Aus der Medizinischen Klinik mit dem Schwerpunkt Infektiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mechanismen der Zielzellaktivierung durch *Chlamydia trachomatis* Serovar K

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Theresa Grobe

aus Berlin

Datum der Promotion: 22.06.2014

Zusammenfassung

Infektionen mit *Chlamydia trachomatis* gehören weltweit zu den häufigsten sexuell übertragbaren Erkrankungen. Sie resultieren in inflammatorischen Erkrankungen wie Zervizitis, Endometritis und Salpingitis. Letztere kann zu ektopen Schwangerschaften und Infertilität führen. Zudem ist *C. trachomatis* Auslöser des Trachoms, eines der häufigsten Ursachen für Erblindung. All diese Erkrankungen sind charakterisiert durch Entzündungsreaktionen, die zu Gewebeschädigungen, Narbenbildung und Fibrose führen und damit die genannten Krankheiten zur Folge haben. Über die Mechanismen der Interaktion zwischen *C. trachomatis* und der Wirtszelle ist jedoch noch wenig bekannt. In dieser Arbeit wurde die Rolle der Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3K), der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) und des Transkriptionsfaktors NF-κB an der *C. trachomatis*- induzierten proinflammatorischen Wirtszellantwort untersucht. Die Infektion von HEp-2 Zellen mit *C. trachomatis* Serovar K (CTK) führte zu einem zeit- und dosisabhängigen Konzentrationsanstieg des proinflammatorischen Zytokins IL-8 im Zellkulturüberstand. Desweiteren wurde gezeigt, dass die Sekretion von IL-8 offenbar Zelltyp-spezifisch ist, da CTK keinen signifikanten Konzentrationsanstieg von IL-8 im Zellkulturüberstand humaner umbilikalvenöser Endothelzellen (HUVEC) verglichen mit *C. pneumoniae* TW183 induzierte. Darüber hinaus resultierte die Infektion von HEp-2 Zellen mit CTK in einer dosisabhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB. Interessanterweise waren dazu auch UV-inaktivierte CTK in der Lage.

Weiterhin wurde eine Phosphorylierung der MAPKinasen extracellular signal-related kinases (ERK1/2), p38 und c-Jun amino-terminal kinases (JNK) nach Infektion von HEp-2 Zellen mit CTK nachgewiesen. Die nachgewiesene NF-κB- Aktivierung und Translokation in den Zellkern war ebenso wie die konsekutive IL-8- Expression abhängig von der Aktivität der MAPK p38 und ERK1/2 sowie der PI3K, nicht jedoch von der JNK.

Diese Beobachtungen haben gezeigt, dass *C. trachomatis* Serovar K über die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege in humanen Epithelzellen nicht jedoch in endothelialen Zellen einen proinflammatorischen Phänotyp induziert.

Abstract

Chlamydia trachomatis is the most common cause of sexually transmitted disease. They typically induce asymptomatic lower genital tract infections, such as cervicitis, endometritis and salpingitis. Chronic infections can evolve with sequelae such as ectopic pregnancy and infertility. Moreover, *C. trachomatis* is the causative agent of trachoma, the leading cause of preventable blindness. Infection is characterized by inflammation which is exacerbated upon reinfection, leading to tissue damage and scarring. Little is known about the mechanisms of *C. trachomatis*-induced target cell alteration. In this study, we characterized *C. trachomatis*-mediated effects on host cells. Infection of HEp-2 cells leads to a time and dose-dependent expression of the inflammatory chemokine interleukin-8 (IL-8). While *C. trachomatis* was also able to infect endothelial cells, it did not induce the expression of endothelial IL-8. These effects were specific for a direct stimulation with viable *C. pneumoniae* TW183. Furthermore, *C. trachomatis* induce a dose-dependent expression of the transcription factor nuclear factor-κB (NF-κB) in HEp-2 cells. Interestingly UV-inactivated *C. trachomatis* had the same effect.

We also demonstrated enhanced phosphorylation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members extracellular receptor kinase (ERK1/2), p38-MAPK and c-Jun amino-terminal kinase (JNK). Moreover, enhanced activation of the Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks), the MAPKs and the NF-κB was shown. Subsequent IL-8 and NF-κB expression were dependent on PI3Ks, p38-MAPK and ERK1/2 activation as demonstrated by preincubation of HEp-2 cells with specific inhibitors for these pathways. Inhibition of the JNK had almost no effect on IL-8 and NF-κB expression.

Thus, *C. trachomatis* triggers an early signal transduction cascade in target cells that could lead to epithelial but not endothelial cell activation which in turn promote inflammation.

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung 7

1.1 Taxonomische Einteilung der Chlamydien 7

1.2 Entwicklungszyklus und Eigenschaften 8

1.3 Medizinische Bedeutung der Chlamydien 11

1.3.1 *Chlamydia trachomatis* 12

1.3.2 *Chlamydophila pneumoniae* 12

1.4 Intrazelluläre Signaltransduktion 13

1.4.1 Phosphatidylinositol 3-Kinasen 13

1.4.2 Mitogen-aktivierte Protein Kinasen 15

1.4.3 Der Transkriptionsfaktor NF-κB 17

1.5 Zytokin IL-8 20

1.6 Wirtszellaktivierung 21

1.7 Fragestellung 23

2 Methoden 24

2.1 Zellkultur 24

2.2 Anzucht von *Chlamydia trachomatis* 25

2.3 Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene 27

2.4 Infektionsexperimente 28

2.5 Interleukin-8-ELISA 31

2.6 Luciferase Assay 32

2.7 Western Blot 34

2.8 Statistische Auswertung 36

3 Ergebnisse 37

3.1 *Chlamydia trachomatis* infiziert HEp-2 Zellen 37

3.2 UV-inaktivierte *C. trachomatis* infiziert nicht HEp-2 Zellen 38

3.3 *Chlamydia trachomatis* infiziert HUVEC 39

3.4 Zytokininduktion durch *C. trachomatis* Serovar K 40

3.4.1 IL-8- Sekretion nach Infektion von HEp-2 Zellen mit *C. trachomatis* 40

3.4.2 Vergleich der IL-8- Induktion nach Infektion mit *C. trachomatis* und *Chlamydophila pneumoniae* TW183 in HUVEC 43

3.5 Aktivierung von NF-κB durch *C. trachomatis* 45

3.6 Aktivierung von NF-κB durch UV-inaktivierte *C. trachomatis* 47

3.7 Phosphorylierung der MAP-Kinasen nach Infektion von HEp-2 Zellen mit *C. trachomatis* 49

3.8 Modifikation der *C. trachomatis*- induzierten Zytokin-Induktion durch MAP-Kinase-Inhibitoren und PI 3-Kinase-Inhibitor 52

3.8.1 Hemmung der IL-8- Induktion durch p38- und ERK1/2-MAPK-Inhibitor 52

3.8.2 Hemmung der IL-8- Induktion durch JNK- und PI 3-Kinase-Inhibitor 54

3.9 Modifikation der *C. trachomatis*- induzierten NF-κB- Aktivierung durch MAP-Kinase-Inhibitoren und PI 3-Kinase-Inhibitor 56

3.9.1 Hemmung der NF-κB- Aktivierung durch p38- und ERK1/2-MAPK-Inhibitor 56

3.9.2 Hemmung der NF-κB- Aktivierung durch JNK- und PI 3-Kinase-Inhibitor 58

4 Diskussion 60

4.1 Bedeutung des proinflammatorischen Phänotyps 60

4.2 Unterschiede der Zielzellaktivierung durch *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* 62

4.3 Bedeutung der verschiedenen Kompartimente der Signaltransduktion 64

4.4 Ausblick 70

5 Literaturverzeichnis 71

6 Anhang 89

6.1 Materialien 89

6.1.1 Chemikalien 89

6.1.2 Geräte 91

6.1.3 Zubehör 91

6.1.4 Antikörper für Westernblot 92
6.1.5 Proteinkinase-Inhibitoren 92
6.1.6 Nährmedien 93
6.1.7 Puffer und Lösungen 94
6.2 Abkürzungsverzeichnis 97

7 Eidesstattliche Erklärung 100

8 Lebenslauf 102

9 Publikationen 104

10 Danksagung 105

1 Einleitung

Chlamydien sind Gram-negative, obligat intrazelluläre Bakterien mit einem biphasischen Entwicklungszyklus. Als humanpathogene Erreger gehören sie weltweit zu den häufigsten Krankheitserregern und kommen ubiquitär vor. Infektionen verlaufen häufig inapparent. Zudem sind persistierende Chlamydieninfektionen häufig. Antibiotische Monotherapien haben sich in klinischen Studien als nur unzureichend wirksam erwiesen [1-3]. Voraussetzung für weitere Therapiestudien ist daher die Identifizierung der Mechanismen, die in die Pathogenese und Progression chlamydialer Infektionen involviert sind.

1.1 Taxonomische Einteilung der Chlamydien

Bis 1999 umfasste die Ordnung *Chlamydiales* mit den *Chlamydiaceae* nur eine Familie und mit *Chlamydia* nur eine Gattung, die in die vier Arten *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* sowie *C. pecorum* unterteilt wurde [4]. Basierend auf 16S und 23S rRNA-Sequenzanalysen erfolgte Ende der 90er Jahre die Reklassifikation der Chlamydien [5, 6]. Die neue Taxonomie gliedert *Chlamydiales* in die vier Familien *Chlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Parachlamydiaceae* und *Waddliaceae*. Desweiteren beinhaltet die Familie *Chlamydiaceae* nun zwei Gattungen: *Chlamydia* und *Chlamydophila*. *Chlamydia* umfasst drei Arten, darunter *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila* beinhaltet neben *Chlamydophila pneumoniae* noch fünf weitere Arten (s. Abb. 1.1).

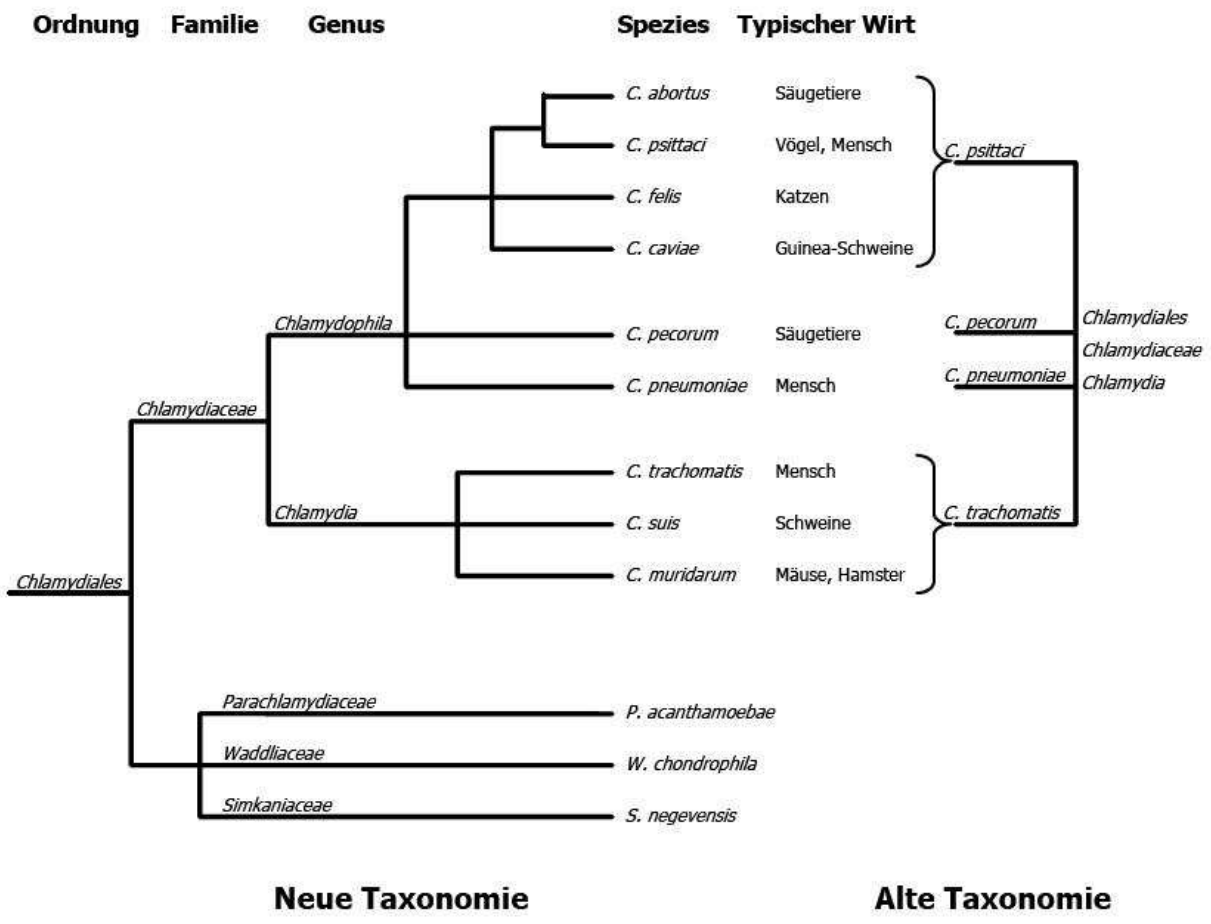


Abb. 1.1: Neue und alte Taxonomie der *Chlamydiales* im Vergleich

Links: Neue Taxonomie der Chlamydiales nach der Reklassifikation von 1999. Rechts: Alte Taxonomie. Graphik modifiziert [5, 7]. Die Länge der Linien ist nicht proportional zu den tatsächlichen phylogenetischen Distanzen.

1.2 Entwicklungszyklus und Eigenschaften

Chlamydien sind Gram-negative, obligat intrazelluläre Bakterien, deren Entwicklung durch einen biphasischen Entwicklungszyklus gekennzeichnet ist. In diesem treten Chlamydien in zwei Erscheinungsformen auf, die an das extrazelluläre Überleben und die intrazelluläre Vermehrung angepasst sind. Die extrazelluläre Form heißt Elementarkörperchen (EK) und die intrazelluläre Form wird Retikularkörperchen (RK) genannt [8]. EK haben einen Durchmesser von 0,3 µm, sind osmotisch stabil sowie metabolisch inaktiv und stellen die infektiöse Form der Chlamydien dar. Aufgrund ihrer

widerstandsfähigen Zellwand ist das Überleben in der Umwelt möglich. Nach Adhäsion an und Eindringen in die Zelle via Phagozytose oder rezeptorvermittelter Endozytose gelangen die EK in Vakuolen. Aufgrund verschiedener, bisher noch nicht im Detail identifizierter Mechanismen entziehen sich diese Vakuolen einer Fusion mit den Phagolysosomen [9-11]. In diesen Vakuolen (sog. Einschlusskörperchen) transformieren die EK innerhalb von zwei Stunden nach Eintritt in die Zelle zu RK. Diese stellen die nicht infektiöse, replikative Form der Chlamydien dar. Sie sind größer (0,8-1,0 µm) und besitzen eine dünnere, permeablere Zellwand als die EK, sind metabolisch aktiv und vermehren sich durch binäre Teilung. Zum Ende des Entwicklungszyklus dekondensieren RK wieder zu EK.

Die Dauer des Entwicklungszyklus ist speziesabhängig: bei *C. pneumoniae* dauert er ca. 72-96 h, bei *C. trachomatis* ca. 32-48 h. Schließlich werden die EK durch Lyse der Zelle oder Exozytose freigesetzt [12] (s. Abb. 1.2).

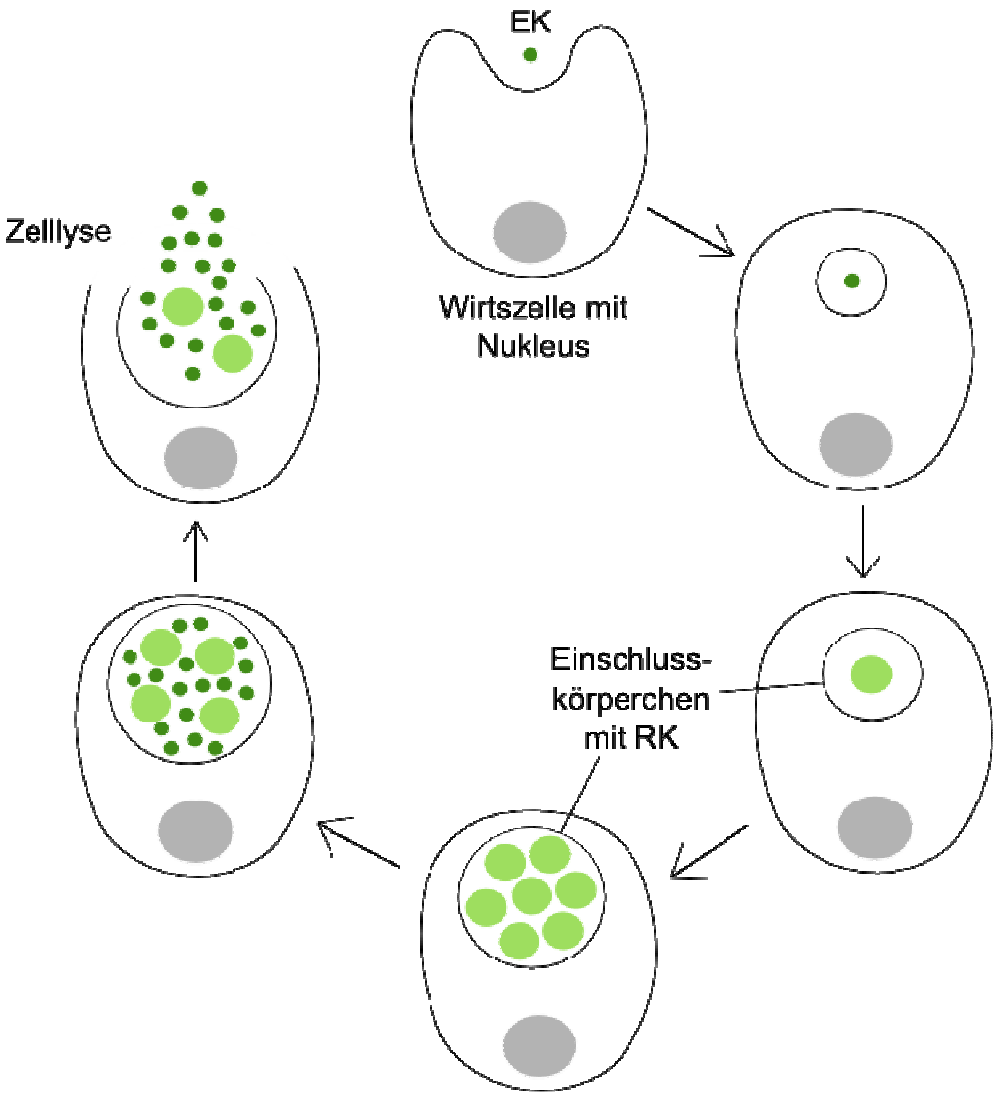


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des chlamydialen Entwicklungszyklus

Der gesamte Entwicklungszyklus findet im sogenannten Einschlusskörperchen statt. Nach Adhäsion und Internalisierung der Elementarkörperchen (EK) transformieren diese zu metabolisch aktiven Retikularkörperchen (RK). Es erfolgt die Vermehrung der RK durch binäre Teilung und schließlich ihre Dekondensation zu EK. Diese werden durch die Lyse der Zielzelle freigesetzt. Die Dauer des Entwicklungszyklus ist speziesabhängig und beträgt für *C. trachomatis* 32-48 h und für *C. pneumoniae* 72-96 h.

Chlamydien verfügen über viele Stoffwechselwege der Prokaryonten zur Synthese von Proteinen, DNA, RNA und Phospholipiden. Ursprünglich wurden Chlamydien als Energieparasiten beschrieben, die ihren Energiebedarf über ATP der Wirtszelle decken [8]. Das Vorhandensein ADP/ATP-Translokasen kodierender Gene im Genom von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* bestätigen diese Hypothese [13, 14]. Darüber hinaus konnten jedoch auch Gene identifiziert werden, die für ATPasen, Phosphoglyceratkinasen, Pyruvatkinasen und Succinat-Thiokinasen kodieren, so dass Chlamydien offenbar die Fähigkeit besitzen selbst ATP zu synthetisieren [14]. Somit scheinen sie keine obligaten Energieparasiten zu sein.

Das Genom von Chlamydien ist relativ klein. *C. trachomatis* enthält mit 1,0 Mbp ein etwas kleineres Genom als *C. pneumoniae* mit 1,2 Mbp [13, 14]. Von den 1073 für Proteine kodierenden Genen in *C. pneumoniae* konnten für 214 keine homologen Sequenzen im Genom von *C. trachomatis* gefunden werden. Umgekehrt besitzt *C. trachomatis* 70 Gene, die in *C. pneumoniae* nicht vorkommen. Diese speziespezifischen Gene könnten ursächlich für Unterschiede hinsichtlich Biologie, Wirtszelltropismus und Pathogenese von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* sein. So besitzt *C. pneumoniae* beispielsweise eine höhere Invasivität und kann in einem breiteren Spektrum an Wirtszellen überleben als *C. trachomatis* [13].

1.3 Medizinische Bedeutung der Chlamydien

Als humanpathogene Erreger für eine Reihe von Erkrankungen fungieren vor allem *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*. Aber auch *Chlamydophila psittaci* und *Chlamydophila pecorum,* die in erster Linie Vögel und Säugetiere infizieren, können nach Übertragung auf den Menschen zu schweren Krankheiten wie Pneumonie und Psittakose führen [15].

1.3.1 *Chlamydia trachomatis*

Infektionen mit *C. trachomatis* gehören weltweit zu den häufigsten sexuell übertragenen Erkrankungen mit geschätzten 90 Millionen Krankheitsfällen jährlich [16]. Zudem ist der Erreger Auslöser des Trachoms, eines der häufigsten Ursachen für Erblindung weltweit [17].

C. trachomatis umfasst zwei für den Menschen bedeutsame Biovare, die sich in weitere Serovare unterteilen: Trachoma und Lymphogranuloma venereum (LGV). Die Trachom-Serovarianten A, B und C sind ursächlich für die okulären Infektionen, die zu Vernarbungen der Kornea und damit zu Erblindung führen können. Die Serovare D bis K sowie L1 bis L3 infizieren Zellen des Urogenitaltrakts. Sie können neben den Epithelien des Genitaltrakts auch lokale Monozyten befallen und damit in Folge zu einer systemischen Erkrankung, dem Lymphogranuloma venereum führen [15, 18]. Die Serovare D bis K verursachen milde Formen genitaler Infektionen wie Urethritis und Zervizitis. Im Verlauf können sie jedoch mit Komplikationen wie Endometritis und Salpingitis assoziiert sein und zu Infertilität und ektopen Schwangerschaften führen [15]. Diese verschiedenen Erkrankungen sind charakterisiert durch chronische Entzündungsreaktionen, die Gewebeschädigungen, Narbenbildung und Fibrose hervorrufen [19].

Darüber hinaus werden chlamydiale Infektionen des Genitaltrakts mit einem erhöhten Risiko für die Übertragung des Humanen Immundefizienz Virus verbunden [20].

1.3.2 *Chlamydophila pneumoniae*

C. pneumoniae verursacht vor allem Infektionen des Respirationstrakts und wird durch Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch übertragen. 90 % dieser Infektionen verlaufen asymptomatisch, andere führen über Erkältungssymptome bis hin zu Bronchitis und Pneumonie [21]. Verschiedenste chronische Erkrankungen wie Sarkoidose und hiläre Lymphadenopathie [22], Guillain-Barré Syndrom, Multiple Sklerose [23] und Lungenkrebs [24] wurden mit *C. pneumoniae* in Zusammenhang gebracht. Hierzu liegen bisher allerdings nur Fallberichte und kleinere Studien vor, die keine wirkliche Aussage erlauben.

Die hohe Seroprävalenz von etwa 50 % bei 20jährigen, die mit zunehmendem Alter Werte von 70-80 % erreicht, legt nahe, dass so gut wie jeder Mensch im Laufe des

Lebens eine Infektion mit *C. pneumoniae* durchmacht. Reinfektionen sind trotz alledem häufig [25, 26].

C. pneumoniae wird zudem als möglicher Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose diskutiert [27]. Der Erreger konnte in atheromatösen Plaques und Gefäßen von KHK- und Schlaganfallpatienten nachgewiesen werden [28]. Andere Studien zeigten hingegen keine signifikante Korrelation [29, 30]. Letztlich bleibt die Frage offen, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *C. pneumoniae* im atherosklerotisch veränderten Gewebe und der Erkrankung besteht.

1.4 Intrazelluläre Signaltransduktion

Die Übertragung von Informationen von der Zelloberfläche in den Zellkern sowie die intrazelluläre Kommunikation läuft über eine Vielzahl verschiedener Signalübertragungskaskaden. In einem ersten Schritt lässt sich meist die Aktivierung eines membrangebundenen oder transmembranösen Rezeptors nachweisen, der durch die Bindung extrazellulärer Liganden in seiner Konformation modifiziert wird. Über assoziierte membran- und rezeptorgebundene G-Proteine, zwischengeschaltete weitere „second messenger“ wird dann die Aktivität einer Kaskade von Proteinkinasen und -phosphatasen gesteuert. Hierüber folgt eine Modifizierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Expression spezifischer Genprodukte im Zellkern regulieren [31].

1.4.1 Phosphatidylinositol 3-Kinasen

Die Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3K) sind eine Gruppe von Lipidkinasen, die als second messengers an einer Reihe von biologischen Prozessen beteiligt sind wie Zellwachstum, Regulation von Apoptosevorgängen, Änderungen des Zytoskeletts sowie Vesikeltransport [32]. Desweiteren sind sie an der Regulation verschiedener Entzündungsprozesse und -kaskaden beteiligt [33].

Diese Enzymgruppe katalysiert die Phosphorylierung der 3'-OH Position am Inositolring ihrer Phospholipidsubstrate. Die phosphorylierten Substrate regulieren wichtige zelluläre Prozesse wie beispielsweise den Proteintransport vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen [34]. Desweiteren aktivieren sie Enzymkaskaden, die wichtig für Proliferations- und Differenzierungsvorgänge und somit bedeutend für die Regulation des Zellzyklus und der Proteinbiosynthese sind. Zudem wird eine Funktion der PI3K in Tumorvorgängen und in mitotischen Signaltransduktionen angenommen, da 3-

phosphorylierte Phosphoinositide in Tumorzellen und mitoseaktivierten Zellen nachgewiesen werden können [35, 36].

