

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner Ph.D. (Melbourne))

**Optimierung von Kulturverfahren für *Chlamydia pneumoniae***  
**und Untersuchung der**  
**Interaktion monozytärer Zellen mit dem Erreger**

**Sven Poppert**

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

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Th. Chr. Miethke  
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 26.11.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.05.2002 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abkürzungen.....  | 5  |
| I. Einleitung.....  | 6  |
| 1. Historie.....  | 6  |
| 2. Taxonomie.....   | 6  |
| 3. Entwicklungszyklus.....  | 8  |
| 4. Makromolekularer Aufbau.....   | 9  |
| 5. Chlamydien als Krankheitserreger.....                                | 10 |
| 5.1. Allgemeine Mechanismen.....  | 10 |
| 5.2. <i>Chlamydia trachomatis</i> .....                                 | 11 |
| 5.3. <i>Chlamydia psittaci</i> .....                                    | 12 |
| 5.4. <i>Chlamydia pecorum</i> .....                                     | 12 |
| 5.5. <i>Simkania</i> sp. und <i>Parachlamydia</i> sp.....               | 12 |
| 6. <i>Chlamydia pneumoniae</i> .....                                    | 12 |
| 6.1. Atemwegsinfektionen.....   | 12 |
| 6.2. <i>Chlamydia pneumoniae</i> und Arteriosklerose.....               | 13 |
| 7. Diagnose von Chlamydieninfektionen.....                              | 15 |
| 8. Therapie von Chlamydien-Erkrankungen.....                            | 15 |
| II. Ziele der vorliegenden Arbeit.....                                  | 16 |
| III. Materialien.....   | 18 |
| 1. Antikörper.....  | 18 |
| 2. Chemikalien, Reagenzien.....   | 18 |
| 3. Lösungen, Medien, Puffer, Gel.....                                   | 20 |
| 4. Plastikwaren.....  | 22 |
| 5. Geräte.....  | 22 |
| 6. Zellen.....  | 22 |
| 7. Chlamydienstämme.....  | 23 |
| IV. Methoden.....   | 24 |
| 1. Anzuchtverfahren.....  | 24 |
| 1.1. Zellkultur.....  | 24 |
| 1.2. Infektion des Zellrasens.....                                      | 24 |
| 1.3. Färbungen der Chlamydienpräparate für das Mikroskop.....           | 25 |
| 1.4. Bestimmung der Effizienz der Infektion.....                        | 25 |
| 1.5. Bestimmung der Infektionsdosis.....                                | 25 |
| 1.6. Aufreinigungsverfahren.....  | 26 |
| 1.7. Kontrolle der Zellkultur auf Mykoplasmen-Kontaminationen.....      | 27 |
| 1.8. Infektion von Amöben mit <i>C. pneumoniae</i> .....                | 28 |
| 2. Interaktion monozytärer Zellen mit <i>Chlamydia pneumoniae</i> ..... | 28 |
| 2.1. Infektion von Monozyten.....                                       | 28 |
| 2.1.1. Infektionsverfahren für Monozyten.....                           | 28 |

|  |    |
|--|----|
| 2.1.2. Intrazelluläre Chlamydien-Färbung von Zellen für FACS Analysen.....         | 28 |
| 2.1.3. Isolation von Monozyten aus peripherem Blut .....                           | 29 |
| 2.2. Expression von Oberflächenrezeptoren auf Monozyten.....                       | 29 |
| 2.2.1. Oberflächenfärbung für FACS .....   | 30 |
| 2.2.2. Kombination der Chlamydienfärbung mit Oberflächenfärbungen .....            | 30 |
| 2.3. Einfluss von <i>C. pneumoniae</i> auf Apoptoseverhalten.....                  | 30 |
| 2.3.1. Auslösung der Apoptose durch Apoptosegifte.....                             | 30 |
| 2.3.2. Beurteilung der Apoptose mittels mikroskopischer Präparate .....            | 31 |
| 2.3.3. Beurteilung der Apoptose mittels FACS.....                                  | 31 |
| 2.3.4. Darstellung der DNS-Fragmente auf einem Agarosegel.....                     | 31 |
| 2.4. Messung der Adhäsion von Monozyten .....                                      | 32 |
| 2.5. Bestimmung von NF- $\kappa$ -B mittels Gelretardierungsassay.....             | 32 |
| V. Ergebnisse.....   | 33 |
| 1. Optimierung des Anzuchtverfahrens .....   | 33 |
| 1.1. Einfluss der Infektionsdosis auf Infektionsrate.....                          | 33 |
| 1.2. Vergleich des Chlamydienwachstums in den Zelllinien HeLa, Hep-2 und NCI ..... | 33 |
| 1.3. Zentrifugation .....  | 34 |
| 1.3.1. Zentrifugationsdauer.....   | 34 |
| 1.3.2. Zentrifugationstemperatur.....  | 35 |
| 1.4. Erntezeitpunkt .....  | 36 |
| 1.5. Monolayer vom Vortag versus frisch trypsinierte Zellsuspension.....           | 38 |
| 1.6. Dichte des Zellrasens .....   | 38 |
| 1.7. Dauer der Inkubation vor dem Zentrifugieren .....                             | 41 |
| 1.8. Vorinkubation mit Cycloheximid .....  | 41 |
| 1.9. Inkubation der Chlamydien ohne Cycloheximid .....                             | 42 |
| 1.10. Auswechseln des Infektionsmediums .....                                      | 43 |
| 1.11. Infektiosität des Überstandes .....  | 43 |
| 1.12. Wiederholtes Zentrifugieren versus Zweitzyklus .....                         | 44 |
| 2. Interaktion monozytärer Zellen mit <i>C. pneumoniae</i> .....                   | 46 |
| 2.1. Infektion von Monozyten.....  | 46 |
| 2.1.1. Unterschiedliche Infektionsdosen.....                                       | 46 |
| 2.1.2. Infektionsrate im Zeitverlauf .....   | 47 |
| 2.1.3. Zentrifugation.....   | 47 |
| 2.1.4. Einfluss einer Aktivierung der Monozyten durch LPS bzw. von FCS Entzug..... | 48 |
| 2.1.5. Vergleich von verschiedenen Monozytenzelllinien und Blutmonozyten .....     | 50 |
| 2.2. Expression von Oberflächenrezeptoren auf Monozyten nach Infektion .....       | 52 |
| 2.2.1. CD14.....   | 52 |
| 3.2. MHC-I .....   | 56 |
| 3.3. MHC-II .....  | 57 |
| 3.4. CD54 .....  | 57 |

|  |    |
|--|----|
| 3.5. CD71 .....  | 60 |
| 3.6. CD80 .....  | 60 |
| 3.7. CD86 .....  | 61 |
| 4. Einfluss von <i>C. pneumoniae</i> auf Apoptose in Monozyten und Epithelzellen .....   | 63 |
| VI. Diskussion.....  | 69 |
| 1. Optimierung des Anzuchtverfahrens .....   | 69 |
| 1.1. Einfluss der Infektionsdosis auf Infektionsrate.....                                | 69 |
| 1.2. Vergleich verschiedener Zellarten.....  | 69 |
| 1.3. Zentrifugation.....   | 70 |
| 1.4. Erntezeitpunkt .....  | 71 |
| 1.5. Monolayer vom Vortag versus frisch trypsinierte Zellsuspension.....                 | 72 |
| 1.6. Dichte des Zellrasens.....  | 72 |
| 1.7. Dauer der Inkubation vor dem Zentrifugieren.....                                    | 73 |
| 1.8. Vorinkubation mit Cycloheximid .....  | 73 |
| 1.9. Inkubation der Chlamydien ohne Cycloheximid .....                                   | 73 |
| 1.10. Auswechseln des Infektionsmediums .....  | 74 |
| 1.11. Infektiosität des Überstandes.....   | 74 |
| 1.12. Wiederholtes Zentrifugieren versus Zweitzyklus .....                               | 74 |
| 1.13. Weitere mögliche Einflussfaktoren.....   | 75 |
| 1.14. Optimale Anzuchtmethode.....   | 76 |
| 2. Interaktion monozytärer Zellen mit <i>C. pneumoniae</i> .....                         | 78 |
| 2.1. Infektion von Monozyten.....  | 78 |
| 2.1.1 Infektionsdosis .....  | 78 |
| 2.1.2. Infektionsrate im Zeitverlauf.....  | 78 |
| 2.1.4. Einfluss einer Aktivierung der Monozyten durch LPS bzw. von FCS Entzug.....       | 79 |
| 2.1.5. Infektion verschiedener monozytärer Zellen .....                                  | 80 |
| 2.2. Expression von Oberflächenrezeptoren.....   | 82 |
| 2.2.1. CD14.....   | 82 |
| 2.2.2. MHC-I und II .....  | 82 |
| 2.2.3. CD 54 .....   | 84 |
| 2.2.4. CD71 .....  | 84 |
| 2.2.5. CD80/86.....  | 85 |
| 2.3. Einfluss von <i>C. pneumoniae</i> auf Apoptose in Monozyten und Endothelzellen..... | 87 |
| VII. Anhang.....   | 90 |
| 1. Weitere Versuche zu Anzuchtmethoden.....  | 90 |
| 1.2. Infektion von Amöben.....   | 90 |
| 1.2.1. Infektion mit Chlamydien bei Vorhandensein von Kontaminanten.....                 | 90 |
| 1.2.2. Mykoplasmenreinigungversuche.....   | 90 |
| 2. Weitere Versuche zur Interaktion von <i>C. pneumoniae</i> und Monozyten.....          | 92 |
| 2.1. Adhärenzversuche mit infizierten Monozyten an Gefäßwandmodellen .....               | 92 |

|   |     |
|---|-----|
| 2.2. Rolle des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ -B bei Infektion von Monozyten mit <i>C. pneumoniae</i> ..... | 92  |
| 2.3. Einfluss von Arteriosklerose-Risikofaktore auf Infektion von Monozyten mit Chlamydien .....                | 93  |
| 2.3.1. Nikotin .....  | 93  |
| 2.3.2. Eisen .....  | 94  |
| VIII. Zusammenfassung.....  | 95  |
| IX. Literatur.....  | 99  |
| X Bildteil.....   | 114 |
| XI. Danksagung .....  | 117 |

## Abkürzungen

|              |   |
|--------------|---|
| AK           | Antikörper                                  |
| C. Chl       | <i>Chlamydia</i>                            |
| C. pn.       | <i>Chlamydia pneumoniae</i>                 |
| Cyclo        | Cycloheximid                                |
| D.C.         | Dendritische Zelle                          |
| ELK          | Elementarkörper                             |
| EK           | Einschlusskörper                            |
| ETO          | Etoposid                                    |
| FITC         | Fluoreszein Isothiocyanat                   |
| Ifn          | Interferon                                  |
| Ifu          | inclusion forming unit                      |
| Ig           | Immunglobulin                               |
| Il           | Interleukin                                 |
| K.           | konzentriert                                |
| KHK          | koronare Herzkrankheit                      |
| Konz.        | Konzentration                               |
| KO           | Kontrolle                                   |
| lsg.         | Lösung                                      |
| min.         | Minute                                      |
| MM6          | Mono-Mac 6-Zelle                            |
| moi          | multiplicity of infection = ifu/Zelle       |
| MOMP         | major outer membrane protein                |
| nd           | not determined, nicht bestimmt              |
| PI           | Propidiumjodid                              |
| PBMC         | Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut |
| rpm.         | rounds per minute                           |
| sec.         | Sekunde                                     |
| Susp.        | Suspension                                  |
| Stauro, STAU | Staurosporin                                |
| TNF          | Tumor Nekrose Faktor                        |
| U            | Umdrehungen                                 |
| 6W           | 6-Well/ 6-Lochplatte                        |
| zentr.       | zentrifugiert                               |

# I. Einleitung

## 1. Historie

Durch Chlamydien verursachte Krankheiten sind seit langem bekannt. Das Trachom wurde bereits im Altertum beschrieben (Oriol 1984). Lymphogranuloma venereum, Einschluss-Konjunktivitis, Nicht-Gonokokkenurethritis und Psittakose wurden im achtzehnten und neunzehnten Jahrhundert erkannt (Oriol 1984). 1907 wies Prowazek Einschlusskörperchen in Konjunktivalepithelien von Trachom-Patienten nach, und ordnete sie zwischen Bakterien und Protozoen ein (Chlamydozoa)(Hahn H 1994). Später wurden Chlamydien als atypische Viren angesehen, weil sie in künstlichen Medien nicht anzüchtbar waren und für alle damals bekannten Bakterien undurchlässige Filter passierten.

1930 entdeckte Levinthal charakteristische Einschlusskörper in Geweben von infizierten Papageien. Die erste Anzucht von Chlamydien gelang 1935 in Hühnerembryonen. In den 60er Jahren wurden die ersten Zellkulturverfahren entwickelt und damit die Voraussetzungen für die Erforschung des Keimes geschaffen.

Moulder leistete einen großen Beitrag, als er die Chlamydien als Bakterien erkannte, nachdem Bedson und Bland allerdings schon vorher *Chlamydia psittaci* als einen „obligat intrazellulären Parasiten mit bakteriellen Eigenschaften“ beschrieben hatten (Hahn H 1994).

Bereits 1943 beschrieb Smadel durch Chlamydien verursachten Pneumonien ohne vorherigen Kontakt zu Vögeln (Allegra *et al.* 1994). Zunächst hielt man einen atypischen *Chlamydia psittaci* Stamm für verantwortlich. 1965 wurde in Taiwan aus dem Konjunktivalabstrich eines Kindes die Chlamydie TW-183 angezüchtet und 1983 aus der Rachenspülflüssigkeit eines Studenten in Seattle mit akuten respiratorischen Symptomen die Chlamydie AR-39 isoliert (Grayston *et al.* 1986). Diese Keime wurden bald als ein Stamm erkannt und zunächst als TWAR bezeichnet. Im Jahr 1989 wurden diese Chlamydien als eigene Spezies abgegrenzt und mit *Chlamydia pneumoniae* bezeichnet (Grayston *et al.* 1989).

## 2. Taxonomie

Als im Jahr 1980 die „Approved List of Bacterial Names“ veröffentlicht wurde, bezeichnete man alle Bakterien mit Chlamydien-Charakteristika, wenn sie Glykogen enthielten und Sulfadiazin sensibel waren, als *C. trachomatis*, alle anderen als *C. psittaci*. Die Etablierung von Klassifizierungstechniken auf DNA-Basis führte zur Abtrennung zweier weiterer Spezies: *C. pneumoniae* (Grayston *et al.* 1989) und *C. pecorum* (Fukushi & Hirai 1992).

Die momentan gültige Einteilung ist folgende:

Chlamydien sind das einzige Familienmitglied der Chlamydiaceae, die wiederum alleine in der Ordnung der Chlamydiales stehen. Die Gattung *Chlamydia* umfasst vier Arten: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. pecorum*. *C. trachomatis* wird noch in drei Biovarien eingeteilt: das Trachombiovar mit den Serotypen A-K, das Lymphogranuloma venereum-Biovar mit den Serotypen L1-L3, und das Mauspneumonie-Biovar ohne weitere Unterteilung.

|          |                       |                   |
|----------|-----------------------|-------------------|
| Ordnung: | <i>Chlamydiales</i>   |                   |
| Familie: | <i>Chlamydiaceae</i>  |                   |
| Genus:   | <i>Chlamydia</i>      |                   |
| Spezies: | <i>C. psittaci</i>    |                   |
| Spezies: | <i>C. trachomatis</i> |                   |
| Biovar   | Trachom               | Serovare ABC, D-K |
| Biovar   | Maus-Pneumonie        |                   |
| Biovar   | Lymphogranuloma       | Serovare L1-L3    |
| Spezies: | <i>C. pneumoniae</i>  |                   |
| Spezies: | <i>C. pecorum</i>     |                   |

Abbildung 1. Bisher gültige Taxonomie der Chlamydialen

Seit 1993 sind eine Reihe von *C. trachomatis*-ähnlichen Chlamydien aus Schweinen isoliert worden, welche Sulfadiazin resistent sind, und sich somit nicht in obiges Schema einordnen lassen (Everett *et al.* 1999; Everett 2000; Kaltenboeck *et al.* 1993; Schiller *et al.* 1997; Rogers & Andersen 1999). In den letzten Jahren wurden weitere Bakterien mit großer morphologischer und genetischer Ähnlichkeit zu Chlamydien isoliert, die sich ebenfalls nicht in obiges Schema einordnen lassen (Simkania strain Z (Kahane *et al.* 1995; Kahane *et al.* 1998); ein Cluster von Isolaten aus Amöben (Birtles *et al.* 1997); Hall's Coccus (Birtles *et al.* 1997) und der nahe verwandte Candidatus parachlamydia acanthamoebae (Amann *et al.* 1997)). Bei Untersuchungen von Blut, Nasenabstrichen und Proben aus abdominalen Aneurismen mittels 16 s RNA-PCR wurden vier neue Sequenzen entdeckt, die sich mit bekannten Chlamydien DNA Sequenzen hybridisieren ließen. In phylogenetischen Analysen zeigten diese Sequenzen größte Ähnlichkeit mit *S. negevensis* und *P. acanthamoebae* (Ossewaarde & Meijer 1999).

Im April 1999 wurde deshalb vorgeschlagen, die Ordnung der Chlamydialen um drei Familien zu ergänzen (Parachlamydiaceae, Simkaniaceae, Unbenannt) und die Taxonomie innerhalb der Familie der Chlamydiaceae unter Einführung eines neuen Genus und fünf neuer Spezies zu ändern (Everett *et al.* 1999).

Auch wenn dieser Vorschlag noch nicht allgemein akzeptiert ist und weitere Änderungen zu erwarten sind, sei er kurz vereinfacht dargestellt (Abbildung 2).



|                    |   |
|--------------------|---|
| <b>Ordnung:</b>    | <i>Chlamydiales</i>                         |
| <b>Familie I</b>   | <i>Chlamydiaceae</i>                        |
| Spezies:           | <i>Chlamydia muridarum</i> sp. nov.         |
|                    | <i>Chlamydia suis</i> sp. nov.              |
|                    | <i>Chlamydia trachomatis</i>                |
|                    | Biovar Trachoma                             |
|                    | Biovar LGV                                  |
|                    | <i>Chlamydiophila abortus</i> sp. nov.      |
|                    | <i>Chlamydiophila caviae</i> sp. nov.       |
|                    | <i>Chlamydiophila felis</i> sp. nov.        |
|                    | <i>Chlamydiophila pecorum</i> comb. nov.    |
|                    | <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> comb. nov. |
|                    | Biovar TWAR                                 |
|                    | Biovar Koala                                |
|                    | Biovar Equine                               |
|                    | <i>Chlamydiophila psittaci</i> comb. nov.   |
| <b>Familie II</b>  | <i>Simkaniaceae</i> fam. nov.               |
| Spezies            | <i>Simkania negevensis</i> sp. nov.         |
| <b>Familie III</b> | <i>Parachlamydiaceae</i> fam. nov.          |
| Spezies            | <i>Parachlamydia acantamoebae</i> sp. nov.  |
| <b>Familie IV</b>  | <b>unbenannt</b>                            |
| Spezies            | unbenannt, WSU 86-1044, ATCC-NR: VR 1470    |

Abbildung 2. Vorschlag für Umstrukturierung der Taxonomie der Chlamydialen (Everett *et al.* 1999)

### 3. Entwicklungszyklus

Chlamydien fehlen Enzyme, um ausreichend ATP und NAD zu synthetisieren, sie sind daher auf eukaryote Zellen als Energielieferanten angewiesen. Die Vermehrung und Ausbreitung erfolgt durch einen einzigartigen biphasischen Entwicklungszyklus. Die Vermehrung findet in der Zelle innerhalb von Einschlusskörpern durch Teilung statt. Ihre Verbreitung erfolgt durch Elementarkörperchen.

Der Zyklus beginnt mit der Anhaftung des Elementarkörperchens über verschiedene schwachen Bindungen an die Zellmembran der Zielzelle (Abb. 3). Das Elementarkörperchen ist rund, zwischen 0.25 und 0.4 µm groß. Es ist von einer dreischichtigen Zellwand umgeben, die der Zellwand gramnegativer Bakterien ähnelt. Über unterschiedliche noch nicht im Detail geklärte Aufnahmemechanismen gelangen diese Elementarkörperchen in die Zelle (Stephens *et al.* 2000b; Wolf *et al.* 2000). Sie bleiben von einem Phagosom umschlossen, wobei die Fusion mit Lysosomen durch ungeklärte Mechanismen verhindert wird. Ein bis drei Stunden nach Aufnahme in die Zelle kommt es zur Umbildung des Elementarkörperchens zum Initialkörperchen, auch Retikularkörperchen genannt (Abb. 3). Es hat einen

Durchmesser von ca. 1 µm und ist von einer flexiblen dreischichtigen Zellwand umgeben. Innerhalb des Einschlusskörperchens teilen sich nun die Retikularkörperchen. Nach ca. 24 bis 48 Stunden beginnen die Retikularkörperchen sich unter weiterer Vermehrung in Elementarkörperchen zurückzubilden. Am Ende des Vermehrungszyklus kann das Einschlusskörperchen bis zu tausend Elementarkörperchen enthalten und den Kern an Größe deutlich übertreffen, bis es schließlich mitsamt der Zelle birst, und die Elementarkörperchen freigesetzt werden (Abb. 3). Ein Vermehrungszyklus dauert je nach Bedingungen und Chlamydienspezies zwischen 40 und 96 Stunden (*C. trachomatis* ca. 48 Std.; *C. pneumoniae* ca. 72 Std.).

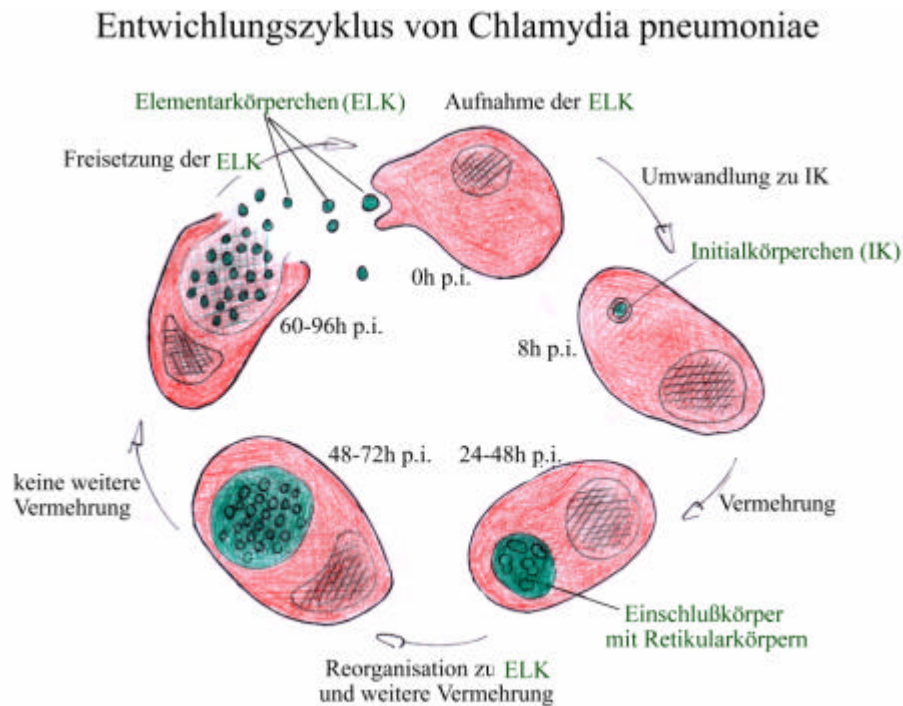


Abbildung 3. Entwicklungszyklus

Die Elementarkörperchen gelangen durch noch nicht genau geklärte Aufnahmemechanismen in die Zelle. Innerhalb einer Hülle vermehren sich die Chlamydien nach Umwandlung zu einem Initialkörperchen durch Teilung. Nach ca. 2 Tagen beginnt innerhalb des Einschlusskörpers unter weiterer Vermehrung die Reorganisation zu Elementarkörperchen. Nach 3-4 Tagen bersten Zelle und Einschlusskörper und die infektiösen Elementarkörper werden freigesetzt.

#### 4. Makromolekularer Aufbau

Die Zellmembran von Chlamydien ähnelt der von gramnegativen Bakterien. Sie besteht aus einer inneren und einer äußeren Membran. Die äußere Membran enthält chlamydienspezifisches Lipopolysaccharid (LPS) und das Membranprotein MOMP (major outer membrane protein).

MOMP, ca. 40 kDa groß hat einen Anteil von etwa 60% des Gesamtproteingehaltes der Bakterienmembran. Zusammen mit assoziierten Proteinen soll es eine Rolle bei der Anhaftung an die Wirtszelle spielen (Caldwell *et al.* 1981). Neuere DNA-Analysen bestätigten die Vorstellung, dass es sich um ein Porin handelt. Es leistet vermutlich auch einen Beitrag zum Nährstofftransport durch die Phagosomenmembran in das Einschlusskörperchen (Wyllie *et al.* 1999). Bei *C. trachomatis* werden die serovar-, serogruppen-, spezies-, und genus-spezifischen Epitope durch vier variable Domänen

des MOMP gebildet (Newhall 1988). Das MOMP von *C. pneumoniae* ist weniger immunogen und weniger komplex als das MOMP von *C. trachomatis* (Gaydos *et al.* 1992).

Neben dem MOMP sind weitere Proteine (99 kDa, 98 kDa, 97 kDa, 54 kDa, 53 kDa, 46 kDa, 43 kDa) bekannt, die zum Teil auf der Oberfläche nachgewiesen wurden (53 kDa, 97 kDa, 99 kDa), und eine Rolle als Antigene bei der Immunabwehr spielen (Halme *et al.* 1997; Knudsen *et al.* 1999). Die Analyse der mittlerweile aufgeschlüsselten DNS lässt auf 24 unterschiedliche Membranproteine schließen (Kalman *et al.* 1999).

Die Struktur des LPS von *C. trachomatis* (Nurminen *et al.* 1985) und *C. psittaci* (Brade *et al.* 1986) ähnelt der rauen Form des LPS von Enterobakterien, insbesondere dem von *Salmonella minnesota*. Die kurze hydrophile Ketodeoxyoctonat (kdo) Trisaccharid Einheit enthält eine einzigartige 2,8-Verbindung, die ein genuspezifisches Epitop bildet (Brade *et al.* 1987). Bei *C. pneumoniae* wurde ein ähnliches LPS mit einem genuspezifischen Trisaccharid Epitop  $\alpha$ Kdo (2-8)  $\alpha$ Kdo (2-4) gefunden (Christiansen *et al.* 1999; Peterson *et al.* 1998). Chlamydiales LPS besitzt eine vergleichsweise geringe endotoxische Aktivität, die auf die ungewöhnliche Komposition des Lipid A, insbesondere die geringere Zahl von Acylgruppen (5 statt 6) zurückgeführt wird (Qureshi *et al.* 1997).

Wie alle Organismen enthalten auch Chlamydien Hitzeschockproteine. Das am besten untersuchte ist ein 57-60 kDa genuspezifisches heat shock protein (HSP60), das mit Hitzeschockproteinen von *Escherichia coli* und Mykobakterien verwandt ist (Cerrone *et al.* 1991). Dieses HSP60 ist an der Pathogenese des Trachoms und möglicherweise auch der Arteriosklerose beteiligt (Bachmaier *et al.* 1999; Mayr *et al.* 1999; Morrison 1991) Ein weiteres Hitzeschockprotein ist HSP70, von welchem kein Einfluss auf die Pathogenese bekannt ist.

Chlamydien enthalten kein Peptidoglycan in ihrer Zellwand (Caldwell *et al.* 1981), die Wandstabilität wird durch die äußeren Membranproteine gewährleistet (Newhall 1988). Man geht davon aus, dass Chlamydien ihre Peptidoglycanschicht im Laufe der Entwicklung von einem Eubakterium-Vorfahren abgelegt haben (Moulder JW 1988). Es sind aber Spuren von Muraminsäure in Chlamydien sowie die entsprechenden Gene gefunden worden, und Chlamydien sind interessanterweise auch Penicillin sensibel (Moulder 1993). Möglicherweise haben die Peptidoglykane eine Bedeutung bei der Zellteilung (Rockey *et al.* 2000).

## **5. Chlamydien als Krankheitserreger**

### **5.1. Allgemeine Mechanismen**

Chlamydien sind weit verbreitete Krankheitserreger bei Mensch und Tier. Trotz unterschiedlicher Wirtsspezifität haben sie pathogenetische Gemeinsamkeiten. Üblicherweise verursachen sie chronische Infektionen. Die Erstinfektion geht im Allgemeinen nur mit schwachen Symptomen einher. Auch wenn die Erkrankungen klinisch zunächst meist leicht verlaufen, können wiederholte Reinfektionen und chronische Infektionen durch Hyperreagibilität des Immunsystems zu massiver Schädigung von Organen führen.

Verschiedene Faktoren sind ursächlich für die unzureichende Abwehr des Körpers. Die Antikörperantwort ist unvollständig, serovarspezifisch und hält nur kurz an (Rank *et al.* 1988). Dazu kommt, dass Chlamydien in ihrer Vermehrungsphase durch die intrazelluläre Lage vor der Körperabwehr geschützt sind. Abwehrmechanismen scheinen teilweise sogar die Chronifizierung zu begünstigen. Es konnte gezeigt werden, dass z.B. IFN- $\gamma$  den Vermehrungszyklus unterbricht und zu einer atypischen persistierenden intrazellulären Chlamydienform führt. Diese Formen können sobald der auslösende Stimulus wegfällt wieder in den normalen Vermehrungszyklus eintreten (Beatty *et al.* 1994b; Beatty *et al.* 1994a; Beatty *et al.* 1995). Des Weiteren kann die Körperabwehr, unter anderem durch Autoimmunreaktionen, zu einer Selbstschädigung des infizierten Organismus führen.

Ein erst seit kurzem bekannter Aspekt der Pathogenese von Chlamydieninfektionen ist die Fähigkeit von Chlamydien sowohl Apoptose auszulösen sowie zu inhibieren (Gibellini *et al.* 1998; Fan *et al.* 1998; Ojcius *et al.* 1998c)

Der Krankheitsverlauf einer Chlamydieninfektion hängt neben Chlamydientyp, Infektionsdosis und Eintrittspforte von der genetischen Ausstattung des Individuums ab. So ist zum Beispiel die Stärke der Antikörperantwort auf chlamydiales HSP60 vom MHC-Typ abhängig (Zhong & Brunham 1992).

## **5.2. *Chlamydia trachomatis***

Die verschiedenen Serotypen von *C. trachomatis* verursachen unterschiedliche Krankheitsformen. Die Serotypen A-C verursachen das Trachom. Die Serotypen D-K können Einschlusskörperchen-Konjunktivitis, Zervizitis, Endometritis, Proktitis und Säuglingsinfektionen erzeugen. Die Infektion mit Serotypen L1-L3 führt zu Lymphogranuloma inguinale.

### **5.2.1. Trachom**

Das Trachom ist weltweit die häufigste Erblindungsursache. Es ist besonders in Nordafrika, Indien und China verbreitet (Munoz & West 1997). Häufige Übertragungswege sind Schmierinfektionen, meist vom Finger ins Auge über gemeinsam benützte Handtücher, Waschlappen usw., wobei das Übertragungsrisiko von der Enge der Lebensgemeinschaft und den hygienischen Bedingungen abhängt. Auch indirekte Übertragung, zum Beispiel durch Fliegen, ist möglich.

Nach einer Inkubationszeit von fünf bis sieben Tagen kommt es zu einer eitrigen Konjunktivitis, die im Allgemeinen bald wieder abklingt. Es bilden sich dann aber durch die T-Zell abhängige Immunantwort typische Follikel, bis zu 1 mm große mit Makrophagen und Lymphozyten gefüllte Granula auf der Innenseite der Lider. Durch zunehmende Vernarbung kommt es zur Einwärtskehrung der Lider (Entropium), und dadurch zum Reiben der Wimpern auf der Hornhaut (Trichiasis). Die Selbstreinigungsmechanismen des Auges sind eingeschränkt und es kommt zu Sekundärinfektionen. Die Hornhaut wird von Granulationsgewebe überzogen und allmählich vaskularisiert, was zu Trübung der Kornea und schließlich zur Erblindung führt.

### **5.2.2. Unspezifische Genitalinfektionen**

Chlamydien der Serogruppe D-K stellen die häufigste bakterielle Ursache für sexuell übertragene Infektionen in industrialisierten Ländern dar. Bei der Frau laufen die Infektionen häufig subklinisch oder symptomlos ab, wobei es allerdings zu einer aufsteigenden Zervizitis oder Salpingitis mit Unfruchtbarkeit als Folge kommen kann. Man geht davon aus, dass 10% aller asymptomatischen Frauen infiziert sind, und damit auch Infektionsquellen für Sexualpartner und ihren Nachwuchs darstellen.

### **5.2.3. Einschlusskörperchen-Konjunktivitis**

Betroffen sind meist Neugeborene, die sich im Geburtskanal infizieren, seltener auch Erwachsene (Schwimmbad-Konjunktivitis). Im Allgemeinen nimmt diese Konjunktivitis einen guten Verlauf und heilt binnen eines halben Jahres aus, es kann allerdings auch zu einem Trachom ähnlichen Verlauf kommen.

#### **5.2.4. Neugeborenen Pneumonie**

Bei Neugeborenen kann sich neben der Konjunktivitis auch eine interstitielle Pneumonie entwickeln, die im Allgemeinen ein bis sechs Monate nach der Geburt Symptome zeigt.

#### **5.2.5. Lymphogranuloma inguinale**

Drei bis 21 Tage nach sexueller Übertragung von *C. trachomatis* der Serogruppe L kommt es zu einem Genitalulkus. Die Lymphknoten schwellen an, vereitern und verschmelzen schließlich.

#### **5.3. *Chlamydia psittaci***

*C. psittaci* verursacht die Ornithose (auch Psittakose oder Papageienkrankheit), eine interstitielle Pneumonie, die mit plötzlich auftretendem Fieber, Kopfschmerzen und Husten einhergeht. Selten kann es zu systemischen Komplikationen, wie Myokarditis, Enzephalitis und Hepatitis, kommen. Bei Tieren können diese Chlamydien zu verschiedensten Krankheitserscheinungen führen. Beispiele sind intestinale, respiratorische, meningeale, plazentare, und fetale Infektionen.

#### **5.4. *Chlamydia pecorum***

*C. pecorum* wird mit verschiedenen Krankheiten bei Schaf und Rind in Verbindung gebracht (Storz J 1994). Der Mensch ist kein natürlicher Wirt, es werden aber gelegentlich fieberhafte Pneumonien und seltener neurologische, gastrointestinale und kardiovaskuläre Manifestationen beobachtet (Odeh & Oliven 1992).

#### **5.5. *Simkania* sp. und *Parachlamydia* sp.**

Die klinische Bedeutung dieser erst kürzlich entdeckten Chlamydienarten ist noch nicht geklärt. Es wurden Antikörperprävalenzen gegen diese Keime bis 80 % gefunden (Friedman *et al.* 1999). Vermutlich sind diese Chlamydien für einen Teil der ungeklärten Pneumonien verantwortlich (Ossewaarde & Meijer 1999).

### **6. *Chlamydia pneumoniae***

*C. pneumoniae* wurde erst 1989 als eigene Spezies erkannt. Man geht mittlerweile davon aus, dass *C. pneumoniae* weltweit eine der häufigsten Ursachen für Atemwegsinfektionen ist, und es mehren sich die Anzeichen, dass der Erreger an der Entstehung einer ganzen Reihe chronischer Krankheiten zumindest beteiligt ist. Die Antikörperträgerrate liegt bei Erwachsenen weltweit bei ca. 50%, sie steigt von niedrigen Werten in der Kindheit im Laufe des Lebens kontinuierlich an. Bei Männern liegen sowohl Seroprävalenz als auch die Stärke der Antikörperantwort etwas höher als bei Frauen (Karvonen *et al.* 1994). In Entwicklungsländern liegt die Durchseuchungsrate insbesondere bei Kindern deutlich höher als in Industriestaaten (Saikku *et al.* 1988b).

#### **6.1. Atemwegsinfektionen**

Die Klinik einer Atemwegsinfektion durch *C. pneumoniae* reicht vom asymptomatischen bis zum letalen Verlauf, abhängig von Alter, Grunderkrankungen, und ob es sich um Ersterkrankung oder Reinfektion handelt (File *et al.* 1998; Grayston *et al.* 1989; Hahn 1999; Heinemann *et al.* 2000). Bei zuvor gesunden Personen verläuft die Infektion üblicherweise mild. Sie beginnt nach einer Inkubationszeit von 1-4 Wochen mit zunehmender Heiserkeit,

Halsschmerzen, Husten und vorübergehendem Fieber. Die Symptome lassen meist bald nach, wobei ein trockener Husten allerdings noch Monate anhalten kann. Häufig kommt es ca. 2 Wochen nach dem Nachlassen der ersten Krankheitserscheinungen zur Exazerbation einer tiefen Atemwegsinfektion. Bei älteren Patienten, bei Kindern in Entwicklungsländern sowie immunsupprimierten Patienten kommt es häufiger zu schwereren Krankheitsverläufen (Kauppinen & Saikku 1995; Heinemann *et al.* 2000). Reinfektionen laufen im Allgemeinen schwächer ab, allerdings halten die Symptome häufig länger an. Interessanterweise finden sich die meisten Fälle (80%) von rekurrenden Infektionen bei Männern (Kauppinen & Saikku 1995).

Serologische Daten sprechen auch für eine Beteiligung von *C. pneumoniae* an der Exazerbation von chronischen Bronchitiden (von Hertzen *et al.* 1996). Auch der Verdacht eines Zusammenhangs zwischen *C. pneumoniae* und Asthma wurde durch verschiedene epidemiologische Studien an Erwachsenen und Kindern erhärtet (Daian *et al.* 2000).

## **6.2. Chlamydia pneumoniae und Arteriosklerose**

Verschiedenste chronischen Krankheiten wie Sarkoidose und hiläre Lymphadenopathie (Marie *et al.* 1999), Guillan Barré Syndrom, Multiple Sklerose (Layh-Schmitt *et al.* 2000), Lungenkrebs (Koyi *et al.* 1999), Sezary T-Zell Lymphom (Abrams *et al.* 1999), Venenthrombosen (Loziquez *et al.* 2000), Morbus Alzheimer (Ring & Lyons 2000) und das chronische Müdigkeitssyndrom (Chia & Chia 1999) wurden mit *C. pneumoniae* in Zusammenhang gebracht. Bisher liegen hierzu allerdings nur Fallberichte und kleineren Studien vor, die keine wirkliche Aussage erlauben.

Fester ist die Datenlage was den Zusammenhang von Arteriosklerose und *C. pneumoniae* betrifft. Schon seit 50 Jahren wurde wiederholt ein gehäuftes Zusammentreffen von Arteriosklerose und Chlamydien-Erkrankungen beobachtet. Bis in die achtziger Jahre fand diese Beobachtung allerdings keine große Beachtung. Nach Hinweisen auf eine Beteiligung von *C. pneumoniae* an der Entstehung der Arteriosklerose in einer seroepidemiologischen Studie in Finnland (Saikku *et al.* 1988a) folgten weitere retrospektive und prospektive Studien in den U.S.A., Schweden, Deutschland, England, den Niederlanden und Alaska, die eine Korrelation von erhöhten *C. pneumoniae*-Titern mit koronarer Herzkrankheit ergaben (Koyi *et al.* 1999; Saikku 1999). Eine solche Verbindung konnte allerdings in neueren Untersuchungen nicht immer bestätigt werden (Danesh *et al.* 2000).

Der Verdacht auf einen Zusammenhang wurde erhärtet durch den Nachweis von *C. pneumoniae* in arteriosklerotischen Gefäßen. Mittlerweile liegen etwa 50 Veröffentlichungen vor, in welchen mit den verschiedensten Techniken (PCR, Elektronenmikroskopie, Immunfluoreszenzfärbungen, Kultur) *C. pneumoniae* in arteriosklerotischen Gefäßen (Aorta, Koronararterie, Pulmonalarterie, Femoralarterie, Arteria iliaca) nachgewiesen wurde. Die Nachweisrate in arteriosklerotischen Gefäßen lag im Schnitt bei 50% im Vergleich zu etwa 2% in gesunden Gefäßen (Kuo & Campbell 2000). Die Nachweisraten schwanken allerdings abhängig von Nachweismethode und Forschergruppe erheblich (Apfalter *et al.* 2001).

Es ist bis heute offen, ob Atherome sekundär mit Chlamydien infiziert werden, oder ob tatsächlich die Infektion selbst zur Atherombildung führt. Ein mögliches Szenario wäre, dass es bereits in jungen Jahren zu meist subklinischen Atemwegsinfektionen durch Chlamydien kommt, die Chlamydien sich dann innerhalb von infizierten Monozyten im Organismus ausbreiten und auf diesem Weg auch Endothelzellen infizieren. Die Arteriosklerose wäre dann das Produkt einer ultrachronischen Chlamydieninfektion, wobei die bekannten Risikofaktoren entweder unabhängig von einer Chlamydieninfektion zu Gefäßschädigungen führen, oder die Chlamydieninfektion begünstigen, oder in einem Wechselspiel mit den Chlamydien zur Pathogenese beitragen könnten. Neben den genannten Studien lassen eine Reihe weiterer Daten dieses Szenario zumindest als möglich erscheinen. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine

produktive *C. pneumoniae* Infektion in Makrophagen, Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen möglich ist (Gaydos *et al.* 1996). Auch ex vivo konnte *C. pneumoniae* in diesen Zellen bei Mensch, Maus und Kaninchen nachgewiesen werden (Chiu 1999; Moazed *et al.* 1996). Mit *C. pneumoniae* infizierte menschliche Endothelzellen exprimieren vermehrt Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1), ELAM-1 (Endothelial leucocyte adhesion molecule), die für die Anlagerung von Monozyten wichtig sind (Summersgill *et al.* 2000). Infektion von Makrophagen mit *C. pneumoniae* regt diese zu einer vermehrten Expression von Entzündungsmediatoren, wie Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6, Interleukin-8 und Interferon- $\gamma$  an. Gleichzeitig kommt es zu einer vermehrten Expression von CD14 (Heinemann *et al.* 1996; Netea *et al.* 2000). Des Weiteren werden menschliche Makrophagen durch *C. pneumoniae* zur Aufnahme von LDL (low density lipoprotein) und schließlich zur Schaumzellbildung (einer typischen Erscheinung in einem frühen Stadium der Arteriosklerose) angeregt (Kalayoglu & Byrne 1998). In vitro kann *C. pneumoniae* von infizierten Makrophagen auf Endothelzellen übertragen werden (Quinn & Gaydos 1999). Auch eine Kreuzreaktion von Antikörpern gegen chlamydiale Proteine wie HSP65/60 und Membranproteinen mit humanem HSP60 und Myosinketten könnte eine Schädigung des Endothels verursachen (Bachmaier *et al.* 1999; Mayr *et al.* 1999).

Die Chlamydien-Arteriosklerose-Theorie wird auch durch Tierversuche gestützt. Bei New Zealand White Rabbits konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit *C. pneumoniae* zu arteriosklerotischen Veränderungen, zu Ansammlung von Schaumzellen und zu Spindelzellproliferation im Aortenbogen führen kann (Fong *et al.* 1997; Fong 1999). Im Mausmodell (C57BL/6J) konnten nach intranasaler wie intraperitonealer Gabe von *C. pneumoniae* infizierte Makrophagen aus Lunge und Peritoneum isoliert werden (Moazed *et al.* 1997; Moazed *et al.* 1998). Chlamydien wurden auch in Blutmonozyten nachgewiesen, nicht aber im Plasma. Der Transfer von infizierten Makrophagen in ein gesundes Tier führte bei diesem zu einer disseminierten Infektion in Lunge, Thymus, Milz und Lymphknoten. In verschiedenen Mäusemodellen konnte ein Tropismus von *C. pneumoniae* zu arteriosklerotischen Plaques und einer Vergrößerung der Läsionen nach Infektion gezeigt werden (Moazed *et al.* 1998; Hu *et al.* 1999; Laitinen *et al.* 1997). Chlamydien konnten bis zu 20 Wochen in Läsionen und Schaumzellen nachgewiesen werden (Moazed *et al.* 1998). Jüngste Tierversuche stützen allerdings nicht immer die Chlamydien-Arteriosklerose-Theorie. So wurden in Versuchen an keimfreien Apo E (-/-) Mäusen gleiche Arterioskleroseraten wie an mit Chlamydien und weiteren Keimen infizierten Mäusen gemessen (Wright *et al.* 2000).

Zurzeit laufen weltweit Studien zur prophylaktischen Wirkung gegen Chlamydien wirksamer Antibiotika bei KHK-Patienten. Kleinere Studien ergaben eine signifikant niedrigere Inzidenz von akuten ischämischen Attacken bei Patienten mit instabiler Angina nach Roxithromycin Behandlung (Gurfinkel *et al.* 1999), wobei allerdings zu bedenken ist, dass Makrolid Antibiotika eine unspezifische antiinflammatorische Wirkung haben. Es wurde bereits gezeigt, dass durch eine Behandlung mit Roxithromycin die Inzidenz von *C. pneumoniae* in arteriosklerotischen Plaques zurückgeht (Melissano *et al.* 1999). Neueste Auswertungen von Therapieversuchen sind allerdings weniger viel versprechend (Jackson *et al.* 1999b; Anderson & Muhlestein 2000; Jackson *et al.* 1999a; Muhlestein *et al.* 2000).

Zusammenfassend bleiben trotz aller Indizien für die Chlamydien-Arteriosklerose-Theorie, Zweifel bestehen. Nachdem in der anfänglichen Euphorie vorwiegend Artikel erschienen, die für eine Rolle von Chlamydien bei der Entstehung der Arteriosklerose sprachen, erscheinen zunehmend auch Berichte über niedrige Nachweisraten von Chlamydien in arteriosklerotischen Gefäßen, über erfolglosen Einsatz von Antibiotika bei Arteriosklerose und fehlende Arteriosklerosebildung bei experimentell mit *C. pneumoniae* infizierten Tieren. Auch wenn dieses Thema international

sehr intensiv beforscht wird, wird es voraussichtlich noch einige Jahre dauern bis die Bedeutung von *C. pneumoniae* endgültig geklärt ist.

## 7. Diagnose von Chlamydieninfektionen

Infektionen mit Chlamydien können durch Kultur, Antigen-Nachweis, Hybridisierung und PCR diagnostiziert werden. Zellkulturverfahren gelten als Goldstandard sind allerdings mit Schwierigkeiten behaftet. Da freie Chlamydien äußerst empfindlich sind, müssen Proben in besonderen Transportmedien transportiert und schnell verarbeitet werden. *C. psittaci* ist weniger empfindlich gegenüber Umwelteinflüssen, stellt daher aber eine erhöhte Gefahr für das Laborpersonal dar. Das Hauptproblem besteht im Fall von *C. pneumoniae* in dem Fehlen von ausgereiften und standardisierten Kulturverfahren, weshalb die Anzucht von *C. pneumoniae* bisher nur vereinzelt in Forschungseinrichtungen gelang.

Aufgrund dieser Probleme werden im Allgemeinen alternative Testverfahren eingesetzt.

Zum Nachweis urogenitaler Infektionen werden meist Immunofluoreszenstests oder Enzym-Immunoassays verwendet. Invasive Infektionen besonders pulmonale Infektionen werden meist serologisch durch Antigennachweis diagnostiziert. Häufig werden Mikroimmunofluoreszenz Tests empfohlen. Die Ergebnisse sind allerdings schwierig zu interpretieren und weisen eine große Schwankungsbreite zwischen verschiedenen Labors auf. Deshalb wird vielfach weiterhin der Hämagglutinations Hemmtest verwendet, obwohl dieser nicht sicher zwischen *C. pneumoniae* und *C. psittaci* differenzieren kann.

Für *C. trachomatis* sind bereits PCR Verfahren kommerziell erhältlich. Für die anderen Chlamydienspezies ist diese Technik bisher auf Speziallabors begrenzt.

## 8. Therapie von Chlamydien-Erkrankungen

Makrolide, Tetracycline, und neue Quinolone gelten als Mittel der Wahl gegen *C. pneumoniae* und andere Chlamydien. Die Therapie sollte mindestens 10 Tage durchgeführt werden, da es sonst häufig zu einem Wiederaufflammen der Infektion kommt. Bei einigen chlamydialen Infektionen wirkt auch eine Einmalgabe von Azithromycin zuverlässig. Der Erfolg der Therapie ist jedoch auch nach längerer Therapie oft von kurzer Dauer. In diesem Fall wird ein zweiter Zyklus mit Tetracyclin empfohlen.

Es existieren bereits Impfstoffe gegen *C. psittaci* für Tiere. An der Entwicklung von Impfstoffen gegen humanpathogene Chlamydien wird weltweit intensiv gearbeitet. In Tierversuchen wurden bereits erste Erfolge insbesondere mit DNA Impfstoffen erzielt (Brunham *et al.* 2000;Svanholm *et al.* 2000;Zhong & Brunham 1992). Bis zum Einsatz eines Impfstoffs beim Menschen ist es aber noch ein weiter Weg.



## II. Ziele der vorliegenden Arbeit

Das erste Ziel dieser Arbeit war, **Kulturverfahren** für *C. pneumoniae* zu etablieren und zu optimieren. Es sollte einerseits ein möglichst sensitives Verfahren gefunden werden, sowohl zum Nachweis und zur Isolierung von Chlamydien aus Patientenproben sowie als Vergleichsverfahren für eine PCR, die zur gleichen Zeit an unserem Institut entwickelt wurde. Gleichzeitig galt es eine Methode zu finden, mit möglichst geringem Aufwand möglichst große Mengen an Chlamydien zu produzieren, um weiterführende Forschungsprojekte zur Interaktion von *C. pneumoniae* mit monozytären Zellen durchzuführen.

Es wird schon seit geraumer Zeit an der Entwicklung von Kulturverfahren für Chlamydien gearbeitet. Die in der Literatur beschriebenen Methoden unterscheiden sich aber z.T. erheblich, und scheinbar gleiche Methoden werden in verschiedenen Labors mit unterschiedlichem Erfolg durchgeführt. Dazu kommt, dass die Anstrengungen bisher immer in Richtung Entwicklung eines möglichst sensitiven Verfahrens zum Nachweis kleiner Chlamydienmengen gingen. Unser Ziel war in erster Linie die Anzucht großer Chlamydienmengen für anschließende Versuche. Es musste also von den beschriebenen Methoden die für unsere Labor am besten geeignete gefunden und entsprechend unseren Laborbedingungen und Ansprüchen modifiziert und weiter optimiert werden. Es galt hierbei verschiedenste Einflussfaktoren wie Zentrifugationsbedingungen, Erntezeitpunkte, Zellarten und Medienzusätze zu untersuchen.

Ziel der weiteren Forschungsvorhaben war, unterschiedliche Aspekte der **Reaktion monozytärer Zellen auf Infektion mit *C. pneumoniae*** zu beleuchten.

Für die geplanten Forschungsvorhaben mussten neben der Anzucht weitere **methodische Grundlagen** entwickelt werden. Um Beobachtungen in späteren Experimenten klar den Chlamydien zuordnen zu können, galt es ein Gradienten-Zentrifugationsverfahren zur **Aufreinigung von Chlamydien** zu etablieren. Des Weiteren mussten **Nachweisverfahren für Mykoplasmen** (Mikroskopie und PCR) eingeführt werden, um bei Zellkulturen sehr häufig auftretende Mykoplasmen Kontaminationen auszuschließen.

Ein weiterer wichtiger Punkt war die Etablierung von Analysemethoden und entsprechenden **Färbeverfahren**. Dazu gehörten u.a. die Entwicklung von Verfahren zur gleichzeitigen Darstellung der intrazellulären Chlamydien und Oberflächenrezeptoren am FACS, sowie von Chlamydien und eukaryoter DNS zur Beurteilung der Apoptose.

Nach der Etablierung von **Infektionsverfahren für Monozyten** sollten verschiedene monozytären Zelllinien und Zellen ex vivo (MM6, THP-1, RAW, humane periphere Blutmonozyten, murine dendritische Zellen) auf ihre Infizierbarkeit durch *C. pneumoniae* überprüft werden, und der Verlauf der Infektion bezüglich Infektionsrate, Dauer und Produktivität der Infektion untersucht werden.

Die **immunologische Reaktion der Monozyten** sollte anhand der Expression verschiedener Oberflächenproteine (wie CD14, MHC-I, MHC-II CD40, CD54, CD71, CD80, CD86 und CD106) im Verlauf der Infektion charakterisiert werden.

Ein weiterer Aspekt war, inwieweit sich die Infektion von Monozyten mit *C. pneumoniae* auf das **Apoptoseverhalten** auswirkt. Verschiedenste intrazelluläre Erreger beeinflussen das Apoptoseverhalten infizierter Zellen. Für *C. trachomatis* und *C. psittaci* lagen scheinbar widersprüchliche Berichte an Epithelzellen bzw. einer Monozyten-Zelllinie über Auslösung bzw. Inhibierung von Apoptose durch Chlamydien vor. Es war also zu vermuten, dass auch *C. pneumoniae* einen Einfluss auf das Apoptoseverhalten von Monozyten hat.

Der Frage ob eine Infektion von Monozyten mit *C. pneumoniae* in vitro zu einer verstärkten **Adhärenz** dieser Zellen an Gefäßwänden führt, und ob es hierbei auch zu einer Übertragung von Chlamydien kommen kann, wurde in

Zusammenarbeit mit einer Gruppe von Prof. Dr. Neumann im Deutschen Herzzentrum nachgegangen. In vivo könnte eine verstärkte Adhärenz infizierter Zellen eine Übertragung von Chlamydien auf die Gefäßwand ermöglichen, sowie auch unabhängig davon die Entzündungsreaktion an der Gefäßwand verstärken. Zunächst sollten Versuche an HUVEC-Monolayern unter statischen Bedingungen durchgeführt werden, um bei positiven Resultaten die Anhaftung in einem physiologischeren Durchflussmodell genauer zu evaluieren. Gleichzeitig sollte mittels Durchflusszytometrie die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Monozyten unter Infektion untersucht werden. Diese in vitro Experimente wurden ergänzt durch eine klinische Studie, in der die prophylaktische Wirkung von Roxithromycin auf Restenosisierung nach Stentimplantation ermittelt wurde.

Um einen ersten Anhalt zu gewinnen, welche Signalsysteme an der Auslösung der monozytären Reaktionen auf *C. pneumoniae* beteiligt sind, sollte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Korbinian Brand der klinischen Chemie der TU München untersucht werden, inwieweit **Nf-κ-B** durch *C. pneumoniae* aktiviert wird. Nf-κ-B ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselstelle bei Entzündungsreaktionen darstellt. Auch bei der Entwicklung der Arteriosklerose wird dieser Faktor aktiviert.

