoreszenz von GFP bei CT166 und SopE war auch zu früheren Zeitpunkten 24 und 48 h nach Transfektion nur bei wenigen Zellen zu beobachten (<1 %). Als

Positiv-Kontrolle für GFP-Fusionsprotein diente das chlamydiale Protein CT671, welches in der eigenen vorangegangenen Diplomarbeit nach Transfektion sehr gut intrazellulär fluoreszierte. Dieses war bereits ab 48 h bei bis zu 5 % der Zellen und nach 72 h bei 10-20 % der Zellen GFP-positiv.

CT166 und SopE werden, wenn auch nur in geringem Maße, von eukaryonten Zellen exprimiert. Eine Ursache für die geringe GFP-Fluoreszenz könnten Faltungsprobleme von CT166 bzw. SopE oder des grün-fluoreszierenden Proteins sein. Ein anderes Problem könnte der untersuchte Zeitpunkt nach der Transfektion sein.

#### **4.3.2 Klonierung des Effektorproteins SopE und dem putativen Toxin CT166 in einen IRES-Vektor**

Unter normalen Umständen muss bei eukaryonten mRNA ein 5'-Cap vorhanden sein, um an das Ribosom zu binden und translatiert zu werden. Virale mRNA besitzt diese Cap-Struktur nicht, sondern enthält eine Basensequenz mit ausgeprägter Sekundärstruktur, die eine unabhängige Bindung an das Ribosom erlaubt, die **IRES-Sequenz**.

In dem von uns verwendeten Vektor befindet sich die IRES-Sequenz vor dem zu untersuchenden Gen. Diese wird unabhängig von dem im Vektor zusätzlich vorhandenen GFP exprimiert. Durch die unabhängige Expression der beiden Proteine soll eine Fehlfaltung der beiden Proteine nach Expression verhindert werden. CT166 und SopE wurden aus dem TOPO-Vektor über *KpnI* ausgeschnitten und über *blunt-end* Ligation in den IRES-Vektor pSF91-IRES-eGFP-PRE einkloniert und mittels Sequenzierung kontrolliert.

Die Transfektion mit Lipofectamin in HEK293 und HeLa-Zellen ergab nach 3 Tagen in einem Einzelexperiment eine Transfektionseffizienz von 30 %. Nach visueller Abschätzung unter dem Fluoreszenzmikroskop fluoreszierten 20-30 % der HEK293 und 15-20 % der HeLa-Zellen mit dem Ursprungsvektor pSF91-IRES-eGFP-PRE (GFP-Positiv-Kontrolle). Ein Konstrukt mit dem humanen Gen Ets1 im Vektor zeigte bei 10-20 % der HEK293 Zellen und 1-2 % der HeLa-Zellen GFP-Fluoreszenz. Bei den Zellen mit SopE und CT166 hingegen waren nur 1-2 % der HEK293 GFP-positiv. Keine der HeLa T-Zellen fluoreszierte nach 3 Tagen. Eine Beurteilung des Zytoskeletts war bei den HEK-Zellen aufgrund ihres Wachstums in Zellklumpen nicht oder nur sehr schwer durchführbar. Eine Veränderung war bei den GFP-positiven Zellen mit CT166 oder SopE nicht zu erkennen. Sowohl bei den HEK- als auch bei den HeLa-Zellen überlebten nach der Transfektion vom Ursprungsvektor pSF91-IRES-eGFP-PRE und dem Konstrukt mit dem Gen Ets1 etwa 70-80 % im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen. Im Gegensatz dazu hafteten nach Transfektion von CT166 und SopE nur 20-30 % der Zellen am Boden des Kulturgefäßes. Demnach scheint die Transfektion von CT166 und SopE ein erhöhtes Zellablösen zur Folge zu haben.

### 4.3.3 Effekt von SopE und CT166 auf HeLa-Zellen zu frühen Zeitpunkten nach Transfektion

Wie Belland *et al.* zeigen konnten, führt die Infektion von HeLa-Zellen mit *C. trachomatis* D (MOI 100) zu einer Abrundung der infizierten Zellen zwischen 30 min und 4 h nach Infektion [119]. Dieses Zellabrundern zeigte sich auch bei Behandlung der HeLa-Zellen mit Toxin B und wird als Effekt in Vortests unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

Hier wurden HeLa-Zellen mit den TOPO-Konstrukten von SopE-GFP und CT166-GFP mittels Metafecten-Transfektion transfiziert. Nach visueller Abschätzung unter dem Lichtmikroskop waren etwa 50 % der Zellen 24 h nach Transfektion vor dem Mediumwechsel schon abgerundet. Mit pcDNA3.1 His/LacZ waren zu diesem Zeitpunkt nur 10% der Zellen abgerundet. Demnach scheinen die Effekte, die zur Zytoskelett-Veränderung führen, bereits **vor** 24h nach der Transfektion statt zu finden.

Zu frühen Zeitpunkten nach Transfektion spielt neben der aufgenommenen Menge an Plasmid auch die Stufe des Zellzyklus eine Rolle. Dies hat Einfluss auf die Anzahl an Zellen, die das gewünschte Protein exprimieren und so die untersuchten Effekte zeigen. Daher wurden die Zellen durch Abkühlen für 30 min auf Eis synchronisiert (beschrieben unter [165]).

Nach Zellsynchronisation wurden die Zellen mit CT166 und SopE (ohne GFP) sowie als Negativkontrolle und zur Bestimmung der Transfektionseffizienz mit pcDNA3.1 His/LacZ mittels Metafecten-Transfektion transfiziert. Nach 12 h, 15 h, 18 h und 24 h nach Transfektion wurde der Anteil an abgerundeten Zellen zur Gesamtzellzahl bestimmt.

	Anteil abgerundeter Zellen [%]			
	12 h	15 h	18 h	24 h
<b>His/LacZ</b>	17,7	17,7	18,4	18,0
<b>SopE-Stop</b>	48,9	59	62,6	52,7
<b>CT166-Stop</b>	43,5	51,8	51	43,2

**Tabelle 4.12** Prozentualer Anteil abgerundeter Zellen nach Transfektion mit CT166 und SopE

Angegeben ist der prozentuale Anteil abgerundeter Zellen zur Gesamtzellzahl nach Transfektion von Leervektor (His/LacZ), SopE-Stop und CT166-Stop. Die Ergebnisse wurden aus einem Einzelexperiment durch Auszählen von 5 verschiedenen Gesichtsfeldern bei 10facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop erhalten.

Bereits nach 12 h sind deutlich mehr abgerundete Zellen nach Transfektion mit SopE und CT166 zu beobachten. Demnach scheinen die Effekte sogar noch früher als zu 12 h eine Rolle zu spielen. Um zu beobachten, ob ähnliche Phasen bei der Zytoskelett-Änderung auftreten wie bei Toxin B, müssen noch frühere Zeitpunkte analysiert werden.

Zusammengefasst:

Das putative Zytotoxin CT166 ist zu einer Reihe anderer Toxine bzw. Adhärenzfaktoren homolog. Diese besitzen alle eine Glykosyltransferase-Aktivität mit dem DXD-Motiv zur Glukose-Derivat Bindung. CT166 und die Salmonellen Effektorproteine SopE und SopE2 konnten in einen Vektor kloniert und für Transfektionen eingesetzt werden.

Sowohl nach Gabe von *C. difficile* Toxin B als auch Transfektion von SopE/SopE2 konnten nach Färbung Zytoskelett-Veränderungen beobachtet werden. Nach Transfektion von GFP-Konstrukten war der Anteil an positiven Zellen bezüglich GFP oder Zytoskelett-Änderung nach 72 h nur gering. Die Fehlfaltung von CT166 bzw. SopE und GFP konnte nach unabhängiger Expression in einem IRES-Vektor ausgeschlossen werden. Nach Betrachtung der abgerundeten Zellen zu frühen Zeitpunkten nach Transfektion zwischen 12 und 24 h scheint CT166 bereits vor 12 h seine Wirkung zu entfalten.



## 5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Beeinflussung der Genexpression von Wirtszellen nach Infektion mit Chlamydien und Salmonellen untersucht werden. Schwerpunkt der Analysen stellte dabei die Genexpression der Wirtszellen während der Persistenz von Chlamydien dar. Im Weiteren wurde die Genexpression von Wirtszellen nach Infektion mit Salmonellen untersucht. Dabei wurde zum einen überprüft, ob Unterschiede der Wirtszell-Genexpression nach Infektion mit *S. typhimurium* Wildtyp zu den beiden TypIII-Sekretionsapparat *Knock-Out*-Mutanten im DNA-Micro-Array gefunden werden können. Weiterhin sollte durch den Vergleich mit intrazellulären Salmonellen überprüft werden, in wieweit die durch Chlamydien veränderte Genexpression in HeLa-Zellen für diese Bakterium spezifisch ist. Abschließend wurde der Einfluss des putativen Toxins CT166 von *C. trachomatis* D auf das Zytoskelett von Zellen untersucht.

### 5.1 Persistenz

Vorangegangene Arbeiten der Forschungsgruppe haben veränderte Wirtszell-Genregulationen während der **produktiven** Infektion von Chlamydien gezeigt. Dabei wird von Chlamydien eine Vielzahl von Wirtszell-Genen mit Schlüsselfunktion oder Bezug zu chronischen Infektionen reguliert. Bei einer Reihe von Erkrankungen spielt die **persistierende** Infektion von Chlamydien eine wesentlichere Rolle. Bisher wurde die Wirtszell-Genexpression während der Persistenz nur wenig untersucht, sondern dabei eher das chlamydiale Expressionsverhalten betrachtet. Untersuchungen zur chlamydialen Persistenz sind *in vivo* nur unter großen Schwierigkeiten möglich. Für die Untersuchungen werden daher gewöhnlich eine Reihe von Zellkulturmodellen der chlamydialen Persistenz eingesetzt. Es ist bisher nicht bekannt, welches Modell die *in vivo* Situation am besten wiedergibt.

Die ursprüngliche Erwartung war, dass Veränderungen durch persistierende Chlamydien in jedem Modell auftreten. Daher sollte ein Vergleich der Wirtszell-Genexpression in den wichtigsten Modellen die Identifikation von gemeinsamen, Persistenz-typischen Zellantworten, ermöglichen. Spezies-abhängige Effekte während der Persistenz lassen sich durch den Vergleich von persistierenden *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* zeigen. Dies bietet die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Rolle der Persistenz bei chronischen Erkrankungen. Aus diesem Grund mussten die experimentellen Bedingungen der Modelle für diese beiden Spezies, so weit wie möglich, aneinander angepasst werden.

### 5.1.1 Optimierung von Persistenzmodellen bei Chlamydien

Bei der Optimierung sind verschiedene Kriterien zu beachten gewesen. Zum einen musste die Fähigkeit der einzelnen untersuchten Spezies, und bei *C. trachomatis* des verwendeten Serovars, zur Persistenz-Induktion überprüft werden. Außerdem wichtig war die Menge der verwendeten Induktoren, Medien und deren Zusätze sowie der Zeitpunkt der Analyse.

#### 5.1.1.1 Spezies- und Serovar-spezifische Unterschiede bei Persistenz-Erzeugung

Frühere Untersuchungen der Persistenz sind mit den okularen Serovaren von *C. trachomatis* durchgeführt worden. Bei diesen werden wesentlich geringere Mengen an IFN- $\gamma$  benötigt, um Persistenz zu erzeugen [166;167]. Diese Serovare spielen bei der reaktiven Arthritis jedoch keine Rolle. Zur Untersuchung des Pathomechanismus mussten daher genitale Serovare zur Analyse heran gezogen werden. Für die reaktive Arthritis ist eine Beteiligung von *C. trachomatis* D bereits veröffentlicht worden [58;60], und weil es sich um den sequenzierten und am besten charakterisierten Stamm handelt, ist die Optimierung hauptsächlich mit diesem Serovar durchgeführt worden. Dieses benötigt zur Persistenz-Erzeugung höhere Konzentrationen an IFN- $\gamma$  [42]. Auch sind Unterschiede in der Menge an den Persistenz-erzeugenden Substanzen zwischen *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* spezies-spezifisch und wurden bereits vorher beschrieben [31;32;42]. Diese Unterschiede sind unter anderem auf das schnellere intrazelluläre Wachstum von *C. trachomatis* zurückzuführen. Hierbei entsteht ein größerer Konkurrenzdruck zwischen den Bakterien und ihrer Wirtszelle um die entsprechenden Nährstoffe [24]. Auch die vergrößerten Einschlüsse, die bei IFN- $\gamma$  und DAM Persistenz trotz geringer Restinfektiösität zu finden waren, lassen auf dieses Phänomen schließen. Die Chlamydien in einigen Einschlüssen können sich noch vermehren, bis der Tryptophan- bzw. Eisen-Pool der Zelle aufgebraucht ist. Durch die höheren Mengen an DAM bzw. IFN- $\gamma$  wurde der rapide Entzug des Metaboliten sichergestellt. Als Alternative behandeln einige Labore die Zellen mit DAM oder mit IFN- $\gamma$  schon 24 oder 48 h vor Infektion [42;113]. Auf diese Behandlung wurde, bis auf das DAM-Modell bei *C. trachomatis* D, verzichtet. Die Behandlung mit den beiden Substanzen könnte bereits die Zellen beeinflussen und die Messung Chlamydien-induzierter Veränderungen der Wirtszell-Genexpression erschweren. Außerdem tritt auch *in vivo* der Eisenmangel bzw. die IFN- $\gamma$  Sekretion erst nach Infektion auf. Zusätzlich konnte die Persistenz-Induktion im DAM Modell durch die Verwendung eines publizierten Mediums mit geringerem Serumgehalt [31] verbessert werden. Durch die Zugabe einer niedrigeren Serummenge ist im Kulturmedium eine geringere Konzentration Eisen-beladener Proteine vorhanden.

Erste Untersuchungen der Genexpression infizierter Zellen während der chlamydialen Persistenz bei *C. pneumoniae* hatten bei einigen Genen nur eine schwache Expression [168] gezeigt. Bei diesen Genen war ein Einfluss von persistierenden Chlamydien auf ihre

Wirtszellen daher fraglich. Die Verwendung von hohen Bakterienzahlen in der hier vorliegenden Arbeit führte in HeLa-Zellen zu einer stärkeren Antwort der Genexpression infizierter Wirtszellen, während bei schein-infizierten Zellen und solchen mit UV-inaktivierten Chlamydien nach wie vor keine veränderte Genexpression zu messen war [112]. Zur Erzeugung von Persistenz konnten die durch K. Endlich optimierten Bedingungen bei *C. pneumoniae* verwendet werden [168]. Nur die Konzentration von Holotransferrin zur Reaktivierung musste gegenüber der geringen MOI von 200 µg/ml auf 800 µg/ml erhöht werden. Dies ist wahrscheinlich auf die größere Anzahl Chlamydien durch die erhöhte Infektionsrate von etwa 70 % bei geringer MOI auf >90 % bei hoher MOI zurückzuführen.

#### 5.1.1.2 Konzentration der Persistenz-Induktoren

DAM und IFN- $\gamma$  verändern den Nährstoff-Pool der Zellen während Penicillin G die Chlamydien direkt beeinflusst. Daher sind die Mengen von DAM und IFN- $\gamma$  abhängig vom verwendeten Zelltyp, der sich hinsichtlich der Mengen an Metaboliten unterscheidet. Auch in den Medien sind unterschiedliche Mengen an Eisen (DAM Modell) bzw. L-Tryptophan vorhanden, die den Zellen/Chlamydien von außen zugefügt werden. Das Medium der Zellen wurde alle 24 h gewechselt. Dies ermöglichte den Zellen ein optimales Nährstoffangebot und beste Wachstumsbedingungen. Weiterhin wurden dadurch die Persistenz-Induktoren regelmäßig erneuert um „verbrauchte“ Substanzen (wie IFN- $\gamma$ ) auszutauschen. Durch diesen 24-stündigen Mediumwechsel wurde das entfernte Eisen und Tryptophan den Zellen wieder zugefügt. Dies musste möglichst schnell wieder entfernt werden, um die Chlamydien nicht zu reaktivieren. Die höhere Mengen an Penicillin G und DAM sowohl bei *C. trachomatis* als auch *C. pneumoniae* mussten als Kompromiss benutzt werden, um die Bedingungen in den Modellen möglichst gleich zu halten. Jedoch war dies bei DAM nur durch die Verwendung eines anderen Mediums möglich.

Bei IFN- $\gamma$  wäre der Unterschied zwischen den beiden Spezies zu groß gewesen, weswegen hier verschiedene Konzentrationen eingesetzt wurden. Die verwendeten Konzentrationen der Persistenz-Induktoren erzeugten bei >95 % der Chlamydien Persistenz. Dies verhinderte die Reinfektion noch produktiver Chlamydien. So wird sichergestellt, dass die gemessenen Veränderungen der Wirtszell-Genexpression überwiegend von persistierenden Chlamydien induziert werden.

#### 5.1.1.3 Zeitpunkt der Analysen

Ein wesentlicher Punkt bei der Optimierung der verschiedenen Persistenzmodelle war außerdem auch die Länge der Kultur. Die meisten der bisher veröffentlichten Untersuchungen zur Persistenz wurden bis 48 h nach Infektion durchgeführt, nur in wenigen Fällen nach 4 Tagen. Die persistierende Infektion ist eine **Langzeit-Beziehung** zwischen Wirtszelle und Chlamydien. Sie führt erst nach Wochen oder später zu chronischen Erkrankungen. Für

Untersuchungen des Einflusses von persistierenden Chlamydien auf ihre Wirtszellen sind daher längere Zeiträume nach Infektion wichtig. Für gewöhnlich wird bei Chlamydien-Infektionen in der Zellkultur der Proteinsynthese-Hemmer Cycloheximid verwendet. Längere Kultivierung mit Cycloheximid führt nach 4-5 Tagen zum Zelltod. Außerdem beeinflusst er durch die Verringerung der Verfügbarkeit von Proteinen (Transkriptionsfaktoren, Proteine der Signaltransduktion, usw.) den zellulären Stoffwechsel. Chlamydien-induzierte Veränderungen können so nicht mehr von Effekten durch Cycloheximid unterschieden werden. Aus diesen beiden sehr wichtigen Gründen kann der Inhibitor nicht eingesetzt werden.

### 5.1.2 Zeitlicher Verlauf der Wirtszell-Genexpression bei *C. pneumoniae* Persistenz

Bei der Expression der Wirtszell-Gene sind zwei Hypothesen denkbar: Die Gene könnten entweder daueraktiviert werden, wodurch es zu einer fortschreitenden Schädigung von Gewebe kommt. Oder alternativ könnten die Gene zum Schutz der Chlamydien stumm geschaltet werden. Dies würde dem Immunsystem die Erkennung und Eliminierung infizierter Zellen erschweren. Eine spätere Reaktivierung könnte erneut zu einer veränderten Genexpression mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren führen. In der vorliegenden Arbeit konnten zwei verschiedene Expressionsmuster in der späten Phase der Persistenz nachgewiesen werden, die abhängig vom jeweiligen Modell waren.

Die beobachteten Expressionsmuster lassen sich in zwei zeitliche Phasen unterteilen: In eine **frühe Phase** 1 Tag nach Infektion. Hier war in allen Modellen das gleiche Expressionsverhalten wie bei der produktiven Infektion zu beobachten. Das vergleichbare Expressionsmuster in allen Persistenz-Modellen und produktiver Infektion kann mehrere Ursachen haben:

1. Die Chlamydien liegen in persistierender Form vor, aber sie beeinflussen zu diesem Zeitpunkt noch nicht ihre Wirtszelle
2. Die gemessene eukaryote mRNA stammt noch von dem Zeitpunkt vor der Umwandlung in die persistierende Form.
3. In der frühen Phase führen die persistierenden Chlamydien zur gleichen Wirtszell-Genexpression, wie bei produktiver Infektion.

Eine veränderte chlamydiale Genexpression von *C. pneumoniae* 24 h p.i. konnte durch Molestina *et al.* im Vergleich von IFN- $\gamma$  induzierter Persistenz zu produktiver Infektion gezeigt werden [115]. Viele Labore verwenden gerade diesen frühen Zeitpunkt um 1-2 Tage nach Infektion, um Unterschiede zwischen der Persistenz und der produktiven Infektion zu untersuchen. Ob andere Wirtszell-Gene während der chlamydialen Persistenz zu diesem Zeitpunkt verändert exprimiert werden, kann aufgrund der Analyse von nur einer Auswahl an

Genen nicht ausgeschlossen werden. Doch sollten zur Untersuchung von Persistenz und deren Bedeutung bei chronischen Erkrankungen Veränderungen zu späteren Zeitpunkten analysiert werden.