PI3K sind Heterodimere, bestehend aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit, die in drei Klassen unterteilt werden. Vertreter der Klasse I können alle Phosphatidylinositole als Substrat verwenden, bevorzugen jedoch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, welches an der 3'-OH Position des Inositolrings phosphoryliert wird. Dabei entsteht Phosphoinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3), das weitere intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die wiederum zu einer vermehrten Genexpression von Entzündungsmediatoren führen. Hierbei findet die Lipidkinaseaktivität an der Zellmembran statt [34, 37]. PIP3 dient anschließend als Bindungsstelle für verschiedene Enzyme wie die Protein Kinase B (PKB) sowie deren Aktivatoren, die PDKs (phosphatidylinositol-dependent kinases). PKB aktiviert eine Reihe von Enzymphosphorylierungen, die für den sog. „Survival-Pathway“ entscheidend sind. Glycogen Synthase Kinase 3 (GKS3) und die Transkriptionsfaktoren FKHR (Forkhead Transkriptionsfaktoren), CREB (cAMP-responsive-element binding protein) und NF-κB (Nuclear factor-kappa B) gehören zu den PKB- Effektorproteinen des „Survival-Pathways“ [38] (s. Abb. 1.3).

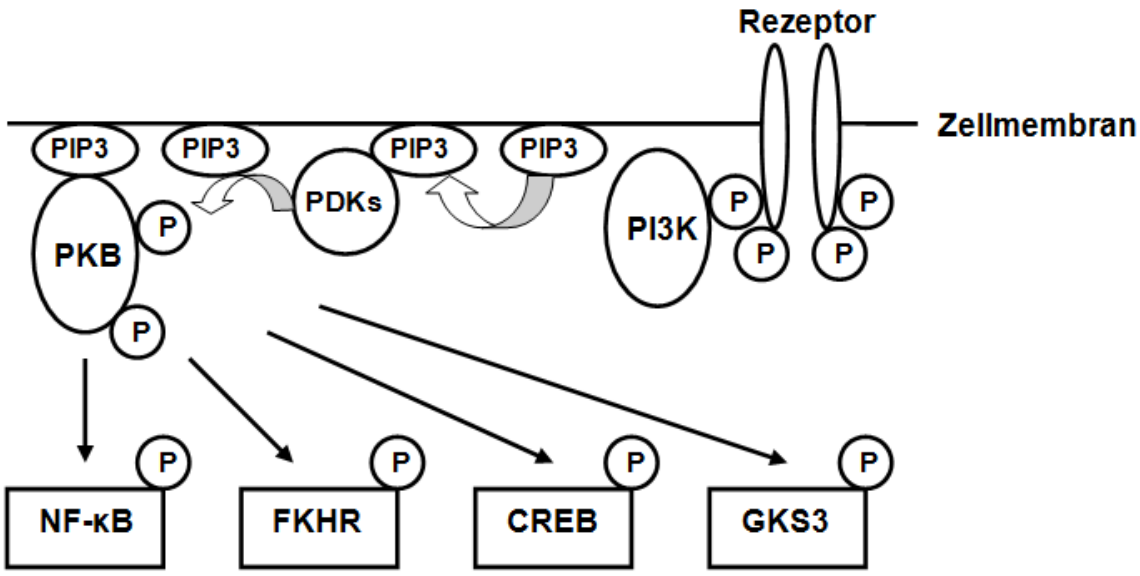


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des PI3K/ PKB- Signalweges

PDKs: Phosphatidylinositol-dependent kinases, FKHR: Forkhead Transkriptionsfaktor, CREB: cAMP-responsive-element binding protein, GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3, NF-κB: Nuclear factor-kappa B. Graphik modifiziert [39].

Für die PI3K der Klasse I ist zudem eine intrinsische Proteinkinaseaktivität beschrieben, die zu einer vorwiegend im Zytosol stattfindenden Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) führt [34, 37].
Die Vertreter der Klasse II sind in der Lage Phosphatidylinositol (PI) und PI-4-P an der 3'-OH Position des Inositolringes zu phosphorylieren. Klasse III- Vertreter können nur PI umzusetzen. Für sie ist ebenfalls eine Proteinkinaseaktivität nachgewiesen [37].
Verschiedene Studien haben darüber hinaus an einer Vielzahl von Zelltypen gezeigt, dass PI3K an der intrazellulären Signaltransduktion mit nachfolgender IL-6 und IL-8 Expression beteiligt sind [40-45].

1.4.2 Mitogen-aktivierte Protein Kinasen

Die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (Mitogen-activated protein kinases, MAPKs)-Kaskaden sind in allen Eukaryonten nachweisbare Signaltransduktionsenzyme, die durch eine Reihe extrazellulärer Stimuli wie Zellstress, Hormone, Neurotransmitter und Zytokine aktiviert werden. Diese Signalkaskaden bestehen aus MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK; MEKK), die MAPK-Kinasen (MAPKK, MEK) phosphorylieren und aktivieren, welche wiederum MAPKs aktivieren [46].
Zu den MAPK gehören die „extracellular signal-related kinases“ (ERK)1/2, die durch Stimulierung der DNA-Synthese sowie Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren die Zellproliferation und Differenzierung regulieren [47-49]. Weiterhin sind die „c-Jun amino-terminal kinases“ (JNK)- und die p38-MAPK bekannt, die für Stressantworten wie Entzündung und Apoptose verantwortlich gemacht werden [50, 51]. MAPK regulieren außerdem die Expression von Genen [52].
Die Aktivierung der MAPK erfordert die Phosporylierung ihrer Tyrosyl- und Threonylreste durch MAPKK, die wiedererum durch MAPKKK aktiviert werden [48]. Anschließend erfolgt die nukleäre Translokation der Kinasen [53]. Dort wirken sie auf ihre Substrate zu denen beispielsweise die Transkriptionsfaktoren Adapterprotein-1 (AP-1) und Elk-1, Zytoskelettproteine, Proteinkinasen sowie Phospholipasen gehören

[46]. Desweiteren können MAPK zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB führen [54].

Die MAPK werden durch unterschiedliche MAPKK aktiviert: ERK1/2 durch MEK1/2, p38 durch MKK3/6 und JNK durch MKK4/7. Hingegen kann jede MAPKK durch mehr als eine MAPKKK aktiviert werden, was die Komplexität der MAPK-Signalwege deutlich macht [55]. Diese wird durch den gegenseitigen Signalaustausch zwischen den Kaskaden noch verstärkt [56] (s. Abb. 1.4).

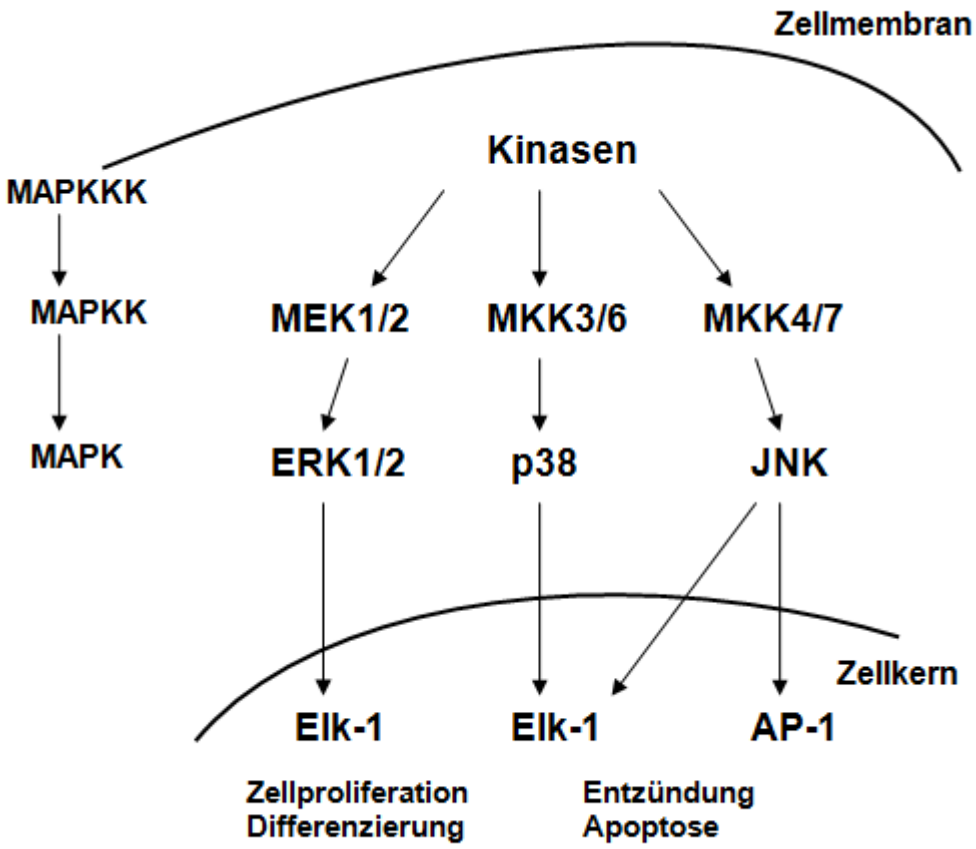


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der MAPK-Kaskaden

Verschiedene extrazelluläre Stimuli wie Zellstress, Hormone, Neurotransmitter und Zytokine induzieren die MAPK-Kaskaden. Unterschiedliche MAPKK aktivieren die MAPK: ERK1/2 wird durch MEK1/2, p38 durch MKK3/6 und JNK durch MKK4/7 aktiviert. Anschließend erfolgt die nukleäre Translokation der Kinasen, wo sie auf ihre Substrate wie die Transkriptionsfaktoren Adapterprotein-1 (AP-1) und Elk-1 wirken. Auf diese Weise werden Zellproliferation, Differenzierung, Entzündung und Apoptosevorgänge reguliert.

1.4.3 Der Transkriptionsfaktor NF-κB

Nuclear factor-kappa B (NF-κB) ist ein Transkriptionsfaktor, der erstmals 1986 in B-Lymphozyten beschrieben wurde [57]. Heute ist bekannt, dass er in nahezu allen Zelltypen vorkommt. NF-κB wird durch verschiedene extrazelluläre Stimuli wie die proinflammatorischen Zytokine TNFα und IL-1, T- und B- Zellmitogene, Bakterien, Viren sowie physikalischen und chemischen Zellstress aktiviert [58, 59]. Sogenannte Toll-like Rezeptoren (TLRs), die extrazelluläre Pathogene erkennen können, sind an der Aktivierung von NF-κB beteiligt [60]. NF-κB spielt eine wichtige Rolle in der Immun- und Entzündungsantwort, indem er die Transkription zahlreicher Gene reguliert. So induziert NF-κB die Expression von Akute-Phase-Proteinen, Zelladhäsionsmolekülen sowie der Zytokine IL-1β, IL-6 und IL-8. Zudem kann die NF-κB- Aktivierung viele Zellen vor der Apoptose schützen, in anderen hingegen induziert sie die Apoptose [58, 59].

Strukturell bezeichnet NF-κB eine heterogene Gruppe von Dimeren, die aus verschiedenen Kombinationen von Mitgliedern der *Rel*-Familie von DNA-bindenden Proteinen besteht. Fünf *Rel*-Proteine konnten identifiziert werden: NF-κB1 (p50 und sein Präkurser p105), NF-κB2 (p52 und sein Präkurser p100), cRel, RelA (p65) und RelB [58]. Gemeinsam ist all diesen Proteinen eine aus 300 Aminosäuren bestehende *Rel*-Homologie-Region (RHR). Die RHR ist verantwortlich für die Dimerisation, die DNA-Bindung und die Interaktion mit den IκB-Proteinen. Außerdem enthält diese Region eine Kern-Lokalisations-Sequenz [58].

Die *Rel*-Proteine unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, die Transkription zu aktivieren. So wurden beispielsweise nur in p65/RelA und cRel transkriptionsaktivierende Domänen gefunden. Anderen *Rel*-Proteinen wie p50 fehlt diese Domäne und ihnen wird daher eine hemmende Wirkung auf die Transkription zugeschrieben. In „Knockout“-Studien konnten spezifische Wirkungen verschiedener *Rel*-Proteine nachgewiesen werden [58].

Im Zytoplasma liegt NF-κB als inaktive Form gebunden an die Proteine der IκB-Familie vor [61, 62]. Die IκB-Familie umfasst die Proteine IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε, Bcl-3, die Präkurser p105 und p100 sowie das *Drosophila*-Protein *Cactus*. Ausgelöst durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli erfolgt im Verlauf die proteolytische Degradation der inhibierenden IκB-Proteine [58]. Dabei werden die IκBs durch den aktivierten NF-κB Kinase (IKK)-Komplex phosphoryliert [63-65]. Dies hat eine Translokation von NF-κB in den Nukleus zur Folge [58]. Der IKK-Komplex besteht aus zwei katalytischen Kinase-

Untereinheiten, IKKα und IKKß, und einer regulatorischen Untereinheit NEMO (IKKγ) [66], wobei IKKß überwiegend in den klassischen (kanonischen) NF-κB-Weg involviert ist. Dieser hängt von der IκB-Degradierung ab und setzt das Heterodimer p50/p65 frei, welches an die DNA bindet. Strukturell sind sich IKKα und IKKß sehr ähnlich. Dennoch haben biologische und genetische Studien gezeigt, dass IKKß die dominantere Kinase ist, die an der Phosphorylierung von IκBα beteiligt ist [67, 68] (s. Abb 1.5).

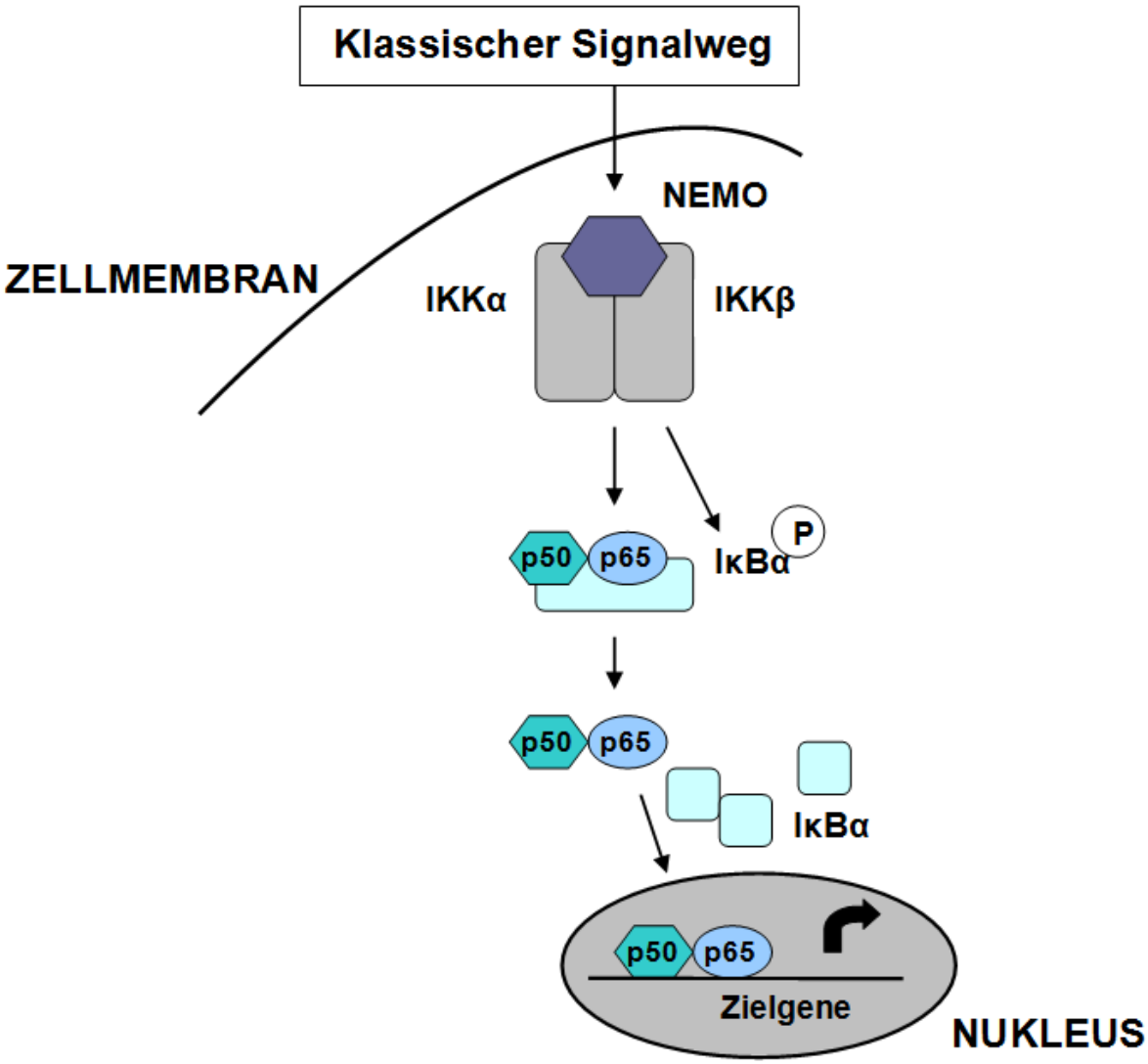


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des klassischen NF-κB- Signalweges

Der klassische (kanonische) Signalweg wird durch eine Vielzahl von Stimuli (z. B. TNFα, IL-1) aktiviert. Die Aktivierung dieses Signalweges ist abhängig von dem NF-κB Kinase (IKK)-Komplex, bestehend aus IKKα/ß und dem essentiellen Modulator von NF-κB (NEMO). Der IKK-Komplex phosphoryliert IκBα und führt somit zu dessen Degradation und zur Freisetzung von p50/p65. Dieser Signalweg ist essentiell für die Immunantwort, Inflammation, Tumorgenese und das Zellüberleben. Graphik modifiziert [69].

1.5 Zytokin IL-8

Interleukin-8 (IL-8) ist ein inflammatorisches Zytokin, das durch verschiedene Zelltypen sezerniert wird, darunter Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen sowie Keratinozyten [70-73].

IL-8 gehört zu den Chemokinen, einer Familie kleiner Polypeptide, die chemotaktische Eigenschaften auf Entzündungszellen haben [73]. Zu den chemotaktischen Wirkungen von IL-8 gehören die Aktivierung neutrophiler und basophiler Granulozyten sowie T-Lympozyten [74]. IL-8 ist involviert in die frühe Antwort des Wirtsorganismus auf die Exposition gegenüber Mikroorganismen [75, 76]. Verschiedene extrazelluläre Stimuli können die Bildung von IL-8 induzieren, einschließlich IL-1 [77] und TNF [78], sowie Zellstress [79], bakterielle [75] und virale Produkte [80]. In Vorstudien der eigenen Arbeitsgruppe konnte zudem gezeigt werden, dass eine Infektion von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) mit *C. pneumoniae* TW183 zu einem deutlichen Anstieg des IL-8 Spiegels im Überstand infizierter Zellen führte [81].

Neben einer vermehrten Bildung von IL-8 beobachtet man im Verlauf einer chlamydialen Infektion nichtimmunologischer Zellen zudem die Produktion weiterer proinflammatorischer Faktoren wie z. B. IL-1α, IL-6, IL-11, GROα und GM-CSF [19, 82, 83]. Diese Faktoren können durch Rekrutierung neutrophiler Granulozyten an den Ort der Infektion zu einer akuten Entzündungsreaktion führen, gefolgt von einer subepithelialen Akkumulation mononukleärer Leukozyten während der chronischen Phase der Infektion [19, 84, 85].

Das Gen für IL-8 enthält eine NF-κB- Sequenz in seinem Promoter [86], dies weist darauf hin, dass die IL-8 Expression u. a. über NF-κB kontrolliert wird. Weitere Untersuchungen des IL-8 Promoters zeigen, dass zudem die AP-1 (activator protein-1), NFIL6 (nuclear factor IL6) und NF-κB Elemente notwendig sind, um eine vollständige Transkription von IL-8 nach Infektion mit *C. trachomatis* nachzuweisen [87]. Transkriptionsfaktoren, die an diese Elemente binden, werden durch die ERK1/2, p38 und JNK MAPK reguliert [88, 89]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die IL-8 Antwort der Wirtszelle nach Infektion mit *C. trachomatis* durch einen oder mehrerer dieser Signalwege induziert wird. Anhand dieses "Modell-Zytokins" für die inflammatorische Aktivität einer Zelle oder eines Organismus sollte nun untersucht werden, ob *C. trachomatis* Serovar K auch in der Lage ist, die Expression von IL-8 in HEp-2 Zellen und HUVEC zu induzieren.

1.6 Wirtszellaktivierung

Chlamydien haben verschiedene Strategien entwickelt, um ihr Überleben in infizierten Wirtsorganismen zu sichern und den Abwehrmechanismen der Wirtszellen zu entkommen. Sie kommunizieren über die Membran des Einschlusskörperchens mit der Wirtszelle und greifen in bestimmte Prozesse der Wirtszelle ein [12]. Wenige Minuten nach Anlagerung der Elementarkörperchen (EK) an die Wirtszelle sind bereits Thyrosin-Phosphorylierungen und eine Aktin-Mobilisation in der Wirtszelle nachweisbar. Eine vermehrte Bildung von Mikrovilli an der Zelloberfläche zeigt sich 15 min nach Anlagerung [90].

Die Aufnahme der EK in die Wirtszelle findet innerhalb von 30 min bis 2 h nach Aktivierung des Aktin-Zytoskelettes via rezeptorvermittelter Endozytose oder Phagozytose statt [10, 11, 90]. Eine rezeptorvermittelte Induktion spezifischer Signaltransduktionskaskaden durch Chlamydien ist essentiell für die Invasion von *C. pneumoniae* in Epithelzellen. So konnte gezeigt werden, dass die MEK- abhängige Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2, gefolgt von einer PI3K- abhängigen Phosphorylierung und Aktivierung von Akt mit der Invasion von *C. pneumoniae* in die Zielzellen einhergeht [90].

Nach Internalisierung befinden sich die Chlamydien in einer Vakuole (sog. Einschlusskörperchen), die umgeben ist von einer von der Plasmamembran der Wirtszelle abgeleiteten Membran. Die Fusion des Einschlusskörperchens mit Lysosomen, wie es normalerweise bei Durchlaufen des endozytotischen Weges geschieht, wird unterbunden [91]. Dieser Prozess läuft zunächst unabhängig von einer chlamydialen Proteinsynthese ab, da im EK bereits in der Frühphase der Infektion vorhandene Proteine die Aufgaben dafür übernehmen. Im weiteren Verlauf erfolgt dies durch die in den Retikularkörperchen (RK) synthetisierten Proteine [92, 93]. Zwei Stunden nach Internalisierung kann in mit *C. trachomatis* infizierten Zellen eine Translokation der Einschlusskörperchen unter Beteiligung des Zytoskelettes der Wirtszelle in Richtung des Golgi-Apparates nachgewiesen werden [94, 95]. Weiterhin wurde sowohl für intrazelluläre Infektionen mit *C. trachomatis* als auch mit *C. pneumoniae* gezeigt, dass es zu einer von der chlamydialen Proteinbiosynthese abhängigen Fusion der Einschlusskörperchen mit vom Golgi-Apparat sezernierten, sphingomyelin- und cholesterinhaltigen Vesikeln des exozytotischen Weges kommt [92, 96-98]. Die aufgenommenen Lipide decken zum einen den Bedarf der während des

Entwicklungszyklus wachsenden Membran des Einschlusskörperchens, zum anderen könnten diese Lipide eine Maskierung des Einschlusskörperchens hervorrufen und so einer Fusion mit Lysosomen entgegenwirken [99].

Darüber hinaus vermögen Chlamydien die Apoptose der Wirtszelle sowohl zu inhibieren und als auch zu induzieren: das konservierte chlamydiale Protein CADD wird spät im Entwicklungszyklus exprimiert und aktiviert wahrscheinlich über Interaktion mit Death-Rezeptoren die Apoptose der Wirtszelle [100]. Daneben wurde gezeigt, dass Chlamydien die Apoptose der Wirtszelle inhibieren [101-104]. Die verantwortlichen Faktoren konnten teilweise identifiziert werden. So korreliert die anti-apoptotische Aktivität der Chlamydien mit der Blockade der mitochondrialen Freisetzung des apoptotischen Faktors Cytochrom c [105] und einer Hemmung der pro-apoptotischen mitochondrialen Proteine Bax und Bak [106]. Es bedarf jedoch weiterer Studien, um endgültige Klarheit über diese scheinbar widersprüchlichen Phänomene zu erlangen.

1.7 Fragestellung

Infektionen mit *Chlamydia trachomatis* gehören weltweit zu den häufigsten sexuell übertragbaren Erkrankungen. Über die Mechanismen der Interaktion zwischen *C. trachomatis* und der Wirtszelle ist jedoch noch wenig bekannt.
In dieser Arbeit sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Kann *C. trachomatis* Serovar K HEp-2 Zellen infizieren? Führt die mögliche Infektion zur Ausbildung eines proinflammatorischen Phänotyps? Welchen Einfluss haben die zeitliche Dauer und die Dosis der bakteriellen Stimulation auf die mögliche IL-8 Expression in HEp-2 Zellen?

2. Führt eine Infektion mit *C. trachomatis* zur Ausbildung eines proinflammatorischen Phänotyps in humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVEC) verglichen mit *Chlamydophila pneumoniae* TW183- infizierten HUVEC?

3. Welche molekularen Mechanismen spielen bei der *C. trachomatis*- induzierten Infektion von HEp-2 Zellen eine Rolle? Welchen Beitrag leisten insbesondere Phosphatidylinositol 3-Kinasen, Mitogen-aktivierte Protein Kinasen und der Transkriptionsfaktor NF-κB?

Die Kenntnis über eine Interaktion zwischen *C. trachomatis* (Serovar K) und Zielzellen auf molekularer Ebene im Speziellen ist eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der pathophysiologischen, klinischen Abläufe chlamydialer Erkrankungen.

2 Methoden

2.1 Zellkultur

Kultivierung von HEp-2 Zellen

Als Wirtszellen zur Kultivierung der Chlamydien dienten HEp-2 Zellen. HEp-2 Zellen sind humane Larynxkarzinomzellen (ATCC Nr.: CCL-23) [107].