### III. Materialien

#### 1. Antikörper

|              |               |        |                  |
|--------------|---------------|--------|------------------|
| Chlamydien   | Mouse Ig G 1  | FITC   | Biochrom         |
| CD 3         | Ig G 1κ       | PE     | Pharmingen       |
| CD 8         | Mouse Ig G 2a | PE     | Becton Dickinson |
| CD 11 c      | Mouse Ig G 2a | PE     | Pharmingen       |
| CD 14        | Mouse Ig G 2a | PE     | Pharmingen       |
| CD 40        | Mouse Ig G 1  | PE     | Coulter          |
| CD 54 (ICAM) | Mouse Ig G 1  | PE     | Pharmingen       |
| CD 71        | Mouse Ig g 1  | PE     | Pharmingen       |
| CD 80 (B7-1) | Mouse Ig Mκ   | Biotin | Pharmingen       |
| CD 86        | Mouse Ig G 1  | PE     | Pharmingen       |
| CD 95 (fas)  | Mouse Ig G 1  | Biotin | Pharmingen       |
| CD 106       | Mouse Ig G 1  | Biotin | Serotec          |
| MHC I PE     | Mouse Ig G 1  | FITC   | Pharmingen       |
| MHC II PE    | Mouse Ig G 2b | PE     | Pharmingen       |
| Isotyp 1     | Mouse Ig G 1  | PE     | Pharmingen       |
| Isotyp 2     | Mouse Ig G 2a | PE     | Pharmingen       |
| Fc-Block     |               |        | Pharmingen       |

#### 2. Chemikalien, Reagenzien

|                                     |                               |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| Agarose                             | Biozym                        |
| Agarose Standard                    | Gibco                         |
| [α-32 P](> 3000 Ci/mol)             | NEN, Brüssel                  |
| Aminosäuren, nicht essentielle 100X | Seromed                       |
| Ammoniumeisensulfat                 | Merck                         |
| Amphotericin                        | Sigma                         |
| Borsäure                            | Merck                         |
| BSA                                 | Sigma                         |
| Chloroform                          | Roth                          |
| Cycloheximid, C15H23NO4             | Sigma                         |
| DMSO, Dimethylsulfoxid              | Sigma                         |
| DNA Farbstoff                       | Hoechst (33.258, Bisbenzimid) |
| DNAse                               | Böhringer                     |
| DNS-Polymerase I                    | Boehringer Mannheim           |
| EDTA                                | Merck                         |
| Eisessig, Essigsäure 100%           | Merck                         |
| Entellan                            | Merck                         |

|                                     |                     |
|-------------------------------------|---------------------|
| Etoposid                            | Sigma               |
| Ethanol 100%                        | Merck               |
| Ethanol 70%                         | Hausapotheke        |
| Etidiumbromid                       | Roth                |
| FCS Standard                        | Vitromex            |
| FCS low tox                         | Biochrom KG         |
| Ficoll                              | Biochrom KG         |
| Formaldehyd                         | Merck               |
| L-Glutamin                          | Seromed             |
| Glucose                             | Merck, Hausapotheke |
| Hepes-Pulver                        | Seromed             |
| Histopaque 1077 / 1119              | Sigma               |
| Indometacin                         | Sigma               |
| Isoamylalkohol                      | Sigma               |
| Kaliumphosphat                      | Fluka               |
| Kalziumphosphat                     | Sigma               |
| DNA-Leitern                         |                     |
| 100bp DNA Ladder Plus               | Fermenter GmbH      |
| 1Kb-Ladder                          | Gibco               |
| 123 Kb-Ladder                       | Gibco               |
| Loading Buffer                      | Sigma               |
| LPS (E. coli 0111:B4)               | Sigma               |
| Magnesiumchlorid                    | Roche/ Perkin Elmer |
| Magnesiumsulfat                     | Merck               |
| Marker                              |                     |
| M20 pBR322DNA/AluI                  | MBI Fermenter GmbH  |
| M23, pUC19DNA/MspI                  | MBI Fermenter GmbH  |
| MEM alpha Medium                    | Gibco BRL           |
| 2-Mercaptoethanol                   | Sigma               |
| Methanol                            | Merck               |
| MEM, Minimal Essential Medium       | Biochrom            |
| Mineralöl                           | Sigma               |
| NEAA, nicht essentielle Aminosäuren | Biochrom            |
| Nicotine +/-                        | Sigma               |
| Natriumcitrat                       | Merck               |
| Natriumphosphat                     | Merck               |
| Natriumhypochlorid 12%              | Roth                |
| Objektträger                        | Menzel Gläser       |
| OPI-Media-Supplement                | Sigma               |
| PBS                                 | Seromed             |

|                             |                    |
|-----------------------------|--------------------|
| Penicillin/Streptomycin     | Seromed            |
| Phenol (pH 7)               | Roth               |
| Phenol (pH 4)               | ICN-Biochemicals   |
| Penicillin-Streptomycin     | Seromed            |
| RPMI-low-tox, VLE RPMI 1640 | Seromed, Biochrom  |
| Primer                      |                    |
| Myf                         | MWG-Biotech        |
| Myr                         | MWG-Biotech        |
| Protease Pepton             | Difco              |
| 10X Puffer                  | Roche/Perkin Elmer |
| Pyruvat                     | Seromed            |
| Saponin                     | Sigma              |
| Sucrose                     | Sigma              |
| Taq-Polimerase              | Roche Perkin Elmer |
| 10X TBE                     | Biorad             |
| Tris, Trizym Base           | Sigma              |
| Tris-HCl                    | Merck              |
| Trypsin                     | Seromed            |
| Urografin                   | Schering           |
| Yeast extract               | Difco              |

### 3. Lösungen, Medien, Puffer, Gel

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Mercaptoethanol-Stock          | 70 µl konz. Mercaptoethanol<br>100 ml PBS  |
| RPMI-Kulturmedium 1640 für MM6 | 500 ml RPMI 1640 low tox<br>50 ml FCS low tox<br>5 ml 200 nM L-Glutamin<br>½ vial OPI-supplement |
| MEM- Infektionsmedium          | 500 ml MEM-Medium<br>5 ml NEAA<br>5 ml Natriumpyruvat<br>0,5 ml Cycloheximid Stocklösung         |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| MEM-Kulturmedium      | 500 ml MEM- M<br>25 ml inaktiviertes FCS<br>5 ml NEAA<br>5 ml Natriumpyruvat   |
| RPMI-Infektionsmedium | 500 ml RPMI-Medium<br>50 µl Indometacin-Stocklösung<br>2,5 ml Mercaptoethanol-Stocklösung<br>5 ml 200mM L-Glutamin<br>0,5 ml Cycloheximid Stocklösung  |
| RPMI-Kulturmedium     | 500 ml RPMI-Medium<br>25 ml inaktiviertes FCS<br>50 µl Indometacin-Stocklösung<br>2,5 ml Mercaptoethanol-Stocklösung<br>5 ml 200mM L-Glutamin  |
| Amöbenpuffer          | 1000 ml H <sub>2</sub> O<br>10 ml 0,4 M MgSO <sub>4</sub><br>10 ml 0,005 M(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> FeII(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub><br>10 ml 0.25 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O<br>10 ml 0.25 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>8 ml 0.05 M CaCl <sub>2</sub><br>1 g Natriumcitrat |
| Amöbenmedium          | 1 l Amöbenpuffer<br>20 g Protease Pepton<br>1 g Yeast extract<br>18 g Glucose  |
| Zell-Einfriermedium   | 70 % Zuchtmedium<br>20 % FCS<br>10 % DMSO  |
| SPG (pH 7.4-7.6)      | 75 g Sucrose<br>0.52 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>1.22 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>0.72 gL-Glutamatic Acid   |
| Trypsin               | 10 % 10 X Trypsin in 90 % Aqua dest.   |

#### 4. Plastikwaren

|  |                   |
|--|-------------------|
| Deckgläschen 12 mm für Mikroskopie       | Kittel Gläser     |
| Filtertöpfe 0.2 µm                       | Sartorius         |
| Kryo Röhrchen Innen/Außengewinde         | Nunc              |
| Lochplatten 6,12,24                      | Nunc              |
| Pipettenspitzen                          | Greiner           |
| Pipettenspitzen gestopft                 | Biozym            |
| Reaktionsgefäße PCR 0,5 ml               | Biozym/ Eppendorf |
| Spritzenfilter 0.2 µm                    | membra Pure       |
| U-Röhrchen PC 10 ml                      | Nunc              |
| V-Röhrchen PC 10 ml                      | Nunc              |
| V Platten 96                             | Nunc              |
| V-Röhrchen 15 ml                         | Falcon            |
| V-Röhrchen 50 ml                         | Falcon            |
| Zellkulturflaschen mit/ohne Filterdeckel | Greiner           |
| Zellschaber 25 cm                        | Greiner           |

#### 5. Geräte

|               |                            |
|---------------|----------------------------|
| Brutschränke  | Hereus B 5060 EK/CO2       |
| FACS          | EPICS-PROFILE              |
| Flow          | Hereus Lamina Air HLB 2472 |
| Heizblock     | Liebisch                   |
| Mikroskope    | Zeiss                      |
| PCR-Maschinen | Perkin Elmer               |
| Zentrifugen   | Hereus                     |

#### 6. Zellen

##### **HeLa (ATCC CCL-2)**

Zelllinie eines humanen Epithelloid-Karzinoms, die 1957 aus einem Cervixkarzinom einer 31 jährigen schwarzen Frau isoliert wurde (ATCC Produktinformation 1999).

##### **Hep-2 (ATCC CCL-23)**

Zelllinie eines humanen Larynxkarzinoms. Die Isolation erfolgte 1952 aus Tumoren, die sich in Cortison behandelten Ratten gebildet hatten, nachdem man ihnen Larynxkarzinomgewebe eines 56 jährigen Kaukasiers injiziert hatte. Eine ursprüngliche Kontamination mit Mykoplasmen wurde von ATCC durch Kanamycin Behandlung eliminiert. Seit Kurzem besteht der Verdacht, dass es sich bei dieser Zelllinie auch um einen HeLa Zellklon handeln könnte, der durch Kontamination entstanden ist (ATCC Produktinformation 2001).

##### **NCIH292 (ATCC CRL-1848)**

Zelllinie eines humanen mucoepidermoiden Lungenkarzinoms. Die Zelllinie wurde aus einer Lymphknotenmetastase einer 32 jährigen Schwarzen isoliert und an Wachstum in serumhaltigem RPMI-Medium adaptiert. Die Merkmale einer mucoepidermoiden Zelle bleiben auch in Kultur erhalten (ATCC Produktinformation 1999)

**Mono Mac 6 (MM6)**

Humane monozytäre Zelllinie, mit Charakteristika eines reifen Monozyten, welche aus dem peripheren Blut eines Patienten mit monoblastischer Leukämie isoliert wurde (Ziegler-Heitbrock *et al.* 1988).

**THP-1 (ATCC TIB-202)**

Humane Monozyten-Zelllinie welche aus einem männlichen Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie isoliert wurde (ATCC Produktinformation 1999)

**RAW (ATCC TIB-71)**

Adhärenz wachsende murine Makrophagen-Zelllinie aus einer männlichen Balb/c Maus. Diese Zelllinie wurde nach Induktion eines Tumors mittels Abelson Mäuse Leukämie Virus isoliert. Die Zellen produzieren keine Retroviren (ATCC Produktinformation 1999)

**ANA**

Adhärenz wachsende murine Makrophagen-Zelllinie.

**7. Chlamydienstämme*****C. pneumoniae* ATCC 1310; TWAR (CDC/CWL-029)**

Isoliert aus dem Rachenabstrich eines Pneumonie Patienten (ATCC Produktinformation 1999).

***C. pneumoniae* ATCC 1360 (CM-1)**

Isoliert aus dem Sputum eines 58 Jahre alten Pneumonie Patienten, serologisch identisch mit dem Referenz Stamm TW 183 (ATCC Produktinformation 1999).

***C. pneumoniae* MUL**

Von Maaß *et al.* aus Patientenmaterial isolierter Stamm, mykoplasmenkontaminiert (freundlicherweise von Maaß zur Verfügung gestellt).



## IV. Methoden

### 1. Anzuchtverfahren

#### 1.1. Zellkultur

Die Zellen wurden a  $10^5$  Zellen/ml Zuchtmedium in Kulturflaschen ausgesät und im Brutschrank bei  $35^\circ$  mit 5%  $\text{CO}_2$  Begasung bebrütet. Bei filterlosen Flaschen wurde der Deckel einen Spalt offen gelassen, um Gasaustausch zu gewährleisten. Alle 3 Tage wurden die Zellen umgesetzt. Adhärente Zellen wurden hierfür durch Inkubation mit Trypsin (ca. 5 min) im Brutschrank gelöst. Durch Aufnahme in PBS plus FCS und anschließendes Abzentrifugieren (5 min; 1200 rpm) wurden die Zellen gewaschen und anschließend in Zuchtmedium ( $10^5$  Zellen/ ml) resuspendiert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde nach Färbung mit Eosin in einer Neubauer Zählkammer ermittelt

Frische Zellen wurden rasch aufgetaut, z.B. im  $37^\circ$  Wasserbad, in Medium gewaschen und in entsprechendem Kulturmedium plus 10% FCS angezchtet.

Für Zellstocks wurde einer konzentrierte Zell-Suspension ( $2 \times 10^6$  -  $2 \times 10^8$  Zellen /ml in Medium) mit 20-30% FCS und 10-20% DMSO versetzt und auf 1 ml Kryoröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden nach schrittweiser Abkühlung in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 1.2. Infektion des Zellrasens

Prinzip: Es wird ein Hep-Zellrasen angelegt, dieser wird mit einer Chlamydiensuspension infiziert. Durch Zentrifugieren wird das Eindringen der Chlamydien in die Zellen erleichtert. Im Infektionsmedium befindet sich Cycloheximid, welches die Proteinsynthese der Eukaryonten am 80S-Ribosom blockiert und damit der Chlamydie einen Wachstumsvorteil verschafft. Nach 3 Tagen erntet man die Chlamydien, indem man den Zellrasen abkratzt, die Zellen durch Vortexen mit Glaskugeln zerstört und so die infektiösen Elementarkörperchen freisetzt.

**Tag 1:** Hep-2 oder NCI Zellen wurden in 6Lochplatten verteilt (ca. 400 000 Zellen in 2 ml pro Loch). In einen Napf wurde ein Deckgläschen gegeben. Die Zellen wurden 12-24 Stunden im Brutschrank bei  $35^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  bebrütet.

**Tag 2:** Nach Kontrolle des Zellrasens im Umkehrmikroskop wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Chlamydiensuspension in Infektionsmedium hinzugeben (2 ml pro Loch). Die 6-Lochplatten wurden eine Stunde bei 3500 U und  $35^\circ\text{C}$  zentrifugiert und anschließend im Brutschrank  $35^\circ$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert.

**Tag 4/1:** Das Deckgläschen wurde entnommen und auf Chlamydien angefärbt um die Intensität der Infektion zu kontrollieren. Die 6-Lochplatten für die nächste Generation wurden vorbereitet.

**Tag 5/2:** Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt.  
Ein Teil der Ernte wurde ohne weitere Behandlung nach langsamer Abkühlung bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.  
Ein kleiner Teil der Ernte diente dem Herstellen der Infektionssuspension für die nächste Generation. Die benötigte Menge an Chlamydien-Zellsuspension wurde in 50 ml VRöhrchen gefüllt (je nach Stärke der Ausgangsinfektion ließen sich mit der Ernte eines Napfes 6-20 neue Nöpfe infizieren). Die Zellen wurde durch 3 min Vortexen mit 20-50 Glasperlchen aufgeschlossen. Die so behandelte

Chlamydien-Zellsuspension wurde mit Infektionsmedium auf die benötigte Menge aufgefüllt um die vorbereiteten Platten zu infizieren (12 ml pro 6- Lochplatte).

Dieses Verfahren erwies sich nach einer Reihe von Vorversuchen als gut geeignet. Für die in dieser Arbeit dargestellten Versuche zur Optimierung des Anzuchtverfahrens wurde es in Bezug auf verschiedensten Parameter wie z.B. Zelllinie, Zentrifugationsdauer und Temperatur, Erntezeitpunkt, Dichte des Zellrasens und Zusatz von Cycloheximid variiert. In den Versuchen wurde im Allgemeinen eine maximale Konzentration von ca. 0.5 inclusion forming units (ifu) / Zelle sowie 2 weitere geometrische Verdünnungsstufen also ca. 0,25 und 0,12 ifu/Zelle eingesetzt.

### 1.3. Färbungen der Chlamydienpräparate für das Mikroskop

Adhärenente Zellen wurden auf Glaskulturträgerchen in Lochplatten gezüchtet. Diese Gläschen wurden nach der Fixierung auf Objektträger geklebt (mit Entellan) und anschließend gefärbt. Nicht-adhärenente Zellen wurden mittels Zytospin auf einen Objektträger gebracht, in Methanol fixiert und gefärbt.

Für die Färbung verwendeten wir den Test Kit von Progen. Die Färbelösung enthält einen FITC-konjugierten genusspezifischen AK gegen Chlamydien LPS, und als Gegenfärbung für die Zellen Evansblau. Proben wurden nach Waschen in PBS 10 min in Methanol fixiert, an der Luft getrocknet und anschließend mit 10 µl Färbelösung 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 min in einem PBS Bad gewässert, nach Lufttrocknung mit Eindeckmedium bedeckt und möglichst bald mikroskopiert. Dauerpräparate wurden bei -20° im Dunkeln gelagert um ein Ausbleichen des FITC-Farbstoffes zu vermeiden. Die Zellen erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop in Ölimmersion rot, während die Chlamydien grün leuchten.

### 1.4. Bestimmung der Effizienz der Infektion

Die Anzahl der Einschlusskörper (EK) gilt allgemein als Maß für die Stärke einer Chlamydieninfektion. Um die verschiedenen Verfahren zu vergleichen wurden 48 Stunden nach Infektion pro Ansatz ein bis zwei Kulturträgerchen auf Chlamydien gefärbt und die EK in je nach Stärke der Infektion in 4 bis 10 Gesichtsfeldern ausgezählt und hieraus der Mittelwert der EK pro Gesichtsfeld berechnet. Das zu Beginn unserer Untersuchungen verwendete Mikroskop wurde später durch ein Mikroskop mit einem größeren Gesichtsfeld ersetzt. Dadurch wurden in späteren Versuchen entsprechend mehr EK/Gesichtsfeld ausgezählt. Auf die genaue aufwendige Bestimmung der eingesetzten Chlamydien-Konzentration wurde bei den Experimenten zum Vergleich der Anzuchtmethoden meist verzichtet. Die aus den Diagrammen ersichtliche Anzahl der Einschlusskörper im Standardverfahren ist ein recht genaues Maß für die Infektionsdosis und reicht für einen Vergleich der Verfahren. Eine Angabe der eingesetzten Volumina macht keinen Sinn, da die Chlamydien-Konzentrationen in frischen Ernten stark schwanken.

### 1.5. Bestimmung der Infektionsdosis

Es ist allgemein üblich, die Infektionsdosis von Chlamydien in inclusion forming units (IFU/Volumen) anzugeben, d.h. der Anzahl der Chlamydien, die unter optimalen Kulturbedingungen in der Lage sind, eine Zelle zu infizieren und einen Einschlusskörper zu bilden.

$$\text{Berechnung der IFU/ml : } \frac{\text{EK / Gesichtsfeld} \quad \times \quad \text{Gesamtgrundfläche}}{\text{Volumen der Infektionslsg.} \quad \times \quad \text{Fläche eines Gesichtsfeldes}}$$

Da sich die Zahl der Einschlusskörper nicht direkt proportional zur Anzahl der Chlamydien verhält sondern bei steigender Chlamydien-Konzentration einem Maximalwert nähert, und schließlich durch Schädigung des Zellrasens und weiteren ungeklärte Mechanismen wieder abfällt (siehe Abb. 4) führten wir mit den zu bestimmenden Suspensionen Verdünnungsreihen auf Hep-2-Zellen durch, und berechneten die Zahl der Ifu aus Mittelwerten im linear steigenden Teil der Kurve.

## **1.6. Aufreinigungsverfahren**

### **Grobe Aufreinigung**

Für Vorversuche z.B. im Rahmen der Untersuchungen zur Apoptose wurden aus Zeitgründen teilweise auf eine gründliche Aufreinigung verzichtet und nur „grob aufgereinigte“ Chlamydien verwendet. Hierfür wurde 72 Stunden nach Infektion das Infektionsmedium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit Medium gespült. Anschließend wurden die Zellen abgekratzt, in lowtox Medium aufgenommen und mit Glaskugeln gevortext. Die Zelltrümmer wurden durch 10 min. Zentrifugation bei 1200 U abzentrifugiert. Der Überstand wurde in Versuchen eingesetzt.

### **Aufreinigung mittels Urografingradientenzentrifugation**

Eine gründliche Aufreinigung wurde mittels Gradientenzentrifugation mit Urografin folgendermaßen durchgeführt:

1. Chlamydien und Zellen wurden durch eine 20-30 minutige Zentrifugation der Chlamydienernte bei 8000g konzentriert. Das Pellet wurde in einer kleinen Menge PBS resuspendiert.
2. Die Chlamydien wurden durch Vortexen mit Glasperlen freigesetzt.
3. Die Suspension wurde gepoolt. Die groben Zelltrümmer werden durch niedrig touriges Zentrifugieren (10 min bei 1000U/min) der Suspension entfernt.
4. Die so vorgereinigte Suspension wurde mit einer 30-35 prozentigen Urografinlösung unterschichtet. Darunter wurde ein weiteres 50 prozentiges Sucrosekissen geschichtet. Die Röhrchen wurden durch Zugabe von PBS austariert und eine Stunde bei 10.000 g zentrifugiert. Die Gadienzzentrifugation wurde in einer Festwinkelzentrifuge in einem 200 ml Becher durchgeführt. Es wurden hierbei 30 ml Chlamydiensuspension, 30 ml Urografin und 20 ml Sucrose eingesetzt.
5. Das Chlamydien-haltige Pellet wurde für einen weiteren Waschschrift in PBS oder Medium resuspendiert und anschließend wieder abzentrifugiert (1 Std., 10.000 g). Um DNA Reste, die auch zu Verklumpung der Chlamydien führt zu entfernen, wurde das Pellet vor Resuspension meist 10 min mit DNase behandelt.
6. Die gereinigten Chlamydien wurden je nach Ausgangsmenge in 5-20 ml RPMI 1640 low tox resuspendiert, auf 1 ml Kryoröhrchen verteilt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.
7. Um einen Anhalt für die Reinheit zu gewinnen wurden 10  $\mu\text{l}$  auf einem Objektträger hitzefixiert und anschließend mit dem normalen Chlamydienfarbstoff gefärbt.
8. Zur Kontaminationskontrolle wurden einige  $\mu\text{l}$  auf Blutagar ausgestrichen und einige  $\mu\text{l}$  für eine Mykoplasmen PCR aufbewahrt.
9. Um Anhalt für Chlamydienmenge und Reinheit zu erhalten wurde teilweise mit einigen  $\mu\text{l}$  eine Proteinbestimmung durchgeführt
10. Die Konzentration der infektiösen Einheiten (ifu) in der aufgereinigten Suspension wurde mittels einer Verdünnungsreihe auf Hep-2 Zellen mit wieder aufgetautem Material bestimmt (siehe 1.5.)

## 1.7. Kontrolle der Zellkultur auf Mykoplasmen-Kontaminationen

Da Kontamination mit Mykoplasmen insbesondere bei der Anzucht von Chlamydien sehr häufig sind (Uphoff & Drexler 1999; Huniche *et al.* 1998), sich aber mit kontaminierten Chlamydien keine seriösen Untersuchungen durchführen lassen überprüften wir das Anzuchtssystem wie in der entsprechenden Literatur empfohlen durch Kombination zweier Methoden (Hopert *et al.* 1993; Uphoff & Drexler 1999).

Die Zellkulturen wurden mittels **DNS-Färbung durch DAPI** überprüft. In einer solchen Färbung erscheint der Zellkern klar und leuchtend, das Zytoplasma zeigt eine leichte Hintergrundfärbung. Die Mykoplasmen erscheinen als relativ schwach gefärbte, leicht unscharfe krisselige Körperchen auf und an den Zellen, bei massiver Kontamination auch zwischen den Zellen (siehe Bild 3,4).

Als weitere Kontrolle für Zellkulturen und aufgereinigte Chlamydien etablierten wir die unten beschriebene Genus-spezifische Mykoplasmen **PCR**, unter Verwendung bereits beschriebener Primer (van Kuppeveld *et al.* 1994a; van Kuppeveld *et al.* 1994b).

### Mastermix:

|                  |         |
|------------------|---------|
| H <sub>2</sub> O | 29,5 µl |
| 10xPuffer        | 5 µl    |
| MgCl             | 7 µl    |
| MgCl             | 7 µl    |
| dUTP             | 2 µl    |
| Myf-primer       | 0,5 µl  |
| Myr-primer       | 0,5 µl  |
| Taq-polymerase   | 0,5 µl  |
| Probe            | 5 µl    |

### Zyklusbedingungen Heizblock (Biometra):

|                  |        |      |
|------------------|--------|------|
| Vorwärmphase:    | 5 sec  | 95°C |
| Denaturation     | 30 sec | 95°C |
| Annealing        | 30 sec | 63°C |
| Primer extension | 30 sec | 72°C |

### Gel:

|                |       |
|----------------|-------|
| Ethydiumbromid | 10 µl |
| Agarose        | 0,8 g |
| 0,5 TBE        | 42 ml |

## Präparation von DNA

3-6 Millionen Zellen wurden in einem „2 ml Epi“ in 100 µl NaCl suspendiert. Nach Zugabe von 500µl Digestionspuffer (bestehend aus 100 mM NaCl + 10 mM Tris-Cl/pH 8,0 + 25 mM EDTA/pH 8,0 + 0,5% SDS-Sodium-Dodecyl-Sulfat) und 5 µl Proteinase K (Stockkonz. 20 mg/ml) wurde der Ansatz 60 min. bei 56°C im Heizblock inkubiert. Den Proben wurde 500µl Phenol (Roti-Phenol für DNA/RNA; pH 7,4-8,0; bei 4°C gelagert) und nach gründlichem Vortexen 300µl eines Chloroform-Isoamyl-Gemisches (Verdünnung 24:1; bei 4°C gelagert) zugesetzt.

Die Suspension wurde nach 10 min Kühlung bei -20°C für 20 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. 400µl vom dem klaren Überstand wurden abpipettiert, in ein neues 2 ml Epi gegeben und mit 1,3 ml 100 prozentigem Ethanol (bei -20°C gelagert) und 40 µl Natriumacetat gevortext und 1h bei -20°C fällen gelassen (alternativ 12-24h). Anschließend wurden die Proben 20 min. zentrifugiert (13.000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 1 ml 70 prozentigem eiskalten Ethanol resuspendiert und wieder zentrifugiert (20 min. 13.000 rpm). Der Waschschriff in Ethanol wurde einmal wiederholt. Der Überstand wurde wieder vorsichtig abpipettiert und der restlichen Überstand im Heizblock bei 45°C verdampfen gelassen.

## **Gelelektrophorese:**

5 µl Laufpuffer wurden mit 15 µl PCR Produkt gemischt und davon 18 µl in eine Geltasche gegeben. In eine Tasche pro Gel wurden 5 µl der M23-Leiter gegeben. Die DNA wurde 30 min bei 120 V aufgetrennt und gleich anschließend unter der UV-Lampe fotografiert.

## **1.8. Infektion von Amöben mit *C. pneumoniae***

Amöben wurden durch Zentrifugation bei 1000U mit Infektionsdosen von bis zu 10 IFU/ Zelle infiziert.

Für die mikroskopische Darstellung wurden infizierte Amöben wie nicht adhärenente Zellen in PBS gewaschen und auf Objektträger zentrifugiert. Nach Fixierung durch eine Ethanolentwässerungsreihe wurden sie mit dem üblichen Testkit gefärbt.

Es wurden zwei gleichwertige Ernteverfahren angewendet. Im ersten Verfahren wurden die Amöben nach Entfernen des Überstandes, ähnlich wie bei der normalen Ernte von Kulturzellen, mit Glaskügelchen gevortext. In dem anderen Verfahren wurden die Amöben nach Entfernen des Überstandes in eine 0,1% Saponinlösung aufgenommen und dreimal durch eine 29-gauge Spritzenadel gepresst.

## **2. Interaktion monozytärer Zellen mit *Chlamydia pneumoniae***

### **2.1. Infektion von Monozyten**

Für die Etablierung des Infektionsverfahrens von Monozyten wählten wir die Mono-Mac-6 Zelllinie, da diese von allen bekannten Zelllinien die meisten Charakteristika eines reifen Monozyten hat (Ziegler-Heitbrock *et al.* 1988). Auch bei der Überprüfung der Infizierbarkeit weiterer Zellen wie THP-1, RAW, peripherer Blutmonozyten und dendritischer Zellen diente sie als Vergleich. Die Infektionsraten wurden mittels Zytometer bestimmt und mikroskopisch kontrolliert.

#### **2.1.1. Infektionsverfahren für Monozyten**

1. Die Monozyten wurden in PBS oder Medium gewaschen, in Toxin freies Medium (200 000 Zellen/ml) resuspendiert und 24 Stunden im Kulturgefäß ruhen gelassen.
2. Aufgereinigte Chlamydien suspension (ca. 10 ifu/Zelle) wurde vorgewärmt hinzu gegeben.
3. Das entsprechende Gefäß wurde 10 min vorsichtig geschwenkt, um Kontakt zwischen Zellen und Chlamydien zu ermöglichen.
4. Wenn ausschließlich die Wirkung der intrazellulären Chlamydien untersucht werden sollte wurde das Medium nach 1. Stunde ausgetauscht.
5. Die Zellen wurden unter den üblichen Bedingungen (35°, 5% CO<sub>2</sub>) im Brutschrank gehalten.

#### **2.1.2. Intrazelluläre Chlamydien-Färbung von Zellen für FACS Analysen**

Um in FACS-Analysen infizierte Zellen von nicht infizierten unterscheiden zu können mussten die intrazellulär liegenden Chlamydien angefärbt werden. Wir modifizierten hierzu eine Anleitung für intrazelluläre Färbung von Interleukinen. Die Zellen werden gewaschen und mit Paraformaldehyd fixiert. Die Zellwand wird durch Saponin porös gemacht, so dass intrazelluläre Interleukine bzw. Chlamydien durch Zugabe eines Antikörpers gefärbt werden können.

Die Schritte des Färbeverfahrens sahen im Einzelnen folgendermaßen aus:

1. Die Zellen werden in PBS ohne FCS, BSA, Ca oder Mg (PBS<sub>0</sub>) gewaschen und anschließend in PBS o. aufgenommen (ca.  $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  Zellen/ ml). (Adhärente Zellen werden vorher mittels Trypsin abgelöst und in PBS suspendiert.)
2. 4% Formaldehyd wird im Verhältnis 1:1 dazugegeben (Endkonzentration 2%) und die Zellen so 10-20 min. bei Raumtemperatur fixiert.
3. Anschließend werden die Zellen wieder in PBS<sub>0</sub> gewaschen und in PBS plus BSA 5%, plus acid 0.05% (PBS BSA acid) auf ca.  $5 \times 10^6$  Zellen / ml resuspendiert.
4. Die Suspension wird in Portionen von 100-150µl der Suspension in Eppendorftubes oder auf eine 96 V-Lochplatte verteilt und bei 2000 rpm Zellen abzentrifugiert.
5. Der Überstand wird durch vorsichtiges Ausklopfen verworfen und die Zellen in 50µl Färbelösung (PBS BSA acid, plus 0.5% Saponin, plus 5% FITC markierter Chlamydien-Antikörper ohne Evansblau) resuspendiert.
6. Nach 30 min. Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit werden die Zellen wieder bei 2000 rpm abzentrifugiert
7. und anschließend in 50 µl PBS BSA acid plus 0.5% Saponin resuspendiert um ungebundene Antikörper 20 min. bei Raumtemperatur in Dunkelheit aus den Zellen diffundieren zu lassen.
8. Die Zellen werden wieder abzentrifugiert und für die Messung am FACS in 300µl PBS BSA acid aufgenommen und in FACS-Röhrchen gefüllt.
9. Messung am FACS
10. Die Ergebnisse der FACS-Messung werden durch mikroskopische Präparate (siehe 1.3. Färbungen der Chlamydienpräparate) auf Plausibilität überprüft

### **2.1.3. Isolation von Monozyten aus peripherem Blut**

1. In ein 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 12 ml Histopaque®-1119 gegeben und mit Histopaque®-1077 überschichtet.
2. Auf den oberen Gradienten wurden 24 ml Vollblut geschichtet.
3. Das Röhrchen wird 30 Minuten mit 700g bei Raumtemperatur zentrifugiert.
4. Das Zentrifugenröhrchen enthielt 6 Schichten: ein unterstes Pellet mit roten Blutkörperchen (C), darauf Hisopaque®-1119, darauf eine undurchsichtige Schicht mit Granulozyten (B), darauf Hisopaque®-1077, darauf eine undurchsichtige Schicht mit mononukleären Zellen und Thrombozyten (A), darüber als letzte Schicht das durchsichtige Plasma.
5. Das Plasma bis einschließlich 0,5 cm der anschließenden Schicht (A) wurde abpipettiert und verworfen.
6. Schicht A mit Monozyten wurde abpipettiert und in Röhrchen geben. (Analog können im nächsten Schritt die Granulozyten gewonnen werden).
7. Die Zellen wurden 2x in PBS gewaschen, gezählt und in Medium resuspendiert.
8. Nach einer Stunde wurde das Medium mit den „schwimmenden“ Thrombozyten von den mittlerweile adhärierenden Monozyten entfernt und durch frisches Medium ersetzt.

## **2.2. Expression von Oberflächenrezeptoren auf Monozyten**

Für diese Versuche wurden die humanen monozytären Zelllinien MM6 und THP-1 verwendet. Die Zellen wurden, wie unter „1. Infektion von Monozyten“ beschrieben, mit unterschiedlichen Chlamydienstämmen und Infektionsdosen

infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Oberflächenmarker einzeln und gleichzeitig mit Chlamydien gefärbt und mittels FACS analysiert.

### 2.2.1. Oberflächenfärbung für FACS

Die zuverlässigsten Ergebnisse für Oberflächenfärbungen erreicht man, wenn man die Zellen „lebendig“ färbt und anschließend erst fixiert. Bei sämtlichen von uns verwendeten PE- und FITC- markierten Antikörpern ergaben sich weitgehend identische Werte bei Färbung nach dem Fixieren (Daten nicht gezeigt).

Oberflächenfärbungen mit FITC- und PE- markierten AK wurden also nach dem gleichen Schema wie die Chlamydienfärbung durchgeführt, mit dem Unterschied, dass kein Saponin benötigt wurde und eine AK-Konzentration von 2% ausreichte.

Das Färben fixierter Zellen mit biotinmarkierten Antikörpern war nicht möglich, da Streptavidin alleine fixierte Zellen schon deutlich anfärbte (Daten nicht gezeigt). Für Färbungen mit biotinmarkierten AK wurden also frische Zellen in FCS-freiem PBS gewaschen und 20 min mit 2% AK gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen 20 min mit Streptavidin inkubiert. (Streptavidin bindet sich an Biotin. Es lässt sich wie PE zu roter Fluoreszenz anregen.) Nach der Entfernung von ungebundenem Farbstoff durch Waschen in PBS wurden die Zellen wie oben beschrieben in Paraformaldehyd fixiert.

### 2.2.2. Kombination der Chlamydienfärbung mit Oberflächenfärbungen

Doppelfärbungen waren nötig, um in FACS-Analysen abgrenzen zu können, ob ein Oberflächenmarker innerhalb der infizierten Charge eher auf der erfolgreich infizierten, d.h. chlamydienhaltigen Population, oder auf der chlamydienfreien Teilpopulation hoch oder herunter reguliert wird.

Doppelfärbungen mittels PE-markierten AK und FITC-markierten Chlamydien-Antikörper wurden durch gleichzeitige Zugabe in dem oben beschriebenen Chlamydien Färbeverfahren durchgeführt.

Für Doppelfärbungen mit biotinmarkierten AK wurde erst die Oberfläche der nicht fixierten Zelle wie beschrieben gefärbt und die klassische Chlamydienfärbung angeschlossen.

## 2.3. Einfluss von *C. pneumoniae* auf Apoptoseverhalten

### 2.3.1. Auslösung der Apoptose durch Apoptosegifte

Für die Auslösung der Apoptose wurden Zellen 6 Stunden mit Apoptosegiften im Brutschrank inkubiert. Es wurden die Konzentrationen verwendet bei welcher in den mikroskopischen Bestimmungen 50% der Zellen fragmentierte Kerne aufwiesen. Die entsprechenden Werte [ $\mu$ l Stocklösung/ml Medium] sind aus Abbildung 4 ersichtlich. Die Stocklösungen enthielten 20  $\mu$ M Staurosporin pro ml und 40 $\mu$ M Etoposid pro ml.

|              | MM6   | THP-1 | Hep-2  | HeLa  | NCI     |
|--------------|-------|-------|--------|-------|---------|
| Staurosporin | 12-25 | 12    | 50-100 | 25-50 | 100-200 |
| Etoposid     | 25-50 | 12-25 | >100   | >100  | >100    |

Abbildung 4: Apoptosegiftmengen ( $\mu$ l Stocklösung) für 50% Apoptoserate

In den späteren FACS-Analysen wurden allgemein niedrigere Apoptoseraten als durch die mikroskopische Auszählung gemessen.

### **2.3.2. Beurteilung der Apoptose mittels mikroskopischer Präparate**

Apoptose wurden mikroskopisch nach Anfärben der Zellkerne mit DNA Farbstoffen (Acridiniumiodid, DAPI) durch Beurteilung der Kernmorphologie untersucht.

Um den Einfluss von Chlamydien auf die Apoptose zu bestimmen, wurden Zellkern und Chlamydie innerhalb der Zelle gleichzeitig mit verschiedenen Farbstoffen dargestellt. Die Chlamydien wurden hierfür zunächst gründlich nach Protokoll mit dem Chlamydienfarbstoff ohne Evansblau gefärbt, um sie anschließend nur eine Sekunde durch den 1:60 verdünnten PI-Farbstoff zu ziehen und gleich darauf in PBS zu waschen. Mittels des digitalen Fluoreszenzmikroskops, ließ sich schwache Färbung der Chlamydien-DNA mit PI unsichtbar machen (siehe Bild 1,2). Eine weitere Möglichkeit bestand darin, die Chlamydien mit einem PE-markierten AK und die Kerne mit DAPI anzufärben und die Bilder am digitalen Fluoreszenzmikroskops übereinander zu legen bzw. gleichzeitig in beiden entsprechenden Wellenlängen anzuregen.

### **2.3.3. Beurteilung der Apoptose mittels FACS**

Prinzip: Propidiumjodid interkaliert in die DNS-Stränge und emittiert nach Anregung Licht, welches bei einer Wellenlänge von 480 nm gemessen werden kann. Durch Auftragen der Fluoreszenzintensität gegen die Spitzenfluoreszenz können die Einzelzellen von zusammenhängenden Zellen abgegrenzt, und für die Apoptosebestimmung ausgewählt werden. Trägt man die Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität auf, finden sich links von den Peaks der diploiden und den tetraploiden Zellen und den dazwischen liegenden Zellen in der Synthese-Phase die apoptotischen Zellen mit vermindertem DNS-Gehalt. Die Apoptoserate lässt sich am Besten in logarithmischer Auftragung beurteilen. Eine genauere Zellzyklusanalyse ist in linearer Darstellung möglich (siehe Abb. 40).

Die einfache Propidiumjodidfärbungen wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Die Zellen wurden wie für die Chlamydienfärbung in PBS gewaschen, fixiert und mit Saponin permeabilisiert.
2. Es werden 100µl RNase (1 mg/ml) pro ml zugegeben und ca. 10 min inkubiert.
3. Anschließend werden 100µl Propidiumjodid (0,4 mg/ml) pro ml zugegeben und ca. 10 min inkubiert.
4. FACS-Analyse ist anschließend ohne weitere Waschschrte möglich.

Für Doppelfärbungen zur Beurteilung der Apoptose am FACS wurden die Chlamydien nach Protokoll gefärbt, anschließend PI und RNase hinzu gegeben und nach 20 min Inkubationszeit in PBS gewaschen. Durch diese Methode ließ sich klar unterscheiden ob eher infizierte oder nicht infizierte Zellen apoptotisch werden. Sie ermöglichte allerdings keine 100%ig genaue Messung der Apoptoserate, da die Doppelfärbung bei infizierten Zellen teilweise leicht höhere Apoptoseraten ergab, als die Einzelfärbung mit PI (siehe Abb. 40).

### **2.3.4. Darstellung der DNS-Fragmente auf einem Agarosegel**

Die mikroskopisch und per FACS (wie unter 2.5 und 2.6 beschrieben) gemessene Apoptose wurde durch Darstellung der DNS Fragmentierung bestätigt. Prinzip: Die DNS wird nach Lyse der Zellen extrahiert. Die DNS wird in einem Agarosegel aufgetrennt. Die großen intakten DNS-Stränge bleiben in der Geltasche, die fragmentierte DNS wandert im Gel. Die DNS von ca. 2 Millionen Zellen wurde wie für die PCR aufbereitet (siehe unter 6: Präparation von DNA). 15µl der extrahierten DNS wurden mit 5µl Laufpuffer in die Taschen eines 1,5 prozentigen Geles gegeben. Als Größenmarker wurde eine 100 Basenpaar- Leiter verwendet. Nach 30 min bei 120V wurde das Gel unter der UV-Lampe fotografiert (siehe Abb. 39).



## 2.4. Messung der Adhäsion von Monozyten

Die Adhäsion von Monozyten wurde in 96-Well-Platten an HUVEC-Monolayern (humane, aus der Nabelschnur isolierte Monozyten) und an immobilisierten Proteinen der extrazellulären Matrix (Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin) bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die nicht adhärenen Monozyten durch schonendes Waschen entfernt. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte durch mikroskopisches Auszählen.

Die Werte wurden überprüft durch Markierung der Monozyten mit Fluoreszenz-Farbstoffen (BCECF/AM) und Auswertung mittels FlouroCount, Microplate Fluorometer.

## 2.5. Bestimmung von NF- $\kappa$ -B mittels Gelretardierungsassay

### 2.4.1. Isolierung nukleärer und zytosolischer Extrakte

THP-1-Zellen bzw. MM6 (je 3 Mio.) wurden abzentrifugiert (200g, 7 min.) und einmal in PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden resuspendiert in Puffer A (0,1 Nonident p-40; 10 mM Hepes; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 ml DTT; 300 mM Saccharose; je  $\mu$ g/ml Pepstatin, Antipain; Chymostatin; Aprotinin; 0,1  $\mu$ g/ml Leupeptidin; 0,5 mM PMSF) und darin 5 min inkubiert um die Zellmembranen aufzubrechen. Nach dem anschließenden Zentrifugationsschritt (15.800g, 10 sec.) wurde der Überstand mit der zytosolischen Fraktion von den noch intakten Zellkernen abgenommen und bei  $-80^{\circ}$  gelagert. Um eine Kontamination der nukleären Extrakte durch zytosolische Proteine zu vermeiden, wurden die Kerne einmal in Puffer A gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden daraufhin in Puffer B (20 mM Hepes, pH 7,9; 100 mM KCl; 100 mM NaCl; 20% Glycerin; 0,5 mM DTT; Protease-Inhibitoren wie in Puffer A) aufgenommen und die Kernmembranen mit Hilfe eines Ultraschallintegrators zerstört. Durch Zentrifugation (15.800g, 10 sec) ließen sich die Membranfragmente abtrennen. Die nukleären Proteine wurden ebenfalls bei  $-80^{\circ}$ C aufbewahrt.

### 2.4.2. Gelretardierungsassay

Die Anwesenheit des DNS-bindenden Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ -B wurde mittels Gelretardierungsassay unter Verwendung doppelsträngiger Oligonukleotide mit Erkennungssequenzen nachgewiesen. Als NF- $\kappa$ -B-Konsensussequenz diente ein Oligonukleotid mit dem prototypischen I $\kappa$ B-Motiv (5'-CAGAGGGACTTTCCGAGA-3'). Dieses Oligonukleotid wurde in Anwesenheit der erforderlichen Nukleotide durch das Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I (Boehringer Mannheim) mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]( $> 3000$  Ci/mol)(NEN, Brüssel) markiert. Als Kontrollen wurden Oligonukleotide mit Erkennungssequenzen für den konstitutiv aktivierten Transkriptionsfaktor Sp-1 (5'-ATTCGATCGGGCGGGGGCGGGGCGAGC-3') verwendet, der mittels T4-Polynukleotidkinase (Böhringer Mannheim) mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP( $>5000$  Ci/mol)(NEN) markiert wurde. Nicht gebundene Nukleotide wurden über eine Sephadex G25-Säule (Böhringer Mannheim) abgetrennt. Gleiche Mengen an extrahierten nukleären Proteinen (2-5 $\mu$ g) wurden in Bindepuffer (20 mM Hepes, pH 7,9; 50 mM KCl; 1 mg/ml BSA; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1% Nonident P40; Glycerin; 50 ng Poly[d(I-C)]/ $\mu$ l (Böhringer Mannheim)) aufgenommen und 30 min mit der radioaktiv markierten DNA-Probe (10 ng, 100000 cpm) inkubiert. Nach Zugabe eines Laufpuffers (0,25xTBE-Puffer; 40% Glycerin; 0,2% Bromphenolblau) erfolgte die Auftrennung der Proteine in einem 6%igen Polyacrylamidgel in 0,25 TBE-Puffer. Als positive Kontrollen dienten routinemäßig Extrakte von LPS-stimulierten (1 $\mu$ g/ml) THP-1 Zellen. Qualität und gleichmäßige Proteinkonzentration der untersuchten nukleären Extrakte wurden parallel durch Inkubation mit dem Sp-1-Oligonukleotid überprüft. Die quantitative Auswertung der getrockneten Gele erfolgte mittels Autoradiographie (DuPont, Bad Homburg) und Densitometrie (MWG-Biotech, Ebersberg).

# V. Ergebnisse

## 1. Optimierung des Anzuchtverfahrens

### 1.1. Einfluss der Infektionsdosis auf Infektionsrate

Eine Chlamydien suspension wurde in 6-Lochplatten auf einem Hep-2 Zellrasen geometrisch verdünnt. Die 6-Lochplatten wurden dem Standard-Infektionsverfahren unterzogen. Nach 48 Stunden wurden Zellkulturpräparate durch Immunfluoreszenz gefärbt und die Zahl der Einschlusskörper pro mikroskopischem Gesichtsfeld bestimmt.

Die Zahl der Einschlusskörper stieg im Bereich niedriger Konzentrationen direkt proportional mit der Infektionsdosis (Abb. 5). Ab Konzentrationen von ca. 0.75 ifu/ Zelle verlangsamte sich der Anstieg. Eine Erhöhung der Dosis über 1,5 ifu pro Zelle brachte keine weitere Steigerung der Einschlusskörperzahlen, sondern führte im Gegenteil bei Infektionsdosen über 3 IFU pro Zelle u.a. durch Schädigung des Zellrasens zu einem Abfall der Einschlusskörper pro Gesichtsfeld. Auf der HeLa Zelle und der NCI-Zelle zeigte sich eine ähnliche Kurve. Bei der NCI-Zelle war das Plateau allerdings deutlicher ausgeprägt, es kam erst bei doppelt so hohen Konzentrationen wie auf der Hep-2-Zelle zu einem Abfall der Infektionsrate (Daten nicht gezeigt).

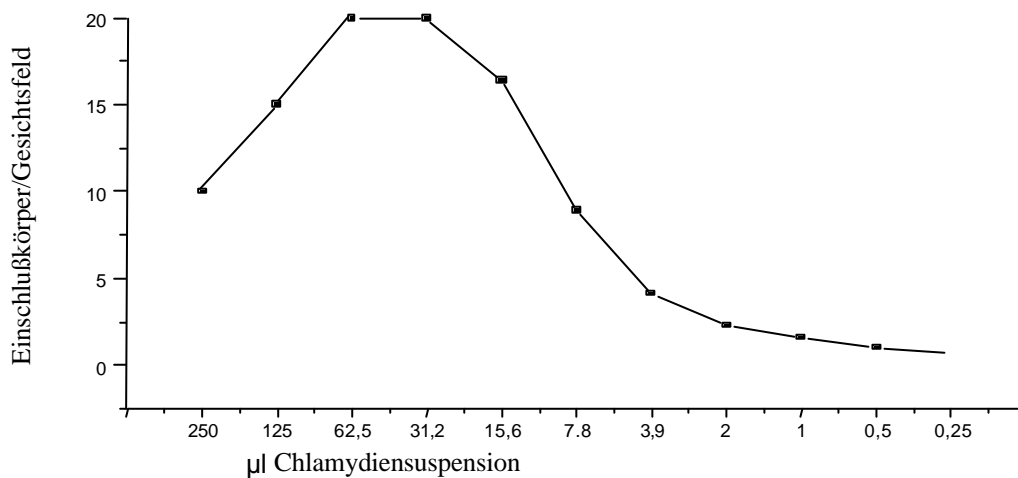


Abb. 5 Beispiel für eine Verdünnungsreihe aufgereinigter Chlamydien auf Hep-2 Zellen.

Dargestellt sind Durchschnittswerte der Einschlusskörper (EK) eines Gesichtsfeldes im Mikroskop gegen eingesetzte Chlamydien suspension pro Napf eines 6 Wells. (Ein Gesichtsfeld enthielt ca. 20 Zellen) Es zeigt sich mit steigender Konzentration zunächst ein linearer Anstieg der Anzahl der Einschlusskörper. Bei Erhöhung der Konzentrationen auf über 31µl kommt es zu einem Abfall der Einschlusskörperzahlen. Die Zahl konnte hier teilweise nicht mehr ganz exakt ermittelt werden, da es zu einer Schädigung des Zellrasens kam.

### 1.2. Vergleich des Chlamydienwachstums in den Zelllinien HeLa, Hep-2 und NCI

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die Zelllinien zwar in ihrem jeweiligen Optimalmedium etwa doppelt so schnell wuchsen wie in dem anderen Universalmedium, dass aber in beiden Medien eine Infektion der Zellen mit *C. pneumoniae* möglich ist. Um zu überprüfen, in welchen Medien sich jeweils die beste Chlamydienausbeute erreichen lässt, wurden die unterschiedlichen Zelllinien in 6-Lochplatten mit je drei Chlamydien-Konzentrationen in MEM- oder RPMI-Infektionsmedien infiziert. Nach 48 Stunden wurden die Kulturträgerchen gefärbt, und die Anzahl der Einschlusskörper (EK) in 4-7 Gesichtsfeldern ausgezählt.

In allen Zellen bildeten sich in beiden verwendeten Medien typische Einschlusskörperchen, in den jeweiligen Optimalmedien wuchsen die Chlamydien allerdings deutlich besser (Abb. 6). Bei allen Zellsorten lag die Anzahl der Einschlusskörper im Optimalmedium in etwa doppelt so hoch wie im jeweils anderen „Universalmedium“. Die NCI-Zelle brachte mit der Hep-Zelle gleichwertige bis leicht bessere Anzuchtergebnisse. Die HeLa-Zelle lag in ihrer Produktivität unter optimalen Bedingungen ca. 20 % unter der Hep-Zelle (Abb. 6).

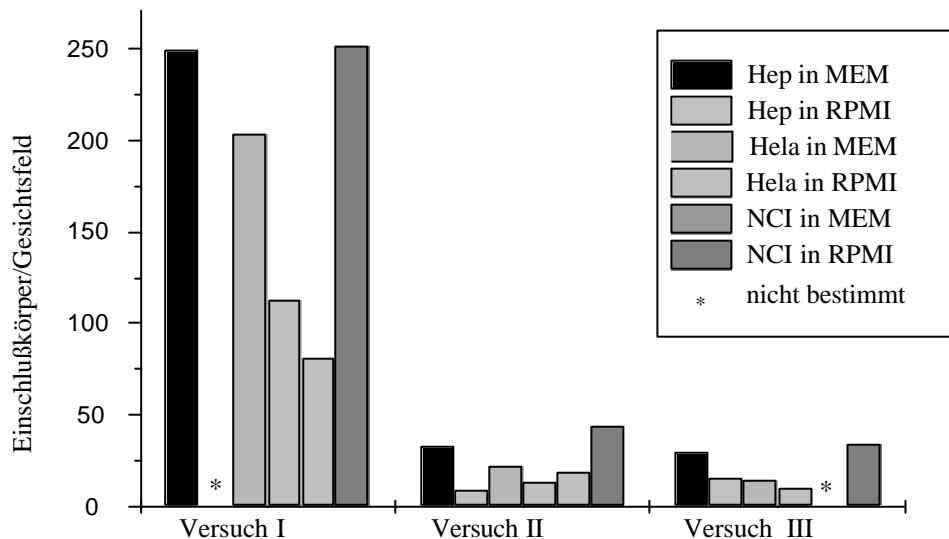


Abb. 6 Chlamydienausbeute in unterschiedlichen Zellen und Medien 48 Stunden nach Infektion  
 Dargestellt sind die Zahlen der Einschlusskörper die sich 48 Stunden nach Infektion in den verschiedenen Zellen in drei repräsentativen Versuchen mit verschiedenen Infektionsdosen gebildet haben. Die eindeutig besten Ergebnisse erbrachten die Hep-Zelle in MEM Medium und die NCI-Zelle in RPMI-Medium. Die HeLa Zelle schnitt in allen vergleichbaren Ansätzen deutlich schlechter ab als Hep- und NCI-Zelle.

### 1.3. Zentrifugation

#### 1.3.1. Zentrifugationsdauer

Der Einfluss der Zentrifugationsdauer auf Chlamydienwachstum wurde an Hep-2-Zellen untersucht. Sechs Zwölf-Loch-Platten wurden gleichzeitig mit einer mittleren Infektionsdosis (moi ca. 0,5) infiziert und anschließend zwischen 0 und 120 Minuten unter Standardbedingungen (36°C, 3500 U) zentrifugiert. Nach 48 Stunden wurden pro Ansatz je zwei Kulturträgerchen aus verschiedenen Näpfen gefärbt und je 4-6 Gesichtsfelder ausgezählt.

Abb. 7 zeigt eine typische Auswertung. Ohne Zentrifugation war keine Infektion nachweisbar. Schon nach 10 min Zentrifugation wurden erste Zellen infiziert. Die Zahl der erfolgreich infizierten Zellen stieg in einer sigmoiden Kurve mit der Zentrifugationsdauer. Eine Verdoppelung der Zentrifugationszeit von 10 auf 20 min hatte eine Vervierfachung der Einschlusskörper (EK) zur Folge. Ab einer Zentrifugationsdauer von 80 min war eine weitere Verlängerung der Zentrifugationszeit mit keinem deutlichen Anstieg mehr verbunden (Abb. 7).