Am 4. Tag konnte bei den Expressionsanalysen eine **späte Phase** beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt lagen in den drei Persistenzmodellen und der produktiven Infektion verschiedene Expressionsmuster vor. Beim IFN- $\gamma$  und Penicillin G Modell wurden die Gene stumm geschaltet. Bei der Stummschaltung der Wirtszell-Genexpression wären die Chlamydien vor der Immunabwehr verborgen und würden in der persistierenden Form ein Reservoir bilden. Nach Reaktivierung wäre anschließend eine weitere Verbreitung möglich. Beim DAM-Modell wurden die meisten Gene über den gesamten Zeitraum vermehrt exprimiert. Bei daueraktiver Genexpression käme es zu einer anhaltenden Immunreaktion, die zur Schädigung des betroffenen Gewebes führen könnte. Die anhaltende Freisetzung von Proteinen wie Matrix Metalloproteinasen könnte weitere Schäden verursachen.

Die drei verschiedenen Modelle bestätigen, von uns unerwartet, beide eingangs gestellten Hypothesen. Dies könnte auf verschiedene *in vivo* Situationen hindeuten, die abhängig vom Zelltyp, Art der Persistenzinduktion, Spezies usw. sind.

#### 5.1.2.1 IFN- $\gamma$ abhängige Effekte

Das IFN- $\gamma$  Modell ist das häufigste eingesetzte Modell zur Untersuchung der chlamydialen Persistenz. Interessant war hier die höhere IL-6 Freisetzung von infizierten Zellen, die sogar deutlich höher als in den anderen Modellen und bei produktiver Infektion war. IFN- $\gamma$  scheint einen synergistischen Effekt auf die IL-6 Sekretion bei der persistierenden Infektion auszuüben. Mit IFN- $\gamma$  vorbehandelte epitheliale Zellen können nach Gabe von IL-1, LPS oder anderen Stimuli mehr IL-6 freisetzen [169-172]. Hierbei führt IFN- $\gamma$  durch Aktivierung des p38-Signalweges zu einer höheren Stabilität der IL-6 mRNA [170;173;174]. Die Induktion von IL-6 bei chlamydialer Infektion und die längere Stabilität der IL-6 mRNA erhöht die Freisetzung des Zytokins zu 24 h nach Infektion.

Dies könnte möglicherweise einen Hinweis auf Vorgänge *in vivo* geben. Die höhere IL-6 Konzentration hat bei chronischen Infektionen pathophysiologische Bedeutung, da IL-6 in inflammatorischen Prozessen eine bedeutende Rolle spielt. Allerdings ist dieser synergistische Effekt bei IL-8 nicht zu beobachten, obwohl die mRNA durch IFN- $\gamma$  wie bei IL-6 über den p38 Signalweg stabilisiert werden sollte [174]. In unseren Experimenten war aber die IL-8 Expression zu 24 h p.i. im IFN- $\gamma$  Persistenzmodell vergleichbar stark wie bei der produktiven Infektion. Die Expression von IL-8 scheint daher nicht durch IFN- $\gamma$  beeinflusst zu werden. Demnach müssen weitere Einflüsse bei der IL-6 Freisetzung eine Rolle spielen. Z. B. könnten die Zellen durch IFN- $\gamma$  induzierte Rezeptoren an der Oberfläche gegenüber freigesetzten Mediatoren „empfindlicher“ geworden sein und die IL-6 Sekretion zusätzlich stimulieren.

Nach Reaktivierung mit Tryptophan scheinen die Chlamydien nur geringe Veränderungen der Wirtszell-Genexpression auszulösen. Oder die Anzahl an reaktivierten Chlamydien zum jeweiligen Zeitpunkt genügt nicht, um messbare Veränderungen der Expression auszulösen. Einzig IL-8 zeigte bei den infizierten wie schein-infizierten Zellen erhöhte Mengen an mRNA im Vergleich zu den Persistenz-Proben. Hier ist aber die veränderte Genexpression auf das Entfernen von IFN- $\gamma$  und die Zugabe von Tryptophan zurück zuführen. Da das IL-8 Protein kein Tryptophan benötigt, kann ein Mangel nicht Ursache für die geringere Expression während der Persistenz und höhere Bildung des Zytokins nach Reaktivierung sein.

Im Gegensatz dazu enthalten die Proteine von IL-6 und IL-11 Tryptophan, doch war bei beiden Zytokinen während des gesamten Zeitraumes eine Sekretion messbar. Demnach muss noch genügend Tryptophan vorhanden gewesen sein, um den Ablauf der zellulären Stoffwechselwege sicherzustellen.

Auch scheinen die Chlamydien nach Reaktivierung die Interleukin-Freisetzung von IL-8 und IL-11 verhindern zu können. Dies könnte einen Schutzmechanismus gegen das Immunsystem darstellen bis der Entwicklungszyklus nach Reaktivierung komplett abgeschlossen ist. Aber auch hier könnte die Zahl der reaktivierten Chlamydien zu gering gewesen sein, um einen Anstieg der Interleukine zu messen.

Die Langzeit-Analyse verdeutlicht ein Problem: Die Reaktivierung ist ein stetiger Prozess, in dessen Verlauf sich die Bildung der infektiösen EK über mehrere Tage erstreckt. Es konnten zwar über 40% der persistierenden Chlamydien gegenüber der produktiven Infektion wieder reaktiviert werden, aber die Reaktivierung erstreckte sich dabei über 6 Tage. Die Anzahl der reaktivierten Chlamydien nach 3 Tagen Reaktivierung kann möglicherweise zu gering gewesen sein, um neben den persistierenden Chlamydien Einfluss auf die Genexpression der Wirtszelle zu nehmen. Hier wären Messungen auf Einzelzellebene nötig.

#### 5.1.2.2 DAM-abhängige Effekte

Der Eisenentzug durch DAM führte bei den meisten untersuchten Genen zu einer stetigen Expression. Allerdings ist dieses Muster nicht bei allen Genen beobachtet worden. Bei IL-11 unterschied sich der Sekretionsverlauf nicht gegenüber den anderen Modellen und bei IL-6 konnte keine Chlamydien-induzierte Freisetzung gemessen werden. Die ermittelte Daueraktivierung der Wirtszell-Genexpression lässt sich daher nicht allgemeingültig auf alle Gene übertragen.

Zur Reaktivierung wurden wie bei Al-Younes *et al.* 2-3 Tage verwendet [31]. Die Analyse der Wirtszell-Expression nach Reaktivierung verdeutlicht hier wesentliche Unterschiede zur persistierenden Infektion. Bei der Genexpression war bei allen untersuchten Genen nur noch eine geringe Expression zu messen, die ungefähr der Expression von mock-behandelten Zellen entsprach. Dementsprechend lagen die Chlamydien nach der Reaktivierung nicht mehr in der persistierenden Form vor, da das für das DAM Modell typische Expressionsmuster bei

den untersuchten Genen nicht mehr vorhanden war. Die verringerte Wirtszell-Genexpression könnte verschiedene Gründe haben. Zum einen könnten die Chlamydien früher als 3 Tage nach Reaktivierung freigesetzt worden sein. So wäre eine geringere Genexpression wie am Tag 4 bei der produktiven Infektion zu beobachten. Eine Überprüfung der infektiösen Chlamydien am ersten und zweiten Tag nach Reaktivierung könnte dies aufklären.

Zweitens könnten die Gene bei der Reaktivierung durch Eisen als Schutzmechanismus gegen die Immunabwehr temporär bis zum vollständigen Durchlaufen des Entwicklungszyklus „stumm geschaltet“ worden sein. Die Zugabe von Eisen kann jedoch nicht der Grund für die verringerte Wirtszell-Genexpression sein, da die schein-infizierten Zellen eine vergleichbare Genexpression bei Medium-, DAM- und Holotransferrin-behandelten Zellen gezeigt haben.

#### 5.1.2.3 Penicillin G-abhängige Effekte

Wie bei IFN- $\gamma$  wurden die untersuchten Gene während der Persistenz auch hier stumm geschaltet. Durch die geringe Anzahl reaktivierter Chlamydien ist eine Analyse der Wirtszell-Genexpression nur bedingt möglich, da die Beeinflussung der persistierenden Chlamydien auf die Wirtszelle überwiegt. Hier würden nur sehr starke Einflüsse von den reaktivierten Chlamydien gemessen werden können. Tatsächlich war aber nach der Reaktivierung bei Penicillin G keine veränderte Expression der Wirtszellgene im Vergleich zur persistierenden Infektion zu messen. Die reaktivierten Chlamydien beeinflussen zu diesem Zeitpunkt die Expression der untersuchten Gene noch nicht oder die Anzahl der reaktivierten Chlamydien ist zu gering, um eine veränderte Expression messen zu können. Bei infizierten wie auch mock-infizierten Zellen konnte am 7. Tag nach der Reaktivierung (11 Tage nach Infektion) eine deutliche Sekretion bei den Zytokinen IL-8, IL-6 und IL-11 im Vergleich zum 3. Tag nach Reaktivierung (Tag 7 nach Infektion) beobachtet werden. Demnach scheinen die Zellen durch das weitere Wachstum bereits stress-abhängig Interleukine frei zu setzen.

#### 5.1.3 Vitalität von Wirtszellen und Chlamydien

Der Tod der Zellen während der chlamydialen Persistenz kann in allen Modellen ausgeschlossen werden. Beim DAM Modell zeigten fast alle Gene eine erhöhte Genexpression der Wirtszellen, von der Vitalität der Zellen kann daher ausgegangen werden. Im Fall von IFN- $\gamma$  lässt sich während der Persistenz besonders bei IL-6 eine anhaltende Sekretion sowohl bei infizierten wie schein-infizierten Zellen feststellen. Aber auch bei den anderen Interleukinen weiterhin eine Freisetzung infizierten wie schein-infizierten Zellen gemessen werden. Auch bei Penicillin G werden die Interleukine von infizierten wie schein-infizierten Zellen bis zum 11. Tag nach Infektion stetig weiter sekretiert. Zusätzlich kann eine schwere Schädigung der Wirtszellen am Tag 4 wegen der nach späterer Reaktivierung gebildeten infektiösen Chlamydien ausgeschlossen werden, da zum Ablauf des chlamydialen Entwicklungszyklus vitale Zellen benötigt werden. Eine weitere Möglichkeit

zur Überprüfung der Zell-Vitalität wäre die Messung von wichtigen Signaltransduktionswegen, wie der NF- $\kappa$ B- oder p38-Weg, nach Stimulierung (beispielsweise durch Serum *response*).

Die Vitalität der Chlamydien im DAM Modell muss aufgrund der dauerhaften Genexpression der infizierten Zellen nicht überprüft werden. Bei der verringerten Genexpression im IFN- $\gamma$  und Penicillin G Modell jedoch könnten die Chlamydien theoretisch bereits tot gewesen sein. Bei IFN- $\gamma$  konnten jedoch in der Langzeit-Analyse über 40% Chlamydien wieder reaktiviert werden, womit bei IFN- $\gamma$  auch diese Möglichkeit auszuschließen ist.

Im Penicillin G Modell wurde nur nach 3 Tagen Reaktivierung die Anzahl an infektiösen *C. pneumoniae* bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt waren aber nur wenige Chlamydien bereits wieder infektiös. Möglicherweise sind die restlichen Chlamydien durch das Antibiotikum abgetötet worden. Die Reaktivierung für 3 Tage bei Antibiotika-induzierter Persistenz ist zu kurz. Die 3 Tage Reaktivierung wurde zum Vergleich der drei Modelle verwendet, da für das DAM Modell ein Reaktivierungszeitraum von 2-3 Tagen publiziert ist [31]. Im Gegensatz zu DAM müsste bei Penicillin G entsprechend des IFN- $\gamma$  Modells eine Langzeit-Analyse der Reaktivierung klären, ob sich im weiteren Verlauf noch Chlamydien reaktivieren lassen, um den Tod der Chlamydien sicher auszuschließen.

#### **5.1.4 Verwendung von primären Zellen und Wechsel in ein Mausmodell**

Wie sich in den Experimenten gezeigt hat, spielt die Art des Persistenzmodells eine wesentliche Rolle, wie die persistierenden Chlamydien die Wirtszelle beeinflussen. Auch veranschaulichen die Analysen der verschiedenen Modelle Schwierigkeiten bei den Untersuchungen der Persistenz *in vivo*. Das Ausbleiben der Genexpression kann entweder ein fehlender Einfluss der Chlamydien auf die Wirtszellen als Ursache haben oder entsprechend des IFN- $\gamma$  und Penicillin G Modells als Schutzmechanismus gegen die Immunabwehr von den Chlamydien „gewollt“ sein.

Die bis jetzt durchgeführten Arbeiten sind im Zellkulturmodell durchgeführt worden. Ein großer Vorteil der verwendeten HeLa-Zelllinie ist ihr funktioneller Defekt des Toll-like Rezeptor 4 Weges, wodurch die Zellen nicht LPS-responsibel sind. Diese Modelle wurden außerdem verwendet, um die Ergebnisse aus vorherigen Arbeiten mit den aktuellen, vorliegende Daten vergleichen zu können. Die Modelle dienen in erster Linie zur Ermittlung von Effekten in eukaryonten Wirtszellen, die nach Induktion von chlamydialer Persistenz auftreten können. Arbeiten mit Zellkulturmodellen sind einfacher zu handhaben. Zelllinien bieten den Vorteil, sehr gut reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. Außerdem kann die verwendete HeLa-Zelllinie gut infiziert werden, wodurch Chlamydien-induzierte Veränderungen gut gegenüber dem Hintergrund von mock-infizierten Zellen bestimmt werden können. Weiterhin kann zur Verbesserung der Mess-Sensitivität bei mRNA oder Zytokinen eine hohe Menge Chlamydien eingesetzt werden. Die gute Manipulierbarkeit bietet

die Möglichkeit, einzelne chlamydiale Proteine in den Zellen zu exprimieren und die Zellen auf Wirtszell-Antworten hin zu analysieren, wie sie nach Infektion gefunden worden sind.

Die Zellkultur erlaubt daher eine breite Auswahl an Analysemöglichkeiten nach chlamydialer Infektion im produktiven wie auch persistierenden Zustand. Die aus Zellkultur-Experimenten erworbenen Ergebnisse können zur Vorauswahl „interessanter“ Genexpressionen dienen. Diese können weiter bei Infektion von primären Zellen oder im Mausmodell verfolgt werden. Auswahlkriterien wären beispielsweise Bezug zu Krankheiten, Funktion in Zellen, aber auch praktische Gründe wie die Menge gebildeter mRNA bzw. Protein.

#### 5.1.4.1 Primäre Zellen

Für persistierende Toxoplasmen durch IFN- $\gamma$  in Enterozyten konnte gezeigt werden, dass der **Eisenentzug** zur Persistenz geführt hat [158]. In der epithelialen HeLa-Zelllinie ist die Eisenlimitierung bei IFN- $\gamma$  hingegen nicht wichtig, sondern es spielt vor allem der Tryptophan-Entzug eine wesentliche Rolle. Wie die vorliegende Arbeit demonstrieren konnte, kommt es entsprechend des entzogenen Nährstoffs (Eisen oder Tryptophan) zu unterschiedlichen Verhalten der persistierenden Chlamydien. Demnach spielt auch der infizierte Zelltyp eine wichtige Rolle bei der Entstehung der chlamydialen Persistenz und der chlamydial-veränderten Wirtszell-Genexpression. Außerdem enthält die verwendete Karzinom-Zelllinie lysogenes Papillomavirus [175]. Diese Veränderung der Zellen könnte bereits einen Einfluss auf die Chlamydien-induzierten Veränderungen der Wirtszell-Genexpression haben. Aus diesem Grund müssen primäre Zellen für weitere Untersuchungen der Persistenz aus Geweben verwendet werden, die einen Bezug zu (möglichen) chlamydial induzierten chronischen Erkrankungen haben.

Bei primären Zellen ist die Handhabung und Haltung deutlich schwieriger als bei Zelllinien. Vor allem ist die Antwort bei den primären Zellen häufig Spender-abhängig, weswegen Untersuchungen aus mehreren Spendern durchgeführt werden müssen. Hier würden sich für weitergehende Untersuchungen primäre Blutmonozyten als mögliche Zielzellen anbieten, die als „Shuttle“ der Chlamydien vom Eintrittsgewebe zum Gewebe der chronischen Infektion dienen. Oder Endothel- und glatte Muskelzellen, die bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen betroffen sind. Aber auch synoviale Fibroblasten müssen untersucht werden, bei denen während der reaktiven Arthritis persistierende Chlamydien nachgewiesen werden können. Die Untersuchung der Wirtszell-Genexpression bei Persistenz in diesen Zellen erlaubt eine erste Aussage, nach welchem Mechanismus chronische Erkrankungen durch die persistierenden Chlamydien erzeugt werden.

#### 5.1.4.2 Mausmodell

Ebenso sind *in vivo* Untersuchungen im Mausmodell zwingend notwendig. Hier sind aber aus verschiedenen Gründen Voruntersuchungen zur Analyse der Genexpression während der Persistenz anzustreben. Zum einen können die Mäuse nicht mit hohen Bakterienzahlen infiziert werden, um „100%“ der interessanten Zellen zu infizieren. Die infizierten Zellen müssen daher aufwendig selektiert werden oder bei Aufarbeitung aller Zellen ist mit einem Hintergrund der nicht-infizierten Zellen zu rechnen. Durch die geringe Anzahl an infizierten Zellen erhält man keine so hohe mRNA-Ausbeute und ist deshalb bei der Analyse der Gene in der Anzahl begrenzt. Daher muss eine Vorauswahl an Genen getroffen werden. Schwankungen der Ergebnisse wie bei den primären Zellen erfordern Studien mit vielen Tieren.

#### **Zusammenfassung der chlamydialen Persistenz:**

Es konnten für *C. trachomatis* D mit niedriger und für *C. pneumoniae* mit hoher MOI die drei wichtigsten Persistenzmodelle aufgebaut werden. Hierbei gab es Unterschiede in den zu wählenden Bedingungen für die beiden Spezies. Die drei Persistenzmodelle konnten nach Analyse der Wirtszell-Genexpression bei *C. pneumoniae* Persistenz beide Hypothesen, die der Daueraktivierung oder der Stummschaltung bestätigen. Es hat sich in den drei Modellen jeweils ein charakteristisches Expressionsmuster herausgestellt. Dieses unterschiedliche Verhalten in den drei Modellen deutet auf verschiedene *in vivo* Situationen hin, die von pathophysiologischer Bedeutung bei chronischen Infektionen sein könnten. Um herauszuarbeiten, welche Modelle und Reaktionen am ehesten *in vivo* eine Rolle spielen sollten Untersuchungen in entsprechenden primären Zellen und im Mausmodell angeschlossen werden.

## **5.2 Salmonella-Wirtszell Interaktion**

*S. typhimurium* ist ein fakultativ intrazellulärer Erreger, der überwiegend Infektionen im Gastrointestinaltrakt verursacht. Um die Interaktion mit Wirtszellen untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Salmonellen-Infektionsprotokoll an das bestehende Infektionsmodell in HeLa-Zellen angepasst. Dadurch ist ein Vergleich zwischen Salmonellen- und Chlamydien-induzierten Veränderungen der Genregulation in den Wirtszellen möglich. Dieser erlaubte eine Unterscheidung zwischen veränderten Genregulationen, die allgemein von intrazellulären Erregern oder relativ spezifisch durch Chlamydien hervorgerufen werden. Letztere könnten Hinweise auf eine Beteiligung der Chlamydien an Erkrankungen liefern und der Aufklärung des Pathomechanismus dienen. Außerdem sollte die Genexpression nach Infektion mit *Knock-Out* Mutanten der TypIII-Sekretionsapparate im Vergleich zum *Salmonella* Wildtyp im Micro-Array untersucht

werden. Ziel war die Identifikation von verändert regulierten Genen, bei denen die Regulation von einem der beiden TypIII-Sekretionsapparate abhängt.

### 5.2.1 Aufbau des Salmonellen-Infektionsmodells

Zur späteren Vergleichbarkeit der Wirtszell-Genexpression von Salmonellen und Chlamydien war ein Anpassen des Salmonellen Infektionsprotokolls an das Chlamydien Infektionsmodell notwendig. Zur Untersuchung von Salmonellen-induzierten Veränderungen wären Monozyten aufgrund ihres Bezugs zur *in vivo* Situation besser geeignet gewesen. Jedoch hat die Messung der IL-8 Sekretion bereits einen starken Einfluss über *pattern recognition* Signalwegen durch Oberflächenmoleküle gezeigt. Auch konnte Rosenberger *et al.* die veränderte Expression der meisten durch Salmonellen induzierten Gene bei Makrophagen auf den Einfluss von LPS zurückführen [176]. Da die HeLa-Zelllinie nicht auf LPS reagiert, eignet sie sich hervorragend zur Untersuchung der durch Salmonellen über den TypIII-Sekretionsapparat (durch Effektorproteine) ausgelösten Veränderungen.