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter der Laminair durchgeführt. Die Anzucht der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen mit 75 cm^2 Kulturfläche (T75) bei 37 °C unter 5 % CO_2-Spannung in HEp-2-Kulturmedium. Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurde das Kulturmedium abgegossen, der Zellrasen mit sterilem PBS-/- gewaschen und die adhärenten Zellen in 3 ml 0,5 % Trypsin-EDTA bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, worauf sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen ließen. Durch Zugabe von 15 ml Medium wurde das Trypsin-EDTA inaktiviert. Die Zellen wurden bei 400 x g für 5 Minuten (min) pelletiert, anschließend in frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt.

Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in Suspension wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypan-Blau 1:1 verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Die Multiplikation der Anzahl nicht blaugefärbter, also lebender Zellen in einem Großquadrat (4 x 4 Felder) mit dem Kammerfaktor (1 x 10^4 Zellen/ml) und dem Faktor der Verdünnung mit Trypan-Blau ergab die Konzentration lebender Zellen in der ursprünglichen Zellsuspension. Um eine zuverlässige Zellzahl zu erhalten, wurden mehrere Großquadrate ausgezählt und die Werte gemittelt.

2.2 Anzucht von *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis Serovar K wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Jens Kuipers, Rheumatologie der medizinischen Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt und wie zuvor beschrieben angezüchtet [108]. *Chlamydophila pneumoniae* TW183 wurden von Prof. Dr. M. Maaß, Labor Dr. Heidrich & Kollegen MVZ GmbH, zur Verfügung gestellt.

In Zellkulturflaschen mit 175 cm^2 Kulturfläche (T175) kultivierte HEp-2 Zellen wurden mit *Chlamydia trachomatis* infiziert. Zur Verbesserung der Infektionsrate wurden nach Zusatz der Chlamydien-Suspension die Zellkulturflaschen auf einem Schüttler für 30 min bei RT geschwenkt. Die Zellkulturflaschen wurden bei 37 °C unter 5 % CO_2-Spannung in cycloheximidhaltigem Infektionsmedium für zwei Tage inkubiert. Cycloheximid hemmt hierbei die Proteinsynthese der Wirtszellen und verschafft damit den Chlamydien einen Wachstumsvorteil. 48 Stunden (h) nach Infektionsbeginn wurde der Zellrasen mit einem sterilen Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Die entstandene Zell-Suspension wurde mittels einer großlumigen Kanüle (0,9 mm Durchmesser) in einer Spritze aufgenommen und in ein steriles 50 ml-Zellkulturröhrchen mit Glasperlen überführt. Anschließend wurde der Zelldetritus durch zweiminütiges Vortexen geschreddert, um die Elementarkörperchen aus den Zellen freizusetzten. Nach Auffüllen des Zelldetritus mit Infektionsmedium diente das Infektionsgemisch der erneuten Infektion von HEp-2 Zellen.

Bis zur Aufreinigung wurde die Chlamydien enthaltende Zell-Suspension in 50 ml-Zellkulturröhrchen bei -80 °C gelagert.

Aufreinigung von *Chlamydia trachomatis*

Analog zu Caldwell *et al.* [109] erfolgte die Aufreinigung von *Chlamydia trachomatis* Serovar K.

Die Chlamydien enthaltende Zell-Suspension wurde im 37 °C Wasserbad angetaut, jedoch nicht bis auf 37 °C. Nach Antauen wurde die Suspension in auf Eis vorgekühlte und mit Glasperlen gefüllte sterile 50 ml-Zellkulturröhrchen überführt und 5 min geschreddert. Die auf diese Weise zertrümmerten Zellen wurden in neuen gekühlten 50 ml-Zellkulturröhrchen durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 300 x g und 4 °C pelletiert. Der gewonnene Überstand wurde in autoklavierte und gekühlte

Ultrazentrifugenröhrchen überführt und bei 200000 x g und 4 °C 1 h ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, das nun aus chlamydialen Elementarkörperchen bestand, in SPG-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde in 100 µl Aliquots portioniert und bei -80 °C in Kryoröhrchen gelagert.

Bestimmung der Infektiösität von *Chlamydia trachomatis*

Die Bestimmung der Infektiösität von *C. trachomatis* in einer Chlamydien-Suspension erfolgte mittels Immunfluoreszenztest infizierter Zellen und Auszählung der Einschlusskörperchen unter einem Fluoreszenzmikroskop [108]. Hierzu wurden 2×10^5 HEp-2 Zellen je Well in eine Zellkulturplatte mit 24 Wells mit Deckgläschen (10 mm Durchmesser) eingesät und mit 1 ml verschiedener Verdünnungsstufen (1:100, 1:1000, 1:10000) der Chlamydien-Suspension infiziert. 48 h nach Infektionsbeginn wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol bei -20 °C für 10 min fixiert. Anschließend wurden die HEp-2 Zellen mit PBS-/- gewaschen und nach Trocknen an der Luft mit 25 µl Konjugat aus dem Immunfluoreszenz-Chlamydia-Testkit gefärbt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 15 min. Nach sich daran anschließenden Waschschritten und Trocknen wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf Objektträger mit Eindeckmedium aus dem Testkit gegeben. Anschließend konnte die Anzahl der Einschlusskörperchen je 100 HEp-2 Zellen ausgezählt werden. Hieraus ließ sich die Konzentration der Chlamydien in der zur Infektion verwendeten Chlamydien-Suspension in "Inclusion forming units" pro ml (IFU/ml) bestimmen. Eine IFU entspricht einem lichtmikroskopisch darstellbaren Einschlusskörperchen.

2.3 Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene

Die Nabelschnüre wurden uns freundlicherweise von den Geburtshilfe-Abteilungen des ev. Waldkrankenhauses Spandau (Berlin) und des Humboldt Krankenhauses Reinickendorf (Berlin) zur Verfügung gestellt.

Die Isolation der Endothelzellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der von Jaffé beschriebenen Technik [110]. Unter einer Laminair wurde die Nabelschnurvene kanüliert (Braunule R, 18 G, Braun Melsungen), mit sterilem HBSS +/+ ausgespült und dann mit 0,025 % Typ II Kollagenase für 20 min gefüllt und inkubiert. Durch wiederholtes vorsichtiges Massieren und Ausspülen mit M199 wurden die Endothelzellen aus der Vene extrahiert. Die gewonnenen Zellen wurden für 10 min bei 350 x g zentrifugiert und das Pellet in Endothel-Basal-Medium aufgenommen. Die Primärkultur der isolierten HUVEC lagerte in Endothel-Basal-Medium mit 10 % inaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS) im Brutschrank bei 37 °C unter 5 % CO_2-Spannung.

Die nach 4 bis 5 Tagen in T75 konfluenten Zellen wurden in 24-Well-Platten gesplittet. Dafür wurden die Endothelzellen mit sterilem PBS-/- gewaschen, mit 0,5 % Trypsin-EDTA abgelöst und wieder in Kulturmedium aufgenommen. Alle verwendeten Gefäße wurden vorher eine Stunde mit 0,5 %iger Gelatinelösung behandelt.

Die nach morphologischen und immunologischen Kriterien Jaffés [110] charakterisierten humanen Endothelzellen wuchsen zu einem konfluenten "Kopfsteinpflaster-artigen" Monolayer.

2.4 Infektionsexperimente

Die Infektionsexperimente mit HEp-2 Zellen wurden in Cycloheximid-freiem Infektionsmedium durchgeführt, jene mit HUVEC in Endothel-Basal-Medium mit 1 % FCS.

Zunächst wurden konfluente HEp-2 Zellen bzw. HUVEC in T75 - wie bereits beschrieben – mit Trypsin-EDTA aus den Flaschen gelöst und in 24-Well-Platten (2,4 × 10^4 Zellen pro Well) ausgesät. Die Bakterien wurden aufgetaut und je nach Bedarf auf eine MOI (Multiplicity of Infection) von 5, 0,5 oder 0,05 eingestellt. Mit der MOI wird das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Agenzien wie Bakterien zu deren Zielzellen beschrieben. Für die Infektion der Zellen wurde die MOI dieser Kultur berechnet, indem die Konzentration der Bakterien in der Suspension in IFU/ml durch die Anzahl der Zellen pro Well (Vertiefung in der Zellkulturplatte) geteilt wurde. So wurden beispielsweise bei einer MOI von 5 zur Infektion 1,2 x 10^5 IFU/ml Bakterien eingesetzt, wenn pro Well 2,4 × 10^4 Zellen gezählt und 10 µl Bakteriensuspension in 1 ml Zellkulturmedium eingesetzt wurden.

Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und die eingestellte Bakterienlösung anschließend zugegeben. Als Negativkontrolle diente reines Medium, als Positivkontrolle wurde Medium mit 1 ng/ml TNFα verwendet. Die Platten wurden 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert, daraufhin erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Cycloheximid-freiem Infektionsmedium. Anschließend wurden die infizierten Zellen im Zellkulturschrank bei 37 °C und 5 % CO_2-Spannung inkubiert.

Um die Phosphorylierung der MAPK intrazellulär nachzuweisen, wurde für HEp-2 Zellen das 6-Well-Format gewählt. 4 - 6 h vor Infektion wurde das antibiotikahaltige Medium abgesaugt und durch 1 ml blankes Medium ersetzt. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden HEp-2 Zellen mit *C. trachomatis* Serovar K einer MOI von 5 inkubiert. Hierbei dienten Zellen in reinem Medium als Negativkontrolle, als Positivkontrolle wurde 1 ng/ml TNFα verwendet.

Infektionsexperimente mit Zugabe von Inhibitoren

An MAPK-Inhibitoren wurden der p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB 202190 in einer Konzentration von 5 µM, der ERK1/2-MAP-Kinase-Inhibitor U 0126 in einer Konzentration von 6 µM, der JNK-MAP-Kinase-Inhibitor SP 600125 in einer

Konzentration von 5 µM sowie der Phosphatidylinositol 3-Kinase-Inhibitor LY 294002 in einer Konzentration von 5 µM verwendet (Calbiochem, Darmstadt).

HEp-2 Zellen wurden in 24-Well-Platten (2,4 × 10^4 Zellen pro Well) ausgesät. Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurden die Inhibitoren in Cycloheximid-freiem Infektionsmedium auf die gewünschte Konzentration eingestellt und eine halbe Stunde vor Infektion den Zellen zugefügt. Die Inkubation erfolgte im Zellkulturschrank bei 37 °C und 5 % CO_2-Spannung. Den Zellen, die später infiziert werden sollten, wurde ein Volumen von 1000 µl Inhibitor-haltigem Medium zugegeben, ebenso den Zellen, die als Negativkontrolle dienten. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden Chlamydien-Suspensionen aufgetaut. Den zu infizierenden Zellen wurden 10 µl der Chlamydien-Suspension zugegeben, so dass sich im Well die Chlamydien-Suspension auf die gewünschte Konzentration einstellte. Durch dieses Vorgehen wurde gewährleistet, dass über den Zeitpunkt der Infektion hinaus die Zellen den Inhibitoren ausgesetzt waren. Mit der Positivkontrolle wurde analog vorgegangen: eine halbe Stunde vor Infektion wurden 1000 µl frisches Kulturmedium zugegeben. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden den Zellen 10 µl TNFα zugefügt, so dass eine TNFα Konzentration von 1 ng/ml entstand.

Nach Zusatz der Chlamydien-Suspension sowie der Positivkontrolle wurden die 24-Well-Platten auf einem Schüttler für 30 min inkubiert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel mit Cycloheximid-freiem Medium aller Wells durchgeführt unter Beibehaltung der bereits initial zugeführten Inhibitoren. Nun wurden die Platten im Zellkulturschrank bei 37 °C und 5 % CO_2-Spannung gelagert (s. Abb 2.1).

	1	2	3	4	5	6	
A	none →					→	A
		SB202190	U0126	SB & U0126	SP 600125	LY 294002	
B	CTK →					→	B
		SB202190	U0126	SB & U0126	SP 600125	LY 294002	
C	CTK →					→	C
		SB202190	U0126	SB & U0126	SP 600125	LY 294002	
D	TNFα, 1 ng/ml →					→	D
		SB202190	U0126	SB & U0126	SP 600125	LY 294002	
	1	2	3	4	5	6	

Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Infektionsexperimentes mit Inhibitoren

none: Negativkontrolle, CTK: *C. trachomatis* Serovar K, TNFα: Positivkontrolle

SB 202190: p38-MAP-Kinase-Inhibitor

U 0126: ERK1/2-MAP-Kinase-Inhibitor

SP 600125: JNK-MAP-Kinase-Inhibitor

LY 294002: Phosphatidylinositol 3-Kinase-Inhibitor

2.5 Interleukin-8-ELISA

Gewinnung von Zellkulturüberständen

Die Zytokinproduktion wurde aus Zellkulturüberständen nach bakterieller Infektion mittels ELISA untersucht. Die Zellkulturüberstände wurden 4 h, 24 h sowie 48 h nach Infektion abgenommen. Nach Zentrifugation (10000 x g, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand bis zu weiteren Untersuchungen bei - 20 °C gelagert.

IL-8 ELISA

Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) eignet sich durch seine hohe Sensitivität, um im Zellkulturüberstand die Konzentrationen der Proteine quantitativ nachweisen zu können. Analog zu Klucken *et al.* [111, 112] wurde die IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels folgender ELISA-Methode gemessen: Zunächst wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Maxi-Sorb®) mit dem monoklonalen, neutralisierenden Maus-anti-hIL-8-Antikörper (MAB208, R&D Systems, 4 µg/ml, 100 µl/Well) präpariert. Nach 16 h wurde die Platte ausgeschlagen und dreimalig mit Waschpuffer (PBS) gespült. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Casein-Puffer für 2 h blockiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Proben (100 µl, 1:10 mit Versuchsmedium verdünnt) und die hIL-8-Standards (Rekombinantes humanesIL-8, R&D Systems) in Duplikaten (0 ng/ml bis 5 ng/ml in sieben Verdünnungsschritten von je 1:2) in die einzelnen Wells pipettiert. Wiederum erfolgte nach 2 h ein dreimaliges Waschen. Nachfolgend wurde der Detektionsantikörper (20 ng/ml, 100 µl/Well) aufpipettiert, ein polyklonaler, biotinylierter Ziege anti-hIL-8-Antikörper (BAF208, R&D Systems). Nach 2 h erfolgte wiederum dreimaliges Waschen. Nach einer 20-minütigen Inkubation mit Meerrettichperoxidase-konjugierten Avidin/Biotin-Komplex (Verdünnung 1:20000) folgte erneut ein dreimaliger Waschschritt. Danach wurde das Entwickler-Substrat zugegeben (Tetramethylbenzidin TMB, Sigma, 100 µl/Well) und lichtgeschützt 20 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,5 M Schwefelsäure (50 µl/Well) abgestoppt. Innerhalb von 30 min wurde die optische Dichte am Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Berechnung der IL-8- Konzentration erfolgte über die Erstellung einer sigmoiden Standardkurve.

2.6 Luciferase Assay

NF-κB-Reportergen-Assay (Prinzip)

Analog zu Klucken *et al.* [111, 113] wurde ein Plasmid, welches 3 x 2 hintereinandergeschaltete NF-κB-Bindungsstellen (gekoppelt an ein HIV-Enhancer-Gen) enthielt, transient in HEp-2 Zellen transfiziert. Das durch einen Stimulus aktivierte NF-kB konnte sich an die NF-κB-Bindungstellen des transfizierten Plasmids anlagern und so die Transkription des Luciferasegens induzieren. Über die Quantifizierung der Emission von Licht im Luminometer (Lumat LB 9501, Berthold, Bad Wildbad) wurde die NF-κB- Aktivierung in transfizierten HEp-2 Zellen (stimuliert versus unstimuliert) ermittelt.

Transiente Transfektion von HEp-2 Zellen

Der Reportergen-Assay wurde in Analogie zu Klucken *et al.* [111, 113] auf 12-Well-Platten in Duplikaten durchgeführt. Dazu wurde SuperFect (Qiagen) verwendet, das ein polykationisches Transfektionsreagenz definierter Form und Größe ist. Die positive Nettoladung der SuperFect-DNA-Komplexe ermöglicht die Anlagerung an die negativ geladene Oberfläche eukaryontischer Zellen. Über Endozytose gelangen die Komplexe ins Zellinnere. Im lysosomalen Kompartiment der Zelle verhindert SuperFect durch Inhibition der lysosomalen Nukleasen einen pH Anstieg und ermöglicht so den unversehrten Transport der transfizierten DNA in den Zellkern. Wenn Zellen transient transfiziert werden, gelangt die transfizierte DNA in hohen Mengen in den Zellkern und führt zu einer starken Expression des gewünschten Proteins (hier: Luciferase), integriert jedoch nicht ins Chromosom.

Pro Ansatz (eine 12-Well) wurden 0,75 µg DNA, 75 µl blankes Medium und 7,5 µl SuperFect-Transfektionsreagenz zusammengegeben und 10 min bei RT inkubiert. Während der Komplexbildung wurden die HEp-2 Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Transfektionsansatz in 400 µl HEp-2-Kulturmedium aufgenommen, gemischt und auf die Zellen gegeben. Die Transfektion erfolgte für 3 h bei 37°C im CO_2 Inkubator (5%). Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit frischem Kulturmedium versetzt und für 24 h inkubiert.

Für die Infektion der transient transfizierten Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wie oben beschrieben (s. 2.4) infiziert. Jedoch erfolgte nach der Infektion kein

Mediumwechsel. Als Negativkontrolle diente reines Medium; als Positivkontrolle wurde Medium mit 1 ng/ml TNFα verwendet.

Messung der NF-κB- Aktivierung durch Luciferase-Aktivität

In Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} und Sauerstoff katalysiert das Enzym Luciferase eine Biolumineszenz-Reaktion, bei der Photonen emittiert werden. Diese Lichtsignale können in einem Luminometer detektiert und quantifiziert werden. Die Analyse der Reportergenaktivität erfolgte 3 h bzw. 6 h nach Infektion der HEp-2 Zellen. Dazu wurden die Zellen analog zu Klucken *et al.* [111, 113] zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 100 µl Reporter Lysepuffer 1x (Promega) /pro Well abgelöst. Die Zellfragmente wurden durch Zentrifugieren (5 min, 14000 x g, 4°C) pelletiert und die Luciferase-Aktivität aus dem gewonnen Überstand im Luminometer bestimmt. Dabei wurden die relativen Lumineszenzwerte gegen den totalen Proteingehalt der Probenansätze abgeglichen.

2.7 Western Blot

Analog zu N'Guessan *et al.* [114, 115] erfolgte der Western Blot.

Die SDS-Gelelektrophorese trennt das Gesamtprotein oder einzelne Fraktionen einer Probe nach ihrem Molekulargewicht. Die einzelnen Proteine werden dann auf eine Membran (Nitrozellulose, PVDF Membran) transferiert und mit spezifischen Antikörpern immundetektiert.

Extraktion der löslichen Gesamtproteine

HEp-2 Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens mit Chlamydien entsprechend einer MOI von 5 infiziert.

5, 15, 30, 60 und 120 min nach Infektion wurden die Zellen mit eiskaltem Phosphoprotein-Waschpuffer zweimal gewaschen und anschließend mit je 10 µl Lysepuffer und einem Scraper abgekratzt. Das gewonnene Zelllysat wurde in Eppendorfgefäßen für 10 min bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Eppendorfgefäß gesammelt. 5 µl wurden zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet, der Rest bei -20 °C gelagert.

Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bio-Rad Protein-Assay (Bio-Rad), basierend auf der Methode nach Bradford [116] wurde zur Konzentrationsbestimmung der Proteine eingesetzt. Dieses Verfahren nutzt die Tatsache, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue® nach Proteinbindung sein Absorptionsmaximum von 465 auf 595 nm verlagert. Nach fünfminütiger Inkubation von 5 µl der Proteinlösung mit 995 µl der 1:5 verdünnten Farbstofflösung in einer Mikrotiterplatte wechselt die Farbe von grünbraun zu blau. Mit einem Spektralphotometer wird dann die Absorption bei 595 nm gemessen und über eine zuvor hergestellte BSA (Bovines Serumalbumin)-Standardkurve (1-8 µl einer Stocklösung mit 1 mg/ml Protein) die Proteinkonzentration bestimmt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das anionische Detergens SDS kann mit einem Massenverhältnis von 1,4:1 an das Polypeptidgerüst der Proteine binden. Dadurch bekommen die Proteine gemäß ihrer Länge eine negative Außenladung und können nach ihrem Molekulargewicht im Gel

getrennt werden. Zur optimalen Darstellung von Phospho-p38, P-ERK und P-c-Jun wurde ein Trenngel mit einer 10-prozentigen Acrylamid-Konzentration gewählt.
Vor SDS-Kontakt wurde das Protein mit Gelladepuffer in einem Verhältnis von 1:1 versetzt und für 5 min unter Schütteln auf 95 °C erhitzt. Jeweils 80 µg Protein wurden nach Abkühlen der Probe separat in je eine Geltasche aufgetragen, ebenso ein Marker (Amersham Rainbow high, Braunschweig) zur Größenbestimmung. Die anschließende Elektrophorese erfolgte in BioRad Mini-Gel-Kammern im Laemmli-Puffer-System bei 120 V für 2 h.

Protein-Blot

Um die Antikörper optimal zu detektieren, wurden die getrennten Proteine auf eine Membran übertragen. Dieser Transfer ist möglich, weil negativ geladene Proteine zur Anode, senkrecht zur Gellaufrichtung wandern.
Das Trenngel wurde nach erfolgreicher Elektrophorese vorsichtig aus der Elektrophoresekammer entnommen, für 15 min im Blotting-Puffer äquilibriert und mit einer sauberen Glaspipette auf eine ebenfalls puffergetränkte Hybond-Nitrozellulosemembran aufgerollt, um störende Luftblasen zu entfernen. Um die Trenngel-Membranvorrichtung wurde ein Sandwich gebildet, indem zwei puffergetränkte Lagen 3M-Whatman–Papiere (Whatman, Dassel) je Seite und die Blotvorrichtung (Transblot, München) gemäß Herstellerangaben verwendet wurde.
Zum Proteintransfer wurde das Sandwich in die Blotkammer überführt und zusammen mit einem eiskalten Blotpuffer bei 100 V und 4 °C und maximaler Stromstärke für 1 h geblottet.
Um den Transfererfolg zu beurteilen, wurde die Membran reversible mit Ponceau-S gefärbt. Anschließend wurde sie mit Aqua bidest gewaschen, bis Ponceau-S vollständig entfernt war.

Antikörperexposition

Entsprechend des Detektionsverfahrens (Odyssey Licor, Lincoln, NE, USA) wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungen in Odyssey Licor Block-Puffer für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde sie für 1 h bei RT bzw. über Nacht (bei 4 °C) mit einem primären Antikörper gegen das Zielprotein im frischen Blockpuffer exponiert. Nach dreimaligem, jeweils fünfminütigem Waschen wurde dann bei RT für 1 h ein

sekundärer Antikörper hinzugegeben. Spezies-entsprechend wurde für die Odyssey Licor Detektion ein an IRDye 800 oder an Cy5.5 gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet.
In Vorversuchen wurde die optimale Antikörperverdünnung bestimmt. Sie betrug für die primären Antiköper 1:1000 und für die sekundären Antikörper 1:2000.

Detektion

Die am primären Antikörper mit IRDye800 oder Cy.5.5 markierten sekundären Antikörper wurden mit einem speziellen Scanner (Odyssey Licor infrared imaging system, Lincoln, NE, USA) detektiert und mit einer entsprechenden Software nach den Herstellervorgaben bearbeitet. So wurde nicht nur die Proteinbande dargestellt, sondern auch ihre Intensität bestimmt.

2.8 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und ergaben vergleichbare Ergebnisse. Es wurde jeweils eine Versuchsgruppe mit der Kontrollgruppe verglichen. Die Datenbewertung erfolgte über den t-Test zur Prüfung der Gleichheit der Mittelwerte. Die Differenz von Werten mit $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant beurteilt.

3 Ergebnisse

3.1 *Chlamydia trachomatis* infiziert HEp-2 Zellen

Zunächst sollte untersucht werden, ob *Chlamydia trachomatis* Serovar K in der Lage ist, HEp-2 Zellen zu infizieren.

In einem Infektionsexperiment konnte die Infektion und die Replikation von *C. trachomatis* mit Ausbildung von Einschlusskörperchen (IFU) in HEp-2 Zellen nachgewiesen werden. Gleichzeitig dienten diese Versuche der Bestimmung der Infektiösität, dokumentiert in "Inclusion forming units" pro ml (IFU/ml). *Chlamydia trachomatis* Serovar K hatte einen durchschnittlichen Infektionstiter von 1,2 x 10^5 IFU/ml in HEp-2 Zellen (s. Abb. 3.1).