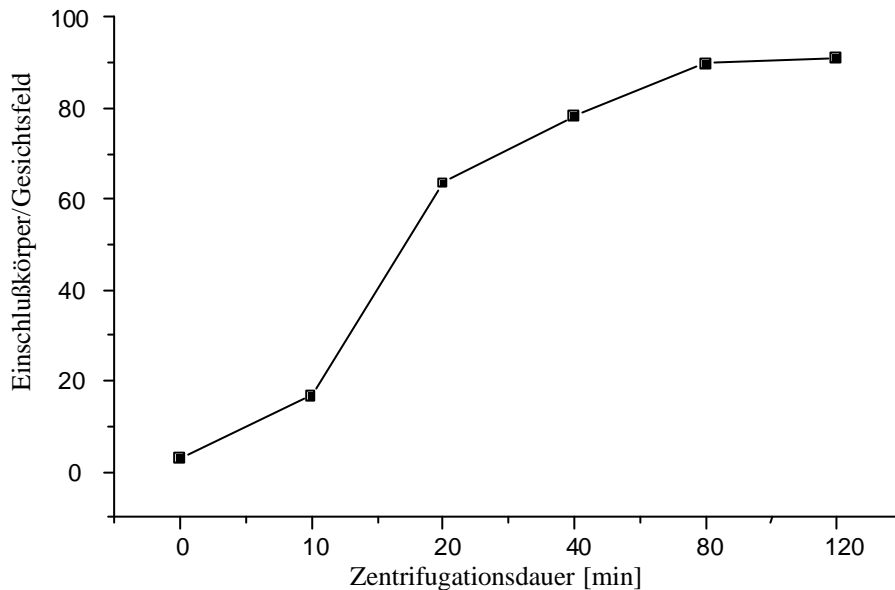


Abb. 7 Einfluss der Zentrifugationsdauer auf Infektionsrate  
 Konfluente Hep-2-Zellrasen wurden in 6Wells infiziert und unterschiedlich lang unter Standardbedingungen (35°, 3500 U) zentrifugiert. Dargestellt ist die Zahl der EK, die 48 Stunden später pro Gesichtsfeld nachweisbar waren. Ohne Zentrifugation kommt es zu einer kaum messbaren Infektion. Schon 20 min Zentrifugation bewirken eine deutliche Infektion, die sich durch Verlängerung der Zentrifugationsdauer bis 80 min noch um etwa 30% steigern lässt.

### 1.3.2. Zentrifugationstemperatur

Um zu überprüfen, ob ein Vorwärmen der Zentrifuge notwendig ist, wurden infizierte Hep-2-Zellrasen in 6-Wells bei Raumtemperatur bzw. in einer auf 35° vorgewärmten Zentrifuge je 30 und 60 min bei 3500 U/min zentrifugiert. Die Auswertung erfolgte wie üblich nach 48 Stunden durch Auszählen der EK pro Gesichtsfeld.

Wie Abb.8 zeigt ergab die Zentrifugation in der vorgewärmten Zentrifuge geringgradig höhere Infektionsraten als Zentrifugation bei Raumtemperatur, wobei dieser Effekt bei kurzen Zentrifugationszeiten ausgeprägter war.

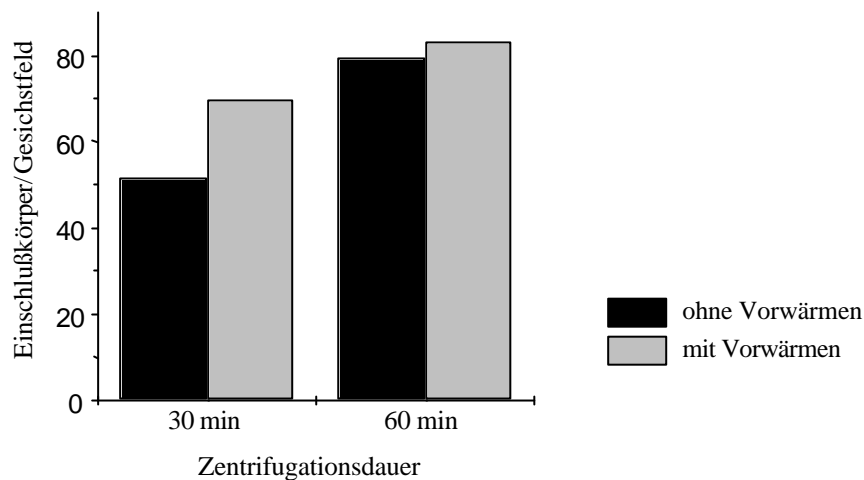


Abb. 8 Einfluss der Zentrifugationstemperatur auf Chlamydieninfektion

Infizierte 6Wells wurden bei Raumtemperatur bzw. in die auf 35° vorgewärmte Zentrifuge gestellt und 30 bzw. 60 min bei 3500 U/min zentrifugiert. Ein Vorwärmen der Zentrifuge ermöglicht besonders bei kürzerer Zentrifugationszeiten eine geringgradig höhere Infektionsrate.

#### 1.4. Erntezeitpunkt

Um zu überprüfen zu welchem Zeitpunkt nach Infektion sich die größte Menge an infektiösen Chlamydien gewinnen lässt, wurden 6-Wells mit konfluenten NCI- und Hep-Zellen mit je 3 in einer geometrischen Verdünnungsreihe hergestellten Chlamydiendosen infiziert. Da es in diesem Fall nicht um Infektionsrate sondern um die Gesamtmenge der sich bildenden infektiösen Elementarkörper ging wurden nach 24, 48, 72, 96, 120 und 148 Stunden die Infektion gestoppt, die Zellen abgeschabt und tief gefroren. Je 200µl der wieder aufgetauten Zellsuspensionen wurden anschließend wie üblich aufgeschlossen und in einen weiteren Infektionszyklus eingesetzt. Nach 48 Stunden wurden die Infektionsraten der Zweit-Zyklen durch Auszählen der EK in je 3-10 Gesichtsfeldern ermittelt.

Es zeigte sich, dass der optimale Erntezeitpunkt bei NCI- wie bei der Hep-Zelle bei 72 Stunden lag (Abb. 9; 10). Nach 48 Stunden waren auf der Hep-Zelle nur minimale Mengen an Chlamydien herangereift. (Abb. 9: Ernte 48). 96 Stunden nach Infektion war bereits ein leichter Abfall der Infektiosität der Ernte im Vergleich zu 72 Stunden zu erkennen (Abb. 9: Ernte 96 im Vergleich mit Ernte 72). Nach weiterer Verlängerung der Anzuchtdauer kam es zu einem deutlichen Rückgang der infektiösen Chlamydien. Dieser Rückgang war bei höheren Infektionsdosen besonders ausgeprägt. Der Verlauf auf der NCI-Zelle war ähnlich, allerdings zeitlich leicht nach hinten versetzt (Abb. 10). 48 Stunden nach Infektion waren praktisch noch keine infektiösen Elementarkörperchen herangereift, nach 96 Stunden war noch kein wesentlicher Abfall an infektiösen Elementarkörperchen zu erkennen. Wie schon in den voraus gehenden Versuchen lag die Produktivität der NCI Zelle ca. 10% über der Hep-2 Zelle (vergleiche Abb. 9, 10: Ernte 72).

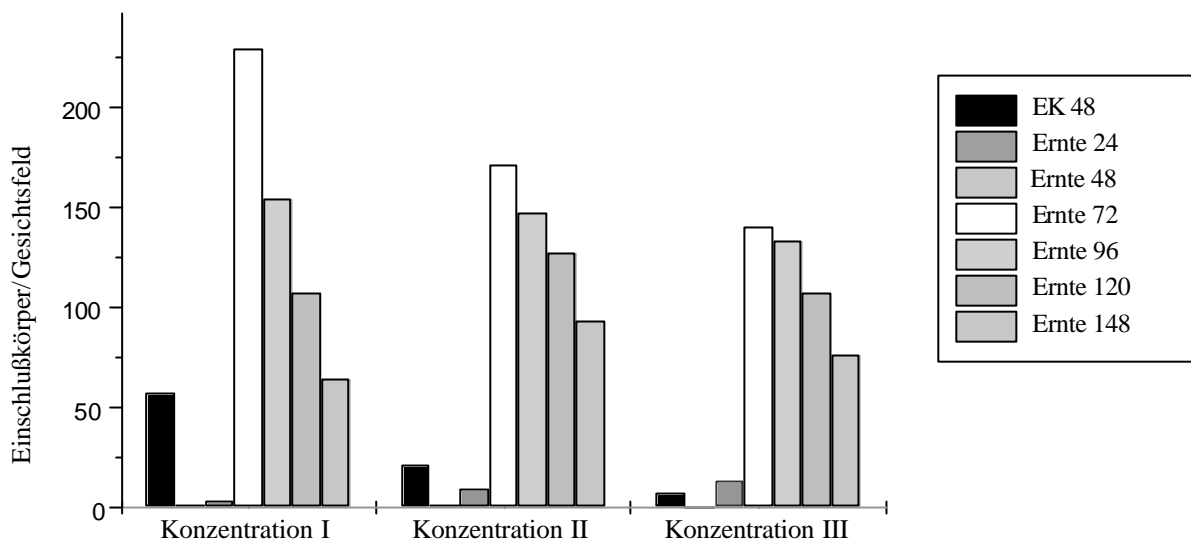


Abb. 9 Erntezeitpunkt auf der Hep-2- Zelle

Hep-2-Zellen wurden mit je drei unterschiedlichen Chlamydiendosen infiziert. Nach 48 Stunden wurden die Einschlusskörperchen ausgezählt (EK 48). Je 200 µl der Ernte nach 24, 48, 72, 96, 120 und 148 Stunden wurden in einen weiteren Infektionszyklus eingesetzt und wiederum nach 48 Stunden die Infektionsrate bestimmt.

Bis zu 48 Stunden nach Infektion fanden sich nur minimale Mengen an infektiösen Chlamydien. Die maximale Menge an infektiösen Chlamydien ließ 72 Stunden nach Infektion gewinnen. Innerhalb der nächsten Tage fiel die Zahl der infektiösen Elementarkörper in der Erntesuspension langsam ab.

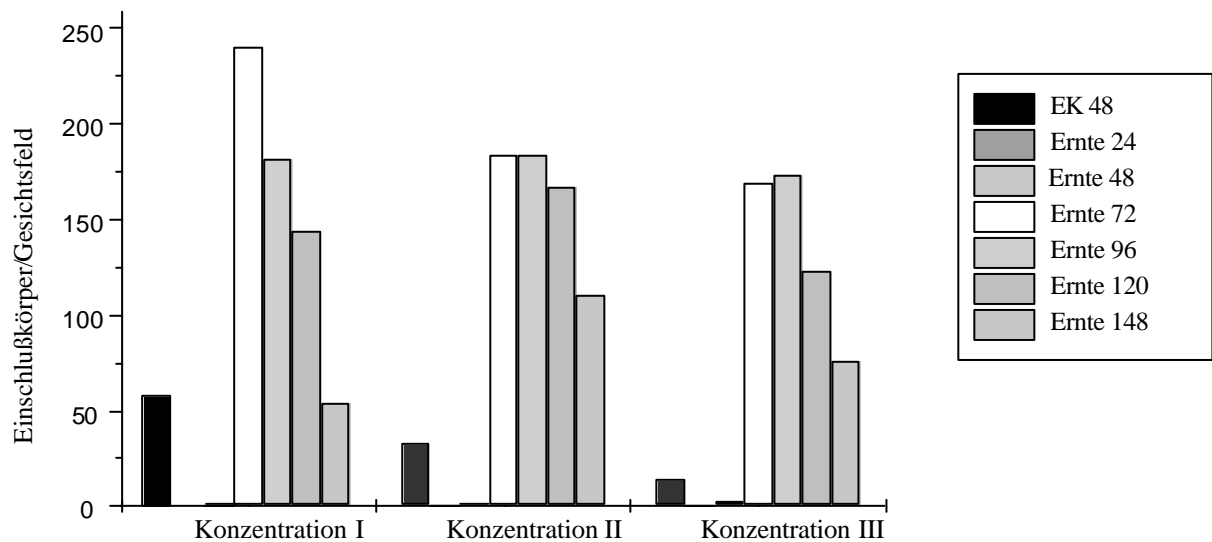


Abb. 10 Erntezeitpunkt auf der NCI-Zelle

Die Infektion der NCI-Zellen wurde nach dem gleichen Verfahren wie auf den Hep-2-Zellen durchgeführt und ausgewertet (siehe Abb. 9). Es zeigt sich der gleiche Trend wie auf der Hep2-Zelle. Die Infektiosität der Ernte 48 Stunden nach Infektion war noch niedriger als auf der Hep-Zelle und das 72 Stundenmaximum ist weniger ausgeprägt. Insgesamt liegen die Infektionsraten auf der NCI-Zelle leicht über der Hep-Zelle.

## 1.5. Monolayer vom Vortag versus frisch trypsinierte Zellsuspension

Da für *C. trachomatis* Berichte vorlagen, dass sich in Zellsuspensionen höhere Anzuchtergebnisse erzielen lassen als auf Monolayern und diese Methode zudem eine Arbeitserleichterung und Zeitersparnis mit sich bringt, sollte untersucht werden, ob sich mit Zellsuspensionen ähnlich gute Anzuchtergebnisse wie mit adhärennten Monolayern erzielen lassen. Für die Herstellung der Zellsuspensionen wurden Hep-Zellen abtrypsiniert und in PBS gewaschen. Die Zellen wurden in verschiedenen Dichten auf 6-Well-Näpfe und Bluecaps verteilt. In diesen Gefäßen wurden sie mit je drei Chlamydien-Konzentrationen (100 µl ATCC1360; grob gereinigt) infiziert. Um die Chlamydien mit der Zelloberfläche in Kontakt zu bringen wurden die verschiedenen Ansätze eine Stunde unterschiedlichen in Tabelle 1 genauer beschriebenen Behandlungen wie Zentrifugieren (3400U), Schütteln (auf dem Schüttler Stufe 3) und Rütteln (Vortexer Stufe 2) unterzogen. Alle Ansätze wurden anschließend in 2 ml Infektionsmedium suspendiert und in 6-Well-Näpfen mit Kulturträgerchen 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Je nach Infektionsrate wurden pro Ansatz die Einschlusskörper in 4-10 Gesichtsfeldern ausgezählt.

Sämtliche getestete Suspensionsverfahren brachten deutlich schlechtere Infektionsraten als die Zentrifugationsmethode auf einen Monolayer (Tabelle 1). Nur bei Zentrifugation der nicht konzentrierten Suspension im 6-Well (Tabelle 1 Nr. 4 und 5) ließ sich überhaupt eine deutliche Infektion erreichen. Auch diese lag noch 50% unter der des Standardverfahrens (Tabelle 1 Nr. 1). Auch das Anzentrifugieren der Zellen bei 1000 U für 10 min brachte keine deutliche Verbesserung (Tabelle 1 Nr. 5). Alle anderen Verfahren bewirkten im Vergleich zur Standardmethode (Tabelle 1 Nr. 1) nur minimale Infektionsraten.

## 1.6. Dichte des Zellrasens

Um zu ermitteln ob die Zelldichte der Kulturzellen die Chlamydienausbeute beeinflusst, wurden von einer Hep-2-Zellsuspension (200 000/ml) je 1; 1,5; 2 und 3 ml pro Napf in 6Wells ausgesät. Die Zellrasen wurden nach 24 Stunden, nachdem sich bei der Kontrolle am Umkehrmikroskop bei 3 ml ein sehr dichter Rasen, bei 2 ml ein konfluenter Rasen, bei 1,5 ml ein subkonfluenter Rasen, bei 1 ml ein dünner Rasen mit Lücken gezeigt hatte, mit je drei verschiedenen Chlamydien-Konzentrationen infiziert. Die Zahl der sich pro Gesichtsfeld bildenden Einschlusskörper wurde nach 48 Stunden in je einem Ansatz bestimmt. Da hier wieder die Chlamydienausbeute relevant war, wurde nach 72 Stunden je ein weiterer Ansatz geerntet und je 200µl der Ernte in einen weiteren Infektionszyklus eingesetzt.

Die Zahl der Einschlusskörper pro Gesichtsfeld 48 Stunden nach Infektion unterschied sich nicht wesentlich zwischen den Ansätzen mit subkonfluentem und dichten Zellrasen (Abb. 11), wobei die Einschlüsse in den dichteren Rasen allerdings etwas kleiner waren als in dem subkonfluenten Rasen. In dem sehr dünnen Zellrasen war die Zahl der EK pro Gesichtsfeld durch die großen Lücken im Zellrasen geringer (Abb. 11). Obwohl die Zahl der Einschlusskörper in dem subkonfluenten Rasen gleich groß wie in dem gerade konfluenten Rasen gewesen war, ließen sich mit der Ernte des subkonfluenten Rasens ca. 5% mehr Zellen infizieren (Abb. 12). Durchgehend die schlechtesten Ergebnisse zeigten sich auf dem sehr dünnen Rasen (Abb. 11 und 12 schwarze Balken).

| Infektionsverfahren:   | Zahl der EK/Gesichtsfeld nach 48 h |                  |                   |
|--|------------------------------------|------------------|-------------------|
|  | Konzentration I                    | Konzentration II | Konzentration III |
| 1.) Standard   | 166.6                              | 60.3             | 17.5              |
| 2.) 2 ml Suspension im 6W nicht zentrifugiert                | 5                                  | 3                | 0.6               |
| 3.) 0,4 ml konzentrierte Suspension im 6W nicht zentr.       | 2.3                                | nd               | 0                 |
| 4.) 2 ml Suspension im 6W zentrifugiert                      | 63.25                              | 22               | nd                |
| 5.) 2 ml Suspension im 6W anzentrifugiert und zentrifugiert  | 66.5                               | nd               | 11                |
| 6.) 0,4 ml konzentrierte Suspension im 6W zentrifugiert      | nd                                 | 7.25             | nd                |
| 7.) 2 ml Suspension im 6W geschüttelt                        | 6.6                                | 1.2              | 0.3               |
| 8.) 0,4 ml konzentrierte Suspension im 6W geschüttelt        | 5.2                                | 2.75             | 0.83              |
| 9.) 2 ml Suspension im Bluecap nicht zentrifugiert           | 2.6                                | 0.8              | 0.5               |
| 10.) 0,4 ml konzentrierte Suspension im Bluecap nicht zentr. | 3.2                                | 1.3              | 0.6               |
| 11.) 2 ml Suspension im Bluecap zentrifugiert                | 16.6                               | 8.2              | nd                |
| 12.) 0,4 ml konzentrierte Suspension im Bluecap zentr.       | 12.2                               | 6.6              | 1.4               |
| 13.) 2 ml Suspension im Bluecap geschüttelt                  | 1.6                                | 0.5              | 0                 |
| 14.) 0,4 ml konzentrierte Suspension im Bluecap geschüttelt  | 7.25                               | 3.2              | 1                 |
| 15.) 2 ml Suspension im Bluecap gerüttelt                    | nd                                 | 1.8              | 0.3               |
| 16.) 0,4 ml konzentrierte Suspension im Bluecap gerüttelt    | nd                                 | 5.2              | 1.6               |

Tabelle 1 Suspensionsmethoden versus Standardmethode; Mittelwerte der Einschlusskörper pro Gesichtsfeld

Das Standard Infektionsverfahren (Nr. 1) wurde mit verschiedensten Infektionsverfahren in Suspension verglichen. Die unterschiedlichen Behandlungen sollten den - im Standardverfahren durch Zentrifugation bewirkten- Kontakt zwischen Zelloberfläche und Chlamydie herstellen. Für die Zellsuspension wurden je 500 000 gewaschene Hep-Zellen in 2 ml bzw. 0.4 ml (konzentrierte Suspension Nr. 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16) mit je drei verschiedenen Chlamydien-Konzentrationen (I, II, III) infiziert. Ein Teil der Suspensionen wurde in 6-Well (Nr. 1-8) unterschiedlichen Behandlungen wie Zentrifugieren (Nr. 4, 5, 6) oder Schütteln (Nr. 7, 8) unterzogen. Die Suspension in Ansatz Nr. 5 wurde vor Infektion 10 min bei 1000 U anzentrifugiert. Weitere Suspensionen wurden ähnlichen Prozeduren in Bluecaps ausgesetzt (Nr. 11 und 12 wurden zentrifugiert, Nr. 13 und 14 auf einem Schüttler sanft geschüttelt, Nr. 15 und 16 auf dem Vortexer bei Stufe 2 gerüttelt.). Nach einer Stunde Behandlung wurden alle Ansätze in 6-Wellnäpfe gegeben (soweit sie es noch nicht waren) und die konzentrierten Suspensionen auf 2 ml aufgefüllt. Nach 48 Stunden Kulturdauer bei 35°C wurden die Einschlusskörper auf je zwei Kulturträgern in je 4-10 Gesichtsfeldern ausgezählt.

Das einzige Suspensionsverfahren mit dem sich eine deutliche Infektion erreichen ließ, bestand in der Zentrifugation der nicht konzentrierten Suspension im 6-Well (Nr. 4 und 5). Auch diese Methode erbrachte aber weniger als halb so viel EK wie die Standardmethode des konfluenten Zellrasens. Alle anderen Methoden bleiben bei unter 10% des Standardverfahrens.



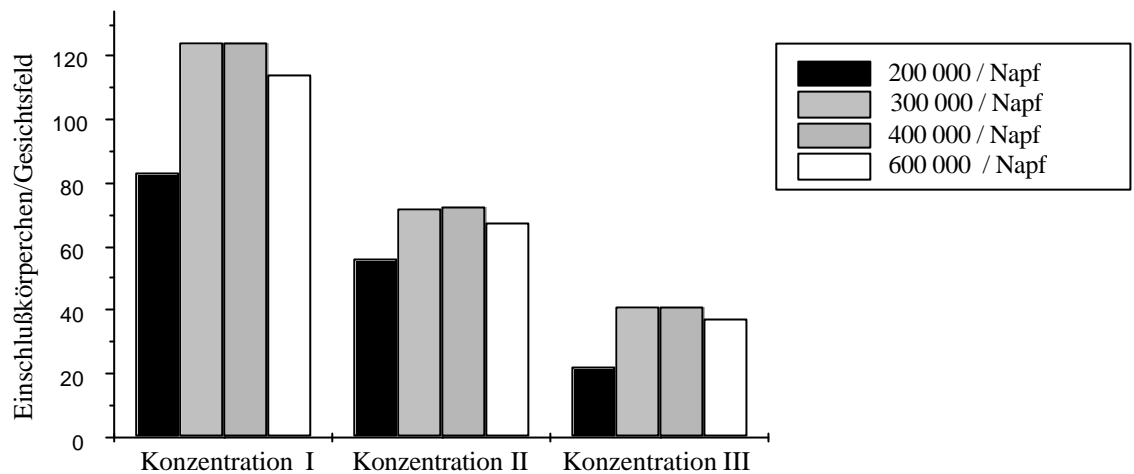


Abb. 11 Anzahl der Einschlusskörper in verschieden dichten Zellrasen bei verschiedenen Konzentrationen  
 In 6 Lochplatten wurden sehr dünne (200 000 Zellen/Napf) subkonfluente (300 000/Napf), konfluente (400 000/Napf) und sehr dichte (600 000/Napf) Hep-2-Zellrasen mit drei unterschiedlichen Chlamydien-Konzentrationen infiziert, und die Anzahl der EK/Gesichtsfeld nach 48 Stunden ermittelt. In dem subkonfluenten und in dem konfluenten Rasen fanden sich ca. 5% mehr EK als in dem sehr dichten und bis zu 40% mehr EK als in dem sehr dünnen Rasen.

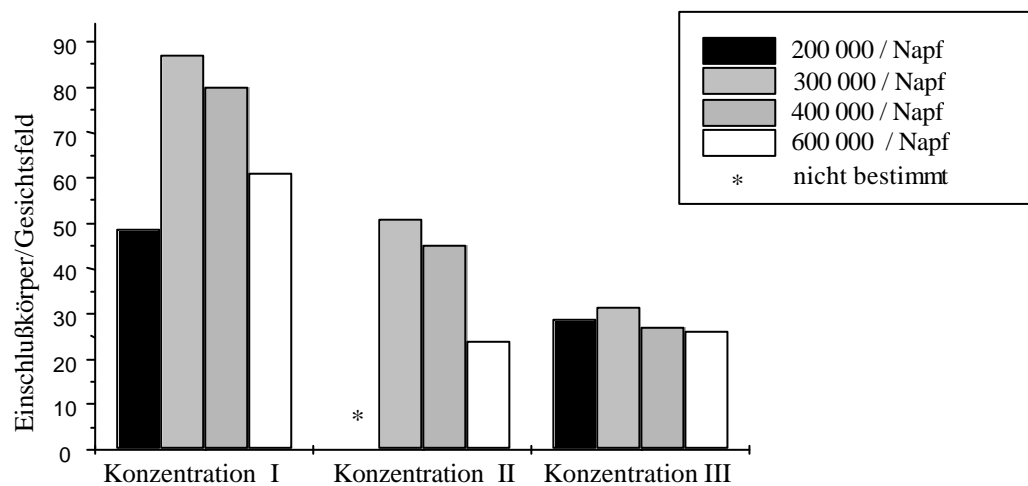


Abb. 12 Anzahl der Einschlusskörper aus 0.2 ml Ernte der verschieden dichten Zellrasen  
 Je 0,2 ml Ernte, der unter Abb.11 beschriebenen Ansätze mit den unterschiedlich dichten Zellrasen, wurde in einen weiteren Infektionszyklus eingesetzt. Nach 48 Stunden wurde wieder die Zahl der Einschlusskörper bestimmt. Aus der Ernte von dem subkonfluenten Rasen (300 000 Zellen/ Napf, hellgrauer Balken) bildeten sich ca. 5% mehr EK als aus dem konfluenten Zellrasen (400 000 Zellen/ Napf, gestreifter Balken). Die ausgeprägtesten Unterschiede zwischen den unterschiedlich dichten Zellrasen zeigten sich bei den höheren Infektionsdosen.

## 1.7. Dauer der Inkubation vor dem Zentrifugieren

Der Einfluss der Inkubationsdauer der Chlamydien auf dem Zellrasen vor Zentrifugation wurde geprüft, indem acht 6- Wells mit je drei Konzentrationen infiziert wurden und vor Infektion 0 bis 6 Stunden bei Raumtemperatur bzw. im Brutschrank gelagert wurden.

Die nach 48 Stunden ermittelten Infektionsraten waren erstaunlicherweise unabhängig von den Vorinkubationszeiten. Auch unterschiedliche Temperaturen während der Vorinkubationszeit beeinflussten das Ergebnis nicht (Abb.13).

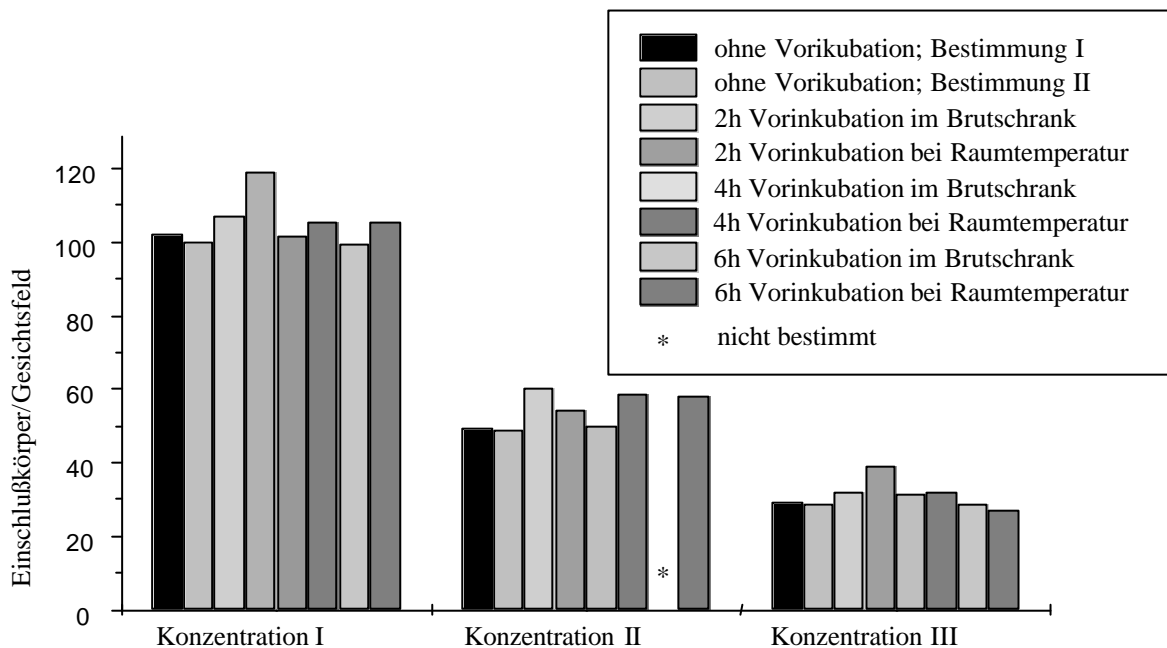


Abb. 13 Inkubation der Wells in Chlamydiensuspension vor Zentrifugieren

Acht 6Wells wurden in gleicher Weise mit je drei Chlamydien-Konzentrationen infiziert, je zwei Platten wurden sofort, bzw. nach 2, 4 und 6 Stunden zentrifugiert. Bis zum Zentrifugieren wurde eine Hälfte der Platten bei Raumtemperatur, die andere Hälfte im Brutschrank aufbewahrt. Es war kein deutlicher Unterschied in der Menge der EK nach 48 Std. zu erkennen.

## 1.8. Vorinkubation mit Cycloheximid

Hier wurde geprüft ob eine Vorinkubation der Zellen mit Cycloheximid vor Infektion die Infektionsrate erhöht. In einer 6-Lochplatte mit konfluentem Hep-Zellrasen wurde eine halbe Stunde bzw. eine Stunde vor Infektion das Kulturmedium gegen Cycloheximid-haltiges Infektionsmedium ausgetauscht.

Wie Abbildung 14 illustriert, bewirkte Vorinkubation des Zellrasens mit Cycloheximid keine Verbesserung der Infektionsrate, sondern im Gegenteil niedrigere Infektionsraten.

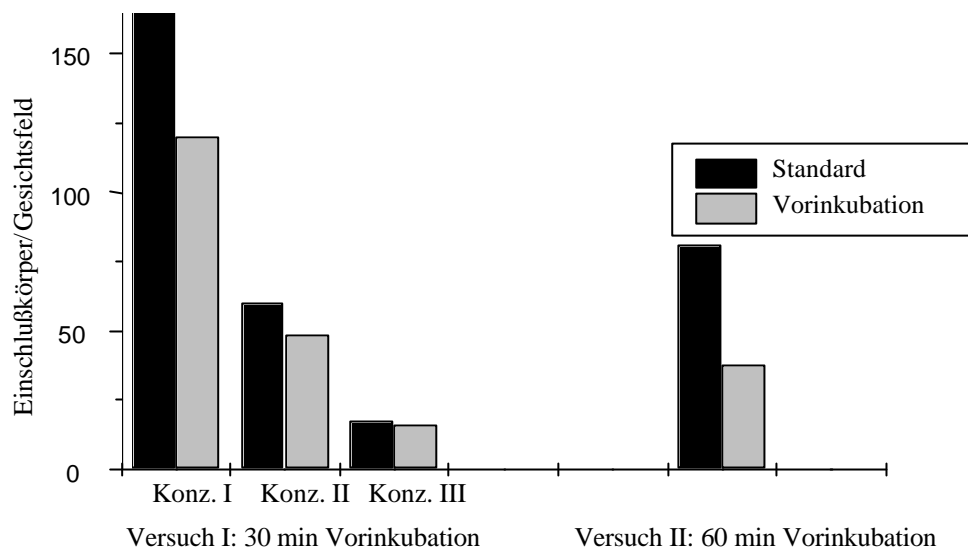


Abb. 14 Vorinkubation des Zellrasens mit Cycloheximid

Konfluente Hep-Zellrasen wurden vor Infektion eine halbe Stunde (linke Hälfte des Diagramms) bzw. eine Stunde (rechte Seite des Diagramms) mit normalem Cycloheximid-haltigen Infektionsmedium vorinkubiert. Nach 48 Stunden wurden pro Ansatz die EK in 5 Gesichtsfeldern ausgezählt. Die Vorinkubation bewirkt eine mit Verlängerung der Vorinkubationszeit zunehmende Verminderung der EK-Zahlen.

### 1.9. Inkubation der Chlamydien ohne Cycloheximid

Um zu überprüfen ob eine Infektion und Zentrifugation der Zellen vor Zugabe des Cycloheximid einen Vorteil bringt wurden 6 Lochplatten mit Cycloheximid-freier Chlamydiensuspension in drei Dosen infiziert und 0, 30, 60 und 120 min nach der Zentrifugation das Medium gegen Cycloheximid-haltiges Infektionsmedium ausgetauscht. Bei einer Platte wurde schon vor der Zentrifugation Cycloheximid hinzu gegeben.

Im Unterschied zu der Vorinkubation mit Cycloheximid im vorangehenden Experiment, bewirkte das Verschieben der Cycloheximid-Zugabe bis 2 Stunden nach Zentrifugation keinerlei Unterschied in der Infektionsrate (Abb. 15).

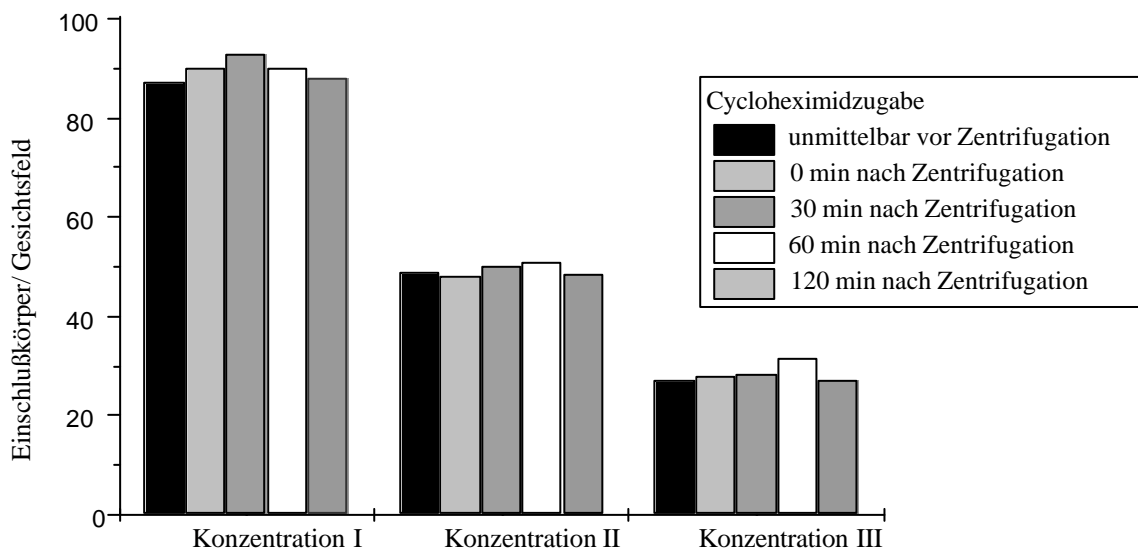


Abb. 15 Vorinkubation mit Chlamydiensuspension ohne Cycloheximid

Hep-Zellrasen wurden mit Cycloheximid-freier Chlamydiensuspension infiziert. Bei je einer Platte wurde vor bzw. 0, 30, 60 und 120 min nach der Zentrifugation die Chlamydiensuspension gegen Cycloheximid-haltiges Medium ausgetauscht. Die Zeit der Inkubation ohne Cycloheximid beeinflusste die Zahl der sich bildenden EK nicht.

### 1.10. Auswechseln des Infektionsmediums

Um zu ermitteln ob das in der Literatur teilweise vorgeschlagene Austauschen der Infektionssuspension einen Einfluss auf die Infektionsrate hat, wurde nach Infektion eines Hep-Zellrasens nach dem Standardverfahren gleich nach der Zentrifugation bzw. nach 24 Stunden das Medium ausgetauscht.

Das Auswechseln des Infektionsmediums bewirkte zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied im Vergleich zum Belassen des Mediums (Abb. 16). In weiteren Experimenten mit Verwendung sehr geringer Volumina an Infektionsmedium bewirkte der Austausch des Infektionsmediums nach 24 Stunden eine geringe Verbesserung der Ausbeute (Daten nicht gezeigt).

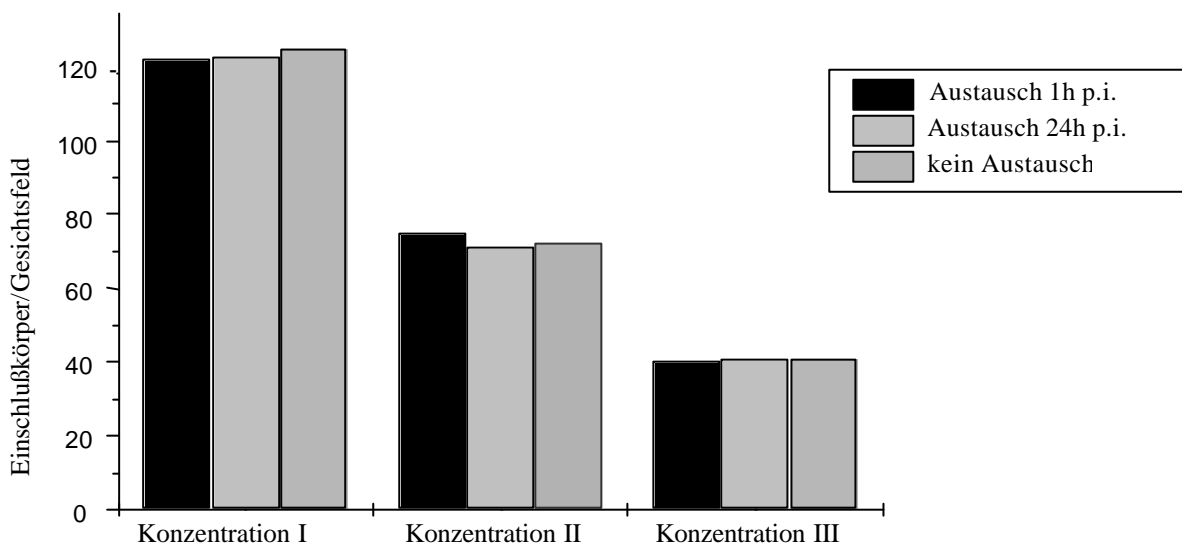


Abb. 16 Austausch des Infektionsmediums

Bei einer Charge infizierter Hep-Zellen wurde das Infektionsmedium sofort nach der Zentrifugation, nach 24 Stunden bzw. nicht ausgetauscht. Die Menge der EK nach 48 Stunden war mit und ohne Austausch des Mediums gleich.

### 1.11. Infektiosität des Überstandes

Um entscheiden zu können, ob das Medium der Chlamydienanzuchtkultur verworfen werden soll oder noch infektiöse Chlamydien enthält, wurde je 0,5 ml des Überstandes 72 und 96 Stunden nach Infektion zur Weiterinfektion von Hep-Zellen in einem 6-Well-Napf verwendet.

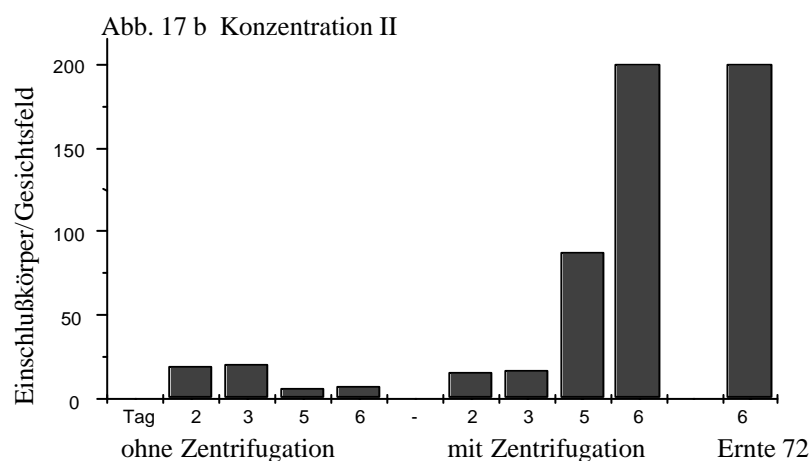
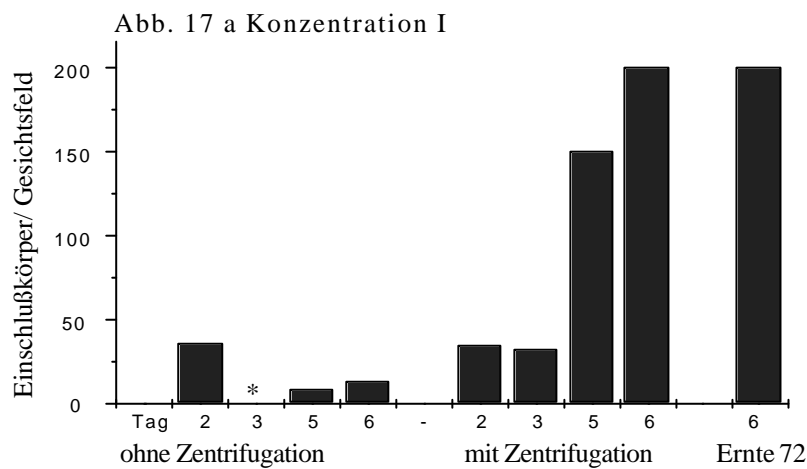
Die Zahl der Einschlusskörperchen, die sich bei Infektion mit Überstand bildeten schwankte erheblich. Sie lag zwischen 10 und deutlich über 200 EK/Gesichtsfeld. Die höchsten Werte ergaben sich bei hoher Ausgangsinfektion, ganz besonders hohe Einschlusskörperzahlen fanden sich wenn der Zellrasen der Ausgangsinfektion schon geschädigt war. 96 Stunden nach Infektion fanden sich besonders bei mittleren bis hohen Infektionsraten mehr Chlamydien im Medium als nach 72 Stunden (Daten nicht gezeigt).

## 1.12. Wiederholtes Zentrifugieren versus Zweitzyklus

Für die Anzucht kleinster Chlamydienmengen aus Patientenproben galt es zu überprüfen, ob sich durch Verlängerung der Kulturdauer mit täglichem Zentrifugieren bessere Anzuchtergebnisse erzielen lassen als durch die klassische Ernte nach 72 Stunden.

Konfluente Hep-Zellen wurden hierfür mit vier verschiedenen Chlamydiendosen infiziert in 6-Well (nach dem Standardverfahren mit einmaliger Zentrifugation). Ein Teil der Platten wurde anschließend unberührt im Brutschrank gelassen. Ein weiterer Teil der Platten wurde täglich eine Stunde bei 35° mit 3500 U zentrifugiert. Nach 2, 3, 5 und 6 Tagen wurde die Zahl der Einschlusskörper bestimmt. Eine Platte wurde nach 72 Stunden geerntet und vollständig in einen zweiten Zyklus eingesetzt (Ernte-72-Methode). Die Infektionsrate des zweiten Zyklus wurde 72 Stunden nach Infektion also 6 Tage nach der Erstinfektion bestimmt.

Wie aus den Abbildungen 17a –17d deutlich wird, erzielten die Weiterinfektion mit der Ernte nach 72 Stunden die besten Ergebnisse. Auch durch tägliche Zentrifugation ließ sich die Zahl der Einschlusskörper erheblich steigern. Beim Einsatz relativ hoher Infektionsdosen wurden ähnliche Werte wie bei der Ernte 72 Methode erreicht (Abb. 17 a, b). Bei den niedrigeren Infektionsdosen fanden sich allerdings nur halb so viele EK wie bei der Ernte 72 Methode (Abb. 17 d). Die Einschlusskörper befanden sich bei den wiederholt zentrifugierten Zellen ab Tag 4 in den verschiedensten Entwicklungsstadien. Der Zellrasen war besonders bei den höheren Infektionsdosen ab dem 5. Tag deutlich geschädigt. In den Ansätzen ohne Zentrifugation nahm die Zahl der Einschlusskörper nach 3 Tagen nicht mehr zu sondern, wie die Experimente zum optimalen Erntezeitpunkt (Abschnitt 1.3) erwarten ließen, sogar ab.



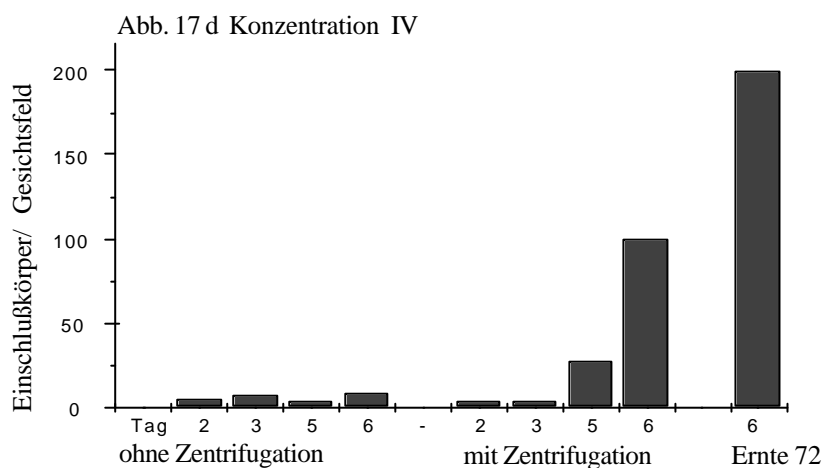
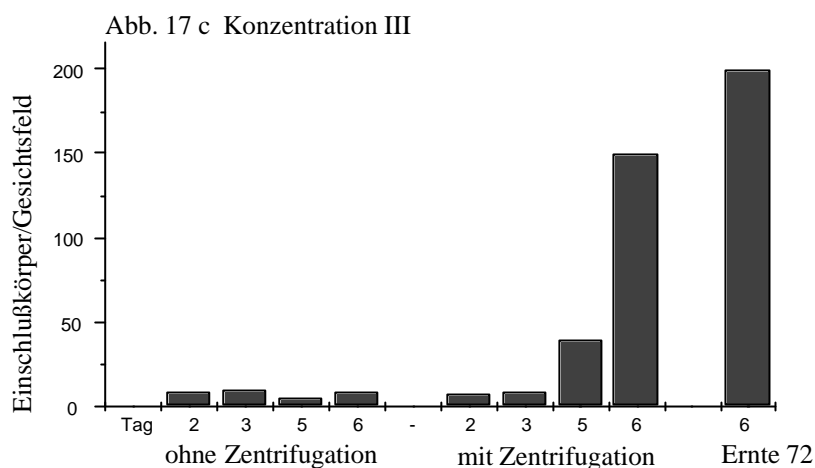


Abb. 17 a - d

Konfluente Hep-Zellen wurden mit vier verschiedenen niedrigen durch geometrische Verdünnung hergestellte Chlamydiendosen infiziert. Die Platten wurde zum einen unberührt im Brutschrank gelassen (linke 4 Balken; ohne Zentrifugation), zum anderen 1 Std. täglich zentrifugiert (mittlere 4 Balken; mit Zentrifugation) oder nach 72 Stunden geerntet und vollständig in einen zweiten Zyklus eingesetzt (rechter Balken; Ernte 72). Dargestellt ist die mittlere Menge der Einschlusskörper pro Gesichtsfeld 2, 3, 5 und 6 Tage nach Infektion bzw. nach Weiterinfektion der Ernte (Ernte 72).

Die Zahl der EK am Tag zwei gibt Auskunft über die verwendeten Infektionsdosen und belegt die gleich hohen Infektionsraten der jeweiligen unterschiedlichen Ansätze zu Beginn des Versuchs.

Man erkennt einen kontinuierlichen Anstieg der wiederholt zentrifugierten Chargen gegenüber den nicht zentrifugierten. Bei höheren Infektionsdosen finden sich am Tag 6 bei der Zentrifugationsmethode und der Ernte 72 Methode ähnliche Mengen an Einschlusskörpern (14 a, b). Da sich Einschlusskörper-Raten über 200 /Gesichtsfeld nicht mehr exakt bestimmen ließen wurden nur Werte bis 200 angegeben. Mit abnehmender Infektionsdosis (14c, d) erweist sich die Ernte 72 Methode als überlegen.

## 2. Interaktion monozytärer Zellen mit *C. pneumoniae*

### 2.1. Infektion von Monozyten

#### 2.1.1. Unterschiedliche Infektionsdosen

Der Einfluss der Infektionsdosis auf Infektionsrate wurde an MM6 und THP-1 Zellen untersucht. Je 100 000 Zellen wurden in 0.5 ml Kulturmedium in 24-Wells verteilt. Nach 24 Stunden wurden die Monozyten mit je 0,5 ml einer geometrischen Verdünnungsreihe einer aufgereinigten Chlamydien suspension infiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurde die Infektionsrate am FACS bestimmt und mikroskopisch verifiziert.

Im Bereich niedriger Infektionsdosen stieg die Infektionsrate auf der MM6 wie auf der THP-1 Zelle nahezu proportional mit der eingesetzten Infektionsdosis. Mit Erhöhung der Dosis flachte die Kurve zunehmend ab, erreichte eine maximale Infektionsrate von ca. 60% um schließlich wieder abzufallen (Abb. 18). Auf der THP-1 Zelle wurde die maximale Infektionsrate mit ca. 10 infektiösen Chlamydien pro Zelle erreicht, auf der MM6 wurden ca. 40 infektiöse Chlamydien benötigt um maximale Infektionsraten zu erreichen.

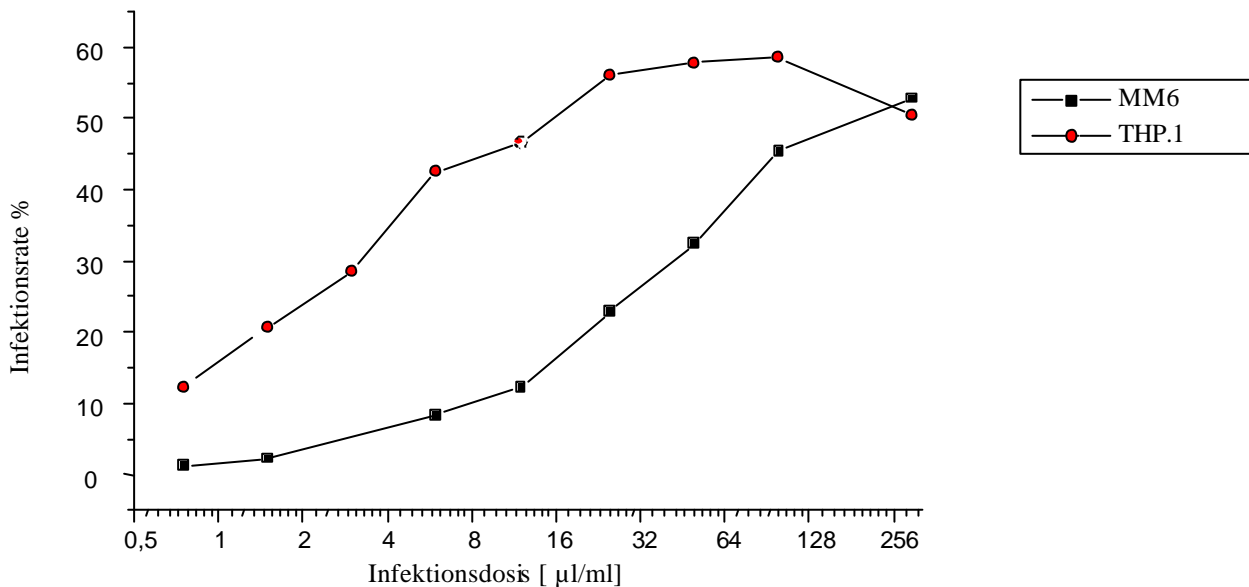


Abb. 18 Beispiel für eine Dosiskurve auf MM6 und THP-1 Zellen

Zu je 100 000 MM6 bzw. THP-1 in 0.5 ml Kulturmedium in 24-Wells wurden je 0.5 ml Chlamydien suspension einer geometrischen Verdünnungsreihe gegeben. Die Infektionsdosis ist hier in µl zugegebener aufgereinigter Chlamydien (ATCC 1310) angegeben. Ein µl enthielt  $16,7 \times 10^3$  ifu. Die Infektionsrate wurde 48 Stunden nach Infektion am FACS bestimmt.

Man sieht zunächst einen kontinuierlichen Anstieg der Infektionsrate mit Erhöhung der Infektionsdosis bis die Kurven langsam abflachen und nach Erreichen einer maximalen Infektionsrate von 60% wieder abfallen. Um vergleichbare Infektionsraten zu erreichen wurden auf der MM6 ca. 8-mal so viele Chlamydien wie auf der THP-1 benötigt. Die hier dargestellten Daten wurden in weiteren Versuchen auch für den Chlamydienstamm ATCC 1360 bestätigt (Daten nicht gezeigt).

### **2.1.2. Infektionsrate im Zeitverlauf**

Der Zeitverlauf der Infektionsrate wurde auf MM6, THP-1 und RAW-Zellen untersucht. Die Zellen wurden in Flaschen infiziert. Täglich wurde ca. 1/3 der Zellsuspensionen zu Analyse Zwecken entnommen und durch frisches vorgewärmtes Medium ersetzt. Die Zellen wurden bis zu 30 Tagen beobachtet.

Auf allen untersuchten Zellen lagen die Maxima der Messwerte bei 48 Stunden. Danach begann die Infektionsrate kontinuierlich abzusinken. Bei den MM6 sank die Rate innerhalb von 10 Tagen unter die Nachweisgrenze des FACS (siehe Abb. 22b). Auf der THP-1 dauerte es 15 Tage, bis keine eindeutige Infektion mehr im FACS nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 25). Die RAW Zellen zeigten das gleiche Verhalten wie die MM6 (Daten nicht gezeigt). Der mikroskopische Vergleich ergab zunächst die gleichen Werte wie das FACS, allerdings waren teilweise noch nach einem Monat vereinzelt infizierte Zellen im Mikroskop zu finden. Während der größte Teil der infizierten Zellen zwischen 3 und 10 Einschlusskörper aufwies, fanden sich immer einige besonders stark infizierte Zellen (siehe Bild 7 bis 9). Daneben fanden sich aber selbst bei stärksten Infektionen immer Zellen, die keinen einzigen Einschlusskörper enthielten (siehe Bild 7 bis 8). Nach 48 Stunden waren alle Einschlusskörper noch sehr klein (siehe Bild 7). Mit längerer Dauer der Infektion fanden sich zunehmend größere EK (siehe Bild 9, 10). Sie wurden allerdings nie auch nur annähernd so groß wie in den Kulturzellen (auch nicht nach Zugabe von Cycloheximid). Später ergab sich ein buntes Bild von Zellen mit keinen, kleinen und/oder großen EK.