#### 5.2.1.1 Quantifizierung der infektiösen Salmonellen

Die Quantifizierung der infektiösen Salmonellen war schwierig, da *S. typhimurium* vor jeder Infektion frisch angezogen und aufgearbeitet werden mussten. Für Salmonellen ist es nicht möglich, wie bei den Chlamydien im Vorfeld Stöcke herzustellen und einzufrieren. Für die Infektiösität der Salmonellen ist die Expression des TypIII-Sekretionsapparat auf SPI1 wichtig. Da diese vom pH-Wert und O<sub>2</sub>-Gehalt des Anzuchtmediums abhängt [151], ist die Expression des TypIII-Apparates nach dem Einfrieren zu gering für hohe Infektionsraten. Auch können Schwankungen der Medium-Bedingungen zu einer veränderten Expression des TypIII-Apparates und zu unterschiedlicher Infektiösität führen. Dadurch ergaben sich Schwankungen aufgrund der Anzucht-Bedingungen. Der Vergleich von einer ausplattierten **und** photometrisch gemessenen Salmonellen-Suspension erlaubte die Quantifizierung vitaler Salmonellen durch photometrische Bestimmung nach jeder Aufarbeitung die genaue Anzahl der infektiösen Salmonellen in den Experimenten wurde durch Zellyse nach der Infektion bestimmt, indem die intrazellulären Salmonellen nach Ausplattieren am nächsten Tag ausgezählt wurden. Sowohl die Schwankungen der eingesetzten Salmonellen als auch der Infektionsrate betragen dabei in den Experimenten nur 10-20 %.

#### 5.2.1.2 Infektiösitäts-Unterschiede bei TypIII-Sekretionsapparat Mutanten

Bei den Salmonellen spiegelt sich die Notwendigkeit des TypIII-Apparats auf SPI1 auch in der geringen Infektiösität wieder. Hier hätten erst sehr hohe Bakterienmengen höhere Infektionsraten ergeben können. Doch führen diese Mengen schon bei UV-inaktivierten Salmonellen zu einer Zellantwort bei HeLa-Zellen. Durch die Verhinderung der Aufnahme

des Wildtyps durch Zytoskelett-Inhibitoren hätten Wildtyp und SPI1-Mutante extrazellulär untersucht werden können, jedoch ist die Induktion der Zytoskelett-Reorganisation durch die TypIII-Effektorproteine beim Wildtyp sehr stark. Es hätten nur sehr hohe Konzentrationen an Inhibitor zu einer geringen Aufnahme geführt. Die hohen Inhibitor-Konzentrationen hätten selbst die Zellen beeinflusst und im ungünstigsten Fall den Zelltod induziert.

Die SPI2-Mutante des TypIII-Sekretionsapparates zeigte ein deutlich langsames intrazelluläres Wachstum. Demnach scheinen diese TypIII-Effektorproteine für das intrazelluläre Wachstum oder Überleben benötigt zu werden. Untersuchungen bei Maus-Makrophagen und humanen Epithelial-Zellen [177;178] bestätigen diese Beobachtungen. Für vergleichende Analysen der SPI2-Mutante und dem Wildtyp haben sich daher nur frühe Zeitpunkte bis 4 h angeboten. Nur bis zu diesem Zeitpunkt lag eine annähernd gleiche Anzahl intrazellulärer Erreger vor. Bei Messungen zu späteren Zeitpunkten hätte bereits die unterschiedliche Menge an intrazellulären Salmonellen der Grund für Unterschiede in der Genregulation der Wirtszellen sein können. Da die unterschiedlichen Anforderungen nur schwer zu vereinen waren, mussten daher Abstriche bei den Versuchen gemacht und die Analysen zu dem frühen Zeitpunkt durchgeführt werden.

### ***5.2.2 DNA-Micro-Array Analyse zur Identifikation von TypIII-Apparat-abhängigen Veränderungen der Wirtszell-Genexpression***

Der Einfluss von Effektorproteinen des TypIII-Sekretionsweges wurde bisher nur durch Überprüfung **einzelner** Veränderungen bei *Knock-Out* Mutanten von Effektorproteinen untersucht. Allerdings ist nicht bekannt, welche Veränderungen der Wirtszelle überhaupt vom TypIII-Sekretionsapparat abhängig sind. Durch Micro-Arrays ist eine breite Analyse der Wirtszell-Genexpression möglich. Der Vergleich der Genexpression von Wildtyp und TypIII-Apparat Mutanten bietet die Möglichkeit, eine Reihe von regulierten Genen zu identifizieren, deren Expression vom TypIII-Apparat abhängig ist. Diese verändert regulierten Gene hätten im Anschluss wieder mit *Knock-Out* Mutanten einzelner Effektorproteine untersucht werden können. Die Wahl der möglichen Effektorproteine wird durch Homologien zu eukaryonten Proteinen oder zu Effektorproteinen mit bekannter Wirkung erleichtert. Die Schwierigkeit bei Salmonellen liegt allerdings an den **zwei** vorhandenen TypIII-Sekretionsapparaten, die zu verschiedenen Zeitpunkten exprimiert werden und unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Der TypIII-Apparat auf SPI1 ist für die Invasion wichtig, da die Zytoskelett beeinflussenden Effektorproteine über ihn in das Zytosol der Wirtszelle gelangen [179;180]. Die SPI1-Mutante ist daher, wie zu erwarten, nur wenig infektiös. Die Menge an infizierten Zellen (etwa 40%) ist zu gering für Array-Analysen. Das Hintergrund Signal von gebildeter mRNA durch die nicht-infizierten Zellen wäre zu hoch und höhere Bakterienzahlen führten bereits bei toten Salmonellen zu Zellreaktionen.

Bei den Micro-Array Analysen von Wildtyp und SPI2-Mutante infizierten Zellen waren nach 4 h bei beiden Infektionen verändert regulierte Gene gegenüber schein-infizierten Zellen zu finden. Hierbei zeigten sich Unterschiede in der Anzahl verändert regulierter Wirtszell-Gene zwischen Wildtyp und SPI2-Mutante infizierten Zellen. Keines der regulierten Gene war allerdings nach Auswertung mit der Affymetrix-Software und im Vergleich zu den durch vitale Salmonellen induzierten Veränderungen vom TypIII-Sekretionsapparat abhängig. Nur die Genregulation von IL-6 wurde sowohl durch den Wildtyp wie auch durch die Mutante induziert. Beim Wildtyp lässt sich dieses Ergebnis auch nach 4 h in der *Real-Time* RT-PCR reproduzieren.

Außerdem wurden die Wirtszellen auch durch UV-inaktivierte Salmonellen stark beeinflusst. Demnach scheinen HeLa-Zellen bei nicht voll funktionsfähigem Toll-like Rezeptor 2 bzw. 4 über andere Mechanismen durch UV-inaktivierte Salmonellen stimuliert zu werden.

Zwar wurde bei IL-6 und IL-8 kein Einfluss von UV-inaktivierten Salmonellen auf HeLa-Zellen gefunden und keine veränderte Genexpression nach Behandlung beobachtet. Doch könnten bei anderen Genen die TLR 2 und 4 unabhängigen Mechanismen eine Rolle spielen und eine Veränderung der Wirtszell-Genexpression auch durch tote Salmonellen stattfinden. Diese Mechanismen könnte der Grund für die wenigen ermittelten „aktiv“ durch vitale Salmonellen verändert regulierten Gene sein.

Ein anderer Grund könnte der geringe Einfluss der Salmonellen 4 h nach Infektion oder eine zu schwache Veränderung der Wirtszell-Genexpression sein. Eine weitere publizierte Array-Analyse von Eckmann *et al.* mit *S. dublin* wurde ebenfalls zu einem frühen Zeitpunkt nach 3 h p.i. durchgeführt und zeigte eine deutliche Anzahl regulierter Gene in infizierten Epithel-Zellen [181]. Erstaunlicherweise wurde in den beiden in der Publikation verwendeten Arrays (GF211 von Research Genetics und Atlas cDNA Cytokine/Receptor Array, Clontech) für IL-6 keine Salmonellen-induzierte Wirtszell-Genexpression gemessen. Diese wurde in Übereinstimmung mit Weinstein *et al.* [182;183] sowohl im Array bei WT und SPI2-Mutante infizierten HeLa-Zellen als auch in *Real-Time* RT-PCR Messungen reguliert vorgefunden.

Von den 30 in dieser Publikation erwähnten regulierten Genen sind 27 Gene ebenfalls auf dem in der Arbeit verwendeten U95A-Array vorhanden. Keines der 27 Gene wurde allerdings übereinstimmend im Array vorgefunden. Nur IL-8 und Mip-2 $\alpha$  lagen bei Eckmann *et al.* [181] und in *Real-Time* RT-PCR reguliert vor. Eine Überprüfung mit dem U95A-Array ist nicht möglich, da IL-8 nicht auf dem Chip vorhanden ist. Mip-2 $\alpha$  wurde im Gegensatz zu den publizierten Array-Ergebnissen von Eckmann *et al.* in den *Real-Time* RT-PCR Messungen erst spät reguliert.

Allerdings wurde nicht die Wirkung von UV-inaktivierten Salmonellen auf die epithelialen Zellen in der Veröffentlichung betrachtet. Von Mip-2 $\alpha$  ist eine LPS-abhängige mRNA-Bildung in Epithelial-Zellen nach 2 h Stimulus mit LPS bereits gezeigt worden [184]. Daher könnten viele der exprimierten Gene auch durch die inaktivierten Salmonellen

verändert reguliert werden. Die von uns verwendeten HeLa-Zellen hingegen haben nicht auf UV-inaktivierte Salmonellen in der verwendeten MOI reagiert.

### 5.2.3 *Optimierungsmöglichkeiten der Micro-Array Analyse*

Allein zu frühen Zeitpunkten war eine vergleichbare Anzahl intrazellulärer Salmonellen vorhanden. Die Wirtszell-Genexpression am Beispiel von IL-6 wird allerdings nur wenig durch die SPI2-Mutante zu diesem Zeitpunkt induziert. Zu späteren Zeitpunkten (>20 h) ist die Genexpression stärker, aber hier sind die Unterschiede in der Expression möglicherweise schon auf die unterschiedliche Anzahl intrazellulärer Salmonellen zurückzuführen. Eine mögliche Lösung wäre statt des Wildtyps eine Stoffwechsel-Mutante zu verwenden, die ein ähnliches Wachstum wie die SPI2-Mutante besitzt. Ob sich diese Mutation nicht bereits auch auf das Bakterium und den TypIII-Sekretionsapparat auswirkt, ist nicht bekannt.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Infektion mit sehr hohen MOI, wie sie bei Chlamydien durchgeführt worden ist. Der prozentuale Unterschied der intrazellulären Bakterien wäre vernachlässigbar und durch die größere Menge an Bakterien würde man eine stärkere Wirtszell-Genexpression auch messen können. Bei Salmonellen sind aber Grenzen bei der MOI gesetzt, da die HeLa-Zellen bei hohen Bakterienzahlen um MOI 400 bis 5 h nach Infektion auch bei UV-inaktivierten Bakterien antworten. Spätere Zeitpunkte (>5 h nach Infektion) wurden allerdings nicht betrachtet und müssten überprüft werden. Ebenso unbekannt ist das Wachstumsverhalten der intrazellulären Erreger, wenn mit einer hohen Bakterienzahl infiziert wird.

### 5.2.4 *Darstellungsmöglichkeiten der veränderten Wirtszell-Genexpression*

Ergebnisse der veränderten Genexpression werden meist in Form der errechneten Genregulationsfaktoren dargestellt. Sie resultieren aus dem Verhältnis der Expression von infizierten zu schein- bzw. nicht-infizierten Zellen. Bei den vorliegenden Ergebnissen der *Real-Time* RT-PCR verringert sich der Regulationsfaktor zum Zeitpunkt 48 h. Intrazelluläre Salmonellen und Chlamydien scheinen eine geringere vermehrte Expression zu späten Zeitpunkten als zu frühen Zeitpunkten nach Infektion zu induzieren. Bei Betrachtung der gebildeten mRNA (hier nur im Falle von Salmonellen in Abbildung 4.22 und Abbildung 4.23) ist eine stärkere Expression der infizierten gegenüber den schein-infizierten Zellen messbar. Der geringe Regulationsfaktor ist auf die erhöhte Expression der schein-infizierten Zellen zurückzuführen.

Entweder ist die Beeinflussung der Erreger auf ihre Wirtszellen wirklich schwächer, in den infizierten Zellen ist aufgrund der Stabilität von mRNA die maximal nachweisbare Menge an mRNA erreicht oder aber die schein-infizierten Zellen werden allein durch die Kultur stimuliert. Aus diesem Grund kann bei kleinen Regulationsfaktoren nicht direkt auf eine geringere Regulation geschlossen werden. Die vitalen Erreger können auch weiterhin die

Wirtszell-Genexpression induzieren. Die Betrachtung der mRNA-Werte kann selbst bei einem geringen Regulationsfaktor den Verlauf der Wirtszell-Genexpression erlauben und die Erstellung von Expressionsprofilen ermöglichen.

### 5.2.5 Vergleich der Wirtszell-Genexpression bei Chlamydien und Salmonellen

Zur Untersuchung von Pathomechanismen ist es wichtig zu klären, welche Veränderungen in den Wirtszellen von Erregern spezifisch ausgelöst werden. Diese spezifisch-regulierten Gene könnten die Ursache für verschiedene Krankheitsbilder nach Infektion darstellen. Im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation von S. Heß wurden breite Analysen der Wirtszell-Genexpression mittels Micro-Array während der produktiven Infektion in HeLa-Zellen durchgeführt. Die veränderte Expression einer Auswahl von Wirtszell-Genen konnte in der *Real-Time* RT-PCR bestätigt werden. Allerdings konnte dadurch nicht bewiesen werden, dass die gemessenen Veränderungen der Genregulation nur auf die obligat intrazellulären Chlamydien beschränkt sind. Salmonellen sind fakultativ intrazelluläre Erreger, die phylogenetisch weit entfernt von den Chlamydien stehen. Allgemeine Effekte bei der Genexpression sollten sowohl bei Chlamydien- wie auch Salmonellen-infizierten Zellen zu finden sein. Tabelle 5.1 zeigt zusammenfassend das Regulationsprofil der Genexpression von Chlamydien- und Salmonellen-infizierten Zellen.

	4 h p.i.				24 h p.i.				48 h p.i.			
	C. tr L2	C. tr D	C. pn	S. tm	C. tr L2	C. tr D	C. pn	S. tm	C. tr L2	C. tr D	C. pn	S. tm
CTGF	0	+	+	0	++	+++	++	0	+	+	0	+
EPHA2	(+)	+	+	0	++	+++	+	0	++	+	0	0
EGR1	+	+	(+)	0	+++	++++	+++	+	+	0	0	0
ETV4	0	+	+	0	+++	+++	++	+	(+)	++	+	+
IER3	(+)	+	+	0	+++	+++	+	+	+++	(+)	(+)	(+)
LIF	0	+	+	0	++	+++	++	0	+	(+)	0	+
MCL1	0	+	0	0*	(+)	+	0	0*	+	+	(+)	0*
NR4A2	0	(+)	0	0	++	++	(+)	0	+	(+)	0	0
Mip-2 $\alpha$	(+)	++	+	(+)	++	+++	(+)	(+)	+++	+	0	+++
IL-6	(+)	(+)	(+)	++	++	++	(+)	+++++	++	0	0	++++
IL-8	++	+++	+++	++	+++++	+++++	++	++++	+++	++	+	++

**Tabelle 5.1 Vergleich der Wirtszell-Regulation nach Chlamydien und Salmonellen Infektion**

Die Tabelle zeigt die semiquantitative Darstellung der Genexpression von HeLa-Zellen nach Infektion mit *C. trachomatis* L2 (C.trL2), *C. trachomatis* D (C.trD), *C. pneumoniae* (C.pn) und *S. typhimurium* wt (S.tm). Analysiert wurden die Zeitpunkte 4h, 24h und 48h nach Infektion. Die Faktoren ergeben sich aus Doppelwerten von drei (\*zwei) unabhängigen Messungen mit 0 keine Regulation, (+) Faktor 2-3, + Faktor 3-5, ++ Faktor 5-10, +++ Faktor 10-30, ++++ Faktor 30-100 und +++++ Faktor >100 Die Daten für die Chlamydien wurden freundlicherweise von S. Heß zur Verfügung gestellt [106].

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, weisen die Salmonellen-infizierten Zellen ein völlig anderes Expressionsverhalten auf als die Chlamydien-infizierten Zellen. Einzig IL-6 und IL-8 zeigen zu den untersuchten Zeitpunkten eine deutliche Veränderung der Genexpression bei infizierten Zellen. Auch Mip-2 $\alpha$  wird zu 48 h nach Infektion erhöht exprimiert. Die teilweise sehr starke Regulation dieser Zytokine schließt eine schlechte Infektion aus. Demnach muss

es sich bei IL-6, IL-8 und Mip-2 $\alpha$  um eine allgemein ausgelöste Antwort durch beide intrazellulären Erreger handeln.

Eine weitere Gemeinsamkeit von Chlamydien und Salmonellen ist die stärker vermehrte Wirtszell-Genexpression von 4 h zu 24 h nach Infektion. Diese ist möglicherweise partiell auf die durch Vermehrung erhöhte Anzahl intrazellulärer Erreger zurückzuführen.

Von allen drei Genen wurde bereits in anderen Publikationen eine Salmonellen-induzierte Veränderung der Genregulation gezeigt [181-183]. Im Gegensatz zu Eckmann *et al.* konnte in der vorliegenden Arbeit die Abhängigkeit von **vitalen** Salmonellen bei der Expression von IL-8 und Mip-2 $\alpha$  bewiesen werden. Alle drei Zytokine beeinflussen die Immunabwehr (<http://www.copewithcytokines.de>). Insbesondere IL-8 hat starken Einfluss auf polymorphkernige Leukozyten (PMN), wie beispielsweise Monozyten/Makrophagen, und führt bei Infektion von epithelialen Zellen mit Salmonellen zum Anlocken und transepithelialer Migration der PMN [185].

Eine Reihe anderer gramnegativer Bakterien führt ebenfalls zur Expression von IL-6 und IL-8 (siehe Tabelle 5.2)

Zytokin	Bakterienspezies	Epitheliale Zellen	Literatur
IL-6	<i>P. aeruginosa</i>	CF15 (nasale, cystische fibrose Zelllinie)	[186]
	<i>E. coli</i>	J82 (epitheliale Blasen Zelllinie)	
	<i>S. typhi</i> , <i>S. dublin</i>	murine kleine IEC ( <i>intestinale epithelial cells</i> , Maus)	[182;183]
	<i>L. monocytogenes</i> ; <i>Y. Enterocolitica</i> ; <i>E. coli</i>	Hep2 (laryngiale epitheliale Zelllinie)	[187]
IL-8	<i>P. aeruginosa</i>	CF15 (Zelllinie)	[186]
	<i>E. coli</i>	J82 (epitheliale Blasen Zelllinie)	
	<i>H. pylori</i>	AGS, Kato III, MKN28 (gastrointestinale Krebs- Zelllinien)	[188]
	<i>B. pseudomallei</i>	A549 (Lungenepithel Zelllinie)	[189]

**Tabelle 5.2 Auswahl publizierter Ergebnisse zur Expression von IL-6 und IL-8 durch andere gramnegative Bakterien**

Wie bei Elewaut *et al.* beschrieben ist, stellt die schnelle Freisetzung (2-3 h nach Infektion) von inflammatorisch wichtigen Zytokinen bei einer Reihe von enteroinvasiven Bakterien eine generelle Antwort von intestinalen, epithelialen Zellen dar [190]. Die Aktivierung vom Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B als zentralem Regulator spielt bei der Expression der Zytokine eine wichtige Rolle [190].

Eine weitere Möglichkeit zur Identifikation Chlamydien-spezifischer Regulationsvorgänge wäre eine vergleichende Analyse mit anderen, ebenfalls obligat intrazellulären Erregern (z. B. Rickettsien). Diese wären phylogenetisch näher an den Chlamydien und sind auch von ihren Wirtszellen abhängig.

### **Zusammenfassung Salmonellen-Wirtszell Interaktion:**

Durch die Optimierung des Salmonellen-Infektionsprotokolls ist eine vergleichende Analyse der Chlamydien- und Salmonellen-induzierten Wirtszell-Genexpression möglich. Beim Vergleich wurde eine Reihe von spezifisch durch obligat intrazelluläre Chlamydien verändert regulierten Wirtszell-Genen ermittelt. Nur die Zytokine IL-6, IL-8 und zu späten Zeitpunkten Mip-2 $\alpha$  werden auch durch die fakultativ intrazellulären Salmonellen vermehrt exprimiert.

