

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Werner Solbach

**Etablierung neuer Infektionsmodelle  
der genitalen *Chlamydia trachomatis* Infektion  
unter Berücksichtigung der physiologischen Gegebenheiten *in vivo***

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Stefan Jerchel**

aus Bergen auf Rügen

Lübeck 2013

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. J. Rupp
2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. S. Anemüller

Tag der mündlichen Prüfung: 11.09.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.09.2013

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Zusammenfassung .....	9
2. Einleitung .....	11
2.1 Grundlagen der Chlamydiaceae.....	11
2.1.1 Allgemeines zur Familie der Chlamydiaceae .....	11
2.1.2 <i>C. trachomatis</i> Serovar D-K assoziierte Krankheitsbilder .....	12
2.1.3 Der Lebenszyklus humanpathogener <i>Chlamydia sp.</i> .....	13
2.1.4 Persistenz von Chlamydien.....	16
2.1.5 <i>C. trachomatis</i> assoziierte Immunreaktion .....	17
2.2 Der IFN- $\gamma$ induzierte Jak/ Stat Signalweg .....	19
2.3 Infektionsmodelle für <i>C. trachomatis</i> .....	21
2.4 Hypoxie und der Hypoxie induzierbare Faktor-1 (HIF-1) .....	22
2.5 Regulation der zellulären Apoptose bei Chlamdieninfektionen.....	24
2.6 Fragestellung .....	26
3. Material.....	27
3.1 Geräte.....	27
3.2 Verbrauchsmaterialien.....	29
3.3 Chemikalien und Reagenzien .....	30
3.4 Puffer und Lösungen .....	32
3.5 Zelllinien.....	34
3.6 Medien und Medienzusätze .....	35
3.7 Enzyme und Kits .....	36
3.8 Oligonukleotide .....	36
3.8.1 Primer für die cDNA Synthese .....	36
3.8.2 Primer für die quantitative RT-PCR.....	37
3.9 Antikörper.....	38
3.9.1 Antikörper für Western Blot Analysen.....	38
3.9.2 Antikörper für Immunfluoreszenz .....	39
3.9.3 Antikörper für die FACS-Analyse.....	40
3.10 Software.....	40
4. Methoden.....	41
4.1 Zellkultur .....	41
4.1.1 Zellkultur von Dauerkulturzellen.....	41

4.1.2	Bestimmung der Zellzahl.....	41
4.1.3	Konservierung von Zelllinien .....	42
4.1.4	Auftauen von Zelllinien .....	42
4.2	Tubenpräparation.....	42
4.3	Isolation primärer epithelialer Eileiterzellen .....	43
4.3.1	Isolation primärer epithelialer Eileiterzellen mit Collagenase .....	43
4.3.2	Isolation primärer epithelialer Eileiterzellen mit Pronase/ DNase .....	43
4.4	Zellkultur primärer epithelialer Eileiterzellen .....	44
4.5	Beschichtung von Zellkulturflaschen mit Collagen .....	44
4.6	Apoptoseinduktion mit Staurosporin.....	44
4.7	FACS-Analyse primärer epithelialer Eileiterzellen.....	45
4.7.1	Extrazelluläre FACS-Färbung von Oberflächenmarkern .....	45
4.7.2	Intrazelluläre FACS-Färbung .....	45
4.8	Infektionsbiologische Methoden .....	46
4.8.1	Herstellung eines <i>C. trachomatis</i> Serovar D Infektionsstocks .....	46
4.8.2	Infektion von Karzinomzelllinien.....	46
4.8.3	Infektion von humanem Eileitergewebe .....	47
4.8.4	Infektion von humanen primären epithelialen Eileiterzellen.....	47
4.8.5	Verlauf der <i>C. trachomatis</i> Infektion in HeLa-229 Zellen nach..... Stimulation mit IFN- $\gamma$ unter Normoxie und Hypoxie.....	48
4.8.6	Bestimmung infektiöser <i>C. trachomatis</i> .....	49
4.9	Mikroskopie.....	50
4.9.1	Direkter Immunfluoreszenztest von Chlamydien .....	50
4.9.2	Indirekter Immunfluoreszenztest von <i>C. trachomatis</i> .....	50
4.9.3	Quantifizierung infektiöser Chlamydien mittels..... Immunfluoreszenztests .....	51
4.9.4	Rasterelektronenmikroskopie .....	51
4.9.5	Transmissionselektronenmikroskopie .....	51
4.9.6	Lichtmikroskopie von Semi-Dünnschnitten .....	52
4.9.7	DNA Färbung mit Hoechst Lösung .....	52
4.10	Proteinbiochemische Methoden .....	53
4.10.1	Probengewinnung für Western Blot .....	53
4.10.2	SDS-Gelelektrophorese .....	53
4.10.3	Western Blot Analyse .....	54
4.10.4	Strippen von Western Blot Membranen .....	54

4.11	Molekularbiologische Methoden.....	55
4.11.1	RNA-Isolation.....	55
4.11.2	Reverse Transkription.....	55
4.11.3	Quantitative RT-PCR.....	56
4.12	Statistik.....	57
5.	Ergebnisse.....	58
5.1	Humanes Eileiterepithelmodell.....	58
5.1.1	Detektion von Veränderungen nach einer Chlamydieninfektion.....	58
5.1.2	Detektion von Chlamydieneinschlüssen mit Hilfe von..... Semi-Dünnschnitten.....	59
5.1.3	Detektion von Chlamydieneinschlüssen mit Hilfe der..... Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	60
5.1.4	Analyse von pro-inflammatorischen Zytokinen nach einer..... <i>C. trachomatis</i> Infektion.....	61
5.2	Humanes epitheliales Eileiterzellmodell.....	63
5.2.1	Isolation primärer epithelialer Zellen aus humanen Eileitern.....	63
5.2.1.1	Isolation von primären epithelialen Eileiterzellen mit Collagenase....	63
5.2.1.2	Isolation von primären epithelialen Eileiterzellen mit..... Pronase/ DNase.....	64
5.2.1.3	FACS-Analyse der Zell-Differenzierung im zeitlichen Verlauf.....	64
5.2.2	Charakterisierung der primären epithelialen Eileiterzellen.....	65
5.2.2.1	Infektion mit <i>C. trachomatis</i> .....	66
5.2.2.2	Induktion der Stat-1 Signalkaskade nach Zugabe von IFN- $\gamma$ .....	67
5.2.2.3	Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ .....	69
5.2.2.4	Induktion der zellulären Apoptose.....	70
5.3	HeLa-229 Zellmodell.....	72
5.3.1	Charakterisierung des HeLa-229 Infektionsmodelles.....	72
5.3.1.1	Infektion mit <i>C. trachomatis</i> .....	72
5.3.1.2	Phosphorylierung der ERK1/2 und p38 MAP-Kinasen nach Infektion .. mit <i>C. trachomatis</i> .....	73
5.3.1.3	Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen nach Infektion mit..... <i>C. trachomatis</i> .....	74
5.3.1.4	Induktion der Stat-1 Signalkaskade nach Zugabe von IFN- $\gamma$ .....	76
5.3.1.5	Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ .....	78
5.3.1.6	Apoptoseinduktion durch Staurosporin.....	79

5.4	Verlauf einer <i>C. trachomatis</i> Infektion in HeLa-229 Zellen nach..... Stimulation mit IFN- $\gamma$ in Normoxie und Hypoxie.....	80
5.4.1	Vergleich der <i>C. trachomatis</i> Infektion in HeLa-229 Zellen nach..... Stimulation mit IFN- $\gamma$ in Normoxie und Hypoxie.....	80
5.4.2	Vergleich der ERK1/2 und p38 MAP-Kinasen Phosphorylierung..... während einer <i>C. trachomatis</i> Infektion in HeLa-229 Zellen nach..... Stimulation mit IFN- $\gamma$ in Normoxie und Hypoxie.....	82
5.4.3	Vergleich der Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen..... während einer <i>C. trachomatis</i> Infektion in HeLa-229 Zellen nach..... IFN- $\gamma$ Stimulation in Normoxie und Hypoxie.....	84
5.4.4	Vergleich der Induktion und Phosphorylierung des Stat-1 Proteins..... während einer <i>C. trachomatis</i> Infektion in HeLa-229 Zellen nach..... IFN- $\gamma$ Stimulation in Normoxie und Hypoxie.....	86
5.4.5	Vergleich der Apoptoseinduktion durch Staurosporin während einer..... <i>C. trachomatis</i> Infektion in HeLa-229 Zellen nach IFN- $\gamma$ Stimulation... in Normoxie und Hypoxie.....	88
6.	Diskussion.....	89
6.1	Vergleich der <i>C. trachomatis</i> Infektion in primären epithelialen..... Eileiterzellen, HeLa-229 Zellen und Eileitergewebe.....	90
6.2	Verlauf einer <i>C. trachomatis</i> Infektion in Anwesenheit von IFN- $\gamma$ unter..... Hypoxie.....	94
6.3	Vergleich der zellulären Eigenschaften von Primärzellen und HeLa-229..... Zellen.....	97
6.4	Ausblick.....	98
6.5	Schlussbetrachtung.....	101
	Literaturverzeichnis.....	103
	Abbildungsverzeichnis.....	118
	Tabellenverzeichnis.....	120
A.	Anhang.....	121
A.1	Publikationen.....	121
A.2	Kongressbeiträge.....	122
A.3	Danksagung.....	123

## Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgelistet.

Abb.	Abbildung
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
aRK	aberranter Retikularkörper
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-Cell Lymphoma-2
BH3	Bcl-2 Homology Domain
BSA	Bovines Serum-Albumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DIABLO	Direct Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-Binding Protein with low PI
DISC	CD95 Death Inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EK	Elementarkörper
EpCam	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ERK	Extracellular Signal-Regulated-Kinases
<i>et al.</i>	und andere
etc.	<i>et cetera</i>
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter

FADD	Fas-Associated Death Domain
Fas	TNF Receptor Superfamily Member 6
FKS	Fötales Kälberserum
GAS	Gamma-Activated Sequences
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
h	Stunde
HeLa	Henrietta Lacks
HEp	Human Epidermoid Cancer Cell
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid
HIF	Hypoxie Induzierbarer Faktor
Hox	Hypoxie
HPH	HIF-Prolyl-Hydroxylasen
HRE	HIF Response Element
HRP	Horse Radish Peroxidase
Hsp	Heat Shock Protein
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IDO	Indolamin-2-3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IFNGR	Interferon gamma Receptor
Ifu	Infectious Units
IL	Interleukin
Jak	Janus-Kinases
JNK	c-Jun Amino-Terminal Kinases
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MAP-Kinasen	Mitogen-Activated-Protein-Kinases
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MEM	Minimal Essential Medium
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOMP	Major Outer Membrane Protein
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NEAA	Not Essential Amino Acids

---

NFκB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nucleotide-Binding-Oligomerization Containing Protein
Nox	Normoxie
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OmP	Outer Membran Protein
p.I.	post Infection
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHD	Prolyl-Hydroxylasen
PIAS	Protein Inhibitors of Activated Stat
PID	Pelvic Inflammatory Disease
PRR	Pattern Recognition Receptor
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Ras	Rat Sarcoma
REM	Raster-Elektronen Mikroskopie
Rho	Ras Homologue
RK	Retikularkörper
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
rRNA	ribosomal Ribonucleic Acid
RT	Raum-Temperatur
SAP	Saponin
Scr	Sarcoma
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
SH2	Scr-Homology-2
SHP	SH2-Containing Phosphatases
Smac	Second Mitochondria Derived Activator of Caspase
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling

---

SPG	Sodium-Phosphate-Glutamic Acid
Stat	Signal Transducers and Activators of Transcription
TARP	Translocation Actin-Recruiting Phosphoprotein
TBS	Tris Buffered Saline
TEM	Transmissions-Elektronen Mikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFI	Tubal Factor Infertility
TGF	Tissue Growth Factor
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
Trail	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
T-TBS	Tween-TBS
Tyr	Tyrosin
U	Units
USG	Ultroser-G (Mediumzusatz)
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein -1
vHL	von Hippel-Lindau Suppressor Protein
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel

## 1. Zusammenfassung

*Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) ist ein Gram-negatives obligat intrazelluläres Bakterium und der häufigste sexuell übertragene Infektionserreger weltweit. Der Krankheitsverlauf im weiblichen Genitaltrakt ist gekennzeichnet durch eine aufsteigende Infektion vom Uterus zum Ovar. Eine langjährige unbehandelte Infektion kann in einem Eileiterverschluss resultieren, wodurch der Transport der Eizelle innerhalb des Eileiters nicht mehr gewährleistet werden kann und die Patientinnen infertil werden. Die meisten Infektionsmodelle für *C. trachomatis* basieren auf Zellkultur- oder Mausmodellen. Diese Modelle spiegeln nur unzureichend die natürliche *in vivo* Infektion im Eileiter wieder. Aus diesem Grund war eine Zielsetzung der Arbeit, möglichst lebensnahe Infektionsmodelle auf der Basis von humanen Eileitern zu entwickeln. Zum besseren Verständnis der *C. trachomatis* Pathogenese sollte die Infektion in den neu etablierten Modellen charakterisiert und mit dem seit vielen Jahren etablierten HeLa-229 Modell verglichen werden.