### **2.1.3. Zentrifugation**

Ob Zentrifugation die Infektionsrate wie in Kulturzellen positiv beeinflusst und ob es hierbei zu einer unspezifischen Aktivierung von Monozyten kommt, wurde an MM6-Zellen untersucht.

Die Zellen wurden gewaschen und in Medium resuspendiert (200 000/ml) und a 3 ml in 6-Well Näpfe verteilt, mit Chlamydien infiziert und entweder ohne weitere Behandlung in den Brutschrank gestellt oder bei 1000 U / 35°C eine Stunde zentrifugiert. Nicht infizierte Kontrollen wurden in gleicher Weise behandelt. Nach 24, 48, und 72 Stunden wurden Proben fixiert und in Einzel- sowie Doppelfärbungen auf Chlamydien und CD14 (LPS-Rezeptor; als Messwert für Aktivierung der Zellen) gefärbt.

Durch Zentrifugieren der Monozyten mit Chlamydien suspension ließ sich die Infektionsrate auf MM6 von 65% auf 75% steigern (Tabelle 2). Neben der Steigerung der Infektionsrate kam es durch die Zentrifugation allerdings auch zu einer erheblichen Schädigung der Zellen (Tabelle 2 rechte Spalte) und als Zeichen einer Aktivierung zu einer vermehrten Expression von CD 14 (Tabelle 2 mittlere Spalte). Entsprechende Experimente auf RAW und THP-1 erbrachten vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).



| Werte nach 48 Std.       | Infektionsrate in % | CD14-Expression | Vitale Zellen |
|--------------------------|---------------------|-----------------|---------------|
| - KO ohne Zentrifugieren | 0                   | 55 %            | 96 %          |
| - KO mit Zentrifugieren  | 0                   | 75 %            | 50 %          |
| + KO ohne Zentrifugieren | 65 %                | 72 %            | 68 %          |
| + KO mit Zentrifugieren  | 75 %                | 86 %            | 37 %          |

Tabelle 2 Steigerung der Infektionsrate auf Mono-Mac 6 durch Zentrifugieren  
 Mono-Mac 6 Zellen wurden mit grob aufgereinigter Chlamydiensuspension (ATCC1360) in 6 Wells infiziert und bei 1000U zentrifugiert (+KO mit Zentrifugieren). Als Vergleich dienten nach dem Standardverfahren infizierte Zellen (+KO ohne Zentrifugieren) und entsprechend behandelte nicht infizierte Zellen (-KO). Als Messwert für Zellaktivierung wurde die CD14 Expression bestimmt. Durch Zentrifugation ließ sich die Infektionsrate leicht anheben (von 65% auf 75%). Die Zentrifugation führte allerdings zu einer Zellaktivierung und einer Zellschädigung. Die durch Chlamydien bewirkte Aktivierung und Zellschädigung wurde durch Zentrifugieren verstärkt.

#### 2.1.4. Einfluss einer Aktivierung der Monozyten durch LPS bzw. von FCS Entzug

Ob sich durch unspezifische Aktivierung der Monozyten die Aufnahme der Chlamydien und damit die Infektionsrate steigern lässt, wurde an ruhenden frischen MM6, vorstimulierten adhärennten MM6 und RAW-Zellen untersucht. Die Monozyten wurden mit LPS (1 ng/ml) aktiviert und anschließend mit unterschiedlichen Chlamydiestämmen infiziert.

In denselben Versuchsansätzen wurde auch geprüft, ob die Infektionsrate, wie bei Hep-Zellen in FCS-freiem Medium steigt, und wie sich eine Kombination von LPS Gabe und FCS Entzug auf die Infektionsrate auswirkt. Die Infektionsrate wurde nach 48 und 72 Stunden am FACS gemessen und mikroskopisch kontrolliert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 ad zusammengefasst. Stimulation mit LPS nach Infektion bewirkte bei allen Versuchen eine deutliche Steigerung der 48 Stunden-Messwerte für die Infektionsrate. Auch FCS-Entzug führte zu einer leichten Steigerung der Infektionsrate. Die Kombination beider Methoden bewirkte eine weitere Erhöhung der gemessenen Infektion (Abb. 19 c und d). In den schon weiter differenzierten adhärennten MM6 wurden nach 48 Stunden allgemein höhere Infektionsraten als in den nicht adhärennten Zellen gemessen (vergl. Abb. 19 c und d; Bild 12). Die Messwerte für die Infektionsrate auf den stimulierten Zellen lag 72 Stunden nach Infektion teilweise unter 50% des Vortageswertes. Auf den nicht stimulierten Zellen sanken die Messwerte nur leicht, so dass der Abstand zu den unbehandelten Zellen deutlich kleiner bzw. teilweise sogar aufgehoben wurde (siehe Abb. 19 a-d untere Balken).

Abb. 19 a MM6 infiziert mit ATCC 1360

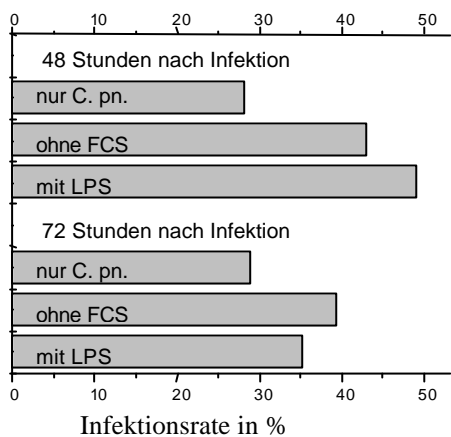


Abb 19 b RAW infiziert mit ATCC1360

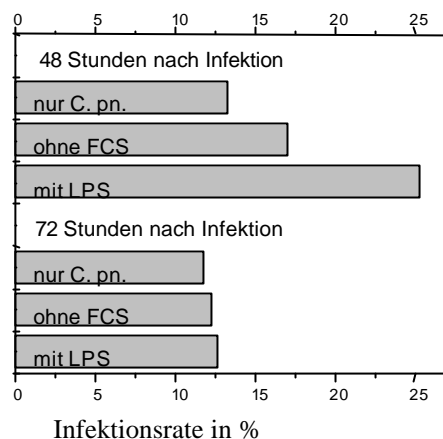


Abb.19 c MM6 infiziert mit ATCC 1310

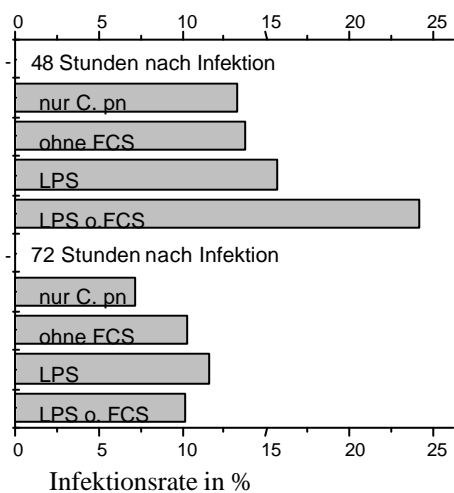


Abb. 19 d MM6 adhärenent ATCC1310

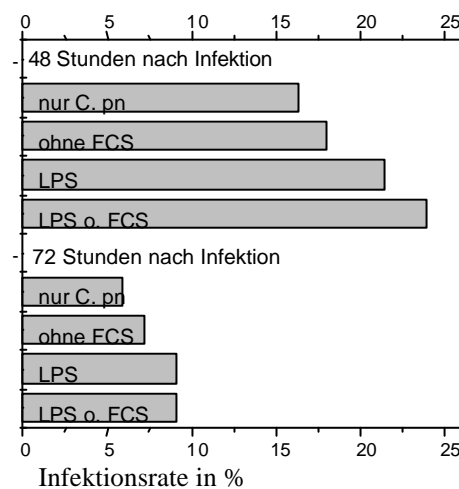


Abb. 19 Einfluss von Aktivierung durch LPS bzw. von FCS Entzug auf Infektionsrate

MM6 (16a, c), RAW (16 b), und differenzierte adhärenent MM6 wurden nach Aktivierung mit LPS (1 ng/ml) und/oder in FCS freiem Medium infiziert (14a, b ATCC 1360, 14 c, d ATCC 1310). Die Infektionsrate wurde nach 48 Stunden und 72 Stunden am FACS gemessen.

Aktivierung durch LPS wie auch FCS Entzug führten zu einer Erhöhung der Infektionsrate. Durch Kombination beider Methoden ließen sich die Werte weiter steigern (14c, d). Die Infektionsraten auf den behandelten Zellen gingen allerdings im Laufe des dritten Tages nach Infektion deutlich zurück, so dass sich die Werte angleichen.

### 2.1.5. Vergleich von verschiedenen Monozytenzelllinien und Blutmonozyten

Die humanen Monozytenzelllinien MM6 und THP-1, die murinen Makrophagenzelllinien ANA- und RAW-Zellen sowie dendritische Zellen (DC) der Maus und humane Monozyten wurden in diversen Versuchen sowohl einzeln als auch im direkten Vergleich auf ihre Infizierbarkeit untersucht. Die Infektionsraten wurden nach 48h per FACS bestimmt und mikroskopisch überprüft.

#### 2.1.5.1. MM6, THP-1 und RAW-Zellen

Alle Zellen erwiesen sich in dem Standardverfahren als infizierbar. Die THP-1 Zelle zeigte im Allgemeinen höhere Infektionsraten als MM6 und RAW, die beide um ähnliche Werte schwankten (siehe Abb. 20; vergleiche auch Abb. 18, 19 a, b).

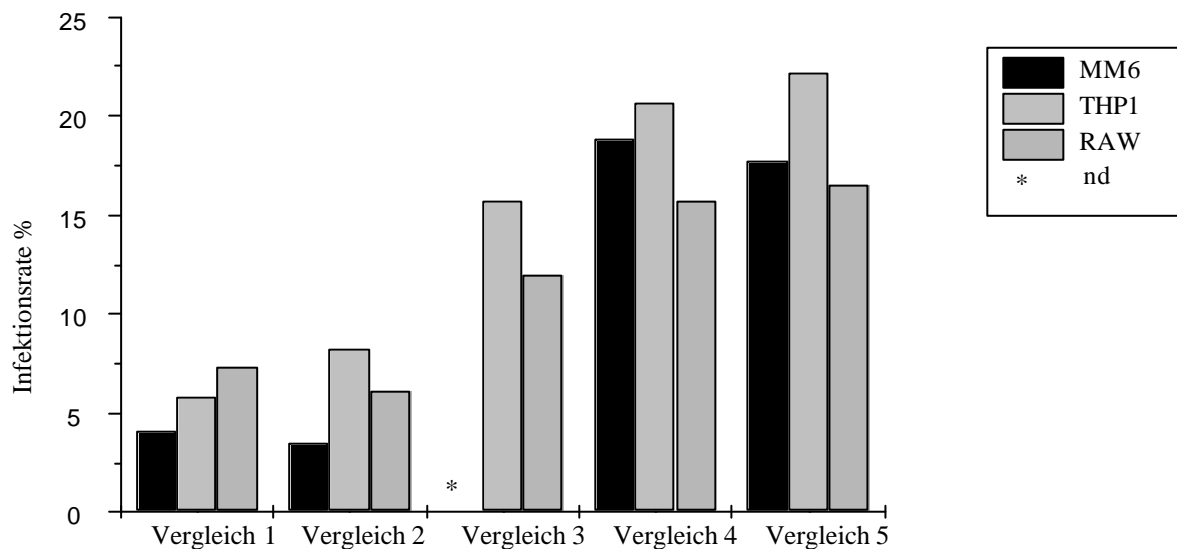


Abb. 20 Vergleich MM6, THP-1 und RAW bei Infektion mit ATCC1360

Die Zellen wurden in unabhängigen Versuchen nach dem Standardverfahren infiziert. Bei Vergleich 1, 2, 3 und 5 wurden grob aufgereinigte für Vergleich 4 nach dem Urografen-Verfahren aufgereinigte Chlamydien verwendet. Die Infektionsrate wurde nach 48h per FACS bestimmt und mikroskopisch überprüft.

Die Infektionsraten auf der MM6 und RAW lagen meist auf ähnlichem Niveau leicht unter dem der THP-1.

#### 2.1.5.2. ANA

ANA-Zellen wurden ohne direkten Vergleich mit anderen Zellen in zwei Experimenten infiziert. Die per FACS und Mikroskop ermittelten Infektionsraten lagen in einer Höhe wie man sie auch für MM6 bei entsprechenden Infektionsdosen erwartet hätte (Daten nicht gezeigt).

#### 2.1.5.3. Dendritische Zellen der Maus (DC)

Auch aus der Milz von Mäusen isolierte dendritische Zellen wurden in zwei Versuchen infiziert. Die Infektion konnte, wegen der geringen Zahl der zu Verfügung stehenden Zellen, nur mikroskopisch kontrolliert werden.

Es zeigten sich erstaunlich hohe Infektionsraten. Infektionsdosen die bei MM6 allenfalls zu einer Infektionsrate von 20% geführt hätten, ermöglichten auf dendritischen Zellen eine fast 100 prozentige Infektion. Die Infektion ließ sich im

Vergleich zu MM6 auch deutlich länger und in höherem Maße nachweisen. Auch nach 14 Tagen waren noch in bis zu 50 % der Zellen Chlamydien verschiedener Entwicklungsstadien nachweisbar (siehe Bild 11). Die Infektion ließ sich von den DC wie auch von MM6-Zellen auf Hep-Zellen übertragen (Daten nicht gezeigt).

#### **2.1.5.4. Monozyten aus peripherem Blut (PBMC)**

PBMC wurden in zwei Versuchen 24 Stunden nach Isolation infiziert. Die 48 Stunden nach Infektion per FACS und Mikroskop (siehe Bild 10) ermittelten Infektionsraten lagen mit 20 bis 40% bei ähnlichen Werten wie die Vergleichsinfektion auf MM6. Die Infektionsrate ließ sich wie bei den Monozytenzelllinien durch LPS-Stimulation steigern (Daten nicht gezeigt). Bei allen Infektionsmethoden bildeten sich zwar unzweifelhaft Einschlüsse, die Einschlüsse wirkten aber meist deformiert (siehe Bild 10). Eine Anzucht von Chlamydien aus infizierten Blutmonozyten auf Kulturzellen gelang nicht.

## 2.2. Expression von Oberflächenrezeptoren auf Monozyten nach Infektion

### 2.2.1. CD14

CD14 der LPS Rezeptor wird durch LPS und weitere unspezifische Mechanismen hoch reguliert (Ziegler-Heitbrock *et al.* 1988). CD14 vermittelt u.a. über den Transkriptionsfaktor NF-kappa-B eine Aktivierung der Monozyten und damit u.a. eine Steigerung der Adhärenz (Wright *et al.* 1990a;Hmama *et al.* 1999) und Phagozytose (Schiff *et al.* 1997). Da bereits bekannt war, dass auch *C. pneumoniae* zu einer Hochregulation von CD 14 auf MM6 führt (Heinemann *et al.* 1996), wurden die Färbungen auf CD14 bei der Etablierung der Methoden als Kontrolle verwendet. Am Beispiel von CD14 sollen deshalb auch unsere Messungen inklusive der Kontrollfärbungen ausführlich und allgemein dargestellt werden.

Durch die Infektion kommt es zu leichten Veränderungen des Scatters (Abb. 21 a, b). Die Zellen werden allgemein etwas kleiner und granulierter. Ein gewisser Teil der Zellen geht zugrunde (Abb. 21 b Pfeilspitze). Die Fluoreszenz-Signale im PE- und FITC-Kanal werden durch Infektion alleine nicht verändert (Abb. 21 c, d). Durch die Färbung nicht infizierter Zellen mit fluoreszenzmarkierten chlamydienspezifischen Antikörpern kommt es zu keiner wesentlichen Anfärbung der Zellen (Abb. 18 c, g). Auch die Färbungen mit den Isotyp-Kontrollen bewirken keine Veränderung der Messwerte im Vergleich zu den ungefärbten Werten (21 d, e, f).

Die Infektionsrate ist erst nach 48 Stunden messbar, da ein Großteil der Einschlusskörper zu einem früheren Zeitpunkt noch zu klein ist um ein deutliches FACS-Signal zu geben (siehe Abb. 25).

CD14 ist auf zwischen 5 und 10% der ruhenden Zellen exprimiert (Abb. 21 i, l; 23). Es wird nach Chlamydieninfektion hoch reguliert, wobei alle infizierten Zellen und auch ein Großteil der nicht sichtbar infizierten Zellen CD14 hoch regulieren (Abb. 21 i und k, l und m; 22, 23). Die CD 14-Expression korreliert hierbei in hohem Maße mit der Infektionsrate (siehe Abb. 23). Wie die Größe der Einschlusskörperchen ist auch die Expression von CD14 fließend. Als weiterer Parameter wurde teilweise der Mittelwert der Gesamtstärke des Fluoreszenz-Signals (mean channel fluorescens, MnX, Mittelwert M) angegeben. Die absolute Höhe dieses Mittelwertes wird durch Mess- und Fixierbedingungen beeinflusst. Für den Vergleich von Werten aus verschiedenen Messungen, wurde deshalb für die einzelnen Messungen der Quotient dieses Mittelwertes zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen gebildet (relative mittlere Fluoreszenz) (u.a. Abb. 22).

Bereits 6 Stunden nach Infektion ist die Expression von CD14 leicht angestiegen (Daten nicht gezeigt). Sie erreicht 48 Stunden nach Infektion ein Maximum um dann in ähnlicher Weise wie die Infektionsrate langsam wieder zum Ausgangswert zurückzukehren (Abb. 22).

Auf der **THP-1-Zelle** konnten wir in drei unabhängigen Messungen 48 h nach Infektion keinerlei Expression von CD14 feststellen (Abb. 24). Auch im späteren Verlauf der Chlamydieninfektion fanden wir keine Expression von CD14 (Abb.25).

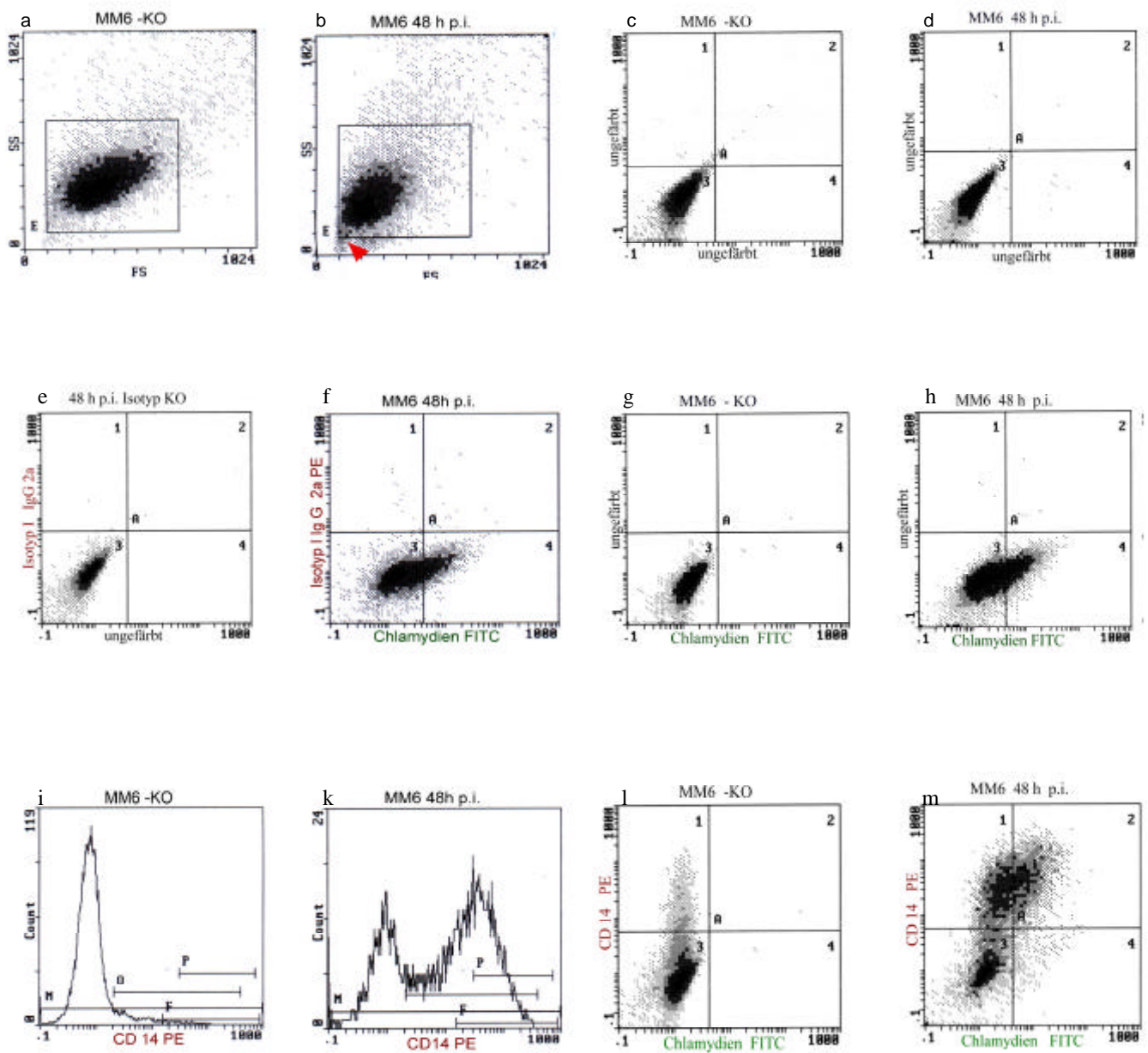


Abb. 21 Beispiel für FACS-Messungen zur Expression von CD14 auf der Mono-Mac-6 MM6 wurden auf die in Material und Methoden beschriebene Weise infiziert und nach 48 Stunden gefärbt. Durch die Infektion kommt es zu einer Erhöhung des Sideward-Scatters und Erniedrigung des Forward-Scatters (21 a, b). Die Fluoreszenz-Intensität auf PE- und FITC- Kanal wird durch Infektion alleine nur minimal verändert (21 c, d). Isotyp-Kontrollen und Chlamydienfarbstoff führen zu keiner Anfärbung der Zellen (18 e, f, g). Nicht infizierte Zellen exprimieren zu ca. 8% CD14 (21 i, l). Nach Infektion (erkennbar durch Verschiebung der Zellen im FITC Kanal, Abszisse (Abb. 21 h, m; Infektionsrate ca. 30%) steigt die CD14-Expression auf ca. 60% (PE-Kanal, Ordinate; 18 k, m), wobei alle infizierten Zellen und knapp 50% der nicht infizierten Zellen CD14 hoch regulieren (vergl. 18 m).

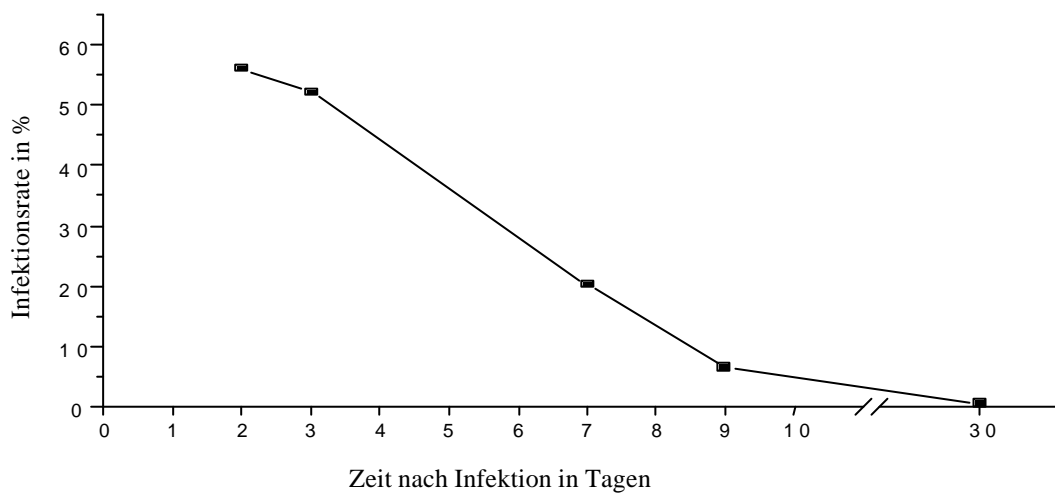
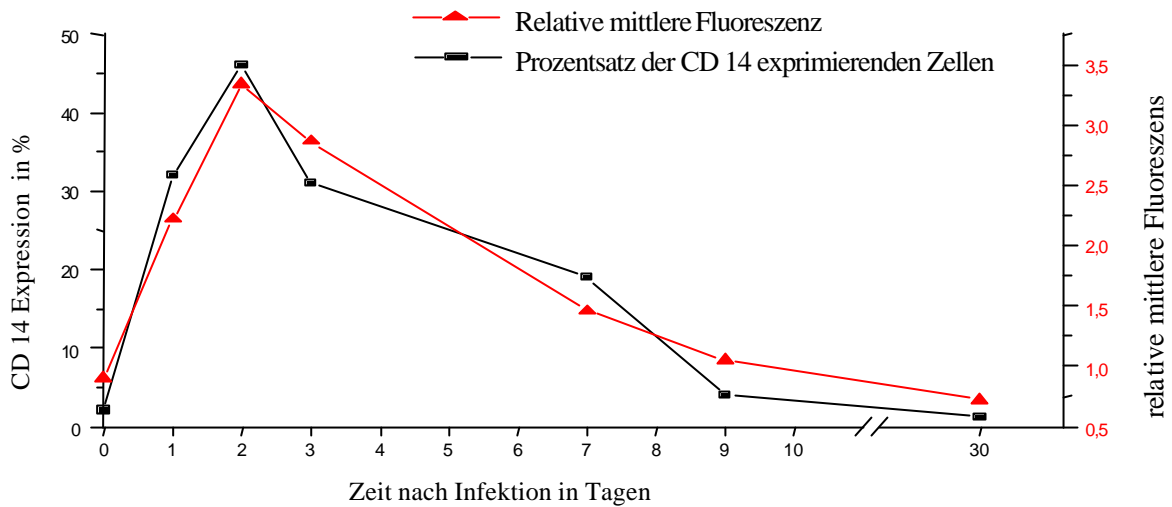


Abb. 23 Expression von CD 14 auf MM6 im Zeitverlauf der Infektion mit *C. pneumoniae*

Die Zellen wurden in Flaschen infiziert. Täglich wurde ca. 1/3 der Zellsuspensionen entnommen und durch frisches vorgewärmtes Medium ersetzt. 0, 1, 2, 3, 7, 9, und 30 Tage nach Infektion wurden CD14 Expression und Infektionsrate am FACS bestimmt.

Die Infektionsrate (untere Kurve) ist erst nach 48 Stunden messbar, da ein Großteil der Einschlusskörper zu einem früheren Zeitpunkt noch zu klein ist um ein deutliches FACS-Signal zu geben. Sie sinkt hier von einem Wert knapp über 50% kontinuierlich ab. Nach 9 Tagen lässt sich im FACS kaum noch eine Infektion feststellen.

Als Maß für die Expression wird die Expressionsrate (Anteil der CD14 exprimierenden Zellen in Prozent; obere Kurve) und die relative mittlere Fluoreszenz (Mittelwert der Expressionsstärke; obere Kurve) angegeben. Die Expression von CD14 steigt von einer niedrigen Expressionsrate von unter 5% bis zum 2. Tag auf Werte von nahe 50% um anschließend innerhalb einer Woche wie die Infektionsrate wieder auf den Ausgangswert zurückzugehen.

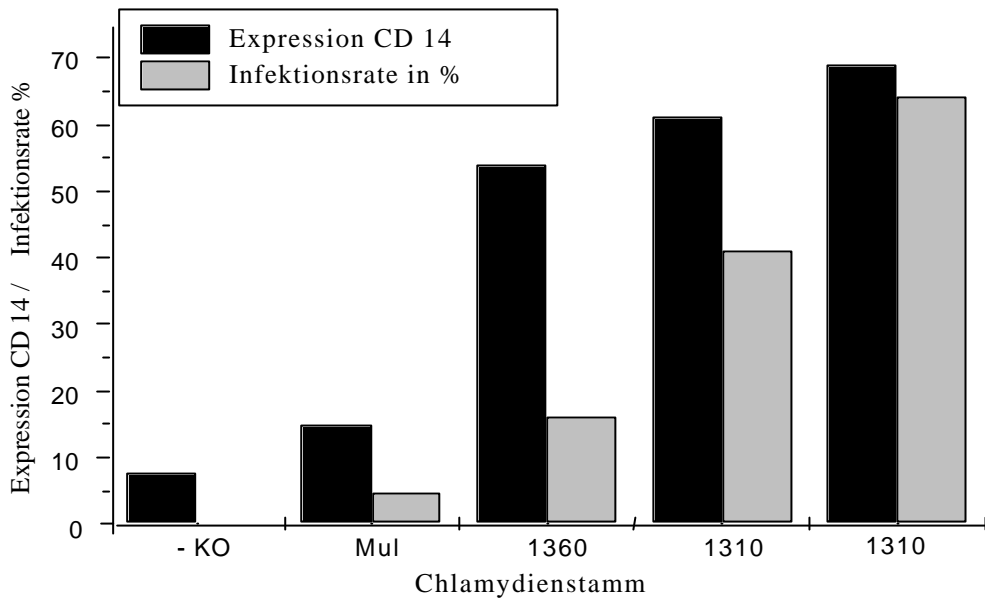


Abb. 22 Beispiele für CD 14 Expression auf MM6 nach Infektion durch verschiedene Chlamydienstämme MM6 wurden auf die in Material und Methoden beschriebene Weise in Einzelversuchen mit verschiedenen Chlamydienstämmen in unterschiedlichen Dosen infiziert und nach 48 Stunden gefärbt. Die Balken zeigen den Anteil der infizierten Zellen (grau) und den Anteil der CD14 exprimierenden Zellen (schwarz) in Prozent. Die Expression von CD14 auf den nicht infizierten Zellen lag zwischen 5% und 10% (KO). Man erkennt eine Zunahme der CD14-Expression mit steigender Infektionsrate.

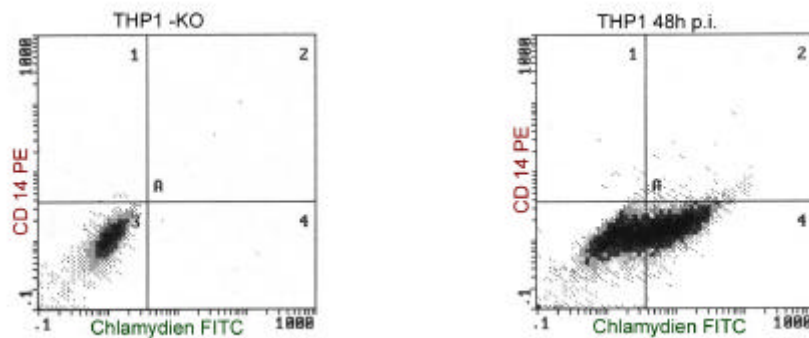


Abb. 24 Beispiel für Messung der CD14 Expression auf THP-1 THP-1 wurden auf die in Material und Methoden beschriebene Weise (ATCC1360) infiziert, nach 48 Stunden gefärbt und im FACS gemessen. Die linke Messung zeigt die auf CD14 und Chlamydien gefärbte Negativkontrolle. Rechts sind entsprechend gefärbte infizierte Zellen zu sehen. Bei einer Infektionsrate von ca. 50% ist keine Hochregulation von CD14 zu erkennen.



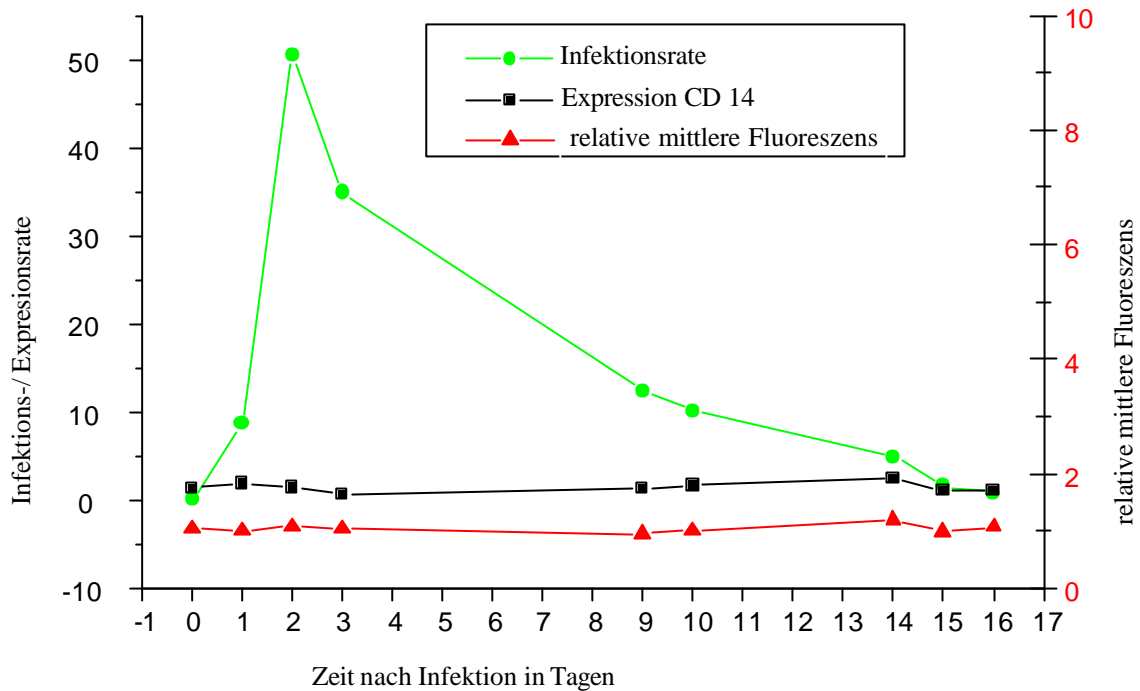


Abb. 25 Beispiel CD14 Expression auf THP-1 im Zeitverlauf  
 THP-1 wurden auf die in Material und Methoden beschriebene Weise infiziert (ATCC1360) und nach 0, 1, 2, 3, 9, 10, 14, 15 und 16 Tagen gefärbt und gemessen.  
 Die exakte Infektionsrate lässt sich erst 48 Stunden nach Infektion ermitteln, da ein Großteil der Einschlusskörper zu einem früheren Zeitpunkt noch zu klein ist um ein deutliches FACS-Signal zu geben. Sie fällt innerhalb von zwei Wochen kontinuierlich unter die Nachweisgrenze. Die Infektion ist also auf der THP-1 eine Woche länger als auf der MM6 per FACS nachweisbar. Eine Expression von CD14 konnte zu keinem Zeitpunkt der Infektion gefunden werden.

### 3.2. MHC-I

MHC-I-Moleküle präsentieren dem Immunsystem Peptide von Proteinen, die im Zytosol abgebaut wurden. insbesondere Partikel von intrazellulären Erregern.

MHC-I wurde bei unseren Messungen auf der MM6 durch die Infektion deutlich hoch reguliert. Die Expressionsrate stieg von 60% auf 90%, der Mittelwert der Fluoreszenz vervierfachte sich (siehe Abb. 26 a, b). Auf der THP-1 Zelle konnten wir keinen Unterschied in der Expression feststellen (siehe Abb. 26 c, d).

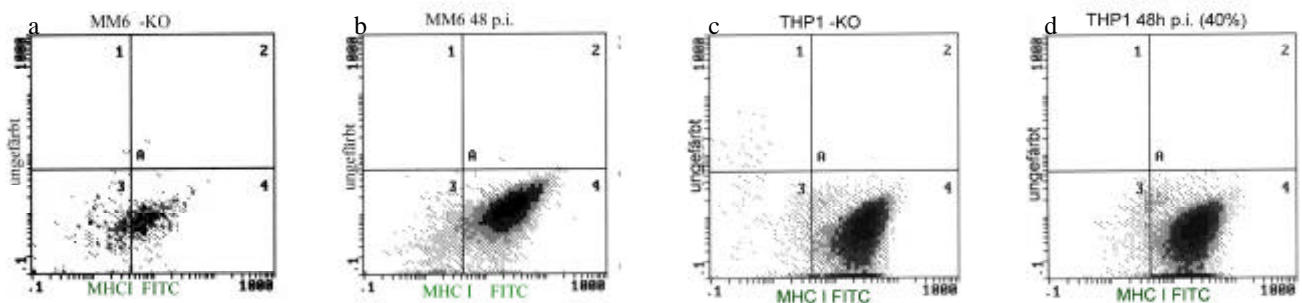


Abb. 26 Beispiel für Expression von MHC-I auf MM6 (a, b) und THP-1 (c, d)  
 Die Monozyten wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit aufgereinigten ATCC 1310 Chlamydien infiziert und nach 48 Stunden gefärbt. Da uns sowohl für MHC-I als auch Chlamydien nur FITC markierte AK zu Verfügung standen, war eine gleichzeitige Darstellung beider Parameter nicht möglich. Die Infektionsraten lagen bei ca. 30% (MM6) und 40% (THP-1). Auf der MM6 kommt es zu einem Anstieg der Expression von MHC-I (a, b) während sich auf der THP-1 die schon vor Infektion hohe Expression von MHC I nicht verändert.

### 3.3. MHC-II

MHC-II-Moleküle präsentieren CD4-T-Zellen Peptide von phagozytierten und abgebauten Proteinen. CD4 Zellen steuern in Zusammenspiel mit Immunzellen über Interleukine die Richtung der weiteren Immunantwort.

Auf von den von uns verwendeten Zelllinien wurde MHC-II im Ruhezustand nicht bzw. kaum exprimiert. Mit keinem der von uns verwendeten Chlamydienstämme (ATCC1310, 1360, MUL) ließ sich weder auf der MM6 noch auf der THP-1 eine Expression von MHC-II auf MM6 oder THP-1 induzieren (siehe Abb. 27 a-d, Daten nur für ATCC 1310 gezeigt).

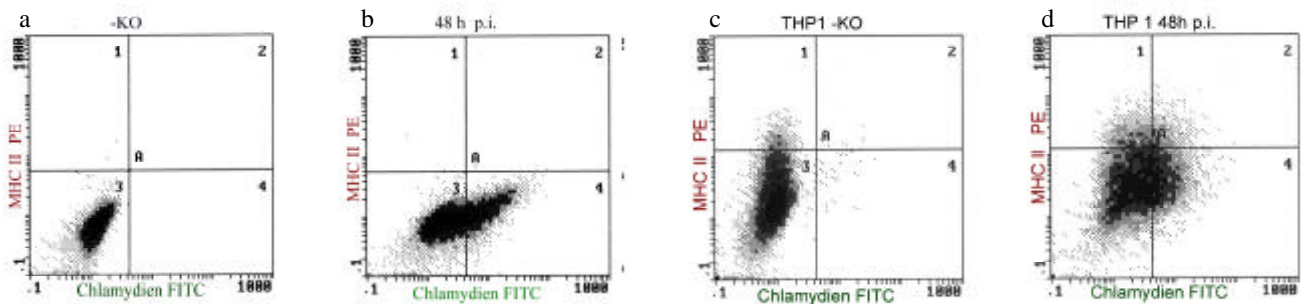


Abb. 27 Expression von MHC-II auf MM6 (a,b) und THP-1 (c,d) ohne (a,c) und mit (b,d) Chlamydieninfektion Die Monozyten wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit aufgereinigten ATCC 1310 Chlamydien infiziert und nach 48 Stunden gefärbt. Die Chlamydieninfektion führt weder auf MM6 (Abb. 24 a, b) noch auf THP-1 (Abb. 24 d, e) zu einer Expression von MHC-II.

### 3.4. CD54

CD54 trägt zum einen als kostimulatorisches Molekül zur Aktivierung von T-Zellen bei, des Weiteren vermittelt es als wichtiges Adhäsionsmolekül die Migration von Leukozyten.

Auf der MM6 wurde CD54 schon im Ruhezustand auf bis zu 80% der Zellen exprimiert (Abb. 30a). Infektion mit Chlamydien führte unabhängig von dem verwendeten Stamm zu einem weiteren mit der Infektionsrate korrelierenden Anstieg der Expression (Abb. 28, 29). Die Höhe der Expression erreichte ihr Maximum 1 Tag nach Infektion. Im Laufe der nächsten Tage fiel sie in einem ähnlichen Maße wie die Infektionsrate wieder auf die Ausgangswerte zurück (siehe Abb. 31). Wie bei CD14 betraf diese Hochregulation alle Zellen, zeigte sich aber besonders deutlich bei den infizierten Zellen (siehe Abb. 30, 32).

Die THP-1 Zelle exprimiert im Ruhezustand kein CD54 (Abb. 32a). Zwei Tage nach Infektion lag die Expressionsrate bei ihrem Maximalwert von ca. 40% (Abb. 32), um dann wie auf der MM6 parallel zu der Infektionsrate auf den Ausgangswert zurück zu fallen.

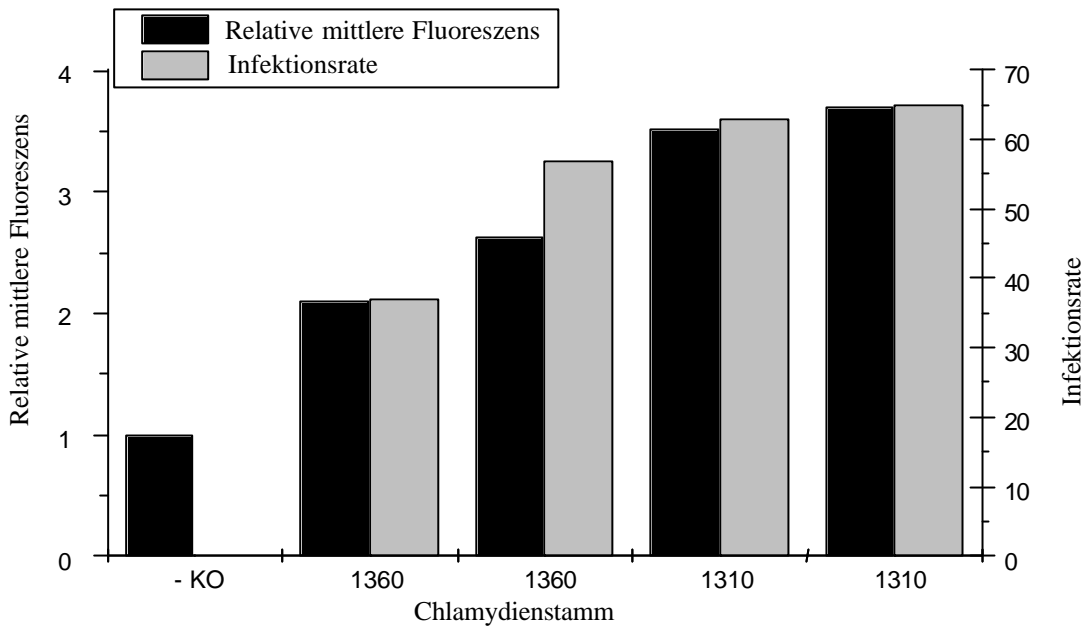


Abb. 28 Expression von CD 54 auf MM6 bei verschiedenen Infektionsraten

Die MM6 wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit aufgereinigten Chlamydien infiziert und nach 48 Stunden gefärbt. Da die Expressionsrate von CD54 schon im Ruhezustand der Zellen bei 90% lag und so eine Steigerung der Rate kaum noch möglich war, wurde als Maß für den Anstieg der (unter 3.1. CD14 beschriebene) Quotient des Mittelwertes (relative mittlere Fluoreszenz) angegeben. Die Stärke der Expression von CD54 zeigt einen klaren Zusammenhang mit der Infektionsrate.

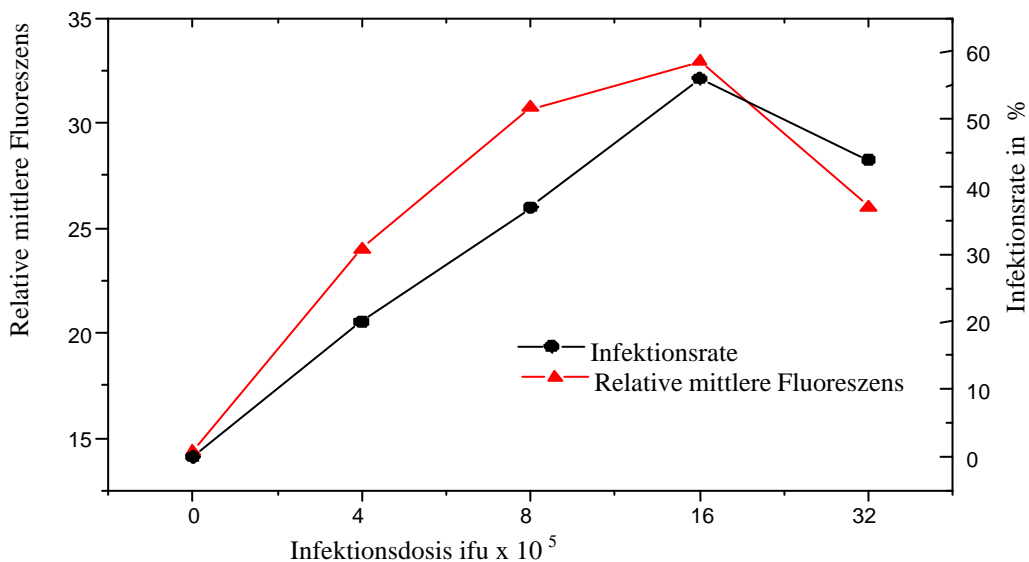


Abb. 29 Beispiel für die Expression von CD 54 auf MM6 bei verschiedenen Infektionsdosen

Die MM6 wurden nach dem üblichen Verfahren mit einer Verdünnungsreihe aufgereinigter Chlamydien (ATCC1360) infiziert und nach 48 Stunden gefärbt. Als Maß für den Anstieg der CD54 Expression wurde wie unter Abb. 28 der Quotient des Mittelwertes (Relative mittlere Fluoreszenz) angegeben. Die Stärke der Expression von CD54 zeigt einen klaren Zusammenhang mit der Infektionsrate, wobei die Infektionsrate bei diesem Versuch mit ca. 33% nur einen relativ niedrigen Maximalwert erreichte.

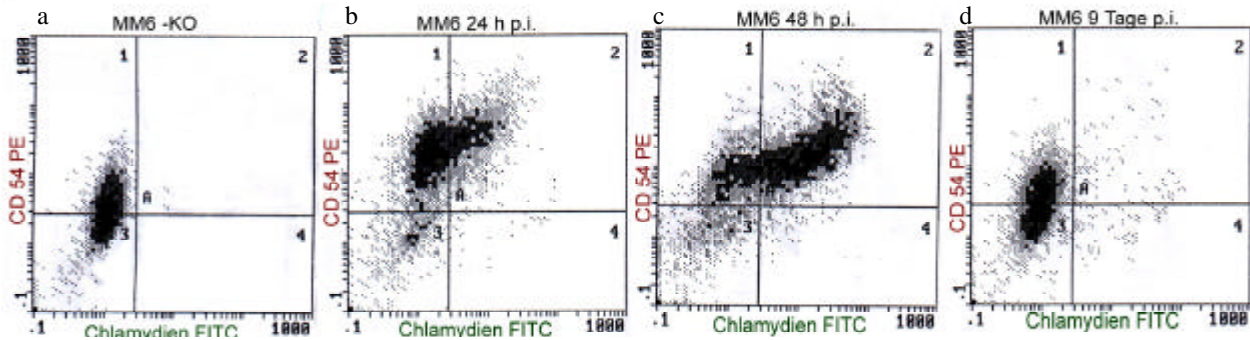


Abb. 30 a-d Beispiele für Messwerte zur CD 54 Expression im Zeitverlauf der Infektion auf MM6

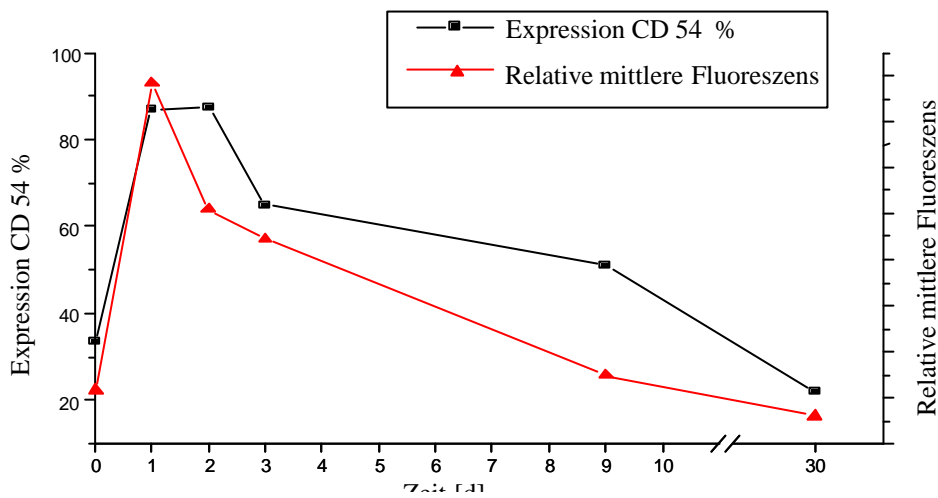


Abbildung 31 a Expression von CD 54 im Verlauf der Infektion

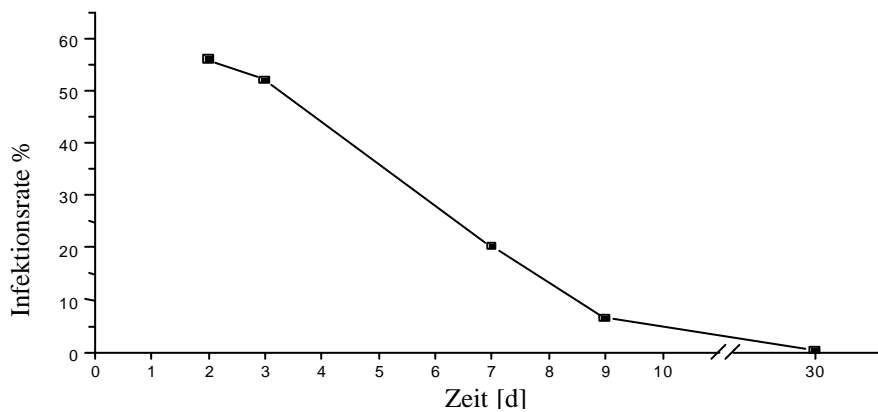


Abbildung 31 b Verlauf der Infektionsrate

Abb. 30 a-d, 31 a, b Darstellung der CD54 Expression im Zeitverlauf der Infektion auf MM6. Die MM6 wurden nach dem üblichen Verfahren infiziert (ATCC 1360) und nach 0, 1, 2, 3, 9 und 30 Tagen gefärbt. Bereits nach 24 Stunden ist ein massiver Anstieg der CD54 Expression erkennbar (Abb. 30b; PE Kanal; Ordinate) der nach 48 Stunden schon wieder etwas nachgelassen hat (Abb. 30c). Nach 9 Tagen sind noch vereinzelt infizierte MM6 nachweisbar, die Expression von CD54 ist noch leicht über Ausgangswert (Abb. 30 d). In Abb. 31 a, b sind die Messergebnisse grafisch zusammengefasst.

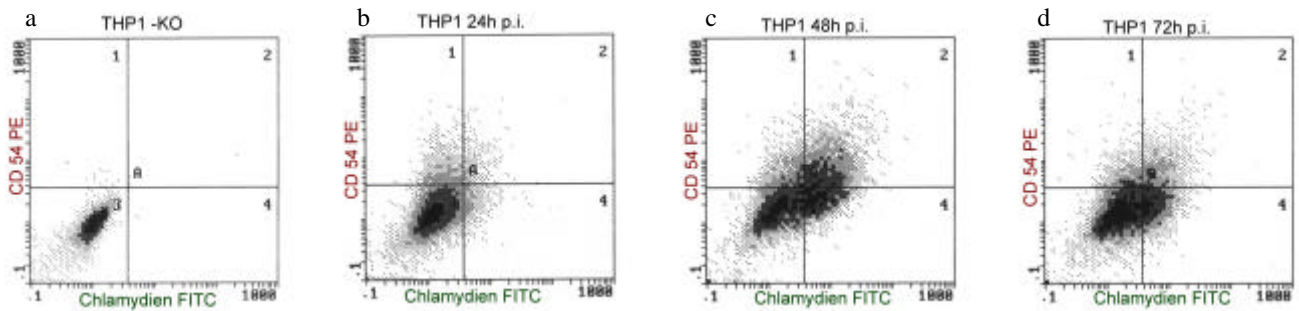


Abb. 32 a-e Beispiele für Messwerte zur CD 54 Expression im Zeitverlauf der Infektion auf THP-1  
 Die THP-1 wurden nach dem üblichen Verfahren infiziert (ATCC 1310) und nach 0, 1, 2 und 3 Tagen gefärbt und gemessen.  
 Im Ruhezustand exprimieren THP-1 kein CD54 (Abb. 31a, PE Kanal, Ordinate). Nach 24 Stunden ist bereits ein Anstieg von CD54 zu sehen (Abb. 31b), das Maximum wird nach 48 Stunden erreicht (Abb. 31c).

### 3.5. CD71

Der Transferrinrezeptor CD71 vermittelt die endozytische Aufnahme von Eisen.

Wir führten zwei Messungen dieses Rezeptors auf der MM6 bei Infektionsraten um 60% durch. Es zeigte sich jeweils eine Verringerung der Expression von 99 auf 87%, sowie eine Halbierung des Mittelwertes M (siehe Abb. 33).

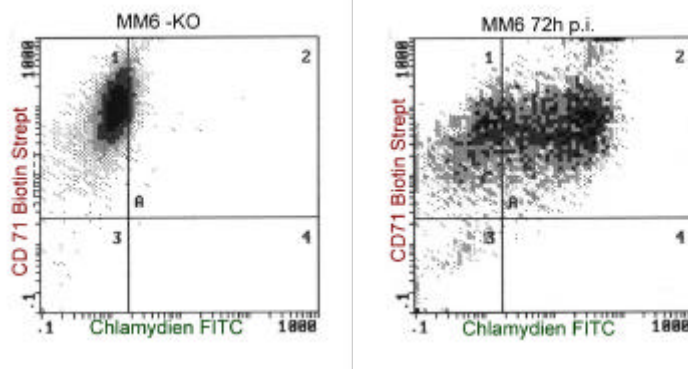


Abb. 33 Beispiel für die Expression von CD71 auf der MM6  
 MM6 wurden auf die übliche Weise mit ATCC1360 infiziert und nach 48 Stunden gefärbt.  
 Man erkennt in der rechten Messung bei einer Infektionsrate von ca. 60% (FITC Abszisse) eine deutliche Verminderung der Expressionsstärke von CD71 (Biotin-Streptavidinfärbung; Ordinate) im Vergleich zu der Negativkontrolle links.