Diese Mediatoren, die für die Immunreaktion wichtig sind, scheinen daher eine allgemeine Reaktion der Wirtszelle auf intrazelluläre Chlamydien und Salmonellen darzustellen. Ein Vergleich mit einer anderen obligat intrazellulären Bakterien-Spezies würde die spezifisch durch Chlamydien induziert exprimierten Gene weiter einengen.

Bei der Micro-Array Analyse zur Identifikation TypIII-Sekretionsapparat abhängiger Regulationsvorgänge 4 h p.i. wurde nur eine geringe Anzahl von Wirtszell-Genen durch vitale Salmonellen reguliert. Dabei konnte im Array wie auch in der *Real-Time* RT-PCR reproduzierbar IL-6 nach 4 h p.i. nachgewiesen werden. Zur Optimierung der Micro-Array Analyse könnte eine Stoffwechsel-Mutante mit gleichem Wachstumsverhalten wie die SPI2-Mutante zu späten Zeitpunkten eingesetzt werden, um die Genexpression zu späteren Zeitpunkten untersuchen zu können.

## **5.3 CT166**

Ziel dieses Teilprojektes war die Expression des chlamydialen putativen Toxins CT166 aus *C. trachomatis* D. Die Expression sollte in der genetisch gut manipulierbaren und gut infizierbaren epithelialen Zelllinie HeLa T stattfinden. Dies erlaubt die Analyse der Zytoskelett-Änderung sowohl nach Infektion mit *C. trachomatis* D und L2, wie auch nach Expression von CT166 nach transienter Transfektion. Im Rahmen von Diplomarbeiten und einer anderen Dissertation wurden bereits erfolgreich andere chlamydiale Proteine in HeLa-Zellen exprimiert.

### **5.3.1 Einfluss von CT166 auf eukaryote Zellen**

Bei CT166 ist ein Protein-Motiv für eine Glykosyltransferase vorhanden. Dieses enthält außerdem ein DXD-Motiv zur Bindung von Glukose-Derivaten. Der Homologievergleich von CT166 mit anderen bakteriellen Proteinen zeigte eine Reihe von homologen Toxinen und Adhärenzfaktoren, die alle das Motiv für die Glykosyltransferase besitzen (Tabelle 4.11). Die Glykosyltransferase-Aktivität ist beispielsweise auch bei Toxin A und B von *C. difficile* vorhanden. Die Toxine übertragen ein Glukose-Derivat auf kleine Rho-GTPasen und aktivieren diese, wodurch eine Zytoskelett-Umorientierung induziert wird [163].

Morphologisch ähnliche Zytoskelett-Änderungen wurden bis 4 h nach Infektion mit *C. trachomatis* D, nicht aber bei Serovar L2 beobachtet [119]. Hierbei konnte CT166 durch

Antikörper bis zu 30 min nach Infektion in den Lysaten *C. trachomatis* D infizierter Zellen nachgewiesen werden [119].

Durch die Überexpression von CT166 in eukaryonten Zellen ist die Möglichkeit gegeben, die Zytoskelett-Veränderungen zu beobachten und die Lysate der Zellen auf Glykosyltransferase-Aktivität zu untersuchen. Auch könnten die Zellen nach der Expression auf mögliche weitere Effekte, wie Aktivierung von Signalwegen, Genexpression, Zytokin-Freisetzung, usw. analysiert werden.

CT166 wurde zuerst als GFP-Fusionsprotein hergestellt, da nicht bekannt ist, ob es in eukaryonten Zellen exprimiert werden kann. Allerdings könnte das Ausbleiben der Fluoreszenz zu 24 h, 48 h und 72 h auch auf Fehlfaltung des GFP-Proteins oder die Betrachtung zu einem falschen Zeitpunkt hindeuten. Die Fehlfaltung ist im Anschluss durch die Verwendung eines IRES Vektors ausgeschlossen worden, da hier Zielprotein und GFP unabhängig voneinander exprimiert werden. Die Beobachtung vom Abrunden der Zellen zu sehr frühen Zeitpunkten (ab 12 h nach Infektion) deutet auf eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen durch Überexpression von CT166 hin. Wie in den Experimenten mit Toxin B gezeigt worden ist, reichen bei bakteriellen Toxinen vielfach bereits geringe Mengen des Giftes aus, um ihre zellschädliche Wirkung zu entfalten. Je nachdem wo sie in die Signaltransduktion eingreifen kann es sehr schnell zu Veränderungen der Zelleigenschaften kommen.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte noch nicht hinreichend geklärt werden, ob diese Zytoskelett-Veränderungen auf eine Glykosyltransferase-Aktivität von CT166 (ähnlich *C. difficile* Toxin B) zurückgeführt werden können. Der Ansatz wird in der Arbeitsgruppe weiter verfolgt.

## Literatur

- [1] Halberstaedter,L. & Prowazek,S.v. Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. Arb.GesundhAmt 26, 44-47. 1907.
- [2] Storz,J. & Page,L.A. (1971) Taxonomy of Chlamydiae: Reasons for classifying organisms of the genus Chlamydia, family Chlamydiaceae, in a separate order. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **21**, 332-334.
- [3] Schachter,J. & Dawson,C.R. (1973) *Human chlamydial infections*. PSG Publishing Company:Littleton/Mass..
- [4] Everett,K.D., Bush,R.M., & Andersen,A.A. (1999) Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49 Pt 2**, 415-440.
- [5] Rurangirwa,F.R., Dilbeck,P.M., Crawford,T.B., McGuire,T.C., & McElwain,T.F. (1999) 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.
- [6] Stephens,R.S., Tam,M.R., Kuo,C.C., & Nowinski,R.C. (1982) Monoclonal antibodies to Chlamydia trachomatis: antibody specificities and antigen characterization. *J. Immunol.*, **128**, 1083-1089.
- [7] Hatch,T.P. (1999) Developmental Biology. In *Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity* (Stephens,R.S., ed), pp. 29-68. ASM Press, Washington D.C., USA.
- [8] Hackstadt,T. (1999) Cell Biology. In *Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity* (Stephens,R.S., ed), pp. 101-138. ASM Press, Washington D.C, USA.
- [9] Farencena,A., Comanducci,M., Donati,M., Ratti,G., & Cevenini,R. (1997) Characterization of a new isolate of Chlamydia trachomatis which lacks the common plasmid and has properties of biovar trachoma. *Infect. Immun.*, **65**, 2965-2969.
- [10] Kalman,S., Mitchell,W., Marathe,R., Lammel,C., Fan,J., Hyman,R.W., Olinger,L., Grimwood,J., Davis,R.W., & Stephens,R.S. (1999) Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis. *Nat. Genet.*, **21**, 385-389.
- [11] Gsell,O., Krech,U., & Mohr,W. (1986) *Klinische Virologie*. Urban&Schwarzenberg, München/Wien/Baltimore.
- [12] Ward,M.E. (1983) Chlamydial classification, development and structure. *Br. Med. Bull.*, **39**, 109-115.

- [13] Moulder, J.W. (1991) Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol. Rev.*, **55**, 143-190.
- [14] Reynolds, D.J. & Pearce, J.H. (1991) Endocytic mechanisms utilized by chlamydiae and their influence on induction of productive infection. *Infect. Immun.*, **59**, 3033-3039.
- [15] Zhang, J.P. & Stephens, R.S. (1992) Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell*, **69**, 861-869.
- [16] Scidmore, M.A., Rockey, D.D., Fischer, E.R., Heinzen, R.A., & Hackstadt, T. (1996) Vesicular interactions of the *Chlamydia trachomatis* inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry. *Infect. Immun.*, **64**, 5366-5372.
- [17] Belland, R.J., Ouellette, S.P., Gieffers, J., & Byrne, G.I. (2004) *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Cell Microbiol.*, **6**, 117-127.
- [18] Hatch, T.P., Al Hossainy, E., & Silverman, J.A. (1982) Adenine nucleotide and lysine transport in *Chlamydia psittaci*. *J. Bacteriol.*, **150**, 662-670.
- [19] Perara, E., Yen, T.S., & Ganem, D. (1990) Growth of *Chlamydia trachomatis* in enucleated cells. *Infect. Immun.*, **58**, 3816-3818.
- [20] Rockey, D.D., Heinzen, R.A., & Hackstadt, T. (1995) Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Mol. Microbiol.*, **15**, 617-626.
- [21] Taraska, T., Ward, D.M., Ajioka, R.S., Wyrick, P.B., Davis-Kaplan, S.R., Davis, C.H., & Kaplan, J. (1996) The late chlamydial inclusion membrane is not derived from the endocytic pathway and is relatively deficient in host proteins. *Infect. Immun.*, **64**, 3713-3727.
- [22] Beatty, W.L., Morrison, R.P., & Byrne, G.I. (1994) Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol. Rev.*, **58**, 686-699.
- [23] Hogan, R.J., Mathews, S.A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J.T., & Timms, P. (2004) Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect. Immun.*, **72**, 1843-1855.
- [24] Darville, T. (2000) *Chlamydia* spp. In *Persistent bacterial infections* (Nataro, J.P., Blaser, M.J., & Cunningham-Rundles, S., eds), pp. 229-261. ASM Press, Washington, D.C.
- [25] Moulder, J.W., Levy, N.J., & Schulman, L.P. (1980) Persistent infection of mouse fibroblasts (L cells) with *Chlamydia psittaci*: evidence for a cryptic chlamydial form. *Infect. Immun.*, **30**, 874-883.
- [26] Laitinen, K., Laurila, A.L., Leinonen, M., & Saikku, P. (1996) Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* infection in mice by cortisone treatment. *Infect. Immun.*, **64**, 1488-1490.

- [27] Malinverni,R., Kuo,C.C., Campbell,L.A., & Grayston,J.T. (1995) Reactivation of Chlamydia pneumoniae lung infection in mice by cortisone. *J. Infect. Dis.*, **172**, 593-594.
- [28] Beatty,W.L., Belanger,T.A., Desai,A.A., Morrison,R.P., & Byrne,G.I. (1994) Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect. Immun.*, **62**, 3705-3711.
- [29] Matsumoto,A. & Manire,G.P. (1970) Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of Chlamydia psittaci. *J. Bacteriol.*, **101**, 278-285.
- [30] Coles,A.M., Reynolds,D.J., Harper,A., Devitt,A., & Pearce,J.H. (1993) Low-nutrient induction of abnormal chlamydial development: a novel component of chlamydial pathogenesis? *FEMS Microbiol. Lett.*, **106**, 193-200.
- [31] Al Younes,H.M., Rudel,T., Brinkmann,V., Szczepek,A.J., & Meyer,T.F. (2001) Low iron availability modulates the course of Chlamydia pneumoniae infection. *Cell Microbiol.*, **3**, 427-437.
- [32] Freidank,H.M., Billing,H., & Wiedmann-Al-Ahmad,M. (2001) Influence of iron restriction on Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis. *J. Med. Microbiol.*, **50**, 223-227.
- [33] Raulston,J.E. (1997) Response of Chlamydia trachomatis serovar E to iron restriction in vitro and evidence for iron-regulated chlamydial proteins. *Infect. Immun.*, **65**, 4539-4547.
- [34] Heuer,D., Brinkmann,V., Meyer,T.F., & Szczepek,A.J. (2003) Expression and translocation of chlamydial protease during acute and persistent infection of the epithelial HEp-2 cells with Chlamydia pneumoniae. *Cell Microbiol.*, **5**, 315-322.
- [35] Kelder,M.E., Kaul,A., Nowicki,B., Findley,W.E., Hutchens,T.W., & Nagamani,M. (1996) Estrogen regulation of lactoferrin expression in human endometrium. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **36**, 243-247.
- [36] Harper,A., Pogson,C.I., Jones,M.L., & Pearce,J.H. (2000) Chlamydial development is adversely affected by minor changes in amino acid supply, blood plasma amino acid levels, and glucose deprivation. *Infect. Immun.*, **68**, 1457-1464.
- [37] Jones,M.L., Gaston,J.S., & Pearce,J.H. (2001) Induction of abnormal Chlamydia trachomatis by exposure to interferon-gamma or amino acid deprivation and comparative antigenic analysis. *Microb. Pathog.*, **30**, 299-309.
- [38] Fehlner-Gardiner,C., Roshick,C., Carlson,J.H., Hughes,S., Belland,R.J., Caldwell,H.D., & McClarty,G. (2002) Molecular basis defining human Chlamydia trachomatis tissue tropism. A possible role for tryptophan synthase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 26893-26903.

- [39] Caldwell,H.D., Wood,H., Crane,D., Bailey,R., Jones,R.B., Mabey,D., Maclean,I., Mohammed,Z., Peeling,R., Roshick,C., Schachter,J., Solomon,A.W., Stamm,W.E., Suchland,R.J., Taylor,L., West,S.K., Quinn,T.C., Belland,R.J., & McClarty,G. (2003) Polymorphisms in Chlamydia trachomatis tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates. *J. Clin. Invest.*, **111**, 1757-1769.
- [40] Byrne,G.I., Ouellette,S.P., Wang,Z., Rao,J.P., Lu,L., Beatty,W.L., & Hudson,A.P. (2001) Chlamydia pneumoniae expresses genes required for DNA replication but not cytokinesis during persistent infection of HEp-2 cells. *Infect. Immun.*, **69**, 5423-5429.
- [41] Mehta,S.J., Miller,R.D., Ramirez,J.A., & Summersgill,J.T. (1998) Inhibition of Chlamydia pneumoniae replication in HEp-2 cells by interferon-gamma: role of tryptophan catabolism. *J. Infect. Dis.*, **177**, 1326-1331.
- [42] Morrison,R.P. (2000) Differential sensitivities of chlamydia trachomatis strains to inhibitory effects of gamma interferon. *Infect. Immun.*, **68**, 6038-6040.
- [43] Sakash,J.B., Byrne,G.I., Lichtman,A., & Libby,P. (2002) Cytokines induce indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human atheroma-associated cells: implications for persistent Chlamydia pneumoniae infection. *Infect. Immun.*, **70**, 3959-3961.
- [44] Airene,S., Surcel,H.M., Alakarppa,H., Laitinen,K., Paavonen,J., Saikku,P., & Laurila,A. (1999) Chlamydia pneumoniae infection in human monocytes [published erratum appears in *Infect Immun* 1999 Dec;67(12):6716]. *Infect. Immun.*, **67**, 1445-1449.
- [45] Igietseme,J.U., Ananaba,G.A., Candal,D.H., Lyn,D., & Black,C.M. (1998) Immune control of Chlamydial growth in the human epithelial cell line RT4 involves multiple mechanisms that include nitric oxide induction, tryptophan catabolism and iron deprivation. *Microbiol. Immunol.*, **42**, 617-625.
- [46] Koehler,L., Nettelbreker,E., Hudson,A.P., Ott,N., Gerard,H.C., Branigan,P.J., Schumacher,H.R., Drommer,W., & Zeidler,H. (1997) Ultrastructural and molecular analyses of the persistence of Chlamydia trachomatis (serovar K) in human monocytes. *Microb. Pathog.*, **22**, 133-142.
- [47] Schmitz,E., Nettelbreker,E., Zeidler,H., Hammer,M., Manor,E., & Wollenhaupt,J. (1993) Intracellular persistence of chlamydial major outer-membrane protein, lipopolysaccharide and ribosomal RNA after non-productive infection of human monocytes with Chlamydia trachomatis serovar K. *J. Med. Microbiol.*, **38**, 278-285.
- [48] Holland,S.M., Hudson,A.P., Bobo,L., Whittum-Hudson,J.A., Viscidi,R.P., Quinn,T.C., & Taylor,H.R. (1992) Demonstration of chlamydial RNA and DNA during a culture-negative state. *Infect. Immun.*, **60**, 2040-2047.
- [49] Mabey,D.C., Robertson,J.N., & Ward,M.E. (1987) Detection of Chlamydia trachomatis by enzyme immunoassay in patients with trachoma. *Lancet*, **2**, 1491-1492.

- [50] Cheema,M.A., Schumacher,H.R., & Hudson,A.P. (1991) RNA-directed molecular hybridization screening: evidence for inapparent chlamydial infection. *Am. J. Med. Sci.*, **302**, 261-268.
- [51] Hudson,A.P., McEntee,C.M., Reacher,M., Whittum-Hudson,J.A., & Taylor,H.R. (1992) Inapparent ocular infection by *Chlamydia trachomatis* in experimental and human trachoma. *Curr. Eye Res.*, **11**, 279-283.
- [52] Brunham,R.C. & Peeling,R.W. (1994) *Chlamydia trachomatis* antigens: role in immunity and pathogenesis. *Infect. Agents Dis.*, **3**, 218-233.
- [53] Campbell,L.A., Patton,D.L., Moore,D.E., Cappuccio,A.L., Mueller,B.A., & Wang,S.P. (1993) Detection of *Chlamydia trachomatis* deoxyribonucleic acid in women with tubal infertility. *Fertil. Steril.*, **59**, 45-50.
- [54] Kiviat,N.B., Wolner-Hanssen,P., Peterson,M., Wasserheit,J., Stamm,W.E., Eschenbach,D.A., Paavonen,J., Lingenfelter,J., Bell,T., & Zabriskie,V. (1986) Localization of *Chlamydia trachomatis* infection by direct immunofluorescence and culture in pelvic inflammatory disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **154**, 865-873.
- [55] Patton,D.L., Askienazy-Elbhar,M., Henry-Suchet,J., Campbell,L.A., Cappuccio,A., Tannous,W., Wang,S.P., & Kuo,C.C. (1994) Detection of *Chlamydia trachomatis* in fallopian tube tissue in women with postinfectious tubal infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **171**, 95-101.
- [56] Soong,Y.K., Kao,S.M., Lee,C.J., Lee,P.S., & Pao,C.C. (1990) Endocervical chlamydial deoxyribonucleic acid in infertile women. *Fertil. Steril.*, **54**, 815-818.
- [57] Thejls,H., Gnarpe,J., Lundkvist,O., Heimer,G., Larsson,G., & Victor,A. (1991) Diagnosis and prevalence of persistent chlamydia infection in infertile women: tissue culture, direct antigen detection, and serology. *Fertil. Steril.*, **55**, 304-310.
- [58] Wollenhaupt,J. & Zeidler,H. (1998) Undifferentiated arthritis and reactive arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, **10**, 306-313.
- [59] Hammer,M., Nettelbreker,E., Hopf,S., Schmitz,E., Porschke,K., & Zeidler,H. (1992) Chlamydial rRNA in the joints of patients with *Chlamydia*-induced arthritis and undifferentiated arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **10**, 63-66.
- [60] Nanagara,R., Li,F., Beutler,A., Hudson,A., & Schumacher,H.R., Jr. (1995) Alteration of *Chlamydia trachomatis* biologic behavior in synovial membranes. Suppression of surface antigen production in reactive arthritis and Reiter's syndrome. *Arthritis Rheum.*, **38**, 1410-1417.
- [61] Rahman,M.U., Cheema,M.A., Schumacher,H.R., & Hudson,A.P. (1992) Molecular evidence for the presence of chlamydia in the synovium of patients with Reiter's syndrome. *Arthritis Rheum.*, **35**, 521-529.
- [62] Stephens,R.S. (1992) Challenge of *Chlamydia* research. *Infect. Agents Dis.*, **1**, 279-293.

- [63] Wang,S.P. & Grayston,J.T. (1991) Three new serovars of Chlamydia trachomatis: Da, Ia, and L2a. *J. Infect. Dis.*, **163**, 403-405.
- [64] Hammerschlag,M.R., Chirgwin,K., Roblin,P.M., Gelling,M., Dumornay,W., Mandel,L., Smith,P., & Schachter,J. (1992) Persistent infection with Chlamydia pneumoniae following acute respiratory illness. *Clin. Infect. Dis.*, **14**, 178-182.
- [65] Smith,C.B., Friedewald,W.T., & Chanock,R.M. (1967) Shedding of Mycoplasma pneumoniae after tetracycline and erythromycin therapy. *N. Engl. J. Med.*, **276**, 1172-1175.
- [66] Campbell,L.A., Kuo,C.C., & Grayston,J.T. (1998) Chlamydia pneumoniae and cardiovascular disease. *Emerg. Infect. Dis.*, **4**, 571-579.
- [67] Jackson,L.A., Campbell,L.A., Kuo,C.C., Rodriguez,D.I., Lee,A., & Grayston,J.T. (1997) Isolation of Chlamydia pneumoniae from a carotid endarterectomy specimen. *J. Infect. Dis.*, **176**, 292-295.
- [68] Kuo,C. & Campbell,L.A. (1998) Is infection with Chlamydia pneumoniae a causative agent in atherosclerosis? *Mol. Med. Today*, **4**, 426-430.
- [69] Grayston,J.T., Kuo,C.C., Coulson,A.S., Campbell,L.A., Lawrence,R.D., Lee,M.J., Strandness,E.D., & Wang,S.P. (1995) Chlamydia pneumoniae (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery [see comments]. *Circulation*, **92**, 3397-3400.
- [70] Kuo,C.C., Shor,A., Campbell,L.A., Fukushi,H., Patton,D.L., & Grayston,J.T. (1993) Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J. Infect. Dis.*, **167**, 841-849.
- [71] Kuo,C.C., Gown,A.M., Benditt,E.P., & Grayston,J.T. (1993) Detection of Chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler. Thromb.*, **13**, 1501-1504.
- [72] Kuo,C.C., Coulson,A.S., Campbell,L.A., Cappuccio,A.L., Lawrence,R.D., Wang,S.P., & Grayston,J.T. (1997) Detection of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic plaques in the walls of arteries of lower extremities from patients undergoing bypass operation for arterial obstruction. *J. Vasc. Surg.*, **26**, 29-31.
- [73] Shor,A., Kuo,C.C., & Patton,D.L. (1992) Detection of Chlamydia pneumoniae in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. *S. Afr. Med. J.*, **82**, 158-161.
- [74] Gaydos,C.A., Summersgill,J.T., Sahney,N.N., Ramirez,J.A., & Quinn,T.C. (1996) Replication of Chlamydia pneumoniae in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infect. Immun.*, **64**, 1614-1620.
- [75] Godzik,K.L., O'Brien,E.R., Wang,S.K., & Kuo,C.C. (1995) In vitro susceptibility of human vascular wall cells to infection with Chlamydia pneumoniae. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2411-2414.