Es ist im Rahmen dieser Arbeit gelungen, humane Eileiter *ex vivo* zu infizieren und infektionsbedingte Veränderung am Eileiterepithel als auch intrazelluläre Chlamydieneinschlüsse sowie die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine zu detektieren. Weiterhin konnte ein primäres epitheliales Eileiterzell-Modell etabliert und erste Vergleiche mit HeLa-229 Zellen durchgeführt werden. So konnte erstmalig in den Primärzellen ein „Persistenz-ähnlicher“ Infektionsverlauf beschrieben werden. Außerdem fanden sich Unterschiede in der Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  und der Apoptose Induktion durch Staurosporin zwischen Primär- und HeLa-229 Zellen. Diese Daten implizieren, dass es Unterschiede in den zellulären Reaktionen zwischen Primärzellen und HeLa-229 Zellen gibt, die in noch unbekanntem Maß Einfluss auf die Infektion nehmen können.

Sowohl das Eileiterzell- als auch das Gewebemodell erlauben in der Zukunft Untersuchungen zur Pathogenese und den assoziierten Signalwegen während einer *C. trachomatis* Infektion in einer komplexen, möglichst lebensnahen Umgebung.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Unterschiede im *C. trachomatis* Infektionsverlauf während einer IFN- $\gamma$  Stimulation zwischen Normoxie und Hypoxie analysiert. Es wurden zum ersten Mal direkte Wirt-Pathogen Interaktionen während der hypoxischen Reaktivierung einer IFN- $\gamma$  induzierten Persistenz untersucht. Im

Gegensatz zur Primärinfektion, konnte keine pro-inflammatorische Reaktion entsprechend einer Aktivierung von MAP-Kinasen oder einer Expression pro-inflammatorischer Zytokine der Wirtszelle beobachtet werden. Aufgrund der erhobenen Befunde ergeben sich Hinweise auf bis jetzt unbekannte Mechanismen, die es den Chlamydien erlauben nach der Reaktivierung die Immunabwehr zu umgehen.

## 2. Einleitung

### 2.1 Grundlagen der Chlamydiaceae

#### 2.1.1 Allgemeines zur Familie der Chlamydiaceae

Chlamydien sind Gram-negative obligat intrazelluläre Bakterien. Sie wurden zuerst 1906 von Ludwig Halberstädter und Stanislaus von Prowazek in Abstrichen von humanen Trachomen beschrieben<sup>1-4</sup>. Heute weiß man, dass *Chlamydiaceae* in einer Vielzahl von Vertebraten gefunden werden können. So werden unter anderem Vögel, Koalas, Schweine, Schafe, Rinder und Menschen infiziert<sup>5-11</sup>. Die einzelnen Stämme haben sich im Laufe der Evolution hervorragend an ihre entsprechenden Wirte angepasst. Darüber hinaus werden auch Übertragungen vom Tier auf den Menschen (Zoonose) durch *Chlamydia psittaci* (Ornithose) und *Chlamydia abortus* (Spontanabort) beobachtet<sup>12, 13</sup>. Sie treten vor allem bei engem Zusammenleben mit den entsprechenden Tieren, wie bei Vogelhaltern oder Landwirten auf<sup>14, 15</sup>.

Die für den Menschen wichtigsten Chlamydienspezies sind *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) und *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*). *C. pneumoniae* infizieren den Menschen über den Bronchialtrakt und rufen schwere Lungenentzündung sowie Erkrankungen der Blutgefäße hervor<sup>16, 17</sup>. Hingegen handelt es sich bei *C. trachomatis* um eine Spezies, die im Menschen drei verschiedene Organsysteme besiedelt und daher in Biovare unterteilt wird. Diese werden wiederum in Serovare unterteilt. Die Serovare A-C führen zu okularen Infektionen und sind weltweit die am häufigsten vorkommenden Infektionserreger, die insbesondere in Ländern der Dritten Welt zu Erblindung führen<sup>18</sup>. Infektionen führen zu den sogenannten Trachomen, die morphologisch durch eine zunehmende Fibrosierung charakterisiert sind und zu einer Vernarbung und somit Eintrübung der Hornhaut führen<sup>19</sup>.

Die Serovare D-K werden sexuell übertragen und infizieren vor allem den Urogenitaltrakt. Sie sind der häufigste sexuell übertragene Infektionserreger und können zu schweren Krankheitsbildern des weiblichen Genitaltraktes bis hin zur Infertilität führen. Dieser Erreger ist Hauptbestandteil dieser Arbeit und wird später genauer erläutert. Die Serovare L1-L3 werden ebenfalls sexuell übertragen und besiedeln die Lymphknoten im Bereich der Leisten und des Genitaltraktes. Sie sind mit dem Lymphogranuloma venereum assoziiert<sup>20</sup>. Nach Infektion verursachen sie

Schwellungen der Lymphknoten sowie zu späteren Zeitpunkten Nekrosen. Die Infektion kann zum Verschluss von Lymphbahnen führen und die sogenannte Elephantiasis auslösen<sup>20,21</sup>. Die Erkrankung ist in Industrienationen selten, wird aber in Teilen Afrikas, Südamerikas und der Karibik häufiger gefunden<sup>20</sup>.

### **2.1.2 *C. trachomatis* Serovar D-K assoziierte Krankheitsbilder**

Die Serovare D-K sind die häufigsten sexuell übertragbaren Infektionserreger und Auslöser für einen Großteil der durch einen Infektionserreger ausgelösten Infertilitäten weltweit. In der Europäischen Union wurden 2009 340.000 Fälle von Chlamydien Infektionen gemeldet<sup>22</sup>. Insgesamt ist das Screening aber nicht in allen Staaten wie z.B. Deutschland, Frankreich und Italien durchgeführt worden, so dass von einer deutlich höheren Dunkelziffer auszugehen ist. Über 75 % der Infektionen wurden in jungen sexuell aktiven Menschen im Alter von 15-24 Jahren diagnostiziert. Die jährliche Infektionsrate für *C. trachomatis* hat sich von 1995 bis 2009 verdreifacht. Allein in diesem Zeitraum gab es in den EU Staaten ca. 3.000.000 Neu-Infizierte<sup>22</sup>. Die überwiegende Zahl der Infektionen (70-80 %) verläuft ohne klinische Symptome. Aufgrund dessen kommt es häufig vor, dass Patientinnen nicht behandelt werden<sup>23,24-26</sup>.

In den restlichen 10-30 % der Fälle kommt es zu einer symptomatischen Manifestation einer urogenitalen Chlamydieninfektion. Diese kann sowohl Männer (Urethritis, Epididymitis, Prostatitis) als auch Frauen (Salpingitis, Eileiterschwangerschaft, partieller oder kompletter Eileiterverschluss (Tubal Factor Infertility (TFI))) betreffen<sup>27</sup>. Die prozentuale Verteilung aller diagnostizierten Infektion variiert zwischen den Geschlechtern. Bei Frauen beträgt sie 60 %, während in Männer 40 % der Infektionen vorliegen<sup>28</sup>. Eine chronische, unbehandelte Chlamydieninfektion kann in beiden Geschlechtern zu Infertilität führen. In Frauen basiert diese auf der krankhaften Veränderung der Eileiter, die mit der Infektion einhergehen<sup>27</sup>. In Männern hingegen sind vor allem eine Reduktion der Spermien-Aktivität beziehungsweise Spermien-Anzahl beschrieben<sup>29,30</sup>. Aufgrund der höheren Fallzahlen stand im Rahmen dieser Arbeit die Pathogenese in Frauen im Vordergrund. Aus diesem Grund werden im Folgenden nur die Manifestationen der Chlamydieninfektion in Frauen näher erläutert.

Bei einer Salpingitis handelt es sich um die Infektion der humanen Eileiter, die

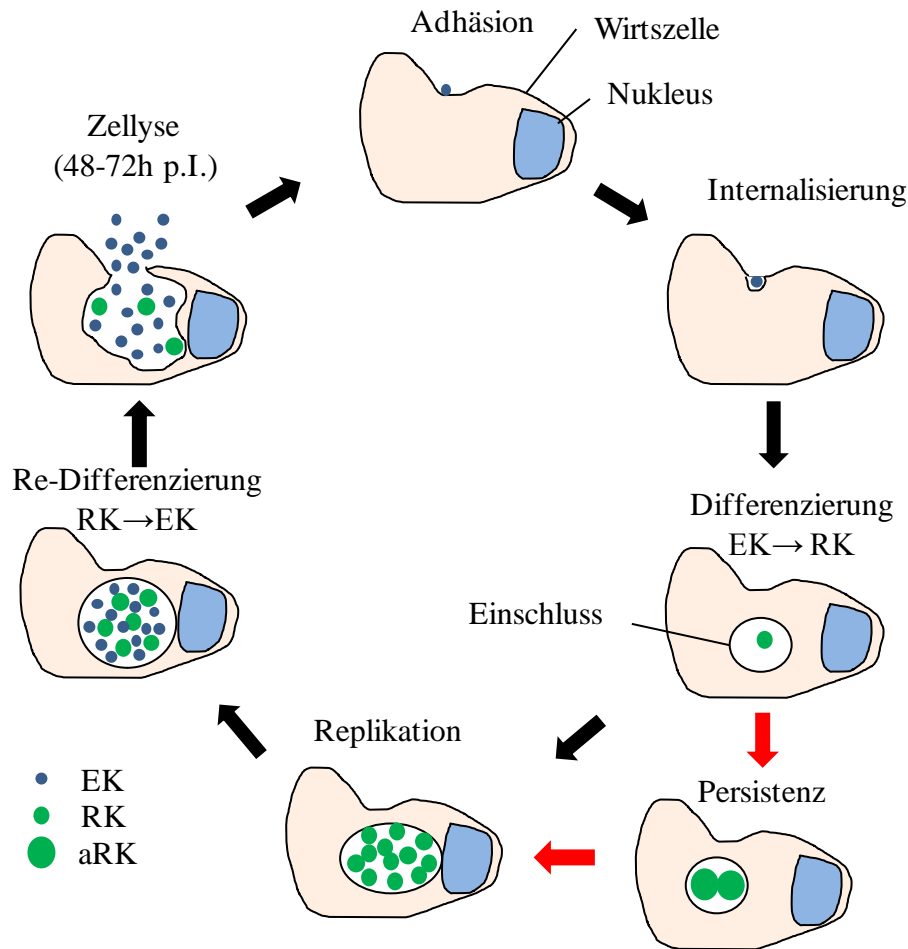
aufsteigend vom Uterus in Richtung des Ovars verläuft. Neben *C. trachomatis* (40-50 %) sind *Neisseria gonorrhoeae* oder *Enterobacteriaceae* für den Großteil der Salpingitiden verantwortlich<sup>31, 32</sup>. Bei einer aufsteigenden Infektion (ca. 40 % aller *C. trachomatis* Infektionen) in das kleine Becken kann sich die Salpingitis zu einer Pelvic Inflammatory Disease (PID) entwickeln. Hierbei handelt es sich um eine starke Entzündung des oberen weiblichen Genitaltraktes mit verschiedenen Auslösern wie Endometritis, Salpingitis oder Peritonitis<sup>33</sup>. Langwierige unbehandelte PID können zu TFI, Eileiterschwangerschaften und chronischen Schmerzen führen<sup>34, 35</sup>. In einer schwedischen Studie konnte gezeigt werden, dass 11,4 % der PID Patientinnen nach einer Chlamydieninfektion aufgrund eines Eileiterverschlusses infertil wurden. Wobei es nach jeder weiteren PID zu einer Verdopplung der Rate kam.