### 3.6. CD80

CD80 und CD86 sind wichtige kostimulatorische Rezeptoren bei der Aktivierung von T-Zellen.

Für CD80 konnten wir auf der MM6 und der THP-1 Zelle bei je 3 voneinander unabhängigen Messungen auf infizierten wie nicht infizierten Zellen nur eine minimale Expression von CD80 messen (Abb. 34)

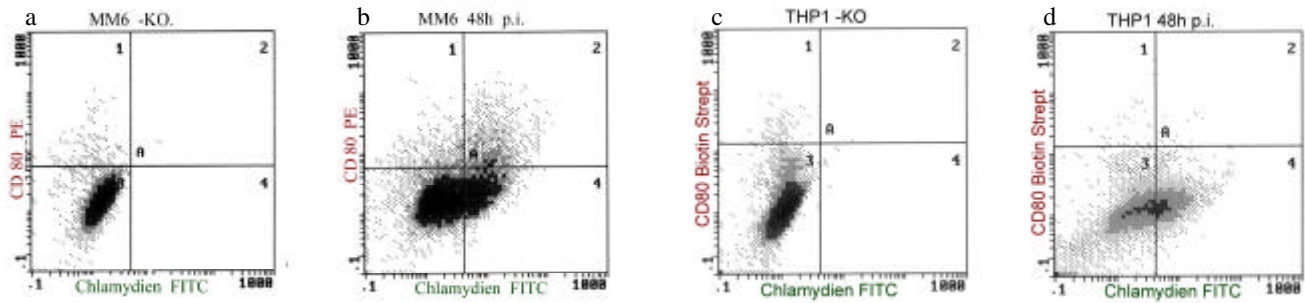


Abb. 34 Beispiele für Messwerte zur Expression von CD80

Die Monozyten wurden auf die übliche Weise infiziert (b: MM6, ATCC1310; d: THP-1, ATCC1360) und nach 48 Stunden gefärbt. Die Expression von CD80 steigt auf MM6 (Abb. 33a, b) wie auf der THP-1 (Abb. 33 c, d) allenfalls minimal.

### 3.7. CD86

Für CD86 fanden wir auf der MM6 eine deutliche Hochregulation. Diese vermehrte Expression zeigte eine klare Korrelation mit der Infektionsrate (siehe Abb. 35). Die Hochregulation betraf nahezu alle Zellen, war aber auf den sichtbar infizierten Zellen am ausgeprägtesten (siehe Abb. 36d). 6 Stunden nach Infektion war noch kein Anstieg festzustellen, wohl aber nach 24 Stunden. Die maximale Rate wurde 48 Stunden nach Infektion gemessen (siehe Abb. 36e).

Auf der THP-1 Zelle konnten wir weder in zwei unabhängigen Messungen 48h nach Infektion, noch im Verlauf von 14 Tagen nach Infektion eine deutliche Expression von CD86 messen (siehe Abb. 37).

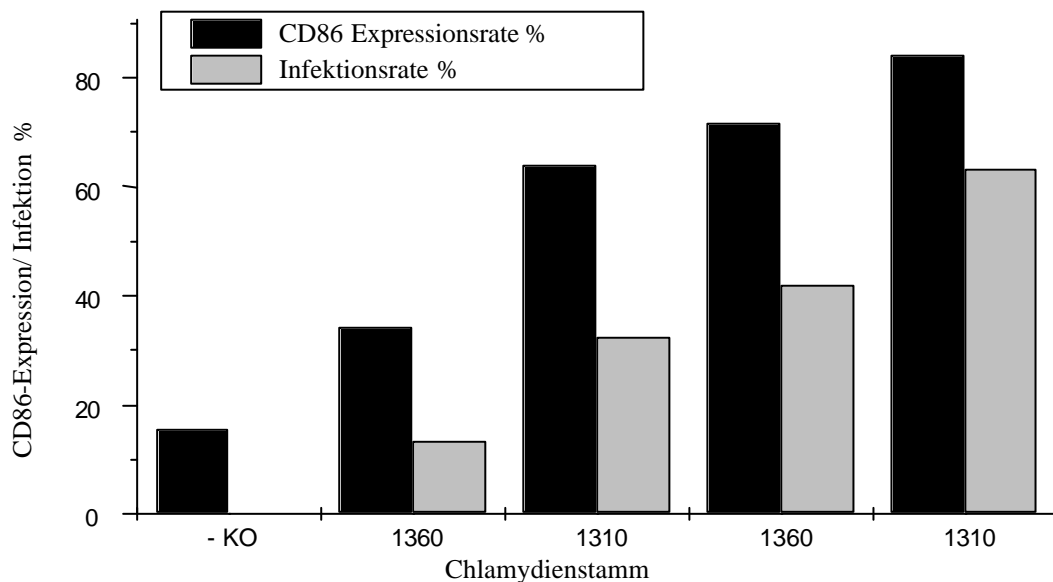


Abb. 35 Expression von CD86 bei unterschiedlichen Infektionsraten

MM6 wurden auf die in Material und Methoden beschriebene Weise in Einzelversuchen mit verschiedenen Chlamydia Stämmen in unterschiedlichen Dosen infiziert und nach 48 Stunden gefärbt. Bei der -KO wurde der Mittelwert der CD86 Expression angegeben. Man erkennt eine Zunahme der CD86 Expression mit steigender Infektionsrate.

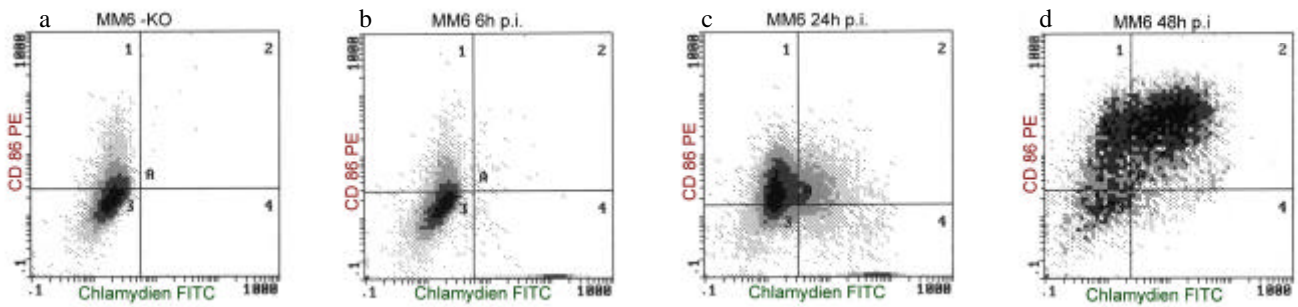


Abb. 36 a ,b, c ,und d Beispiele für Messwerte der CD86 Expression im Zeitverlauf der Infektion auf MM6

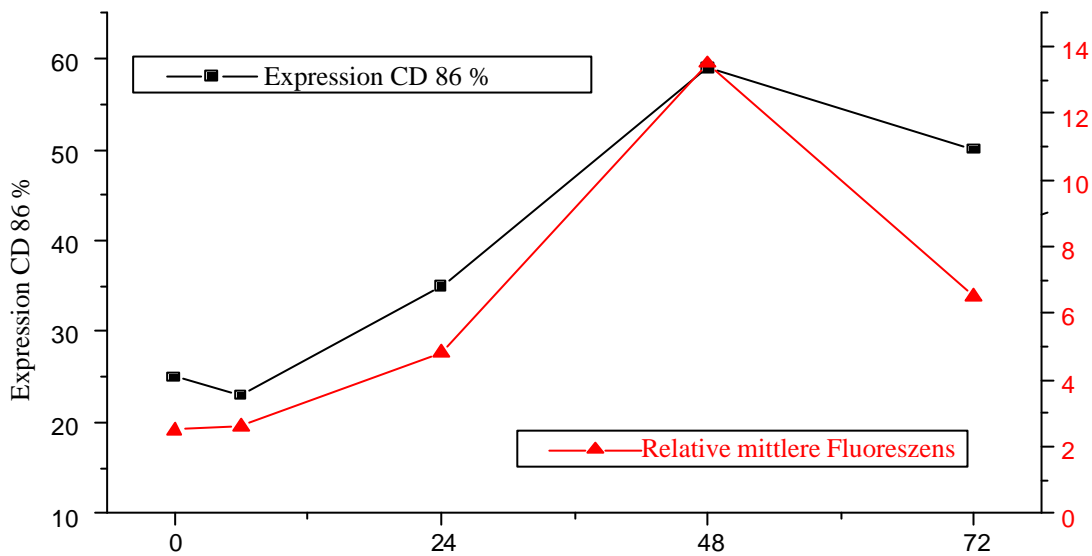


Abb. 36 e

Abb. 36 a – e CD86 Expression im Zeitverlauf der Infektion auf MM6

Die MM6 wurden wie üblich infiziert (ATCC 1310) und nach 0, 1, 2 und 3 Tagen gefärbt. Man erkennt im PE-Kanal (Ordinate) die im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 36a) in den ersten 2 Tagen zunehmende Expression von CD 86 (Abb. 36b: 6 Std.; Abb. 36c: 24 Std.; Abb. 36d: 48 Stunden nach Infektion). Die Chlamydien selbst führen erst nach 48 Stunden, wenn sie eine gewisse Größe erreicht haben zu deutlichen Signalen (FITC-Kanal; Ordinate). In Abb. 36e sind die Messergebnisse grafisch zusammengefasst

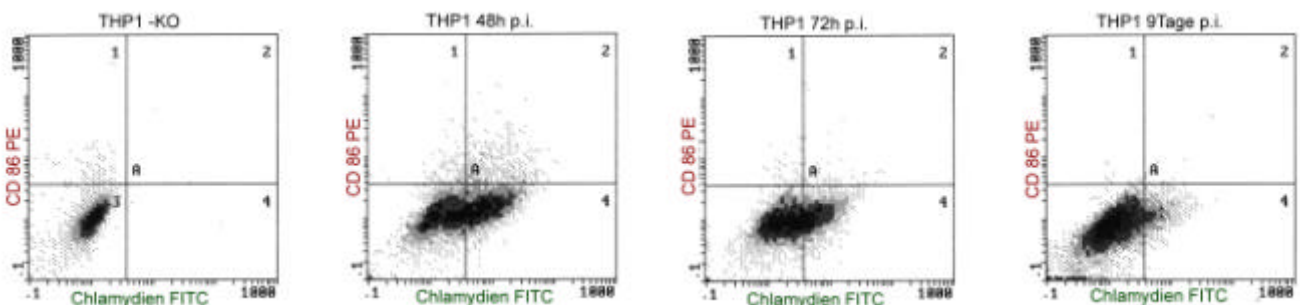


Abb. 37 Beispiel für Messung der Expression von CD86 auf der THP-1

Die Monozyten wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit aufgereinigten ATCC 1360 Chlamydien infiziert und nach 2, 3 und 9 Tagen gefärbt. Eine Expression von CD86 (PE-Kanal; Ordinate) war auf infizierten wie nicht infizierten THP-1 nicht messbar.

## 4. Einfluss von *C. pneumoniae* auf Apoptose in Monozyten und Epithelzellen

Um den Einfluss der Chlamydien auf Apoptose bestimmen zu können, musste man Apoptose künstlich auslösen. Hierfür standen eine Reihe von Apoptosegiften zur Verfügung, die allerdings unterschiedlich stark auf verschiedene Zellen wirken. Zunächst wurden also für die Apoptosegifte Staurosporin, Etoposid und Cycloheximid die Konzentrationen ermittelt, die jeweils 50% der Zellen in einem Zeitraum von 6 Stunden in die Apoptose treiben. Die Apoptoserate wurde hierbei mittels mikroskopischen Auszählens der Kernfragmentation bestimmt. Für die späteren Analysen wurden entsprechende Konzentrationen der Apoptosegifte eingesetzt. In den nachfolgenden FACS Messungen wurden allerdings durchgehend niedrigere Apoptoseraten gemessen.

In einer Reihe von Vorversuchen wurde der Einfluss von *C. pneumoniae* auf Apoptoseverhalten von MM6 und THP-1 untersucht. Die Apoptoseraten wurden hierfür nach Infektion mit *C. pneumoniae* und/ oder Induktion der Apoptose durch Staurosporin durch mikroskopisches Auszählen der fragmentierten Kerne untersucht.

Nachdem hierbei deutliche Effekte festgestellt worden waren, wurden Färbeverfahren zum gleichzeitigen Nachweis von Apoptose und Chlamydieninfektion in Mikroskop und FACS entwickelt (siehe Methoden: 2.5 und 2.6; Abb. 40).

Die in den Vorversuchen ermittelten Befunde wurden anschließend durch objektivere Zellzyklus-Analysen am FACS und durch Einbeziehung weiterer Apoptosegifte (wie Etoposid) und Zellen (wie HeLa, Hep- und NCI- Zellen) erweitert.

Der Faktor **Chlamydien-Konzentration** wurde durch Verwendung von zwei verschiedenen Infektionsdosen berücksichtigt. Angestrebt wurde jeweils eine hohe Dosis mit einer  $moi$  von 3, die auf der THP-1 etwa eine 50% auf den Epithelzelllinien eine 100% Infektionsrate bewirkt. Als zweite Dosis wurde ein Zehntel der Ersten verwendet.

Durch Zugabe von **Cycloheximid** (1µg/ml), das die Proteinsynthese der eukaryoten Zellen, nicht aber der Bakterien blockiert, sollte der Einfluss der Syntheseleistung der Wirtszelle betrachtet werden.

Durch **UV-Inaktivierung** der Chlamydien sollte die Bedeutung der Vitalität der Chlamydien beleuchtet werden. Zur UV-Inaktivierung wurden die Chlamydien in einer Zellkulturflasche eine halbe Stunde direkt unter der UV-Lampe des Flows befestigt. Die Durchlässigkeit der Flaschen für UV-Licht war zuvor am Fluorometer überprüft worden.

Durch Zusatz des **Caspaseinhibitors** (Z-DEVD-FMK 50 µM; Tag 1 und 3 der Infektion), der die Caspasen 1 und 3 hemmt, sollte deren Rolle ermittelt werden.

Die Rolle des **Infektionsstadiums** wurde durch Messungen nach 1, 2 und 3 Tagen studiert.

Ein Großteil der Experimente wurde mit einfach gereinigten Chlamydien durchgeführt.

Insgesamt wurden über 20 unabhängige mikroskopisch kontrollierte FACS-Messungen auf den Monozytenzelllinien MM6 und THP-1, und den Endothelzelllinien HeLa, NCI und Hep durchgeführt.

Die Infektion mit *C. pneumoniae* wirkte sich in allen untersuchten Zellen in ähnlicher Weise auf das Apoptoseverhalten aus. Diese Reaktionen sollen hier anhand einiger Beispiele gezeigt werden.

Durch *C. pneumoniae* wurde **Apoptose ausgelöst**. In allen durchgeführten Versuchen kam es durch Zugabe der Chlamydien alleine zu Apoptose (Abb. 38-42). Die Apoptose konnte mikroskopisch (siehe Photo 1 und 2, apoptotische Zellen erkennbar an verdichteten, pyknotischen Kernen), per FACS (siehe Abb. 40-42) und durch DNA-Fragmentation (siehe Abb. 39) nachgewiesen werden. Die apoptotische Wirkung war ab dem 2. Tag der Infektion nachweisbar (siehe Abb. 41) und stieg **Verlauf** der Infektion weiter an (Abb. 42). Das Ausmaß der Apoptose war von der eingesetzten Chlamydienmenge abhängig. Wurde die übliche **Dosis** von 2-3 Ifu/Zelle auf ein Zehntel reduziert, war keine bzw. nur noch eine minimale Erhöhung der Apoptoserate feststellbar (siehe Abb. 38, 41). Mittels **UV-Licht** inaktivierte Chlamydien waren nicht in der Lage, Apoptose auszulösen (siehe Abb. 38, 41, 42).



Zusatz von **Caspaseinhibitor** verminderte die apoptotische Potenz der vitalen Chlamydien nur geringfügig (siehe Abb. 41, 42).

Auch durch Zusatz von **Cycloheximid** kam es nur zu einem leichten Rückgang der Apoptose der infizierten Zellen (Abb. 41, 42).

Es werden besonders die nicht infizierten Zellen in die Apoptose getrieben, während die infizierten Zellen von Apoptose verschont bleiben (Abb. 40 k).

Gleichzeitig wurde die Auslösung von **Apoptose** mittels Staurosporin und Etoposid durch Chlamydien deutlich **gehemmt** (siehe Abb. 38, 41, 42). Diese Hemmung war im gesamten **Verlauf** der Infektion nachweisbar. Zu späteren Zeitpunkten der Infektion kam es allerdings zunehmend zu einer Überlagerung der Apoptoseauslöser Chlamydie und Apoptosegift (siehe Abb. 38, 42). Die Apoptose inhibierende Wirkung der Chlamydien ließ sich deutlicher zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion und bei Verwendung hoher Dosen an Staurosporin oder Etoposid darstellen (siehe Abb.41). Auch kleine **Chlamydienmengen** erreichten noch eine erstaunliche Verminderung der Staurosporinwirkung (Abb. 38, 41). Selbst **UV-inaktivierte** Chlamydien führten noch zu einer erheblichen Reduktion der durch Staurosporin ausgelösten Apoptose (Abb. 38, 41, 42).

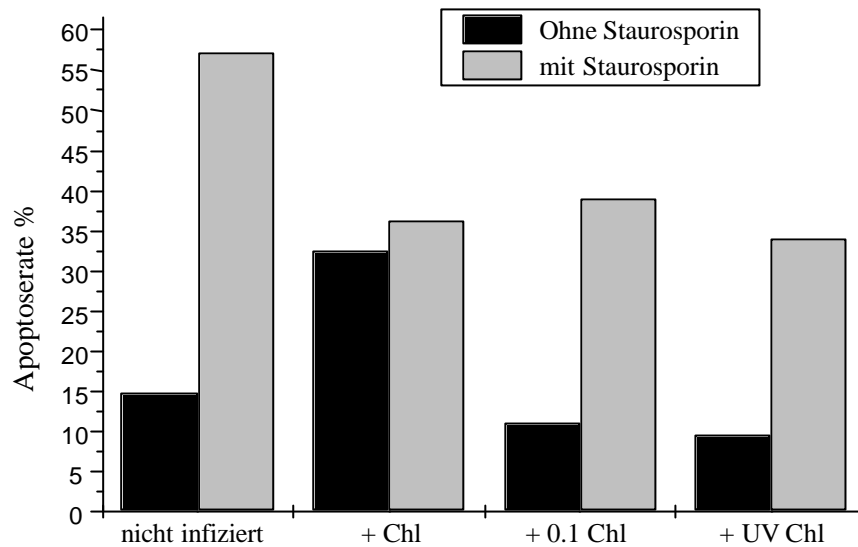


Abb. 38 Beispiel für Apoptoseverhalten der MM6 72 Stunden nach Infektion mit *C. pneumoniae*

Neben der nicht infizierten Negativkontrolle wurden Monozyten mit Chlamydien suspension einer moi von ca. 3 (grob aufgereinigt ATCC1360) wie in Material und Methoden beschrieben infiziert (+ Chl). In je einem weiteren Ansatz wurden ein Zehntel der Ausgangsdosis (+0,1) bzw. mittels UV-Licht inaktivierte Chlamydien eingesetzt (+UV). Am Tag 3 wurde je ein Ansatz 6 Stunden mit Staurosporin inkubiert und anschließend alle Zellen fixiert, gefärbt und am FACS analysiert.

Staurosporinzusatz alleine bewirkte eine Apoptoserate von ca. 55% im Vergleich zu 15% der Negativkontrolle ohne jeden Zusatz. Bei einer Infektionsrate von ca. 50% (+Chl) induzierten Chlamydien alleine Apoptose in ca. 35% der Zellen (+Chl, schwarzer Balken). Zusatz von Staurosporin zu den infizierten Zellen bewirkte nur eine minimale Steigerung der Apoptoserate (+Chl, grauer Balken). Sehr kleine Infektionsdosen (+0.1 Chl) oder inaktivierte Chlamydien (+UVChl) lösten keine Apoptose aus, waren aber in der Lage die Apoptose-Auslösung durch Staurosporin zu verringern.

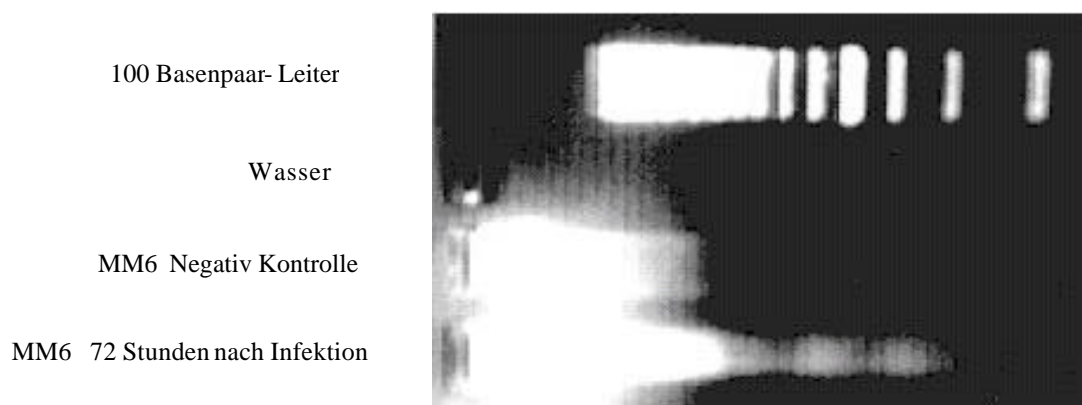


Abb. 39 DNA-Fragmentation infizierter MM6 72 Stunden nach Infektion

Aus infizierten und nicht infizierten Monozyten des unter Abb. 38 beschriebenen Versuchs wurde wie unter Material und Methoden beschrieben DNA aufbereitet und anschließend auf einem Gel aufgetrennt. Auf der Spur der infizierten Zellen (MM6 72 Stunden nach Infektion) ist die durch Apoptose fragmentierte DNA im Gel gewandert während sie bei der nicht infizierten Kontrolle (MM6 Negativ Kontrolle) in der Nähe der Tasche geblieben ist.

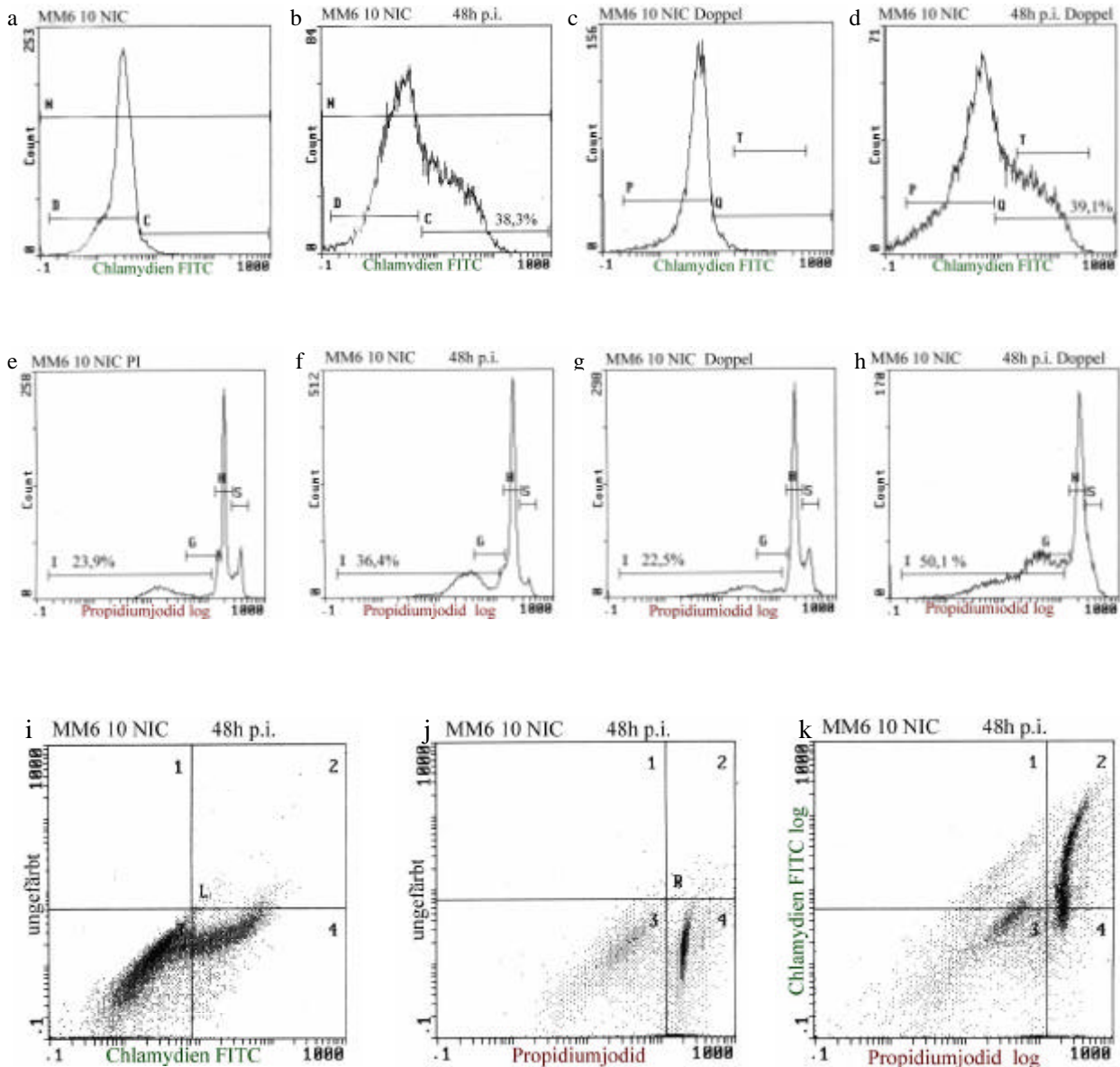


Abb. 40 Vergleich von Einfach- und Doppelfärbungen zur Darstellung der Chlamydieninfektion und Apoptose (Um Apoptosewerte vergleichen zu können, werden neben infizierten MM6 (ATCC1310 48h p.i.), anstatt einer Negativkontrolle, Zellen mit einer Apoptoserate knapp über 20 % gezeigt (alle Zellen sind Nikotin-behandelt)). In der ersten Reihe links sind nicht infizierte (Abb. 40a) und infizierte (Abb. 40b) nur mit Chlamydienfarbstoff gefärbte MM6 dargestellt. Rechts daneben (Abb. 40c, d) sind die gleichen Zellen nach Doppelfärbung mit Chlamydien AK und PI. Anfärbung der Chlamydien führt zu einer Verschiebung nach rechts (Gate C bzw. Q). Es zeigt sich keine signifikante Veränderung der gemessenen Infektionsrate in der Doppelfärbung. In der zweiten Reihe sind die gleichen Zellen nach Einzelfärbung mit Propidiumjodid (PI) (Abb. 40 e, f) und Doppelfärbung mit PI und Chlamydienfarbstoff (Abb. 40 g, h) in einer logarithmischen Skalierung zur Beurteilung der Apoptose dargestellt. Die apoptotischen Zellen mit dem verminderten DNA-Gehalt finden sich in Gate I links. In der dritten Reihe sind infizierte MM6 nach einer Einzelfärbung mit Chlamydienfarbstoff (Abb. 40i), einer Einzelfärbung mit PI (Abb. 40j) und einer Doppelfärbung (Abb. 40k) dargestellt. In der Doppelfärbung lässt sich erkennen, dass eher die nicht infizierten Zellen apoptotisch sind. Obwohl bei dieser Messung in der Doppelfärbung falsch hohe Apoptoseraten gemessen wurden (vergleiche Abb. 40 f und h), lässt sich in der Doppelfärbung klar erkennen, dass die nicht infizierten Zellen in die Apoptose getrieben werden, während die infizierten geschützt zu sein scheinen (Abb. 40k). Infizierte Zellen sind auf der Ordinate nach oben verschoben, apoptotische auf der Abszisse nach links. In Quadrant 2 finden sich also die infizierten nicht apoptotischen Zellen, in Quadrant 3 die apoptotischen nicht infizierten.

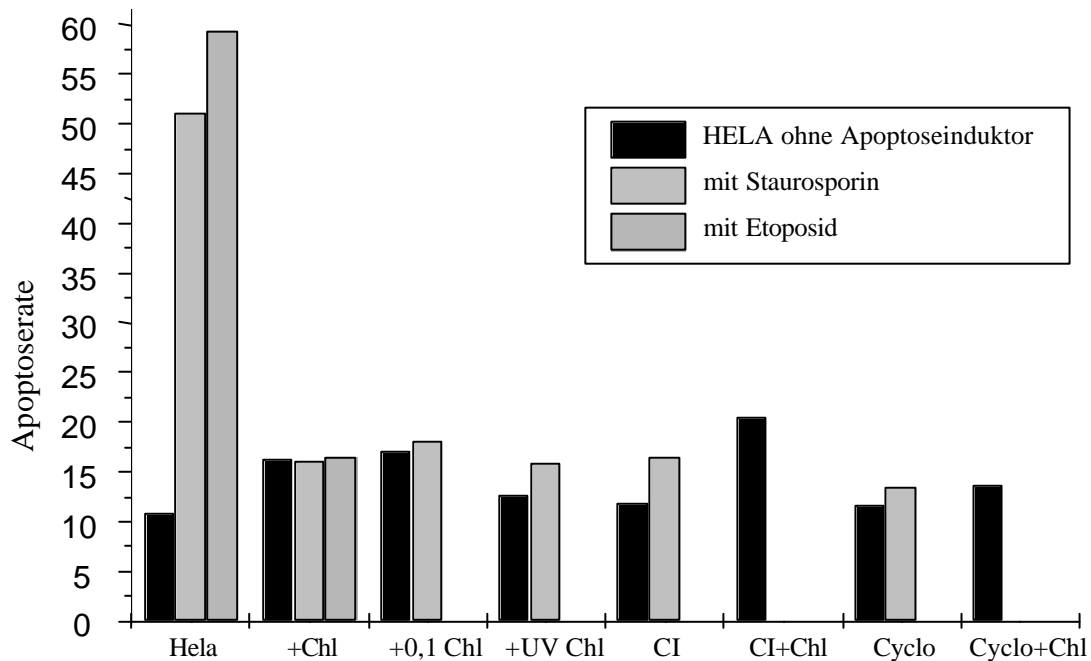
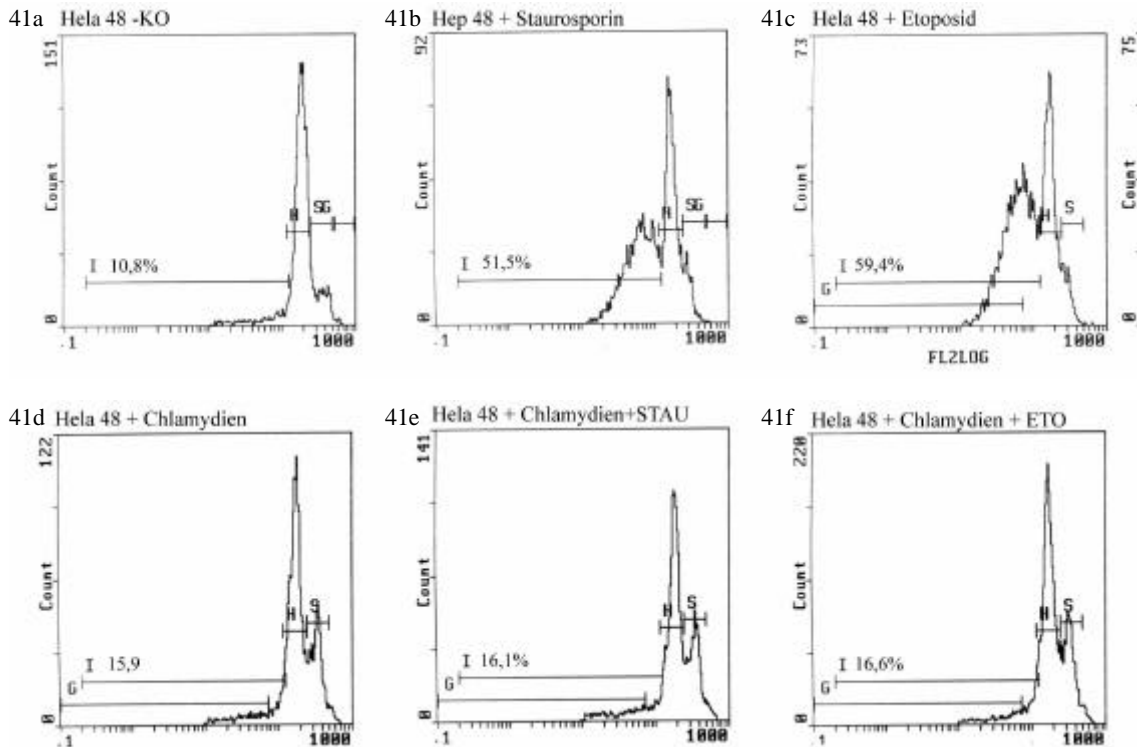


Abb. 41 a-g Beispiel für Apoptoseverhalten der HeLa-Zellen 48 Stunden nach Infektion mit *C. pneumoniae*. HeLa-Zellen wurden mit 1360 Chlamydien suspension in Cycloheximid-freiem Medium mit einer moi von ca. 1,5 infiziert. Einem Teil der Ansätze wurde Caspaseinhibitor (CI) oder Cycloheximid (Cyclo) zugegeben. Weitere Ansätze wurden mit einer moi von 0.15 (+ 0,1 Chl) und UV-inaktivierten Chlamydien (+ UV Chl) infiziert. Nach 48 Stunden wurde ein Teil der Zellen mit der doppelten der sonst üblichen Staurosporin und Etoposiddosen für 6 Stunden inkubiert, so dass auf den nicht infizierten Zellen eine Apoptoserate von 50 bis 60% erreicht wurde (41a, b, c; 41 g: HeLa). Die Chlamydieninfektion alleine bewirkte 48 Stunden nach Infektion eine geringe Steigerung Apoptose (41g: +Chl). Die Staurosporin und Etoposidwirkung war in den infizierten Zellen vollständig aufgehoben (41 d, e, f, 41 g: +Chl). Auch ein Zehntel der normalen Dosis bewirkte noch eine Hemmung der Apoptose (+0.1 Chl). Weder der Zusatz von Caspaseinhibitor (41 g: +CI, +Chl+CI) noch Cycloheximid (41g: Cyclo, Cyclo+Chl) vermochten die (hier nur geringe) Chlamydien induzierte Apoptose zu unterdrücken. Entgegen den Literaturangaben (Fan et al.1998) stellten wir eine Drosselung der Staurosporinwirkung durch Cycloheximid fest (Abb. 41).

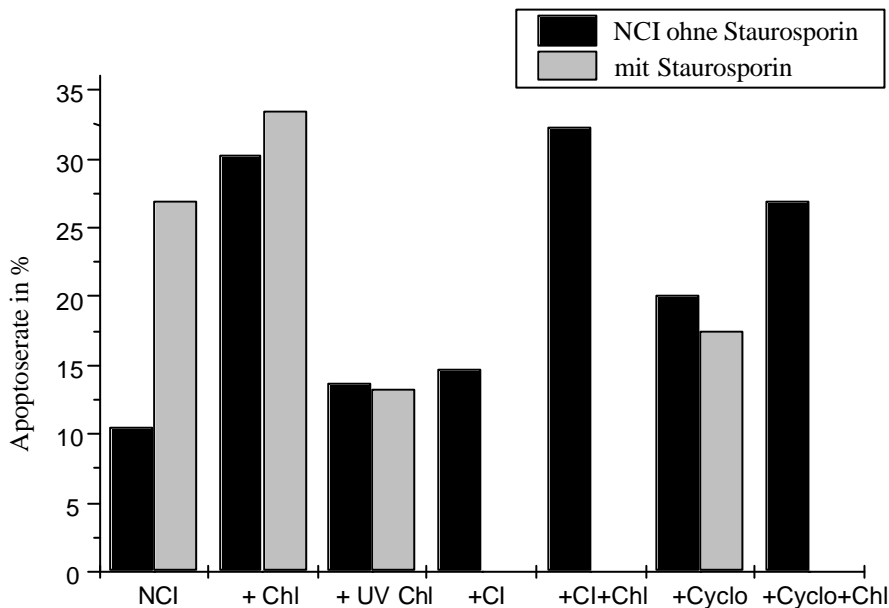
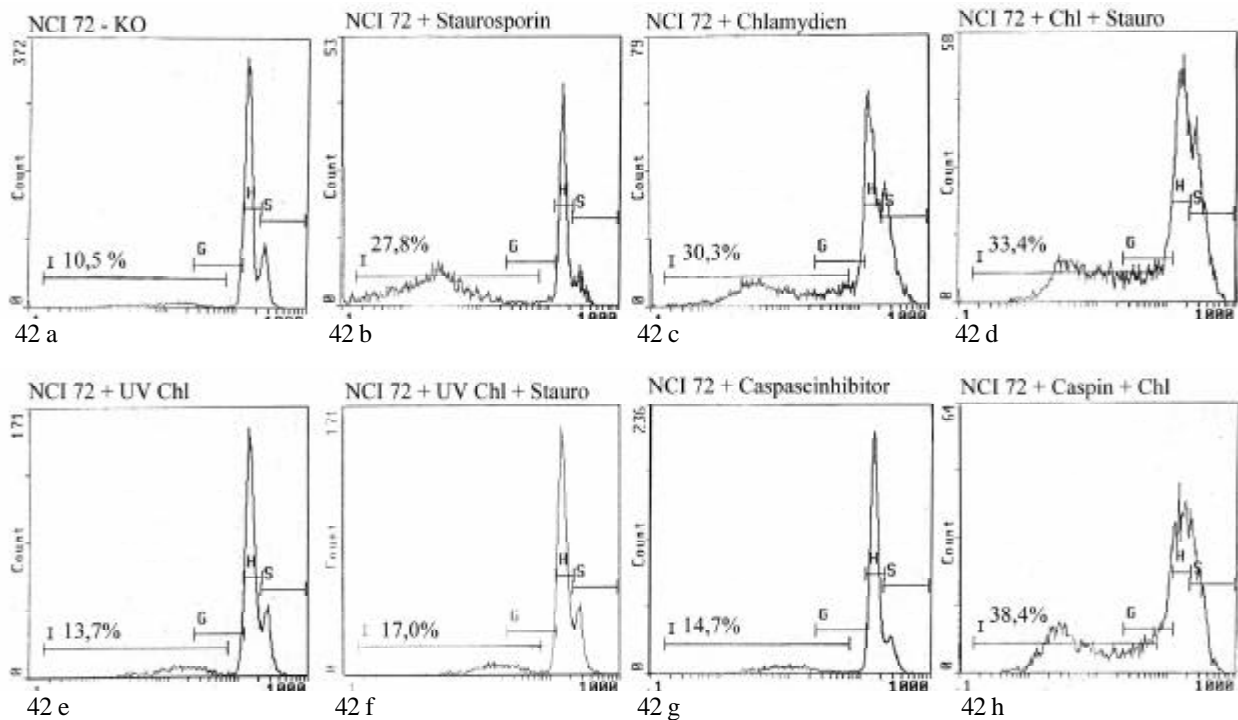


Abb. 42i Zusammenfassung der Messwerte auf der NCI 72 Stunden nach Infektion

Abb. 42 Beispiel für Apoptoseverhalten der NCI 72 Stunden nach Infektion mit *C. pneumoniae*

NCI Zellen wurden mit grob aufgereinigter 1360 Chlamydien suspension mit einer moi von ca. 3 (+Chl) infiziert. Einem Teil der Ansätze wurde Caspaseinhibitor (CI) oder Cycloheximid zugesetzt (Cyclo). Ein weiterer Ansatz wurde mit UV-inaktivierten Chlamydien infiziert (+ UV). Nach drei Tagen wurde je ein Ansatz 6 Stunden mit Staurosporin inkubiert, anschließend alle Zellen fixiert, gefärbt und gemessen.

Bei den nicht infizierten Zellen führte Staurosporin nahezu zu einer Verdreifachung der natürlichen Apoptoserate auf über 25% (42a, b; 42i: NCI). Die Chlamydieninfektion alleine bewirkte eine Apoptoserate von ca. 30 Prozent (42c), die nach Zugabe von Staurosporin nur minimal anstieg (42d, 42i, +Chl). UV-inaktivierte Chlamydien lösten keine Apoptose aus (42e), inhibierten die durch Staurosporin ausgelöste Apoptose hingegen wirkungsvoll (42f, 42i: +UVChl). Durch Zusatz von Caspaseinhibitor zu den infizierten Zellen ließ sich die Chlamydien-induzierte Apoptose nicht unterdrücken (42g, h; 42i: +CI, +Chl+CI). Der Zusatz von Cycloheximid bewirkte alleine schon eine Erhöhung der Apoptoserate, inhibierte die durch Chlamydien ausgelöste Apoptose aber nur minimal (42i: +Cyclo, +Cyclo+Chl).

## VI. Diskussion

### 1. Optimierung des Anzuchtverfahrens

#### 1.1. Einfluss der Infektionsdosis auf Infektionsrate

Im Bereich niedriger Infektionsdosen stieg die Anzahl der sich bildenden Einschlusskörper direkt proportional mit der eingesetzten Dosis, um bei höheren Dosen abzuflachen und schließlich sogar wieder abzufallen. Ab einer Dosis von einer Chlamydie pro Zelle bewirkte eine zusätzliche Steigerung der Dosis keine Steigerung der Infektionsrate mehr, bei Erhöhung über 3 Chlamydien pro Zelle kam es zu einem Abfall der Infektionsrate.

Eine Erklärung für den Abfall der Infektionsrate ist, dass es mit zunehmender Dosis immer häufiger zu Doppelinfectionen einzelner Zellen kommt und sich hierbei nicht immer beide Chlamydien zu getrennten Einschlusskörpern entwickeln. Der Abfall der Infektionsrate bei weiterer Erhöhung der Infektionsdosis, lässt sich mit der Schädigung der Zellen durch einen zytotoxischen Effekt der Chlamydien erklären.

Aus den Ergebnissen ergibt sich, dass die Infektionsdosis durch Auszählen der Einschlusskörperzahlen bei verschiedenen Konzentrationen und anschließendem Interpolieren ermittelt werden muss. Als weitere Konsequenz dieser Versuche ergab sich die Notwendigkeit, die zu untersuchenden Parameter bei unterschiedlichen Dosen zu vergleichen, um Artefakte zu vermeiden.

#### 1.2. Vergleich verschiedener Zellarten

Seit man begonnen hatte, *C. trachomatis* nicht mehr im Dottersack von Hühnerembryos, sondern in Zellkulturen zu züchten, waren die verschiedensten Zelllinien auf ihre Eignung zur Anzucht von *C. trachomatis* und später auch *C. pneumoniae* getestet worden. Als geeignet erwiesen sich McCoy-, (maligne Maus-Fibroblasten), HTED-, HeLa, HL- (menschliche Epitheloidzelle unklarer Abstammung), GMK- (durch spontane Mutation von green monkey kidney abstammende, epitheloid wachsende Zelle), NCI H292 (menschliches Bronchial-CA), Detroit 562 (Pharynxkarzinom), FaDu (Pharynxkarzinom) und die Hep-2-Zelle (Kuo *et al.* 1972;Croy *et al.* 1975;Rota 1977;Sabet *et al.* 1984;Cles & Stamm 1990;Roblin *et al.* 1992;Maass & Harig 1995;Kuo & Grayston 1990a).

Zu Beginn unserer Untersuchungen galten HeLa-Zellen als Standardzellen für die Anzucht von *C. pneumoniae*. Es lagen aber bereits Berichte vor, dass Hep-2 Zellen besser geeignet sind. So zeigten Arbeitsgruppen um Wong und Roblin, dass die Hep-2 Zellen höhere Ausbeuten an Chlamydien ermöglichen, als die üblichen HeLa-Zellen (Wong *et al.* 1992;Roblin *et al.* 1992). Auch Maaß bestätigte die Überlegenheit der Hep-2 Zelle gegenüber der HeLa-Zelle und fand noch eine weitere Zelllinie (NCI 292), die gleichwertige Anzuchtergebnisse wie die Hep-2 Zelle lieferte (Maass & Harig 1995). Die früheren Voruntersuchungen waren aber zum Teil widersprüchlich. Anzuchtmethoden unterschieden sich von Labor zu Labor (Pate & Hook 1995). Zelllinien mit gleicher Bezeichnung wurden in unabhängigen Labors mit unterschiedlichem Erfolg verwendet.

Wir verglichen daher die drei -laut Literatur am besten geeigneten- Zelllinien (HeLa, Hep-2 und NCI) bezüglich Wachstumsverhalten, Infizierbarkeit und Chlamydienausbeute in den Universalmedien MEM und RPMI.

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten der Zellen in unterschiedlichen Medien getestet. HeLa und Hep-Zellen wuchsen in MEM-Medium etwa doppelt so schnell wie im RPMI Medium, während die NCI-Zellen in RPMI-Medium deutlich besser wuchsen als in MEM Medium (Tabelle 2). Für die Vermehrung der Zellen war es also, trotz Mehraufwand und Preisdifferenz der Medien lohnend die jeweiligen Optimalmedien zu verwenden.

Im nächsten Schritt wurde die Chlamydienausbeute in den unterschiedlichen Medien bei Verwendung unterschiedlicher Medien ermittelt.

Bei allen Zellsorten lag die Anzahl der Einschlusskörper im Optimalmedium in etwa doppelt so hoch wie im jeweils anderen „Universalmedium“. Auf NCI-Zelle und Hep-Zelle ließen sich unter jeweils optimalen Bedingungen gleichwertige Anzuchtergebnisse erzielen (Abb. 6). Wie schon bei Wong et al. (Wong *et al.* 1992) und Maaß et al. (Maass & Harig 1995) erwies sich die HeLa-Zelle auch in unserem Labor als unterlegen (Abb. 6). Die NCI Zelle erlaubte in diesem wie in späteren Versuchen eine um etwa 5% höhere Ausbeute an Chlamydien als die Hep-2 Zelle. Der entscheidende Vorteil der NCI-Zelle gegenüber der Hep-Zelle liegt in der allgemein größeren Robustheit. Die NCI Zelle überlebte weitaus längere Zeiten als Hep-2 und HeLa Zelle ohne Umsetzen und Mediumwechsel ohne Zeichen der Schädigung. Sie tolerierte des Weiteren eine großzügigere Handhabung der Infektionsdosis. Auf der Hep-Zelle führten hohe Infektionsdosen zu einer Beschleunigung der Chlamydienreifung, oder sogar zu einem kompletten Sistieren des Wachstums. Auf der NCI Zelle war die Menge der gebildeten Chlamydien und ihre Reifungsgeschwindigkeit ab einer bestimmten Mindestdosis weitgehend unabhängig von Schwankungen der Infektionsdosis. Während in der Hep-Zelle die einzelnen Einschlusskörper meist getrennt voneinander heranreifen, kam es in der NCI-Zelle nach 24-48 Stunden zur Verschmelzung und Bildung eines einzigen großen EK (siehe Bild 4). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die NCI-Zelle insbesondere für in der Chlamydienanzucht weniger erfahrene Labors besser geeignet ist als die im Moment allgemein verwendeten HeLa-Zellen.

### **1.3. Zentrifugation**

Es war bekannt, dass Zentrifugation eine Steigerung der Infektionsrate bei *C. trachomatis* bewirkt. Diese Beobachtung war auch für *C. pneumoniae* für einige Zelllinien gezeigt worden (Kuo & Grayston 1990a). Dies konnte hier auch für die bisher nicht untersuchte Hep-2 und NCI-Zelle bestätigt werden. Vermutlich gelangen durch die Zentrifugation die Chlamydien in die Nähe der Zellen und können elektrostatischen Abstoßungskräfte leichter überwinden.

#### **1.3.1. Zentrifugationsdauer**

Der positive Effekt durch Verlängerung der Zentrifugationsdauer war für *C. trachomatis* belegt (Pate & Hook 1995). Auch für *C. pneumoniae* lagen solche Hinweise bereits vor (Tjhie *et al.* 1997), allerdings nicht für die von uns verwendeten Zellen.

Wir konnten zeigen, dass Zentrifugation unabdingbar ist und, dass eine Verlängerung der Zentrifugationsdauer bis ca. 80 min eine Steigerung der Infektionsrate bewirkt. Schon nach 20 min Zentrifugieren werden allerdings 70% der maximalen Infektionsrate erreicht (siehe Abb. 7).

Für die Anzucht von kleinen Mengen Chlamydien aus Patientenproben ist es daher empfehlenswert, 80 min zu zentrifugieren. Für die Routinevermehrung von *C. pneumoniae* ist es zu verantworten die Zentrifugationsdauer auf eine halbe Stunde zu reduzieren und dafür die Infektionsdosis leicht anzuheben.

### 1.3.2. Temperatur

Dass die Erhöhung der Temperatur von 18° auf 33°C während der Zentrifugation einen günstigen Einfluss auf die Anzucht von *C. trachomatis* hat, war bekannt (Rota ), und bereits für *C. pneumoniae* bestätigt worden (Bong R 1996). Für uns war interessant, ob es einen deutlich negativen Effekt auf die Chlamydienausbeute hat, wenn man aus Zeitgründen auf das Vorwärmen der Zentrifuge verzichtet.

Wir konnten die beschriebene Verbesserung der Anzuchtergebnisse durch Anhebung der Temperatur auf 35°C auch für Hep-Zellen bestätigen (siehe Abb. 8). Die Infektionsrate ließ sich um 10-30% anheben. Bei Anzuchtversuchen kleiner Chlamydienmengen lohnt es sich also durchaus, die Zentrifuge vorzuwärmen. Bei der Routine-Vermehrung kann man auf das Vorwärmen der Zentrifuge aber verzichten. Die Verluste lassen sich gut durch eine gewisse Verlängerung der Zentrifugationszeit z.B. von 30 auf 40 min. ausgleichen. Diese Einschätzung wurde in der Routinevermehrung bestätigt.

### 1.3.3. Zentrifugations-Geschwindigkeit

Es ist nahe liegend, dass eine Erhöhung der Geschwindigkeit zu einer Steigerung der Infektionsrate führt. Dies ist sowohl für *C. trachomatis*, als auch für *C. pneumoniae* gründlich belegt (Rota ;Kuo & Grayston 1988;Kuo & Grayston 1990a).

Wir verzichteten daher auf weitere Untersuchungen dieses Parameters, und wählten standardmäßig 2000g, die maximal mögliche Geschwindigkeit, als Zentrifugations-Geschwindigkeit.

### 1.4. Erntezeitpunkt

Es ist allgemein üblich, die Chlamydien nach 72 Stunden zu ernten und einen neuen Infektionszyklus anzusetzen. Es lagen aber widersprüchliche Berichte vor, ob eine Verlängerung der Kulturdauer zu einer höheren Infektionsrate führt. Maaß konnte keinen Anstieg der Einschlusskörper durch Verlängerung der Kulturdauer bis 7 Tage feststellen (Maass & Harig 1995). Diesen Ergebnissen widerspricht eine Gruppe aus Amsterdam. Sie fand einen Anstieg der Einschlusskörper um das fünffache durch Verlängerung der Kulturdauer von 3 auf 7 Tage (Birtles *et al.* 1997;Tjhe *et al.* 1997). In beiden Untersuchungen wurde ausschließlich die Anzahl der Einschlusskörper betrachtet. Die Zahl der infektiösen Chlamydien pro Einschlusskörperchen kann allerdings erheblich schwanken.

Wir untersuchten deshalb die Ausbeute an Chlamydien zu verschiedenen Erntezeitpunkten anhand einer weiteren anschließenden Infektion (Abb. 9, 10). Der optimale Erntezeitpunkt lag bei 3 Tagen. Die Ausbeute fiel aber bei niedrigen bis mittleren Infektionsdosen im Laufe eines weiteren Tages nur minimal.

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse von Tihje *et al.* und uns könnte sein, dass deren Chlamydien in der Lage waren neue Zellen ohne Zentrifugation zu infizieren und so freigesetzte Chlamydien neue EK bildeten, während die mit den von uns verwendeten Chlamydien ohne Zentrifugation keine Infektion der Zuchtzellen erreicht wurde (siehe Abschnitt 1.2. Zentrifugation). Möglicherweise waren die Chlamydien in dem Anzuchtverfahren mit Zentrifugation entsprechend selektiert worden.

Im Rahmen der Anzucht ist es also ohne weiteres zu verantworten, auch nach vier Tagen zu ernten, und damit in einem flexiblen 3 Tage - 4 Tage Rhythmus zu infizieren.



## 1.5. Monolayer vom Vortag versus frisch trypsinierte Zellsuspension

Zu der Frage ob mit Zellsuspensionen bessere Infektionsraten als mit Monolayern zu erreichen sind, lagen widersprüchliche Ergebnisse vor. Zur Anzucht von *C. trachomatis* scheinen Zellsuspensionen besser geeignet (Oyelese *et al.* 1987). Für *C. pneumoniae* lagen zu dieser Fragestellung zwei Veröffentlichungen vor. Renate Bong kam zu dem Ergebnis, dass bei Verwendung von GMK- und McCoy-Zellen, Zellsuspensionen gegenüber Monolayern vorteilhafter sind (Bong R 1996). Für HL- und HeLa-Zellen konnte sie zunächst keinen Unterschied feststellen. Durch Vorschalten einer leichten Zentrifugation (39g, 15 min) vor die eigentliche Zentrifugation (2000g, 1h) erzielte sie signifikant bessere Resultate mit Zellsuspensionen gegenüber Monolayern bei allen verwendeten Zelllinien. Maaß stellte je nach Zelltyp 15 bis 32-fach höhere Infektionsraten bei Monolayern gegenüber Zellsuspensionen fest (15-fach bei Hep-2; 21-fach bei NCI-H 292; 16-fach bei HL).

Vorteil der Zellsuspension ist, dass die Vorbereitung des Monolayers am Vortag nicht nötig ist. Es ermöglicht so kurzfristigeres Anlegen von Kulturen bei Anzuchtversuchen von Chlamydien aus Patientenmaterial. Auch für die Massenanzucht brächte die Suspensionsmethode Arbeitserleichterung und die Möglichkeit größere Zellmengen zu infizieren.