- [76] Fryer,R.H., Schwobe,E.P., Woods,M.L., & Rodgers,G.M. (1997) Chlamydia species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. *J. Investig. Med.*, **45**, 168-174.
- [77] Heinemann,M., Susa,M., Simnacher,U., Marre,R., & Essig,A. (1996) Growth of Chlamydia pneumoniae induces cytokine production and expression of CD14 in a human monocytic cell line. *Infect. Immun.*, **64**, 4872-4875.
- [78] Kaukoranta-Tolvanen,S.S., Ronni,T., Leinonen,M., Saikku,P., & Laitinen,K. (1996) Expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated by Chlamydia pneumoniae. *Microb. Pathog.*, **21**, 407-411.
- [79] Molestina,R.E., Dean,D., Miller,R.D., Ramirez,J.A., & Summersgill,J.T. (1998) 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.
- [80] Kalayoglu,M.V. & Byrne,G.I. (1998) Induction of macrophage foam cell formation by Chlamydia pneumoniae. *J. Infect. Dis.*, **177**, 725-729.
- [81] Balin,B.J., Gerard,H.C., Arking,E.J., Appelt,D.M., Branigan,P.J., Abrams,J.T., Whittum-Hudson,J.A., & Hudson,A.P. (1998) Identification and localization of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's brain. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)*, **187**, 23-42.
- [82] Hannu,T., Puolakkainen,M., & Leirisalo-Repo,M. (1999) Chlamydia pneumoniae as a triggering infection in reactive arthritis. *Rheumatology. (Oxford)*, **38**, 411-414.
- [83] Schumacher,H.R., Jr., Gerard,H.C., Arayssi,T.K., Pando,J.A., Branigan,P.J., Saaibi,D.L., & Hudson,A.P. (1999) Lower prevalence of Chlamydia pneumoniae DNA compared with Chlamydia trachomatis DNA in synovial tissue of arthritis patients. *Arthritis Rheum.*, **42**, 1889-1893.
- [84] Raetz,C.R. (1990) Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 129-170.
- [85] Raetz,C.R. & Whitfield,C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 635-700.
- [86] Rietschel,E.T., Kirikae,T., Schade,F.U., Mamat,U., Schmidt,G., Loppnow,H., Ulmer,A.J., Zahringer,U., Seydel,U., Di Padova,F., & . (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.*, **8**, 217-225.
- [87] Brade,L., Schramek,S., Schade,U., & Brade,H. (1986) Chemical, biological, and immunochemical properties of the Chlamydia psittaci lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, **54**, 568-574.
- [88] Ingalls,R.R., Rice,P.A., Qureshi,N., Takayama,K., Lin,J.S., & Golenbock,D.T. (1995) The inflammatory cytokine response to Chlamydia trachomatis infection is endotoxin mediated. *Infect. Immun.*, **63**, 3125-3130.

- [89] Dessus-Babus,S., Knight,S.T., & Wyrick,P.B. (2000) 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.
- [90] Rasmussen,S.J., Eckmann,L., Quayle,A.J., Shen,L., Zhang,Y.X., Anderson,D.J., Fierer,J., Stephens,R.S., & Kagnoff,M.F. (1997) 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.
- [91] Jahn,H.U., Krull,M., Wuppermann,F.N., Klucken,A.C., Rosseau,S., Seybold,J., Hegemann,J.H., Jantos,C.A., & Suttorp,N. (2000) Infection and activation of airway epithelial cells by chlamydia pneumoniae. *J. Infect. Dis.*, **182**, 1678-1687.
- [92] Dechend,R., Maass,M., Gieffers,J., Dietz,R., Scheidereit,C., Leutz,A., & Gulba,D.C. (1999) 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.
- [93] Quinn,T.C. & Gaydos,C.A. (1999) In vitro infection and pathogenesis of Chlamydia pneumoniae in endovascular cells. *Am. Heart J.*, **138**, S507-S511.
- [94] Rodel,J., Woytas,M., Groh,A., Schmidt,K.H., Hartmann,M., Lehmann,M., & Straube,E. (2000) Production of basic fibroblast growth factor and interleukin 6 by human smooth muscle cells following infection with Chlamydia pneumoniae. *Infect. Immun.*, **68**, 3635-3641.
- [95] Rodel,J., Groh,A., Vogelsang,H., Lehmann,M., Hartmann,M., & Straube,E. (1998) Beta interferon is produced by Chlamydia trachomatis-infected fibroblast-like synoviocytes and inhibits gamma interferon-induced HLA-DR expression. *Infect. Immun.*, **66**, 4491-4495.
- [96] Rodel,J., Straube,E., Lungershausen,W., Hartmann,M., & Groh,A. (1998) Secretion of cytokines by human synoviocytes during in vitro infection with Chlamydia trachomatis. *J. Rheumatol.*, **25**, 2161-2168.
- [97] Bianchi,A., Dosquet,C., Henry,S., Couderc,M.C., Ferchal,F., & Scieux,C. (1997) Chlamydia trachomatis growth stimulates interleukin 8 production by human monocytic U-937 cells. *Infect. Immun.*, **65**, 2434-2436.
- [98] Rothermel,C.D., Schachter,J., Lavrich,P., Lipsitz,E.C., & Francus,T. (1989) Chlamydia trachomatis-induced production of interleukin-1 by human monocytes. *Infect. Immun.*, **57**, 2705-2711.
- [99] Caspar-Bauguil,S., Puissant,B., Nazzal,D., Lefevre,J.C., Thomsen,M., Salvayre,R., & Benoist,H. (2000) Chlamydia pneumoniae induces interleukin-10 production that down- regulates major histocompatibility complex class I expression. *J. Infect. Dis.*, **182**, 1394-1401.

- [100] Kaukoranta-Tolvanen,S.S., Teppo,A.M., Laitinen,K., Saikku,P., Linnavuori,K., & Leinonen,M. (1996) Growth of Chlamydia pneumoniae in cultured human peripheral blood mononuclear cells and induction of a cytokine response. *Microb. Pathog.*, **21**, 215-221.
- [101] Netea,M.G., Selzman,C.H., Kullberg,B.J., Galama,J.M., Weinberg,A., Stalenhoef,A.F., Van Der Meer,J.W., & Dinarello,C.A. (2000) Acellular components of Chlamydia pneumoniae stimulate cytokine production in human blood mononuclear cells. *Eur. J. Immunol.*, **30**, 541-549.
- [102] Redecke,V., Dalhoff,K., Bohnet,S., Braun,J., & Maass,M. (1998) Interaction of Chlamydia pneumoniae and human alveolar macrophages: infection and inflammatory response. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **19**, 721-727.
- [103] Kelly,K.A. & Rank,R.G. (1997) 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.
- [104] Krull,M., Klucken,A.C., Wuppermann,F.N., Fuhrmann,O., Magerl,C., Seybold,J., Hippenstiel,S., Hegemann,J.H., Jantos,C.A., & Suttorp,N. (1999) Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with Chlamydia pneumoniae. *J. Immunol.*, **162**, 4834-4841.
- [105] Yamaguchi,H., Haranaga,S., Widen,R., Friedman,H., & Yamamoto,Y. (2002) Chlamydia pneumoniae infection induces differentiation of monocytes into macrophages. *Infect. Immun.*, **70**, 2392-2398.
- [106] Hess,S. Untersuchungen zur Chlamydien-Wirtszell-Interaktion. 2002.
- [107] Fan,T., Lu,H., Hu,H., Shi,L., McClarty,G.A., Nance,D.M., Greenberg,A.H., & Zhong,G. (1998) Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J. Exp. Med.*, **187**, 487-496.
- [108] Rajalingam,K., Al Younes,H., Muller,A., Meyer,T.F., Szczepek,A.J., & Rudel,T. (2001) Epithelial Cells Infected with Chlamydia pneumoniae (Chlamydia pneumoniae) Are Resistant to Apoptosis. *Infect. Immun.*, **69**, 7880-7888.
- [109] Perfettini,J.L., Reed,J.C., Israel,N., Martinou,J.C., Dautry-Varsat,A., & Ojcius,D.M. (2002) Role of Bcl-2 family members in caspase-independent apoptosis during Chlamydia infection. *Infect. Immun.*, **70**, 55-61.
- [110] Fawaz,F.S., van Ooij,C., Homola,E., Mutka,S.C., & Engel,J.N. (1997) Infection with Chlamydia trachomatis alters the tyrosine phosphorylation and/or localization of several host cell proteins including cortactin. *Infect. Immun.*, **65**, 5301-5308.
- [111] Lu,H., Shen,C., & Brunham,R.C. (2000) Chlamydia trachomatis infection of epithelial cells induces the activation of caspase-1 and release of mature IL-18. *J. Immunol.*, **165**, 1463-1469.

- [112] Hess,S., Peters,J., Bartling,G., Rheinheimer,C., Hegde,P., Magid-Slav,M., Tal-Singer,R., & Klos,A. (2003) More than just innate immunity: comparative analysis of *Chlamydomydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* effects on host-cell gene regulation. *Cell Microbiol.*, **5**, 785-795.
- [113] Belland,R.J., Nelson,D.E., Virok,D., Crane,D.D., Hogan,D., Sturdevant,D., Beatty,W.L., & Caldwell,H.D. (2003) Transcriptome analysis of chlamydial growth during IFN-gamma-mediated persistence and reactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 15971-15976.
- [114] Belland,R.J., Zhong,G., Crane,D.D., Hogan,D., Sturdevant,D., Sharma,J., Beatty,W.L., & Caldwell,H.D. (2003) Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 8478-8483.
- [115] Molestina,R.E., Klein,J.B., Miller,R.D., Pierce,W.H., Ramirez,J.A., & Summersgill,J.T. (2002) Proteomic analysis of differentially expressed *Chlamydia pneumoniae* genes during persistent infection of HEp-2 cells. *Infect. Immun.*, **70**, 2976-2981.
- [116] Nilsson,C.L. (2002) Bacterial proteomics and vaccine development. *Am. J. Pharmacogenomics.*, **2**, 59-65.
- [117] Stenner-Liewen,F., Liewen,H., Zapata,J.M., Pawlowski,K., Godzik,A., & Reed,J.C. (2002) CADD, a *Chlamydia* protein that interacts with death receptors. *J. Biol. Chem.*, **277**, 9633-9636.
- [118] Zhong,G., Fan,P., Ji,H., Dong,F., & Huang,Y. (2001) Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J. Exp. Med.*, **193**, 935-942.
- [119] Belland,R.J., Scidmore,M.A., Crane,D.D., Hogan,D.M., Whitmire,W., McClarty,G., & Caldwell,H.D. (2001) *Chlamydia trachomatis* cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 13984-13989.
- [120] Darwin,K.H. & Miller,V.L. (1999) Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol Rev.*, **12**, 405-428.
- [121] Burrows,W. (1959) *Textbook of microbiology*, 7 edn. The W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.
- [122] McWhorter-Murlin,A.C. & Hickman-Brenner,F.W. Identification and serotyping of *Salmonella* and an update of the Kauffmann-White scheme. 1994. Atlanta, Ga., Centers for Disease Control and Prevention.
- [123] Galan,J.E. & Curtiss,R., III (1989) Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 6383-6387.
- [124] Tsolis,R.M., Adams,L.G., Ficht,T.A., & Baumler,A.J. (1999) Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect. Immun.*, **67**, 4879-4885.

- [125] Ochman,H., Soncini,F.C., Solomon,F., & Groisman,E.A. (1996) Identification of a pathogenicity island required for Salmonella survival in host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 7800-7804.
- [126] Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella* surveillance report-annual summary 1992-. 1994. Atlanta, Ga.
- [127] Tauxe,R.V. (1996) An update on *Salmonella*. *Health Environ. Dig.*, **10**, 1-4.
- [128] Blaser,M.J. & Newman,L.S. (1982) A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Rev. Infect. Dis.*, **4**, 1096-1106.
- [129] Jones,B.D., Ghori,N., & Falkow,S. (1994) Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.*, **180**, 15-23.
- [130] Galan,J.E. & Zhou,D. (2000) Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by Salmonella. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 8754-8761.
- [131] Eckmann,L., Kagnoff,M.F., & Fierer,J. (1993) Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.*, **61**, 4569-4574.
- [132] Hobbie,S., Chen,L.M., Davis,R.J., & Galan,J.E. (1997) Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by Salmonella typhimurium in cultured intestinal epithelial cells. *J. Immunol.*, **159**, 5550-5559.
- [133] Santos,R.L., Zhang,S., Tsolis,R.M., Baumler,A.J., & Adams,L.G. (2002) Morphologic and molecular characterization of Salmonella typhimurium infection in neonatal calves. *Vet. Pathol.*, **39**, 200-215.
- [134] Kimberg,D.V., Field,M., Johnson,J., Henderson,A., & Gershon,E. (1971) Stimulation of intestinal mucosal adenyl cyclase by cholera enterotoxin and prostaglandins. *J. Clin. Invest.*, **50**, 1218-1230.
- [135] Gomez,H.F. & Cleary,G.G. (1998) *Salmonella*, 4 edn. The W.B.Saunders Co., Philadelphia, Pa.
- [136] Hook,E.W. (1990) *Salmonella species (including typhoid fever)*, 3 edn. Churchill Livingstone, Inc., New York, N.Y.
- [137] Tauxe,R.V. & Pavia,A.T. (1998) Salmonellosis: nontyphoidal. In *Bacterial infections of humans: epidemiology and control* (Evans,A.S. & Brachman,P.S., eds), pp. 613-630. Plenum Medical Book Co., New York, N.Y.
- [138] Turnbull,P.C. (1979) Food poisoning with special reference to Salmonella -- its epidemiology, pathogenesis and control. *Clin. Gastroenterol.*, **8**, 663-714.
- [139] Cornelis,G.R. & Van Gijsegem,F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 735-774.

- [140] Hueck,C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol. Rev.*, **62**, 379-433.
- [141] Schesser,M., Francis,M.S., Forsberg,A., & Wolf-Watz,H. (2000) Type III Secretion Systems in Animal- and Plant-Interacting Bacteria. In *Cellular Microbiology* (Cossart,P., Boquet,P., Normark,S., & Rappuoli,R., eds), ASM Press, Washington, D.C.
- [142] Meccas,J.J. & Strauss,E.J. (1996) Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands. *Emerg. Infect. Dis.*, **2**, 270-288.
- [143] Anderson,D.M. & Schneewind,O. (1999) *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. *Molecular Microbiology*, **31**, 1139-1148.
- [144] Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., & Erlich,H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- [145] Calvin,N.M. & Hanawalt,P.C. (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.*, **170**, 2796-2801.
- [146] Birnboim,H.C. & Doly,J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- [147] Huniche,B.S., Jensen,L.T., Birkelund,S., & Christiansen,G. (1998) Mycoplasma contamination of Chlamydia pneumoniae isolates. *Scand. J. Infect. Dis.*, **30**, 181-187.
- [148] Chomczynski,P. & Sacchi,N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.
- [149] Livak,K.J., Flood,S.J., Marmaro,J., Giusti,W., & Deetz,K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.*, **4**, 357-362.
- [150] Higuchi,R., Fockler,C., Dollinger,G., & Watson,R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N. Y.)*, **11**, 1026-1030.
- [151] Bajaj,V., Lucas,R.L., Hwang,C., & Lee,C.A. (1996) Co-ordinate regulation of Salmonella typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hilA expression. *Mol Microbiol*, **22**, 703-714.
- [152] Sachs,L. (1997) *Angewandte Statistik*. Springer Verlag, Berlin.
- [153] Beatty,W.L., Morrison,R.P., & Byrne,G.I. (1995) Reactivation of persistent Chlamydia trachomatis infection in cell culture. *Infect. Immun.*, **63**, 199-205.

- [154] Gerard,H.C., Whittum-Hudson,J.A., Schumacher,H.R., & Hudson,A.P. (2004) Differential expression of three Chlamydia trachomatis hsp60-encoding genes in active vs. persistent infections. *Microb. Pathog.*, **36**, 35-39.
- [155] Pantoja,L.G., Miller,R.D., Ramirez,J.A., Molestina,R.E., & Summersgill,J.T. (2001) Characterization of Chlamydia pneumoniae persistence in HEp-2 cells treated with gamma interferon. *Infect. Immun.*, **69**, 7927-7932.
- [156] Hahn,H., Klein,P., & Giesbrecht,P. (1999) Bakterien:Definition und Morphologie. In *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (Hahn, Falke, Kaufmann, & Ullmann, eds), pp. 173-195. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [157] Airene,S., Surcel,H.M., Tuukkanen,J., Leinonen,M., & Saikku,P. (2002) Chlamydia pneumoniae inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cell lines. *Scand. J. Immunol.*, **55**, 390-398.
- [158] Dimier,I.H. & Bout,D.T. (1998) Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit Toxoplasma gondii replication: a role for intracellular iron. *Immunology*, **94**, 488-495.
- [159] Wan,C.P., Park,C.S., & Lau,B.H. (1993) A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J. Immunol. Methods*, **162**, 1-7.
- [160] Drevets,D.A. & Campbell,P.A. (1991) Macrophage phagocytosis: use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria. *J. Immunol. Methods*, **142**, 31-38.
- [161] Rosenberger,C.M., Pollard,A.J., & Finlay,B.B. (2001) Gene array technology to determine host responses to Salmonella. *Microbes. Infect.*, **3**, 1353-1360.
- [162] Hofmann,F., Busch,C., Prepens,U., Just,I., & Aktories,K. (1997) Localization of the glucosyltransferase activity of Clostridium difficile toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. *J. Biol. Chem.*, **272**, 11074-11078.
- [163] Just,I., Selzer,J., Wilm,M., Eichel-Streiber,C., Mann,M., & Aktories,K. (1995) Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature*, **375**, 500-503.
- [164] Friebel,A., Ilchmann,H., Aepfelbacher,M., Ehrbar,K., Machleidt,W., & Hardt,W.D. (2001) SopE and SopE2 from Salmonella typhimurium activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34035-34040.
- [165] Lindle,T. (2002) Spezielle Methoden der Zellbiologie:Zellsynchronisation. In *Zell- und Gewebekultur* pp. 244-247. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- [166] Beatty,W.L., Byrne,G.I., & Morrison,R.P. (1993) Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent Chlamydia trachomatis infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 3998-4002.