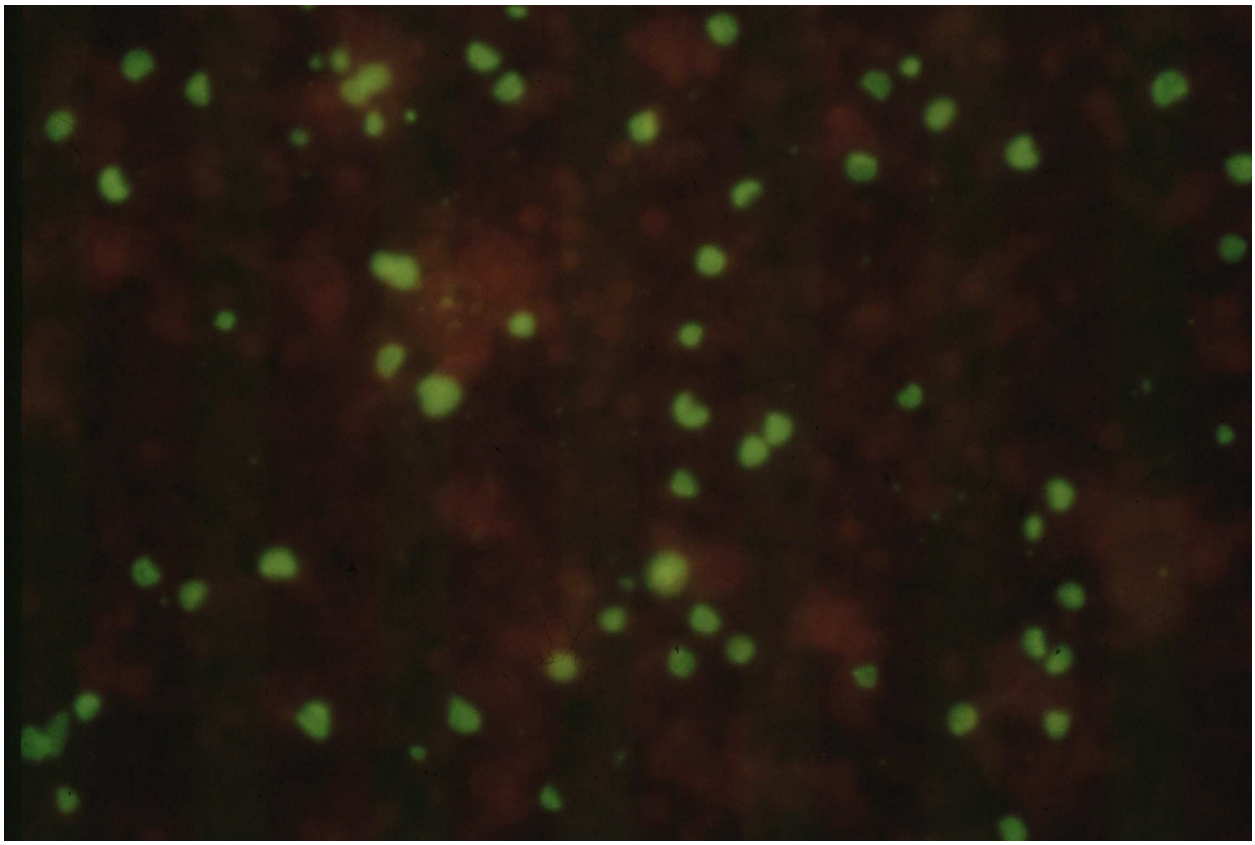


Abb. 3.1: Infektion von HEp-2 Zellen mit *Chlamydia trachomatis* Serovar K (x400)

Die Einschlusskörperchen wurden immunfluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung eines Chlamydien-spezifischen Immunfluoreszenz-Testkits (Imagen, Ely/ Cambridgeshire) visualisiert.

3.2 UV-inaktivierte *C. trachomatis* infiziert nicht HEp-2 Zellen

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob UV-inaktivierte *C. trachomatis* Serovar K auch in der Lage ist, HEp-2 Zellen zu infizieren. Die UV-Inaktivierung von *C. trachomatis* erfolgte 60 min bei maximaler Leitung im UV-Crosslinker.

In diesem Infektionsexperiment zeigte sich keine Ausbildung von Einschlusskörperchen in UV-inaktivierten *C. trachomatis*- infizierten HEp-2 Zellen (s. Abb. 3.2).

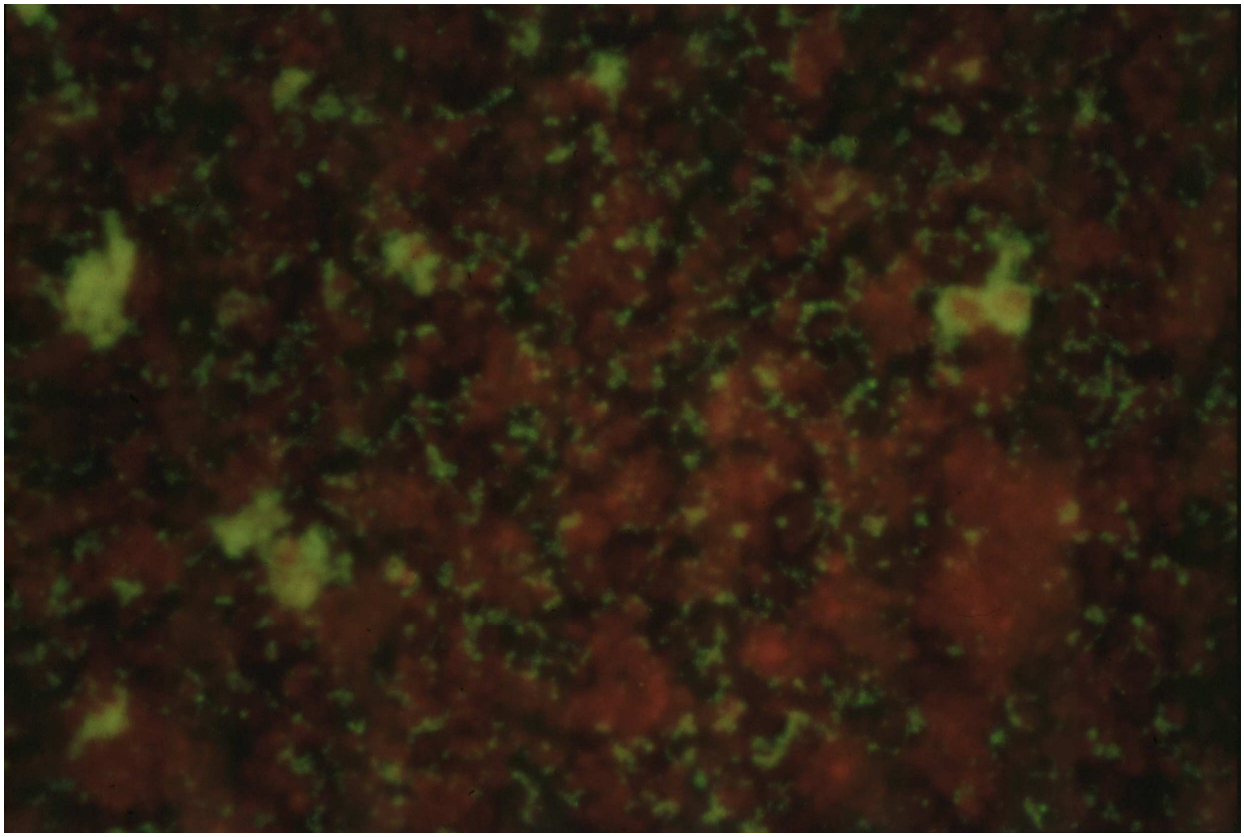


Abb. 3.2: Infektion von HEp-2 Zellen mit UV-inaktivierten *C. trachomatis* (x400)

Kein Nachweis von Einschlusskörperchen unter einem Fluoreszenzmikroskop in UV-inaktivierten *C. trachomatis*- infizierten HEp-2 Zellen gefärbt mit einem Chlamydien-spezifischen Immunfluoreszenz-Testkit (Imagen, Ely/ Cambridgeshire).

3.3 *Chlamydia trachomatis* infiziert HUVEC

In einem weiteren Infektionsexperiment wurde untersucht, ob *C. trachomatis* Serovar K in der Lage ist, HUVEC zu infizieren. Es konnte die Infektion von *C. trachomatis* mit Ausbildung von Einschlusskörperchen in HUVEC nachgewiesen werden (s. Abb. 3.3).

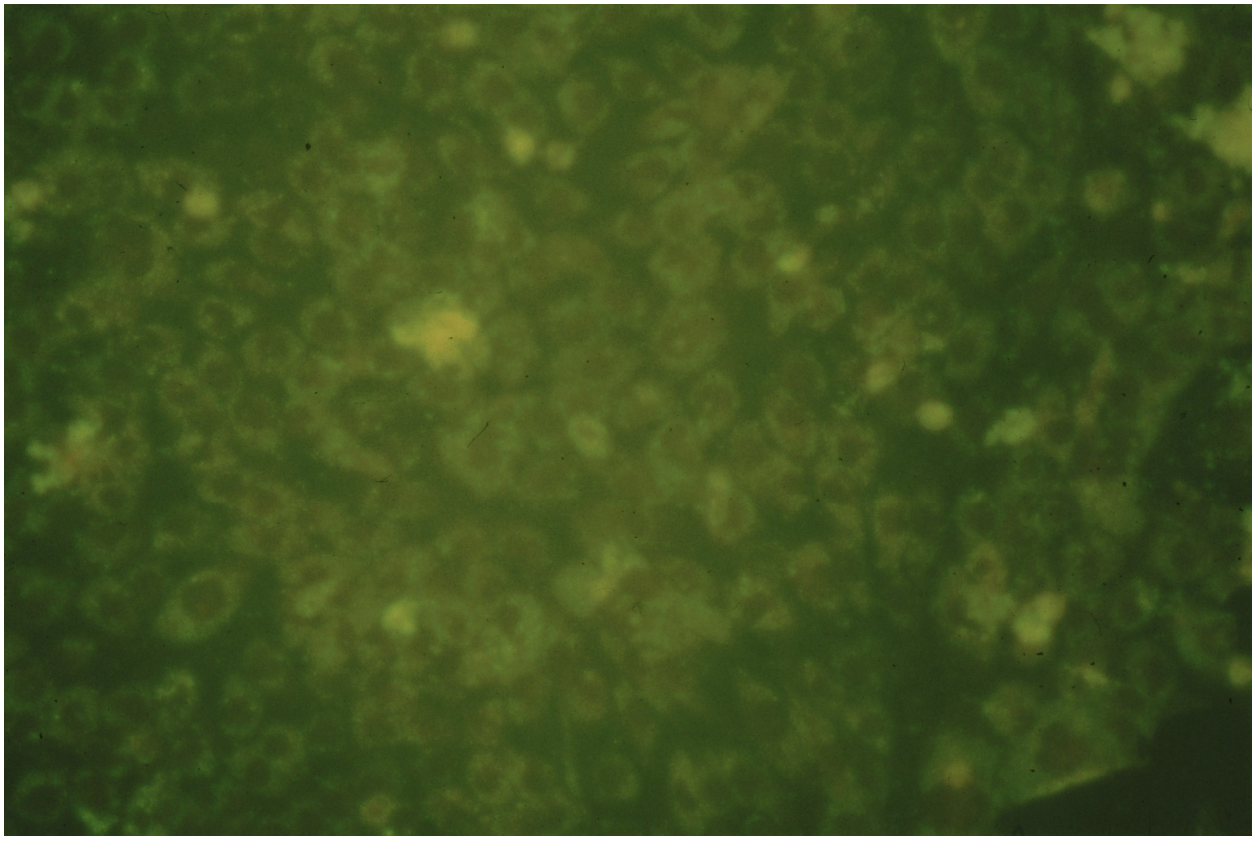


Abb. 3.3: Infektion von HUVEC mit *Chlamydia trachomatis* Serovar K (x400)

Die Einschlusskörperchen wurden immunfluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung eines Chlamydien-spezifischen Immunfluoreszenz-Testkits (Imagen, Ely/ Cambridgeshire) visualisiert.

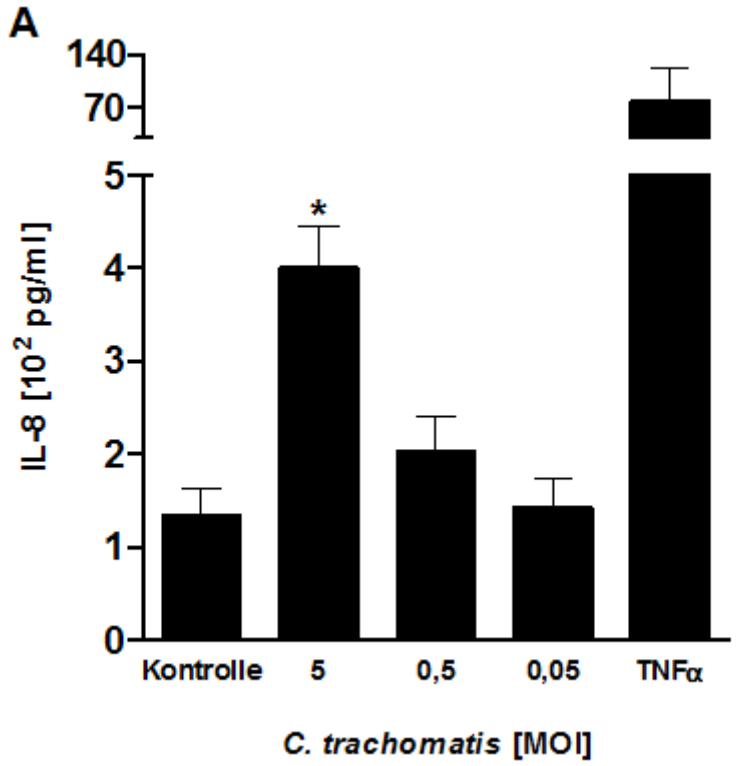
3.4 Zytokininduktion durch *C. trachomatis* Serovar K

3.4.1 IL-8- Sekretion nach Infektion von HEp-2 Zellen mit *C. trachomatis*

HEp-2 Zellen wurden für die Dauer von 30 min mit *C. trachomatis* einer MOI von 5, 0,5 und 0,05 pro Well infiziert, entsprechend 1,2 x 10^5, 1,2 x 10^4 und 1,2 x 10^3 IFU/ml. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel. 24 h nach Infektion wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Konzentration von IL-8 mittels ELISA bestimmt. Als Negativkontrolle diente reines Medium nicht infizierter Zellen, als Positivkontrolle Medium TNFα stimulierter HEp-2 Zellen.

Ergebnis war eine konzentrationsabhängige IL-8- Freisetzung aus HEp-2 Zellen nach Infektion mit *C. trachomatis*. Die höchste Konzentration von IL-8 wurde nach Infektion mit *C. trachomatis* einer MOI von 5 beobachtet (s. Abb. 3.4 A).

In einer Zeitreihe wurde die Kinetik der IL-8- Freisetzung untersucht (s. Abb. 3.4 B). Dafür wurden HEp-2 Zellen mit *C. trachomatis* einer MOI von 5 (1,2 x 10^5 IFU/ml) infiziert und die Zellkulturüberstände zu den Zeitpunkten 4 h, 24 h und 48 h nach Infektion abgenommen. Auch hier diente Medium nicht infizierter Zellen als Negativkontrolle und Medium TNFα stimulierter HEp-2 Zellen als Positivkontrolle. Schon nach 4 h konnte ein IL-8- Anstieg beobachtet werden. Nach 48 h konnte die höchste Konzentration von IL-8 nachgewiesen werden. Kontrollen zu späteren Zeitpunkten erbrachten keinen weiteren Anstieg der IL-8- Konzentration im Zellkulturüberstand.


A
140
70
5
4
3
2
1
0
IL-8 [10² pg/ml]
*
Kontrolle
5
0,5
0,05
TNFα
C. trachomatis [MOI]

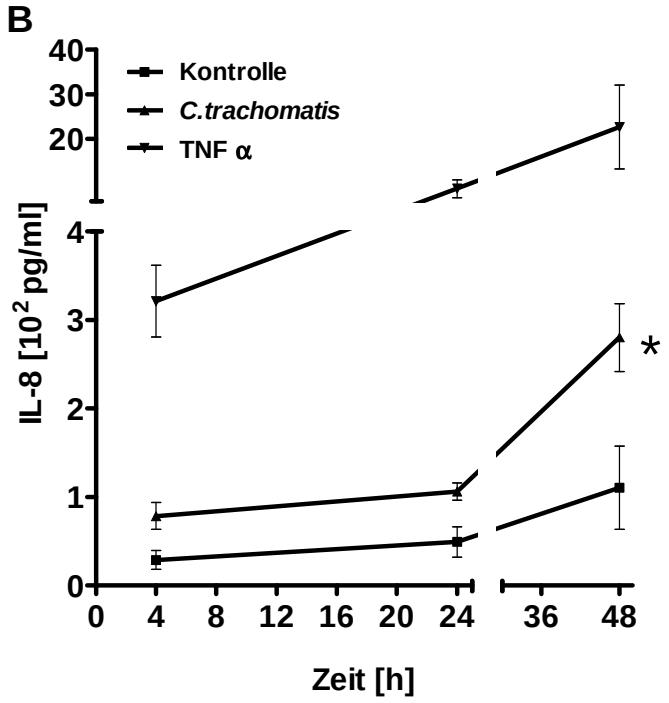

B
40
30
20
4
3
2
1
0
IL-8 [10² pg/ml]
Kontrolle
C.trachomatis
TNF α
*
0
4
8
12
16
20
24
36
48
Zeit [h]

Abb. 3.4: IL-8- Produktion von HEp-2 Zellen nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K.

Messung der IL-8- Konzentration mittels ELISA. **(A)** HEp-2 Zellen wurden mit *C. trachomatis* einer MOI von 5, 0,5 und 0,05 pro Well, entsprechend $1,2x10^5$, $1,2x10^4$ und $1,2x10^3$ IFU/ml infiziert und die Zellkulturüberstände nach 24 h abgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM aus 3 separaten Experimenten. * statistisch signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zur Negativkontrolle. **(B)** HEp-2 Zellen wurden mit *C. trachomatis* (MOI = 5) infiziert und die Zellkulturüberstände nach 4 h, 24 h und 48 h abgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM aus 3 separaten Experimenten. * statistisch signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zur Negativkontrolle.

3.4.2 Vergleich der IL-8- Induktion nach Infektion mit *C. trachomatis* und *Chlamydophila pneumoniae* TW183 in HUVEC

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob *C. trachomatis* Serovar K auch in der Lage ist, die Expression von IL-8 in Endothelzellen zu induzieren. Es konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* TW183 die Expression von IL-8 in humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) induziert [81]. Daher wurden HUVEC mit beiden Chlamydienarten infiziert und die IL-8- Freisetzungen miteinander verglichen.

Zunächst wurden konfluente HUVEC in einer 24-Well-Platte mit *C. pneumoniae* TW183 (MOI = 5) infiziert, wobei die Zellen für 60 min bei 37 °C und 800 x g zentrifugiert wurden. Anschließend wurden noch nicht infizierte HUVEC derselben Platte mit *C. trachomatis* (MOI = 5) für 30 min analog den Infektionsexperimenten mit HEp-2 Zellen infiziert. Reines Medium nicht infizierter Zellen diente als Negativkontrolle, für die Positivkontrolle wurden HUVEC mit TNFα stimuliert. Im Anschluss daran erfolgte ein Mediumwechsel. 24 h nach Infektion wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Konzentration von IL-8 mittels ELISA bestimmt.

Es stellte sich heraus, dass *C. trachomatis* Serovar K im Gegensatz zu *C. pneumoniae* TW183 keine Expression von IL-8 in HUVEC induziert (s. Abb. 3.5), obwohl *C. trachomatis* in der Lage ist, HUVEC zu infizieren [81].

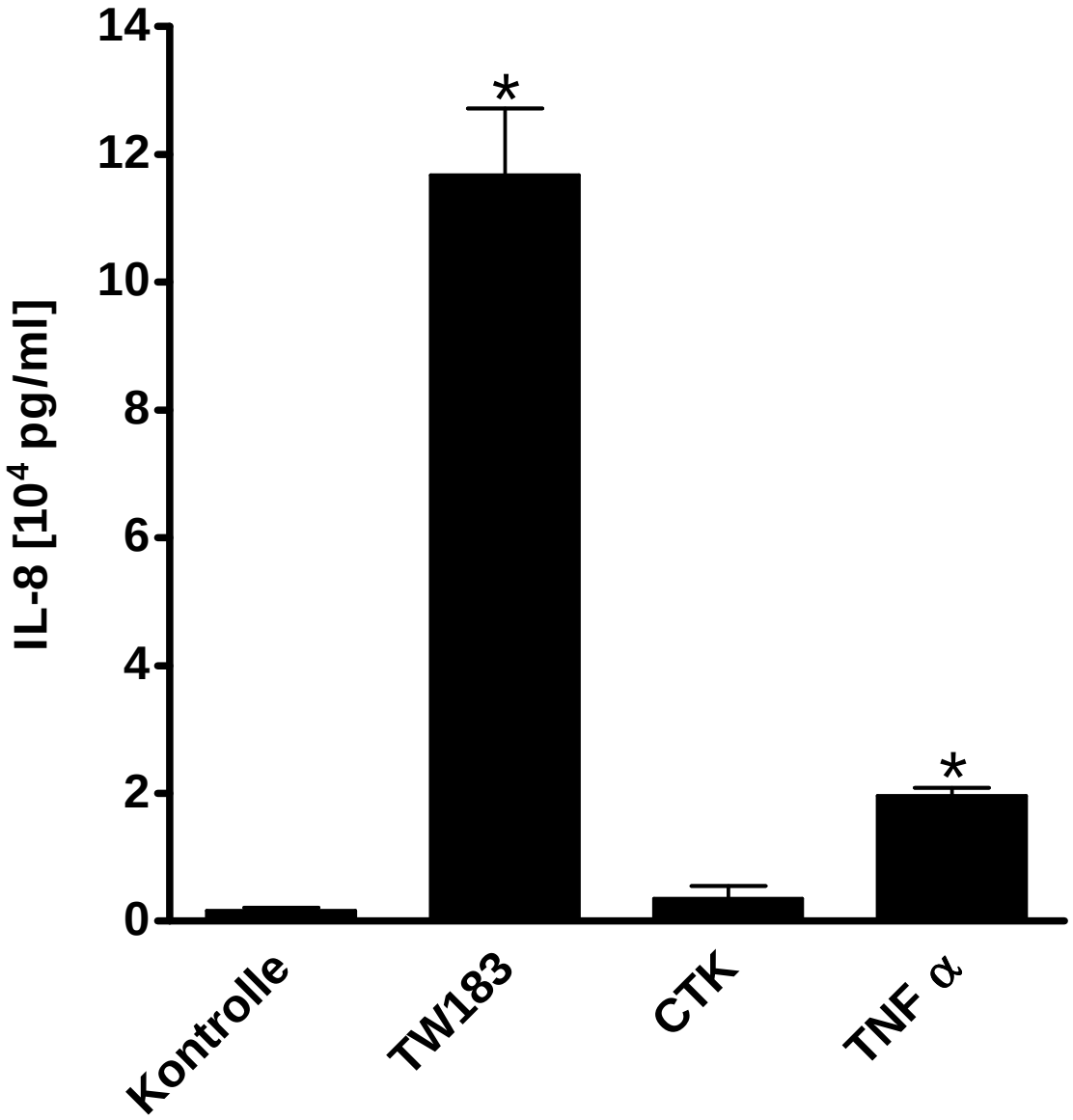


Abb. 3.5: IL-8- Produktion von HUVEC nach Infektion mit *C. pneumoniae* TW183 und *C. trachomatis* Serovar K. Messung der IL-8- Konzentration mittels ELISA. HUVEC wurden mit *C. pneumoniae* TW183 oder *C. trachomatis* Serovar K (CTK) einer MOI von 5 infiziert und die Zellkulturüberstände nach 24 h abgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM aus 3 separaten Experimenten. * statistisch signifikanter Unterschied ($p<0.01$) zur Negativkontrolle.

3.5 Aktivierung von NF-κB durch *C. trachomatis*

Da das Gen für IL-8 eine NF-κB- Sequenz in seinem Promoter enthält [86] und damit die Expression von IL-8 von NF-κB kontrolliert wird, wurde untersucht, ob *C. trachomatis* zu einer Aktivierung von NF-κB in HEp-2 Zellen führt. Dazu wurden die Zellen für 3 h mit 0,75 µg NF-κB- Luciferase Plasmid [113] transient transfiziert. Die Infektion erfolgte mit *C. trachomatis* einer MOI von 5, 0,5 und 0,05 pro Well (1,2 x 10^5, 1,2 x 10^4 und 1,2 x 10^3 IFU/ml). 6 h nach Infektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Zellen, als Positivkontrolle TNFα stimulierte Zellen. Das Ergebnis war ein konzentrationsabhängiger Anstieg der NF-κB- Aktivität (gezeigt als Chemolumineszenz/µg Protein) in *C. trachomatis*- infizierten HEp-2 Zellen. Die höchste Aktivität von NF-κB wurde nach Infektion mit *C. trachomatis* einer MOI von 5 (1,2 x 10^5 IFU/ml) beobachtet (s. Abb. 3.6).

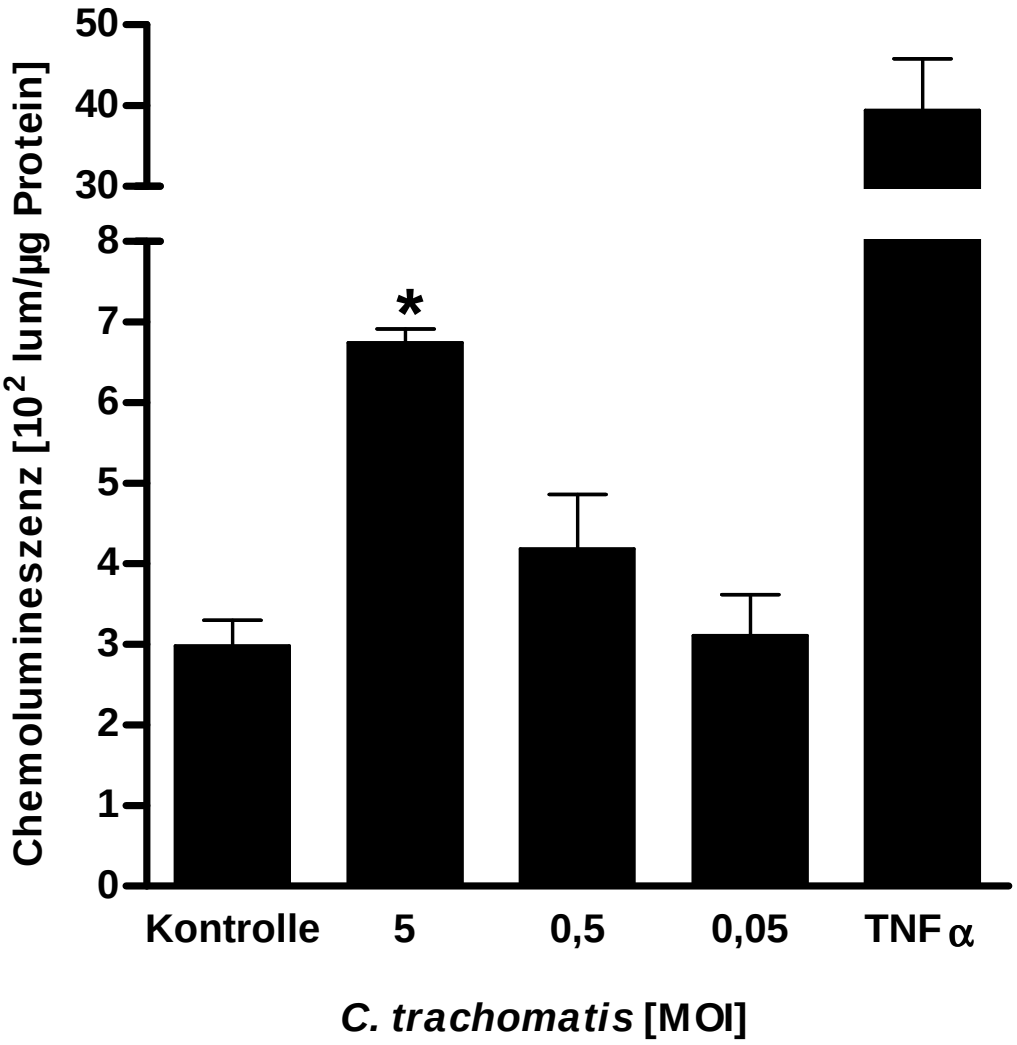


Abb. 3.6: NF-κB- Aktivierung in HEp-2 Zellen nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K. Nachweis der Induktion von NF-κB mittels Luciferase-Assay. Transient transfizierte HEp-2 Zellen wurden mit *C. trachomatis* einer MOI von 5, 0,5 und 0,05 pro Well ($1{,}2x10^5$, $1{,}2x10^4$ und $1{,}2x10^3$ IFU/ml) infiziert und für 6 h inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM aus 3 separaten Experimenten. * statistisch signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zur Negativkontrolle.