Leider ließen sich weder in dem unter Tabelle 1 gezeigten noch in einer Reihe weiterer Versuche (Daten nicht gezeigt) mit Suspensionsmethoden annehmbare Infektionsraten erreichen. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen von Maaß *et al.* (Maass & Harig 1995), widersprechen allerdings den auf anderen Zelltypen gewonnen Ergebnissen von Bong (Bong R 1996).

Wie Maaß verwendeten wir Chlamydien, die durch Zentrifugation auf Monolayern gewonnen worden waren. Durch dieses Verfahren könnten Chlamydien selektioniert worden sein, die für eine erfolgreiche Infektion auf Zentrifugation angewiesen sind. Denkbar ist auch, dass durch die Trypsinbehandlung der Zellen bei der Herstellung der Suspension, Moleküle von der Zelloberfläche gelöst oder blockiert werden, die für die Anhaftung von *C. pneumoniae* wichtig sind. Gegen diese Theorie spricht, dass die Empfindlichkeit von HL Zellen gegenüber *C. pneumoniae* durch Trypsin gesteigert werden kann (Kazuyama *et al.* 1997). Die unterschiedlichen Befunde könnten aber mit der Verwendung verschiedener Zelllinien zusammenhängen. Die Zellen unterscheiden sich vermutlich in ihrer Rezeptorausstattung und sind damit unterschiedlich „empfindlich“ gegenüber Trypsin. Die unterschiedlichen Ergebnisse für *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* könnten damit erklärt werden, dass diese beiden Stämme schwerpunktmäßig über unterschiedliche Rezeptoren andocken. Für *C. trachomatis* konnte bereits gezeigt werden, dass die Anhaftung der Chlamydien über unterschiedliche Rezeptoren möglich ist (Chen & Stephens 1997).

Für unsere Arbeit ergab sich, dass für die Vermehrung von Chlamydien auf die Herstellung eines Monolayers nicht verzichtet werden kann.

## 1.6. Dichte des Zellrasens

Über den Einfluss der Dichte des Zellrasens bei der Anzucht von Chlamydien lagen bisher keine Veröffentlichungen vor. Auch in jüngsten Untersuchungen wurde selbstverständlich davon ausgegangen, dass ein konfluenter Zellrasen die besten Ergebnisse bringt (Maass & Harig 1995).

In unseren Versuchen ermöglichte ein subkonfluenter Zellrasen höhere Chlamydienausbeute als ein konfluenter Zellrasen (Abb. 11, 12).

Ein Grund für unsere Ergebnisse könnte darin liegen, dass die Einzelzelle in einem dünneren Rasen größer ist und damit mehr Chlamydien Raum zum Wachsen bietet. Gleichzeitig ist auch die für Elementarkörperchen erreichbare Oberfläche

größer. Möglich ist auch, dass in den Zellen trotz Cycloheximid-Behandlung noch Abwehrsysteme aktiviert werden, die durch näheren Kontakt zwischen den Zellen weiter verstärkt werden.

Für die Routinevermehrung sollte also ein subkonfluenten Zellrasen angestrebt werden. Ein sehr dünner Rasen mit großen Lücken sollte aber vermieden werden, da hier die Chlamydienausbeute wieder sinkt.

### **1.7. Dauer der Inkubation vor dem Zentrifugieren**

Es war anzunehmen, dass höchste Infektionsraten mit der Zentrifugation frisch geernteter Chlamydien zu erreichen sind, da die Vitalität der Elementarkörper außerhalb einer Zelle rasch abnimmt (Maass & Dalhoff 1995). Bisher lagen zum Einfluss der Inkubation der Zellen mit Chlamydien vor dem Zentrifugieren keine Daten vor.

Erstaunlicherweise bildeten sich nach allen Vorinkubationszeiten zwischen 0 und 6 Stunden unabhängig von der Inkubationstemperatur gleich viele Einschlusskörperchen (Abb. 13). Bei Vorinkubationszeiten über 8 Stunden kam es in weiteren Versuchen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Teilweise fanden sich mit den Kontrollen vergleichbare Raten, teilweise aber auch niedrigere (Daten nicht gezeigt).

Bei den bisher üblichen Verfahren werden pro Zentrifuge vier 6-Loch-Platten mit einer frisch hergestellten Chlamydien suspension infiziert und gleich anschließend zentrifugiert. Das Herstellen einer frischen Infektionssuspension bedeutet einen erheblichen Arbeitsaufwand, und birgt Kontaminations-Gefahren in sich. Unsere Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, in einem einzigen Arbeitsschritt bei einer großen Zahl von vorbereiteten 6-Well das Anzuchtmedium gegen Infektionsmedium auszutauschen, und diese dann nacheinander innerhalb von 6 Stunden zu zentrifugieren. Damit ist es möglich in einem einzigen Arbeitsschritt bei nahezu gleichem Arbeitsaufwand und verringerter Kontaminations-Gefahr die 12-fache Menge an 6-Loch-Platten zu infizieren (bei 30 min Zentrifugationsdauer). Es erlaubt weiterhin eine flexiblere Zeiteinteilung falls die Zentrifuge wie in unserem Fall für verschiedenste Zwecke gebraucht wird.

### **1.8. Vorinkubation mit Cycloheximid**

Cycloheximid hemmt die Proteinbiosynthese der Eukaryonten. Es behindert auf diese Weise die Abwehrfunktionen der Zelle und ermöglicht den Chlamydien ein ungestörtes Wachstum. Es war nun denkbar, dass eine Vorinkubation der Kulturzellen mit Cycloheximid durch das frühzeitige Abschalten der Abwehrfunktionen der Kulturzellen das Angehen der Chlamydien begünstigt. Es zeigte sich aber, dass es durch Vorinkubation mit Cycloheximid zu einer deutlichen Verminderung der Infektionsrate kam (Abb. 14).

Der Grund hierfür könnte sein, dass für eine erfolgreiche Infektion die aktive Aufnahme der Chlamydie durch die Zelle nötig ist. Dieser Aufnahmemechanismus wäre durch Cycloheximid genauso wie die Abwehrfunktionen der Zelle gehemmt. Bis jetzt ist nicht geklärt auf welche Weise die Chlamydie in die Zelle gelangt. Für *C. psittaci* und *C. trachomatis* gibt es deutliche Hinweise, dass es sich um aktive Endozytose-ähnliche Mechanismen handelt (Stephens *et al.* 2000a; Hackstadt *et al.* 1997). Es ist anzunehmen, dass auch *C. pneumoniae* durch solche aktive mittels Cycloheximid hemmbare Transportmechanismen in die Zelle gelangt.

### **1.9. Inkubation der Chlamydien ohne Cycloheximid**

Unter der Annahme, dass Chlamydien durch die Zelle aktiv aufgenommen werden schien es denkbar, dass eine spätere Zugabe von Cycloheximid zu höheren Infektionsraten führt. In den bisher beschriebenen Verfahren wurde die Chlamydien suspension entweder bereits in Infektionsmedium, d.h. mit Cycloheximid auf den Zellrasen aufzentrifugiert,

oder das Cycloheximid-haltige Infektionsmedium wird gleich nach der Zentrifugation hinzu gegeben (Maass & Harig 1995; Roblin *et al.* 1992; Theunissen *et al.* 1992).

Die Infektionsrate zeigte in unseren Versuchen (Abb. 15) keinerlei Veränderung durch Inkubation des Zellrasens mit Chlamydien suspension ohne Cycloheximid.

Die aktiven für die Aufnahme der Chlamydie wichtigen Prozesse die durch Cycloheximid gehemmt werden (siehe 1.7. Vorinkubation mit Cycloheximid) finden wohl relativ rasch statt. Bei gleichzeitiger Zugabe von Cycloheximid und Chlamydie scheinen diese Mechanismen noch vollständig abzulaufen, bevor das Cycloheximid in der Zelle seine Wirkung entfaltet. Möglicherweise sind in dem Zentrifugationsverfahren nach der schnellen Bindung der Chlamydie an präformierte Moleküle der Zelle keine großen Zellaktivitäten mehr notwendig, da die Aufnahme durch die Zentrifugation begünstigt wird.

Die einfachste Methode mit geringstem Arbeitsaufwand und damit auch geringster Kontaminations-Gefahr ist also, den Zellrasen direkt mit Chlamydien in Cycloheximid-haltigem Infektionsmedium zu infizieren.

### **1.10. Auswechseln des Infektionsmediums**

Es ist allgemein üblich, das Infektionsmedium direkt nach der Zentrifugation oder nach 24 Stunden gegen frisches Infektionsmedium auszutauschen (Kuo & Grayston 1990b; Maass & Harig 1995). Argumente hierfür sind die Entfernung potentiell zellschädigender Substanzen (wie Zellschrottreste oder Transportmedium bei der Anzucht aus Patientenproben) und die Zufuhr frischer Nährstoffe.

Wir konnten keinen Unterschied in der Infektionsrate oder der Größe der Einschlusskörper bei den unterschiedlichen Behandlungen feststellen (Abb. 16).

Auf den Austausch des Mediums kann also bei Verwendung des beschriebenen Standardverfahrens verzichtet werden. Dies bedeutet eine erhebliche Arbeitserleichterung, Ersparnis an Medium und Verminderung der Kontaminations-Gefahren.

### **1.11. Infektiosität des Überstandes**

Soweit in Veröffentlichungen angegeben, wird der Überstand im Allgemeinen verworfen. Da die Aufreinigung der Chlamydien umso effizienter ist, je konzentrierter die Chlamydien in der Ausgangssuspension sind lohnt es sich, den Überstand zu verworfen, falls dieser nur geringe Chlamydienmengen enthält.

Wir fanden in verschiedenen Versuchen, besonders bei hohen Infektionsraten und späten Erntezeitpunkten große Mengen an infektiösen Chlamydien im Überstand (Daten nicht gezeigt).

Auf eine genaue Auswertung verzichteten wir und begnügten uns mit der Erkenntnis, dass teilweise große Mengen an Chlamydien in freier Form vorliegen und es sich daher lohnt den Überstand zu retten. Durch die spätere Zentrifugation der gewonnenen Chlamydien-Zellsuspension werden alle Chlamydien dann auf ein kleines Volumen reduziert (siehe Methoden: 4. Aufreinigungsverfahren).

### **1.12. Wiederholtes Zentrifugieren versus Zweitzyklus**

Es lagen bereits Überlegungen zur Verbesserung der Anzucht kleiner Chlamydienmengen, z.B. aus Patientenmaterial vor. Tjhie und Mitarbeiter sahen eine Zunahme der Chlamydien nach Verlängerung der Kulturdauer auf 7 Tage (Tjhie *et al.* 1997). Eine Möglichkeit die Infektionsrate der Dauerkultur weiter zu steigern, bestand in der täglichen

Zentrifugation der Kulturgefäße (Tjhie *et al.* 1997). Maaß und Mitarbeiter stellten in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen (siehe 1.3. Erntezeitpunkt) keine Vermehrung der Chlamydien durch Verlängerung der Kulturdauer fest. Sie schlagen wiederholte Ernten und weitere Kulturpassagen vor (Maass & Harig 1995). Im Oktober 1999 wurde nochmals bestätigt, dass wiederholtes Zentrifugieren zu einer massiven Vermehrung der Einschlusskörper führt, während eine bloße Verlängerung Kulturdauer keinen Erfolg bringt (Pruckler *et al.* 1999).

Die beiden Methoden, Umsetzen nach 72 Stunden versus Dauerkultur mit täglicher Zentrifugation, waren bisher nicht verglichen worden.

Bei unseren Versuchen konnten durch Ernte nach 72 Stunden und Weiterinfektion entschieden mehr Chlamydien als durch tägliches Zentrifugieren gewonnen werden (Abb. 17 a-c). Die Überlegenheit der Ernte-72-Methode war besonders ausgeprägt bei niedrigen Infektionsdosen, wie sie bei der Isolierung von Chlamydien aus Patientenmaterial zu erwarten sind. Bei der Ernte-72-Methode befanden sich alle EK am Tag 6 im gleichen Ernte reifen Entwicklungszustand, während die EK bei der Zentrifugationsmethode nach 6 Tagen in den verschiedensten Stadien vorlagen und damit nur zu einem Teil infektiöse Chlamydien enthielten.

Der Grund für die besseren Erfolge der Ernte-72-Methode könnte sein, dass die Chlamydien 72 Stunden nach Infektion ihr Wachstum im wesentlichen einstellen aber, obwohl schon infektiös, erst erheblich später, freigesetzt werden. Durch das Aufschließen der Zellen nach 72 Stunden und Weiterinfektion erhalten sie die Möglichkeit in einem neuen Rasen weiter zu wachsen. Weitere Gründe sind vermutlich, dass der Zellrasen durch wiederholte Zentrifugation und Infektion geschädigt wird und, dass sich die freigesetzten Chlamydien nicht gleichmäßig im Medium verteilen und damit nur wenige Zellen in ihrer Nachbarschaft infizieren.

### **1.13. Weitere mögliche Einflussfaktoren**

#### **1.13.1. Polyethylenglykol (PEG), DEAE-Dextran, Trypsin und EDTA**

Es lagen Berichte vor, nach welchen sich die Infektionsraten durch Vorbehandlung der Kulturzellen mit DEAE-Dextran (Kuo *et al.* 1972;Tjhie *et al.* 1997) Trypsin und EDTA (Kazuyama *et al.* 1997) steigern lässt. Es bestand die Annahme, dass durch diese Behandlungen abstoßende Kräfte zwischen Chlamydie und Zelle verringert werden. Wir stellten Versuche in dieser Richtung zunächst hinten an, da wir davon ausgingen, dass eine hochoptimale Zentrifugation ausreicht die Abstoßungskräfte zu überwinden. Die Wirkung von DEAE-Dextran bei gleichzeitiger Zentrifugation war schon vor Beginn unserer Untersuchungen mehrfach negativ beurteilt worden (Bong R 1996;Roblin *et al.* 1992). Nach Abschluss unserer Arbeiten erschien eine Untersuchung, die unsere Vermutungen auch für PEG und Trypsin bestätigte (Pruckler *et al.* 1999). Bei Zentrifugations-Geschwindigkeiten von 1000g konnte weder durch PEG- noch durch Trypsin-Behandlung die Sensibilität von Hep-2-Zellen für die Infektion mit *C. pneumoniae* erhöht werden (Pruckler *et al.* 1999).

#### **1.13.2. Temperatur des Brutschrankes**

Kuo *et al.* kamen 1988 bereits zu dem Ergebnis, dass eine Erniedrigung der Brutschranktemperatur von 37°C auf 35°C zu einer Verdoppelung der Einschlusskörperzahl führte (Kuo & Grayston 1988). Da uns mit nur einem Brutschrank die Möglichkeiten fehlten, unterschiedliche Brutschranktemperaturen zu vergleichen, übernahmen wir 35° als Temperatur.

#### **1.13.3. Cycloheximid**

Es ist seit 1977 bekannt, dass eine Hemmung der Zellproteinsynthese durch Cycloheximid die Sensitivität der Zellenkultur für Chlamydien steigt. Dies wurde auch für *C. pneumoniae* bestätigt (Kuo & Grayston 1990a). Die Cycloheximidchargen variieren allerdings in der Wirkstärke von zu Labor und Labor (Bong R 1996). Im Allgemeinen

werden Dosen zwischen 0,5 und 1,5 µl/ml eingesetzt. Bei unseren Chargen lag auf der Hep-Zelle das Optimum der Cycloheximidkonzentration bei 0,8 µl/ml. Wir stellten allerdings bei längerer Lagerung des gelösten Cycloheximid im Kühlschrank ein Nachlassen der Wirkung fest (Daten nicht gezeigt). Zu empfehlen ist also neue Cycloheximidchargen zu testen und Cycloheximidlösungen nicht länger als 2 Wochen bei Kühlschranktemperatur zu lagern.

#### 1.13.4. FCS

In Transportmedien erhöht FCS die Überlebensrate von Chlamydien (Maass & Dalhoff 1995; Theunissen *et al.* 1992). Die Infektion selber ist effektiver in FCS freiem Medium. HeLa-Zellen sind in FCS-freiem Medium 10-50 mal empfänglicher für Chlamydieninfektionen als in FCS-haltigem Medium (Maass *et al.* 1993). Vermutlich führt der Nährstoffmangel zusätzlich zur Cycloheximidwirkung zur Inhibierung der Proteinsynthese und damit Schwächung der Abwehrleistung (Maaß *et al.* 1993). Wir fanden in auch für die Hep-2-Zelle eine erhöhte Sensibilität in FCS-freiem Medium (Daten nicht gezeigt), und führten daraufhin unsere Anzuchtversuche in FCS-freiem Medium durch.

#### 1.13.5. Lysin; Methionin

Die Verminderung von Lysin und Methionin soll laut Kuo *et al.* zu einer erhöhten Sensibilität von HeLa und McCoy-Zellen für *C. pneumoniae* führen (Kuo & Grayston 1990b). Vermutlich vermindert ein Mangel dieser Aminosäuren die Abwehrleistung der Zellen durch Hemmung der Proteinsynthese, während dieser Mangel die Chlamydien nicht beeinträchtigt. Wir gingen davon aus, dass durch Cycloheximid und FCS-Entzug die Proteinsynthese der Zellen schon weitgehend inhibiert ist und verzichteten auf Experimente in dieser Richtung. (Bei den genannten Untersuchungen zu Aminosäureentzug wurde ohne Cycloheximid und mit FCS gearbeitet).

### 1.14. Optimale Anzuchtmethode

Sowohl für die Anzucht kleiner Chlamydienmengen als auch für die Massenzucht von Chlamydien empfiehlt es sich Hep-2 oder NCI-Zellen anstatt der bisher meist verwendeten HeLa-Zelle zu verwenden und diese subkonfluent aus zu sähen. Insbesondere für die Etablierung des Anzuchtverfahrens empfiehlt sich die Verwendung der NCI-Zelle, da sie besonders robust ist und auch bei hohen Infektionsdosen nicht mit Nekrose reagiert sondern relativ konstante Anzuchtmengen ermöglicht. Die Chlamydien können gleich in Cycloheximid-haltigem Infektionsmedium aufzentrifugiert werden. Ein Austausch des Infektionsmediums anschließend an die Zentrifugation ist nicht nötig. Inkubation der Zellen vor Infektion mit Cycloheximid bringt ebenso wenig einen Vorteil, wie einen verlängerte Inkubation der infizierten Zellen in Cycloheximid-freiem Medium nach Zentrifugation.

Um optimale Bedingungen für die **Anzucht kleiner Chlamydienmengen** aus Patientenmaterial zu erreichen, sollten die infizierten Zellen 80 Minuten bei 2000g in einer auf 37°C vorgewärmten Zentrifuge zentrifugiert werden. Um die Sensitivität zu erhöhen, sollten die Zellen nach 72 Stunden, wie in Material und Methoden beschrieben, aufgeschlossen werden, und die Ernte in einen weiteren Zyklus eingesetzt werden. Hierbei sollte auch der Überstand verwendet werden, da sich auch im Überstand freigesetzte Chlamydien befinden können. Mit dem hier beschriebenen Verfahren lässt sich die Chlamydienausbeute besonders im Bereich niedriger Infektionsdosen im Vergleich zu bisher beschriebenen Standardmethoden vervielfachen.

Für die **Anzucht großer Chlamydienmengen** kann das Verfahren erheblich vereinfacht werden. Bei Anhebung der Infektionsdosis um etwa 20% kann die Zentrifugationszeit bei gleich bleibender Chlamydienausbeute auf eine halbe Stunde in einer nicht vorgewärmten Zentrifuge verkürzt werden. Die Chlamydien können im Wechsel alle drei oder vier Tage nach Infektion geerntet werden. Mehrere Platten können gleichzeitig infiziert werden und anschließend über einen Zeitraum von bis zu 6 Stunden nacheinander ohne messbaren Verlust an Chlamydienausbeute zentrifugiert werden. Bei

Umsetzung dieser Vereinfachungen lässt der Arbeits- und Zeitaufwand bei gleich bleibender Chlamydienausbeute auf einen Bruchteil der bisher beschriebenen Standardmethoden reduzieren. Die Verwendung der robusten NCI Zelle erlaubt auch Labors mit wenig Zellkultur-Erfahrung die Etablierung der Anzuchtmethode.

## **2. Interaktion monozytärer Zellen mit *C. pneumoniae***

### **2.1. Infektion von Monozyten**

Es war bereits bekannt, dass Monozyten prinzipiell infizierbar sind (Numazaki *et al.* 1995;Heinemann *et al.* 1996;Kaukoranta-Tolvanen *et al.* 1996a). Seitdem bei intranasal infizierten Mäusen in Peritonealmakrophagen *C. pneumoniae* nachgewiesen worden war, besteht die Annahme, dass sich Chlamydien über diesen Weg im Körper verbreiten können (Yang *et al.* 1995). Für die Mono-Mac-6 Zelllinie (MM6) lagen bereits wegweisende Untersuchungen vor (Heinemann *et al.* 1996). Wir wählten deshalb diese MM6, um eine Infektionsmethode an unserem Labor zu optimieren, um mit dieser Methode anschließend die Infizierbarkeit weitere monozytärer Zellen zu testen.

#### **2.1.1 Infektionsdosis**

In den vorausgehenden Untersuchungen waren zwar unterschiedliche Infektionsdosen (zwischen 0.1 und 10 Chlamydien pro Zelle) verwendet worden, der Einfluss der Infektionsdosis auf Infektionsrate war allerdings bisher in keiner Veröffentlichung dargestellt (Numazaki *et al.* 1995;Heinemann *et al.* 1996;Kaukoranta-Tolvanen *et al.* 1996a). Wir sahen in unseren Versuchen, dass die Infektionsrate auf MM6 und THP-1 wie zu erwarten mit Erhöhung der Infektionsdosis zunächst linear ansteigt und sich dann langsam auf einen Maximalwert von ca. 60% zu bewegt (Abb. 18). (Dieser Maximalwert gilt für das beschriebene Standardverfahren auf ruhenden Zellen. Nach unspezifischer Aktivierung der Zellen ließen sich in weiteren Versuchen Raten von 80% erreichen. Siehe 2.1.4.) Erstaunlicherweise kam es bei weiterer Erhöhung der Dosis zu einem Abfall der Infektionsrate (Abb. 18).

Der Abfall der Infektionsrate könnte zum einen damit erklärt werden, dass durch die größeren Chlamydienmengen Abwehrfunktionen der Zellen stärker aktiviert werden und dadurch mehr Zellen „resistent“ gegen Infektion werden, zum anderen dadurch, dass einige Zellen so massiv infiziert werden, dass sie zugrunde gehen und somit nicht mehr gemessen werden.

Mittels der ermittelten Kurven ließen sich die Infektionsraten für spätere Versuche einstellen. Die beste Effizienz erreicht man im Bereich der maximalen Steigung der Kurven, also bei Infektionsraten um die 30%. Um nur leicht höhere Infektionsraten zu erreichen müsste man die Infektionsdosis erheblich steigern. Für FACS-Analysen ist eine Rate von 30% vollkommen ausreichend. Ein gewisser Nachteil ist, dass in diesem Bereich eine relativ kleine Änderung der Infektionsdosis schon eine relativ große Änderung der resultierenden Infektionsrate bewirkt. Es ist also schwierig die Infektionsrate ganz exakt vorherzubestimmen.

#### **2.1.2. Infektionsrate im Zeitverlauf**

Ein Nachweis von infektiösen *C. pneumoniae* aus Monozyten bis zu 14 Tagen nach Infektion war bereits gezeigt worden (Heinemann *et al.* 1996). *C. trachomatis* konnte sogar bis zu 150 Tage nach Infektion von U937 Zellen nachgewiesen werden. Ein genauer Zeitverlauf der Infektionsrate in Monozyten lag für *C. pneumoniae* aber bisher nicht vor.

Die Infektionsraten fielen in unseren Versuchen in den Monozytenzelllinien im Laufe der Zeit ab (Abb. 23b, 25, Bild 5-9). Eine Infektion war allerdings auf der MM6 bis zu 10 Tage, auf der THP-1 bis zu zwei Wochen nach Infektion im FACS nachzuweisen. Mikroskopisch fanden sich sogar noch nach einem Monat vereinzelte infizierte Monozyten. Zwei Mechanismen sind vermutlich für den Abfall der Infektionsrate verantwortlich. Während die infizierten Zellen sterben,

vermehren sich gleichzeitig die nicht infizierten Zellen. Die Zahl der Neuinfektionen durch freigesetzte Chlamydien reicht nicht aus, um diese Effekte auszugleichen. Möglicherweise bewirkt die Zytokinausschüttung der infizierten Zellen in den nicht infizierten Zellen auch einen gewissen Schutz vor Infektion.

### **2.1.3. Zentrifugation**

Es lag bereits eine Untersuchung zur Infektion von peripheren Blutmonozyten mittels Zentrifugation vor (Kaukoranta-Tolvanen *et al.* 1996a). Hier wurde eine vermehrte Sekretion von TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  und Il-6 nach Infektion der Zellen mittels Zentrifugation im Vergleich zu Infektion ohne Zentrifugation festgestellt, wobei Zentrifugation von nicht infizierten Zellen keinen Einfluss auf deren Zytokinsekretion hatte. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass durch Zentrifugation die Infektionsrate steigt, belegten dies aber nicht mit entsprechenden Untersuchungen. Für Kulturzellen hatten wir bereits gezeigt, dass sich die Infektionsrate durch Zentrifugieren von nahe 0 auf 100% steigern lässt (Abb.7). Wir konnten bestätigen, dass sich durch Zentrifugation auch in Monozyten die Infektionsrate steigern lässt (Tabelle 2). Dieser Effekt war bei niedrigen Infektionsraten ausgeprägter als bei hohen Infektionsraten (Daten nicht gezeigt). Die maximal mögliche Infektionsrate ließ sich durch Zentrifugation allerdings nur leicht anheben (Tabelle 2). Wir sahen im Gegensatz zu oben genannter Gruppe (Kaukoranta-Tolvanen *et al.* 1996a) auch nach Zentrifugation bei niedrigen Zentrifugations-Geschwindigkeiten eine Aktivierung und Schädigung der Zellen (Tabelle 2). Es ist anzunehmen, dass die von uns bestimmte CD14 Expression ein sensitiverer Marker für unspezifische Aktivierung von Monozyten ist als die Sekretion von TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  und Il-6. Dass periphere Blutmonozyten unempfindlicher gegenüber Zentrifugation als die Monozyten-Zelllinie MM6 sind, ist eher unwahrscheinlich. Ob die höheren Infektionsraten eine direkte Wirkung der Zentrifugation oder eher eine Folge der unspezifischen Aktivierung (siehe folgenden Abschnitt 2.4) der Monozyten war, lässt sich nicht beurteilen. Die geringe Wirkung der Zentrifugation auf Monozyten im Vergleich zu Epithelzellen könnte dadurch erklärt werden, dass einige Monozyten von sich aus (im Gegensatz zu Epithelzellen) phagozytotisch oder endozytotisch aktiv sind und auch ohne Zentrifugation die Chlamydien aufnehmen, während andere Monozyten sich in einem nicht infizierbaren Zustand befinden.

Für immunologische Untersuchungen kam eine Zentrifugation wegen der unspezifischen Zell-Aktivierung in keinem Fall in Frage.

### **2.1.4. Einfluss einer Aktivierung der Monozyten durch LPS bzw. von FCS Entzug**

Zum Einfluss unspezifischer Aktivierung von Monozyten auf die Infizierbarkeit durch Chlamydien lagen keine Berichte vor. Wir schienen denkbar, dass aktivierte Monozyten freie Elementarkörperchen in höherem Maße phagozytieren und damit stärker infiziert werden.

Durch Aktivierung mittels Zusatz von LPS ließen sich die 48 Stundenwerte der Infektionsrate tatsächlich in verschiedenen Monozytenzelllinien erheblich steigern (Abb. 19). 72 Stunden nach Infektion war die Infektionsrate der aktivierten Zellen allerdings auf ein ähnliches Niveau wie in den nicht aktivierten Zellen zurückgegangen (Abb. 19). Die vermehrt aufgenommenen Chlamydien scheinen also nicht zu produktiver Infektion zu führen, sondern abgebaut zu werden. Diese These wird durch weitere Versuche gestützt in welchen der LPS-Effekt durch Hemmung der Phagozytose mittels Cytochalasin D aufgehoben wurde (Daten nicht gezeigt). Aus LPS behandelten Zellen ließen sich trotz höherer Infektionsrate nicht mehr Hep-Zellen infizieren als aus nicht aktivierten infizierten Zellen (Daten nicht gezeigt).



Für Epithelzellen waren signifikante Steigerungen der Infektionsrate durch FCS freie Kultur erzielt worden (Maass *et al.* 1993). Der Grund hierfür ist nicht bekannt. Auf den Monozytenzelllinien ließ sich mittels FCS-Entzug nur ein unbedeutender Anstieg der Infektionsrate erzielen.

Eine Behandlung von Monozyten mit LPS oder FCS Entzug zur Steigerung der Infektionsrate ist also nicht sinnvoll, insbesondere da zu erwarten ist, dass diese Behandlungen trotz des nur geringen Einflusses auf die Infektionsrate, andere Eigenschaften der Monozyten erheblich beeinflussen.

### **2.1.5. Infektion verschiedener monozytärer Zellen**

Bisher waren nur U-937, MM6 und periphere Blutmonozyten experimentell mit *C. pneumoniae* infiziert worden (Numazaki *et al.* 1995;Heinemann *et al.* 1996;Kaukoranta-Tolvanen *et al.* 1996a). Eines unserer Ziele war, verschiedene Monozyten auf ihr immunologisches Verhalten nach Chlamydieninfektion zu vergleichen. Zunächst mussten diese Zellen auf ihre Infizierbarkeit überprüft werden. Da ein Fernziel in weiterführenden Experimenten an der lebenden Maus lag, wurden ANA- und RAW-Zellen (murine Makrophagenzelllinien) und dendritische Zellen (DC) der Maus in diese Untersuchungen mit einbezogen.

Alle untersuchten Zellen (MM6, THP-1, RAW, ANA, HPBMC, DC) erwiesen sich als gut infizierbar und sind somit für weiterführende Untersuchungen geeignet (Abb. 18-20). Die THP-1 Zelle erwies sich als etwas besser infizierbar als die anderen Monozytenzelllinien. Sie hat allerdings gegenüber der MM6 den Nachteil, dass sie weniger differenziert ist und damit für immunologische Analysen weniger geeignet ist (siehe folgendes Kapitel: 3 Expression von Oberflächenrezeptoren).

Für die murinen RAW-Zellen war bereits bekannt, dass sie durch *C. trachomatis* infizierbar sind (Ingalls *et al.* 1995). Wir konnten hier zum ersten mal zeigen das auch *C. pneumoniae* RAW-Zellen infizieren kann, und diese Zelle damit für weiterführende Experimente geeignet ist.

Die murine ANA Zelle wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig mit Chlamydien infiziert. Auch diese Zelle erwies sich als infizierbar und damit für weitergehende Versuche geeignet..

Periphere Blutmonozyten waren bereits vor einigen Jahren erfolgreich mit *C. trachomatis* und *C. psittaci* infiziert worden (Carlin *et al.* 1989;Manor & Sarov 1986).

Bei unseren Infektionsversuchen mit *C. pneumoniae* bildeten sich Einschlüsse peripheren Blutmonozyten (Bild 10). Die Einschlüsse waren allerdings unregelmäßig geformt (Bild 10). Die Infektion ließ sich im Gegensatz zu den getesteten Monozyten-Zelllinien (MM6 und THP-1) nicht auf Kulturzellen übertragen.

Auch Arienne *et al.* demonstrierten parallel zu uns die Infizierbarkeit von Blutmonozyten mit *C. pneumoniae* (Airenne *et al.* 1999;Airenne *et al.* 2000). Bei Infektionsraten von bis zu 90% sahen sie im Konfokalmikroskop ähnlich deformierte Einschlüsse wie wir. Trotz der hohen Infektionsraten konnten auch sie die Infektion nicht auf Kulturzellen übertragen. Arienne *et al.* konnten aber mittels RT-PCR zeigen, dass die Chlamydien metabolisch aktiv bleiben. Es ist also anzunehmen, dass es in peripheren Monozyten eher zu einer persistierenden als einer produktiven Infektion kommt.

Als besonders gut infizierbar erwiesen sich die murinen dendritischen Zellen (DC). Hier ließen sich nicht nur erstaunlich hohe Infektionsraten erzielen, es kam auch zu einer Dauerinfektion, die selbst nach 14 Tagen kaum an Stärke eingebüßt hatte und zur Bildung infektiöser EK führte (siehe Bild 10). Dendritische Zellen, nehmen durch ihre Fähigkeit Antigene zu präsentieren, mit anderen Zellen wie T-Zellen zu interagieren und eine Großzahl von Interleukinen zu produzieren eine Schlüsselstelle im Immunsystem ein. Für *C. trachomatis* konnte bereits gezeigt

werden, dass dendritische Zellen infizierbar sind und chlamydiale Epitope zu präsentieren die in Verbindung mit Il-12 eine Immunantwort über Th1-Zellen auslösen (Ojcius *et al.* 1998a; Gibellini *et al.* 1998; Lu & Zhong 1999).

Es ist also davon auszugehen, dass DCs eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der durch *C. pneumoniae* verursachten Krankheitsbilder spielen. Es ist mittlerweile bekannt, dass DCs auch bei der Entstehung der Arteriosklerose eine Bedeutung zukommt (Bobryshev *et al.* 1999; Lord & Bobryshev 1999), hier wäre also eine Verbindung denkbar. Mit der Erkenntnis der hervorragenden Infizierbarkeit der DC wurde also ein hoch interessantes Target für weitergehende immunologische Untersuchungen gefunden. An diese Arbeit anschließende Untersuchungen konnten unter Verwendung dendritischer Zellen bereits zur Entschlüsselung der Signalübertragung bei Chlamydieninfektion durch Tol-Rezeptoren beigetragen (Prebeck *et al.* 2001).

## 2.2. Expression von Oberflächenrezeptoren

### 2.2.1. CD14

Das CD14 Antigen wird auf myelomonozytären Zellen exprimiert. Es dient als Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid und lipopolysaccharidbindendem Protein (LBP). CD14 reguliert ein Signalsystem, welches an der Steuerung der Immunantwort von myelomonozytischen Zellen auf LPS wesentlich beteiligt ist (Wright *et al.* 1990b). Die durch LPS via CD14 ausgelöste Immunantwort umfasst u.a. die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappa-B und die Verstärkung der Adhärenz (Wright *et al.* 1990a; Hmama *et al.* 1999). Auch die Phagozytose gramnegativer Bakterien wird durch CD14 vermittelt (Schiff *et al.* 1997). CD14 wird durch LPS hoch reguliert, kann allerdings auch durch unspezifische Mechanismen, selbst an LPS-toleranten Zellen, induziert werden (Ziegler-Heitbrock *et al.* 1988).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Signalsystem bei der Immunreaktion auf *C. trachomatis* eine wesentliche Rolle spielt (Ingalls *et al.* 1995). Chlamydiales LPS führt hier nach Bindung an CD14 zu einer Aktivierung von NFκB und Ausschüttung von TNF-α (Ingalls *et al.* 1995). Auch für Infektionen von MM6 mit *C. pneumoniae* war bereits gezeigt worden, dass es zu einer Hochregulation von CD14 kommt (Heinemann *et al.* 1996).

Wir konnten auf der MM6 eine Dosis-abhängige Hochregulation von CD14 (Abb. 23) demonstrieren. Nach raschem Erreichen eines Maximums innerhalb von 48 Stunden ließ sie innerhalb einer Woche in demselben Maße wie die Infektionsrate nach (Abb. 23). Wir konnten damit die Befunde von Heinemann *et al.* (Heinemann *et al.* 1996) bestätigen und ergänzen. Zum anderen wurden durch diese Übereinstimmung auch unsere Meßmethoden bestätigt.

Es ist anzunehmen, dass die Hochregulation von CD14 unter anderem durch chlamydiales LPS bewirkt wird. Auch für *C. trachomatis* war bereits gezeigt worden, dass LPS zu einer Zellaktivierung und Bildung von TNF-α und Il-6 führt (Ingalls *et al.* 1995; Rothermel *et al.* 1989). Vermutlich ist auch LPS an der durch *C. pneumoniae* verursachten Ausschüttung von TNF-α und Il-6 (Kaukoranta-Tolvanen *et al.* 1996b) sowie weiterer chemotaktischer Faktoren beteiligt. TNF-α und Il-6 spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr der Chlamydien unter anderem durch die Aktivierung von T-Zellen und NK-Zellen (Williams *et al.* 1998). In jedem Fall lässt sich an der Hochregulation von CD14 eine Aktivierung der Monozyten durch *C. pneumoniae* ablesen. Die Frage welche chlamydialen Strukturen dies über welche Mechanismen auslösen bedarf noch der Klärung.

### 2.2.2. MHC-I und II

MHC-Moleküle sind Glykoproteine, die innerhalb einer peptidbindenden Furche Antigene präsentieren können. Die Antigene werden innerhalb der Zelle an das MHC gebunden und anschließend an die Zelloberfläche transportiert, wo der kombinierte Ligand von T-Zellen erkannt werden kann.

**MHC-I**-Moleküle werden auf sämtlichen Körperzellen exprimiert, sie binden Peptide von Proteinen, die im Zytosol abgebaut werden. Eine Rolle bei der Immunabwehr spielt hier besonders die Bindung viraler Peptide und zelleigener Peptide von Tumorzellen. Dieser MHC-I-Ag-Komplex wird von passenden CD8-T-Zellen erkannt, welche daraufhin die präsentierenden Zellen töten.

**MHC-II**-Moleküle werden nur von professionellen, Antigen präsentierenden Zellen, wie Makrophagen und B-Zellen, exprimiert. Die präsentierten Peptide stammen im Allgemeinen aus Proteinen, die in angesäuerten Vesikeln abgebaut wurden. MHC-II-Moleküle werden durch CD4-T-Zellen erkannt. Über komplizierte Kaskaden kommt es zu einer Aktivierung der präsentierenden Zellen und zu einer Weiterdifferenzierung der T-Zellen. Abhängig von Interleukinen

wie IL-1, IL-10 und IL-12 und weiteren Faktoren entwickeln sich die T-Helferzellen entweder zu Th1- oder Th2-Zellen. Th1-Zellen führen eher zu einer zellvermittelten Immunität, während Th2-Zellen eher die humorale Abwehr aktivieren.

Zu **MHC-I** Expression durch *C. pneumoniae* lagen bisher keine Daten vor. Chronische Infektion mit *C. psittaci* führt bei Mäusen zu einer vermehrten Expression von MHC-I auf Peritonealmakrophagen (Guagliardi *et al.* 1987). Bei Infektionen von Mäusen mit *C. trachomatis* werden Antigene auf MHC-I präsentiert und von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt (Starnbach *et al.* 1994; Igietsme *et al.* 1994). Infektion von CD8 depletierten Mäusen mit *C. trachomatis* sprechen für eine Beteiligung der MHC-I-CD8 Interaktion bei der Bekämpfung der Chlamydieninfektion (Magee *et al.* 1995). Für humane Infektionen mit *C. trachomatis* konnte ex vivo gezeigt werden, dass auf MHC-I Epitope des MOMP präsentiert werden und damit eine CD8(+) T-Zellantwort induziert wird (Kim *et al.* 2000).

Bei unseren Messungen auf der MM6 wurde MHC-I durch die Infektion mit *C. pneumoniae* deutlich hoch reguliert (Abb. 26). Es ist anzunehmen, dass diese Hochregulation eine vermehrte Präsentation von chlamydialen Antigenen und verstärkte Aktivierung von CD8-T-Zellen ermöglicht, und damit auch bei Infektion mit *C. pneumoniae* einen wichtigen Betrag zur Elimination der Chlamydien leistet.

Mittlerweile wurde für *C. trachomatis* auf Epithelzelllinien gezeigt, dass dieser Keim die durch IFN- $\gamma$  induzierte Expression von MHC-I inhibiert (vermutlich durch Degradation des Transkriptionsfaktors RFX5) (Zhong *et al.* 2000). Auch für *C. pneumoniae* konnte eine solche Hemmung nun auf Monozyten gezeigt werden, die hier allerdings auf die Ausschüttung von IL-10 zurückgeführt wird. *Chlamydien* begrenzen vermutlich auf diese Weise, ähnlich wie andere intrazelluläre Erreger (Brodsky *et al.* 1999) die für sie bedrohliche CD-8 Zellantwort.

**MHC-II** wird auf Alveolarmakrophagen durch Infektion mit *C. pneumoniae* vermehrt exprimiert (Redecke *et al.* 1998). Weitere Veröffentlichungen lagen zu Infektionen von Makrophagen und dendritischen Zellen mit *C. trachomatis* und *C. psittaci* vor. Hier wurde eine vermehrte Expression von MHC-II festgestellt (Ojcius *et al.* 1998b; Ojcius *et al.* 1997; Guagliardi *et al.* 1987; Thomas *et al.* 1993). Bei der Maus ist die Expression von MHC-II Voraussetzung für die effektiven Bekämpfung einer Infektion des Genitaltraktes oder Lunge mit *C. trachomatis* (Stagg *et al.* 1998; Williams *et al.* 1997).

Auf den von uns verwendeten MM6 und THP-1 wurde durch *C. pneumoniae* keine MHC-II Expression ausgelöst (Abb. 27).

Zhong fanden eine Hemmung der durch IFN- $\gamma$  induzierbaren MHC-II Expression durch Infektion mit *C. trachomatis*, (bei gleichzeitiger Degradation des upstream stimulatory factor I (USF1), der für die Induktion des class II transactivators (CIITA) benötigt wird). (Zhong *et al.* 1999). Es ist zu vermuten, dass sich *C. trachomatis* auf diese Weise, wie für weitere intrazelluläre Erreger beschrieben (Brodsky *et al.* 1999), vor den Angriffen des Immunsystems schützt.

Da unsere Zellen auch nach Zugabe von aktivierenden Substanzen wie LPS nur geringe Mengen MHC-II exprimierten (Daten nicht gezeigt), sind weitere Experimente an frischen MHC-II exprimierenden Zellen (Ziegler-Heitbrock *et al.* 1988; Tsuchiya *et al.* 1980) nötig, um die Regulation von MHC-II abschließend beurteilen zu können. Es ist gut vorstellbar, dass *C. pneumoniae* ähnlich wie *C. trachomatis* in die Expression von MHC-II eingreift.

### 2.2.3. CD 54

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül CD54 oder ICAM-1 ähnelt seinem Aufbau den Immunglobulinen. Es wird auf den verschiedensten Zellarten, inklusive Leukozyten und Endothelzellen exprimiert. Durch eine Reihe von Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , IL-1, und IFN- $\gamma$  kann es induziert werden. Es bindet an das CD11a/CD18-Integrin (LFA-1) und an das CD11b/CD18-Integrin (Mac-1) auf Leukozyten, an CD43 auf Leukozyten (möglicherweise antiadhäsiv), an Fibrinogen, an den Matrix-Faktor Hyaluronan, an Rhinoviren und an mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten. Die Expression wird im Wesentlichen durch Transkription reguliert. ICAM erfüllt verschiedene Funktionen bei Entzündungsprozessen. Es dient als kostimulatorisches Molekül auf Antigen präsentierenden Zellen bei der Aktivierung von T-Zellen. Auf dem Endothel spielt es eine wichtige Rolle bei der Migration von Leukozyten.

Zu Beginn unserer Untersuchungen veröffentlichten Vanessa Redecke et al. ihre Ergebnisse, wonach die Expression von ICAM auf Alveolarmakrophagen bei Infektion mit *C. pneumoniae* unverändert bleibt (Redecke et al. 1998). Auf Endothelzellen war vermehrte Expression von ICAM nach Infektion mit *C. pneumoniae* bereits 1996 beschrieben worden (Kaukoranta-Tolvanen et al. 1996a). Während unserer Arbeiten erschienen zwei weitere Veröffentlichungen, die diese Befunde bestätigten (Krull et al. 1999b; Kol et al. 1999).

Bei mit *C. trachomatis* infizierten Mäusen wurde, zusätzlich zu der ICAM Expression auf Endothelzellen, an ICAM bindende infiltrierenden T-Zellen nachgewiesen (Perry et al. 1998). Die Kokultivierung *C. trachomatis*-infizierter Endothelzellen mit CD4+Th1 Zellen führt zu einer deutlichen Suppression des Chlamydien-Wachstums. Durch Blockade von ICAM auf den Endothelzellen wird diese Suppression aufgehoben (Igietseme et al. 1999; Igietseme et al. 1996). Die durch CD8(+) T-Zellen vermittelte Lyse *C. trachomatis* infizierter L-Zellen war von der Expression von ICAM-1 abhängig (Beatty & Stephens 1994).

Wir konnten zeigen, dass eine Infektion mit *C. pneumoniae* auf MM6 und THP-1 zu einer, von der Infektionsdosis abhängigen, Hochregulation von CD54 führt (Abb. 28, 29), die nach 1 bis 2 Tagen ihren Maximalwert erreicht und anschließend mit der Infektionsrate langsam zu dem Ausgangswert zurückkehrt (Abb. 31, 32). Alle Zellen einer infizierten Charge regulierten CD54 hoch, die infizierten Zellen allerdings in höherem Maße als die nicht infizierten. Dies ist ein Hinweis, dass die Hochregulation nicht nur eine unspezifische Antwort auf die Ausschüttung von Interleukinen wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  ist. Die Daten legen nahe, dass CD54 bei der Abwehr von *C. pneumoniae*, wie für *C. trachomatis* vermutet (Igietseme et al. 1999; Igietseme et al. 1996), einen wichtigen Beitrag leistet, indem es als kostimulatorisches Molekül zur Aktivierung von T-Zellen beiträgt.

Gleichzeitig bewirkt die Expression von CD54 aber eine vermehrte Adhäsion der Monozyten an Gefäßwänden. Infizierte Monozyten werden also durch diese Hochregulation von CD54 in erhöhtem Maße an Gefäßwänden adhären. Diese Expression von CD54 könnte also neben der protektiven Wirkung, die Verbreitung der Chlamydien in die Gefäßwände begünstigen.

### 2.2.4. CD71

CD71 der Transferrinrezeptor wird auf allen proliferierenden Zellen inklusive aktivierten Leukozyten exprimiert. Er vermittelt die endozytotische Aufnahme von an Transferrin gebundenem Fe<sup>3+</sup> in die Zelle. Die Synthese des Transferrinrezeptors wird auf der posttranskriptionellen Ebene durch zelluläre Faktoren sowie durch iron regulatory protein I (IRPI) und II (IRPII) reguliert. Die Aktivität der IRP ist abhängig von den Eisenvorräten der Zelle, wird aber auch durch verschiedene Formen „oxidativen Stresses“ und Stickoxid beeinflusst (Ponka 1999). Durch IFN- $\gamma$  wird der

Transferrinrezeptor herunter reguliert, dadurch entsteht ein intrazellulärer Eisenmangel, welcher das Wachstum mikrobieller Erreger hemmt (Byrd & Horwitz 1993).

Zu CD71 und *C. pneumoniae* lagen bisher keine Daten vor. Für *C. trachomatis* konnte auf RT4-Zellen (epitheliale Zelllinie) gezeigt werden, dass es zu einer leichten Herabregulation des CD71 kommt (von 96% auf 77%). Neben der Stickstoffoxidinduktion, dem Tryptophankatabolismus und weiteren unbekanntem Mechanismen trägt dieser Effekt vermutlich zur Inhibierung des Wachstums von *C. trachomatis* bei (Igiertseme *et al.* 1998).

Wir stellten auf der MM6 eine verminderte CD71-Expression nach Chlamydieninfektion fest (Abb. 33). Es ist wahrscheinlich, dass diese Herabregulation von CD71 wie für *C. trachomatis* bereits vermutet (Igiertseme *et al.* 1998; Raulston 1997), auch bei Infektion mit *C. pneumoniae* zu einer Verminderung des intrazellulären Eisens führt und auf diese Weise die Vermehrung der Chlamydien inhibiert. Diese These wurde durch weitere Experimente gestützt, in denen durch Zusatz von Eisen die Infektionsrate gesteigert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Herabregulation von CD71 betraf infizierte wie nicht infizierte Zellen. Es ist anzunehmen, dass die nicht infizierten Zellen durch einen von den infizierten Zellen ausgeschütteten Botenstoff wie IFN- $\gamma$  (Byrd & Horwitz 1993) zu Herabregulation von CD71 anregt werden. Der so induzierte intrazelluläre Eisenmangel dürfte also neben anderen Mechanismen dazu beitragen die Infektion mit *C. pneumoniae* zu bekämpfen und die Ausbreitung zu begrenzen. Vermutlich ist dies einer der Wege über welchen IFN- $\gamma$  das Chlamydienwachstum inhibiert (Byrd & Horwitz 1993).

### 2.2.5. CD80/86

CD80 oder B7.1, und CD86 oder B7.2 sind strukturverwandte, homodimere Glykoproteine aus der Immunglobulinsuperfamilie. Ihre funktionellen Unterschiede sind noch nicht genau geklärt. Sie werden ausschließlich auf aktivierten Zellen des Immunsystems exprimiert, ihre Hauptaufgabe besteht in der Steuerung der T-Zellaktivierung als Kostimulatoren. Dendritische Zellen, starke T-Zellaktivatoren tragen konstitutiv B7 Moleküle an ihrer Oberfläche (Ni & O'Neill 1997). Ruhende Makrophagen exprimieren keine B7 Moleküle. Erst nach Aufnahme unlöslicher Antigene wie Mikroorganismen werden MHC-II und B7 hoch reguliert, und prozessierte Antigene des Mikroorganismus präsentiert. Verschiedenste bakterielle Komponenten können allerdings auch einzeln eine Hochregulation von CD80 und CD86 bewirken. Beispiele hierfür sind Choleratoxin und LPS (Foss *et al.* 1999). Ebenso führen verschiedene Zytokine wie GM-CSF und IFN- $\gamma$ , sowie die Interaktion von CD40 und CD40L zu einer vermehrten Expression der B7 Moleküle (Jollow *et al.* 1999). Naive T-Zellen werden nur aktiviert, wenn ihnen zusätzlich zu einem passenden Antigen kostimulatorische Moleküle präsentiert werden. Auf diese Weise regulieren CD80 und 86 auch die Selbsttoleranz. Wird ein Antigen ohne Verbindung mit CD80/86 präsentiert, führt dies bei den entsprechenden T-Zellen zu Anergie oder Apoptose (Slavik *et al.* 1999).

Über die Expression der B7 Moleküle im Verlauf von Chlamydieninfektionen war bisher sehr wenig bekannt. Bei mit *C. trachomatis* infizierten BALB/c Mäusen wurde eine Population mononukleärer Zellen gefunden, welche neben CD45 und MHC-II auch CD86 und CD40 exprimierten und in der Lage waren, T-Zellen spezifisch zu aktivieren (Stagg *et al.* 1998).

Andere intrazelluläre Erreger wie Toxoplasmen oder Leishmanien bewirken teilweise eine Verminderung der Expression der B7-Moleküle und verhindern so eine effektive Abwehr (Fischer *et al.* 1999; Pinelli *et al.* 1999).

Für **CD80** konnten wir auf der MM6 und der THP-1 nur einen geringen Anstieg der Expression feststellen (Abb. 34). Da uns kein biotinmarkierter Isotyp zur Verfügung stand können wir nicht ausschließen, dass diese geringen

Veränderungen durch Färbeartefakte zustande kamen, insbesondere da wir bei der Etablierung der Färbetechniken mit biotinmarkierten AK bei vorfixierten Zellen falsch hohe Werte gemessen hatten.

Es ist durchaus denkbar, dass Chlamydien ähnlich wie für MHC-II beschrieben die Expression von CD80 inhibieren um sich auf diese Weise vor der Immunantwort zu schützen. Um diese Frage beurteilen zu können sind allerdings noch weitere Experimente an Zellen die B.7.1. exprimieren z.B. dendritischen Zellen nötig.

Für **CD86** fanden wir eine deutliche Dosis-abhängige Hochregulation auf MM6 (Abb. 35), die nach 48 Stunden ihr Maximum erreichte und anschließend innerhalb von 1 bis 2 Wochen wie die Infektionsrate auf ihren Ausgangswert zurückging (Abb. 36). Diese vermehrte Expression zeigte sich auf allen infizierten Zellen, gleichzeitig aber auch auf einem Großteil der nicht messbar infizierten.

Es ist davon auszugehen, dass CD86 während der Immunantwort auf Infektion mit *C. pneumoniae* an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist. T-Zellen insbesondere Th1-Zellen spielen eine wichtige, wenn nicht die entscheidende Rolle bei der wirksamen Bekämpfung einer Infektion mit *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* (Halme & Surcel 1997; Morrison & Morrison 2000).

## 2.3. Einfluss von *C. pneumoniae* auf Apoptose in Monozyten und Endothelzellen

Apoptose dient neben vielen anderen Funktionen als Abwehrmechanismus des Körpers gegen intrazelluläre Erreger. Diesen wird durch Apoptose ihre Nahrungsgrundlage entzogen und sie werden dem Abwehrsystem des Körpers ausgeliefert (Gao & Kwaik 2000). Apoptose wird hierbei in der Zelle durch hochspezifische Enzyme u.a. den Caspasen reguliert. Bisher sind 14 verschiedene Caspasen von unterschiedlicher Wichtigkeit und Funktion bekannt, wobei der Caspase 3 eine Schlüsselstellung im Apoptoseprogramm der Zelle zukommt (Kroemer 1999; Earnshaw *et al.* 1999). In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass verschiedenste intrazelluläre und fakultativ intrazelluläre Erreger in das Apoptoseprogramm eingreifen. Einige Erreger lösen Apoptose aus (z.B. *Salmonella*, *Shigella*, *Legionella*) (Gao & Kwaik 2000) andere insbesondere Viren inhibieren eher Apoptose (Meinl *et al.* 1998). Für *C. pneumoniae* gab es bisher keine Daten zu Apoptose. Für *C. psittaci* und *C. trachomatis* lagen scheinbar widersprüchliche Veröffentlichungen vor, die zum einen Teil von Apoptose-Auslösung zum anderen Teil von Apoptose-Inhibition durch Chlamydien berichteten (Fan *et al.* 1998; Gibellini *et al.* 1998; Ojcius *et al.* 1998c).