- [167] Kane,C.D., Vena,R.M., Ouellette,S.P., & Byrne,G.I. (1999) Intracellular tryptophan pool sizes may account for differences in gamma interferon-mediated inhibition and persistence of chlamydial growth in polarized and nonpolarized cells. *Infect. Immun.*, **67**, 1666-1671.
- [168] Endlich,K. Vorraussichtlicher Titel:Persistenzmodelle bei *C. pneumoniae* in HeLa-Zellen, exemplarische Untersuchungen der Wirtszellantwort auf persistierende Infektion mit *C. pneumoniae* und Untersuchungen zu *C. pneumoniae* in atherosklerotischem humanen Gewebe. 2005.
- [169] van Wissen,M., Snoek,M., Smids,B., Jansen,H.M., & Lutter,R. (2002) IFN-gamma amplifies IL-6 and IL-8 responses by airway epithelial-like cells via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Immunol.*, **169**, 7039-7044.
- [170] Faggioli,L., Merola,M., Hiscott,J., Furia,A., Monese,R., Tovey,M., & Palmieri,M. (1997) Molecular mechanisms regulating induction of interleukin-6 gene transcription by interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.*, **27**, 3022-3030.
- [171] Parikh,A.A., Salzman,A.L., Fischer,J.E., Szabo,C., & Hasselgren,P.O. (1997) Interleukin-1 beta and interferon-gamma regulate interleukin-6 production in cultured human intestinal epithelial cells. *Shock*, **8**, 249-255.
- [172] Nagineni,C.N., Detrick,B., & Hooks,J.J. (1994) Synergistic effects of gamma interferon on inflammatory mediators that induce interleukin-6 gene expression and secretion by human retinal pigment epithelial cells. *Clin. Diagn. Lab Immunol.*, **1**, 569-577.
- [173] Salmenpera,P., Hamalainen,S., Hukkanen,M., & Kankuri,E. (2003) Interferon-gamma induces C/EBP beta expression and activity through MEK/ERK and p38 in T84 colon epithelial cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol*, **284**, C1133-C1139.
- [174] Winzen,R., Kracht,M., Ritter,B., Wilhelm,A., Chen,C.Y., Shyu,A.B., Muller,M., Gaestel,M., Resch,K., & Holtmann,H. (1999) The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J.*, **18**, 4969-4980.
- [175] Yee,C., Krishnan-Hewlett,I., Baker,C.C., Schlegel,R., & Howley,P.M. (1985) Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.*, **119**, 361-366.
- [176] Rosenberger,C.M., Scott,M.G., Gold,M.R., Hancock,R.E., & Finlay,B.B. (2000) *Salmonella typhimurium* infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. *J. Immunol.*, **164**, 5894-5904.
- [177] Cirillo,D.M., Valdivia,R.H., Monack,D.M., & Falkow,S. (1998) Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol*, **30**, 175-188.
- [178] Lee,A.K., Detweiler,C.S., & Falkow,S. (2000) OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J. Bacteriol.*, **182**, 771-781.

- [179] Ehrbar,K., Miroid,S., Friebel,A., Stender,S., & Hardt,W.D. (2002) Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Med. Microbiol.*, **291**, 479-485.
- [180] Miroid,S., Ehrbar,K., Weissmuller,A., Prager,R., Tschape,H., Russmann,H., & Hardt,W.D. (2001) *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5, and sopE2. *J. Bacteriol.*, **183**, 2348-2358.
- [181] Eckmann,L., Smith,J.R., Housley,M.P., Dwinell,M.B., & Kagnoff,M.F. (2000) 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.
- [182] Weinstein,D.L., O'Neill,B.L., & Metcalf,E.S. (1997) *Salmonella typhi* stimulation of human intestinal epithelial cells induces secretion of epithelial cell-derived interleukin-6. *Infect. Immun.*, **65**, 395-404.
- [183] Weinstein,D.L., O'Neill,B.L., Hone,D.M., & Metcalf,E.S. (1998) Differential early interactions between *Salmonella enterica* serovar Typhi and two other pathogenic *Salmonella* serovars with intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.*, **66**, 2310-2318.
- [184] Savard,C.E., Blinman,T.A., Choi,H.S., Lee,S.K., Pandol,S.J., & Lee,S.P. (2002) Expression of cytokine and chemokine mRNA and secretion of tumor necrosis factor-alpha by gallbladder epithelial cells: response to bacterial lipopolysaccharides. *BMC. Gastroenterol.*, **2**, 23.
- [185] Gewirtz,A.T., Siber,A.M., Madara,J.L., & McCormick,B.A. (1999) Orchestration of neutrophil movement by intestinal epithelial cells in response to *Salmonella typhimurium* can be uncoupled from bacterial internalization. *Infect. Immun.*, **67**, 608-617.
- [186] Hybiske,K., Ichikawa,J.K., Huang,V., Lory,S.J., & Machen,T.E. (2004) Cystic fibrosis airway epithelial cell polarity and bacterial flagellin determine host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Microbiol.*, **6**, 49-63.
- [187] Arnold,R., Scheffer,J., Konig,B., & Konig,W. (1993) Effects of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cytokine gene expression and release from human polymorphonuclear granulocytes and epithelial (HEp-2) cells. *Infect. Immun.*, **61**, 2545-2552.
- [188] Sharma,S.A., Tummuru,M.K., Miller,G.G., & Blaser,M.J. (1995) Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect. Immun.*, **63**, 1681-1687.
- [189] Utaisincharoen,P., Anuntagool,N., Arjcharoen,S., Lengwehasatit,I., Limposuwan,K., Chaisuriya,P., & Sirisinha,S. (2004) *Burkholderia pseudomallei* stimulates low interleukin-8 production in the human lung epithelial cell line A549. *Clin. Exp. Immunol.*, **138**, 61-65.

- [190] Elewaut,D., DiDonato,J.A., Kim,J.M., Truong,F., Eckmann,L., & Kagnoff,M.F. (1999) NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J. Immunol.*, **163**, 1457-1466.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Taxonomie der Ordnung Chlamydiales .....	2
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des CT166-Bereiches bei <i>C. trachomatis</i> D und L2 .....	4
Abbildung 1.3 Entwicklungszyklus von Chlamydien am Beispiel von <i>C. pneumoniae</i> .....	5
Abbildung 1.4 Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>C. trachomatis</i> -infizierten Zelle .....	7
Abbildung 1.5 Schematische Darstellung eines TypIII-Sekretionsapparats.....	17
Abbildung 2.1 Liste der verwendeten Primer für die Real-Time RT-PCR.....	28
Abbildung 4.1 Fluoreszenzbilder von persistierenden Chlamydien durch Behandlung mit IFN- $\gamma$ .....	74
Abbildung 4.2 Fluoreszenzbilder von persistierenden Chlamydien durch Behandlung mit Penicillin G.....	76
Abbildung 4.3 Fluoreszenzbilder von persistierenden Chlamydien durch Behandlung mit DAM .....	77
Abbildung 4.4 Vergleich von MEM-5 und RPMI Spezial als Infektionsmedium mit und ohne Vorinkubation mit DAM zur Persistenzerzeugung bei <i>C. trachomatis</i> D.....	78
Abbildung 4.5 Vergleich von L-Tryptophan, Eisensulfat und Holotransferrin zur Reaktivierung von persistierenden <i>C. pneumoniae</i> nach IFN- $\gamma$ Behandlung.....	83
Abbildung 4.6 Bildung infektiöser Chlamydien während produktiver und persistierender Infektion mit IFN- $\gamma$ von <i>C. pneumoniae</i> am 1. bis 10. Tag nach Infektion aus dem Überstand und den Zellen .....	84
Abbildung 4.7 Fluoreszenzbilder persistierender Chlamydien durch IFN- $\gamma$ und reaktiverter <i>C. pneumoniae</i> nach L-Tryptophan Behandlung.....	86
Abbildung 4.8 Genexpression von <i>EGR-1</i> und <i>ETV4</i> bei <i>C. pneumoniae</i> infizierten HeLa-Zellen während produktiver und persistierender Infektion sowie nach Reaktivierung .....	89
Abbildung 4.9 Genexpression von <i>CTGF</i> und <i>LIF</i> bei <i>C. pneumoniae</i> infizierten HeLa-Zellen während produktiver und persistierender Infektion sowie nach Reaktivierung .....	90
Abbildung 4.10 Genexpression von <i>IL-8</i> bei <i>C. pneumoniae</i> infizierten HeLa-Zellen während produktiver und persistierender Infektion sowie nach Reaktivierung.....	91
Abbildung 4.11 <i>IL-8</i> und <i>IL-11</i> Freisetzung schein-infizierter und infizierter HeLa-Zellen während produktiver und persistierender Infektion von <i>C. pneumoniae</i> .....	94
Abbildung 4.12 <i>IL-6</i> Freisetzung schein-infizierter und infizierter HeLa-Zellen während produktiver und persistierender Infektion von <i>C. pneumoniae</i> .....	95
Abbildung 4.13 Freisetzung von <i>IL-8</i> und <i>IL-11</i> schein-infizierter und infizierter HeLa-Zellen bei persistierender Infektion und nach Reaktivierung persistierender <i>C. pneumoniae</i> .....	97
Abbildung 4.14 Freisetzung von <i>IL-6</i> schein-infizierter und infizierter HeLa-Zellen bei persistierender Infektion und nach Reaktivierung persistierender <i>C. pneumoniae</i> .....	98
Abbildung 4.15 Mikroaerophile Wachstumskurve von <i>S. typhimurium</i> wt.....	101
Abbildung 4.16 Infektiösität von <i>S. typhimurium</i> wt und Mutanten nach Infektion von HeLa-Zellen mit verschiedenen MOI.....	104
Abbildung 4.17 Vergleich der <i>IL-8</i> Freisetzung von HeLa-Zellen mit vitalen sowie UV-inaktivierten <i>S. typhimurium</i> wt und Mutanten bei MOI 25, 100 und 400.....	106
Abbildung 4.18 <i>IL-8</i> Freisetzung von HeLa-Zellen mit vitalen sowie UV-inaktivierten <i>S. typhimurium</i> wt und Mutanten.....	107
Abbildung 4.19 Vergleich der Anzahl von intrazellulären <i>S. typhimurium</i> wt und SPI2-Mutante zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion.....	110
Abbildung 4.20 <i>IL-8</i> Freisetzung von Monozyten mit vitalen und UV-inaktivierten <i>S. typhimurium</i> wt .....	111
Abbildung 4.21 Zeitlicher Verlauf der <i>IL-6</i> Expression bei <i>S. typhimurium</i> wt und SPI2-Mutante infizierten HeLa-Zellen.....	115
Abbildung 4.22 Darstellung der Genexpression der schwach regulierten Gene nach Infektion von HeLa-Zellen mit <i>S. typhimurium</i> wt.....	117
Abbildung 4.23 Darstellung der Genexpression der stark regulierten Gene nach Infektion von HeLa-Zellen mit <i>S. typhimurium</i> wt.....	118
Abbildung 4.24 Homologievergleich von CT166 zum Glykosyltransferase-Motiv.....	122
Abbildung 4.25 Zytoskelett-Änderungen nach Behandlung mit Toxin B von <i>C. difficile</i> .....	123
Abbildung 4.26 Zytoskelett-Änderungen nach Transfektion von <i>SopE</i> und <i>SopE2</i> .....	124



## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1.1: Strukturelle Unterschiede von Elementar- und Retikularkörperchen</i> .....	4
<i>Tabelle 1.2 Veröffentlichte Chlamydien-induzierte Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen sowie Wachstumsfaktoren und Zytokinen bei verschiedenen Wirtszellen</i> .....	13
<i>Tabelle 3.1 Schematische Darstellung des Ergebnisses eines Real-Time RT-PCR Laufes.</i> .....	51
<i>Tabelle 3.2 Pipettierschema für die Aufstellung der Primer-Matrix.</i> .....	53
<i>Tabelle 3.3 Bedingungen für Metafecten-Transfektion bei HeLa-Zellen</i> .....	58
<i>Tabelle 4.1 Bildung infektiöser Chlamydien nach Persistenzerzeugung durch IFN-<math>\gamma</math> und Reaktivierung persistierender Chlamydien mit L-Tryptophan bei C. trachomatis D in HeLa-Zellen</i> .....	75
<i>Tabelle 4.2 Bildung infektiöser Chlamydien nach Persistenzerzeugung durch Penicillin G und Reaktivierung persistierender Chlamydien durch Mediumwechsel bei C. trachomatis D in HeLa-Zellen</i> .....	76
<i>Tabelle 4.3 Bildung infektiöser Chlamydien nach Persistenzerzeugung durch DAM und Reaktivierung persistierender Chlamydien mit Holotransferrin und Mediumwechsel bei C. trachomatis D in HeLa-Zellen</i> .....	79
<i>Tabelle 4.4 Bildung infektiöser Chlamydien nach Persistenzerzeugung und Reaktivierung persistierender Chlamydien bei C. pneumoniae nach Infektion von HeLa-Zellen mit hohen Bakterienzahlen.</i> .....	81
<i>Tabelle 4.5 Infektiösität von S. typhimurium wt und Mutanten nach Infektion von HeLa-Zellen mit MOI 5</i> .....	103
<i>Tabelle 4.6 Infektiösität von S. typhimurium wt und Mutanten nach Infektion von HeLa-Zellen mit verschiedenen MOI.</i> .....	104
<i>Tabelle 4.7 Übersicht über die Anzahl der regulierten Gene auf U95A-Micro-Array (Affymetrix)-Chips nach Array-Auswertung</i> .....	112
<i>Tabelle 4.8 Übersicht der regulierten Gene in HeLa-Zellen durch vitale S. typhimurium wt</i> .....	113
<i>Tabelle 4.9 Übersicht der regulierten Gene in HeLa-Zellen durch die vitale SPI2-Mutante</i> .....	114
<i>Tabelle 4.10 Darstellung der Regulation ausgewählter Gene in der Real-Time RT-PCR nach Infektion von HeLa-Zellen mit S. typhimurium wt.</i> .....	116
<i>Tabelle 4.11 Homologievergleich von CT166 zu anderen bakteriellen Proteinen.</i> .....	121
<i>Tabelle 4.12 Prozentualer Anteil abgerundeter Zellen nach Transfektion mit CT166 und SopE.</i> .....	126
<i>Tabelle 5.1 Vergleich der Wirtszell-Regulation nach Chlamydien und Salmonellen Infektion.</i> .....	143
<i>Tabelle 5.2 Auswahl publizierter Ergebnisse zur Expression von IL-6 und IL-8 durch andere gramnegative Bakterien</i> .....	144



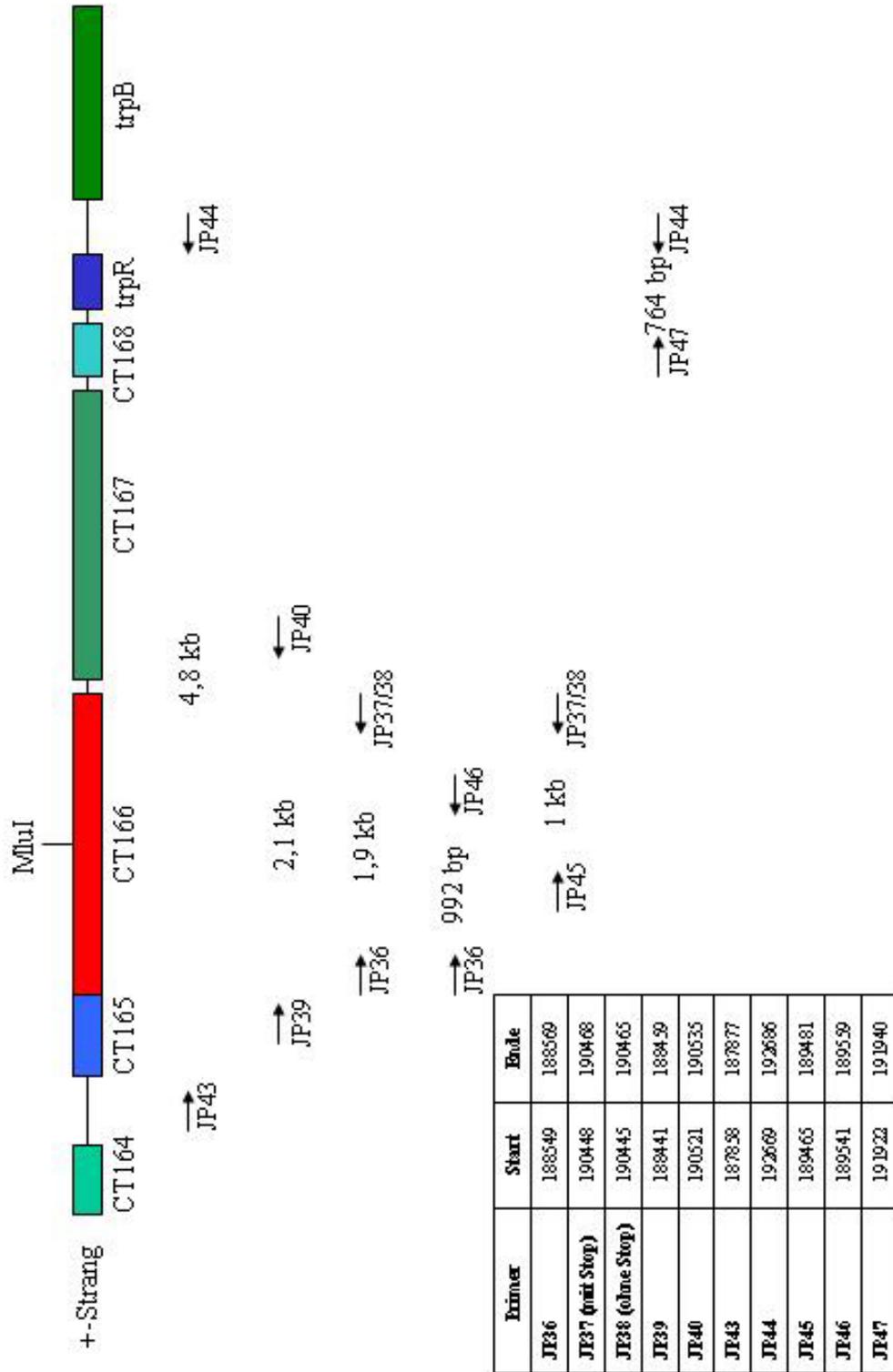
## Abkürzungsverzeichnis

$\mu$	<i>Mikro (<math>10^{-6}</math>)</i>
A	<i>Adenosin</i>
AK	<i>Antikörper</i>
Abb.	<i>Abbildung</i>
Amp	<i>Ampicillin</i>
AP	<i>Alkalische Phosphatase</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BCP	<i>1-Bromo-3-Chloro-Propan</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth-factor</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	<i>Cytosin</i>
CADD	<i>Chlamydia protein associated with death domains</i>
cAMP	<i>cyclisches Adenosinmonophosphat</i>
CD	<i>„cluster of differentiation“</i>
cDNA	<i>komplementäre DNA</i>
CFU	<i>colony forming unit, Kolonie bildende Einheit</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary cells</i>
CHX	<i>Cycloheximid</i>
Ci	<i>Curie</i>
CPAF	<i>chlamydial protease- or proteasome-like activity factor</i>
cRNA	<i>komplementäre RNA</i>
$C_T$	<i>Threshold-Cycle</i>
CTP	<i>Cytidintriphosphat</i>
Da	<i>Dalton</i>
DAM	<i>Deferoxamin Mesylat</i>
ddH <sub>2</sub> O	<i>doppelt destilliertes Wasser</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonat</i>
dH <sub>2</sub> O	<i>destilliertes Wasser</i>
DIG	<i>Digoxigenin</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
dNTP	<i>Desoxynukleotidtriphosphat</i>
DR	<i>death receptor</i>
dsDNA	<i>Doppelstrang-DNA</i>
DTT	<i>Dithiotreitol</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EK	<i>Elementarkörperchen</i>
ELISA	<i>enzym-linked immunosorbent assay</i>
EMS	<i>Ethylmethansulfonat</i>
FCS	<i>fetales Kälberserum</i>
FITC	<i>Fluoresceinisothiocyanat</i>
G	<i>Guanin</i>
g	<i>Erdbeschleunigung 9,81m/s<sup>2</sup></i>
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
GBF	<i>Gesellschaft für Biotechnologische Forschung</i>
GEBS	<i>Glycerin, EDTA, Bromphenolblau, Sarcosyl</i>
GFP	<i>green fluorescent protein; Grün-fluoreszierendes Protein</i>
GM-CSF	<i>Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor</i>
GTP	<i>Guanosintriphosphat</i>
hsp	<i>heat shock protein, Hitzeschockprotein</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IFU	<i>infection forming unit, infektiöse Einheiten</i>
IL	<i>Interleukin</i>
kb	<i>Kilobasen</i>
kbp	<i>Kilobasenpaare</i>