### 2.1.3 Der Lebenszyklus humanpathogener *Chlamydia sp.*

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Mikroorganismen mit einem biphasischen Lebenszyklus. In diesem Lebenszyklus treten unter normalen Bedingungen zwei Formen auf. Die erste Form ist die der infektiösen über eine hoch komprimierte DNA verfügenden Elementarkörper (EK, 0,3 µm). Bei der zweiten handelt es sich um die der nicht infektiösen, replizierenden Retikularkörper (RK, 1 µm)<sup>36</sup>. Bislang ging man noch davon aus, dass es sich bei den EK um eine metabolisch inaktive Form handelt während die RK als die metabolisch aktive Form galten<sup>37</sup>. Seit Neuestem gibt es Hinweise, dass EK ebenfalls über einen aktiven Metabolismus verfügen, der es ihnen ermöglicht, Energie aus Glukose-6-Phosphat zu gewinnen<sup>38</sup>. Der Lebenszyklus beginnt mit den infektiösen EK, diese adhäreren an die Wirtszelle (Abbildung 1). Der genaue Mechanismus und die bakteriellen Proteine sowie die beteiligten Rezeptoren auf der Wirtszelle, welche die Adhäsion vermitteln, sind bis jetzt noch nicht völlig verstanden. Chlamydien binden vermutlich über die Proteine in der äußeren Zellmembran, wie z.B. OmpA, OmpB und das heat shock protein 70 (Hsp70) an die „Protein Disulfide Isomerase“, eine Untereinheit des Östrogen-Rezeptor-Komplexes auf humanen Epithelzellen<sup>39,40</sup>. Direkt im Anschluss an die Bindung wird das „Translocation Actin-Recruiting Phosphoprotein“ (TARP) über ein Typ III Sekretionssystem in die Wirtszelle sekretiert. Hierdurch wird das Aktinskelett modifiziert und nach der Endozytose des EK bildet sich eine vom

Zytoplasma abgetrennte Vakuole<sup>41</sup>. In den Bakterien kommt es bereits kurz darauf zu einer De-Kondensation der chromosomalen DNA und der Differenzierung von EK zu RK<sup>42</sup>. Sofort im Anschluss beginnt die Transkription von Proteinen, wobei die Expression von neuen Proteinen bereits 15 min nach der Infektion detektiert werden kann<sup>43</sup>. Die Replikation erfolgt durch binäre Teilung der RK. Während der Infektion nehmen die Chlamydien eine Vielzahl an Metaboliten, wie ATP, Aminosäuren und Phospholipiden, über Transporter in der Einschlussmembran direkt von der Wirtszelle auf<sup>44,45</sup>.

Interessanterweise besitzen Chlamydien entgegen langläufiger Meinung zwar nicht die Enzyme für einen kompletten eigenständigen Metabolismus, doch werden in der Mittelphase der Infektion auch Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges und des Citratzykluses synthetisiert, welche eine partielle Unabhängigkeit von der ATP-Versorgung der Wirtszelle ermöglichen<sup>46</sup>. Am Ende der Mittelphase beginnt die Re-Differenzierung der RK zu EK, dies geht einher mit der Kondensation der chromosomalen DNA und Induktion von mehr als 70 Genen mit vielfach noch unbekanntem Effekt<sup>47</sup>. Nach Abschluss der Re-Differenzierung wird die Lyse der Wirtszelle induziert (48-72 h p.I.) und die infektiösen EK in die Umgebung entlassen, um weitere Zellen zu infizieren.



**Abbildung 1** Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *Chlamydia sp.* Elementarkörper (EK) infizieren die Wirtszelle und differenzieren anschließend zu einem Retikularkörper. Nach mehrfachen Teilungen erfolgt die Re-Differenzierung zu EK, gefolgt von der Freisetzung dieser durch die zelluläre Lyse. Durch exogene und endogene Stimuli kann eine Persistenz der Chlamydien induziert werden. Dadurch sind die Chlamydien in der Lage, längere Zeit in der Wirtszelle zu verbleiben, bis nach Reduktion des Persistenz-Induktors die Persistenz aufgehoben wird und die Chlamydien zu RK re-differenzieren und wieder in den Lebenszyklus eintreten (rote Pfeile).

#### 2.1.4 Persistenz von Chlamydien

Neben der bereits erwähnten Form der akuten Infektion gibt es noch die persistente Infektion. Während dieser Phase liegen die Chlamydien in Form der aberranten Retikularkörper (aRK) vor (Abbildung 1). Die chlamydiale Persistenz ist charakterisiert durch lebensfähige aber metabolisch inaktive und nach Zellyse nicht kultivierbare Chlamydien<sup>40,48</sup>. Ein weiteres Kennzeichen der Persistenz ist eine verringerte Suszeptibilität gegen Antibiotika sowie die Blockade der Wirtszell-Apoptose<sup>49, 50</sup>.

Die während der Persistenz vorkommenden aRK sind überdurchschnittlich groß im Vergleich zu RK. Die Einschlüsse selbst sind dagegen zumeist deutlich kleiner als bei einer produktiven Infektion. Die Induktoren der Persistenz sind vielfältig. Sie kann induziert werden durch sub-inhibitorische Konzentrationen von Penicillin, IFN- $\gamma$  oder aber den Mangel an Nährstoffen wie Eisen oder Aminosäuren<sup>51-53</sup>. Neben den beschriebenen Induktoren wurden in Primärzellen und Monozyten persistente Infektionen durch bislang unbekannte endogene Mechanismen dokumentiert<sup>54, 55</sup>. Man geht davon aus, dass Chlamydien in der Persistenz über einen langen Zeitraum überleben können und für chronische Erkrankungen verantwortlich sind<sup>56</sup>. Die Persistenz ist aber in den meisten Fällen reversibel und kann durch Entfernen des Induktors bzw. Addition der entsprechenden Nährstoffe behoben werden. Chlamydien sind anschließend in der Lage wieder in ihren normalen Lebenszyklus einzutreten, man spricht hierbei von einer Reaktivierung. So konnte kürzlich in HEp-2 Zellen die Reaktivierung von IFN- $\gamma$  induzierten persistenten *C. trachomatis* unter Hypoxie gezeigt werden<sup>57</sup>. Dies ermöglicht einen neuen Ansatz in der Chlamydien Forschung, da gezeigt werden konnte, dass bis jetzt wenig beachtete Faktoren wie die physiologische Sauerstoffverfügbarkeit, einen gravierenden Einfluss auf den Infektionsverlauf haben können. Offen blieb zu diesem Zeitpunkt die Untersuchung von Wirt-Pathogen Interaktionen während der Reaktivierung. Erste Untersuchungen hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

### 2.1.5 *C. trachomatis* assoziierte Immunreaktion

Die hinter den beschriebenen Krankheitsbildern verborgenen Schädigungen des Eileitergewebes sind nicht allein auf einen direkten Einfluss der Chlamydien Infektion zurück zu führen. Es wurde bereits gezeigt, dass ein großer Teil der induzierten Veränderungen auf den körpereigenen Immunreaktionen basiert<sup>58, 59</sup>. Ein Teil der Pathologie beruht auf der Lyse von funktionsfähigen Epithelzellen nach Vervollständigung des chlamydialen Lebenszyklus. Diese Zellen werden anschließend durch neue Zellen ersetzt. Es ist davon auszugehen, dass die körpereigenen Reparaturmechanismen an dieser Stelle versagen und nicht in der Lage sind, neues funktionsfähiges Gewebe zu bilden. So führte eine mehrmalige *C. trachomatis* Infektion in Makaken zur PID, die gekennzeichnet war durch vernarbtes und funktionsloses Gewebe<sup>60, 61</sup>.

Gründe hierfür sind die inflammatorischen Prozesse, die durch die Infektion als auch durch die Zellyse ausgelöst werden und zu einem Verlust an funktionsfähigem Epithel führen und in einer Vernarbung und Fibrose resultieren<sup>60</sup>. Der Beginn einer Chlamydieninfektion zeichnet sich durch die Infektion von Epithelzellen aus und ist mit der Freisetzung verschiedener pro-inflammatorischer Faktoren wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-18 und GM-CSF verbunden. Die Erkennung der Chlamydien erfolgt hierbei über hoch konservierte „Pathogen Associated Molecular Patterns“ (PAMP). Diese werden von „Pattern Recognition Receptors“ (PRR), wie z.B. Toll-like Rezeptoren erkannt und die entsprechende Immunantwort induziert. Es konnte gezeigt werden, dass MAP-Kinasen („mitogen-activated-protein kinases“) hierbei essentiell sind<sup>62, 63</sup>. MAP-Kinasen sind in allen eukaryotischen Zellen vorhanden und sind an der Signaltransduktion von einer Vielzahl von extrazellulären Stimuli (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Bakterien) beteiligt. Sie regulieren verschiedene zelluläre Aktivitäten wie z.B. Genexpression, Mitose, Apoptose und Differenzierung. Bis jetzt sind in Säugetieren fünf verschiedene Klassen bekannt. Die ERK1/2 (p42/44), ERK3/4, ERK5 („Extracellular Signal-Regulated Kinases“), die JNK („c-Jun Amino-Terminal Kinases“) und p38<sup>64</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit lag ein Fokus auf den MAP-Kinasen ERK1/2 und p38, da vor allem diese im Zusammenhang mit der pro-inflammatorischen Immunreaktion auf *C. trachomatis* beschrieben wurden<sup>62, 63</sup>. Die Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgt durch verschiedene Stimuli. So werden die ERK1/2 vor allem durch Wachstumsfaktoren und Phorbolster aber auch durch Zytokine aktiviert, während p38 vor allem durch

Stress in Form von osmotischem Schock, Strahlung, bakterielles LPS oder durch Zytokin Stimulierung aktiviert wird<sup>64, 65</sup>. Die Signaltransduktion der MAP-Kinase Kaskade erfolgt bei allen Klassen nach demselben Muster. Die Aktivierung erfolgt über die Phosphorylierung nach Rezeptorstimulus oder aber über Interaktion mit einer kleinen GTPase der Ras/ Rho Familie und endet in der direkten Phosphorylierung ihrer Substrate<sup>66,67</sup>.

Für die ERK1/2 Kinase wurden vielfältige Substrate mit teils gegenläufigen Auswirkungen beschrieben. Sie ist eine äußerst wirksame Kinase, deren Funktion sich auf alle zellulären Kompartimente erstreckt. So schätzt man, dass durch ERK1/2 bereits wenige Minuten nach Stimulus bereits 500 verschiedene Substrate in verschiedenen zellulären Kompartimenten phosphoryliert werden<sup>68</sup>. Im Nukleus wird vor allem die Transkription, der Chromatin-Umbau sowie die Translokation von Proteinen beeinflusst<sup>69</sup>. In den Mitochondrien dagegen werden vor allem die Bcl-2 (pro-apoptotisch sowie anti-apoptotisch) Proteine und das Membranpotential reguliert<sup>70-72</sup>. Ebenso wie ERK1/2 findet sich die aktivierte p38 in verschiedenen Kompartimenten, wie z.B. dem Zellkern und dem Zytosol. Sie hat vor allem Auswirkung auf die Initiation von pro-inflammatorischen Immunantworten wie die Induktion verschiedener Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ ) oder aber auf die Apoptose<sup>73-77</sup>. Sie ist direkt an der Induktion von chemotaktischen Zytokinen beteiligt, die zu einem Einstrom von Immunzellen nach der Infektion führt (bspw. Lymphozyten und Monozyten).

Der weitere Verlauf der Infektion hängt nun von der Initiierung einer T-Zell Immunantwort ab. Es gibt klare Hinweise, dass eine starke Th1 Antwort mit Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-12 für die vollständige Eradikation von Chlamydien wichtig ist<sup>78-80</sup>. Eine gravierende Rolle kommt hierbei IFN- $\gamma$  sowie TNF- $\alpha$  zu, da sie durch die Induktion von Indolamin 2,3-Dioxygenase das zelluläre Tryptophan zu N-Formylkinurenin oxidieren und somit die verfügbare Menge verringern. Da Tryptophan als essentielle Aminosäure nicht mehr zur Verfügung steht, kann *C. trachomatis* nicht mehr replizieren und etabliert einen persistenten Phänotyp<sup>81, 82</sup>. Der Effekt ist abhängig von der Dosis, so ist IFN- $\gamma$  in hohen Konzentrationen auch in der Lage Chlamydien abzutöten<sup>81</sup>. IFN- $\gamma$  ist weiterhin an der Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), dem Zell-Arrest und der Apoptoseinduktion beteiligt. Weiterhin unterdrückt es die Differenzierung von Th2-Zellen, induziert die Th1 Differenzierung und die

verstärkte Expression von MHC-I und MHC-II<sup>83-86</sup>.

Es wird angenommen, dass es bei inadäquater Th1 Antwort zur Induktion von Persistenz und einem chronischen Verlauf der Infektion kommen kann. Ist die Immunantwort hingegen überschießend, kann dies zwar zur Eradikation des Erregers führen, aber durch die vermehrte Freisetzung von Effektormolekülen auch starke Gewebsschädigungen hervorrufen. Eine wichtige Rolle spielen in diesem Zusammenhang die zytotoxischen T-Zellen, welche durch die Sekretion von Fas oder Perforin Chlamydien-infizierte aber auch umgebende Zellen töten<sup>87</sup>. Eine solche Immunreaktion kann somit zu einem Verlust an funktionsfähigem Epithel und insbesondere der zilienträger Zellen beitragen<sup>2-4, 58</sup>.