Wir konnten für *C. pneumoniae* **Apoptose-Auslösung** durch hohe Chlamydiendosen auf insgesamt 5 Epithel- und Makrophagenzelllinien mittels dreier unterschiedlicher Techniken (Mikroskop (siehe Abb. 1, 2), FACS (Abb. 38, 40, 41, 42) und DNA Fragmentation (Abb. 39) zeigen. Wir bestätigten damit diesen schon für *C. trachomatis* und *C. psittaci* beschriebenen Effekt (Gibellini *et al.* 1998; Ojcius *et al.* 1998c) auch für *C. pneumoniae*. Deutliche Apoptose war frühestens 24 Stunden nach Infektion nachweisbar und nahm dann im Laufe der Infektion zu. Dies zeigt, zusätzlich zu den unterschiedlichen verwendeten Nachweistechiken, dass tatsächlich Apoptose und kein zytopathischer Effekt für den Tod der Zellen verantwortlich ist. Die durch hohe Chlamydienmengen über einen zytopathischen Effekt bewirkte Zellnekrose setzt sofort ein und ist unabhängig von der Vitalität der Chlamydien (Moulder *et al.* 1976). Unsere Daten stehen in Übereinstimmung mit Gibellini *et al.* und Ojcius *et al.* die in mit *C. trachomatis* und *C. psittaci* infizierten Zellen eine zunehmende Apoptose mit Maximum nach 92 Stunden feststellten (Gibellini *et al.* 1998; Ojcius *et al.* 1998c).

Wie Chlamydien Apoptose auslösen ist noch unklar. Eine Möglichkeit wäre, dass die große Menge proliferierender Chlamydien in der Zelle Apoptose durch bisher nicht genauer charakterisierte Mechanismen auslöst. Ein solcher Mechanismus könnte z.B. die Blockierung der DNS-Synthese oder der Verbrauch zellulärer Substrate sein. Es ist nachvollziehbar und belegt, dass es bei Infektion zu Substratmangel in der Zelle kommt (Moulder 1991). Es ist auch bekannt, dass Chlamydieninfektion die DNS-Synthese der Wirtszelle blockiert, und dass infizierte Zellen länger in der S-Phase des Zellzyklus bleiben (Moulder 1991). Für solche Mechanismen spricht, dass Apoptose erst zu einem späten Zeitpunkt der Infektion ausgelöst wird. Gegen diese These spricht unsere Beobachtung, dass Apoptose besonders in nicht infizierten Zellen ausgelöst wird (siehe Abb. 40, Bild 1, 2). Eine Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass infizierte Zellen Apoptose induzierende Faktoren wie TNF $\alpha$  freisetzen und dadurch die umgebenden Zellen in die Apoptose treiben. Gegen Interleukine als einzige Ursache spricht, dass nach kompletter Hemmung der zellulären Proteinsynthese durch Cycloheximid nahezu unvermindert Apoptose ausgelöst wurde (Abb. 42). Ähnliche Befunde erhoben Gibellini *et al.* auch für *C. trachomatis* und *C. psittaci* in Kulturzellen (Gibellini *et al.* 1998). Denkbar ist, dass Chlamydien selbst Faktoren freisetzen, die in den umgebenden Zellen Apoptose auslösen, während die infizierten Zellen selbst durch die Infektion vor Apoptose geschützt sind (siehe unten). In Analysen des Genoms von *C. pneumoniae* wurden Gene für ein Typ III Sekretionssystem gefunden. Die Chlamydien wären also theoretisch in der Lage ein Apoptose auslösendes Protein in zu sezernieren (Kalman *et al.* 1999). Diese These wird gestützt durch die



Beobachtung, dass Apoptose ausschließlich durch lebende Chlamydien, nicht aber durch UV inaktivierte *C. pneumoniae* ausgelöst wurde (Abb. 38, 41, 42). Ojcius et al. hatten an Epithel und Makrophagenzelllinien eben solche Befunde für *C. trachomatis* erhoben (Ojcius et al. 1998c).

Interessant war auch, dass Inhibierung der Caspase 3 in unseren Versuchen die Apoptose-Auslösung durch Chlamydien nicht verhinderte (Abb. 40, 42). Ojcius et al. kamen für *C. psittaci* zu ähnlichen Ergebnissen und schlugen eine von Caspasen unabhängige Auslösung der Apoptose z.B. durch das seit kurzem bekannte proapoptotische Protein Bax vor (Ojcius et al. 1998c). Auch die allenfalls minimale Hochregulation des, für die Apoptose-Auslösung über Caspase 8 wichtigen, Fas-Rezeptors in unseren Versuchen (Daten nicht gezeigt) ist ein Hinweis für einen von Caspasen unabhängigen Weg.

Gleichzeitig mit der Apoptose-Auslösung stellten wir eine **Inhibierung der Apoptose** durch Apoptosegifte bei Chlamydieninfektion fest, wobei auch noch sehr kleine Chlamydienmengen Apoptose wirksam inhibierten. Eine solche Hemmung war bereits für *C. trachomatis* beschrieben worden (Fan et al. 1998). In diesen Untersuchungen zu *C. trachomatis* schien die Inhibierung der Apoptose von der funktionierenden Proteinsynthese der Chlamydien abhängig zu sein, nicht aber von der Proteinsynthese der Wirtszelle (Fan et al. 1998). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stellten wir auch nach Zugabe UV-inaktivierter Chlamydien eine deutliche Inhibierung der Apoptose fest (Abb. 41, 42). Schon in den Elementarkörperchen von *C. pneumoniae* scheinen also Apoptose inhibierende Substanzen enthalten zu sein. Dafür spricht auch der frühe Beginn der antiapoptischen Wirkung. Fan et al. konnten zeigen, dass *C. trachomatis* wie auch andere intrazelluläre Erreger durch Unterdrückung der Caspase 3 die Apoptose inhibiert (Fan et al. 1998). Ein solcher bereits vermuteter Mechanismus konnte mittlerweile auch für *C. pneumoniae* demonstriert werden (Daten nicht gezeigt).

Auf den ersten Blick erscheint die gleichzeitige Auslösung und Inhibierung der Apoptose durch Infektion mit Chlamydien widersprüchlich. Apoptose ist ein Abwehrmechanismus der eukaryoten Zelle gegenüber intrazellulären Erregern. Intrazelluläre Erreger profitieren von der Inhibierung der Apoptose. Man nimmt an, dass die Mechanismen der Apoptosehemmung der intrazellulären Erreger als Antwort auf die Abwehr der Wirte entstanden (Gao & Kwaik 2000). Es ist also einleuchtend, dass bei Chlamydieninfektion Apoptose (als Abwehrfunktion der Zelle) gleichzeitig mit Apoptosehemmung (als Schutzmechanismus der Chlamydien) zu beobachten sind.

Erstaunlich war, dass Chlamydien auch nach Blockade der Proteinsynthese der Zellen und Inhibierung der Caspasen Apoptose auslösten. Möglicherweise haben Chlamydien einen bisher unbekanntem Mechanismus entwickelt in der Wirtszelle Apoptose auszulösen. Die Chlamydien könnten auf verschiedene Weise von Apoptose-Auslösung profitieren. Nach Freisetzung Chlamydien aus einer apoptotischen Wirtszelle wird vermutlich eine für die Chlamydien weniger bedrohliche Immunreaktion ausgelöst, als durch andere Freisetzungsmechanismen. Die sich an Apoptose anschließende Phagozytose könnte anschließend die Verbreitung der Chlamydien begünstigen.

Die Freisetzung eines apoptotischen Faktors in die Umgebung der infizierten Zelle, könnte auch die Zellen der Immunabwehr wie T-Zellen und Makrophagen in die Apoptose treiben und damit die Chlamydien vor Angriffen des Immunsystems schützen.

Im Moment lässt sich über Ursache und Weg der Apoptose-Auslösung sowie Ursache der Apoptose-Inhibierung nur spekulieren. Es ist aber anzunehmen, dass sowohl Auslösung wie Induktion von Apoptose eine wichtige Bedeutung bei der Pathogenese von Chlamydieninfektionen zukommt. Interessant ist in dem Zusammenhang mit der Diskussion über *C. pneumoniae* und Arteriosklerose auch, dass Apoptose eine wichtige Rolle bei der Arteriosklerose zugeschrieben wird (Walsh & Isner 2000; Maturri et al. 2000).

Mit oben genannten Daten wurde also ein hochinteressantes Forschungsgebiet eröffnet, das hoffentlich bald zum Verständnis der Pathogenese von Chlamydieninfektionen und Apoptosemechanismen beitragen wird. Die hier vorliegenden Ergebnisse gaben bereits den Anstoß zu tiefer gehenden Untersuchungen an der TU München im Rahmen eines DFG-Projektes (Fischer *et al.* 2001). Nun soll das für Apoptose-Inhibition verantwortliche Protein kloniert werden und sein molekularer Wirkmechanismus aufgeklärt werden.

## VII. Anhang

### 1. Weitere Versuche zu Anzuchtmethoden

#### 1.2. Infektion von Amöben

In jüngster Zeit wurden verschiedene Chlamydien ähnliche Bakterien in Amöben gefunden (siehe 2. Taxonomie) (Kahane *et al.* 1995; Kahane *et al.* 1998; Birtles *et al.* 1997; Amann *et al.* 1997). Es war bekannt, dass *Acanthamoeba castellanii* auch mit *C. pneumoniae* infizierbar ist (Essig *et al.* 1997). Es sollte hier untersucht werden ob sich mit anderen Bakterien kontaminierte Chlamydien in Amöben anzüchten lassen und ob sich mit Mykoplasmen kontaminierte Chlamydien über Passage in Amöben dekontaminieren lassen.

##### 1.2.1. Infektion mit Chlamydien bei Vorhandensein von Kontaminanten

Nachdem Verfahren etabliert waren mit welchen sich Amöben effektiv mit aufgereinigten *C. pneumoniae* infizieren und anfärben ließen (siehe Methoden: 12 Infektion von Amöben; Bild 15, 16) wurde untersucht in wie weit der Zusatz von Enterobakterien die Infektion von Amöben mit Chlamydien beeinflusst.

Auch bei gleichzeitiger Zugabe von Bakterienmischungen zu den Chlamydien waren eindeutige Einschlusskörper in Amöben zu finden. Die maximale Infektionsrate lag bei ca. 20%. Es gelang selbst eine Infektion von *A. castellanii* aus einer mit Mykoplasmen kontaminierten tiefgefrorenen Probe des MUL-Stammes, aus der sich in mehrfachen Versuchen keine Kulturzellen mehr infizieren ließen (Bild 16). Auch in einem *Entamoeba dispar* Stamm ließen sich Einschlusskörper nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Das Verfahren bietet eine Möglichkeit zur Untersuchung von Patientenproben. Nur sehr selten gelingt die Anzüchtung von *C. pneumoniae* aus Patientenmaterial trotz offensichtlich hoher Durchseuchung. Eine Schwierigkeit liegt in der häufigen Kontamination der Zellkulturen mit Bakterien bei Untersuchung von Proben aus dem Nasen-Rachenraum. Amöbenkulturen sind offensichtlich unempfindlich gegen bakterielle Kontaminationen. Ein weiterer Grund, warum sich Chlamydien auch bei höchsten Titern nur so selten aus Patientenmaterial isolieren lassen, könnte sein, dass sie in Amöben verborgen liegen. Ein solcher Mechanismus ist für Legionellen belegt (Birtles *et al.* 1997). Die Kokultivierung mit Amöben ermöglicht die Isolierung von mit konventionellen Techniken nicht kultivierbaren Legionellen aus Patientenproben und Umwelt (Birtles *et al.* 1996). Durch Kokultur ließen sich auch solche in Amöben verborgene *C. pneumoniae* sowie weitere Chlamydienarten aus Patientenproben und Umwelt nachweisen.

Ergänzung: Mittlerweile gelang mittels der hier beschriebenen Technik die Isolierung eines bisher unbekanntes chlamydien ähnlichen Organismus aus einer Tierkörperverwertungsanstalt (Horn; 2001 mündliche Information).

##### 1.2.2. Mykoplasmenreinigungsversuche

*Acanthamoeba castellanii* wurde mit 3 verschiedenen Mykoplasmenarten koinfiziert (MUL-Stamm mit entsprechender Kontaminante, ATCC 1360 mit Laborkontamination, ATCC 1360 mit *Mycoplasma hominis*). Die koinfizierten Amöben wurden unterschiedlichen Behandlungen unterzogen mit dem Ziel, die freien Mykoplasmen zu reduzieren. (Waschen in Amöbenpuffer, Zugabe von 5% Humanserum<sup>1</sup>). Die Chlamydien wurden nach 7-10 Tagen durch Vortexen geerntet und auf Hep-Zellen ausgesät.

In allen Fällen waren Einschlusskörperchen in den Amöben nachweisbar, allerdings teilweise bei sehr niedrigen Infektionsraten um die 3%. Bei allen Weiterinfektionen auf die Hep-Zelle ließen sich wiederum Einschlusskörper

nachweisen, allerdings wiederum nur kleine bei niedrigen Infektionsraten um 10%. Die Infektionsraten zeigten keinen Zusammenhang mit dem kontaminierenden Stamm oder der Behandlungsmethode.

In der anschließenden PCR ließen sich aus keinem Ansatz der Amöbenkulturen und den nachgeschalteten Hep-Kulturen Mykoplasmen nachweisen, während die entsprechenden Kontrollen ohne Amöben positiv ausfielen.

Kontamination von Chlamydien mit Mykoplasmen ist ein sehr häufiges Problem, bedingt durch die gemeinsame Anzucht aus dem Nasenrachenraum, sowie durch spätere Kontaminationen während der Weiterkultivierung. Ein großer Teil der weltweit isolierten *C. pneumoniae* Stämme, darunter auch von ATCC vertriebenen Stämme sind mit Mykoplasmen kontaminiert (Hunniche *et al.* 1998; ATCC Produktinformation 1999). Mit solchen "verseuchten" Stämmen sind keine seriösen Experimente zur Untersuchung der biologischen Wirkung von *C. pneumoniae* möglich. Bisher war kein Verfahren, Chlamydien von Mykoplasmen zu befreien, bekannt. Gegen Mykoplasmen wirksame Antibiotika vernichten auch die Chlamydien. Eine für Rickettsien beschriebene Methode (Eremeeva *et al.* 1994) über intraperitoneale Infektion von Mäusen und anschließende Isolierung wurde erfolglos versucht (Maaß mündliche Information 1999).

Mit der Kokultivierung bietet sich nun eine sehr interessante Möglichkeit, mit Mykoplasmen kontaminierte Chlamydien zu dekontaminieren und damit genaueren Untersuchungen zugänglich zu machen.

Ergänzung: Wie wichtig das Problem der Kontamination von Chlamydien mit Mykoplasmen ist zeigt sich an der Zahl der Veröffentlichungen die nach Abschluss dieser Arbeit zu diesem Thema erschienen sind. So wurde unsere Erfahrung, dass Mykoplasmen Infektiosität und Wachstum von Chlamydien in Zellkultur inhibieren bestätigt (Krause-Opatz *et al.* 2000; Castilla & Wadowsky 2000). Es gibt auch Vorschläge zur Dekontamination. Die vorgeschlagenen Verfahren sind allerdings entweder sehr aufwendig (Mupirocinbehandlung über mehrere Wochen (Krause-Opatz *et al.* 2000)), unsicher (Behandlung mit Ipegal CA-630 (Castilla & Wadowsky 2000)) oder verlangen den Einsatz von Mäusen (Dekontamination über intraperitoneale Infektion von SCID-Mäusen (Essig *et al.* 2000)). Das Amöbenverfahren ist vergleichsweise einfach und nach unseren bisherigen Erfahrungen sicher.

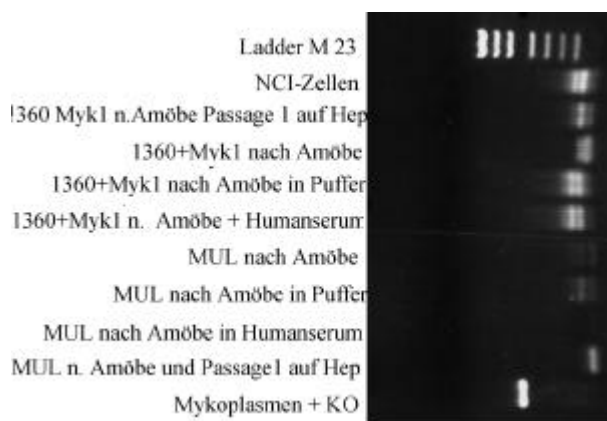


Abb. 44 Mykoplasmen PCR

Amöben wurden mit unterschiedlichen Chlamydien und Mykoplasmen koinfiziert. Nach unterschiedlichen Behandlungen wie Waschen in Puffer und Zusatz von Humanserum wurde nach 7 Tagen die DNS aufbereitet und in eine Mykoplasmen-PCR eingesetzt. Bei keiner der Proben fand sich nach Passage in Amöben die in der Kontrolle (unterste Spur) erkennbare eine positive Bande.

<sup>1</sup> Laut Ziegler-Heitbrock *et al.* lassen sich mit Humanserum Monozyten von Mykoplasmen reinigen (Ziegler-Heitbrock & Burger 1987)

## 2. Weitere Versuche zur Interaktion von *C. pneumoniae* und Monozyten

### 2.1. Adhärenzversuche mit infizierten Monozyten an Gefäßwandmodellen

In Zusammenarbeit mit einer Gruppe von Prof. Neumann im Deutschen Herzzentrum wurde an verschiedenen monozytären Zellen geprüft, ob eine Infektion mit *C. pneumoniae* zu einer verstärkten Haftung an Endothelzellwänden führt. Die Ergebnisse des Kooperationsprojektes werden in anderen Veröffentlichungen ausführlich dargestellt, und deshalb hier nur kurz angerissen. Zunächst wurden Versuche an HUVEC-Monolayern unter stehenden Bedingungen im 24-Well durchgeführt.

Es zeigte sich, dass Infektion mit Chlamydien zu einer verstärkten Haftung von Monozyten an diesen künstlichen Endothelien führt (siehe Tabelle 5, Bild 13). Es konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass bei Infektion der Monozyten Adhäsionsmoleküle wie CD54 hoch reguliert werden (siehe Abb. 28-32). Weitere Versuche wurden an einem Durchflussmodell durchgeführt. Die Monozyten wurden hierbei kontinuierlich unter Videoüberwachung über einen Zellrasen geleitet. Anschließend wurde der Videofilm auf Sticking und Rolling der Monozyten ausgewertet.

Diese in vitro Experimente wurden ergänzt durch eine klinische Studie, in der der prophylaktischen Wirkung von Roxithromycin auf Restenosierung nach Stentimplantation nachgegangen wurde. Gleichzeitig wurden Blutproben dieser Patienten mittels PCR auf das Vorhandensein chlamydialer DNA untersucht. Die verwendete PCR war am Institut für Mikrobiologie der TU München entwickelt worden und mittels des in dieser Arbeit beschriebenen Kulturverfahrens evaluiert worden. In dieser Studie konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Chlamydieninfektion und Restenosierung gefunden werden.

|             | Negativ Kontrolle | LPS Stimulation (1µg/ml) | Infektion mit <i>C. pneumoniae</i> |
|-------------|-------------------|--------------------------|------------------------------------|
| 24 Std p.i. | 62                | 63                       | 71                                 |
| 48 Std p.i. | 40                | 48                       | 53                                 |
| 72 Std p.i. | 5                 | 9                        | 8                                  |
| 96 Std p.i. | 3                 | 4                        | 3                                  |

Tabelle 5 Adhärenz von mit *C. pneumoniae* infizierten THP-1 an HUVEC-Zellen

Infizierte (Infektionsrate ca. 30%), LPS-stimulierte und unbehandelte THP-1 wurden wie in Material und Methoden beschrieben in ein 96 Well auf einen Huvec-Rasen gegeben und nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wieder heruntergespült. Die Zahl der adhärennten Zellen wurde ausgezählt. Infizierte Zellen adhärennten besonders zu frühen Zeitpunkten der Infektion vermehrt an dem Zellrasen.

### 2.2. Rolle des Transkriptionsfaktors NF-κ-B bei Infektion von Monozyten mit *C. pneumoniae*

NF-κ-B ist ein Transkriptionsfaktor der eine Schlüsselstelle bei der Aktivierung der Immunantwort einnimmt. Daneben spielt er eine wichtige Rolle bei apoptotischen Prozessen sowie bei der Pathogenese der Arteriosklerose.

Zur Aktivierung von NF-κ-B durch Chlamydien lag zum Zeitpunkt dieser Arbeit nur eine Veröffentlichungen zu *C. trachomatis* vor, in der die Aktivierung von NF-κ-B durch chlamydiales LPS über CD14 beschrieben wird (Ingalls *et al.* 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst geklärt werden ob NF-κ-B auch durch *C. pneumoniae* aktiviert wird. Wie das Beispiel für einen Gelretardierungsassay in Bild 14 zeigt kommt es nach Infektion von Monozyten mit *C. pneumoniae* zu einer raschen Aktivierung von NF-κ-B, die nach einer Stunde schon maximal ausgeprägt ist. Diese Aktivierung lässt langsam nach ist aber auch zu späteren Zeitpunkten der Infektion noch deutlich über dem Ruhenniveau. Eine solche

Aktivierung konnte mittlerweile in Übereinstimmung zu unseren Befunden auf Monozytenzelllinien auch auf Endothelzellen gezeigt werden (Dechend *et al.* 1999; Krull *et al.* 1999a; Miller *et al.* 2000; Molestina *et al.* 2000).

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit einer Arbeitsgruppe der klinischen Chemie um Korbinian Brand soll nun geklärt werden über welche Rezeptoren und durch welche chlamydialen Strukturen diese Aktivierung bewirkt wird.

### **2.3. Einfluss von Arteriosklerose-Risikofaktoren auf Infektion von Monozyten mit Chlamydien**

Wie oben beschrieben wäre ein mögliches Szenario, dass die bekannten Risikofaktoren nicht selbständig die Gefäßwand schädigen, sondern eine Infektion mit Chlamydien begünstigen, und diese Interaktion eine Ursache für die Entstehung der Arteriosklerose ist. Wir untersuchten also den Einfluss der Risikofaktoren Nikotin und Eisen auf Infektionsrate der Monozyten-Zelllinie MM6.

#### **2.3.1. Nikotin**

Obwohl die beiden Arteriosklerose-Risikofaktoren Rauchen und Infektion mit *C. pneumoniae* miteinander korrelieren (Leinonen & Saikku 1999; von Hertzen *et al.* 1998) lagen zum Einfluss von Nikotin auf Chlamydieninfektion bisher keine Untersuchungen vor.

Wir testeten ob Nikotin in MM6-Monozyten die Infektionsrate mit unterschiedlichen *C. pneumoniae* Stämmen beeinflusst. Zugabe von 10 pg Nikotin/ml brachte bei beiden Stämmen eine Steigerung der Infektionsrate um ca. 10 Prozentpunkte. Ein Verzehnfachen der Nikotindosis brachte keinen zusätzlichen Effekt (siehe Abb. 45).

Eine Erklärung für die Steigerung der Infektionsrate wäre die bereits beschriebene Hemmung der Abwehrfunktion von Monozyten durch Nikotin (Pabst *et al.* 1995). Auch eine unspezifische Aktivierung der Monozyten durch Nikotin und eine dadurch gesteigerte Aufnahme der Chlamydien ist möglich.

Die hier verwendeten Nikotindosen waren relativ hoch. Während des Rauchens können lokal aber durchaus solche hohen Konzentrationen erreicht werden können. Es ist also nach unseren Versuchen gut vorstellbar, dass Rauchen über den Faktor Nikotin zu dem beobachteten erhöhten Infektionsrisiko von Rauchern gegenüber *C. pneumoniae* beiträgt.

Da bekannt war, dass Nikotin auch die Lebensdauer von Monozyten durch Inhibierung von Apoptose verlängert (Aoshiba *et al.* 1996) und apoptotischen Prozessen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Arteriosklerose zukommt (Walsh & Isner 2000; Matturri *et al.* 2000) wurde auch der Einfluss von Nikotin auf das Apoptoseverhalten der MM6 bei Chlamydieninfektion untersucht.

Es zeigte sich, dass auch Nikotin alleine schon zu einer leichten Erhöhung der Apoptoserate führt, dass Nikotin gleichzeitig aber in der Lage ist, Apoptose-Auslösung durch Staurosporin zu inhibieren (Abb. 46). Die Zugabe von Nikotin zu mit Chlamydien infizierten Zellen führte dagegen nicht zu einer Verringerung der durch Chlamydien ausgelösten Apoptose, sondern im Gegenteil zu einer deutlichen Verstärkung der Apoptose. Zu berücksichtigen ist hierbei allerdings, dass die Nikotinzugabe wie wir oben gezeigt haben, zu einer Steigerung der Infektionsrate führt und auf diesem Weg die Auslösung der Apoptose verstärken könnte. Offensichtlich ist Nikotin aber ebenso wenig wie Caspaseinhibitoren oder Cycloheximid in der Lage die Apoptose durch Chlamydien zu unterdrücken.

Nach diesen Versuchen ist es denkbar, dass die Faktoren Chlamydien und Nikotin bei dem Eingriff in das Apoptoseverhalten auch in vivo miteinander interagieren und sich dies auch bei der Pathogenese der Arteriosklerose auswirkt.

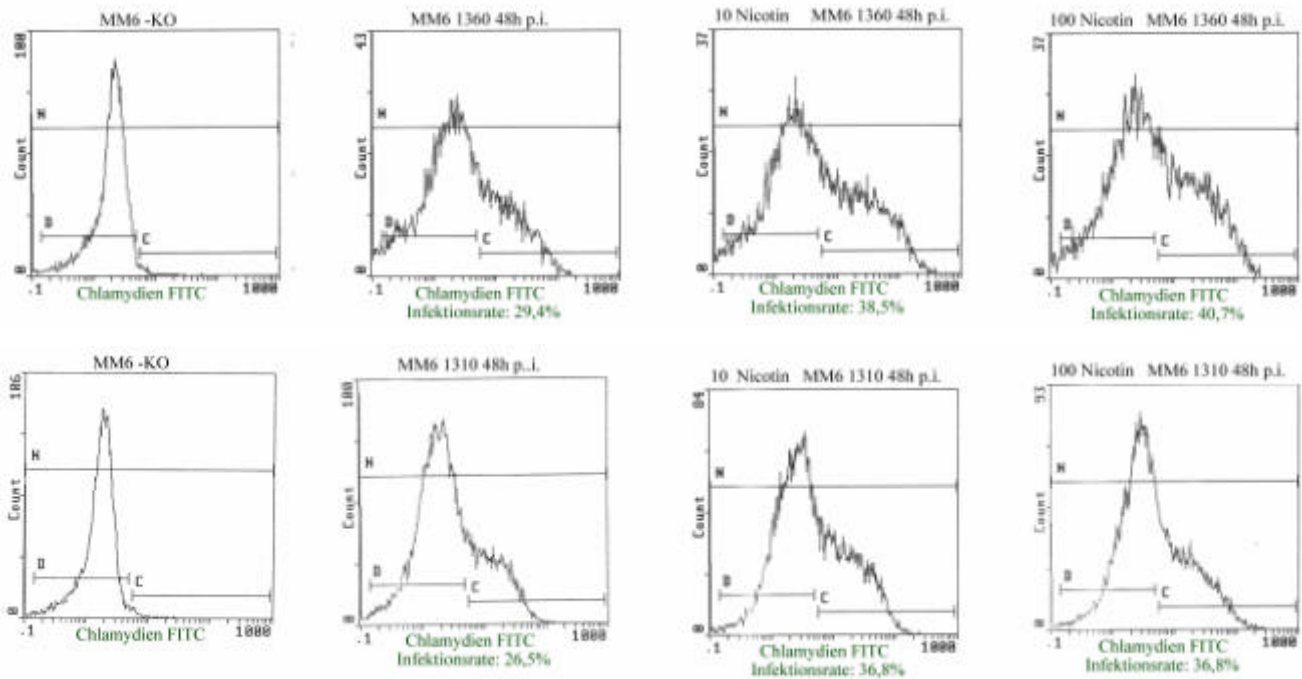


Abbildung 45: Einfluss von Nikotin auf Infektionsrate

MM6-Zellen wurden wie in „Methoden“ beschrieben in 24-Well (je Napf 100 000 Zellen in einem ml Medium) infiziert, einem Teil der Nöpfe wurde gleichzeitig mit den Chlamydien 10 bzw. 100 pg Nikotin zugesetzt. Der Zusatz von 10 pg Nikotin führt schon zu einer Steigerung der Infektionsrate um ca. 10%. Eine Verzehnfachung der Nikotindosis bringt keinen zusätzlichen Effekt.

### 2.3.2. Eisen

Frauen haben ein geringeres Infektionsrisiko für Infektionen mit *C. pneumoniae* als Männer. Die geringeren Eisenvorräte bei Frauen könnten einen gewissen Schutzfaktor gegen Chlamydieninfektionen darstellen. Wir hatten bereits gesehen, dass es bei Infektion mit *C. pneumoniae* zu einer Abregulation von CD71 kommt (Abb. 33). Wie unter bereits besprochen (3.5. CD71) ist belegt, dass die Abregulation des CD71 und die darauf folgende Verringerung der zellulären Eisenvorräte einen Schutzmechanismus gegen *C. trachomatis* darstellen (Igiertseme *et al.* 1998). Eisenentzug führte in einer weiteren Untersuchung bei *C. trachomatis* auf einer Epithelzelle zu einer signifikant erniedrigten Infektionsrate sowie deutlich verzögerten Reifung (Raulston 1997).

Wir fanden in zwei Versuchen nach Zugabe von Eisenchlorid eine leicht höhere Infektionsrate als bei den Kontrollen unter Zugabe von Natriumchlorid. Die Infektionsrate stieg jeweils von 26 auf 30, bzw. von 30 auf 35%. Diese Ergebnisse sind zusätzlich zu der gesehenen Herabregulation des Transferrinrezeptors (Abb. 46) ein weiterer Hinweis, dass der Eisenstoffwechsel auch bei der Infektion mit *C. pneumoniae* eine Rolle spielt. Es ist gut vorstellbar, dass der Faktor Eisen durch den Einfluss auf das Infektionsrisiko durch *C. pneumoniae* und weiterer Keime auch das Arterioskleroserisiko beeinflusst. Zu dieser Theorie passt, dass Östrogen, entgegen den bisherigen Vermutungen, keinen unabhängigen protektiven Faktor gegen Arteriosklerose darstellt (Rodstrom *et al.* 1999).

Ergänzung: Im Oktober 1999 erschien die erste Veröffentlichung die über eine Bedeutung des Eisenstoffwechsels bei Infektion mit *C. pneumoniae* spekulierte (Sullivan & Weinberg 1999), im März 2001 wurden unsere Ergebnisse durch eine weitere Veröffentlichung bestätigt (Freidank *et al.* 2001).

## VIII. Zusammenfassung

### 1. Optimierung des Anzuchtverfahrens

Die von verschiedenen Untersuchern als optimal angegebenen Anzuchtmethoden für *C. pneumoniae* unterschieden sich erheblich und beschränkten sich auf möglichst sensitive Verfahren zur Anzucht kleiner Chlamydienmengen aus Patientenproben. Wir entwickelten ein rationelles Verfahren für die Massenzucht von *C. pneumoniae*. Gleichzeitig optimierten wir die Methodik zur Anzucht kleiner Chlamydienmengen aus Patientenproben. Hierfür wurden die verschiedensten Einflussfaktoren untersucht.

Bei dem Vergleich verschiedener **Zellarten** erwies sich die bisherige Standardanzuchtzelle HeLa der Hep- und der NCI-Zelle deutlich unterlegen. Mit der NCI-Zelle wurde eine Zelle gefunden, die eine höhere Chlamydienausbeute als die bisher verwendeten HeLa und Hep-2-Zellen ermöglicht und sich zudem durch eine allgemein höhere Robustheit auszeichnet.

**Zentrifugation** war für eine erfolgreiche Anzucht unabdingbar. Für die sensitive Anzucht kleiner Chlamydienmengen erwies sich eine Zentrifugationsdauer von 90 Minuten als optimal, während für die Massenzucht von Chlamydien eine Zentrifugationsdauer von 30 min ausreichte. Die Zentrifugation konnte bis zu sechs Stunden nach Zugabe der Chlamydien durchgeführt werden, ohne dass es zu einem signifikanten Nachlassen der Infektionsrate im Vergleich zu sofortiger Zentrifugation kam. Für die Massenzucht ergibt sich durch die Möglichkeit, viele Platten gleichzeitig zu infizieren und dann nacheinander zu zentrifugieren, eine erhebliche Arbeitserleichterung.

Als beste Methoden zur Anzucht sehr kleiner Chlamydienmengen wurde noch Ende 1999 ein Verfahren mit täglicher Zentrifugation beschrieben. Durch die Ernte der Chlamydien nach 72 Stunden und Einsatz in einen neuen Infektionszyklus fanden wir bei kleinen Chlamydienmengen nach insgesamt sechs Tagen doppelt so viele Einschlusskörperchen wie mit Verfahren der täglichen Zentrifugation.

Der optimale **Erntezeitpunkt** lag bei drei Tagen nach Infektion. Die Ausbeute ließ aber innerhalb eines weiteren Tages nur leicht nach. Für die Massenzucht ist also auch eine Ernte nach vier Tagen zu verantworten, so dass in einem drei und vier Tage Rhythmus infiziert werden kann.

In Zellsuspensionen war eine Anzucht befriedigender Chlamydienmengen nicht möglich. Auf die Vorbereitung eines Zellrasens 10- 60 Stunden vor Infektion kann also nicht verzichtet werden. Die höchste Chlamydienausbeute ließ sich hier mit subkonfluenten **Zellrasen** erzielen, während sehr dichte oder dünne Rasen deutlich schlechter abschnitten. Zusatz von **Cycloheximid** zum Infektionsmedium steigert die Infektionsrate, wie beschrieben, erheblich. Eine Vorinkubation der Zelle mit Cycloheximid vor Infektion erwies sich aber als kontraproduktiv. Durch Variation des Zeitpunktes der Cycloheximid-Zugabe nach Infektion konnte keine weitere Verbesserung erreicht werden.

Ein Auswechseln des Infektionsmediums brachte keinen Vorteil und ist damit entgegen der allgemeinen Praxis nicht nötig.

In den Überständen nach 72 und 96 Stunden waren erhebliche Mengen an infektiösen Chlamydien nachweisbar. Der Überstand sollte also nicht, wie vielfach üblich, verworfen werden.

Zusammengenommen wurde in dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, mit dem es möglich ist, große Mengen an *C. pneumoniae* anzuzüchten, bei im Vergleich zu den vorbeschriebenen Verfahren minimalem Zeitaufwand und erheblicher Ersparnis an Materialien. Durch die Vereinfachung der Methodik und den Einsatz der robusteren NCI-Zelle ist das System zudem stabiler als bisherige Standardverfahren.



Gleichzeitig wurden die Optima der verschiedenen Einflussfaktoren für die Anzucht kleinster Chlamydienmengen eruiert und die Überlegenheit der Ernte nach 72 Stunden und Einsatz in einen zweiten Zyklus gegenüber der bisher als optimal geltenden Methode der täglichen Zentrifugation demonstriert. Es wurde abschließend ein Verfahren zur Anzucht von Chlamydien aus Patientenproben formuliert, das zumindest unter experimentellen Bedingungen deutlich sensitiver ist als bisher veröffentlichte Vorgehensweisen.

Ergänzend zu dem Anzuchtverfahren auf Kulturzellen wurde ein Infektionsverfahren für Amöben mit Chlamydien etabliert. Mittels Passage über Amöben gelang die Anzucht anderweitig nicht mehr kultivierbarer Chlamydien sowie die Dekontamination mykoplasmenkontaminierter Chlamydien. Ein großer Teil der weltweit isolierten *C. pneumoniae* Stämme ist mit Mykoplasmen kontaminiert. Bisher war es nicht möglich, die Eigenschaften dieser Stämme genau zu untersuchen, da kein Verfahren bekannt war, Chlamydien von Mykoplasmen zu dekontaminieren. Das in dieser Arbeit beschriebene Verfahren ermöglicht nun endlich die Reinigung dieser Chlamydien von Mykoplasmen. Weitere Einsatzmöglichkeiten des Amöbenmodells liegen in der Anzucht von Chlamydien aus mit weiteren Bakterien kontaminiertem Patientenmaterial, der Anzucht bisher nicht kultivierbarer Chlamydien-ähnlicher Organismen sowie der Untersuchung chlamydialer Überlebenstechniken und Aufnahmemechanismen.

## **2. Interaktion von *C. pneumoniae* mit Monozyten**

### **2.1. Etablierung der Infektionsmethoden von Monozyten**

Zunächst mussten einige Grundvoraussetzungen für die Infektion von Monozyten und den Ausschluss von Störfaktoren bei den geplanten Untersuchungen geschaffen werden. Zum Ausschluss von in Zellkultursystemen häufigen Mykoplasmen-Kontaminationen wurde eine PCR und eine DNS-Färbung etabliert. Um Artefakte in späteren Experimenten durch Verunreinigungen auszuschließen, wurde ein Aufreinigungsverfahren für Chlamydien über einen Urografin-Sucrosegradienten entwickelt. Die Bestimmung der Infektionsrate in Monozyten am FACS erforderte die Entwicklung von Färbeverfahren zur Darstellung der intrazellulären Chlamydien.

Nach diesen aufwendigen Vorarbeiten wurde anhand der Monozytenzelllinien MM6 und THP-1 ein Infektionsverfahren für Monozyten entwickelt und die Infektionsrate im Zeitverlauf bei Einsatz unterschiedlicher Infektionsdosen betrachtet. Mit ansteigender Dosis stieg die Infektionsrate auf beiden Zellen bis zu einem Maximalwert von ca. 60%, um bei weiterer Erhöhung der Infektionsdosis wieder abzufallen. Die Infektionsrate konnte ab 48 Stunden nach Infektion im FACS ermittelt werden. Sie fiel auf der MM6 innerhalb einer Woche auf der THP-1 innerhalb von zwei Wochen kontinuierlich bis unter die Nachweisgrenze.

Anschließend wurden weitere murine monozytäre Zelllinien wie RAW- und ANA-Zellen, murine dendritische Zellen und humane periphere Blutmonozyten auf ihre Infizierbarkeit durch *C. pneumoniae* getestet. Alle diese Zellen erwiesen sich als infizierbar. Besonders starke und lang anhaltende Infektionen waren auf den dendritischen Zellen (DC) der Maus zu beobachten. Diese Ergebnisse bestätigen, dass eine chronische Entzündung von Monozyten möglich ist, und dass sich Chlamydien auf diese Weise theoretisch im Körper ausbreiten können. Mit dem Infektionsverfahren und den entsprechenden Voraussetzungen wurde des Weiteren die Grundlage für spätere Untersuchungen gelegt. Interessant war in diesem Zusammenhang insbesondere die gute Infizierbarkeit der DC, da diese sich als Schlüsselzelle des Immunsystems für immunologische Untersuchungen anbietet.

## 2.2. Expression der Oberflächenrezeptoren

Nach Etablierung des Infektionsverfahrens und von Färbetechniken, die die gleichzeitige Darstellung von Chlamydien und Oberflächenmolekülen im FACS erlaubt, wurde auf MM6 und THP-1 die Expression verschiedener Oberflächenmarker (CD14, 54, 71, 80, 86, 95) unter Chlamydieninfektion untersucht.

Die deutliche Hochregulation von CD14 zeigte, dass es zu einer Aktivierung der Zellen kommt, bei der vermutlich auch LPS eine Rolle spielt. Mit der vermehrten Expression der koakzessorischen Moleküle CD54, CD86 wurden weitere Marker für eine Aktivierung der Zelle gefunden, die in vivo eine Rolle bei der Regulierung der Immunantwort insbesondere der Rekrutierung von T-Zellen spielen dürften. Es ist anzunehmen, dass CD54 gleichzeitig die Adhärenz der Monozyten steigert und damit zu einer Anhaftung infizierter Monozyten an Gefäßwänden beiträgt.

Die hier erzielten Ergebnisse und etablierten Methoden bilden die Grundlage für weitere Forschungsprojekte. So wurde unter anderem anhand dendritischer Zellen untersucht über welche Signalsysteme die Hochregulation der Oberflächenproteine gesteuert wird (Prebeck *et al.* 2001).

## 2.3. Einfluss von *Chlamydia pneumoniae* auf Apoptoseverhalten

Es lagen widersprüchlich scheinende Berichte zum Einfluss von *C. trachomatis* und *C. psittaci* auf das Apoptoseverhalten infizierter Zellen vor. Im Rahmen dieser Arbeit sollte an Monozytenzelllinien (MM6, THP-1) im Vergleich mit Epithelzellen (HeLa, NCI, Hep) untersucht werden, inwieweit *C. pneumoniae* die Apoptose beeinflusst.

Auch hier mussten zunächst einige Vorarbeiten wie Austestung unterschiedlicher Apoptosegifte und Entwicklung von Färbetechniken, zur gleichzeitigen Darstellung von Apoptose und Chlamydieninfektion im FACS und Mikroskop, geleistet werden.

Auf beiden Monozytenzelllinien wurden, wie auch auf den drei verwendeten Epithelzelllinien sowohl eine Inhibition wie eine Auslösung von Apoptose durch Infektion mit *C. pneumoniae* nachgewiesen. Die Apoptose hemmende Wirkung war zu Beginn der Infektion am stärksten ausgeprägt, wobei auch sehr niedrige Chlamydien-Konzentrationen, selbst inaktivierte Chlamydien, noch eine inhibierende Wirkung hatten.

Die Induktion der Apoptose durch *C. pneumoniae* war drei Tage nach Infektion am ausgeprägtesten. Apoptose ließ sich allerdings nur mit relativ großen Mengen vitaler Chlamydien auslösen. Inaktivierte Chlamydien bewirkten keinerlei Apoptose. Blockierung der klassischen Apoptose Maschinerie durch Caspaseinhibitor oder der Proteinsynthese durch Cycloheximid hatte erstaunlicherweise kaum einen Einfluss auf die apoptotische Wirkung der Chlamydien.

Diese Befunde lassen es als plausibel erscheinen, dass *C. pneumoniae* einerseits, wie für *C. trachomatis* beschrieben, Apoptose durch Inhibition von Caspase 3 und 9 unterdrückt, andererseits aber durch einen bisher unbekanntem Mechanismus gegen Ende des Vermehrungszyklus Apoptose auslöst, und auf diese Weise eine „unauffällige“ Freisetzung der Elementarkörper erreicht.

Auch durch diese Ergebnisse wurden weitere Forschungsvorhaben initiiert. Zur Zeit wird im Rahmen eines DFG-Projektes untersucht, durch welche Mechanismen *C. pneumoniae* Apoptose inhibiert und welche Proteine und Gene hierfür verantwortlich sind (Fischer *et al.* 2001).

## 2.4. Adhärenzversuche mit *C. pneumoniae* infizierten Monozyten an Gefäßwandmodellen

In Zusammenarbeit mit dem Deutschen Herzzentrum konnte gezeigt werden, dass Chlamydieninfektion bei Monozyten zu einer verstärkten Adhärenz an Gefäßmodellen führt. Diese Ergebnisse wurden ergänzt durch Messungen verschiedener Adhärenzfaktoren wie CD54. Durch diese Steigerung der Adhärenz wird zum einen eine Übertragung der

Chlamydien auf das Gefäßendothel, zum anderen eine Entzündungsreaktionen an der Gefäßwand durch Botenstoffe der Monozyten begünstigt. Darin könnte ein pathogenetischer Beitrag zur Entstehung der Arteriosklerose liegen. Die hier erzielten Ergebnisse werden im Moment ergänzt durch weitere Versuche in einem physiologischen Durchflussmodell.

## **2.5. Rolle des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ -B**

In Kooperation mit der klinischen Chemie wurde die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ -B bei der Auslösung der Immunantwort in Monozyten untersucht. Auf MM6 und THP-1 konnte eine Aktivierung dieses Faktors durch Chlamydien gezeigt werden. Auch diese Ergebnisse führten zur Initiierung eines tiefer gehenden Forschungsprojektes zu den molekularen Mechanismen der NF- $\kappa$ -B Aktivierung durch Chlamydien (Donath *et al.* 2002).

## **2.6. Einfluss von verfügbarem Eisen auf Infektion von Monozyten mit *C. pneumoniae***

Männer haben höhere Infektionsraten mit *C. pneumoniae* und höhere Herzinfarktraten als Frauen. Ein möglicher hierfür verantwortlicher Faktor sind die Eisen-Vorräte des Körpers. In ersten Versuchen auf der MM6 kam es unter Eisenzugabe zu einer Erhöhung der Infektionsraten. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Infektion der MM6 zu einer Herabregulation des für den Eisentransport wichtigen Transferrinrezeptors führt. Dies sind Hinweise, dass die Chlamydieninfektion von dem zur Verfügung stehenden Eisen beeinflusst wird.

## IX. Literatur

- Abrams J.T., Vonderheid E.C., Kolbe S., Appelt D.M., Arking E.J. & Balin B.J. (1999) Sezary T-cell activating factor is a Chlamydia pneumoniae-associated protein. *Clin Diagn Lab Immunol* 6, 895-905
- Airenne S., Surcel H.M., Alakarppa H., Laitinen K., Paavonen J., Saikku P. & Laurila A. (1999) Chlamydia pneumoniae infection in human monocytes [published erratum appears in *Infect Immun* 1999 Dec;67(12):6716]. *Infect Immun* 67, 1445-1449
- Airenne S., Surcel H.M., Bloigu A., Laitinen K., Saikku P. & Laurila A. (2000) The resistance of human monocyte-derived macrophages to Chlamydia pneumoniae infection is enhanced by interferon-gamma. *APMIS* 108, 139-144
- Allegra L., Blasi F., Centanni S., Cosentini R., Denti F., Raccanelli R., Tarsia P. & Valenti V. (1994) Acute exacerbations of asthma in adults: role of Chlamydia pneumoniae infection. *Eur Respir J* 7, 2165-2168
- Amann R., Springer N., Schonhuber W., Ludwig W., Schmid E.N., Muller K.D. & Michel R. (1997) Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to Chlamydia spp. *Appl Environ Microbiol* 63, 115-121
- Anderson J.L. & Muhlestein J.B. (2000) The ACADEMIC study in perspective (Azithromycin in coronary artery disease: elimination of myocardial infection with Chlamydia). *J Infect Dis* 181 Suppl 3, S569-S571
- Aoshiba K., Nagai A., Yasui S. & Konno K. (1996) Nicotine prolongs neutrophil survival by suppressing apoptosis. *J Lab Clin Med* 127, 186-194
- Apfalter P., Blasi F., Boman J., Gaydos C.A., Kundi M., Maass M., Makristathis A., Meijer A., Nadrchal R., Persson K., Rotter M.L., Tong C.Y., Stanek G. & Hirschl A.M. (2001) Multicenter Comparison Trial of DNA Extraction Methods and PCR Assays for Detection of Chlamydia pneumoniae in Endarterectomy Specimens. *J Clin Microbiol* 39, 519-524
- Bachmaier K., Neu N., de la Maza L.M., Pal S., Hessel A. & Penninger J.M. (1999) Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science* 283, 1335-1339
- Beatty P.R. & Stephens R.S. (1994) CD8+ T lymphocyte-mediated lysis of Chlamydia-infected L cells using an endogenous antigen pathway. *J Immunol* 153, 4588-4595
- Beatty W.L., Belanger T.A., Desai A.A., Morrison R.P. & Byrne G.I. (1994a) Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun* 62, 3705-3711
- Beatty W.L., Morrison R.P. & Byrne G.I. (1994b) Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 58, 686-699
- Beatty W.L., Morrison R.P. & Byrne G.I. (1995) Reactivation of persistent Chlamydia trachomatis infection in cell culture. *Infect Immun* 63, 199-205

- Birtles R.J., Rowbotham T.J., Storey C., Marrie T.J. & Raoult D. (1997) Chlamydia-like obligate parasite of free-living amoebae. *Lancet* 349, 925-926
- Bobryshev Y.V., Babaev V.R., Lord R.S. & Watanabe T. (1999) Ultrastructural identification of cells with dendritic cell appearance in atherosclerotic aorta of apolipoprotein E deficient mice. *J Submicrosc Cytol Pathol* 31, 527-531
- Bong R (1996) *Doktorarbeit Freiburg*
- Brade H., Brade L. & Nano F.E. (1987) Chemical and serological investigations on the genus-specific lipopolysaccharide epitope of Chlamydia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 2508-2512
- Brade L., Schramek S., Schade U. & Brade H. (1986) Chemical, biological, and immunochemical properties of the Chlamydia psittaci lipopolysaccharide. *Infect Immun* 54, 568-574
- Brodsky F.M., Lem L., Solache A. & Bennett E.M. (1999) Human pathogen subversion of antigen presentation. *Immunol Rev* 168, 199-215
- Brunham R.C., Zhang D.J., Yang X. & McClarty G.M. (2000) The potential for vaccine development against chlamydial infection and disease. *J Infect Dis* 181 Suppl 3, S538-S543
- Byrd T.F. & Horwitz M.A. (1993) Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma. *J Clin Invest* 91, 969-976
- Caldwell H.D., Kromhout J. & Schachter J. (1981) Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. *Infect Immun* 31, 1161-1176
- Carlin J.M., Borden E.C. & Byrne G.I. (1989) Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits Chlamydia psittaci replication in human macrophages. *J Interferon Res* 9, 329-337
- Castilla E.A. & Wadowsky R.M. (2000) Effect of a Mycoplasma hominis-like Mycoplasma on the infection of HEp-2 cells by the TW-183 strain of Chlamydia pneumoniae. *J Clin Microbiol* 38, 861-862
- Cerrone M.C., Ma J.J. & Stephens R.S. (1991) Cloning and sequence of the gene for heat shock protein 60 from Chlamydia trachomatis and immunological reactivity of the protein. *Infect Immun* 59, 79-90
- Chen J.C. & Stephens R.S. (1997) Chlamydia trachomatis glycosaminoglycan-dependent and independent attachment to eukaryotic cells. *Microb Pathog* 22, 23-30
- Chia J.K. & Chia L.Y. (1999) Chronic Chlamydia pneumoniae infection: a treatable cause of chronic fatigue syndrome. *Clin Infect Dis* 29, 452-453
- Chiu B. (1999) Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J* 138, S534-S536

- Christiansen G., Boesen T., Hjerno K., Daugaard L., Mygind P., Madsen A.S., Knudsen K., Falk E. & Birkelund S. (1999) Molecular biology of Chlamydia pneumoniae surface proteins and their role in immunopathogenicity. *Am Heart J* 138, S491-S495
- Cles L.D. & Stamm W.E. (1990) Use of HL cells for improved isolation and passage of Chlamydia pneumoniae. *J Clin Microbiol* 28, 938-940
- Costa C.P., Kirschning C.J., Busch D., Durr S., Jennen L., Heinzmann U., Prebeck S., Wagner H. & Miethke T. (2002) Role of chlamydial heat shock protein 60 in the stimulation of innate immune cells by Chlamydia pneumoniae. *Eur.J.Immunol.* 32, 2460-2470
- Croy T.R., Kuo C.C. & Wang S.P. (1975) Comparative susceptibility of eleven mammalian cell lines to infection with trachoma organisms. *J Clin Microbiol* 1, 434-439
- Daian C.M., Wolff A.H. & Bielory L. (2000) The role of atypical organisms in asthma. *Allergy Asthma Proc* 21, 107-111
- Danesh J., Whincup P., Walker M., Lennon L., Thomson A., Appleby P., Wong Y., Bernardes-Silva M. & Ward M. (2000) Chlamydia pneumoniae IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *BMJ* 321, 208-213
- Dechend R., Maass M., Gieffers J., Dietz R., Scheidereit C., Leutz A. & Gulba D.C. (1999) Chlamydia pneumoniae infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI-1 expression: a potential link to accelerated arteriosclerosis. *Circulation* 100, 1369-1373
- Donath B., Fischer C., Page S., Prebeck S., Jilg N., Weber M., da Costa C., Neumeier D., Miethke T. & Brand K. (2002) Chlamydia pneumoniae activates IKK/IkappaB-mediated signaling, which is inhibited by 4HNE and following primary exposure. *Atherosclerosis* 165, 79
- Earnshaw W.C., Martins L.M. & Kaufmann S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424
- Eremeeva M.E., Balayeva N.M. & Raoult D. (1994) Purification of rickettsial cultures contaminated by mycoplasmas. *Acta Virol* 38, 231-233
- Essig A., Heinemann M., Schweitzer R., Simnacher U. & Marre R. (2000) Decontamination of a Mycoplasma-infected Chlamydia pneumoniae strain by pulmonary passage in SCID mice [In Process Citation]. *Int J Med Microbiol* 290, 289-292
- Essig A., Heinemann M., Simnacher U. & Marre R. (1997) Infection of Acanthamoeba castellanii by Chlamydia pneumoniae. *Appl Environ Microbiol* 63, 1396-1399
- Everett K.D. (2000) Chlamydia and Chlamydiales: more than meets the eye. *Vet Microbiol* 75, 109-126

- Everett K.D., Bush R.M. & Andersen A.A. (1999) Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 2, 415-440
- Fan T., Lu H., Hu H., Shi L., McClarty G.A., Nance D.M., Greenberg A.H. & Zhong G. (1998) Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med* 187, 487-496
- File T.M.J., Tan J.S. & Plouffe J.F. (1998) The role of atypical pathogens: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella pneumophila* in respiratory infection. *Infect Dis Clin North Am* 12, 569-92, vii
- Fischer H.G., Dorfler R., Schade B. & Hadding U. (1999) Differential CD86/B7-2 expression and cytokine secretion induced by *Toxoplasma gondii* in macrophages from resistant or susceptible BALB H-2 congenic mice. *Int Immunol* 11, 341-349
- Fischer S.F., Schwarz C., Vier J. & Hacker G. (2001) Characterization of antiapoptotic activities of *Chlamydia pneumoniae* in human cells. *Infect. Immun.* 69, 7121-7129
- Fong I.W. (1999) Value of animal models for *Chlamydia pneumoniae*-related atherosclerosis. *Am Heart J* 138, S512-S513
- Fong I.W., Chiu B., Viira E., Fong M.W., Jang D. & Mahony J. (1997) Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 35, 48-52
- Foss D.L., Zilliox M.J. & Murtaugh M.P. (1999) Differential regulation of macrophage interleukin-1 (IL-1), IL-12, and CD80-CD86 by two bacterial toxins. *Infect Immun* 67, 5275-5281
- Freidank H.M., Billing H. & Wiedmann-Al-Ahmad M. (2001) Influence of iron restriction on *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *J Med Microbiol* 50, 223-227
- Friedman M.G., Galil A., Greenberg S. & Kahane S. (1999) Seroprevalence of IgG antibodies to the chlamydia-like microorganism 'Simkania Z' by ELISA. *Epidemiol Infect* 122, 117-123
- Fukushi H. & Hirai K. (1992) Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int J Syst Bacteriol* 42, 306-308
- Gao L.Y. & Kwaik Y.A. (2000) The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 8, 306-313
- Gaydos C.A., Quinn T.C., Bobo L.D. & Eiden J.J. (1992) Similarity of *Chlamydia pneumoniae* strains in the variable domain IV region of the major outer membrane protein gene. *Infect Immun* 60, 5319-5323