3.6 Aktivierung von NF-κB durch UV-inaktivierte *C. trachomatis*

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob UV-inaktivierte *C. trachomatis* Serovar K auch in der Lage ist, eine Aktivierung von NF-κB in HEp-2 Zellen zu induzieren. Analog zum vorherigen Experiment wurden die Zellen für 3 h mit 0,75 µg NF-κB- Luciferase Plasmid [113] transient transfiziert. Die Infektion erfolgte mit *C. trachomatis* einer MOI von 5 pro Well (1,2 x 10^5 IFU/ml) sowie mit UV-inaktivierten *C. trachomatis* einer MOI von 5 pro Well (1,2 x 10^5 IFU/ml). Die UV-Inaktivierung von *C. trachomatis* erfolgte 60 min bei maximaler Leitung im UV-Crosslinker.

3 h nach Infektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Zellen, als Positivkontrolle TNFα stimulierte Zellen. Das Ergebnis war ein Anstieg der NF-κB- Aktivität (gezeigt als Chemolumineszenz/µg Protein) sowohl in *C. trachomatis*- infizierten als auch in UV-inaktivierten *C. trachomatis*- infizierten HEp-2 Zellen (s. Abb. 3.7).

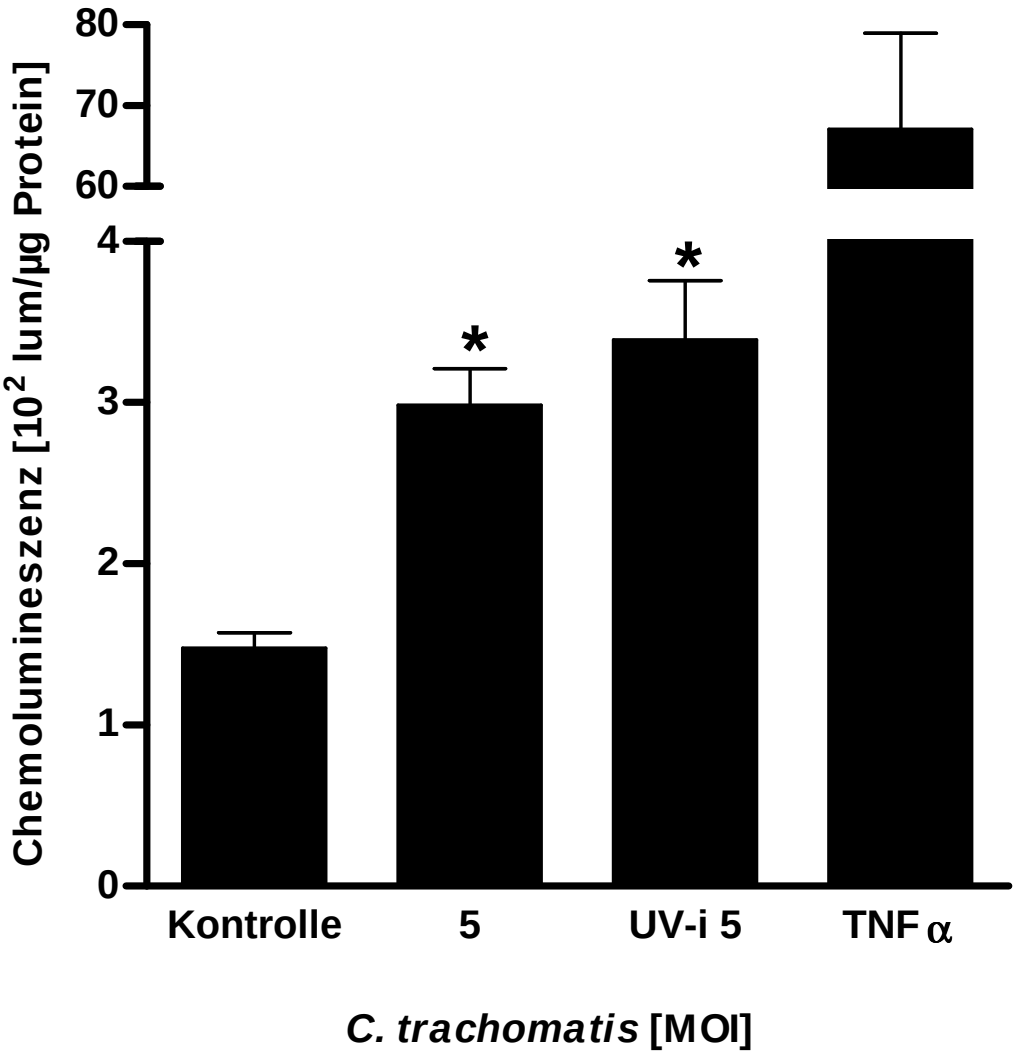


Abb. 3.7: NF-κB- Aktivierung in HEp-2 Zellen nach Infektion mit *C. trachomatis* und UV-inaktivierten *C. trachomatis* Serovar K. Nachweis der Induktion von NF-κB mittels Luciferase-Assay. Transient transfizierte HEp-2 Zellen wurden mit *C. trachomatis* einer MOI von 5 pro Well ($1{,}2 \times 10^5$ IFU/ml) sowie mit UV-inaktivierten *C. trachomatis* (UV-i) einer MOI von 5 pro Well ($1{,}2 \times 10^5$ IFU/ml) infiziert und für 3 h inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM aus 3 separaten Experimenten. * statistisch signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zur Negativkontrolle.

3.7 Phosphorylierung der MAP-Kinasen nach Infektion von HEp-2 Zellen mit *C. trachomatis*

Die Expression von IL-8 wird sowohl auf transkriptionaler als auch auf translationaler Ebene reguliert [86, 117, 118]. Zu den Mitgliedern der MAPK gehören p38, ERK1/2 und JNK, die durch Regulierung von Transkriptionsfaktoren Zellproliferation, Stressantwort sowie Aktivierung des IL-8 Promoters hervorrufen.

Um die regulatorischen Mechanismen der IL-8- Produktion infolge chlamydialer Infektionen zu ermitteln, untersuchten wir jetzt die Aktivierung der MAPK Signalwege.

Hierzu wurde zunächst die Phosphorylierung der MAPK p38, ERK1/2 sowie JNK mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. HEp-2 Zellen wurden mit *C. trachomatis* Serovar K (MOI = 5) für 5, 15, 30, 60 und 120 min inkubiert. Anschließend wurden die Proteine der HEp-2 Zellen aufgereinigt und mittels Western Blot analysiert. Nicht infizierte Zellen, deren Proteine nach 15 min aufgereinigt wurden, dienten als Negativkontrolle. TNFα stimulierte Zellen, deren Proteine ebenfalls nach 15 min aufgereinigt wurden, dienten als Positivkontrolle. Die Proteine wurden im Gel mit einer 10-prozentigen Acrylamid-Konzentration getrennt, als Beladungskontrolle dienten die nicht-phosphorylierten MAPK ERK2 und p38. Die Ergebnisse zeigten eine zeitabhängige Zunahme der Phosphorylierung der MAPK p38 (s. Abb. 3.8 A), ERK1/2 (s. Abb. 3.8 B) und JNK (s. Abb. 3.8 C). Eine maximale Phosphorylierung der p38-MAPK konnte nach 5 bis 15 min beobachtet werden, nach 30 min nahm diese wieder ab, wurde allerdings nach 120 min erneut sichtbar. Eine maximale ERK1/2-Phosphorylierung zeigte sich nach 5 bis 30 min, nach 60 min war diese nicht mehr nachweisbar. Eine gesteigerte Phosphorylierung der JNK-MAPK konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum von 5 bis 120 min nachgewiesen werden.

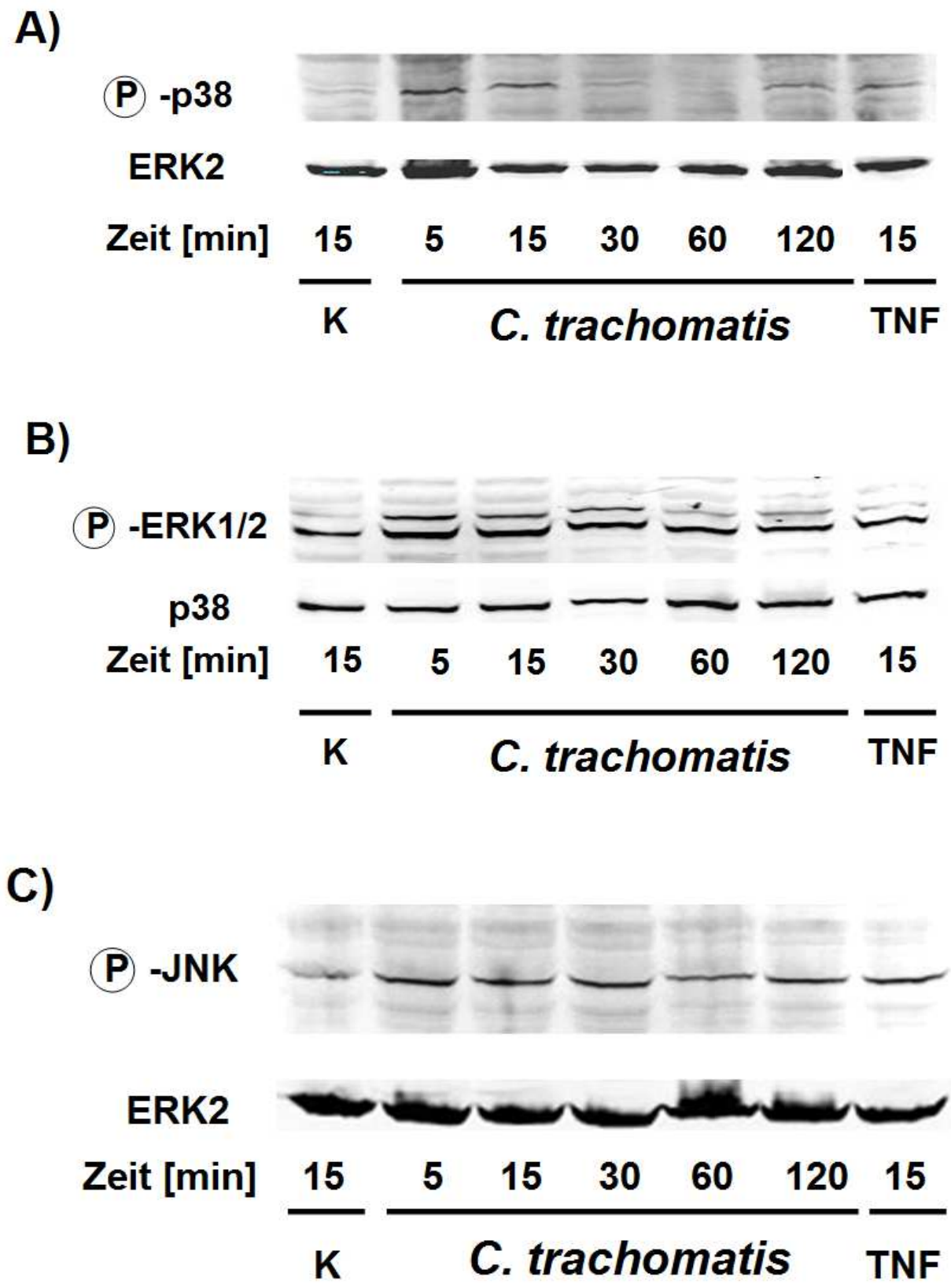

A)
Ⓟ -p38
ERK2
Zeit [min] 15 5 15 30 60 120 15
K
C. trachomatis
TNF
B)
Ⓟ -ERK1/2
p38
Zeit [min] 15 5 15 30 60 120 15
K
C. trachomatis
TNF
C)
Ⓟ -JNK
ERK2
Zeit [min] 15 5 15 30 60 120 15
K
C. trachomatis
TNF

Abb. 3.8: *C. trachomatis*-induzierte Phosphorylierung der MAPK p38, ERK1/2 und JNK in HEp-2 Zellen. Die Phosphorylierung der MAPK p38 **(A)**, ERK1/2 **(B)** und JNK **(C)** wurde in einer Zeitreihe mittels Western Blot analysiert. HEp-Zellen wurden mit *C. trachomatis* Serovar K (MOI = 5) für 5, 15, 30, 60 und 120 min inkubiert. Die Negativkontrolle bestand aus nicht infizierten Zellen (K). TNFα stimulierte Zellen (TNF) dienten als Positivkontrolle. Die Proteine wurden im Gel mit einer 10-prozentigen Acrylamid-Konzentration getrennt, als Beladungskontrolle dienten die nicht-phosphorylierten MAPK ERK2 und p38. Dargestellt sind repräsentative Gele aus je 3 separaten Experimenten.

3.8 Modifikation der *C. trachomatis*- induzierten Zytokin-Induktion durch MAP-Kinase-Inhibitoren und PI 3-Kinase-Inhibitor

3.8.1 Hemmung der IL-8- Induktion durch p38- und ERK1/2-MAPK-Inhibitor

Um zu überprüfen, ob die Aktivität der MAPK p38 und ERK1/2 für die chlamydieninduzierte Expression von IL-8 von Bedeutung sind, wurden HEp-2 Zellen mit den entsprechenden Kinase-Inhibitoren vorbehandelt.

HEp-2 Zellen wurden 30 min vor Infektion mit Medium inkubiert, das den p38-MAPK-Inhibitor SB 202190 in einer Konzentration von 5 µM bzw. den ERK1/2-MAPK-Inhibitor U 0126 in einer Konzentration von 6 µM oder beide Inhibitoren in den genannten Konzentrationen enthielt. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden die Zellen mit *C. trachomatis* einer MOI von 5 (1,2 x 10^5 IFU/ml) stimuliert. Nach weiteren 30 min fand ein Mediumwechsel statt, unter Beibehaltung der bereits initial zugeführten Inhibitoren. Nicht infizierte Zellen dienten als Negativkontrolle, TNFα stimulierte Zellen als Positivkontrolle. 24 h nach Infektion wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und mittels ELISA auf IL-8 analysiert. Die Infektion mit *C. trachomatis* führte analog zu den vorherigen Experimenten zu einem Konzentrationsanstieg von IL-8 im Zellkulturüberstand. Die Vorinkubation der HEp-2 Zellen mit p38-MAPK-Inhibitor führte zu einer Reduktion der IL-8- Konzentration um 76 %, die mit dem ERK1/2-MAPK-Inhibitor zu einer Reduktion der IL-8- Konzentration um 78 % in den Überständen der infizierten Zellen (s. Abb. 3.9). Die Inkubation mit beiden Inhibitoren gleichzeitig bewirkte eine 100%ige Inhibition der IL-8- Sekretion im Zellkulturüberstand.

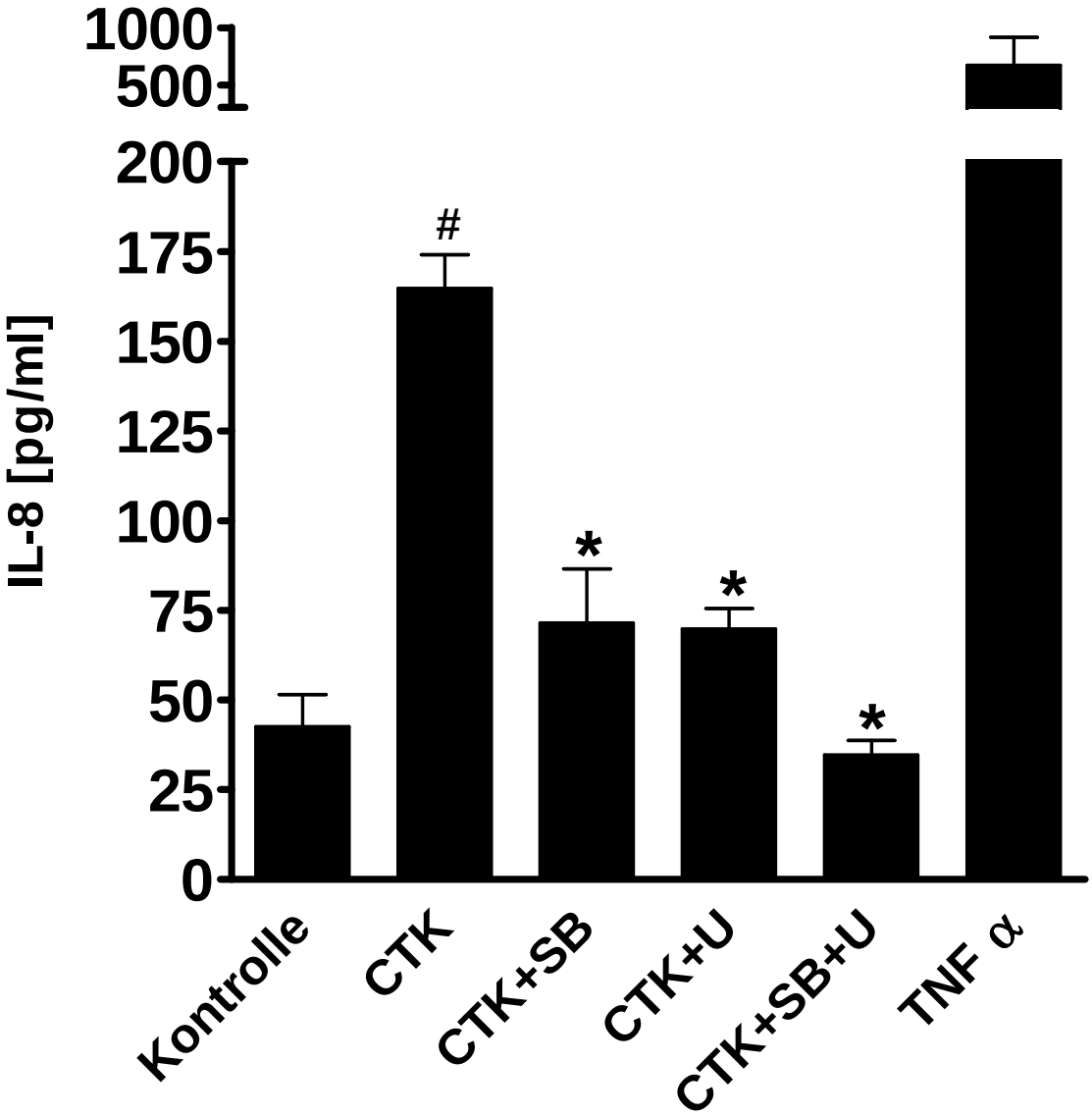


Abb. 3.9: IL-8-Produktion von mit MAPK-Inhibitor vorinkubierten HEp-2 Zellen nach Infektion mit *C. trachomatis.* Messung der IL-8-Konzentration mittels ELISA (24 h nach Infektion). 30 min vor Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K (CTK) einer MOI von 5 ($1{,}2 \times 10^5$ IFU/ml) wurden HEp-2 Zellen mit dem p38-MAPK- (SB 202190, 5 µM) oder ERK1/2- (U 0126, 6 µM) Inhibitor inkubiert. Die Zellen blieben während des gesamten Versuches der Inhibitorkonzentration ausgesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM aus 3 separaten Experimenten. # statistisch signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zur Negativkontrolle. * statistisch signifikanter Unterschied ($p<0.01$) zu CTK.

3.8.2 Hemmung der IL-8- Induktion durch JNK- und PI 3-Kinase-Inhibitor

Analog zum vorherigen Experiment wurde mit den Inhibitoren der c-Jun amino-terminal kinase (JNK) SP 600125 und der PI 3-Kinase LY 294002 verfahren. 30 min vor Infektion mit *C. trachomatis* (MOI = 5) wurde Medium mit dem JNK-Inhibitor in einer Konzentration von 5 µM bzw. mit dem PI 3-Kinase-Inhibitor in einer Konzentration von 5 µM zu HEp-2 Zellen gegeben. Bei diesem Experiment zeigte der PI 3-Kinase-Inhibitor eine Hemmung der durch *C. trachomatis*- induzierten IL-8- Sekretion um 56 % (s. Abb. 3.10). Die Vorinkubation der Zellen mit dem JNK-Inhibitor hatte keinen statistisch signifikanten Effekt auf die IL-8- Konzentration im Überstand *C. trachomatis*- infizierter HEp-2 Zellen.

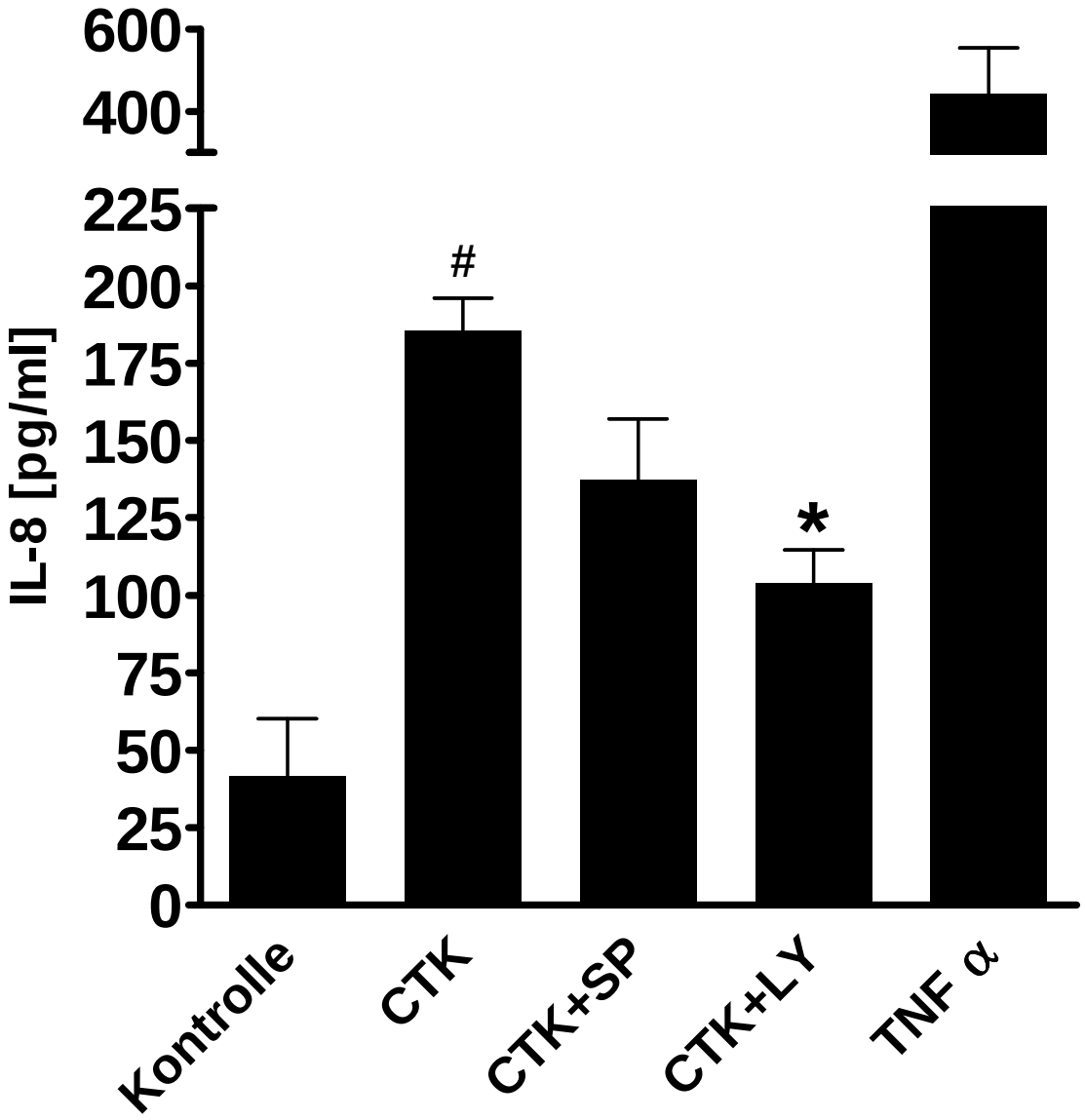


Abb. 3.10: IL-8-Produktion von mit JNK- und PI 3-Kinase-Inhibitor vorinkubierten HEp-2 Zellen nach Infektion mit *C. trachomatis*. Messung der IL-8-Konzentration mittels ELISA (24 h nach Infektion). 30 min vor Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K (CTK) einer MOI von 5 ($1{,}2 \times 10^5$ IFU/ml) wurden HEp-2 Zellen mit dem JNK- (SP 600125, 5 µM) oder PI 3-Kinase- (LY 294002, 5 µM) Inhibitor inkubiert. Die Zellen blieben während des gesamten Versuches der Inhibitorkonzentration ausgesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM aus 3 separaten Experimenten. # statistisch signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zur Negativkontrolle. * statistisch signifikanter Unterschied ($p<0.01$) zu CTK.