Bei einer dominanten Th2 Antwort hingegen bleiben IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-12 Sekretion aus. Ferner ist die bakterielle Tötung durch Makrophagen und die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen stark verringert<sup>88</sup>. Es kann dementsprechend eher eine chronische Infektion etabliert werden. Es ist bis dato nicht eindeutig geklärt, welche Faktoren Einfluss auf den Übergang von einer akuten in eine chronische bzw. persistente Infektion haben. Vermutet wird einerseits eine inadäquate Th1 Antwort sowie eine dominierende Th2 Antwort. Um eine effektive Ausheilung der Infektion mit möglichst wenig Gewebsschädigungen zu erzielen, ist eine balancierte Immunantwort von Nöten<sup>89</sup>.

## 2.2 Der IFN- $\gamma$ induzierte Jak/ Stat Signalweg

Unter den Effektormechanismen des humanen Immunsystems, welche für die Abwehr einer Chlamydieninfektion essentiell sind, nehmen die Interferone, und unter ihnen insbesondere IFN- $\gamma$ , eine wichtige Stellung ein. Interferone sind eine Gruppe von Zytokinen, die bis jetzt nur in Vertebraten gefunden worden. Ihre biologische Aktivität lässt sich gliedern in eine immunmodulatorische, anti-virale und gegen Tumoren gerichtete Wirkung<sup>90</sup>. Sie werden in drei Kategorien eingeteilt: IFN Typ I, Typ II sowie Typ III. Typ I beinhaltet die IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\omega$ , - $\epsilon$ , - $\kappa$  sowie die bis jetzt nur in Schweinen, Rindern und Nagern gefundenen IFN- $\delta$ , - $\zeta$ , - $\tau$ <sup>91-93,94, 95</sup>. IFN Typ II beinhaltet nur das IFN- $\gamma$ , während IFN- $\lambda$ 1-3 Interferone des Typ III darstellen<sup>96,97</sup>. Bis vor kurzem ging man davon aus, dass Typ I IFN vor allem antiviral wirken. Mittlerweile gibt es aber auch Berichte, dass sie eine antibakterielle Wirkung besitzen<sup>98</sup>. Die wichtigste Funktion in Bezug auf Interferone im Zusammenhang mit

Chlamydien Infektionen ist die Induktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), diese kann sowohl von IFN Typ II als auch von IFN Typ I induziert werden<sup>99</sup>. Die Induktion von IDO nach IFN- $\gamma$  Stimulation stellt das derzeit am besten untersuchte Modell für die Induktion einer Persistenz von Chlamydien dar. IFN- $\gamma$  besitzt eine starke antivirale Aktivität, es wird vor allem von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen sekretiert. Es ist ein potenter Aktivator von Makrophagen und essentiell beteiligt an der Abwehr intrazellulärer Erreger wie Mykobakterien und Listerien. Außerdem fördert es die Entwicklung von Th1-Zellen sowie cytotoxischen T-Zellen<sup>100</sup>.

IFN- $\gamma$  bindet an einen zellulären Oberflächenrezeptor, bestehend aus der IFNGR1 und IFNGR2 Untereinheit. Die Bindung induziert eine Rezeptor-Oligomerisation und damit verbunden eine Aktivierung der Rezeptor assoziierten Janus Kinasen 1 und 2 (Jak1, Jak2). Diese phosphorylieren die intrazelluläre Domäne des Rezeptors und schaffen dadurch eine Bindestelle für das Stat-1 Protein. Stat-1 wird daraufhin am Tyrosinrest 701 phosphoryliert und dimerisiert mittels seiner „Src-homology-2“ Domänen (SH2). Anschließend transloziert es in den Nukleus, wo es die Genexpression durch Bindung an die „ $\gamma$ -activated sequences“ (GAS) in der Promotorregion der IFN- $\gamma$  regulierten Gene initiiert<sup>96, 101, 102</sup>. Die maximale Transkriptionseffektivität von Stat1 wird durch eine zusätzliche Phosphorylierung am Serinrest 727 erreicht. Dies geschieht durch die Phosphatidylinositol 3-Kinase und die Proteinkinase B<sup>103, 104</sup>.

Innerhalb der Zelle wurden bis jetzt drei verschiedene Mechanismen, welche die IFN- $\gamma$  Immunantwort regulieren, beschrieben. Zum einen gibt es die konstitutiv exprimierten Phosphatasen der SHP Klasse („SH2-containing phosphatases“) sowie die PIAS („Protein Inhibitors of Activated Stat“). Der regulatorische Mechanismus ist hierbei verschieden. So de-phosphorylieren SHP direkt den IFN- $\gamma$  Rezeptor während PIAS phosphoryliertes Stat binden und eine Bindung an den Promotor verhindern<sup>105</sup>. Die dritte inhibitorische Klasse besteht aus den SOCS-Proteinen („Suppressor of Cytokine Signaling“), diese werden nicht konstitutiv exprimiert sondern erst als Feed-back Mechanismus durch *de novo* Genexpression nach Bindung von Stat an ihr GAS Element. SOCS interagieren direkt mit Jak1 und Jak2, außerdem sind sie in der Lage, Rezeptoren zu de-phosphorylieren sowie phosphorylierte Proteine für die proteasomale Degradation zu markieren<sup>105</sup>.

### 2.3 Infektionsmodelle für *C. trachomatis*

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden überwiegend zwei verschiedene Infektionsmodelle in der Erforschung von *C. trachomatis* verwendet. Bei den Tiermodellen werden vorwiegend Mäuse eingesetzt. Der größte Vorteil des Mausmodelles ist neben dem Preis und der Verfügbarkeit, die Möglichkeit, die komplexen Vorgänge einer Infektion und die daraus resultierende Entzündung unter dynamischen Gesichtspunkten zu betrachten. Die Speziesbarriere ist jedoch hinsichtlich der Verwertbarkeit der Befunde der größte Nachteil. So wird in den meisten Mausmodellen eine artifizielle Infektion mit *C. trachomatis* verwendet. Diese sind human pathogen und werden durch die Maus relativ schnell beseitigt<sup>106</sup>. Das entsprechende Äquivalent in der Maus *C. muridarum* löst dagegen einen vergleichbaren Krankheitsverlauf wie im Menschen aus, jedoch kommt es zumeist bereits nach ca. 4 Wochen zu einer spontanen Heilung der Infektion<sup>106</sup>.

Das zweite Problem ergibt sich aus der Immunantwort. In beiden Spezies ist IFN- $\gamma$  das wichtigste Zytokin bei der Chlamydien Abwehr. Aber im Gegensatz zur humanen Chlamydien Abwehr spieltIDO in der Maus weder gegen *C. muridarum* noch gegen *C. trachomatis* eine Rolle<sup>107</sup>. In der Maus konnte dagegen eine Induktion der p47 GTPase gezeigt werden. Diese steht im Verdacht, die Einschussmembran zu modifizieren und eine Fusion mit dem Phagosom zu ermöglichen, wodurch ein Abtöten der Erreger intrazellulär ermöglicht wird<sup>108, 109</sup>. Dieser Effekt wiederum konnte nur für humane aber nicht für murine Chlamydien gezeigt werden<sup>107, 108</sup>. Es wird angenommen, dass diese Unterschiede durch Ko-Evolution von Chlamydien mit ihrem spezifischen Wirt auftreten und auf spezifischen Genvarianten beruhen<sup>107</sup>. So konnte in den genitalen *C. trachomatis* Serovaren eine Tryptophan-Synthase-Sequenz detektiert werden, die eine Synthese von Tryptophan aus Indol ermöglicht<sup>110</sup>. Dem gegenüber wurden in *C. muridarum* Sequenzen für Zytotoxine gefunden, die es ihnen ermöglichen, mit der murinen Abwehr zu interagieren<sup>110</sup>. Man vermutet, dass die Chlamydien während der Ko-Evolution Mechanismen entwickelt haben, um trotz des Wirtsimmunsystems bestmöglich zu überleben<sup>107</sup>. Da es sich aber um verschiedene Wirtspezies handelt, sind die Mechanismen nicht gleich wirksam. Dies ist ein Grund, warum eine Übertragung von experimentellen Daten aus Mausmodellen auf den Menschen nicht ohne weiteres möglich ist.

Um die Übertragbarkeit von experimentellen Daten auf das humane System zu gewährleisten, werden vor allem Modelle basierend auf den humanen Zelllinien

HeLa-229 oder HEp-2 genutzt. Die Vorteile dieser Zellen sind der Preis, die einfache Handhabung, das unbegrenzte Teilungsvermögen und die gute Reproduzierbarkeit. Die Nachteile dieser Modelle ergeben sich vor allem daraus, dass es sich hierbei um immortalisierte Zellen aus Karzinomen handelt (HeLa-229 Cervix Karzinom, HEp-2 Larynx Karzinom). Es ist bekannt, dass in Karzinomzellen einige wichtige genregulatorische sowie metabolische Funktionen nicht dem natürlichen Phänotyp einer gesunden Zelle entsprechen. Beispiele sind die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, keine oder verringerte Reaktion auf Wachstumsinhibitoren, unbegrenztes Reproduktionspotential, Apoptoseinhibition sowie ein veränderter Metabolismus<sup>111, 112</sup>. Es ist in vielen Fällen nicht klar, wie sich diese Faktoren auf die durchgeführten Experimente bzw. Bakterien auswirken oder ob sich die experimentellen Daten auf primäre Zellen/ Gewebe/ *in vivo* Bedingungen anwenden lassen. Aus diesem Grund ist eine Übertragbarkeit der Daten nicht ohne weitere Prüfung möglich. Ideal ist eine Reproduktion der Versuche in Primärzellen aus verschiedenen Spenderinnen, um einerseits auszuschließen, dass es sich bei den Befunden um Artefakte aus der Nutzung von Karzinomzellen handelt und andererseits die biologische Variabilität einbeziehen.

#### **2.4 Hypoxie und der Hypoxie induzierbare Faktor-1 (HIF-1)**

Ein Faktor, der in den meisten gängigen Zellkulturmodellen vernachlässigt wird, ist die Sauerstoffverfügbarkeit. Eine Umgebungsvariable, die im menschlichen Organismus zumeist deutlich geringer als in der Umgebungsluft oder in einem Brutschrank (Tabelle 1) vorliegt. Sie kann sowohl den zellulären Stoffwechsel entscheidend verändern, als auch immunmodulatorisch wirken. So ist die IFN- $\gamma$  Aktivität unter Hypoxie im Gegensatz zu Normoxie verringert<sup>113, 114</sup>. Innerhalb von Zellkulturmodellen wird Hypoxie als ein Zustand mit einem Sauerstoffgehalt von ca. 0,5-3 % O<sub>2</sub> beschrieben<sup>115</sup>. Der Begriff der Hypoxie wird als verminderter Elektronentransport aufgrund von reduzierter O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit definiert<sup>116</sup>. Allgemein bezeichnet sie einen Zustand von verminderter Sauerstoffverfügbarkeit oder aber reduziertem Sauerstoffpartialdruck unter einer kritischen Grenze, wodurch die Funktion von Organen, Gewebe oder Zellen beeinträchtigt oder aufgehoben wird<sup>117, 118</sup>. *In vivo* tritt der Zustand der Hypoxie vor allem in Tumoren, im Bereich von Entzündungen oder generell in Geweben mit einer hohen Zellteilungsrate auf<sup>119</sup>.

Neben diesen zumeist pathologischen Prozessen ist aber auch die Sauerstoffverfügbarkeit unter gesunden Bedingungen nicht mit dem der Umgebungsluft (Normoxie) vergleichbar (Tabelle 1). Die in aerobem Milieu wachsenden Zellen benötigen Sauerstoff für die ATP-Produktion, da dieser aber nicht immer in ausreichender Menge vorhanden ist, haben sich zelluläre Regulationsmechanismen entwickelt, die ein Überleben unter diesen Bedingungen gewährleisten.

In einer Sauerstoff-armen Umgebung ist der HIF-1 Komplex der wichtigste transkriptionelle Faktor. Er reguliert über 500 verschiedene Gene aus allen Bereichen des Zellmetabolismus, unter anderem Energieversorgung, Glukoseaufnahme, Wachstumsfaktoren, Gefäßeinsproßung und Apoptose<sup>120-123</sup>. Der HIF-1 Komplex ist ein Heterodimer, bestehend aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Untereinheit. Beide werden konstitutiv exprimiert. Entgegen der  $O_2$  abhängigen Degradation der  $\alpha$ -Untereinheit im Zytosol liegt die  $\beta$ -Untereinheit stabil im Kern vor. Unter normoxischen Bedingungen wird die  $\alpha$ -Untereinheit sofort durch die Eisen- und  $O_2$ -abhängigen Prolyl-Hydroxylasen (PHD) bzw. HIF-Prolyl-Hydroxylasen (HPH) an den Prolinresten 402 und 564 hydroxyliert<sup>124</sup>. Dies führt zu einer Bindung an das von Hippel-Lindau Suppressor Protein (vHL), welches HIF-1 $\alpha$  ubiquitiniliert und somit für die proteasomale Degradation markiert<sup>125, 126</sup>.