<i>kDa</i>	<i>Kilodalton</i>
<i>LB-Medium</i>	<i>Luria-Bertani-Medium</i>
<i>LDL</i>	<i>low density lipoprotein</i>
<i>LGV</i>	<i>Lymphogranuloma venereum</i>
<i>LPS</i>	<i>Lipopolysaccharid</i>
<i>MAdCAM</i>	<i>mucosalvascular addressin cell adhesion molecule</i>
<i>MCP</i>	<i>monocyte chemotactic protein</i>
<i>MHH</i>	<i>Medizinische Hochschule Hannover</i>
<i>min</i>	<i>Minuten</i>
<i>MOI</i>	<i>multiplicity of infection, Anzahl an infektiösen Einheiten pro Zelle</i>
<i>MOMP</i>	<i>major outer membrane protein</i>
<i>MOPS</i>	<i>3-(N-Morpholino)ethansulfonsäure</i>
<i>mRNA</i>	<i>messengerRNA</i>
<i>NCBI</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>NF</i>	<i>nukleärer Faktor</i>
<i>nm</i>	<i>Nanometer</i>
<i>OD</i>	<i>optische Dichte</i>
<i>Oligo</i>	<i>Oligonukleotid</i>
<i>ORF</i>	<i>open reading frame, offener Leserahmen</i>
<i>p.a.</i>	<i>pro Analysis</i>
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem, nach Infektion</i>
<i>PBMC</i>	<i>peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
<i>pH</i>	<i>negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration</i>
<i>PKC</i>	<i>Proteinkinase C</i>
<i>RK</i>	<i>Retikularkörperchen</i>
<i>RNA</i>	<i>Ribonukleinsäure</i>
<i>RT</i>	<i>Reverse Transkription, Raumtemperatur</i>
<i>SDS</i>	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
<i>sec</i>	<i>Sekunden</i>
<i>SMC</i>	<i>smooth muscle cells, glatte Muskelzellen</i>
<i>T</i>	<i>Thymin</i>
<i>TAE</i>	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>TGF</i>	<i>transforming growth factor, transformierender Wachstumsfaktor</i>
<i>TNF</i>	<i>Tumor-Nekrosefaktor</i>
<i>Tris</i>	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
<i>TRITC</i>	<i>Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat</i>
<i>TTP</i>	<i>Thymidintriphosphat</i>
<i>U</i>	<i>unit (Einheit der Enzymaktivität)</i>
<i>U</i>	<i>Uracil</i>
<i>UTP</i>	<i>Uridintriphosphat</i>
<i>UV</i>	<i>ultraviolett</i>
<i>UZ</i>	<i>Ultrazentrifuge</i>
<i>V</i>	<i>Volt</i>
<i>VCAM</i>	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
<i>VSMC</i>	<i>vascular smooth muscle cells, vaskuläre glatte Muskelzellen</i>
<i>v/v</i>	<i>Volumen pro Volumen bei Prozentangaben</i>
<i>w/v</i>	<i>Masse pro Volumen bei Prozentangaben</i>
<i>x-Gal</i>	<i>5-Bromo-4-chloro-indoyl-β-D-Galactosid</i>

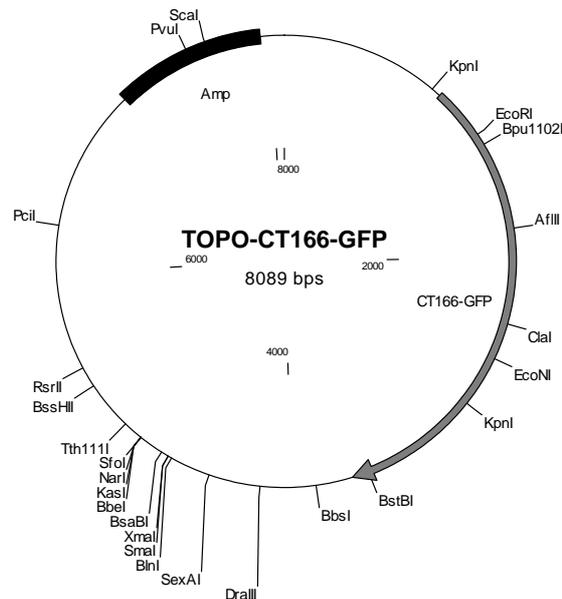
6 Anhang

Primer im CT166-Bereich



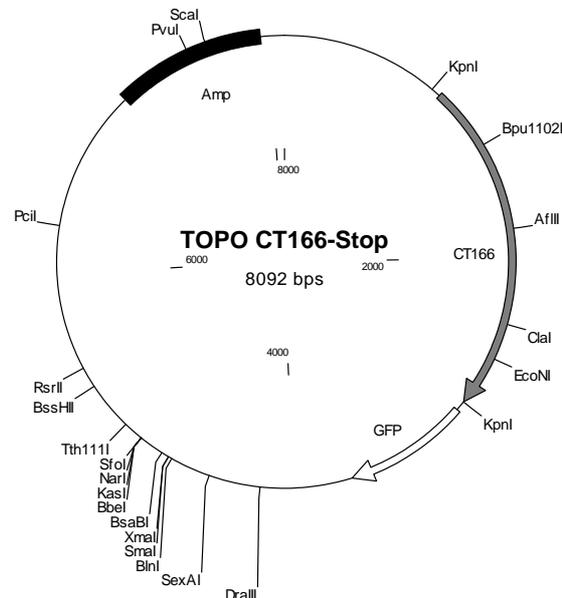
## Generierte Plasmide

### pcDNA 3.1 CT-GFP-TOPO CT166-GFP



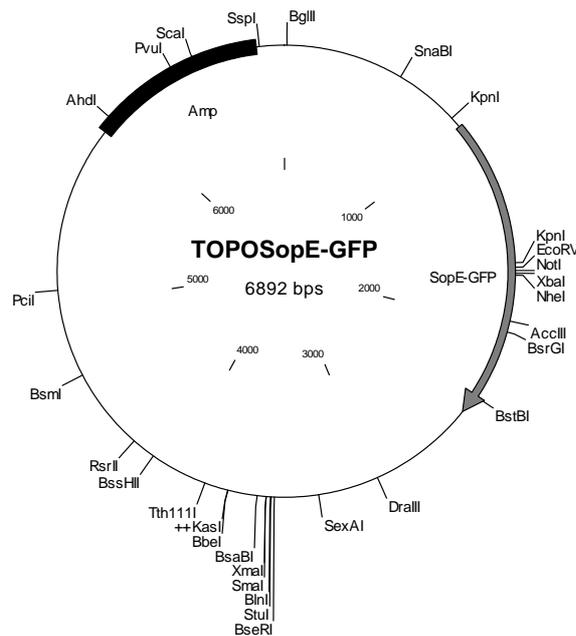
Das Insert für CT166 wurde aus genomischer DNA von *C. trachomatis* D/UW-3/Cx mit den Primern JP36 und JP37 amplifiziert und über TOPO-Cloning in den TOPO Vektor pcDNA3.1 CT-GFP inkliniert. Da kein Stop-Kodon bei CT166 vorhanden ist, wird dieses als Fusionsprotein mit dem C-terminalen GFP exprimiert. Die Sequenzierung zur Überprüfung des Inserts erfolgte durch MWG Biotech mit dem T7-Primer (MWG Biotech, Ebersberg), JP53 und JP54.

### pcDNA 3.1 CT-GFP-TOPO CT166-Stop



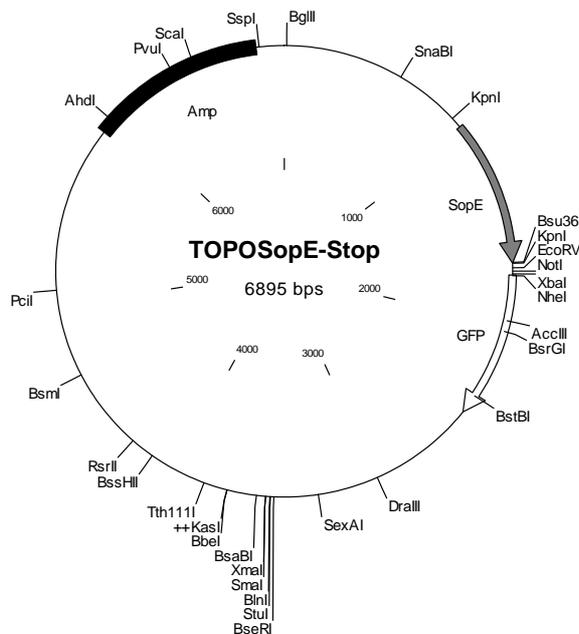
Das Insert für CT166 wurde aus genomischer DNA von *C. trachomatis* D/UW-3/Cx mit den Primern JP36 und JP38 amplifiziert und über TOPO-Cloning in den TOPO Vektor pcDNA3.1 CT-GFP inkliniert. Durch das Stop-Kodon wird nur CT166 exprimiert. Die Sequenzierung zur Überprüfung des Inserts erfolgte durch MWG Biotech mit dem T7-Primer (MWG Biotech, Ebersberg), JP53 und JP54.

### pcDNA 3.1 CT-GFP-TOPO SopE-GFP



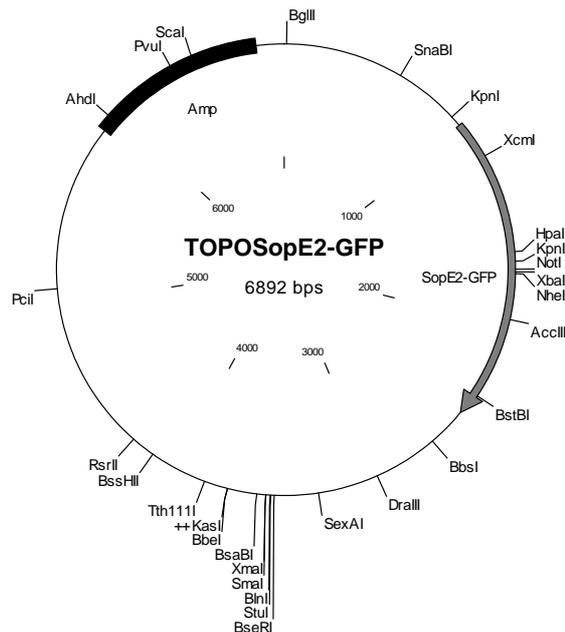
Das Insert für SopE wurde aus genomischer DNA von *S. dublin* mit den Primern JP30 und JP31 amplifiziert und über TOPO-Cloning in den TOPO Vektor pcDNA3.1 CT-GFP einkloniert. Da kein Stop-Kodon bei SopE vorhanden ist, wird dieses als Fusionsprotein mit dem C-terminalen GFP exprimiert. Die Sequenzierung zur Überprüfung des Inserts erfolgte durch MWG Biotech (Ebersberg) mit dem T7-Primer (MWG Biotech, Ebersberg) und JP54.

### pcDNA 3.1 CT-GFP-TOPO SopE-Stop



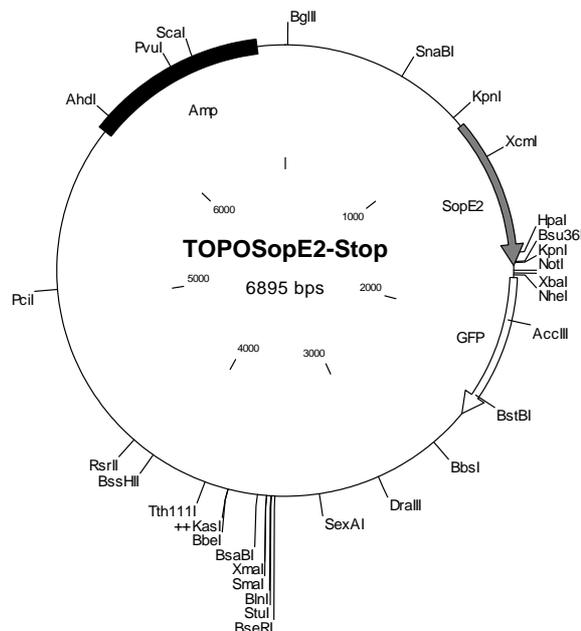
Das Insert für SopE wurde aus genomischer DNA von *S. dublin* mit den Primern JP30 und JP32 amplifiziert und über TOPO-Cloning in den TOPO Vektor pcDNA3.1 CT-GFP einkloniert. Durch das Stop-Kodon wird nur SopE exprimiert. Die Sequenzierung zur Überprüfung des Inserts erfolgte durch MWG Biotech (Ebersberg) mit dem T7-Primer (MWG Biotech, Ebersberg) und JP54.

### pcDNA 3.1 CT-GFP-TOPO SopE2-GFP



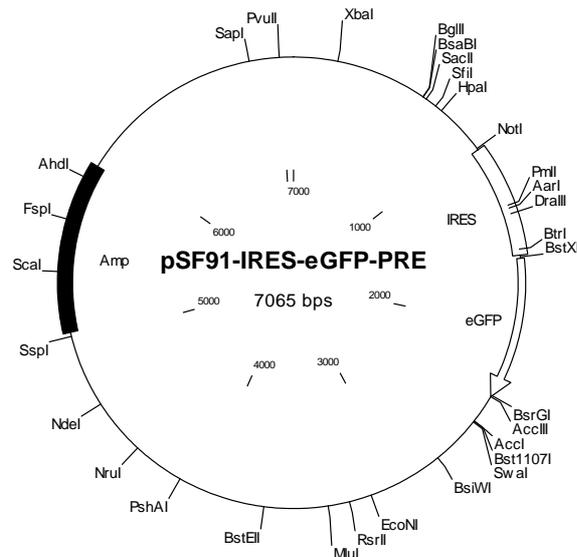
Das Insert für SopE2 wurde aus genomischer DNA von *S. typhimurium* mit den Primern JP33 und JP34 amplifiziert und über TOPO-Cloning in den TOPO Vektor pcDNA3.1 CT-GFP einkloniert. Da kein Stop-Kodon bei SopE2 vorhanden ist, wird dieses als Fusionsprotein mit dem C-terminalen GFP exprimiert. Die Sequenzierung zur Überprüfung des Inserts erfolgte durch MWG Biotech (Ebersberg) mit dem T7-Primer (MWG Biotech, Ebersberg) und JP54.

### pcDNA 3.1 CT-GFP-TOPO SopE2-Stop



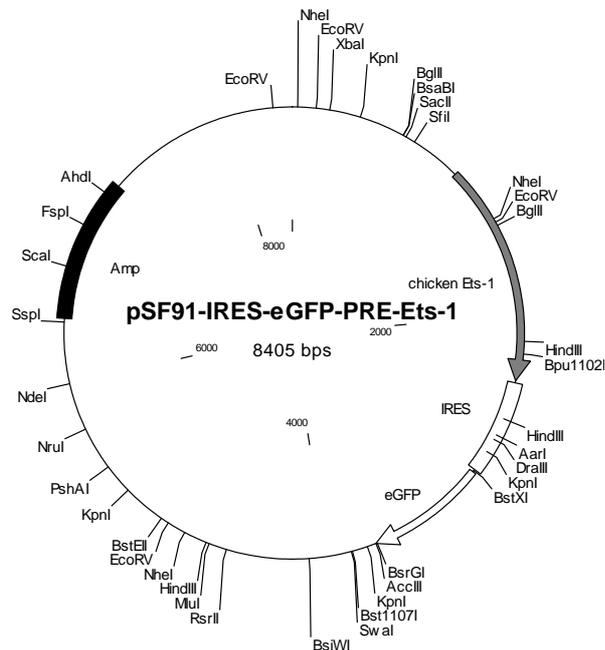
Das Insert für SopE2 wurde aus genomischer DNA von *S. typhimurium* mit den Primern JP33 und JP35 amplifiziert und über TOPO-Cloning in den TOPO Vektor pcDNA3.1 CT-GFP einkloniert. Durch das Stop-Kodon wird nur SopE2 exprimiert. Die Sequenzierung zur Überprüfung des Inserts erfolgte durch MWG Biotech (Ebersberg) mit dem T7-Primer (MWG Biotech, Ebersberg) und JP54.

### pSF91-IRES-eGFP-PRE



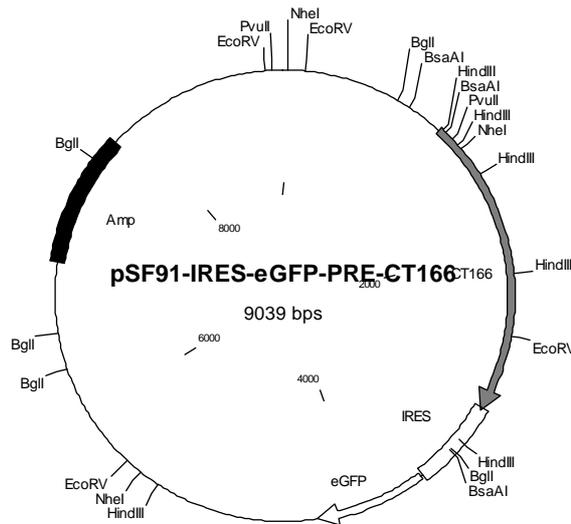
Ursprungsvektor aus der Arbeitsgruppe von Prof. Baum (Molekulargenetik, MHH). Der Vektor wurde zum Öffnen mit *NotI* geschnitten.

### pSF91-IRES-eGFP-PRE-ETS1



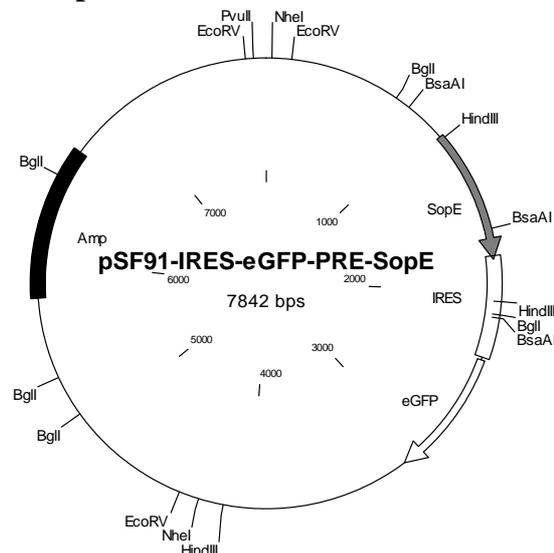
Das Insert chicken Ets-1 wurde mittels Restriktionsverdau (*EcoRI*) aus dem Vektor pcDNA3-Ets-1 herausgeschnitten. Der Vektor pSF91-IRES-eGFP-PRE wurde mit der Restriktionsendonuklease *NotI* verdaut. Anschließend wurden die 5'-Überhänge von Insert und Vektor mittels DNA-Polymerase I, Large Fragment Klenow aufgefüllt. Zur Dephosphorylierung des Vektors wurde die *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) eingesetzt. Das Insert wurde „blunt-end“ in den Vektor ligiert. Der Vektor wurde von Myriam Schaefer zur Verfügung gestellt.

### pSF91-IRES-eGFP-PRE-CT166

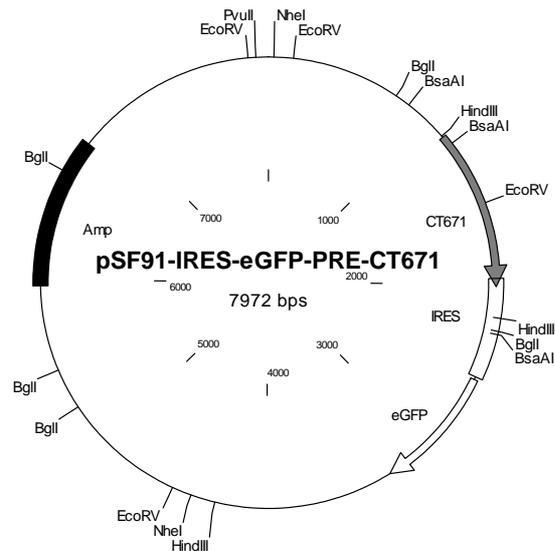


Das Insert CT166 wurde mittels Restriktionsverdau (*KpnI*) aus dem Vektor pcDNA3.1 CT-GFP TOPO CT166-Stop herausgeschnitten. Der Vektor pSF91-IRES-eGFP-PRE wurde mit der Restriktionsendonuklease *NotI* verdaut. Anschließend wurden die 3'-Überhänge vom Insert mit T4-DNA-Polymerase abgedaut und die 5'-Überhänge vom Vektor mittels DNA-Polymerase I, Large Fragment Klenow aufgefüllt. Zur Dephosphorylierung des Vektors wurde die *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) eingesetzt. Das Insert wurde „blunt-end“ in den Vektor ligiert. Die Sequenzierung des Inserts erfolgte durch MWG Biotech (Ebersberg) mit den Primern MS25, MS26 und JP53.