3.9 Modifikation der *C. trachomatis*- induzierten NF-κB- Aktivierung durch MAP-Kinase-Inhibitoren und PI 3-Kinase-Inhibitor

3.9.1 Hemmung der NF-κB- Aktivierung durch p38- und ERK1/2-MAPK-Inhibitor

Um zu prüfen, ob die Aktivität der MAPK p38 und ERK1/2 für die chlamydieninduzierte Aktivierung von NF-κB eine Rolle spielt, wurden HEp-2 Zellen mit den entsprechenden Kinase-Inhibitoren vorbehandelt.

Zunächst wurden HEp-2 Zellen für 3 h mit 0,75 µg NF-κB- Luciferase Plasmid transient transfiziert. Anschließend wurden diese 30 min vor der eigentlichen Infektion mit dem p38-MAPK-Inhibitor SB 202190 (5 µM) bzw. mit dem ERK1/2-MAPK-Inhibitor U 0126 (6 µM) oder mit beiden Inhibitoren vorinkubiert und anschließend mit *C. trachomatis* in einer MOI von 5 (1,2 x 10^5 IFU/ml) stimuliert. Nicht infizierte Zellen dienten als Negativkontrolle, TNFα stimulierte Zellen als Positivkontrolle. 3 h nach Infektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Infektion mit *C. trachomatis* führte analog den vorherigen Experimenten zu einer Aktivierung von NF-κB (gezeigt als Chemolumineszenz/µg Protein x 10, s. Abb. 3.11). Die Zugabe des p38-MAPK-Inhibitors führte zu einer Reduktion der NF-κB- Aktivierung um 31 %, die des ERK1/2-MAPK-Inhibitors zu einer Reduktion der NF-κB- Aktivierung um 67 %. Die Inkubation mit beiden Inhibitoren gleichzeitig bewirkte eine Minderung der NF-κB-Aktivierung um 60 %.

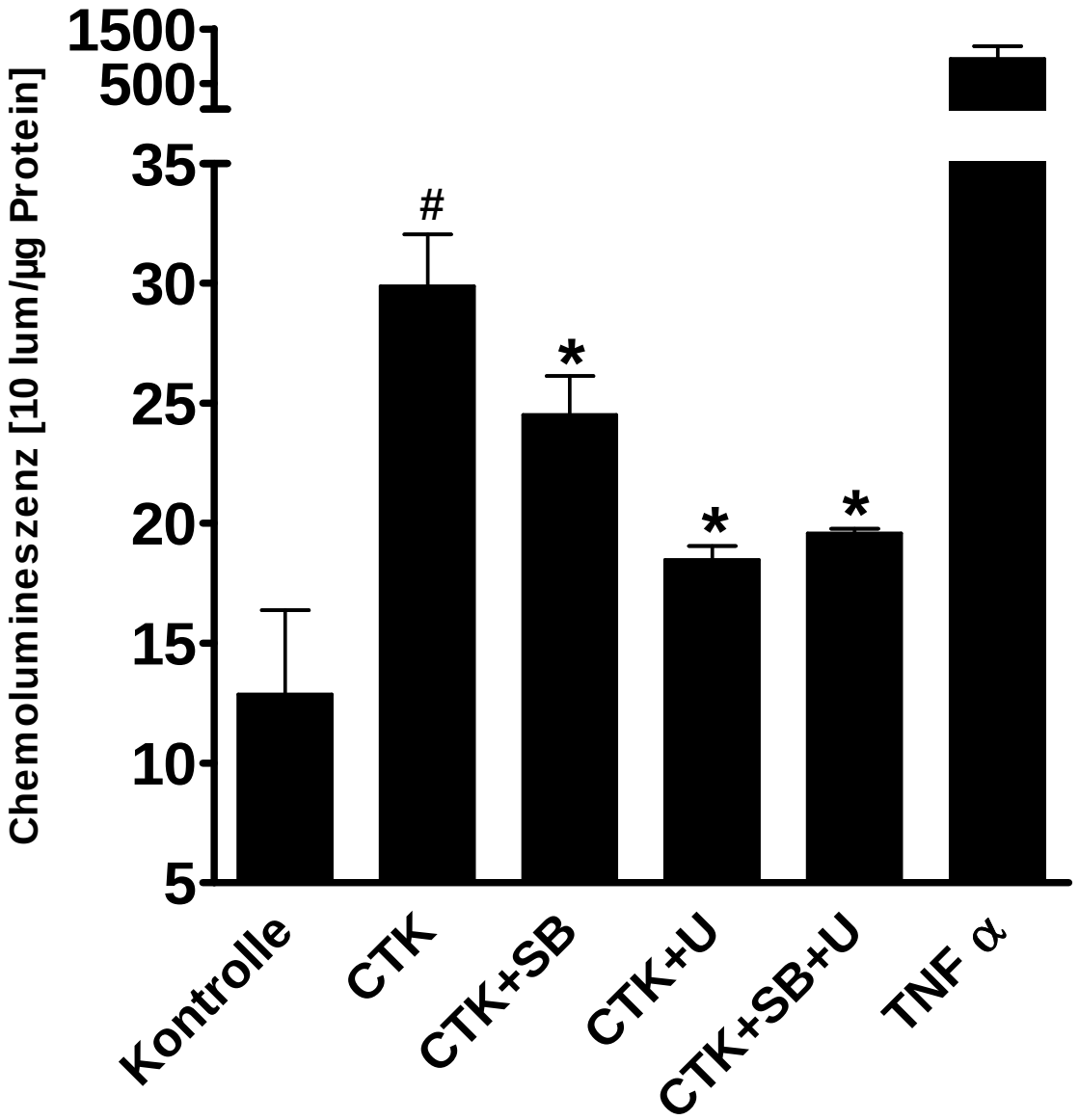


Abb. 3.11: NF-κB- Aktivierung in p38- und ERK1/2-MAPK-Inhibitor-vorinkubierten HEp-2 Zellen nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K. Nachweis der Induktion von NF-κB mittels Luciferase-Assay (3 h nach Infektion). 30 min vor Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K (CTK) einer MOI von 5 ($1{,}2 \times 10^5$ IFU/ml) wurden transient transfizierte HEp-2 Zellen mit dem p38-MAPK- (SB 202190, 5 µM) oder ERK1/2- (U 0126, 6 µM) Inhibitor inkubiert. Die Zellen blieben während des gesamten Versuches der Inhibitorkonzentration ausgesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM aus 3 separaten Experimenten. # statistisch signifikanter Unterschied ($p<0.01$) zur Negativkontrolle. * statistisch signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zu CTK.

3.9.2 Hemmung der NF-κB- Aktivierung durch JNK- und PI 3-Kinase-Inhibitor

Analog zu den vorherigen Experimenten wurde mit den Inhibitoren der c-Jun amino-terminal kinase (JNK) SP 600125 und der PI 3-Kinase LY 294002 verfahren. 30 min vor Infektion mit *C. trachomatis* (MOI = 5) erfolgte eine Inkubation der HEp-2 Zellen mit dem JNK-Inhibitor bzw. PI 3-Kinase-Inhibitor (jeweils 5 µM). Bei diesem Experiment zeigte der PI 3-Kinase-Inhibitor eine Hemmung der durch *C. trachomatis*- induzierten NF-κB- Aktivierung um 100 % (s. Abb. 3.12). Die Vorinkubation der Zellen mit dem JNK-Inhibitor hatte keinen statistisch signifikanten Effekt auf die NF-κB- Aktivierung *C. trachomatis*- infizierter HEp-2 Zellen.

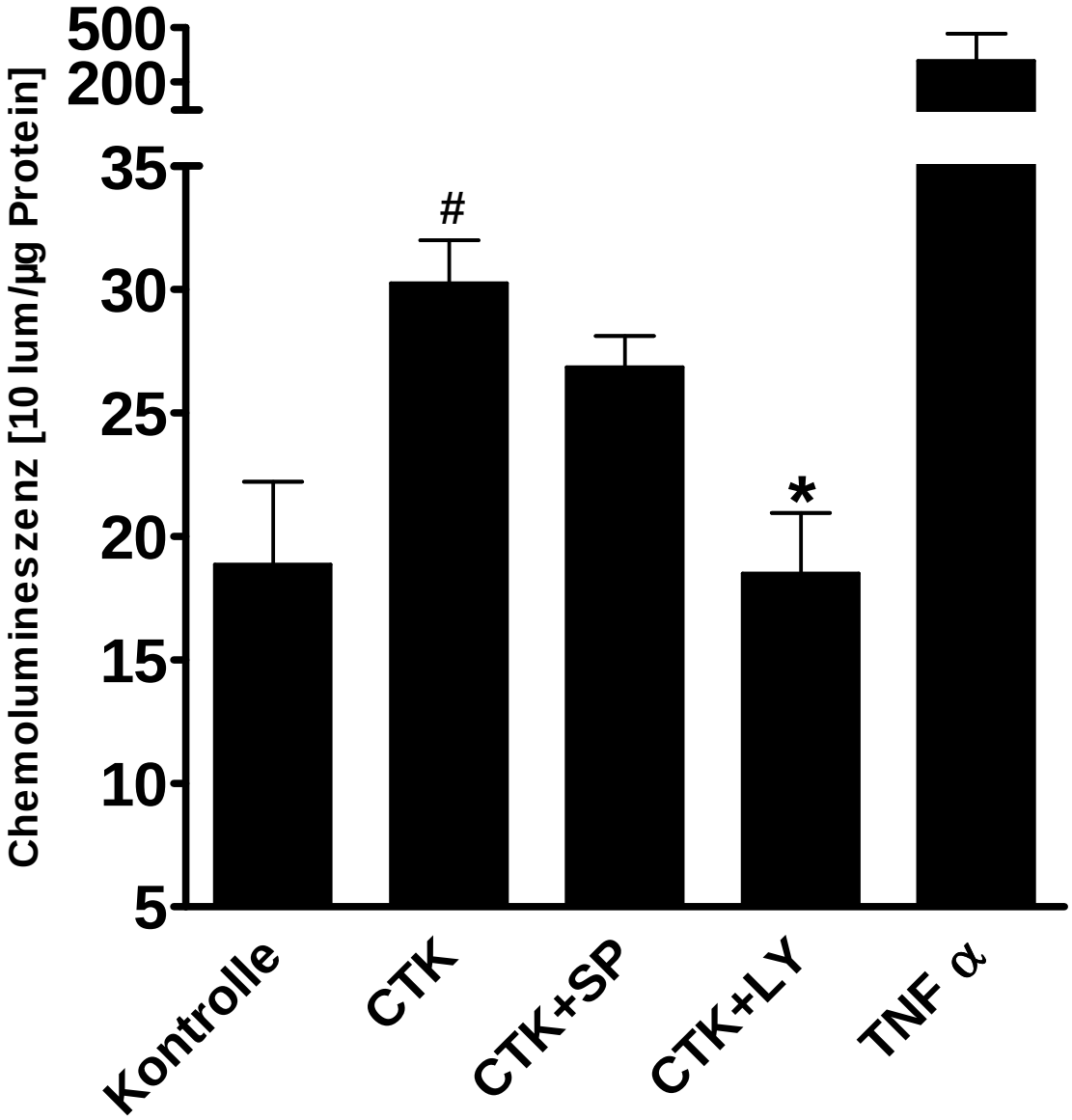


Abb. 3.12: NF-κB- Aktivierung in *C. trachomatis*- infizierten HEp-2 Zellen nach Vorinkubation mit einem JNK- und PI 3-Kinase-Inhibitor. Nachweis der Translokation von NF-κB mittels Luciferase-Assay (3 h nach Infektion). 30 min vor Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K (CTK) mit einer MOI von 5 ($1{,}2 \times 10^5$ IFU/ml) wurden transient transfizierte HEp-2 Zellen mit dem JNK- (SP 600125, 5 µM) oder PI 3-Kinase- (LY 294002, 5 µM) Inhibitor inkubiert. Die Zellen blieben während des gesamten Versuches der Inhibitorkonzentration ausgesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM aus 2 separaten Experimenten. # statistisch signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zur Negativkontrolle. * statistisch signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zu CTK.

4 Diskussion

Im Rahmen chlamydialer Infektionen und Erkrankungen lassen sich in verschiedenen Kompartimenten des Organismus ausgeprägte inflammatorische Veränderungen nachweisen. Über die Mechanismen der *C. trachomatis*- induzierten Zielzellaktivierung ist jedoch noch wenig bekannt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *C. trachomatis* Serovar K in der Lage ist, HEp-2 Zellen und humane Endothelzellen (HUVEC) zu infizieren. Diese Infektion führt nachfolgend zu einer dosisabhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB und einer zeit- und dosisabhängigen Freisetzung des Zytokins IL-8 in HEp-2 Zellen. Hingegen induziert *C. trachomatis* Serovar K keine signifikante IL-8- Freisetzung in HUVEC verglichen mit *C. pneumoniae* TW183.

Zudem induziert *C. trachomatis* Serovar K eine Phosphorylierung der MAPK p38, ERK1/2 und JNK in HEp-2 Zellen. Darüber hinaus ist die Aktivität der MAPK p38 und ERK1/2, nicht jedoch die der JNK für die NF-κB- Aktivierung und IL-8- Freisetzung von Bedeutung. Die PI 3-Kinase ist ebenfalls an der *C. trachomatis*- induzierten NF-κB-Aktivierung und IL-8- Freisetzung in HEp-2 Zellen beteiligt.

Diese Beobachtungen haben gezeigt, dass *C. trachomatis* Serovar K über die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege in humanen Epithelzellen nicht jedoch in endothelialen Zellen einen proinflammatorischen Phänotyp induziert.

4.1 Bedeutung des proinflammatorischen Phänotyps

Die im Rahmen chlamydialer Infektionen auftretenden sexuell übertragenen oder respiratorischen Erkrankungen verlaufen häufig mild oder inapparent, so dass sie oftmals unerkannt und daher unbehandelt bleiben. Die durch *C. trachomatis* verursachten Infektionen werden deshalb als mögliche Ursache für chronische Krankheitsverläufe einer Salpingitis mit nachfolgender Infertilität oder auch eine reaktive Arthritis diskutiert [119-121].

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass *C. trachomatis* Serovar K HEp-2 Zellen und HUVEC infiziert. Hingegen konnten UV-inaktivierte *C. trachomatis* Serovar K HEp-2 Zellen nicht infizieren, hier kam es zu keiner Ausbildung von Einschlusskörperchen. Bereits frühere Studien haben gezeigt, dass hitze- oder UV-inaktivierte *C. pneumoniae* nicht in der Lage sind, in Zielzellen einzudringen [122]. Diese Beobachtungen deuten

darauf hin, dass chlamydiale Infektion und Invasion aktive Prozesse lebender Bakterien sind.

Ein Merkmal chlamydialer Infektionen ist die Entwicklung einer Entzündungsreaktion assoziiert mit der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1α, IL-6, IL-11, GROα, GM-CSF, Interferone (IFNs) und IL-8. Dies konnten Studien mittels *in vitro*- und *in vivo*- Experimenten zeigen [19, 82, 83, 123-125]. IL-8 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das zur Aktivierung neutrophiler und basophiler Granulozyten sowie von T-Lymphozyten führt [74]. Histopathologische Untersuchungen endozervikaler und endometrialer Biopsien konnten zeigen, dass proinflammatorische Faktoren durch Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (PMN) an den Ort der Infektion zu einer akuten Entzündungsreaktion führen, gefolgt von einer subepithelialen Akkumulation mononukleärer Leukozyten während der chronischen Phase der Infektion [19, 84, 85, 126]. Dessus-Babus *et al.* beobachteten, dass in *C. trachomatis* Serovar L2- infizierten HeLa Zellen freigesetztes IL-8 hochchemotaktisch auf PMN wirkt [82]. Hingegen zeigte sich eine deutlich geringere PMN- Rekrutierung nach Infektion von HeLa Zellen mit *C. trachomatis* Serovar E, was auf die moderatere Zytokininduktion durch Serovar E-Infektionen zurückgeführt wird [82]. Diese *in vitro* Studien korrelieren darüber hinaus mit *in vivo* Beobachtungen, die zeigen, dass Serovar E- Infektionen eher asymptomatisch verlaufen im Vergleich zu LGV- Infektionen [82].

Insgesamt lässt sich feststellen, dass chlamydieninfizierte Zellen durch die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren das Immunsystem aktivieren und darüber hinaus der Ausgangspunkt für persistierende Chlamydieninfektionen sein können [19]. So konnten erhöhte Zytokinmengen in chlamydieninfizierten Mäusen gefunden werden [127]. Desweiteren konnten erhöhte IL-8 Level in Tränen von Kindern mit okulärer Chlamydieninfektion gemessen werden [19].

Die vorliegende Arbeit nutzte IL-8 als Modell-Zytokin zur Darstellung der proinflammatorischen Wirtszellantwort auf Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K.

Es konnte eine zeit- und dosisabhängige Freisetzung von IL-8 in HEp-2 Zellen nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K nachgewiesen werden. Maximale IL-8-Freisetzung fand sich nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K einer MOI von 5. Signifikante IL-8- Konzentrationen waren 24 und 48 h nach Infektion nachweisbar. Somit korrelierten die IL-8- Konzentrationen mit der chlamydialen Infektionsdosis sowie den Infektionszeiten. Höhere IL-8- Ausschüttung konnte bei höherer Infektionsdosis und

nach längerer Infektionszeit gemessen werden. Dies weist daraufhin, dass chlamydiale Replikation Voraussetzung für die Aktivierung der HEp-2 Zellen ist.

Andere Arbeiten zeigten ebenfalls, dass die Bildung proinflammatorischer Zytokine abhängig vom bakteriellen Wachstum ist [83]. Buchholz *et. al* zeigten z. B. eine von der bakteriellen Proteinsythese abhängige IL-8- Ausschüttung 15 h nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar L2 [87]. Die Identifikation eines lipidmetabolischen Signalweges, der nach Zielzellinfektion durch *C. trachomatis* Serovar L2 und D aktiviert wird und über die Aktivierung von ERK1/2 und Prostaglandin E2 (PGE2) zur Freisetzung von IL-8 führt, bestätigt den Zusammenhang zwischen Zytokinproduktion und intrazellulärem bakteriellem Wachstum [128].

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Infektion mit *C. trachomatis* und die konsekutive IL-8 Antwort in Epithelzellen aktive Prozesse sind und den chlamydialen Entwicklungszyklus in den Zielzellen voraussetzen. Somit führt nur die Infektion mit lebenden Chlamydien zur Aktivierung eines proinflammatorischen Phänotyps. Damit ist eine wichtige Voraussetzung für die Aktivierung von Immunzellen gegeben.

4.2 Unterschiede der Zielzellaktivierung durch *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*

Die primären Zielzellen von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* unterscheiden sich voneinander: Während *C. trachomatis* vorwiegend primär epitheliale Zellen des Urogenitaltrakts oder des Auges infiziert, infiziert *C. pneumoniae* primär epitheliale Zellen des Respirationstrakts [129]. Darüber hinaus ist *C. trachomatis* in der Lage Makrophagen und glatte Muskelzellen [130], *C. pneumoniae* zudem Monozyten, Makrophagen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen zu infizieren [131-133].

Es konnte gezeigt werden, dass eine epitheliale Zielzellaktivierung durch *C. pneumoniae* sowohl die Freisetzung der Zytokine IL-8 und GM-CSF, als auch eine vermehrte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 gefolgt von einer vermehrten Interaktion von Leukozyten mit aktivierten Epithelzellen induziert [134, 135].

Die vorliegende Arbeit konnte die Freisetzung von IL-8 aus *C. trachomatis*- infizierten HEp-2 Zellen zeigen. Diese Induktion von IL-8 durch *C. trachomatis* ist jedoch nicht spezifisch für HEp-2 Zellen, sie konnten auch an *C. trachomatis* Serovar L2- infizierten

HeLa Zellen sowie endozervikalen Zellen nachgewiesen werden [83]. Dies ist allerdings kein Serovar L2-spezifischer Effekt, auch verschiedene weitere chlamydiale Spezies und Serovare (*C. trachomatis* Serovar D, E und I, *C. psittaci* [82, 83]) sind hierzu in der Lage.

Frühere Studien konnten zudem zeigen, dass *C. pneumoniae* in der Lage ist, humane umbilikalvenöse (HUVEC) und humane arterielle Endothelzellen (HAEC) zu infizieren. Die Infektion führt in der Folge zu einer vermehrten Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 gefolgt von einer vermehrten Interaktion (Rollen, Adhäsion und Transmigration) von humanen Monozyten und neutrophilen Granulozyten (PMN) mit den infizierten Endothelzellen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Endothelzellen nach Infektion mit *C. pneumoniae* prolongiert und protrahiert die leukozytenchemotaktisch hochaktiven Mediatoren RANTES, MCP-1 und IL-8 sezernieren [81, 113].

Es fand sich in der vorliegenden Arbeit hingegen keine IL-8- Ausschüttung durch HUVEC nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K. Diese ist offenbar Zelltyp-spezifisch. Nach Infektion von HUVEC mit *C. trachomatis* Serovar K beobachtet man die Entstehung vieler kleiner atypischer Einschlüsse [81]. Diese „suboptimale“ Infektion könnte der Grund für eine verminderte Reaktion der Endothelzellen nach Infektion mit *C. trachomatis* sein, da HUVEC nicht die primären Zielzellen sind und *C. trachomatis* Serovar K daher nicht gut in ihnen wachsen kann. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass *C. trachomatis* Serovar L2 zwar in der Lage ist, humane Monozyten zu infizieren, jedoch keine Aktivierung und Adhäsion der Monozyten an Endothelzellen induzieren kann [136].

Ursächlich für die Unterschiede hinsichtlich Biologie, Wirtszelltropismus und Pathogenese von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* könnten verschiedene speziespezifische Gene sein. So enthält *C. trachomatis* mit 1,0 Mbp ein etwas kleineres Genom als *C. pneumoniae* mit 1,2 Mbp [13, 14]. Von den 1073 für Proteine kodierenden Genen in *C. pneumoniae* konnten für 214 keine homologen Sequenzen im Genom von *C. trachomatis* gefunden werden. Umgekehrt besitzt *C. trachomatis* 70 Gene, die in *C. pneumoniae* nicht vorkommen. Es konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* eine höhere Invasivität besitzt und in einem breiteren Spektrum an Wirtszellen überleben kann als *C. trachomatis* [13].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl *C. trachomatis* als auch *C. pneumoniae* in der Lage sind, eine Reihe von Zielzellen zu aktivieren. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch zudem, dass die Infektion von humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVEC) mit nachfolgender Induktion eines proinflammatorischen Phänotyps spezifisch für *C. pneumoniae* ist. Hingegen führt die Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K nur zur Ausbildung eines proinflammatorischen Phänotyps in HEp-2 Zellen. HUVEC zeigten nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K keine IL-8 Sekretion.

4.3 Bedeutung der verschiedenen Kompartimente der Signaltransduktion

Die Übertragung von Informationen von der Zelloberfläche in den Zellkern sowie die intrazelluläre Kommunikation läuft über eine Vielzahl verschiedener Signalübertragungskaskaden. Die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) sind in allen Eukaryonten vorkommende Signaltransduktionsenzyme, die durch eine Reihe extrazellulärer Stimuli aktiviert werden. Die ERK1/2-MAPK reguliert durch Stimulierung der DNA-Synthese sowie verschiedener Transkriptionsfaktoren die Zellproliferation und Differenzierung [47-49]. JNK- und p38-MAPK moderieren Stressantworten wie Entzündungsreaktionen und Apoptose [50, 51]. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei MAPK Signalwege (p38, ERK1/2 und JNK) zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB führen können [54]. NF-κB wiederum ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Expression von IL-8 [86]. Desweiteren können MAPK die Transkription von IL-8 induzieren. Dies ist jedoch vom Zelltyp und der Art des Stimulus abhängig [78, 86]. Die Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3K) sind eine Gruppe von Signaltransduktionsenzymen, die ebenfalls an einer Reihe von biologischen Prozessen beteiligt sind wie Zellwachstum, Regulation von Apoptosevorgängen, Änderungen des Zytoskeletts sowie Vesikeltransport [32]. Desweiteren wirken sie an Entzündungsprozessen mit [33].

Die vorliegende Arbeit konnte eine Phoshorylierung der p38-MAPK nach 5, 15 und 120 min, der ERK1/2-MAPK nach 5 bis 30 min sowie der JNK-MAPK nach 5 bis 120 min nach Kontakt der HEp-2 Zellen mit *C. trachomatis* Serovar K zeigen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bereits die alleinige Anhaftung der Chlamydien an HEp-2 Zellen ausreichend für deren Aktivierung ist und dass dazu keine Aufnahme der Chlamydien in

die Zelle erforderlich ist, diese erfolgt frühestens nach 15-30 min. Coombes und Mahony konnten zeigen, dass die Bildung von Mikrovilli an der Zelloberfläche nach Anhaftung durch C. *pneumoniae* an die Zelle mit der Aktivierung des ERK Signalweges assoziiert ist [90]. Dieser wird bereits 10 min nach Kontakt der Zellen mit den Bakterien aktiviert und ist beteiligt an der Aufnahme der Bakterien in die Zelle.

Desweiteren zeigen infizierte Endothelzellen wenige Minuten nach Kontakt mit *C. pneumoniae* eine vermehrte Thyrosin-Phosphorylierung sowie Phosphorylierung und Aktivierung von p38, ERK1/2 und JNK [81, 113]. Diese MAPK-Aktivierung in Zielzellen ist von einer Chlamydien- induzierten Zunahme intrazellulären Calciums abhängig [137-139].

NF-κB ist als Transkriptionsfaktor essentiell für eine IL-8- Induktion nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar L2 [87]. Eine Aktivierung von NF-κB ist in den Zielzellen bereits frühzeitig nachweisbar und scheint zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion, wenn die mRNA Level von IL-8 hoch sind, nur noch bedingt relevant zu sein [140, 141]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte NF-κB- Aktivität in HEp-2 Zellen 3 und 6 h nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K beobachtet werden. Zudem war die NF-κB-Aktivität abhängig von der chlamydialen Infektionsdosis. Maximale NF-κB- Aktivität lies sich nach Infektion mit *C. trachomatis* in einer MOI von 5 nachweisen. Überraschenderweise zeigte sich ebenfalls eine erhöhte NF-κB- Aktivität in HEp-2 Zellen 3 h nach Vorinkubation mit UV-inaktivierten *C. trachomatis* Serovar K obwohl diese nicht in der Lage waren, HEp-2 Zellen auch zu infizieren. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung des NF-κB- Signalweges allein durch Adhäsion der Chlamydien an HEp-2 Zellen möglich ist.