Unter hypoxischen Bedingungen funktioniert die Hydroxylierung dagegen nicht mehr und es kommt zu einer Akkumulation von HIF-1 $\alpha$ . Dieses transloziert in den Nukleus, wo es mit der  $\beta$ -Untereinheit interagiert, als Heterodimer an das „HIF-Response Element“ (HRE) in der Promotorregion der entsprechenden Gene bindet und die Transkription initiiert<sup>127</sup>. Neben der Aktivierung durch Hypoxie wird auch eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen beschrieben. Induktoren hierfür sind viele Wachstumsfaktoren und Zytokine wie z.B. Insulin, Insulin-like growth factor, TGF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ <sup>121, 128, 129</sup>. Aber auch Stickstoffmonoxid (NO) oder die Stimulation der ERK1/2 MAP-Kinasen und durch bakterielles LPS induziertes NF $\kappa$ B führen zu einer Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ <sup>130,131</sup>. Weiterhin konnten durch Infektion mit Bakterien wie z.B. *C. pneumoniae* oder *Bartonella henselae* ebenfalls eine erhöhte Expression an HIF-1 $\alpha$  Protein im Western Blot detektiert werden<sup>132, 133</sup>.

**Tabelle 1** Extrazelluläre Sauerstoffkonzentrationen in verschiedenen Umgebungen, Flüssigkeiten und Geweben (modifiziert nach<sup>134, 135</sup>).

Gewebe	O <sub>2</sub> [mmHg]	O <sub>2</sub> [%]
Luft	160	21,1
Brutschrank	151	20
Arteriell Blut	100	13,2
Bindehaut	58	7,7
Lunge	42,8	5,6
Venöses Blut	40	5,3
Herzmuskel	34	4,5
Gebärmutterhals	13-48	1,7-6,3
Vagina	3,8	0,5

## 2.5 Regulation der zellulären Apoptose bei Chlamydieninfektionen

Während der intrazellulären Phase ihres Lebenszyklus sind die Chlamydien vollkommen abhängig von dem Überleben ihrer Wirtszelle. Aufgrund dessen haben sie Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, auf das Überleben der Zelle einzuwirken<sup>136, 137</sup>. Neben den Chlamydien haben auch die hier verwendeten Bedingungen, wie IFN- $\gamma$  und Hypoxie, einen Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Zellen<sup>138-140</sup>. Die Apoptose ist ein evolutionär konserviertes Programm zur Regulation des Zelltodes unerwünschter Zellen, welches in verschiedenen pathologischen wie auch nicht pathologischen Situationen auftritt. Es ist durch verschiedene morphologische Änderungen, wie z.B. Zellschrumpfung, DNA Fragmentation und Membranabschnürung, charakterisiert<sup>141</sup>. Entgegen der Nekrose handelt es sich hierbei um einen kontrollierten Zelltod, der keine Entzündungsreaktion initiiert<sup>142</sup>. Sie findet häufig bei der Eradikation von Wirtszellen, die Antigene intrazellulärer Pathogene auf ihren MHC I Komplexen präsentieren, statt. Zum aktuellen Zeitpunkt sind zwei verschiedene Signalwege für die Initiation der Apoptose beschrieben, zum einen der intrinsische- und zum anderen der extrinsische Signalweg<sup>143</sup>. Beide unterscheiden sich vor allem im Auslöser der Initiation. So wird der extrinsische Signalweg durch membrangebundene Rezeptoren ausgelöst<sup>144</sup>. Nach Bindung von z.B. CD95-Ligand

(CD95L) oder Trail kommt es zu einer Trimerisierung der Rezeptoren, was auf der intrazellulären Seite zu einer Rekrutierung von FADD („Fas-associated death domain“) führt<sup>145</sup>. Dies wiederum führt nach Rekrutierung von Caspase-8 zur Bildung des DISC („CD95 death inducing signaling complex“). Nach Aktivierung der Caspase-8 kommt es zu einer Aktivierung weiterer Caspasen wie z.B. 3, 6 und 7, die durch Spaltung ihrer entsprechenden Substrate die Apoptose einleiten<sup>146, 147</sup>. Weiterhin kommt es zu einer Kreuzreaktion mit dem mitochondrialen Signalweg, da auch Bid, ein pro-apoptotisches Protein der Bcl-2 Familie, aktiviert wird. Dieses transloziert in die Mitochondrien und induziert die Freisetzung von Cytochrome C<sup>147</sup>. Auf der anderen Seite gibt es den intrinsischen oder mitochondrialen Signalweg, welcher eng mit der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran durch pro-apoptotische Bcl-2 (BH3-only proteins wie Bid, PUMA, Bax, Bad) Proteine assoziiert ist<sup>148</sup>. Durch diese Permeabilisierung können Proteine wie Cytochrome C, Smac („second mitochondria derived activator of caspase“)/ DIABLO („direct inhibitor of apoptosis protein (IAP)-binding protein with low PI“) oder die Endonuklease G in das Cytosol gelangen<sup>149</sup>.

Nach diesem Ereignis kommt es zur Formation des Cytochrom C/ Apaf-1/ Caspase-9 Apoptosom Komplex, der die Caspase-3 aktiviert und die Apoptose einleitet<sup>150, 151</sup>. Weiterhin kommt es zu einer Kreuzreaktion mit dem extrinsischen Weg, da die Caspase-6, welche ebenfalls durch den Apoptosom Komplex aktiviert wird, auch Caspase-8 aktiviert. Die Aktivierung des intrinsischen Wegs kann über verschiedene Chemikalien, Strahlung oder durch Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgen<sup>152</sup>. Sowohl für Chlamydien infizierte als auch für hypoxische Zellen ist eine verringerte Suszeptibilität gegen pro-apoptotische Stimuli beschrieben worden. Die verwendeten Mechanismen unterscheiden sich aber gravierend. So verhindern Chlamydien vermutlich die Aktivierung von Bax und somit die Freisetzung von Cytochrom C, wohingegen unter Hypoxie das anti-apoptotische Bcl-2 Protein verstärkt aktiviert wird<sup>49, 153</sup>. Für IFN- $\gamma$  dagegen wurde ein sensibilisierender Effekt über die Aktivierung von IRF-1 und die damit verbundene Induktion des pro-apoptotischen Bak Protein beschrieben<sup>154</sup>.

## 2.6 Fragestellung

Im Zuge dieser Arbeit sollten zwei zentrale Fragestellungen bearbeitet werden. Zum einen sollten mithilfe von humanen Eileitern neue Infektionsmodelle etabliert werden. Diese hatten zum Ziel, so genau als möglich die *in vivo* Bedingungen zu repräsentieren, um einen möglichst realistischen Einblick in Wirt-Pathogen Interaktionen bei genitalen *C. trachomatis* Infektionen zu erhalten. Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Interaktion zwischen *C. trachomatis* und humanen Wirtszellen. Dabei lag der Schwerpunkt der Analysen auf der Reaktivierung von IFN- $\gamma$  behandelten, persistenten Chlamydien unter hypoxischen Bedingungen.

In der Arbeit wurden folgende Ziele verfolgt:

### Etablierung neuer Infektionsmodelle

- Visualisierung von Chlamydien Infektionen und deren Auswirkungen auf das Eileiterepithel
- Etablierung von chlamydialer Persistenz im Eileitermodell
- Etablierung und Charakterisierung eines Zellkulturmodelles auf der Basis isolierter epithelialer Eileiterzellen

### Reaktivierung einer persistenten Chlamydieninfektion unter Hypoxie

- Etablierung eines Reaktivierungsmodelles auf der Basis von HeLa-229 Zellen und *C. trachomatis*
- Detektion direkter Wirt-Pathogen Interaktionen im Rahmen der hypoxischen Reaktivierung von *C. trachomatis*

### 3. Material

#### 3.1 Geräte

##### Brutschränke (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>)

Forma Series II 3131	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA
Typ: BB 6220	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

##### Brutschränke (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>- Regulation, O<sub>2</sub>-Sensor)

Forma Series II 3141	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA
Hypoxiekammer THC08 124	Toepffer Lab Systems, Göppingen

##### Durchflusszytometer

Cytomics FC 500	Beckman-Coulter GmbH, Krefeld
EPICS XL MCL	Beckman-Coulter GmbH, Krefeld

Elektrophoresekammer Mini-Protean Tetra	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
---	------------------------------------

Gewebehomogenisator Precellys 24	Bertin Technologies, Villeurbanne, Frankreich
----------------------------------	---

Heizblock PCH-2	Grants-Instruments Ltd., Shepreth, Großbritannien
-----------------	---

Imagingsystem Fusion FX7	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
--------------------------	-----------------------------------

Kamera AxioCam HRc	Carl Zeiss MikroImaging, Göttingen
--------------------	------------------------------------

Kontrastierautomat EMAC 20	Leica, Solms
----------------------------	--------------

Kritischer Punkt Trockner	Plano GmbH, Wetzlar
---------------------------	---------------------

LightCycler 1.0	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
-----------------	----------------------------------

Magnetrührer	RMO Gerhardt GmbH, Königswinter
--------------	---------------------------------

Mini Trans-Blot Cell	Cell Bio-Rad Laboratories GmbH, München
----------------------	---

Mikroskope

Axioskop 2, 25, 40	Carl Zeiss MikroImaging, Göttingen
Axiovert 25	Carl Zeiss MikroImaging, Göttingen
BZ-9000	Keyence, Osaka, Japan
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen
Pipetierhilfe accu-jet	Brand GmbH, Wertheim
PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Präzisionswaage KB	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommen
Rasterelektronenmikroskop SEM Phillips 505	Phillips Electronics N.V., Herrsching

Sicherheitswerkbänke

EN 12469	Clean Air Technik B.V., Woerden, Niederlande
SterilGard Hood Class II A/ B3	Baker Company, Sanford, ME, USA
Sputteranlage SCD 040	Leica, Solms
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH, Schwalbach
Thermocycler C1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Transmissionselektronenmikroskop JOEL 1011	JOEL Ltd., Tokyo, Japan
Ultramikrotom Ultracut E	Reichert-Jung, Wien, Österreich
Vortex-Schüttler REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH, Schwalbach

Zentrifugen

Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Megafuge 2.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Rotina 38R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Optima L-90K	Beckmann Coulter, Brea, CA, USA

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

6-, 24-Wellplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Blotpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Deckgläser, Ø10 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Fixiernadeln	Plano GmbH, Wetzlar
Gelkämme: Mini Protean 3 (1,0 mm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glasplatten: Mini Protean 3 (1,0 mm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glasschrot	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
Korkplättchen	Plano GmbH, Wetzlar
Kryoröhrchen	Nalgene Cryoware Nunc Brand Products, Rochester, NY, USA
Kupfernetze (Grids) G2410C	Plano GmbH, Wetzlar
LightCycler Kapillaren (20 µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Neubauer-Zählkammer	Hassa Laborbedarf, Lübeck
Nitrocellulosemembran Protran	Whatman Inc, Florham Park, NJ, USA
Objektträger (76 x 26 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipetten Eppendorf Reference 10, 100, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen Biosphere filter tips 10, 100, 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pipettenspitzen, Prot/ Elec tips 1-200 µl	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Precellys-Keramik-Kit 1,4/ 2,8 mm	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen
Rasierklingen Wilkinson Sword classic	Dirk Rossmann GmbH, Isernhagen
Reaktionsgefäße (0,5/ 1,5 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Falcon Röhrchen (12, 15, 50 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Skalpell: Feather Disposable Scalpell No.11	Feather Safety Razor Co. LTD, Osaka, Japan
Skalpell: Feather Disposable Scalpell No.21	Feather Safety Razor Co. LTD, Osaka, Japan
Transferpipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellkulturflaschen Cellstar Filter Top (175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen (d = 10 cm)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

### 3.3 Chemikalien und Reagenzien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Acrylamid-Bis (40 %) Lösung, 19:1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Araldit	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Azur II	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Bambanker-Kryokonservierungsmittel	Wako Chemicals GmbH, Neuss
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Collagen Typ IV	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylarsinsäure-Natriumsalz	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol, absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Glutaraldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Hoechst Lösung 0,5 µg/ ml	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
HRP-Substrat Super Signal West Femto	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Kontrastierlösung	Laurylab, Saint-Fonds Cedex, Frankreich
Leitkleber EM (Kohlenstoff-Zement)	Plano GmbH, Wetzlar
L-Glutamin (10 mg/ ml)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt

---

Methylenblau	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
di-Natriumtetraborat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd 10 %	Merck KGaA, Darmstadt
PCR Nukleotid Mix (dNTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Propylenoxid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Rekombinantes humanes IFN- $\gamma$	PeproTech GmbH, Hamburg
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Saponin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt
Staurosporin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Trockenmilchpulver	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Trypsin/ EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Tween-20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA

### 3.4 Puffer und Lösungen

<b>Blockpuffer, 5 %</b>	5 g Trockenmilchpulver 100 ml T-TBS Puffer
<b>Blotpuffer</b>	3 g Tris 14,4 g Glycin 200 ml Methanol ad 1 l Aqua dest.
<b>Natrium-Kacodylat-Puffer, 0,2 M</b>	42,80 g Dimethylarsinsäure-Natriumsalz 68,46 g Saccharose ad 1 l Aqua dest.
<b>Monti's Fixanz, pH 3,75</b>	156 ml Natrium-Kacodylat-Puffer 0,1 M 25 ml Glutaraldehyd 25 % 19 ml Paraformaldehyd 10 % 3 ml CaCl <sub>2</sub> -Lösung 3 % ad 312 ml Aqua dest.
<b>Cycloheximid, Stammlösung</b>	1 g Cycloheximid ad 1 ml Aqua dest.
<b>Elektrophoresepuffer (5x), pH 8,3</b>	15 g Tris 72 g Glycin 5 g SDS ad 1 l Aqua dest.
<b>FACS-Puffer</b>	100 ml PBS 1 g BSA 0,1 g NaN <sub>3</sub>

**WB-Lysispuffer, pH 7,8**

3,94 g Tris HCl  
40 ml Glycerol  
8 g SDS  
20 ml DTT (1 M)  
Bromphenolblau  
ad 200 ml Aqua dest.

**PBS-Puffer, pH 7,2**

80 g NaCl  
2 g KCl  
11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 x H<sub>2</sub>O  
2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 1 l Aqua dest.

**Richardson Färbelösung**

Vor Gebrauch beide Lösungen im  
Verhältnis 1:1 mischen.

Lösung 1

1 g Azur II  
ad 100 ml Aqua dest.

Lösung 2

1 g Methylenblau  
1 g di-Natriumtetraborat  
40 g Saccharose  
ad 100 ml Aqua dest.

**Sammelgelpuffer, pH 6,8**

30 g Tris  
ad 500 ml Aqua dest.

**SAP-Puffer**

100 ml PBS  
2 ml FKS  
0,6 g Saponin

<b>SPG-Puffer pH, 7,3</b>	75 g Saccharose 2,47 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,36 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,72 g L-Glutaminsäure ad 1 l Aqua dest.
<b>TBS-Puffer (10x), pH 7,6</b>	24,2 g Tris 80 g NaCl ad 1 l Aqua dest.
<b>Trenngelpuffer, pH 8,8</b>	90,5 g Tris ad 500 ml Aqua dest.
<b>T-TBS Puffer</b>	100 ml TBS-Puffer (10x) 1 ml Tween-20 ad 1 l Aqua dest.

### 3.5 Zelllinien

Name	Ursprung	Nummer	Vertrieb
HEp-2	Epidermoides Larynx Karzinom	CCL-23	ATCC, Manassas, USA
HeLa-229	Epitheloides Cervix Karzinom	ACC 57	DSMZ, Braunschweig

### 3.6 Medien und Medienzusätze

Die verwendeten Medien und Medienzusätze stammen, sofern nicht anders angegeben, von der Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe.

<b>Dauerkulturmedium</b>	DMEM mit Glucose (4,5 g/l) und L-Glutamin 10 % FKS 20 µg/ ml Gentamycin 33,2 mM HEPES-Puffer
<b>Infektionsmedium</b>	RPMI 1640 ohne L-Glutamin 5 % FKS 0,1 mg/ ml L-Glutamin 1x NEAA
<b>Collagenase-Isolationsmedium</b>	1 mg Collagenase II 1 ml M199 Medium
<b>USG-Zellkulturmedium</b>	50:50 DMEM/ Hams F12 1 % Penicillin/ Streptomycin 2 % Ultrosor G (Pall Corporation, NY, USA)
<b>Isolationsmedium</b>	MEM 1,4 mg/ ml Pronase 0,1 mg/ ml DNase

### 3.7 Enzyme und Kits

Collagenase II	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
DNase	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
IMAGEN Chlamydia Kit	Oxoid, Cambridgeshire, Großbritannien
Mykoplasmen-Test, Venor GeM	Minerva Biolab, Berlin
NucleoSpin RNA II	Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Pronase	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Reverse Transkriptase, RevertAid Premium	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase-Inhibitor, RiboLock	Fermentas, St. Leon-Rot
Sensi Mix Capillary Kit	Bioline GmbH, Luckenwalde

### 3.8 Oligonukleotide

#### 3.8.1 Primer für die cDNA Synthese

Die verwendeten Primer (Random Hexamer Primer p(dN)) wurden von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, bezogen.

### 3.8.2 Primer für die quantitative RT-PCR

Die verwendeten Primer wurden von der Firma TIB MOLBIO, Berlin, bezogen. Die Verdünnung erfolgte nach Herstellerangaben mit RNase-freiem Wasser in eine Arbeitskonzentration von 20 µM.

Primerpaar	Spezies	Sequenz 5` > 3`
18S rRNA	Human	Forward TCAAGAACGAAAGTCGGAGG Reverse GGACATCTAAGGGCATCACA
IL-1β	Human	Forward TCCCCAGCCCTTTTGTGTA Reverse TTAGAACCAAATGTGGCCGTG
IL-6	Human	Forward CCTTCCAAAGATGGCTGAAA Reverse CAGGGGTGGTTATTGCATCT
IL-8	Human	Forward CCAGGAAGAAACCACCGGA Reverse GAAATCAGGAAGGCTGCCAAG
MCP-1	Human	Forward CATTGTGGCCAAGGAGATCTG Reverse CTTCGGAGTTTGGGTTTGCTT
16S rRNA	<i>C. trachomatis</i>	Forward CGGTAATACGGAGGGTGCTA Reverse CTACGCATTTACCGCTACA

### 3.9 Antikörper

#### 3.9.1 Antikörper für Western Blot Analysen

##### *Primärantikörper für Western Blot*

Name	Herkunft	Hersteller	Klonalität	Verdünnung
Anti-human- $\beta$ -Aktin	Kaninchen	Cell Signaling Technology, MA, USA	polyklonal	1:2000
Anti-human-HIF-1 $\alpha$	Maus	BD Bioscience, Heidelberg	monoklonal	1:500
Anti-human-pERK1/2	Kaninchen	Cell Signaling Technology, MA, USA	polyklonal	1:1000
Anti-human-pp38	Kaninchen	Cell Signaling Technology, MA, USA	polyklonal	1:1000
Anti-human-STAT1	Maus	Cell Signaling Technology, MA, USA	monoklonal	1:1000
Anti-human-pSTAT1 (Ser 727)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, MA, USA	polyklonal	1:1000
Anti-human-pSTAT1 (Tyr 701)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, MA, USA	polyklonal	1:1000

##### *Sekundärantikörper für Western Blot*

Name	Herkunft	Hersteller	Klonalität	Verdünnung
Anti-Kaninchen IgG, HRP konjugiert	Ziege	Cell Signaling Technology, MA, USA	polyklonal	1:4000
Anti-Maus IgG, HRP konjugiert	Pferd	Cell Signaling Technology, MA, USA	polyklonal	1:4000

### 3.9.2 Antikörper für Immunfluoreszenz

#### *Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen*

Name	Herkunft	Hersteller	Klonalität	Verdünnung
Anti-Chlamydien-LPS	Maus	Prof. H. Brade, FZ Borstel	polyklonal	1:50

#### *Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen*

Name	Herkunft	Hersteller	Klonalität	Verdünnung
Anti-Kaninchen IgG, FITC konjugiert	Ziege	Invitrogen, Darmstadt	polyklonal	1:100
Anti-Maus IgG, FITC konjugiert	Kaninchen	Dako Deutschland GmbH, Hamburg	polyklonal	1:250

### 3.9.3 Antikörper für die FACS-Analyse

Die verwendeten Antikörper waren anti-Human und wurden von der Firma BD Biosciences, Heidelberg, bezogen.

Name	Markierung	Herkunft	Hersteller	Klonalität	Verdünnung
CD 13	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
CD 29	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
CD 34	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
CD 44	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
CD 45	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
CD 54	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
CD 73	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
CD 90	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
CD 105	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
CD 106	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
CD 140 b	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
CD 146	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
CD 166	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
CD 271	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
Cytokeratin 1-19	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
E-Cadherin	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
EpCam	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10
HLA-A,B,C	Phycoerythrin	Maus	BD	monoklonal	1:10

### 3.10 Software

Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
AxioVision Rel. 4.5	Carl Zeiss MikroImaging, Göttingen
Bio1D	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
BZ Analyzer Software	Keyence, Osaka, Japan
Cytomics CXP	Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld
Image J	National Institutes of Health, USA
LightCycler Data Analysis	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Microsoft Office 2007	Microsoft Cooperation, Redmond, USA

## 4. Methoden

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Zellkultur von Dauerkulturzellen

Bei den verwendeten Dauerkulturzellen (Tabelle 2) handelt es sich um adhärenente epitheliale Karzinomzelllinien. Sie wurden in 175 mm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit Dauerkulturmedium in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen mit Trypsin/ EDTA (1x) von der Zellkulturflasche gelöst und im Verhältnis 1:8 bis 1:10 in 25 ml Dauerkulturmedium auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Mykoplasmen-Kontamination auszuschließen, wurde bei jeder Teilung ein Aliquot der zu teilenden Zellen entnommen und auf Mykoplasmen getestet.

**Tabelle 2** Verwendete Dauerkulturzelllinien

Zelltyp	Medium	Volumen
HeLa-229	Dauerkulturmedium	25 ml
HEp-2	Dauerkulturmedium	25 ml

#### 4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Suspension wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Es wurden 90 µl Trypanblau mit 10 µl der Zellsuspension vermischt und 10 µl der 1:10 verdünnten Zellen in eine 0,1 mm tiefe Neubauer Zählkammer pipettiert. Daraufhin wurden alle lebenden (weißen) Zellen in den vier Großquadraten gezählt. Anschließend erfolgte die Kalkulation der Zellzahl/ ml nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ ml} = \frac{\text{gezaehlte Zellzahl} * \text{Volumen} * \text{Verduennungsfaktor} * 10^4}{\text{Anzahl der gezaehlten Großquadrate}}$$

### **4.1.3 Konservierung von Zelllinien**

Die Zellen einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche wurden mit Trypsin/ EDTA (1x) von der Zellkulturflasche gelöst, in 8 ml Dauerkulturmedium aufgenommen und bei 700 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml Bambanker-Kryokonservierungsmittel aufgenommen und bei -80 °C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **4.1.4 Auftauen von Zelllinien**

Zur Anzucht von eingefrorenen Zellen wurden diese aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt. Direkt nach dem Auftauen wurden die Zellen mit 10 ml Dauerkulturmedium versetzt und für 5 min bei 700 x g zentrifugiert bevor das Pellet in 25 ml Dauerkulturmedium aufgenommen wurde und die Zellen über Nacht in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> adhärirten. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit Dauerkulturmedium.

## **4.2 Tubenpräparation**

Humane Eileiter wurden direkt nach der Sektion bei 4 °C in Infektionsmedium gelagert. Zur Präparation der Eileiter wurde eine Petrischale (Durchmesser d = 10 cm) mit 25 ml Infektionsmedium gefüllt und der vollständige Eileiter hinzu gegeben. Während der gesamten Präparation wurde, um Artefakten zu vermeiden, das Austrocknen des Präparates strikt vermieden. Das Eileiter umgebende Bindegewebe sowie alle durch die Sektion kauterisierten Bereiche wurden vorsichtig entfernt und verworfen. Anschließend wurde der Eileiter longitudinal geöffnet und in kleine Stücke mit einer Kantenlänge von ca. 0,5 x 0,5 cm geschnitten. Diese wurden in 6-Wellplatten mit 5 ml Infektionsmedium überführt und entsprechend des Versuchsplanes behandelt.