### pSF91-IRES-eGFP-PRE-SopE



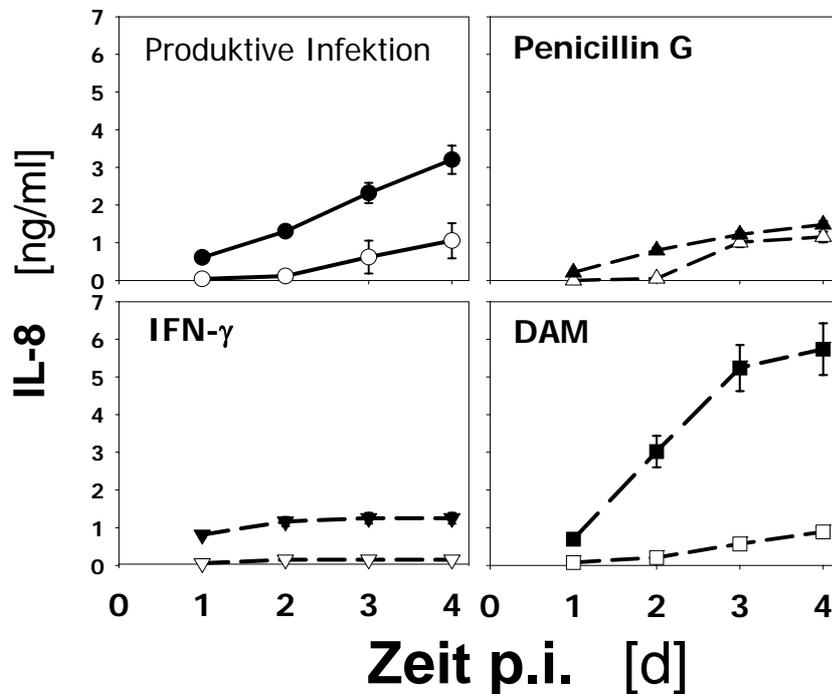
Das Insert SopE wurde mittels Restriktionsverdau (*KpnI*) aus dem Vektor pcDNA3.1 CT-GFP TOPO CTSopE-Stop herausgeschnitten. Der Vektor pSF91-IRES-eGFP-PRE wurde mit der Restriktionsendonuklease *NotI* verdaut. Anschließend wurden die 3'-Überhänge vom Insert mit T4-DNA-Polymerase abgedaut und die 5'-Überhänge vom Vektor mittels DNA-Polymerase I, Large Fragment Klenow aufgefüllt. Zur Dephosphorylierung des Vektors wurde die *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) eingesetzt. Das Insert wurde „blunt-end“ in den Vektor ligiert. Die Sequenzierung des Inserts erfolgte durch MWG Biotech (Ebersberg) mit den Primern MS25 und MS26.

**pSF91-IRES-eGFP-PRE-CT671**

Das Insert CT671 wurde mittels Restriktionsverdau (*KpnI*) aus dem Vektor pcDNA3.1 CT-GFP TOPO CT671-dStop herausgeschnitten. Der Vektor pSF91-IRES-eGFP-PRE wurde mit der Restriktionsendonuklease *NotI* verdaut. Anschließend wurden die 3'-Überhänge vom Insert mit T4-DNA-Polymerase abgedaut und die 5'-Überhänge vom Vektor mittels DNA-Polymerase I, Large Fragment Klenow aufgefüllt. Zur Dephosphorylierung des Vektors wurde die *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) eingesetzt. Das Insert wurde „blunt-end“ in den Vektor ligiert. Die Sequenzierung des Inserts erfolgte durch MWG Biotech (Ebersberg) mit den Primern MS25 und MS26.

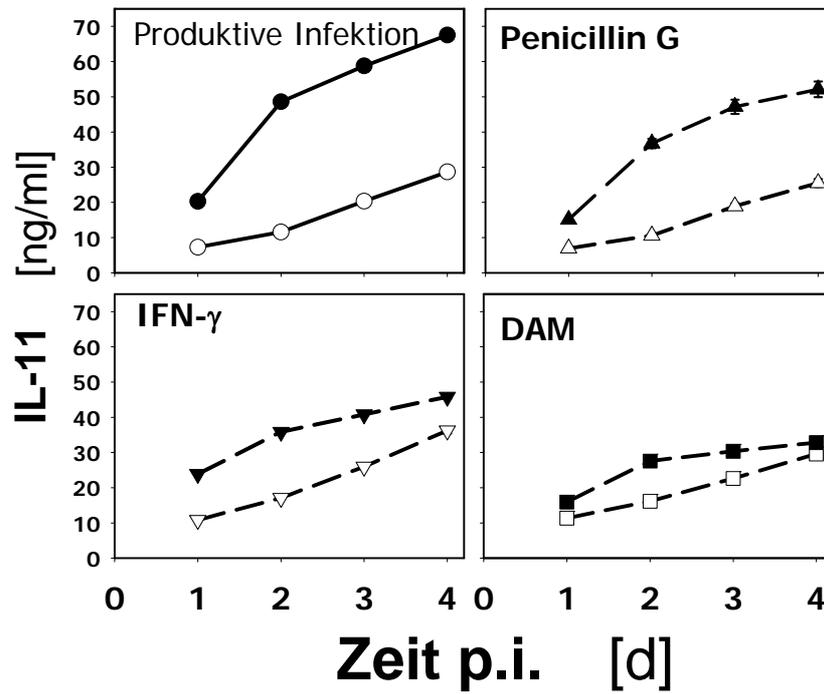
## Zytokin-Sekretion bei persistierender Infektion (2.unabhängiges Experiment)

### IL-8



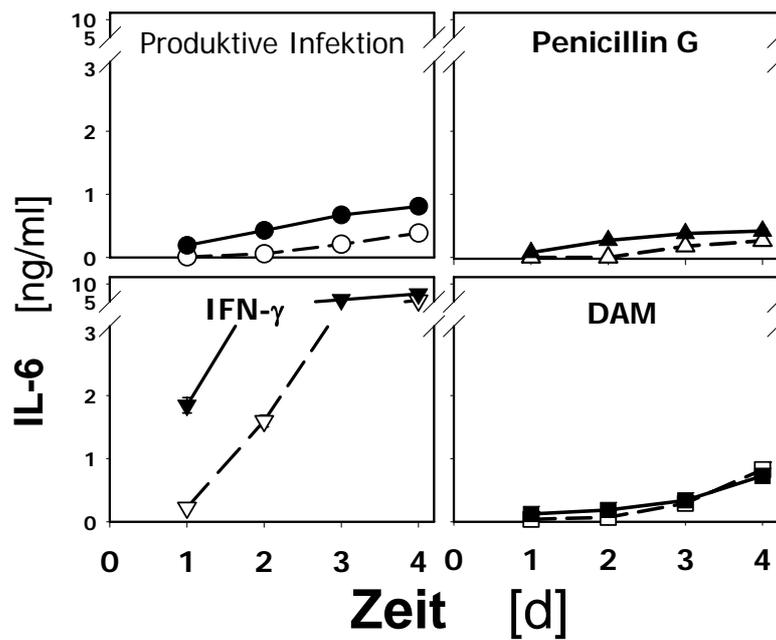
Dargestellt ist der Verlauf der IL-8 Sekretion von Tag 1 bis Tag 4 nach Infektion aus den Überständen von schein-infizierten (offene Symbole) und infizierten (geschlossene Symbole) HeLa-Zellen mit MOI 30 von *C. pneumoniae*. Verglichen wird die freigesetzte Menge an IL-8 während produktiver Infektion (Kreis-Symbol, durchgezogene Linie) und bei Persistenz (gestrichelte Linie) von *C. pneumoniae* durch 250  $\mu$ M DAM (Quadrat-Symbol), 100 U/ml IFN- $\gamma$  (Dreieck-Symbol, Spitze nach unten) oder 500 U/ml Penicillin G (Dreieck-Symbol, Spitze nach oben). Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines biologischen Replikats mit Doppelwerten.

## IL-11



Beschreibung und Legende, siehe Zytokin-Sekretion bei persistierender Infektion, IL-8

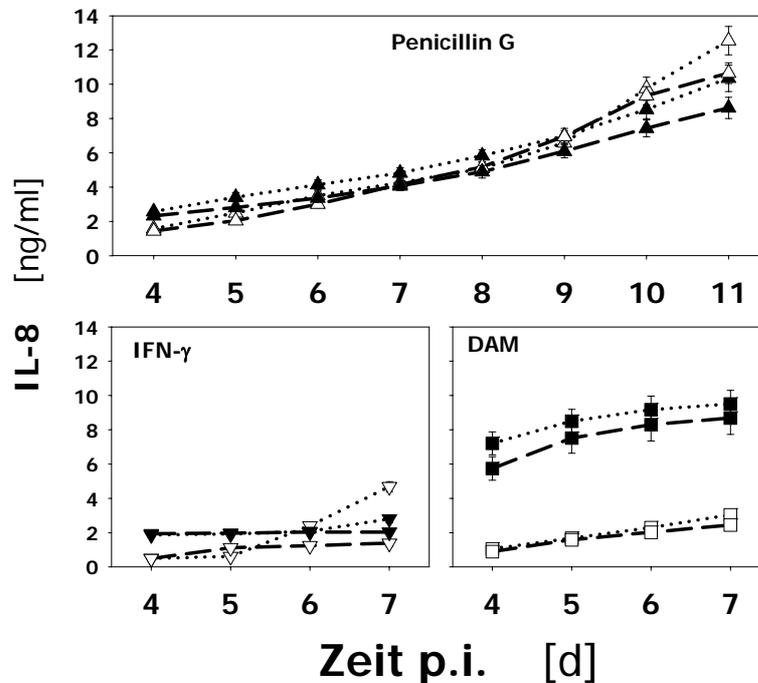
## IL-6



Beschreibung und Legende, siehe Zytokin-Sekretion bei persistierender Infektion, IL-8

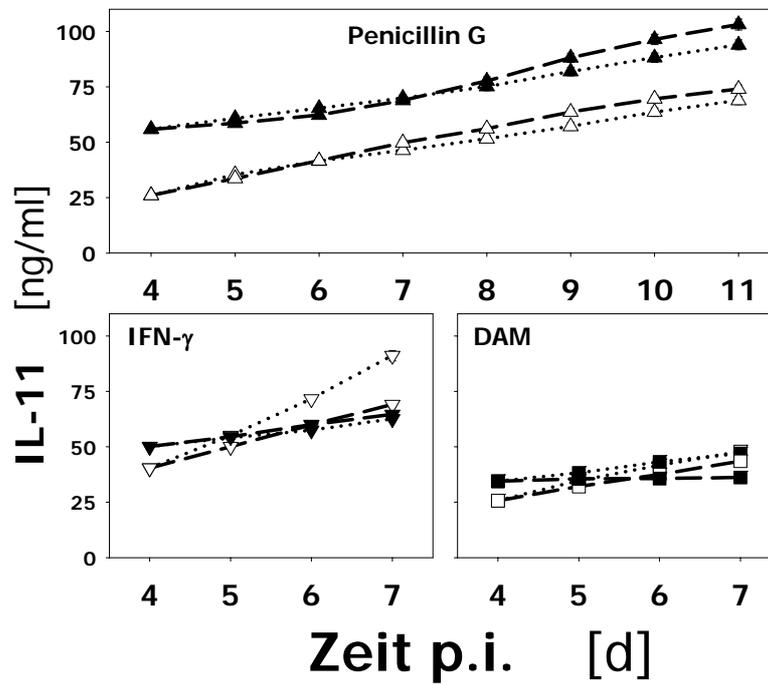
## Zytokin-Sekretion nach Reaktivierung (2.unabhängiges Experiment)

### IL-8



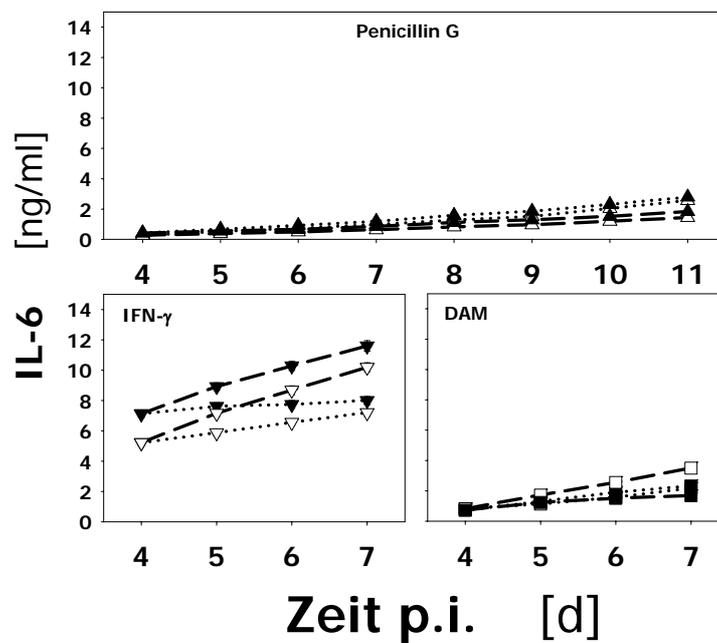
Dargestellt ist der Verlauf der IL-8 und IL-11 Sekretion von Tag 4 bis Tag 7, für Penicillin G von Tag 4 bis 11 nach Infektion aus den Überständen von schein-infizierten (offene Symbole) und infizierten (geschlossene Symbole) HeLa-Zellen mit MOI 30 während persistierender Infektion (gestrichelte Linien) und nach Reaktivierung (gepunktete Linien). Verglichen wurde die IL-8 bzw. IL-11 Freisetzung bei Persistenz und nach Reaktivierung in den 3 Modellen: Persistenz mit 250  $\mu$ M DAM während der Infektion und nach 4 Tagen p.i. Reaktivierung mit 800  $\mu$ g/ml Holotransferrin (Quadrat-Symbol), Persistenz mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  30 min nach Infektion und Reaktivierung mit 200  $\mu$ g/ml L-Tryptophan (Dreieck-Symbol, Spitze nach unten) sowie Persistenz mit 500 U/ml Penicillin G und Reaktivierung durch Mediumwechsel ohne Zusätze (Dreieck-Symbol, Spitze nach oben). Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines biologischen Replikats mit Doppelwerten.

## IL-11



Beschreibung und Legende siehe Zytokin- Sekretion nach Reaktivierung: IL-8

## IL-6



Beschreibung und Legende siehe Zytokin- Sekretion nach Reaktivierung: IL-8



## Lebenslauf

### Von Dipl. Biochem. Jan Peters

Geburtstag/-ort: 22.02.1976 in Hannover/Niedersachsen  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Familienstand: ledig

#### Schulbildung:

1981 – 1982 Vorschule Eichendorffschule, Hannover  
 1982 – 1986 Grundschule Eichendorffschule, Hannover  
 1986 – 1988 Orientierungsstufe Ahlem, Hannover  
 1988 – 1995 Gymnasium Tellkampfschule, Hannover  
 5/1995 Abitur

#### Wehrdienst:

10/1995 – 12/1995 Grundwehrdienst bei Panzeraufklärerlehrbattalion 11, Munster  
 12/1995 – 8/1996 Truppendienst bei Panzerpionierlehrkompanie 90

#### Berufliche Ausbildung/Studium:

10/1996 – 3/2001 Studium Biochemie (Diplom)  
 9/1998 Vordiplom Biochemie  
 9/2000 mündliche Diplomprüfung  
 Prüfungsfächer: Biochemie, Biophysikalische Chemie,  
 Medizinische Mikrobiologie  
 zusätzliche Prüfung: Immunologie

10/2000 – 3/2001 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Medizinische  
 Mikrobiologie mit dem Thema „Untersuchungen zur Transkription  
 und Expression chlamydialer Gene.“

3/2001 Abgabe der Diplomarbeit und Beendigung des Studiums  
 Biochemie mit Abschluss Diplom Biochemiker (Dipl. biochem.)

5/2001 Wissenschaftliche Hilfskraft der Medizinischen Hochschule  
 Hannover bei Herrn Prof. Dr. Zühlke

6/2001 – 12/2004 Anfertigung der Promotion am Institut für Medizinische  
 Mikrobiologie und Krankenhaushygiene unter der Leitung von  
 Herrn Prof. Dr. Bitter-Suermann (bis April 2004) und Herrn  
 Prof. Dr. Suerbaum (ab April 2004) mit dem Thema:  
**„Wirtszellantworten auf intrazelluläre Bakterien: Chlamydiale  
 Persistenz und vergleichende Analyse von *S. typhimurium* zu Chlamydien  
 in der produktiven Infektion“**



## Verzeichnis eigener Publikationen

### **Bisherige Publikationen:**

Hess S, **Peters J**, Bartling G, Rheinheimer C, Hegde P, Magid-Slav M, Tal-Singer R, Klos A.: More than just innate immunity: comparative analysis of *Chlamydomphila pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* effects on host-cell gene regulation; *Cell Microbiol.* 2003 Nov; 5 (11):785-95

**Peters, J**, Heß, S, Endlich, K, Thalmann, J, Holzberg, D, Kracht Bartling, G., Klos, A.: Hide-and-seek: Host-cell responses in models of persistent *Chlamydomphila pneumoniae* infection; *Cell Microbiol.*, (eingereicht zur Publikation)

### **Abstracts:**

**Peters, J.**, Heß, S., Endlich, K., Bartling, G., Klos, A.: Hide-and-seek: Host-cell responses in models of persistent *Chlamydomphila pneumoniae* infection; 2. *Deutscher Chlamydienworkshop*, Berlin, März 2004 (Vortrag)

**Peters, J.**, Heß, S., Endlich, K., Thalmann, J.; Bartling, G., Klos, A.: Hide-and-seek: Host-cell responses in models of persistent *Chlamydomphila pneumoniae* infection; *5th Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Budapest*, September 2004 (Poster und Vortrag)

**Peters, J.**, Heß, S., Endlich, K., Thalmann, J.; Bartling, G., Klos, A.: Hide-and-seek: Host-cell responses in models of persistent *Chlamydomphila pneumoniae* infection; *56. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie*, Münster, September 2004, veröffentlicht in *International Journal of Medical Microbiology*; **294S1**, IIP001 (Poster)

Heß S., **Peters, J.**, 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 (Vortrag)

Heß S., **Peters, J.**; 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; 1. *Deutscher Chlamydienworkshop*, Berlin, Februar 2003 (Vortrag)

Endlich, K.; **Peters, J.**; Heß, S.; Bartling, G.; Klos, A.: Host-cell responses in models of persistent *C. pneumoniae* infection; *55. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie*, Dresden, September 2003; veröffentlicht in *International Journal of Medical Microbiology*; **293**, Suppl. No. 36: MP073 (Poster)



## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bitter-Suermann sowie Herrn Prof. Dr. Suerbaum möchte ich für die Möglichkeit danken, die vorliegende Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Müller danke ich für die Übernahme der Doktorvaterschaft, der hervorragenden Betreuung im Studium und der unermüdlichen Unterstützung während der Doktorarbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Andreas Klos möchte ich mich bedanken für seine engagierte Betreuung meiner Arbeit, dem mir gewährten Freiraum bei der Ausführung meiner Experimente, seinem Ideenreichtum, der stetigen Diskussionsbereitschaft und der wertvollen, konstruktiven Kritik bei der Korrektur dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt den ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Klos (Bettina Sohns, Britta Settmacher, Camilla Dietrich, Felicitas Tidow, Henning Hamacher, Claudia Rheinheimer, Gerda Bartling, Simone Heß, Myriam Schaefer, Katja Endlich, Jessica Thalmann und Kay Johswich) für die schönen Jahre im Institut, der Arbeit im Team, die tatkräftige Unterstützung und den gemeinsamen Stunden im und außerhalb des Labors. Im Einzelnen danke ich:

Claudia für ihre Hilfestellungen bei Versuchen und für ihr fachliches Wissen.

Gerda für ihren tatkräftigen Beistand bei Experimenten und Camilla für die Chlamydien-Stöcke

Steffi für ihre Ruhe und Hilfsbereitschaft sowie Myriam für ihre wertvollen Vorschläge und den Korrekturen dieser Arbeit

Katja und Jessica für die gemeinsam verbrachte Zeit im S2-Labor und der schönen Zusammenarbeit.

Simone für das Zuhören, Mitdenken und der moralischen Unterstützung während der gesamten Zeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene danke ich für die tolle Atmosphäre und die unermüdliche Hilfsbereitschaft

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den Kooperationspartnern bedanken:

Prof. Dr. Jan Buer die Möglichkeit der Affymetrix Micro-Array Analyse an der GBF und der Bereitstellung der Affymetrix Chips, sowie Tanja Toepfer und Dr. Jörg Lauber für ihre Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Arrays.

Prof. Dr. Hensel und Prof. Dr. Hück für die Zusammenarbeit bei den Salmonellen- Experimenten und die Bereitstellung von Salmonellen, Antikörpern und Protokollen.

Agnes Szczepek und Hesham Al-Younes für ihre Hilfe beim Aufbau des DAM-Persistenzmodells.

P.D. Dr. Fred Hofmann und P.D. Dr. Harald Genth für die Zusammenarbeit bei den Zytoskelett-Veränderungen und der Nutzung des Fluoreszenz-Mikroskops.

Herzlich danken möchte ich auch:

Anja für die Telefonate und Treffen, die meine Gedanken in andere Bahnen gelenkt haben.

Patrick für die großartige Freundschaft, die vielen Abende bei Essen und Wein und seiner uneingeschränkten Hilfsbereitschaft.

Schlussendlich möchte ich meinen Eltern für ihre tatkräftige Unterstützung und die viele geopfert Zeit, vor allem in den letzten Monaten der Doktorarbeit, sowie für das Korrekturlesen der Arbeit danken.



### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Wirtszellantworten auf intrazelluläre Bakterien: Chlamydiale Persistenz und vergleichende Analyse von *S. typhimurium* zu Chlamydien in der produktiven Infektion" 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, Dezember 2004

(Jan Peters)