In Studien von Lad *et al.* und Negrate *et al.* konnte hingegen keine erhöhte NF-kB-Aktivität in HeLa Zellen nach Infektion mit verschiedenen chlamydialen Spezies und Serovaren [142, 143] gezeigt werden. So beobachteten Lad *et al.*, dass *C. trachomatis* Serovar LGV2, C, D und F sowie *C. pneumoniae* CWL-029 die TNFα- induzierte IκBα-Degradation inhibieren können. Als molekularer Mechanismus wurde die chlamydiale Protease CT441 identifiziert, die p65/RelA spaltet und damit die Aktivierung von NF-κB verhindert [142, 144]. In der Arbeit von Negrate *et al.* war die chlamydiale Protease *Chla*Dub1 von *C. trachomatis* LGV2 an der Inhibierung der IκBα-Degradation und infolgedessen an der Blockierung der NF-κB- Aktivität beteiligt [143]. Diese Mechanismen könnten persistierenden Chlamydieninfektionen dazu dienen, sich einer

Immunantwort des infizierten Organismus zu entziehen, da NF-κB als zentraler Vermittler in die angeborene und erworbene Immunantwort involviert ist [145, 146].

In früheren Arbeiten aus der Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass *C. pneumoniae* in verschiedenen Zielzellen eine Aktivierung des IκB- Kinase Komplexes (IKK) mit Degradation von IκBα und Aktivierung sowie Translokation von NF-κB in den Zellkern, und nachfolgender Expression NF-κB- abhängiger proinflammatorischer Mediatoren wie Adhäsionsmolekülen, IL-6, IL-8, MCP-1 und RANTES nach sich zieht [113, 147-149]. Die *C. pneumoniae*- induzierte NF-κB- Translokation ist hierbei abhängig von der Aktivierung der p38- und ERK1/2-MAPK, nicht jedoch der JNK-MAPK [81]. Unsere Untersuchungen konnten eine Abhängigkeit der NF-κB- Aktivierung von der Aktivität der MAPK p38 und ERK1/2 3 h nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar K zeigen. So war die Aktivität von NF-κB signifikant verringert nach der Inhibition der MAPK p38 und ERK1/2. Hingegen konnte keine Beteiligung der MAPK JNK an der NF-κB- Aktivierung nachgewiesen werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Zugabe der MAPK-p38- und ERK1/2-Inhibitoren zu einer Reduktion der Chlamydien-induzierten IL-8- Produktion 24 h nach Infektion führte. Die Hemmung des JNK-MAPK Signalweges hatte auch hier keinen signifikanten Einfluss auf die IL-8- Freisetzung. Diese Ergebnisse legen die essentielle Bedeutung der MAPK p38 sowie ERK1/2 nicht jedoch der JNK für die NF-κB- Aktivierung und die konsekutive IL-8- Sekretion nach Infektion von epithelialen Zellen des Typs HEp-2 mit *C. trachomatis* Serovar K nahe.

Die Aktivierung endothelialer Zellen durch *C. pneumoniae* verursacht ebenfalls die Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Mediatoren wie Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und Zytokine einschließlich IL-8 [81, 147, 150, 151]. Inhibierung der MAPK Signaltransduktionswege mit spezifischen Inhibtoren konnte ebenso zeigen, dass die *C. pneumoniae*- induzierte Aktiverung der p38-MAPK und zu einem geringeren Grad der ERK1/2-MAPK, jedoch nicht der JNK-MAPK bei der Sekretion von IL-8 durch Endothelzellen eine wichtige Rolle spielen [81].

Die Arbeit von Vardhan *et al*. zeigte, dass die Bildung von IL-8 durch infizierte HeLa Zellen mit *C. trachomatis* Serovar D abhängig vom intrazellulär verfügbaren Eisen Deferoxamin (DFO) ist [152]. Sowohl der p38 als auch der ERK1/2 Signalweg sind für die DFO- induzierte IL-8- Sekretion notwendig [153-155]. Dies deutet daraufhin, dass chlamydiale Infektionen und DFO die gleichen Signalkaskaden zur Induktion von IL-8

aktivieren. Weitere Studien müssten die Involvierung von p38 und ERK1/2 in die DFO-induzierte IL-8- Sekretion nach chlamydialer Infektion noch belegen.

Andere Studien konnten ebenfalls einen Einfluss des ERK1/2 Signalweges auf die IL-8-Produktion nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar D und L2 finden [128, 156]. In diesen Arbeiten konnte jedoch keine Aktivierung des p38- oder JNK-MAPK Signalweges nach Chlamydieninfektion gezeigt werden. Eine Ursache für die Aktivierung unterschiedlicher Signalübertragungswege könnte in dem molekularen Aufbau der verschiedenen Serovare begründet sein. So führte die Infektion mit *C. trachomatis* Serovar D und L2 beispielsweise zur Induktion unterschiedlicher IL-8 Level [156]. Dessus-Babus *et al.* fanden Unterschiede in der angeborenen Immunantwort *in vitro* zwischen *C. trachomatis* Serovar E und L2 [157].

Die Aktivierung des MAPK Signalweges ERK1/2 durch Chlamydien dient darüber hinaus chlamydialem Wachstum. Die Calcium-abhängige Phospholipase A2 (cPLA2) ist eine der zytosolischen Substrate von ERK1/2 [55, 158]. Es konnte gezeigt werden, dass *C. trachomatis* Serovar L2 über die Aktivierung des ERK1/2-cPLA2 Signalweges wirtszelleigene Glycerophospholipide aufnimmt und darüber ihre Replikation in der Wirtszelle gewährleistet [159]. Somit scheint die Aufnahme wirtszelleigener Glycerophospholipide für Wachstum und Entwicklung notwendig zu sein, obwohl Chlamydien Gene für die Kodierung aller Enzyme besitzen, die für die Synthese von Membran enthaltenem Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylserin benötigt werden [14]. Die Fähigkeit wirtszelleigene Glycerophospholipide aufzunehmen, könnte eine energiesparende Methode der Chlamydien sein, den hohen Bedarf an Lipiden zu decken, die unverzichtbar für chlamydiales Überleben sind. Desweiteren könnte der Einbau wirtszelleigener Lipide in die chlamydiale Membran den Vorteil bieten, vom Wirtsorganismus als fremd unerkannt zu bleiben und somit den Abwehrmechanismen zu entgehen [159].

Im Rahmen chlamydialer Infektionen spielen Interferone (IFNs) eine wichtige Rolle. Frühere Studien zeigten, dass freigesetzte IFNs durch infizierte Epithelzellen [160], Fibroblasten [161] und Makrophagen [162] in der Folge chlamydiale Infektionen hemmen können. Die Mechanismen, die diesen Signalweg des angeborenen Immunsystems aktivieren, konnten teilweise identifiziert werden. Neben der Aktivierung des JAK/STAT1 Signalweges [163] erfolgt eine p38-MAPK abhängige Aktivierung von cPLA2. Dies wiederum hat eine Expression von IFN-β nach Infektion mit *C. trachomatis*

zur Folge [164, 165]. Interessanterweise ist die Aktivierung der IFN-β- Antwort unabhängig von der MAPK ERK1/2, obwohl diese an der Phosphorylierung von cPLA2 beteiligt ist [164].

Die Aktivierung des MAPK Signalweges ERK1/2 durch Chlamydien könnte über einen anti-apoptotischen Effekt ebenso dazu dienen, den Abwehrmechanismen ihrer Wirtszellen zu entgehen. Es wurde gezeigt, dass Chlamydien die Fähigkeit besitzen, infizierte Wirtszellen am programmierten Zelltod zu hindern [105, 166-168]. Apoptose infizierter Wirtzellen ist jedoch ein wichtiger Abwehrmechsnismus des Körpers bei intrazellulären Infektionen [169, 170]. Die Tatsache, dass ERK1/2 eine anti-apoptotische Wirkung hat [51] und die Zellproliferation fördert [55, 171], könnte Chlamydien behilflich sein, die Apoptose ihrer Wirtszellen zu verhindern und sich damit ihren Lebensraum zu erhalten.

Rajalingam *et al.* konnten eine Beteiligung des PI3K Signalweges am Schutz vor Apoptose *C. trachomatis*- infizierter Zellen nachweisen. Sie zeigten eine ERK-abhängige Expression und eine PI3K-abhängige Stabilisierung des anti-apoptotischen Gens Mcl-1 nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar L2 [172]. Diese Daten wurden durch die Beobachtung gestützt, dass die Aktivierung von PI3K nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar L2 zu einer Phosphorylierung von AKT/ Protein Kinase B sowie BAD führt und dadurch infizierte Zellen an der Apoptose gehindert werden [173].

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Beteiligung der PI3K an der *C. trachomatis*-induzierten NF-κB- Aktivierung in HEp-2 Zellen nachgewiesen werden. So kam es zu einer Reduktion der NF-κB- Aktivierung in HEp-2 Zellen, wenn die Zellen mit einem spezifischen PI3K-Inhibitor vorbehandelt waren. Desweiteren war die PI3K an der *C. trachomatis*- induzierten IL-8- Sekretion beteiligt. Es konnte eine Reduktion der IL-8-Konzentration 24 h nach Infektion nach Inhibierung des PI3K Signalweges gezeigt werden.

NF-κB besitzt über eine Hemmung der durch Death-Rezeptoren aktivierten Caspasen eine anti-apoptotische Wirkung [174]. Trotz der Beteiligung des PI3K Signalweges an der anti-apoptotischen Wirkung [172, 173] und der in der vorliegenden Arbeit dargestellten PI3K-abhängigen Induktion von NF-κB früh nach Infektion, konnte keine Beteiligung der NF-κB- Aktivität an der anti-apoptotischen Wirkung von *C. trachomatis* nachgewiesen werden [140]. So fand sich in der Arbeit von Xiao *et. al* keine NF-κB-Aktivität 12 bis 60 h nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar L2. Dies ist wiederum ein

Hinweis darauf, dass eine Aktivierung von NF-κB in erster Linie früh nach Infektion mit *C. trachomatis* eine Rolle spielt.

Die rezeptorvermittelte Induktion spezifischer Signaltransduktionskaskaden durch Chlamydien scheint darüber hinaus essentiell für die Invasion von *C. pneumoniae* in Epithelzellen zu sein. Es zeigte sich, dass die MEK- abhängige Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 von einer PI3K- abhängigen Phosphorylierung und Aktivierung von Akt gefolgt ist und mit der Invasion von *C. pneumoniae* in die Zielzellen 30 bis 120 min nach Zellkontakt einhergeht [90]. Die Interaktion mit diesem Signalweg scheint *C. pneumoniae* die Möglichkeit zu bieten, sich der Fusion mit Lysosomen zu entziehen. Die Datenlage ist jedoch noch uneinheitlich wie die Studie von Carabeo *et al*. belegt, in der ein PI3K- unabhängiger Mechanismus chlamydialer Internalisierung in HeLa Zellen durch *C. trachomatis* Serovar L2 und D gezeigt werden konnte [175].

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass *C. trachomatis* Serovar K eine Phosphorylierung der MAPK p38, ERK1/2 und JNK in HEp-2 Zellen induziert. Darüber hinaus ist die Aktivität der MAPK p38 und ERK1/2, nicht jedoch die der JNK für die NF-κB- Aktivierung und IL-8- Freisetzung notwendig. Desweiteren ist die PI 3-Kinase ebenfalls an der *C. trachomatis*- induzierten NF-κB- Aktivierung und IL-8- Freisetzung in HEp-2 Zellen beteiligt.

4.4 Ausblick

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass *C. trachomatis* Serovar K in der Lage ist, in HEp-2 Zellen innerhalb kurzer Zeit nach Kontakt mit den Zielzellen eine Reihe von Signaltransduktionswegen zu aktivieren, die im Verlauf zu einer protrahierten und prolongierten Aktivierung von HEp-2 Zellen mit vermehrter Expression des Zytokins IL-8 führten. Dies sind zentrale Mechanismen in der Entwicklung eines proinflammatorischen Phänotyps in epithelialen Zellen. Zudem sind diese offenbar Zelltyp-spezifisch, da *C. trachomatis* Serovar K - anders als *C. pneumoniae* TW 183 - keine signifikante IL-8- Freisetzung in humanen Endothelzellen induzierte.

Die Charakterisierung *C. trachomatis*- induzierter Signaltransduktionswege ist wichtig für das Verstehen der Mechanismen durch die Chlamydien sich ihre intrazelluläre Vermehrung sichern und im Wirt eine Infektion hervorrufen und aufrechterhalten. Diese Überlegungen können einen Beitrag zur Etablierung neuer (nicht-antibiotischer) Therapiestrategien zur Verhinderung persistierender Chlamydieninfektionen leisten.

5 Literaturverzeichnis

1. Somani J, Bhullar VB, Workowski KA, Farshy CE and Black CM. Multiple drug-resistant *Chlamydia trachomatis* associated with clinical treatment failure. J Infect Dis 2000;181:1421-7

2. Whittington WL, Kent C, Kissinger P, et al. Determinants of persistent and recurrent *Chlamydia trachomatis* infection in young women: results of a multicenter cohort study. Sex Transm Dis 2001;28:117-23

3. Low N, Cowan F. Genital *chlamydial* infection. Clin Evid 2002:1409-15

4. Herring AJ. Typing *Chlamydia psittaci*--a review of methods and recent findings. Br Vet J 1993;149:455-75

5. Bush RM, Everett KD. Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:203-20

6. Everett KD, Bush RM and Andersen AA. 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 1999;49 Pt 2:415-40

7. Kuhns M. Untersuchungen zum putativen Effektorprotein CPn0809 des Typ-III-Sekretionssystems von *Chlamydophila pneumoniae*. Dissertation. Göttingen: Georg-August-Universität, 2006

8. Moulder JW. Interaction of *chlamydiae* and host cells in vitro. Microbiol Rev 1991;55:143-90

9. Heinzen RA, Scidmore MA, Rockey DD and Hackstadt T. Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. Infect Immun 1996;64:796-809

10. Ward ME, Murray A. Control mechanisms governing the infectivity of *Chlamydia trachomatis* for HeLa cells: mechanisms of endocytosis. J Gen Microbiol 1984;130:1765-80

11. Wyrick PB, Choong J, Davis CH, et al. Entry of genital *Chlamydia trachomatis* into polarized human epithelial cells. Infect Immun 1989;57:2378-89

12. Wyrick PB. Intracellular survival by *Chlamydia*. Cell Microbiol 2000;2:275-82

13. Kalman S, Mitchell W, Marathe R, et al. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. Nat Genet 1999;21:385-9

14. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. Science 1998;282:754-9

15. Schachter J, Caldwell HD. *Chlamydiae*. Annu Rev Microbiol 1980;34:285-309

16. Brunham RC, Rey-Ladino J. Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. Nat Rev Immunol 2005;5:149-61

17. Whitcher JP, Srinivasan M and Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. Bull World Health Organ 2001;79:214-21

18. Mabey D, Peeling RW. Lymphogranuloma venereum. Sex Transm Infect 2002;78:90-2

19. Stephens RS. The cellular paradigm of *chlamydial* pathogenesis. Trends Microbiol 2003;11:44–51

20. Ohshige K, Morio S, Mizushima S, et al. Behavioural and serological human immunodeficiency virus risk factors among female commercial sex workers in Cambodia. Int J Epidemiol 2000;29:344-54

21. Kleemola M, Saikku P, Visakorpi R, Wang SP and Grayston JT. Epidemics of pneumonia caused by TWAR, a new *Chlamydia* organism, in military trainees in Finland. J Infect Dis 1988;157:230-6

22. Marie I, Lecomte F, Levesque H, et al. Lofgren's syndrome as the first manifestation of acute infection due to *Chlamydia pneumoniae*: a prospective study. Clin Infect Dis 1999;28:691-2

23. Layh-Schmitt G, Bendl C, Hildt U, et al. Evidence for infection with *Chlamydia pneumoniae* in a subgroup of patients with multiple sclerosis. Ann Neurol 2000;47:652-5

24. Koyi H, Branden E, Gnarpe J, Gnarpe H, Arnholm B and Hillerdal G. *Chlamydia pneumoniae* may be associated with lung cancer. Preliminary report on a seroepidemiological study. Apmis 1999;107:828-32

25. Grayston JT. Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. Clin Infect Dis 1992;15:757-61

26. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA and Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). Clin Microbiol Rev 1995;8:451-61

27. Belland RJ, Ouellette SP, Gieffers J and Byrne GI. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. Cell Microbiol 2004;6:117-27

28. Shor A, Kuo CC and Patton DL. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. S Afr Med J 1992;82:158-61

29. Danesh J, Whincup P, Lewington S, et al. *Chlamydia pneumoniae* IgA titres and coronary heart disease; prospective study and meta-analysis. Eur Heart J 2002;23:371-5

30. Wong YK, Gallagher PJ and Ward ME. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. Heart 1999;81:232-8

31. Treitl M. Untersuchungen über die Expression von Early-Response Genen und intrazelluläre Signalübertragungswege nach Verletzung humaner vaskulärer Endothelzellmonolayer in vitro. Dissertation. München: Ludwig-Maximilians-Universität, 2004

32. Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Ahmadi K, et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. Annu Rev Biochem 2001;70:535-602

33. Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, et al. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. Science 2000;287:1049-53

34. Fry MJ. Structure, regulation and function of phosphoinositide 3-kinases. Biochim Biophys Acta 1994;1226:237-68

35. Sasaki T, Irie-Sasaki J, Horie Y, et al. Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma. Nature 2000;406:897-902

36. Fry MJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? Breast Cancer Res 2001;3:304-12

37. Foster FM, Traer CJ, Abraham SM and Fry MJ. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. J Cell Sci 2003;116:3037-40

38. Scheid MP, Woodgett JR. PKB/AKT: functional insights from genetic models. Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2:760-8

39. Kemény M. Wirkungsmechanistische Untersuchungen zur Beeinflussung zellulärer Signalübertragungswege durch substituierte Pteridine. Med. Dissertation: Universität Kaiserslautern, 2002

40. Gobert AP, Vareille M, Glasser AL, Hindre T, de Sablet T and Martin C. Shiga toxin produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* inhibits PI3K/NF-kappaB signaling pathway in globotriaosylceramide-3-negative human intestinal epithelial cells. J Immunol 2007;178:8168-74

41. Turner NA, Mughal RS, Warburton P, O'Regan DJ, Ball SG and Porter KE. Mechanism of TNFalpha-induced IL-1alpha, IL-1beta and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones. Cardiovasc Res 2007;76:81-90

42. Wrann CD, Tabriz NA, Barkhausen T, et al. The phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway exerts protective effects during sepsis by controlling C5a-mediated activation of innate immune functions. J Immunol 2007;178:5940-8

43. Xu L, Pathak PS and Fukumura D. Hypoxia-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathways contributes to expression of interleukin 8 in human ovarian carcinoma cells. Clin Cancer Res 2004;10:701-7

44. Yadav M, Clark L and Schorey JS. Macrophage's proinflammatory response to a mycobacterial infection is dependent on sphingosine kinase-mediated activation of phosphatidylinositol phospholipase C, protein kinase C, ERK1/2, and phosphatidylinositol 3-kinase. J Immunol 2006;176:5494-503

45. Yeh CY, Chen JY and Chia JS. Glucosyltransferases of viridans group *streptococci* modulate interleukin-6 and adhesion molecule expression in endothelial cells and augment monocytic cell adherence. Infect Immun 2006;74:1273-83

46. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB and Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiol Rev 1999;79:143-80

47. Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, et al. Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. Nature 2000;403:328-32

48. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. Cell 1995;80:179-85

49. Treinies I, Paterson HF, Hooper S, Wilson R and Marshall CJ. Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal To stimulate DNA synthesis. Mol Cell Biol 1999;19:321-9

50. Dong C, Davis RJ and Flavell RA. MAP kinases in the immune response. Annu Rev Immunol 2002;20:55-72

51. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ and Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science 1995;270:1326-31

52. Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. Curr Opin Cell Biol 1996;8:205-15

53. Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, et al. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. Cell 1998;93:605-15

54. Rahman A, Anwar KN, Minhajuddin M, et al. cAMP targeting of p38 MAP kinase inhibits thrombin-induced NF-kappaB activation and ICAM-1 expression in endothelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;287:L1017-24

55. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 2001;410:37-40

56. Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. Mol Cell Biol 1999;19:2435-44

57. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell 1986;46:705-16

58. Ghosh S, May MJ and Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol 1998;16:225-60

59. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. Annu Rev Immunol 2000;18:621-63

60. Meylan E, Tschopp J and Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. Nature 2006;442:39-44

61. Baeuerle PA, Baltimore D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. Science 1988;242:540-6

62. Baeuerle PA, Baltimore D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. Cell 1988;53:211-7

63. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. Trends Immunol 2004;25:280-8

64. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. Cell 2002;109 Suppl:S81-96

65. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. Genes Dev 2004;18:2195-224

66. Jimi E, Aoki K, Saito H, et al. Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo. Nat Med 2004;10:617-24

67. Xiao G, Harhaj EW and Sun SC. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. Mol Cell 2001;7:401-9

68. Xiao G, Fong A and Sun SC. Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. J Biol Chem 2004;279:30099-105

69. Jimi E, Ghosh S. Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone. Immunol Rev 2005;208:80-7

70. Barker JNWN, M. L. Jones, R. S. Mitra, E. Crockett-Torabe, J. C. Fantone, S. L. Kunkel, J. S. Warren, V. M. Dixit and B. J. Nickoloff. Modulation of keratinocyte-derived interleukin-8 which is chemotactic for neutrophils and T lymphocytes. Am. J. Pathol. 1991;139:869-876

71. Gillitzer R, Berger R, Mielke V, Muller C, Wolff K and Stingl G. Upper keratinocytes of psoriatic skin lesions express high levels of NAP-1/IL-8 mRNA in situ. J Invest Dermatol 1991;97:73-9

72. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, et al. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. J Exp Med 1988;167:1883-93

73. Oppenheim JJ, C. O. C. Zachariae, N. Mukaida, and K. Matsushima. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. Annu. Rev. Immunol. 1991;9:617-648

74. Mukaida N, Harada A and Matsushima K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. Cytokine Growth Factor Rev 1998;9:9-23

75. Eckmann L, Kagnoff MF and Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. Infect Immun 1993a;61:4569-74

76. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, et al. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. J Clin Invest 1995;95:55-65

77. Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E and Kagnoff MF. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. Gastroenterology 1993b;105:1689-97

78. Li J, Kartha S, Iasvovskaia S, et al. Regulation of human airway epithelial cell IL-8 expression by MAP kinases. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002;283:L690-9

79. Shapiro L, Dinarello CA. Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:12230-4

80. Mastronarde JG, Monick MM, Mukaida N, Matsushima K and Hunninghake GW. Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. J Infect Dis 1998;177:1275-81

81. Krull M, Kramp J, Petrov T, et al. Differences in cell activation by *Chlamydophila pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* infection in human endothelial cells. Infect Immun 2004;72:6615-21

82. Dessus-Babus S, Knight ST and Wyrick PB. *Chlamydial* infection of polarized HeLa cells induces PMN chemotaxis but the cytokine profile varies between disseminating and non-disseminating strains. Cell Microbiol 2000;2:317-27

83. Rasmussen SJ, Eckmann L, Quayle AJ, et al. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in *chlamydial* pathogenesis. J Clin Invest 1997;99:77-87

84. Patton DL, Kuo CC. Histopathology of *Chlamydia trachomatis* salpingitis after primary and repeated reinfections in the monkey subcutaneous pocket model. J Reprod Fertil 1989;85:647-56

85. Ward ME. Mechanisms of *Chlamydia*-induced disease. In R. S. Stephens (ed.), *Chlamydia*: intracellular biology, pathogenesis, and immunity. ASS Press, Washington, D.C. 1999:171-210

86. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H and Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. J Leukoc Biol 2002;72:847-55

87. Buchholz KR, Stephens RS. Activation of the host cell proinflammatory interleukin-8 response by *Chlamydia trachomatis*. Cell Microbiol 2006;8:1768-79

88. Hu J, Roy SK, Shapiro PS, et al. ERK1 and ERK2 activate CCAAAT/enhancer-binding protein-beta-dependent gene transcription in response to interferon-gamma. J Biol Chem 2001;276:287-97

89. Karin M, Liu Z and Zandi E. AP-1 function and regulation. Curr Opin Cell Biol 1997;9:240-6

90. Coombes BK, Mahony JB. Identification of MEK- and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling as essential events during *Chlamydia pneumoniae* invasion of HEp2 cells. Cell Microbiol 2002;4:447-60

91. Friis RR. Interaction of L cells and *Chlamydia psittaci*: entry of the parasite and host responses to its development. J Bacteriol 1972;110:706-21

92. Hackstadt T. The diverse habitats of obligate intracellular parasites. Curr Opin Microbiol 1998;1:82-7

93. Scidmore MA, Fischer ER and Hackstadt T. Restricted fusion of *Chlamydia trachomatis* vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. Infect Immun 2003;71:973-84

94. Scidmore MA, Rockey DD, Fischer ER, Heinzen RA and Hackstadt T. Vesicular interactions of the *Chlamydia trachomatis* inclusion are determined by *chlamydial* early protein synthesis rather than route of entry. Infect Immun 1996a;64:5366-72

95. Clausen JD, Christiansen G, Holst HU and Birkelund S. *Chlamydia trachomatis* utilizes the host cell microtubule network during early events of infection. Mol Microbiol 1997;25:441-9

96. Scidmore MA, Fischer ER and Hackstadt T. Sphingolipids and glycoproteins are differentially trafficked to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. J Cell Biol 1996b;134:363-74

97. Wolf K, Hackstadt T. Sphingomyelin trafficking in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. Cell Microbiol 2001;3:145-52

98. Carabeo RA, Mead DJ and Hackstadt T. Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:6771-6

99. van Ooij C, Kalman L, van I, et al. Host cell-derived sphingolipids are required for the intracellular growth of *Chlamydia trachomatis*. Cell Microbiol 2000;2:627-37