### **4.3 Isolation primärer epithelialer Eileiterzellen**

#### **4.3.1 Isolation primärer epithelialer Eileiterzellen mit Collagenase**

Humane Eileiter wurden, wie in Abschnitt 4.2 beschrieben präpariert. Nach dem Teilen der Eileiter in 0,5 cm x 0,5 cm große Stücke wurden diese in Collagenase-Isolationsmedium überführt und für 5 x 5 min auf einem Heizrührer bei 37 °C inkubiert. Nach jedem Schritt wurde das Medium gewechselt, gesammelt, bei 700 x g und 37 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 2 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch (Abschnitt 4.7.1) untersucht bzw. auf Zellkulturflaschen oder 6-Well Zellkulturplatten ausgesät und für 24 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und den gewünschten Sauerstoffkonzentrationen inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel mit Infektionsmedium.

#### **4.3.2 Isolation primärer epithelialer Eileiterzellen mit Pronase/ DNase**

Humane Eileiter wurden, wie in Abschnitt 4.2 beschrieben präpariert. Nach dem Teilen der Eileiter in 0,5 cm x 0,5 cm große Stücke inkubierten diese 36-48 h in 15 ml Isolationsmedium bei 4 °C auf einem Schüttler. Nach erfolgter Inkubation wurde das Isolationsmedium auf 50 ml aufgefüllt, mit 5 ml FKS versehen und umgeschwenkt. Nach dem Absinken der Gewebestücke wurde das Medium auf zwei 50 ml Falcon Röhrchen aufgeteilt und für 10 min bei 700 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium dekantiert und das Zellpellet mit 50 ml USG-Zellkulturmedium gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 25-50 ml Medium aufgenommen und auf sterile Zellkulturschalen (d = 10 cm) bzw. Zellkulturflaschen verteilt. Während einer dreistündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> adhärten die, in der Suspension enthaltenen, Fibroblasten an die Petrischale wohingegen die Mehrzahl der epithelialen Eileiterzellen im Medium verblieb. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, ein Teil der Zellen in 4 % Paraformaldehyd für die intrazelluläre FACS-Analyse fixiert (Abschnitt 4.7.2), während der verbleibende Teil der Zellen mit USG-Zellkulturmedium aufgefüllt und zu je 25 ml in Collagen beschichtete 175 mm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen aufgeteilt wurde. Diese inkubierten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 h bevor das Medium gegen 25 ml frisches USG-Zellkulturmedium ausgetauscht wurde.

#### **4.4 Zellkultur primärer epithelialer Eileiterzellen**

Das Zellkulturmedium wurde alle 48 h gegen frisches Medium ausgetauscht. Durch die verringerte Proliferationsrate von primären epithelialen Eileiterzellen gegenüber Karzinomzelllinien wurden die Primärkulturen nur alle 7 Tage geteilt. Hierfür wurde das Medium verworfen, die Zellen mit 2 ml Trypsin/ EDTA (1x) gewaschen und mit 4 ml Trypsin/ EDTA (1x) für 5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:2-1:4 auf neue Collagen beschichtete Zellkulturflaschen aufgeteilt und bei 37 °C bis zur weiteren Verwendung inkubiert.

#### **4.5 Beschichtung von Zellkulturflaschen mit Collagen**

Um optimale Bedingungen für die Adhärenz primärer epithelialer Eileiterzellen zu schaffen, wurden alle verwendeten Zellkulturmaterialien für die Primärzellkultur mit Collagen Typ IV beschichtet. Das lyophilisierte Collagen Typ IV wurde in 0,5 mM steriler Essigsäure in einer Konzentration von 1 mg/ ml gelöst (Stammlösung). Für die Beschichtung von Zellkulturmaterialien wurde das Collagen bis zu einer Konzentration von 0,06 mg/ ml in PBS verdünnt und auf Zellkulturflaschen/ Zellkulturplatten verteilt. Nach einer Inkubationsphase von drei Stunden bei RT wurde der Überstand verworfen, die Zellkulturflaschen/ Zellkulturplatten dreimal mit PBS gewaschen und bis zur Nutzung mit PBS überschichtet bei 4 °C gelagert.

#### **4.6 Apoptoseinduktion mit Staurosporin**

Zur Induktion von Apoptose wurde Staurosporin verwendet. Für die Stammlösung wurde Staurosporin in DMSO mit einer Konzentration von 1 mM gelöst. Am Vortag der Apoptoseinduktion wurden HeLa-229 Zellen bzw. primäre epitheliale Eileiterzellen gleichermaßen wie für Infektionsversuche ausgesät und inkubiert (Abschnitt 4.8.2, Abschnitt 4.8.4). Anstelle der Infektion wurde am folgenden Tag Staurosporin hinzugegeben. Um die gewünschten Endkonzentrationen Staurosporin im Medium zu erreichen (1 µM bis 15 µM), wurde die entsprechende Menge Staurosporin-Stammlösung in ein Eppendorf Gefäß pipettiert und mit 1 ml Medium aus dem Well, in welchem die Apoptose induziert werden sollte, sorgfältig gemischt. Anschließend wurde das Medium zurück pipettiert und wiederum sorgfältig gemischt. Nach 4 bzw. 8 h wurden die Zellen mit 2 ml Methanol fixiert.

## **4.7 FACS-Analyse primärer epithelialer Eileiterzellen**

### **4.7.1 Extrazelluläre FACS-Färbung von Oberflächenmarkern**

Für die Bestimmung der zellulären Zusammensetzung von Collagenase isolierten primären Epithelzellen (Abschnitt 4.3.1) werden diese mittels Durchflusszytometrie auf ihre Oberflächenmarker untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Panel an direkt markierten Primärantikörper für die Detektion von Oberflächenmarkern zusammengestellt, dass eine möglichst genaue Diskrimination in Epithel-, Fibroblasten- und mesenchymale Stromazellen ermöglichte (Abschnitt 3.9.3). Für die Färbung wurden die frisch isolierten Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in FACS-Puffer aufgenommen. 100  $\mu$ l der Zellsuspension wurden mit jeweils 10  $\mu$ l der entsprechenden Antikörper versetzt und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zell-Antikörpersuspension durch einen Zentrifugationsschritt (700 x g, 10 min, RT) und anschließendem Dekantieren des Überstandes von überschüssigen Antikörpern befreit. Das resultierende Pellet wurde in 500  $\mu$ l FACS-Puffer gelöst und in einem Durchflusszytometer vom Typ EPICS XL MCL oder Cytomics FC 500 analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Cytomics CXP Software.

### **4.7.2 Intrazelluläre FACS-Färbung**

Für eine präzisere Charakterisierung der Zellzusammensetzung wurde für die Pronase/ DNase isolierten Primärzellen eine intrazelluläre FACS-Färbung durchgeführt. Für die FACS-Färbung wurde das bestehende Antikörperpanel aus Abschnitt 3.9.3 verwendet. Für die Färbung wurden die frisch isolierten bzw. trypsinisierten Kulturzellen mit 4 % Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in SAP-Puffer aufgenommen, je 100  $\mu$ l der Zellsuspension mit jeweils 10  $\mu$ l der entsprechenden Antikörper versetzt und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Überschüssige ungebundene Antikörper wurden durch einen Zentrifugationsschritt (700 x g, 10 min, RT) und anschließendem Verwerfen des Überstandes entfernt. Dann wurde das resultierende Zellpellet in 500  $\mu$ l SAP-Puffer aufgenommen und in einem Durchflusszytometer vom Typ EPICS XL MCL analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Cytomics CXP Software.

## 4.8 Infektionsbiologische Methoden

### 4.8.1 Herstellung eines *C. trachomatis* Serovar D Infektionsstocks

Zur Herstellung eines neuen Infektionsstocks können sowohl Chlamydien aus Patientenmaterial oder bereits auf gereinigte und eingefrorene Chlamydien Aliquotes aus bereits vorhandenen Infektionsstocks verwendet werden. Begonnen wurde in beiden Fällen mit der Infektion von 10 mit HEp-2 Zellen konfluent bewachsenen 6-Well-Zellkulturplatten mit 4 Ifu/ Zelle *C. trachomatis* in SPG Puffer. Die Platten wurden eine Stunde bei 30 °C und 700 x g zentrifugiert und anschließend für 72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bebrütet. Direkt nach der Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst und zu je 25 ml in ein 50 ml Gefäß mit 5 ml sterilen Glaskügelchen überführt. Durch mechanische Lyse auf einem Rüttler wurden alle Zellen zerstört und die Chlamydien in das Medium freigesetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 200 x g, 4 °C) wurde der Überstand mit den Chlamydien entnommen, zu je 40 ml auf 50 ml Gefäße aufgeteilt und für 99 min bei 15.500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml SPG Puffer homogenisiert, zu je 20 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Die biologische Aktivität wurde in einem Infektionsversuch mit HEp-2 Zellen überprüft und die Anzahl an Ifu/ ml bestimmt.

### 4.8.2 Infektion von Karzinomzelllinien

Die Dauerkulturzellen (HEp-2, HeLa-229) wurden am Vortag der Infektion mit einer Zellzahl von  $2,5 \times 10^5$  je 6-Well in Infektionsmedium mit und ohne 5 U/ ml IFN- $\gamma$  ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator bebrütet. Am Folgetag wurden die Zellen infiziert. Hierzu wurde ein 20 µl *C. trachomatis* Serovar D Aliquot aus dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und im Verhältnis 1:50 mit Infektionsmedium versehen, gut gemischt und 9,4 Ifu/ Zelle in den Zellüberstand gegeben. Nach einer einstündigen Zentrifugation bei 700 x g und 30 °C folgte eine 48 h Bebrütung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im normoxischen oder hypoxischen Inkubator.

### 4.8.3 Infektion von humanem Eileitergewebe

Die präparierten Eileiterstücke wurden mit 5 ml Infektionsmedium in 6-Well Platten überführt. Anschließend wurde ein 20 µl *C. trachomatis* Serovar D Aliquot aus dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und im Verhältnis 1:50 mit Infektionsmedium versehen, gut gemischt und  $5,5 \times 10^5$  Ifu zum Gewebe gegeben. Anschließend inkubierte es über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> sowie der gewünschten Sauerstoffkonzentration im Brutschrank. Nach 24/ 48 h wurde das Medium gewechselt bzw. Proben entsprechend dem Versuchsplan entnommen. Für REM/ TEM/ Semi-Dünnschnitte wurden nach Ablauf der Inkubationszeiten (24 h, 48 h) die Eileiter in Monti's Fixans (nach Monti-Graziadei<sup>155</sup>) überführt und für drei Tage bei 4 °C fixiert, bevor sie für die Elektronenmikroskopie vorbereitet wurden.

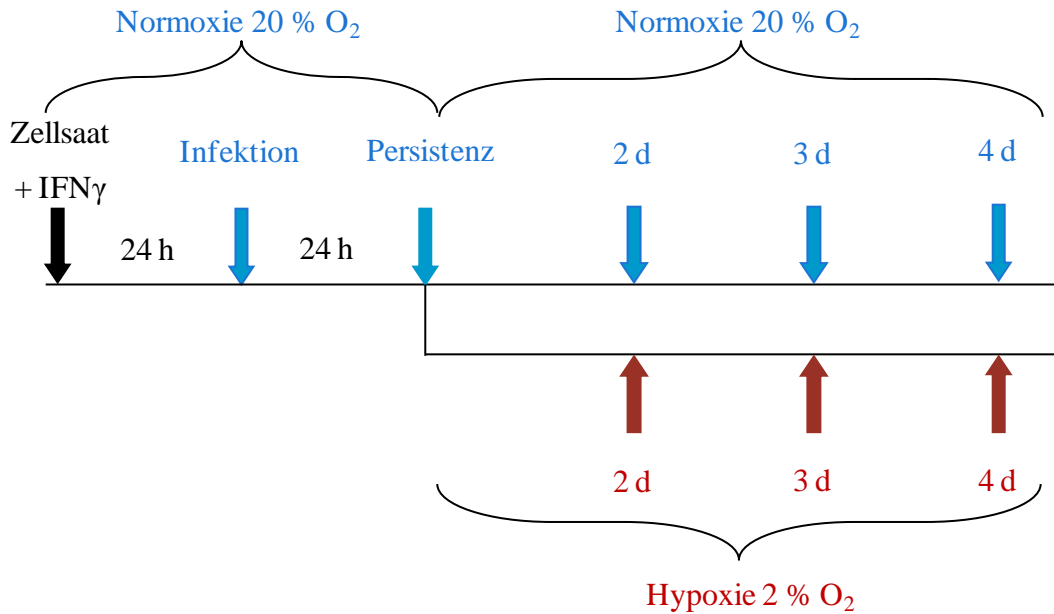
### 4.8.4 Infektion von humanen primären epithelialen Eileiterzellen