- Gaydos C.A., Summersgill J.T., Sahney N.N., Ramirez J.A. & Quinn T.C. (1996) Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infect Immun* 64, 1614-1620
- Gibellini D., Panaya R. & Rumpianesi F. (1998) Induction of apoptosis by *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* infection in tissue culture cells. *Zentralbl Bakteriol* 288, 35-43
- Grayston J.T., Kuo C.C., Wang S.P. & Altman J. (1986) A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N Engl J Med* 315, 161-168
- Grayston J.T., Wang S.P., Kuo C.C. & Campbell L.A. (1989) Current knowledge on *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8, 191-202
- Guagliardi L.E., Paulnock D.M. & Albrecht R.M. (1987) Expression of major histocompatibility complex antigens on macrophages: correlative study using flow cytometry, radioimmunoassay, and colloidal gold immunolabeling. *Scanning Microsc* 1, 705-711
- Gurfinkel E., Bozovich G., Beck E., Testa E., Livellara B. & Mautner B. (1999) Treatment with the antibiotic roxithromycin in patients with acute non-Q-wave coronary syndromes. The final report of the ROXIS Study. *Eur Heart J* 20, 121-127
- Hackstadt T., Fischer E.R., Scidmore M.A., Rockey D.D. & Heinzen R.A. (1997) Origins and functions of the chlamydial inclusion [see comments]. *Trends Microbiol* 5, 288-293
- Hahn H (1994) Chlamydien. In: *Medizinische Mikrobiologie* (ed Hahn H F.D.K.P.H.), 2 edn, pp. 490-496. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hahn D.L. (1999) *Chlamydia pneumoniae*, asthma, and COPD: what is the evidence? *Ann Allergy Asthma Immunol* 83, 271-88, 291
- Halme S., Saikku P. & Surcel H.M. (1997) Characterization of *Chlamydia pneumoniae* antigens using human T cell clones. *Scand J Immunol* 45, 378-384
- Halme S. & Surcel H.M. (1997) Cell mediated immunity to *Chlamydia pneumoniae*. *Scand J Infect Dis Suppl* 104, 18-21
- Heinemann M., Kern W.V., Bunjes D., Marre R. & Essig A. (2000) Severe *Chlamydia pneumoniae* Infection in Patients with Neutropenia: Case Reports and Literature Review. *Clin Infect Dis* 31, 181-184
- Heinemann M., Susa M., Simnacher U., Marre R. & Essig A. (1996) Growth of *Chlamydia pneumoniae* induces cytokine production and expression of CD14 in a human monocytic cell line. *Infect Immun* 64, 4872-4875



- Hmama Z., Knutson K.L., Herrera-Velitz P., Nandan D. & Reiner N.E. (1999) Monocyte adherence induced by lipopolysaccharide involves CD14, LFA-1, and cytohesin-1. Regulation by Rho and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 274, 1050-1057
- Hopert A., Uphoff C.C., Wirth M., Hauser H. & Drexler H.G. (1993) Mycoplasma detection by PCR analysis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A, 819-821
- Hu H., Pierce G.N. & Zhong G. (1999) The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to Chlamydia pneumoniae. *J Clin Invest* 103, 747-753
- Hunniche B.S., Jensen L.T., Birkelund S. & Christiansen G. (1998) Mycoplasma contamination of Chlamydia pneumoniae isolates. *Scand J Infect Dis* 30, 181-187
- Igietseme J.U., Ananaba G.A., Bolier J., Bowers S., Moore T., Belay T., Lyn D. & Black C.M. (1999) The intercellular adhesion molecule type-1 is required for rapid activation of T helper type 1 lymphocytes that control early acute phase of genital chlamydial infection in mice. *Immunology* 98, 510-519
- Igietseme J.U., Ananaba G.A., Candal D.H., Lyn D. & Black C.M. (1998) Immune control of Chlamydial growth in the human epithelial cell line RT4 involves multiple mechanisms that include nitric oxide induction, tryptophan catabolism and iron deprivation. *Microbiol Immunol* 42, 617-625
- Igietseme J.U., Magee D.M., Williams D.M. & Rank R.G. (1994) Role for CD8+ T cells in antichlamydial immunity defined by Chlamydia-specific T-lymphocyte clones. *Infect Immun* 62, 5195-5197
- Igietseme J.U., Uriri I.M., Hawkins R. & Rank R.G. (1996) Integrin-mediated epithelial-T cell interaction enhances nitric oxide production and increased intracellular inhibition of Chlamydia. *J Leukoc Biol* 59, 656-662
- Ingalls R.R., Rice P.A., Qureshi N., Takayama K., Lin J.S. & Golenbock D.T. (1995) The inflammatory cytokine response to Chlamydia trachomatis infection is endotoxin mediated. *Infect Immun* 63, 3125-3130
- Jackson L.A., Smith N.L., Heckbert S.R., Grayston J.T., Siscovick D.S. & Psaty B.M. (1999a) Lack of association between first myocardial infarction and past use of erythromycin, tetracycline, or doxycycline. *Emerg Infect Dis* 5, 281-284
- Jackson L.A., Stewart D.K., Wang S.P., Cooke D.B., Cantrell T. & Grayston J.T. (1999b) Safety and effect on anti-Chlamydia pneumoniae antibody titres of a 1 month course of daily azithromycin in adults with coronary artery disease. *J Antimicrob Chemother* 44, 411-414
- Jollow K.C., Zimring J.C., Sundstrom J.B. & Ansari A.A. (1999) CD40 ligation induced phenotypic and functional expression of CD80 by human cardiac microvascular endothelial cells. *Transplantation* 68, 430-439
- Kahane S., Greenberg D., Friedman M.G., Haikin H. & Dagan R. (1998) High prevalence of "Simkania Z," a novel Chlamydia-like bacterium, in infants with acute bronchiolitis [published erratum appears in J Infect Dis 1998 Nov;178(5):1553]. *J Infect Dis* 177, 1425-1429

- Kahane S., Metzger E. & Friedman M.G. (1995) Evidence that the novel microorganism 'Z' may belong to a new genus in the family Chlamydiaceae. *FEMS Microbiol Lett* 126, 203-207
- Kalayoglu M.V. & Byrne G.I. (1998) Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 177, 725-729
- Kalman S., Mitchell W., Marathe R., Lammel C., Fan J., Hyman R.W., Olinger L., Grimwood J., Davis R.W. & Stephens R.S. (1999) Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet* 21, 385-389
- Kaltenboeck B., Kousoulas K.G. & Storz J. (1993) Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (ompA) genes of the four chlamydial species. *J Bacteriol* 175, 487-502
- Karvonen M., Tuomilehto J., Pitkaniemi J., Naukkarinen A. & Saikku P. (1994) *Chlamydia pneumoniae* IgG antibody prevalence in south-western and eastern Finland in 1982 and 1987. *Int J Epidemiol* 23, 176-184
- Kaukoranta-Tolvanen S.S., Ronni T., Leinonen M., Saikku P. & Laitinen K. (1996a) Expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated by *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Pathog* 21, 407-411
- Kaukoranta-Tolvanen S.S., Teppo A.M., Laitinen K., Saikku P., Linnavuori K. & Leinonen M. (1996b) Growth of *Chlamydia pneumoniae* in cultured human peripheral blood mononuclear cells and induction of a cytokine response. *Microb Pathog* 21, 215-221
- Kauppinen M. & Saikku P. (1995) Pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae*: prevalence, clinical features, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis* 21 Suppl 3, 5244-5252
- Kazuyama Y., Lee S.M., Amamiya K. & Taguchi F. (1997) A novel method for isolation of *Chlamydia pneumoniae* by treatment with trypsin or EDTA. *J Clin Microbiol* 35, 1624-1626
- Kim S.K., Devine L., Angevine M., DeMars R. & Kavathas P.B. (2000) Direct detection and magnetic isolation of chlamydia trachomatis major outer membrane protein-specific CD8(+) CTLs with HLA class I tetramers [In Process Citation]. *J Immunol* 165, 7285-7292
- Knudsen K., Madsen A.S., Mygind P., Christiansen G. & Birkelund S. (1999) Identification of two novel genes encoding 97- to 99-kilodalton outer membrane proteins of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun* 67, 375-383
- Kol A., Bourcier T., Lichtman A.H. & Libby P. (1999) Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* 103, 571-577
- Koyi H., Branden E., Gnarp J., Gnarp H., Arnholm B. & Hillerdal G. (1999) *Chlamydia pneumoniae* may be associated with lung cancer. Preliminary report on a seroepidemiological study. *APMIS* 107, 828-832
- Krause-Opatz B., Dollmann P., Zeidler H., Kuipers J.G. & Kohler L. (2000) Frequent contamination of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* strains with mycoplasma. Biological relevance and selective eradication of mycoplasma from chlamydial cultures with mupirocin [In Process Citation]. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 189, 19-26

- Kroemer G. (1999) Mitochondrial control of apoptosis: an overview. *Biochem Soc Symp* 66, 1-15
- Krull M., Klucken A.C., Wuppermann F.N., Fuhrmann O., Magerl C., Seybold J., Hippenstiel S., Hegemann J.H., Jantos C.A. & Suttorp N. (1999b) Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol* 162, 4834-4841
- Krull M., Klucken A.C., Wuppermann F.N., Fuhrmann O., Magerl C., Seybold J., Hippenstiel S., Hegemann J.H., Jantos C.A. & Suttorp N. (1999a) Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol* 162, 4834-4841
- Kuo C. & Campbell L.A. (2000) Detection of *Chlamydia pneumoniae* in arterial tissues. *J Infect Dis* 181 Suppl 3, S432-S436
- Kuo C., Wang S., Wentworth B.B. & Grayston J.T. (1972) Primary isolation of TRIC organisms in HeLa 229 cells treated with DEAE-dextran. *J Infect Dis* 125, 665-668
- Kuo C.C. & Grayston J.T. (1988) Factors affecting viability and growth in HeLa 229 cells of *Chlamydia* sp. strain TWAR. *J Clin Microbiol* 26, 812-815
- Kuo C.C. & Grayston J.T. (1990a) A sensitive cell line, HL cells, for isolation and propagation of *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *J Infect Dis* 162, 755-758
- Kuo C.C. & Grayston J.T. (1990b) Amino acid requirements for growth of *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures: growth enhancement by lysine or methionine depletion. *J Clin Microbiol* 28, 1098-1100
- Laitinen K., Laurila A., Pyhala L., Leinonen M. & Saikku P. (1997) *Chlamydia pneumoniae* infection induces inflammatory changes in the aortas of rabbits. *Infect Immun* 65, 4832-4835
- Layh-Schmitt G., Bendl C., Hildt U., Dong-Si T., Juttler E., Schnitzler P., Grond-Ginsbach C. & Grau A.J. (2000) Evidence for infection with *Chlamydia pneumoniae* in a subgroup of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 47, 652-655
- Leinonen M. & Saikku P. (1999) Interaction of *Chlamydia pneumoniae* infection with other risk factors of atherosclerosis. *Am Heart J* 138, S504-S506
- Lord R.S. & Bobryshev Y.V. (1999) Clustering of dendritic cells in athero-prone areas of the aorta [letter; comment]. *Atherosclerosis* 146, 197-198
- Loziquez O., Arnaud E., Belec L., Nicaud V., Alhenc-Gelas M., Fiessinger J.N., Aiach M. & Emmerich J. (2000) Demonstration of an association between *Chlamydia pneumoniae* infection and venous thromboembolic disease. *Thromb Haemost* 83, 887-891
- Lu H. & Zhong G. (1999) Interleukin-12 production is required for chlamydial antigen-pulsed dendritic cells to induce protection against live *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun* 67, 1763-1769

- Maass M. & Dalhoff K. (1995) Transport and storage conditions for cultural recovery of Chlamydia pneumoniae. *J Clin Microbiol* 33, 1793-1796
- Maass M., Essig A., Marre R. & Henkel W. (1993) Growth in serum-free medium improves isolation of Chlamydia pneumoniae. *J Clin Microbiol* 31, 3050-3052
- Maass M. & Harig U. (1995) Evaluation of culture conditions used for isolation of Chlamydia pneumoniae. *Am J Clin Pathol* 103, 141-148
- Magee D.M., Williams D.M., Smith J.G., Bleicker C.A., Grubbs B.G., Schachter J. & Rank R.G. (1995) Role of CD8 T cells in primary Chlamydia infection. *Infect Immun* 63, 516-521
- Manor E. & Sarov I. (1986) Fate of Chlamydia trachomatis in human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 54, 90-95
- Marie I., Lecomte F., Levesque H., Janvresse C., Kerleau J.M., Cailleux N. & Courtois H. (1999) Lofgren's syndrome as the first manifestation of acute infection due to Chlamydia pneumoniae: a prospective study. *Clin Infect Dis* 28, 691-692
- Matturri L., Cazzullo A., Turconi P., Roncoroni L., Grana D. & Milei J. (2000) Inflammatory cells, apoptosis and chlamydia pneumoniae infection in atherosclerosis [In Process Citation]. *Int J Cardiol* 75, 23-33
- Mayr M., Metzler B., Kiechl S., Willeit J., Schett G., Xu Q. & Wick G. (1999) Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of Escherichia coli and Chlamydia pneumoniae: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation* 99, 1560-1566
- Meinl E., Fickenscher H., Thome M., Tschopp J. & Fleckenstein B. (1998) Anti-apoptotic strategies of lymphotropic viruses. *Immunol Today* 19, 474-479
- Melissano G., Blasi F., Esposito G., Tarsia P., Dordoni L., Arosio C., Tshomba Y., Fagetti L., Allegra L. & Chiesa R. (1999) Chlamydia pneumoniae eradication from carotid plaques. Results of an open, randomised treatment study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 18, 355-359
- Miller S.A., Selzman C.H., Shames B.D., Barton H.A., Johnson S.M. & Harken A.H. (2000) Chlamydia pneumoniae activates nuclear factor kappaB and activator protein 1 in human vascular smooth muscle and induces cellular proliferation. *J Surg Res* 90, 76-81
- Moazed T.C., Kuo C., Grayston J.T. & Campbell L.A. (1997) Murine models of Chlamydia pneumoniae infection and atherosclerosis. *J Infect Dis* 175, 883-890
- Moazed T.C., Kuo C., Patton D.L., Grayston J.T. & Campbell L.A. (1996) Experimental rabbit models of Chlamydia pneumoniae infection. *Am J Pathol* 148, 667-676

- Moazed T.C., Kuo C.C., Grayston J.T. & Campbell L.A. (1998) Evidence of systemic dissemination of Chlamydia pneumoniae via macrophages in the mouse. *J Infect Dis* 177, 1322-1325
- Molestina R.E., Miller R.D., Lentsch A.B., Ramirez J.A. & Summersgill J.T. (2000) Requirement for NF-kappaB in transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 1 by Chlamydia pneumoniae in human endothelial cells. *Infect Immun* 68, 4282-4288
- Morrison R.P. (1991) Chlamydial hsp60 and the immunopathogenesis of chlamydial disease. *Semin Immunol* 3, 25-33
- Morrison S.G. & Morrison R.P. (2000) In situ analysis of the evolution of the primary immune response in murine Chlamydia trachomatis genital tract infection. *Infect Immun* 68, 2870-2879
- Moulder JW (1988) Characteristics of Chlamydia. In: *Microbiology of Chlamydia* (ed Barron AL), pp. 3-19. Boca Roton, FL, CRC press.
- Moulder J.W. (1991) Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev* 55, 143-190
- Moulder J.W. (1993) Why is Chlamydia sensitive to penicillin in the absence of peptidoglycan? *Infect Agents Dis* 2, 87-99
- Moulder J.W., Hatch T.P., Byrne G.I. & Kellogg K.R. (1976) Immediate toxicity of high multiplicities of Chlamydia psittaci for mouse fibroblasts (L cells). *Infect Immun* 14, 277-289
- Muhlestein J.B., Anderson J.L., Carlquist J.F., Salunkhe K., Horne B.D., Pearson R.R., Bunch T.J., Allen A., Trehan S. & Nielson C. (2000) Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease : primary clinical results of the ACADEMIC study [In Process Citation]. *Circulation* 102, 1755-1760
- Munoz B. & West S. (1997) Trachoma: the forgotten cause of blindness. *Epidemiol Rev* 19, 205-217
- Netea M.G., Selzman C.H., Kullberg B.J., Galama J.M., Weinberg A., Stalenhoef A.F., Van der Meer J.W. & Dinarello C.A. (2000) Acellular components of Chlamydia pneumoniae stimulate cytokine production in human blood mononuclear cells. *Eur J Immunol* 30, 541-549
- Newhall W.J. (1988) Antigenic structure of surface-exposed regions of the major outer-membrane protein of Chlamydia trachomatis. *Rev Infect Dis* 10 Suppl 2, S386-S390
- Ni K. & O'Neill H.C. (1997) The role of dendritic cells in T cell activation. *Immunol Cell Biol* 75, 223-230
- Numazaki K., Suzuki K. & Chiba S. (1995) Replication of Chlamydia trachomatis and C. pneumoniae in the human monocytic cell line U-937. *J Med Microbiol* 42, 191-195
- Nurminen M., Rietschel E.T. & Brade H. (1985) Chemical characterization of Chlamydia trachomatis lipopolysaccharide. *Infect Immun* 48, 573-575
- Odeh M. & Oliven A. (1992) Chlamydial infections of the heart. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11, 885-893

- Ojcius D.M., Bravo d.A., Kanellopoulos J.M., Hawkins R.A., Kelly K.A., Rank R.G. & Dautry-Varsat A. (1998b) Internalization of Chlamydia by dendritic cells and stimulation of Chlamydia-specific T cells. *J Immunol* 160, 1297-1303
- Ojcius D.M., Bravo d.A., Kanellopoulos J.M., Hawkins R.A., Kelly K.A., Rank R.G. & Dautry-Varsat A. (1998a) Internalization of Chlamydia by dendritic cells and stimulation of Chlamydia-specific T cells. *J Immunol* 160, 1297-1303
- Ojcius D.M., Hellio R. & Dautry-Varsat A. (1997) Distribution of endosomal, lysosomal, and major histocompatibility complex markers in a monocytic cell line infected with Chlamydia psittaci. *Infect Immun* 65, 2437-2442
- Ojcius D.M., Souque P., Perfettini J.L. & Dautry-Varsat A. (1998c) Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen Chlamydia psittaci. *J Immunol* 161, 4220-4226
- Oriel J.D. (1984) Public health aspects of sexually transmitted diseases. *Public Health Rev* 12, 131-157
- Ossewaarde J.M. & Meijer A. (1999) Molecular evidence for the existence of additional members of the order Chlamydiales. *Microbiology* 145 ( Pt 2), 411-417
- Oyelese A.O., Brunham R.C., McDowell J. & Williams T. (1987) Enhanced susceptibility of trypsinized HeLa cells to Chlamydia trachomatis infection. *Eur J Clin Microbiol* 6, 594-596
- Pabst M.J., Pabst K.M., Collier J.A., Coleman T.C., Lemons-Prince M.L., Godat M.S., Waring M.B. & Babu J.P. (1995) Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. *J Periodontol* 66, 1047-1055
- Pate M.S. & Hook E.W. (1995) Laboratory to laboratory variation in Chlamydia trachomatis culture practices. *Sex Transm Dis* 22, 322-326
- Perry L.L., Feilzer K., Portis J.L. & Caldwell H.D. (1998) Distinct homing pathways direct T lymphocytes to the genital and intestinal mucosae in Chlamydia-infected mice. *J Immunol* 160, 2905-2914
- Peterson E.M., de la Maza L.M., Brade L. & Brade H. (1998) Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of Chlamydia pneumoniae. *Infect Immun* 66, 3848-3855
- Pinelli E., Rutten V.P., Bruysters M., Moore P.F. & Ruitenbergh E.J. (1999) Compensation for decreased expression of B7 molecules on Leishmania infantum-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infect Immun* 67, 237-243
- Ponka P. (1999) Cellular iron metabolism. *Kidney Int Suppl* 69, S2-11
- Poppert S., Marre R. & Essig A. (2001) Biology and clinical significance of chlamydiae. *Contrib. Microbiol.* 8, 51-71
- Prebeck S., Kirschning C., Durr S., da Costa C., Donath B., Brand K., Redecke V., Wagner H. & Miethke T. (2001) Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in Chlamydia pneumoniae-induced activation of dendritic cells. *J. Immunol.* 167, 3316-3323

- Pruckler J.M., Masse N., Stevens V.A., Gang L., Yang Y., Zell E.R., Dowell S.F. & Fields B.S. (1999) Optimizing culture of *Chlamydia pneumoniae* by using multiple centrifugations. *J Clin Microbiol* 37, 3399-3401
- Quinn T.C. & Gaydos C.A. (1999) In vitro infection and pathogenesis of *Chlamydia pneumoniae* in endovascular cells. *Am Heart J* 138, S507-S511
- Qureshi N., Kaltashov I., Walker K., Doroshenko V., Cotter R.J., Takayama K., Sievert T.R., Rice P.A., Lin J.S. & Golenbock D.T. (1997) Structure of the monophosphoryl lipid A moiety obtained from the lipopolysaccharide of *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem* 272, 10594-10600
- Rank R.G., Batteiger B.E. & Soderberg L.S. (1988) Susceptibility to reinfection after a primary chlamydial genital infection. *Infect Immun* 56, 2243-2249
- Raulston J.E. (1997) Response of *Chlamydia trachomatis* serovar E to iron restriction in vitro and evidence for iron-regulated chlamydial proteins. *Infect Immun* 65, 4539-4547
- Redecke V., Dalhoff K., Bohnet S., Braun J. & Maass M. (1998) Interaction of *Chlamydia pneumoniae* and human alveolar macrophages: infection and inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 721-727
- Ring R.H. & Lyons J.M. (2000) Failure To Detect *Chlamydia pneumoniae* in the Late-Onset Alzheimer's Brain. *J Clin Microbiol* 38, 2591-2594
- Roblin P.M., Dumornay W. & Hammerschlag M.R. (1992) Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 30, 1968-1971
- Rockey DD., Lenart J. & S.R.S. (2000) Genome sequencing and our understanding of chlamydiae. *Infect Immun* 68, 5473-5479
- Rodstrom K., Bengtsson C., Lissner L. & Bjorkelund C. (1999) Pre-existing risk factor profiles in users and non-users of hormone replacement therapy: prospective cohort study in Gothenburg, Sweden. *BMJ* 319, 890-893
- Rogers D.G. & Andersen A.A. (1999) Conjunctivitis caused by a swine *Chlamydia trachomatis*-like organism in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 11, 341-344
- Rota T.R. Trachoma agent under varying cell culture conditions: infection in McCoy and BHK-21 cells. pp. 314-22. In: *Hobson D, Holmes KK, ed. Nongonococcal urethritis and related infections. Washington, American Society for Microbiology, 1977. WJ 600 W926p 1976.*
- Rota T.R. (1977) *Chlamydia trachomatis* in cell culture. II. Susceptibility of seven established mammalian cell types in vitro. Adaptation of trachoma organisms to McCoy and BHK-21 cells. *In Vitro* 13, 280-292
- Rothermel C.D., Schachter J., Lavrich P., Lipsitz E.C. & Francus T. (1989) *Chlamydia trachomatis*-induced production of interleukin-1 by human monocytes. *Infect Immun* 57, 2705-2711

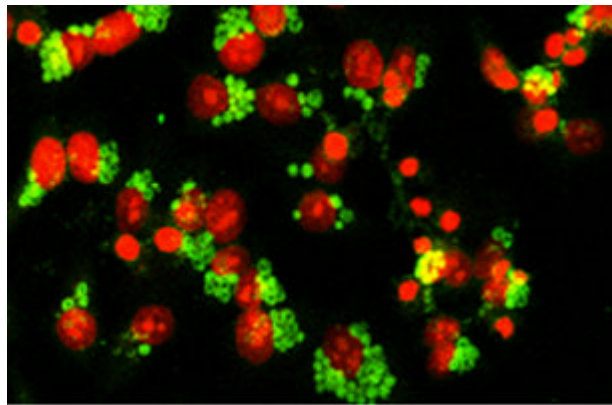
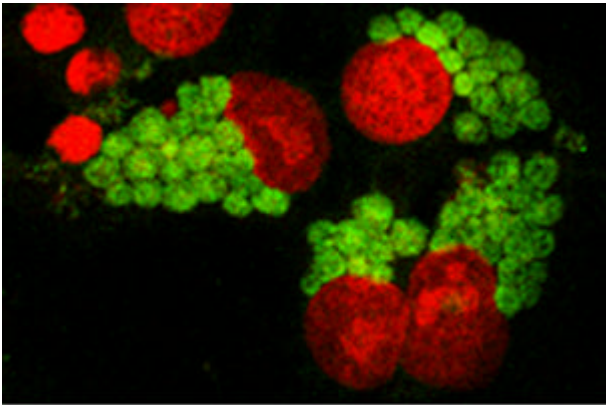
- Sabet S.F., Simmons J. & Caldwell H.D. (1984) Enhancement of Chlamydia trachomatis infectious progeny by cultivation of HeLa 229 cells treated with DEAE-dextran and cycloheximide. *J Clin Microbiol* 20, 217-222
- Saikku P. (1999) Epidemiology of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis. *Am Heart J* 138, S500-S503
- Saikku P., Leinonen M., Mattila K., Ekman M.R., Nieminen M.S., Makela P.H., Huttunen J.K. & Valtonen V. (1988a) Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 2, 983-986
- Saikku P., Ruutu P., Leinonen M., Panelius J., Tupasi T.E. & Grayston J.T. (1988b) Acute lower-respiratory-tract infection associated with chlamydial TWAR antibody in Filipino children. *J Infect Dis* 158, 1095-1097
- Schiff D.E., Kline L., Soldau K., Lee J.D., Pugin J., Tobias P.S. & Ulevitch R.J. (1997) Phagocytosis of gram-negative bacteria by a unique CD14-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 62, 786-794
- Schiller I., Koesters R., Weilenmann R., Kaltenboeck B. & Pospischil A. (1997) Polymerase chain reaction (PCR) detection of porcine Chlamydia trachomatis and ruminant Chlamydia psittaci serovar 1 DNA in formalin-fixed intestinal specimens from swine. *Zentralbl Veterinarmed [B]* 44, 185-191
- Slavik J.M., Hutchcroft J.E. & Bierer B.E. (1999) CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res* 19, 1-24
- Stagg A.J., Tuffrey M., Woods C., Wunderink E. & Knight S.C. (1998) Protection against ascending infection of the genital tract by Chlamydia trachomatis is associated with recruitment of major histocompatibility complex class II antigen-presenting cells into uterine tissue. *Infect Immun* 66, 3535-3544
- Starnbach M.N., Bevan M.J. & Lampe M.F. (1994) Protective cytotoxic T lymphocytes are induced during murine infection with Chlamydia trachomatis. *J Immunol* 153, 5183-5189
- Stephens R.S., Fawaz F.S., Kennedy K.A., Koshiyama K., Nichols B., van Ooij C. & Engel J.N. (2000a) Eukaryotic cell uptake of heparin-coated microspheres: a model of host cell invasion by Chlamydia trachomatis. *Infect Immun* 68, 1080-1085
- Stephens R.S., Fawaz F.S., Kennedy K.A., Koshiyama K., Nichols B., van Ooij C. & Engel J.N. (2000b) Eukaryotic cell uptake of heparin-coated microspheres: a model of host cell invasion by Chlamydia trachomatis. *Infect Immun* 68, 1080-1085
- Storz J B.A.K.K. Advances in detection and differentiation of chlamydia from animals. Orfilia J, Byrne GI Grayston JT eds. 56-73. 1994. Bologna, Societa Editrice Escapulo 1994. Chlamydial infections. Proc 8th Internat Symp on Human Chlamydial infections.
- Ref Type: Conference Proceeding
- Sullivan J.L. & Weinberg E.D. (1999) Iron and the role of Chlamydia pneumoniae in heart disease [letter]. *Emerg Infect Dis* 5, 724-726



- Summersgill J.T., Molestina R.E., Miller R.D. & Ramirez J.A. (2000) Interactions of Chlamydia pneumoniae with human endothelial cells. *J Infect Dis* 181 Suppl 3, S479-S482
- Svanholm C., Bandholtz L., Castanos-Velez E., Wigzell H. & Rottenberg M.E. (2000) Protective DNA immunization against Chlamydia pneumoniae. *Scand J Immunol* 51, 345-353
- Theunissen J.J., van Heijst B.Y., Wagenvoort J.H., Stolz E. & Michel M.F. (1992) Factors influencing the infectivity of Chlamydia pneumoniae elementary bodies on HL cells. *J Clin Microbiol* 30, 1388-1391
- Thomas S.M., Garrity L.F., Brandt C.R., Schobert C.S., Feng G.S., Taylor M.W., Carlin J.M. & Byrne G.I. (1993) IFN-gamma-mediated antimicrobial response. Indoleamine 2,3-dioxygenase-deficient mutant host cells no longer inhibit intracellular Chlamydia spp. or Toxoplasma growth. *J Immunol* 150, 5529-5534
- Tjhie J.H., Roosendaal R., MacLaren D.M. & Vandenbroucke-Grauls C.M. (1997) Improvement of growth of Chlamydia pneumoniae on HEp-2 cells by pretreatment with polyethylene glycol in combination with additional centrifugation and extension of culture time. *J Clin Microbiol* 35, 1883-1884
- Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T. & Tada K. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26, 171-176
- Uphoff C.C. & Drexler H.G. (1999) Detection of mycoplasma contaminations in cell cultures by PCR analysis. *Hum Cell* 12, 229-236
- van Kuppeveld F.J., Johansson K.E., Galama J.M., Kissing J., Bolske G., Hjelm E., van der Logt J.T. & Melchers W.J. (1994a) 16S rRNA based polymerase chain reaction compared with culture and serological methods for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13, 401-405
- van Kuppeveld F.J., Johansson K.E., Galama J.M., Kissing J., Bolske G., van der Logt J.T. & Melchers W.J. (1994b) Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. *Appl Environ Microbiol* 60, 149-152
- von Hertzen L., Isoaho R., Leinonen M., Koskinen R., Laippala P., Toyryla M., Kivela S.L. & Saikku P. (1996) Chlamydia pneumoniae antibodies in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Epidemiol* 25, 658-664
- von Hertzen L., Surcel H.M., Kaprio J., Koskenvuo M., Bloigu A., Leinonen M. & Saikku P. (1998) Immune responses to Chlamydia pneumoniae in twins in relation to gender and smoking. *J Med Microbiol* 47, 441-446
- Walsh K. & Isner J.M. (2000) Apoptosis in inflammatory-fibroproliferative disorders of the vessel wall. *Cardiovasc Res* 45, 756-765
- Williams D.M., Grubbs B.G., Darville T., Kelly K. & Rank R.G. (1998) A role for interleukin-6 in host defense against murine Chlamydia trachomatis infection. *Infect Immun* 66, 4564-4567

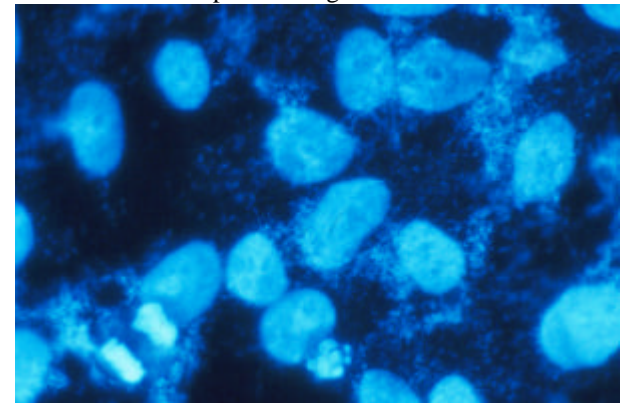
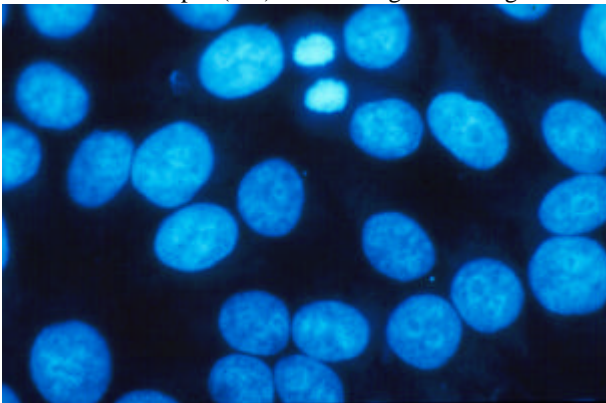
- Williams D.M., Grubbs B.G., Pack E., Kelly K. & Rank R.G. (1997) Humoral and cellular immunity in secondary infection due to murine *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 65, 2876-2882
- Wolf K., Fischer E. & Hackstadt T. (2000) Ultrastructural analysis of developmental events in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. *Infect Immun* 68, 2379-2385
- Wong K.H., Skelton S.K. & Chan Y.K. (1992) Efficient culture of *Chlamydia pneumoniae* with cell lines derived from the human respiratory tract [see comments]. *J Clin Microbiol* 30, 1625-1630
- Wright S.D., Burton C., Hernandez M., Hassing H., Montenegro J., Mundt S., Patel S., Card D.J., Hermanowski-Vosatka A., Bergstrom J.D., Sparrow C.P., Detmers P.A. & Chao Y.S. (2000) Infectious agents are not necessary for murine atherogenesis. *J Exp Med* 191, 1437-1442
- Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J. & Mathison J.C. (1990b) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein [see comments]. *Science* 249, 1431-1433
- Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J. & Mathison J.C. (1990a) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein [see comments]. *Science* 249, 1431-1433
- Wyllie S., Longbottom D., Herring A.J. & Ashley R.H. (1999) Single channel analysis of recombinant major outer membrane protein porins from *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae*. *FEBS Lett* 445, 192-196
- Yang Z.P., Kuo C.C. & Grayston J.T. (1995) Systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* following intranasal inoculation in mice. *J Infect Dis* 171, 736-738
- Zhong G. & Brunham R.C. (1992) Antibody responses to the chlamydial heat shock proteins hsp60 and hsp70 are H-2 linked. *Infect Immun* 60, 3143-3149
- Zhong G., Fan T. & Liu L. (1999) *Chlamydia* inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *J Exp Med* 189, 1931-1938
- Zhong G., Liu L., Fan T., Fan P. & Ji H. (2000) Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I expression in *chlamydia*-infected cells. *J Exp Med* 191, 1525-1534
- Ziegler-Heitbrock H.W. & Burger R. (1987) Rapid removal of mycoplasma from cell lines mediated by a direct effect of complement. *Exp Cell Res* 173, 388-394
- Ziegler-Heitbrock H.W., Thiel E., Futterer A., Herzog V., Wirtz A. & Riethmuller G. (1988) Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer* 41, 456-461

## X Bildteil



*Bild 1 und 2 Hep-Zellen 72h nach Infektion mit C. pneumoniae; Kern und Chlamydienfärbung*

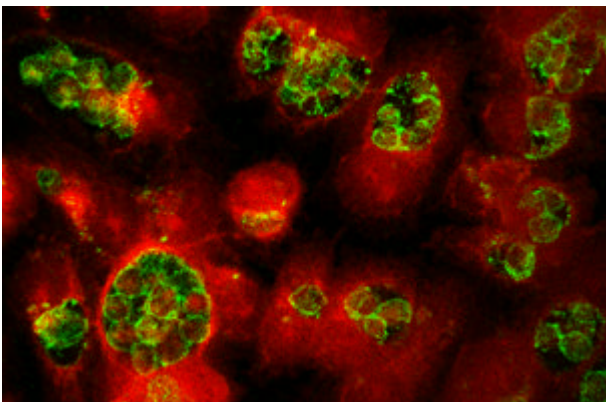
Hep-Zellen wurden nach dem Standardverfahren mit *C. pneumoniae* infiziert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen fixiert, nach Protokoll mit Propidiumjodid und FITC-markiertem Chlamydien-Antikörper gefärbt und im Konfokalmikroskop betrachtet. Die Zellkerne erscheinen rot, die Chlamydien grün. In einer Zelle können sich bis zu 50 Einschlusskörper (EK) bilden die gleichmäßig mit sich teilenden Retikularkörperchen angefüllt sind.



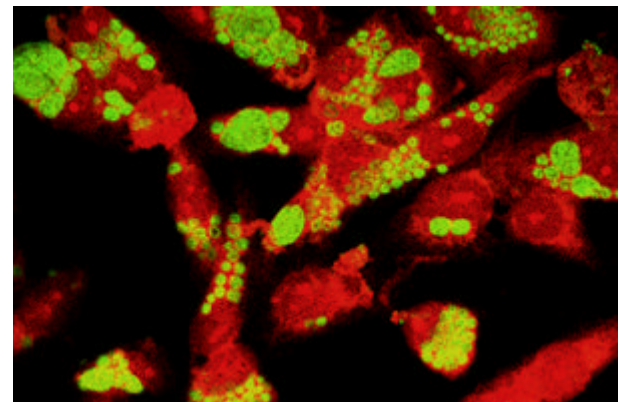
*Bild 3 und 4 DNA-Färbungen „sauberer“ und Mykoplasmen-kontaminierter Hep-Zellen*

Hep Zellen wurden nach Protokoll mit einem DNA Farbstoff gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

Auf dem linken Bild sind klar abgrenzbare Zellkerne und eine Mitose zu sehen. Bei den Schatten auf dem rechten Bild handelt es sich um DNA von Mykoplasmen, die auf den Zellen haften. Eine schwache Kontamination stellt sich im Gegensatz zu dieser massiven Kontamination nur als leichter Schleier dar, der mit dem Zellkörper verwechselt werden kann.



*Bild 5 C. trachomatis in Hep-Zellen 48 Stunden p.i. im Konfokalmikroskop nach Färbung mit FITC-markiertem LPS-Antikörper (Chlamydien, grün) und Evansblau (Zellen; rot). Die Chlamydien liegen im Vergleich zu C. pneumoniae eher an den Wänden der traubenartig zusammengelagerten EK.*



*Bild 6 C. pneumoniae in NCI-Zelle 48 h p.i. nach Standardfärbung wie bei Bild 5.*

Einzelne Zellen enthalten mehrere EK unterschiedlicher Größe, die im Laufe des Entwicklungszyklus zunehmend verschmelzen.

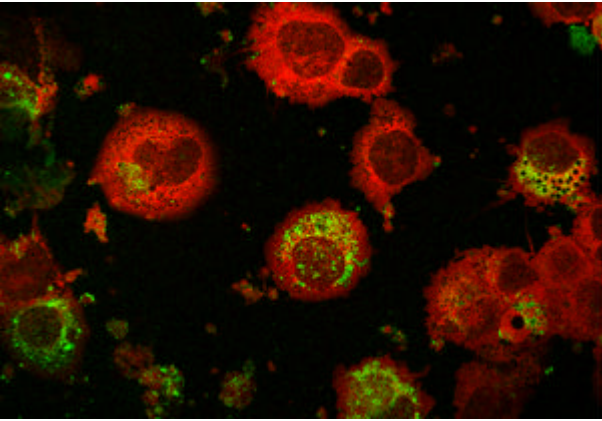


Bild 7 MM6 48 h nach Infektion mit *C. pneumoniae*

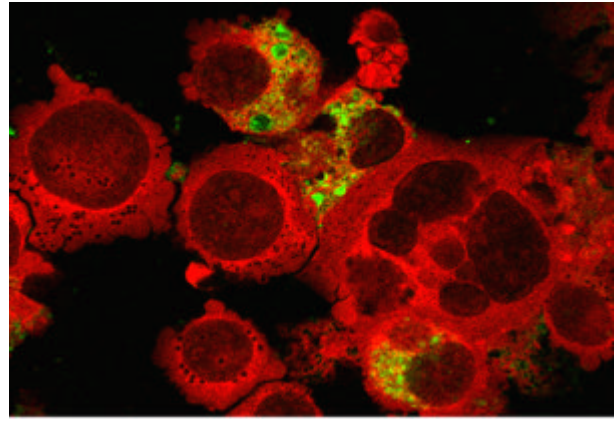


Bild 8 MM6 72 h nach Infektion mit *C. pneumoniae*

MM6 wurden nach Protokoll infiziert und mittels Zytospin nach 48 und 72 Stunden auf Objektträger gebracht. Anschließend wurden sie fixiert, gefärbt und anschließend im Konfokalmikroskop aufgenommen. Die grün gefärbten Einschlusskörperchen lagern sich um die dunkelrot erscheinenden Zellkerne. Einige Monozyten sind massiv andere gar nicht infiziert sind. Mit zunehmender Infektionsdauer wachsen einzelne EK, erreichen aber nie die Größe wie in Kulturzellen. Der Anteil der infizierten Zellen nimmt im Laufe der Zeit ab.

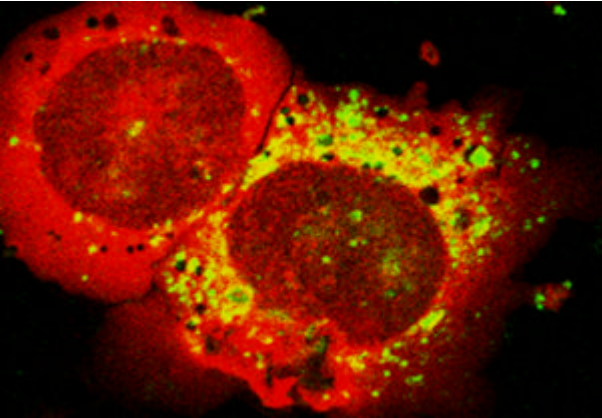


Bild 9 THP1 72 h nach Infektion mit *C. pneumoniae*

THP1 wurden nach dem Protokoll für Monozyten infiziert, nach 72 Stunden gefärbt und im Konfokalmikroskop aufgenommen.

Es zeigten sich sehr ähnliche Bilder wie bei MM6 (Bild 7 und 8). Die Infektionen waren aber etwas stärker und hielten länger an.

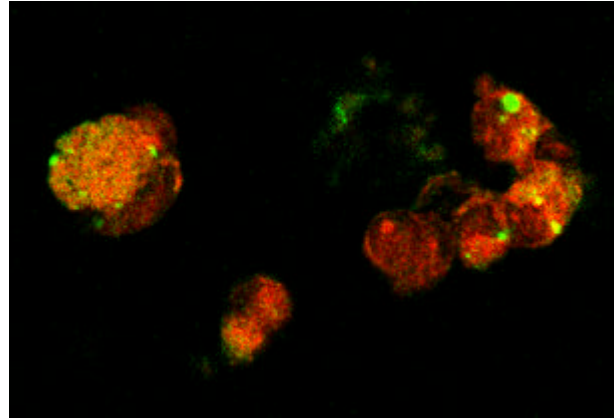


Bild10 Monozyten aus peripherem Blut 72 h p.i. mit *C.pn*

Monozyten wurden nach Protokoll mittels Ficoll aus peripherem Blut gewonnen und nach einem Tag wie die Zelllinien infiziert und gefärbt.

Die Infektionsraten lagen in einem ähnlichen Bereich wie bei der MM6, es gab allerdings weniger massiv infizierte Zellen.

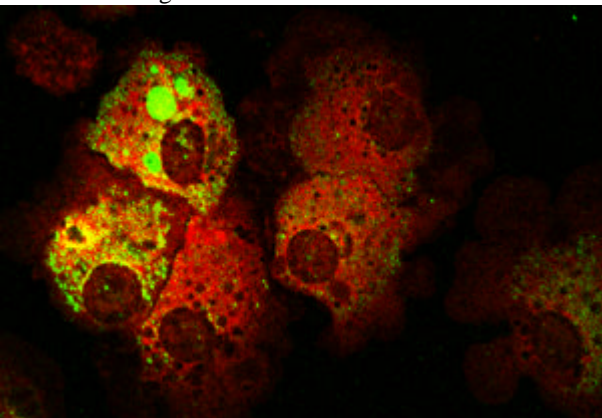


Bild 11 dendritische Zellen der Maus 14 Tage p.i.

Dendritische Zellen der Maus wurden einen Tag nach ihrer Isolierung nach dem Monozyten-Protokoll infiziert. Es zeigte sich eine vergleichsweise sehr starke Infektion, die wesentlich länger anhielt und zu größeren EK führte als bei den übrigen getesteten monozytären Zellen.

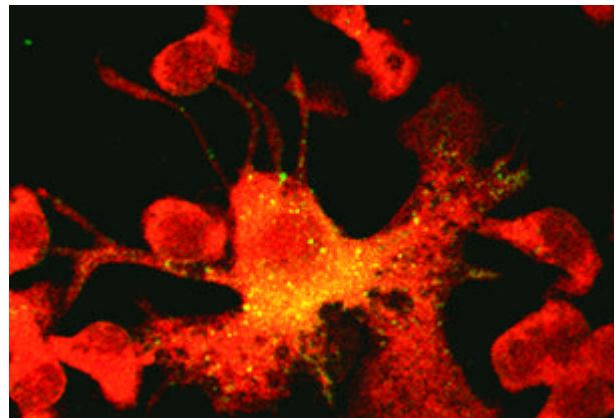


Bild 12 adhärenente MM6 72h p.i. mit *C. pneumoniae*

Bei der Infektion von nach Dauerkultur adhärenenten MM6 mit *C. pneumoniae* zeigte sich allgemein eine höhere Infektionsrate als auf frischen MM6. Die Zellen mit dendritischen Ausläufern waren besonders stark infiziert

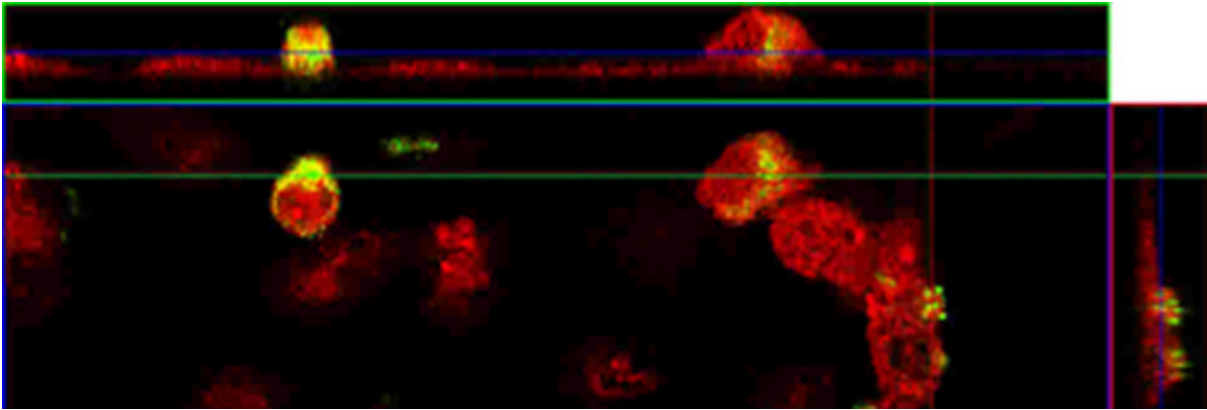


Bild 13 mit *C. pneumoniae* infizierte MM6 adhäreren auf einem HUVEC-Zellrasen

Auf dieser konfokalmikroskopischen Aufnahme sieht man MM6 (48 Stunden nach Infektion mit *C. pneumoniae*) von oben (großer Ausschnitt, links unten) bzw. in den markierten Schnittebenen (oben und rechts) auf HUVEC-Zellen liegen. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Teil der adhärierenden Zellen grün gefärbte Chlamydien enthält.

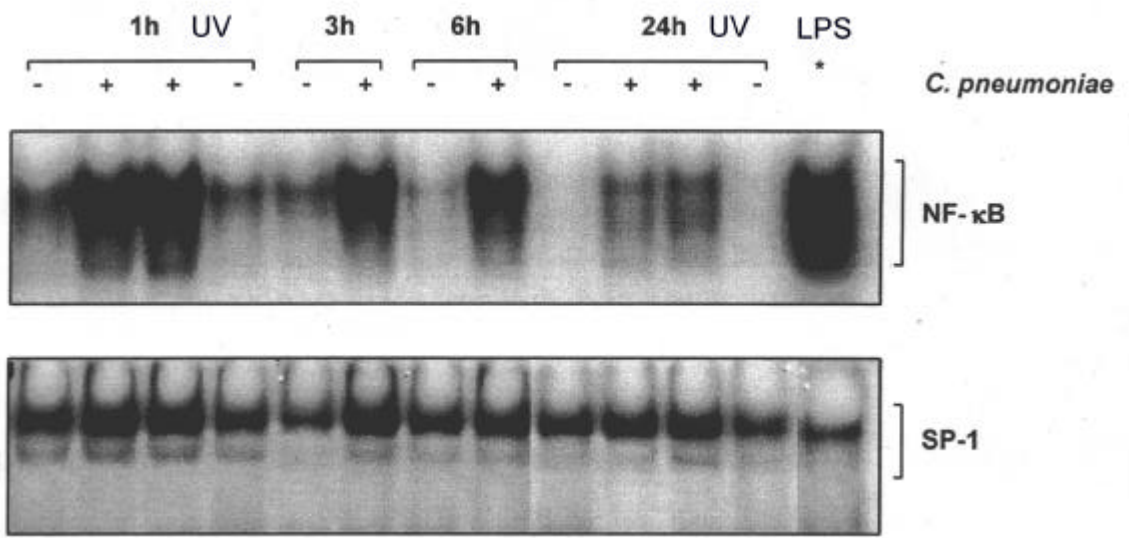


Abb. 14 Gelatardierungsassay zur Darstellung von NF-κB

THP-1 Zellen wurden wie in Methoden beschrieben infiziert. Nach 1, 3, 6 und 24 Stunden wurde NF-κB wie unter Methoden beschrieben in infizierten Zellen (+) und nicht infizierten Zellen (-) dargestellt. 1 Stunde und 24 Stunden nach Infektion wurden auch mit UV inaktivierten Chlamydien behandelte Zellen untersucht (UV). Als Kontrolle wurde NF-κB in LPS aktivierten Zellen sowie der konstitutiv aktivierte Transkriptionsfaktor Sp-1 dargestellt (SP-1).

NF-κB ist bereits eine Stunde nach Infektion stark aktiviert. Diese Aktivierung hat nach 6 Stunden kaum an Stärke eingebüßt. Nach 24 Stunden hat die Aktivierung nachgelassen, ist aber immer noch deutlich stärker als in den Kontrollen. Auch UV inaktivierte Chlamydien führen zu einer NF-κB Aktivierung.

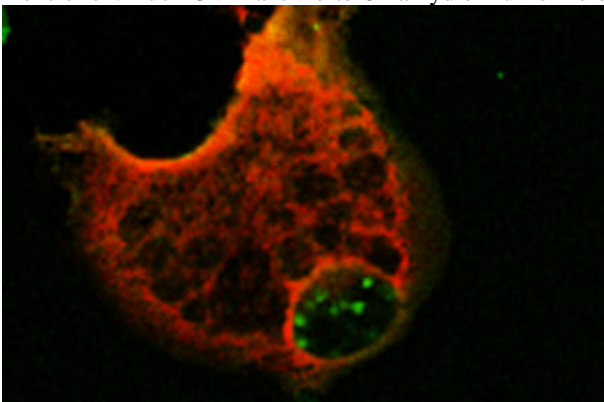


Bild 15 *Acanthamoeba castellanii* 6 Tage p.i.

Amöben wurden wie in Methoden beschrieben mit *C. pneumoniae* infiziert und gefärbt. Die grün gefärbten Chlamydien sind deutlich zu erkennen.

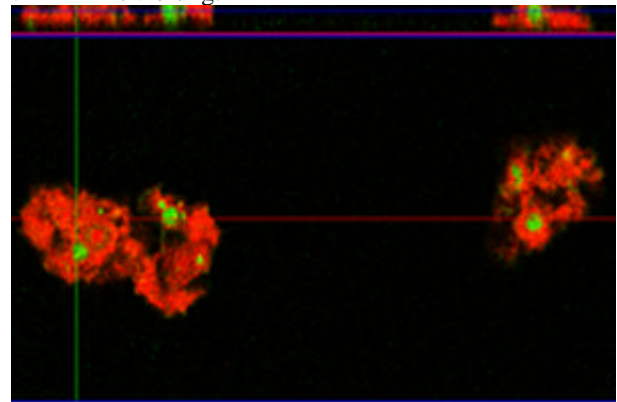


Bild 16 *Acanthamoeba* 9 Tage p.i. mit MUL-Chlamydien

Auch der massiv mykoplasmenkontaminierte MUL-Chlamydienstamm führte zu einer deutlichen Infektion der Amöben.

## **XI. Danksagung**

Mein besonderer Dank gebührt meiner Familie, insbesondere meiner Mutter Birgit, meiner Frau Yen und meiner Stieftochter Anh, ohne deren praktische Unterstützung diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre. Dankbar bin ich auch für ihre Aufmunterungen und Ermutigungen, besonders aber dafür, dass sie mich bei aller Geduld und allem Verständnis für die Forschung, regelmäßig daran erinnern haben, dass es neben Chlamydien auch noch andere Dinge wie Freunde, Kunstausstellungen, Konzerte und Berge gibt.

Mein Dank gilt des weiteren meinen Freunden, die mir trotz Vernachlässigung wegen meines Forschungseifers, die Treue gehalten haben, mich weiter auf Parties eingeladen haben und mir nun nach Abschluss dieser Arbeit die Fortsetzung eines sozial erfüllten Lebens ermöglichen.

Dem ganzen Team der Trogerstr. 9 danke ich für die Einführung in das FACS-Gerät und für die geduldige Beantwortung meiner anfangs häufig naiven Fragen zu unterschiedlichsten Methoden. Insbesondere Roland Lang möchte ich für seine schon fast freundschaftliche Beratung danken.

Mein Dank gilt des weiteren der gesamten MTA-Mannschaft der Trogerstr. 4, insbesondere dem Team des 4-er Zimmers Christian, Manuela und Jila für die kollegiale Aufnahme, die Unterstützung und die Verbreitung positiver Arbeitsatmosphäre.

Meinem jetzigen Oberarzt Andreas Essig (Universität Ulm) danke ich für seine sehr hilfreiche und fachkundige Beratung bezüglich Darstellung und Diskussion der Ergebnisse in dieser Doktorarbeit.

Matthias Maas (Universität Lübeck) und Ute Harig (Universität Lübeck) möchte ich ganz herzlich für ihre freundliche und selbstlose Einführung in die Geheimnisse der Chlamydienanzucht danken.

Herrmann Wagner danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Georg Häcker sei gedankt für seine Beratung zu den Apoptose-Experimenten.

Schließlich möchte ich auch meinem damaligen Oberarzt und Betreuer Thomas Miethke danken, für seine Bemühungen mich bei der Planung der Experimente zu unterstützen, sowie für die, trotz hoher Arbeitsbelastung, durchgeführte Korrektur der vorliegenden Arbeit.