100. Stenner-Liewen F, Liewen H, Zapata JM, Pawlowski K, Godzik A and Reed JC. CADD, a *Chlamydia* protein that interacts with death receptors. J Biol Chem 2002;277:9633-6

101. Rajalingam K, Al-Younes H, Muller A, Meyer TF, Szczepek AJ and Rudel T. Epithelial cells infected with *Chlamydophila pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*) are resistant to apoptosis. Infect Immun 2001;69:7880-8

102. Wahl C, Oswald F, Simnacher U, Weiss S, Marre R and Essig A. Survival of *Chlamydia pneumoniae*-infected Mono Mac 6 cells is dependent on NF-kappaB binding activity. Infect Immun 2001;69:7039-45

103. Carratelli CR, Rizzo A, Catania MR, et al. *Chlamydia pneumoniae* infections prevent the programmed cell death on THP-1 cell line. FEMS Microbiol Lett 2002;215:69-74

104. Fischer SF, Vier J, Kirschnek S, et al. *Chlamydia* inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3-only proteins. J Exp Med 2004;200:905-16

105. Fan T, Lu H, Hu H, et al. Inhibition of apoptosis in *chlamydia*-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. J Exp Med 1998;187:487-96

106. Xiao Y, Zhong Y, Greene W, Dong F and Zhong G. *Chlamydia trachomatis* infection inhibits both Bax and Bak activation induced by staurosporine. Infect Immun 2004;72:5470-4

107. Roblin PM, Dumornay W and Hammerschlag MR. Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. J Clin Microbiol 1992;30:1968-71

108. Schmitz E, Nettelnbreker E, Zeidler H, Hammer M, Manor E and Wollenhaupt J. 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 1993;38:278-85

109. Caldwell HD, Kromhout J and Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. Infect Immun 1981;31:1161-76

110. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG and Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest 1973;52:2745-56

111. Klucken AC. *Chlamydophila pneumoniae* - induzierte Aktivierung humaner Endothelzellen. Dissertation. Berlin: Charité, 2008

112. Hippenstiel S, Soeth S, Kellas B, et al. Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells. Blood 2000;95:3044-51

113. Krull M, Klucken AC, Wuppermann FN, et al. Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. J Immunol 1999;162:4834-41

114. N'Guessan DPP. Molekulare Mechanismen der endothelialen Apoptose. Dissertation. Berlin: Charité, 2005

115. N'Guessan PD, Schmeck B, Ayim A, et al. *Streptococcus pneumoniae* R6x induced p38 MAPK and JNK-mediated caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells. Thromb Haemost 2005;94:295-303

116. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54

117. Akhtar M, Watson JL, Nazli A and McKay DM. Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway. Faseb J 2003;17:1319-21

118. Richmond A. NF-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. Nat. Rev. Immunol. 2002;2:664-674

119. Pal S, Hui W, Peterson EM and de la Maza LM. Factors influencing the induction of infertility in a mouse model of *Chlamydia trachomatis* ascending genital tract infection. J Med Microbiol 1998;47:599-605

120. Mardh PA. Tubal factor infertility, with special regard to *chlamydial* salpingitis. Curr Opin Infect Dis 2004;17:49-52

121. Zeidler H, Kuipers J and Kohler L. *Chlamydia*-induced arthritis. Curr Opin Rheumatol 2004;16:380-92

122. Krull M, Maass M, Suttorp N and Rupp J. *Chlamydophila pneumoniae*. Mechanisms of target cell infection and activation. Thromb Haemost 2005;94:319-26

123. Quayle AJ. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. J Reprod Immunol 2002;57:61-79

124. Rottenberg ME, Gigliotti-Rothfuchs A and Wigzell H. The role of IFN-gamma in the outcome of *chlamydial* infection. Curr Opin Immunol 2002;14:444-51

125. Rodel J, Assefa S, Prochnau D, et al. Interferon-beta induction by *Chlamydia pneumoniae* in human smooth muscle cells. FEMS Immunol Med Microbiol 2001;32:9-15

126. Kiviat NB, Paavonen JA, Wolner-Hanssen P, et al. Histopathology of endocervical infection caused by *Chlamydia trachomatis*, herpes simplex virus, Trichomonas vaginalis, and Neisseria gonorrhoeae. Hum Pathol 1990;21:831-7

127. Darville T, Andrews CW, Jr., Sikes JD, Fraley PL and Rank RG. Early local cytokine profiles in strains of mice with different outcomes from *chlamydial* genital tract infection. Infect Immun 2001;69:3556-61

128. Fukuda EY, Lad SP, Mikolon DP, Iacobelli-Martinez M and Li E. Activation of lipid metabolism contributes to interleukin-8 production during *Chlamydia trachomatis* infection of cervical epithelial cells. Infect Immun 2005;73:4017-24

129. Hess S, Peters J, Bartling G, et al. More than just innate immunity: comparative analysis of *Chlamydophila pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* effects on host-cell gene regulation. Cell Microbiol 2003;5:785-95

130. Hackstadt T. Cell biology. Washington, DC, USA, 1999 *Chlamydia*: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity)

131. Gaydos CA, Summersgill JT, Sahney NN, Ramirez JA and Quinn TC. Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. Infect Immun 1996;64:1614-20

132. Kaukoranta-Tolvanen SS, Teppo AM, Laitinen K, Saikku P, Linnavuori K and Leinonen M. Growth of *Chlamydia pneumoniae* in cultured human peripheral blood mononuclear cells and induction of a cytokine response. Microb Pathog 1996;21:215-21

133. Godzik KL, O'Brien ER, Wang SK and Kuo CC. In vitro susceptibility of human vascular wall cells to infection with *Chlamydia pneumoniae*. J Clin Microbiol 1995;33:2411-4

134. Jahn HU, Krull M, Wuppermann FN, et al. Infection and activation of airway epithelial cells by *Chlamydia pneumoniae*. J Infect Dis 2000;182:1678-87

135. Krull M, Bockstaller P, Wuppermann FN, et al. Mechanisms of *Chlamydophila pneumoniae*-mediated GM-CSF release in human bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 2006;34:375-82

136. May AE, Redecke V, Gruner S, et al. Recruitment of *Chlamydia pneumoniae*-infected macrophages to the carotid artery wall in noninfected, nonatherosclerotic mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:789-94

137. Azenabor AA, Chaudhry AU and Yang S. Macrophage L-type Ca2+ channel antagonists alter *Chlamydia pneumoniae* MOMP and HSP-60 mRNA gene expression, and improve antibiotic susceptibility. Immunobiology 2003;207:237-45

138. Azenabor AA, Yang S, Job G and Adedokun OO. Elicitation of reactive oxygen species in *Chlamydia pneumoniae*-stimulated macrophages: a Ca2+-dependent process involving simultaneous activation of NADPH oxidase and cytochrome oxidase genes. Med Microbiol Immunol 2005;194:91-103

139. Wissel H, Muller T, Rudiger M, Krull M and Wauer RR. Contact of *Chlamydophila pneumoniae* with type II cell triggers activation of calcium-mediated NF-kappa B pathway. Biochim Biophys Acta 2005;1743:37-48

140. Xiao Y, Zhong Y, Su H, Zhou Z, Chiao P and Zhong G. NF-kappa B activation is not required for *Chlamydia trachomatis* inhibition of host epithelial cell apoptosis. J Immunol 2005;174:1701-8

141. Rasmussen SJ. Temporal expression of interleukin-8 in chlamydia-infected epithelial cells. *Chlamydial* Infections: Proceedings of the Ninth International Symposium on Human *Chlamydial* Infection. 1998; Stamm, W. E. (ed.).:San Francisco, CA: International *Chlamydia* Symposium, pp. 411-414

142. Lad SP, Li J, da Silva Correia J, et al. Cleavage of p65/RelA of the NF-kappaB pathway by *Chlamydia*. Proc Natl Acad Sci U S A 2007a;104:2933-8

143. Le Negrate G, Krieg A, Faustin B, et al. ChlaDub1 of *Chlamydia trachomatis* suppresses NF-kappaB activation and inhibits IkappaBalpha ubiquitination and degradation. Cell Microbiol 2008;10:1879-92

144. Lad SP, Yang G, Scott DA, et al. *Chlamydial* CT441 is a PDZ domain-containing tail-specific protease that interferes with the NF-kappaB pathway of immune response. J Bacteriol 2007b;189:6619-25

145. Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. Cell 2006;124:849-63

146. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. Nat Med 2005;11:S45-53

147. Dechend R, Maass M, Gieffers J, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI-1 expression: a potential link to accelerated arteriosclerosis. Circulation 1999;100:1369-73

148. Donath B, Fischer C, Page S, et al. *Chlamydia pneumoniae* activates IKK/I kappa B-mediated signaling, which is inhibited by 4-HNE and following primary exposure. Atherosclerosis 2002;165:79-88

149. Molestina RE, Miller RD, Lentsch AB, Ramirez JA and Summersgill JT. Requirement for NF-kappaB in transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 1 by *Chlamydia pneumoniae* in human endothelial cells. Infect Immun 2000;68:4282-8

150. Kaukoranta-Tolvanen SS, Ronni T, Leinonen M, Saikku P and Laitinen K. Expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated by *Chlamydia pneumoniae*. Microb Pathog 1996;21:407-11

151. Summersgill JT, Molestina RE, Miller RD and Ramirez JA. Interactions of *Chlamydia pneumoniae* with human endothelial cells. J Infect Dis 2000;181 Suppl 3:S479-82

152. Vardhan H, Dutta R, Vats V, et al. Persistently elevated level of IL-8 in *Chlamydia trachomatis* infected HeLa 229 cells is dependent on intracellular available iron. Mediators Inflamm 2009;2009:417658

153. Choi EY, Kim EC, Oh HM, et al. Iron chelator triggers inflammatory signals in human intestinal epithelial cells: involvement of p38 and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. J Immunol 2004;172:7069-77

154. Weiss G, Fuchs D, Hausen A, et al. Iron modulates interferon-gamma effects in the human myelomonocytic cell line THP-1. Exp Hematol 1992;20:605-10

155. Golding S, Young SP. Iron requirements of human lymphocytes: relative contributions of intra- and extra-cellular iron. Scand J Immunol 1995;41:229-36

156. Buchholz KR, Stephens RS. The extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway induces the inflammatory factor interleukin-8 following *Chlamydia trachomatis* infection. Infect Immun 2007;75:5924-9

157. Dessus-Babus S, Darville TL, Cuozzo FP, Ferguson K and Wyrick PB. Differences in innate immune responses (in vitro) to HeLa cells infected with nondisseminating serovar E and disseminating serovar L2 of *Chlamydia trachomatis*. Infect Immun 2002;70:3234-48

158. Zhu X, Jacobs B, Boetticher E, et al. IL-5-induced integrin adhesion of human eosinophils caused by ERK1/2-mediated activation of cPLA2. J Leukoc Biol 2002;72:1046-53

159. Su H, McClarty G, Dong F, Hatch GM, Pan ZK and Zhong G. Activation of Raf/MEK/ERK/cPLA2 signaling pathway is essential for *chlamydial* acquisition of host glycerophospholipids. J Biol Chem 2004;279:9409-16

160. Jenkin HM, Lu YK. Induction of interferon by the Bour strain of trachoma in HeLa 229 cells. Am J Ophthalmol 1967;63:Suppl:1110-5

161. Rodel J, Groh A, Vogelsang H, Lehmann M, Hartmann M and Straube E. Beta interferon is produced by *Chlamydia trachomatis*-infected fibroblast-like synoviocytes and inhibits gamma interferon-induced HLA-DR expression. Infect Immun 1998;66:4491-5

162. Rothfuchs AG, Gigliotti D, Palmblad K, Andersson U, Wigzell H and Rottenberg ME. IFN-alpha beta-dependent, IFN-gamma secretion by bone marrow-derived macrophages controls an intracellular bacterial infection. J Immunol 2001;167:6453-61

163. Lad SP, Fukuda EY, Li J, de la Maza LM and Li E. Up-regulation of the JAK/STAT1 signal pathway during *Chlamydia trachomatis* infection. J Immunol 2005;174:7186-93

164. Vignola MJ, Kashatus DF, Taylor GA, Counter CM and Valdivia RH. cPLA2 regulates the expression of type I interferons and intracellular immunity to *Chlamydia trachomatis*. J Biol Chem 2010;285:21625-35

165. Prantner D, Darville T and Nagarajan UM. Stimulator of IFN gene is critical for induction of IFN-beta during *Chlamydia muridarum* infection. J Immunol 2010;184:2551-60

166. Dean D, Powers VC. Persistent *Chlamydia trachomatis* infections resist apoptotic stimuli. Infect Immun 2001;69:2442-7

167. Geng Y, Shane RB, Berencsi K, et al. *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells through induction of IL-10. J Immunol 2000;164:5522-9

168. Greene W, Xiao Y, Huang Y, McClarty G and Zhong G. *Chlamydia*-infected cells continue to undergo mitosis and resist induction of apoptosis. Infect Immun 2004;72:451-60

169. Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. Cell Death Differ 2001;8:113-26

170. Burgert HG, Ruzsics Z, Obermeier S, Hilgendorf A, Windheim M and Elsing A. Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses. Curr Top Microbiol Immunol 2002;269:273-318

171. Tanoue T, Nishida E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. Cell Signal 2003;15:455-62

172. Rajalingam K, Sharma M, Lohmann C, et al. Mcl-1 is a key regulator of apoptosis resistance in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. PLoS One 2008;3:e3102

173. Verbeke P, Welter-Stahl L, Ying S, et al. Recruitment of BAD by the *Chlamydia trachomatis* vacuole correlates with host-cell survival. PLoS Pathog 2006;2:e45

174. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV and Baldwin AS, Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. Science 1998;281:1680-3

175. Carabeo RA, Grieshaber SS, Fischer E and Hackstadt T. *Chlamydia trachomatis* induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells. Infect Immun 2002;70:3793-803

6 Anhang

6.1 Materialien

6.1.1 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid / Bisacrylamid 40 %	Serva, Heidelberg
Agar	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Amphotericin B	Boehringer, Mannheim
Ampicillin	Biochrom, Berlin
Antipain	Sigma, Desenhofen
BioRad Reagenz	Biorad, München
Calciumchlorid- Hexahydrad	Merck, Darmstadt
Cycloheximid	Sigma, Desenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Desenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Endothelbasal-Medium	PAA, Pasching
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Karlsruhe
Forskolin	Sigma, Desenhofen
Glucose (D+)-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glycerein	Merck, Darmstadt
Gelatine (aus Schweinehaut)	Sigma, Desenhofen
Gentamicin	Gibco, Karlsruhe
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Hepes	Roth, Karlsruhe
IL-8-ELISA-Kit	Pharmingen, San Diego
Immunfluoreszenz-Chlamydia-Testkit	Imagen, Ely/ Cambridgeshire
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt

Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Desenhofen
L-Glutamin 200 MM 100 x	Biochrom, Berlin
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Minimal Essential Medium (MEM)	PAA, Pasching
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Natriumcitrat	Sigma, Desenhofen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat	Sigma, Desenhofen
Nichtessentielle Aminosäuren	Gibco, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin	Biochrom, Berlin
Pepstatin A	Sigma, Desenhofen
QiaQuick-Miniprep-kit	Qiagen, Hilden
Stickstoff 4.0	Messer-Griesheim, Krefeld
Streptomycin	Biochrom, Berlin
N,N,N´,N´-Tetramethylendiamin(TEMED)	Roth, Karlsruhe
TNFα (human)	R&D-Systems, Wiesbaden
Tris (Hydroxymethyl) aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin EDTA	Boehringer, Mannheim
Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Tween-20	Sigma, Desenhofen
Vancomycin	Gibco, Karlsruhe

6.1.2 Geräte

ELISA-Photometer	SLT, Crailsheim
Forschungsmikroskop BX 60	Olympus, Hamburg
Fluorometer Fluoro-Max-2	ISA, Grasbrunn
Laborwaage	Mettler, Gießen
Laminair HB 2448	Hereaus, Hanau
Mini-Protean-Gel-System	Biorad, München
Phasenkontrastmikroskop mit Fluoreszenzeinheit	Olympus, Hamburg
Schüttelinkubator	Uniequip, Planegg
Spektralphotometer Uvicon UV 860	Kontron, München
Ultrazentrifuge	Sorvall, Hamburg
Zellkultur-Inkubator	Hereaus, Hanau
Zentrifuge 48 RC, Rotanta RPC	Hettich, Tuttlingen

6.1.3 Zubehör

Einmalküvetten	Sarstedt, Berlin
Gel-Blotting Papier	Roth, Karlsruhe
Hybond-ECL-Membran	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Falcon/ Becton-Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen (1 ml)	Gilson, WI, USA
Pipettenspitzen (200 µl)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (10 µl)	Sarstedt, Berlin
Spitzboden-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon/ Becton-Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen (T75 und T175 cm^2)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten (6-/12-/24-Well)	Nunc, Wiesbaden

6.1.4 Antikörper für Westernblot

Moleküle	Spezies	Firma
P-ERK	Maus, E-4	Santa Cruz, Hamburg
Phospho-p38	Kaninchen	Upstate Cell Signaling, Lake Placid, USA
P-c-Jun (ser 63)	Kaninchen	NEBL
ERK-2	Maus, D-2	Santa Cruz, Hamburg
p38	Kaninchen	NEBL
Anti-Kaninchen-IgG	Kaninchen, anti-human gekoppelt an IRDye 800	Li-COR Biosciences, Bad Homburg
Anti-Maus-IgG	Maus, anti-human gekoppelt an Cy.5.5	Li-COR Biosciences, Bad Homburg

6.1.5 Proteinkinase-Inhibitoren

MAP-Kinase-Inhibitor SB 202190	Calbiochem, Darmstadt
MAP-Kinase-Inhibitor U 0126	Calbiochem, Darmstadt
MAP-Kinase-Inhibitor SP 600125	Calbiochem, Darmstadt
PI 3-Kinase-Inhibitor LY 294002	Calbiochem, Darmstadt

6.1.6 Nährmedien

Nährmedien für die Zellkultur

Die Zellkulturmedien wurden steril angesetzt und bei + 4 °C gelagert. Das FCS wurde vor Benutzung 45 min bei 56 °C zur Inaktivierung von Komplementfaktoren erhitzt.

HEp-2-Kulturmedium	MEM (Eagle) Medium mit 10 % (v/v) FCS 2 ml Glutamin Nichtessentielle Aminosäuren 2,5 µg/ml Amphotericin B 25 µg/ml Gentamycin 2,5 µg/ml Vancomycin
HEp-2-Infektionsmedium	MEM (Eagle) Medium mit 2 ml Glutamin Nichtessentielle Aminosäuren 2,5 µg/ml Amphotericin B 25 µg/ml Gentamycin 2,5 µg/ml Vancomycin 1 µg/ml Cycloheximid
HUVEC-Kulturmedium	Endothelbasal-Medium mit 2 ml Glutamin 0,5 µg/ml Amphotericin B 5 ng/ml EGF 10 % FCS Streptomycin / Penicillin
HUVEC-Infektionsmedium	Endothelbasal-Medium mit 2 ml Glutamin 5 ng/ml EGF 1 % FCS

6.1.7 Puffer und Lösungen

Gelatine (Stocklösung)	Gelatine 5 g Aqua bidest ad 100 ml

Unter Erhitzen auf 80 °C lösen, danach steril filtrieren.

HBSS (10 x)	KCL 4 g KH_2PO_4 0,6 g NaCl 80 g Na_2HPO_4 0,9 g D-Glukose 10 g Aqua bidest ad 1000 ml
H/H -/-	HBSS (10 x) 100 ml HEPES 6 g Aqua bidest ad 1000 ml
H/H +/-	HBSS (10 x) 100 ml $CaCl_2$ 0,185 g HEPES 6 g Aqua bidest ad 1000 ml
H/H +/+	HBSS (10 x) 100 ml $CaCl_2$ 0,185 g $MgCl_2$ 0,100 g $MgSO_2$ 0,100 g HEPES 6 g
PBS-Stammlösung (20 x)	Na_2HPO_4 58,5 g KH_2PO_4 9,8 g NaCl 320 g Aqua bidest ad 1000 ml

PBS, pH 7,4	PBS-Stammlösung (20 x) 50 ml Aqua bidest ad 1000 ml
Saccharose-Phosphat-Glutaminsäure-Puffer (SPG-Puffer), pH 7,4-7,6	Saccharose 75 g KH_2PO_4 0,52 g Na_2HPO_4 1,53 g Glutaminsäure 0,72 g Aqua bidest ad 1000 ml

Western Blot

Phosphoprotein Waschpuffer	NaF 1 M Na_3VO_4 200 mM $Na_4P_2O_7$ 150 mM in 400 ml H/H -/-
Lyse-Puffer für Proteinextraktion	Tris-Hcl, 50 mM, pH 7,4 EDTA 0,25 mM PMSF 1 mM Antipain 10 µg/ml Leupeptin 10 µg/ml Pepstatin 10 µg/ml NP-40 (v/v) 1 %
Auftragepuffer	Tridest 3,8 ml Tris-Hcl, 0,5 M, 1,0 ml, pH 6,8 Glycerol 0,8 ml SDS (10 %, w/v) 1,6 ml Bromphenolblau (1 % w/v) 0,4 ml β- Mercaptoethanol (1 % v/v) 0,4 ml
Sammelgel	Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 SDS 10 % Acrylamidlösung 19:1, 40 % Ammoniumpersulfat 10 % Aqua bidest TEMED

Trenngel	Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8
	SDS 10 %
	Acrylamidlösung 19:1, 40 %
	Ammoniumpersulfat 10 %
	Aqua bidest
	TEMED

Die prozentuale Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels wurde nach dem molekularen Gewicht des Zielproteins ausgewählt.

Laemmli-Puffer (5 x)	Tris-Base 15 g
	Glycerin 72 g
	SDS 5 g
	Aqua bidest 1000 ml
Ponceau-S-Proteinfärbung	Ponceau S 1 g
	Essigsäure 50 ml
	Aqua bidest 950 ml
Blotting-Puffer	Stocklösung 80 ml
	Methanol 10-20 %
	Aqua bidest 720-820 ml

6.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
a. bidest	Aqua bidestillata
ad	Lat.: bis
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD14	Cluster of Differentiation 14
cPLA2	Calcium-abhängige Phospholipase A2
C. pneumoniae	*Chlamydophila pneumoniae*
C. trachomatis	*Chlamydia trachomatis*
DMSO	Dimethysulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EK	Elementarkörperchen
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbend Assay
ERK	extracellular signal-related kinases
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Ganulozyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Stunden
H/H-/-	Hanks-HEPES Puffer ohne Kalzium und Magnesium
H/H+/-	Hanks-HEPES Puffer mit Kalzium und ohne Magnesium
H/H+/+	Hanks-HEPES Puffer mit Kalzium und Magnesium
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure

HEp-2 Zellen	Humane Karzinomzellen vom Plattenepithel des Mundbodens
HUVEC	Humane umbilikalvenöse Endothelzellen
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IκB	Inhibitor of NF-κB
IFU	Inclusion forming units
IL	Interleukin
JNK	c-Jun amino-terminal kinases
kD	Kilodalton
LGV	Lymphogranuloma venereum
KHK	Koronare Herzkrankheit
M	Mol/l
mM	Millimol
M199	Medium 199
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
Mbp	Mega-Basenpaare
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia Gene 1
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minuten
MOI	Multiplicity of infection
NF-κB	Nuclear Factor κappa-B
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGE2	Prostaglandin E2
PDE	Phosphodiesterase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKB	Protein Kinase B
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
PMSF	Phenylmethansulfon-Säurefluorid
RHR	*Rel*-Homologie-Region

RK	Retikularkörperchen
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat/Laurylsulfat
Sog.	sogenannte
SPG	Saccharose-Phosphat-Glutaminsäure
T75 / 175	Zellkulturflasche mit 75 / 175 cm^2 Kulturfläche
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
u. a.	unter anderem
V	Volt
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
z. B.	zum Beispiel

7 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Theresa Grobe, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Mechanismen der Zielzellaktivierung durch Chlamydia trachomatis Serovar K* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -*www.**icmje**.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 11.09.2013 Theresa Grobe

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Theresa Grobe hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:
Krull M, Kramp J, Petrov T, Klucken A C, Hocke A C, Walter C, Schmeck B, Seybold J, Maass M, Ludwig S, Kuipers J G, Suttorp N, Hippenstiel S. Differences in cell activation by *Chlamydophila pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* infection in human endothelial cells. *Infect Immun* 72, 6615-6621. 2004.
Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Versuchsreihen mit *Chlamydia trachomatis* Serovar K und HUVEC.

Publikation 2:
Petrov T, Kuipers J, Suttorp N, Krüll M. Mechanismen der Epithelzellaktivierung durch *Chlamydia trachomatis*. Poster, 2. Deutscher Chlamydienworkshop, Berlin, März 2004.
Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Versuchsreihen, Erstellung und Vorstellung des Posters im Rahmen des Workshops.

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Publikationen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation

Krull M, Kramp J, Petrov T, Klucken A C, Hocke A C, Walter C, Schmeck B, Seybold J, Maass M, Ludwig S, Kuipers J G, Suttorp N, Hippenstiel S (2004): Differences in cell activation by *Chlamydophila pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* infection in human endothelial cells. *Infect Immun* 72, 6615-6621.

Tagungsbeitrag

Petrov T, Kuipers J, Suttorp N, Krüll M. Mechanismen der Epithelzellaktivierung durch *Chlamydia trachomatis*. 2. Deutscher Chlamydienworkshop, Berlin, März 2004.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Norbert Suttorp für die Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten. Ebenso danke ich Herrn PD Dr. Matthias Krüll für die geduldige Betreuung, sein Interesse und sein Engagement, mich für die Forschung zu begeistern und seine konstruktive Hilfe bei der Verfassung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und den produktiven Gedankenaustausch bedanken. Großer Dank geht ebenfalls an Dr. Philippe N'Guessan und Prof. Dr. Bastian Opitz für Hilfestellungen bei allen theoretischen und praktischen Problemen.

Valerie Johnston und Kerstin Möhr danke ich von ganzem Herzen für die große Unterstützung bei allen praktischen und planerischen Tätigkeiten.
Meinem lieben Mann, meinen Eltern, meinem Bruder sowie meinen Freunden möchte ich für die ständige Unterstützung, Motivation und Aufmunterung danken.