Die isolierten epithelialen Eileiterzellen (Abschnitt 4.3.2) wurden direkt nach der Isolation verwendet oder mit Trypsin/ EDTA (1x) von der Zellkulturflasche trypsinisiert. Danach in einer Neubauer Zählkammer gezählt, in einer Zelldichte von  $1,75 \times 10^5$  Zellen pro 6-Well in 50:50 Primärzellmedium ausgesät, 24 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und den entsprechenden Sauerstoffkonzentrationen bebrütet. Nach 24 h wurden die Zellen gewaschen, das Medium verworfen und gegen Infektionsmedium ausgetauscht. Entsprechend der Versuchsplanung erfolgt zu diesem Zeitpunkt die Zugabe von IFN-γ zum Medium. Die eigentliche Infektion erfolgt nach 24 h. Hierzu wurde ein 20 µl *C. trachomatis* Serovar D Aliquot aus dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und im Verhältnis 1:50 mit Infektionsmedium versehen, gut gemischt und 9,4 Ifu/ Zelle in das Well pipettiert. Anschließend folgte eine Stunde Zentrifugation bei 700 x g und 30 °C, gefolgt von einer 48 h Bebrütung im normoxischen oder hypoxischen Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **4.8.5 Verlauf der *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ unter Normoxie und Hypoxie**

HeLa-229 Zellen einer konfluent bewachsenen 175 mm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurden mit 2 ml Trypsin/ EDTA (1x) gewaschen und mit 4 ml Trypsin/ EDTA (1x) für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1:4 geteilt, in 25 ml Dauerkulturmedium aufgenommen und für 24 h bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen erneut trypsiniert und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Vor der Aussaat der Zellen wurden die Wells der 6-Well-Platten mit Deckgläsern versehen. Anschließend wurden pro Well 2,5x10<sup>5</sup> Zellen in 5 ml Infektionsmedium mit und ohne 5 U/ ml IFN- $\gamma$  pipettiert. Entsprechend dem experimentellen Ansatz (Abbildung 2) inkubierten die Zellen 24 h bei 37 °C in einem normoxischen Inkubator. Anschließend wurden die Zellen mit *C. trachomatis* Serovar D infiziert (Abschnitt 4.8.2) und für 24 h unter normoxischen Bedingungen bebrütet. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Hälfte der Zellkulturplatten aus dem normoxischen Brutschrank in die Hypoxie-Kammer überführt. Alle 48 h nach Infektion erfolgte ein Mediumwechsel. Bei diesem wurde das verbrauchte Medium gegen frisches Infektionsmedium mit 5 U/ ml IFN- $\gamma$  ausgetauscht. Der Mediumwechsel der hypoxischen Platten erfolgte unter Hypoxie mit Infektionsmedium, welches vorher bereits mindestens 24 h unter hypoxischen Bedingungen entgast wurde. Die Zugabe von IFN- $\gamma$  erfolgte direkt vor dem Mediumwechsel in das entgaste Medium. Die Proben für Western Blot, RNA-Isolation, direkten Immunfluoreszenztest sowie für die Bestimmung infektiöser Chlamydien wurden 48 h, 72 h und 96 h nach Bedingungswechsel sowohl aus den verbleibenden normoxischen Zellkulturplatten als auch aus den hypoxischen entnommen. Hierbei war zu beachten, dass die Western Blot Proben und RNA-Proben der hypoxischen Versuchsteile unter Hypoxie entnommen wurden.

Die Deckgläser für den direkten Immunfluoreszenztest (Abschnitt 4.9.1) wurden bei -20 °C in Methanol gelagert. Zur Entnahme von RNA-Proben bzw. Western Blot Proben wurde das Medium verworfen und die Zellen in 350  $\mu$ l RA1-Puffer mit 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercapthoethanol bzw. in 350  $\mu$ l Western Blot Lysis Puffer lysiert. Nach der Lyse wurden die Proben bei -80 °C (RNA) bzw. -20 °C (Western Blot) eingefroren.



**Abbildung 2** Schematischer Aufbau zum experimentellen Ablauf einer *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  in Normoxie und Hypoxie.

#### 4.8.6 Bestimmung infektiöser *C. trachomatis*

Um den Einfluss verschiedener Bedingungen auf die Chlamydien Entwicklung zu vergleichen, wurden die Chlamydien nach erfolgtem Versuch unter optimalen Bedingungen kultiviert und die Anzahl sowie die Größe von Einschlüssen mittels Immunfluoreszenz ausgewertet. Dazu wurden die Zellkulturen sorgfältig abgeschabt und in Medium resuspendiert, bevor 2 ml in ein Röhrchen mit 1 ml Glaskügelchen pipettiert wurden. Um die Zellen möglichst vollständig zu lysieren und die Chlamydien zu isolieren, wurde das Röhrchen für 5 min auf einem mechanischen Rüttler bei 1300 rpm geschüttelt. Direkt im Anschluss wurden 250  $\mu$ l der Chlamydien-Suspension in ein Well einer vorbereiteten konfluent mit HEp-2 Zellen bewachsenen 24-Well-Zellkulturplatte überführt (1 ml Dauerkulturmedium mit 10  $\mu$ l 0,1 mM Cycloheximide) und gut gemischt. Aus dem ersten Well wurden 250  $\mu$ l entnommen und in das folgende Well pipettiert und gemischt. Auf diese Weise wurde eine 1:5 Verdünnungsreihe mit mindestens sechs unterschiedlichen Konzentrationen erstellt. Anschließend wurde die Zellkulturplatte 1 h bei 700 x g und 30 °C zentrifugiert, für 48 h in einem Inkubator mit 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, das Medium verworfen und die Zellen mit je 1 ml Methanol fixiert. Die Zellkulturplatte wurde bis zur indirekten Immunfluoreszenzfärbung (Abschnitt 4.9.2)

bei -20 °C aufbewahrt. Für die Bestimmung von infektiösen Chlamydien aus Gewebeproben wurden diese ebenfalls mit 2 ml ihres Kulturmediums für 5 min homogenisiert, bevor eine Verdünnungsreihe nach obigem Beispiel durchgeführt wurde.

## **4.9 Mikroskopie**

### **4.9.1 Direkter Immunfluoreszenztest von Chlamydien**

Um die phänotypischen Eigenschaften von Chlamydieneinschlüssen unter verschiedenen Bedingungen zu analysieren, wurden mit infizierten Zellen bewachsene Deckgläser mit einem direkten Immunfluoreszenztest der Firma IMAGEN gegen Chlamydien-LPS gefärbt. Hierfür wurden die Deckgläser aus der Zellkulturplatte zum entsprechenden Zeitpunkt entnommen und bis zur Analyse bei -20 °C in Methanol fixiert. Vor der Analyse wurde das Methanol entfernt und die Deckgläser bei 56 °C für 5 min getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Deckgläser mit 8 µl der 1:1 mit PBS verdünnten Antikörperlösung von IMAGEN überschichtet und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen, in Mountain Fluid eingedeckt und mit der bewachsenen Oberfläche auf einem Objektträger fixiert. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop.

### **4.9.2 Indirekter Immunfluoreszenztest von *C. trachomatis***

Die zu färbenden Zellkulturplatten wurden aus dem Gefrierschrank entnommen und das Methanol von den Zellen entfernt. Nach zweimaligem Spülen der Platten mit PBS wurden die Wells mit je 300 µl der primären Antikörperlösung gegen Chlamydien-LPS überschichtet. Nach einer 45 minütigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Antikörperlösung abgesaugt, die Wells zwei Mal mit PBS gewaschen und 300 µl der sekundären Antikörperlösung zugefügt. Nach einem weiteren Inkubationsschritt wurden die Wells erneut zweimal gewaschen, mit 300 µl PBS überschichtet und bis zur mikroskopischen Auswertung im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

#### 4.9.3 Quantifizierung infektiöser Chlamydien mittels Immunfluoreszenztests

Aufgrund der Fluorophor-markierten sekundären Antikörper konnten die Zellkulturplatten bei einer spezifischen Wellenlänge im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Hierzu wurde ein Well mit vereinzelt Einschlüssen gewählt und bei 20-facher Vergrößerung die Einschlüsse pro Gesichtsfeld ( $0,557 \text{ mm}^2$ ) gezählt. Da die eingesetzte Menge an Chlamydien-haltiger Suspension sowie die Fläche eines Wells einer 24-Wellplatte ( $200 \text{ mm}^2$ ) bekannt war, konnte die Anzahl an Ifu/  $\mu\text{l}$  nach folgender Formel berechnet werden.

$$\text{Ifu/ } \mu\text{l} = \frac{\text{gezaehlte Einschluesse} * 200 \text{ mm}^2}{\text{gezaehlte Gesichtsfelder} * \text{eingesetzte } \mu\text{l} * 0,557 \text{ mm}^2}$$

#### 4.9.4 Rasterelektronenmikroskopie

Für die Einbettung des Gewebes wurden die Stücke aus Monti's Fixans entnommen und mit dem Epithel nach oben auf Kork-Plättchen gepinnt. Diese wurden in einen Metallkäfig überführt und für 30 min mit Kakodylsäure-Natriumsalz Puffer (pH 7,35) gewaschen. Um das Wasser in dem Gewebe zu entfernen, wurde anschließend eine aufsteigende Acetonreihe durchgeführt (30 % Aceton für 6 h, 40 % für 6 h, 60 % für 8 h, 70 % über Nacht, 80 % für 2 h, 90 % für 2 h, 100 % über Nacht). Anschließend wurde der Korb in frisches Aceton überführt und einer Kritischer-Punkt-Trocknung unterzogen ( $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , 80 bar). Nach der Trocknung wurde das Gewebe vom Kork entfernt und mit Hilfe von leitendem Kohlenstoff Zement auf ein leitendes Kohlenstoff Plättchen geklebt. Abschließend wurde das Gewebe mit Palladium, Gold oder Platin gesputtert und in einem Rasterelektronenmikroskop analysiert.

#### 4.9.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Detektion von intrazellulären Chlamydieneinschlüssen im Eileiterepithel wurde die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) verwendet. Hierfür wurden die in Monti's Fixans aufbewahrten Eileiterstücke (Abschnitt 4.8.3) in  $2 \times 2$  bis  $4 \times 5$  mm große Stücke geschnitten. Diese Stücke in Kakodylsäure-Natriumsalz Puffer (pH 7,35) für eine Stunde gewaschen und über Nacht in 1 % wässriger Osmiumtetroxidlösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Osmiumtetroxid

verworfen und die Stücke 6 x 5 min in Kakodylsäure-Natriumsalz Puffer (pH 7,35) gewaschen. Um das Wasser in dem Gewebe zu entfernen, wurde anschließend eine aufsteigende Ethanol Reihe durchgeführt (30 % Ethanol für 6 h, 40 % für 6 h, 60 % für 8 h, 70 % über Nacht, 80 % für 2 h, 90 % für 2 h, 100 % über Nacht). Am nächsten Tag wurde das Ethanol verworfen und die Stücke 2 x 15 min in Propylenoxid gewaschen, bevor sie über Nacht in einer 50:50 Lösung aus Araldite und Propylen inkubierten. Am folgenden Morgen wurden die Stücke für eine Stunde in frischem Araldite inkubiert, in Form gegossen und bei 60 °C für 48 h gehärtet. Nach der Aushärtung des Araldite wurde der Block getrimmt und Semi-Dünnschnitte (700 nm) angefertigt. Diese wurden mit Richardson's Färbelösung für weitere Analysen gefärbt (Abschnitt 4.9.6). Weiterhin wurden von dem getrimmten Block Ultra-Dünnschnitte (70 nm) angefertigt und auf Kupfernetze überführt. Diese wurden in einem automatisierten Schritt mit wässriger 0,5 % Uranyl-Acetat Lösung und wässriger 3 % Bleicitratlösung gefärbt. Anschließend folgte die Auswertung der Schnitte im Transmissionselektronenmikroskop.

#### **4.9.6 Lichtmikroskopie von Semi-Dünnschnitten**

Die Semi-Dünnschnitte wurden auf einem Objektträger getrocknet und für 1-2 min bei 60 °C mit der Richardson's Färbelösung gefärbt. Anschließend wurden sie mit destilliertem Wasser gewaschen, getrocknet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop.

#### **4.9.7 DNA Färbung mit Hoechst Lösung**

Von den fixierten Zellen (Abschnitt 4.6) wurde das Methanol entfernt und die Zellen 5 min bei 55 °C getrocknet. Im Anschluss wurden sie mit 9 µl der Hoechst Lösung für 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie dreimal mit PBS gewaschen und mit 300 µl PBS überschichtet wurden. Die Auswertung von drei Gesichtsfeldern mit je 200 Zellen pro Versuch erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop. Als apoptotisch wurden Zellen mit DNA-Fragmentation bestimmt.

## 4.10 Proteinbiochemische Methoden

### 4.10.1 Probengewinnung für Western Blot

Von den zu analysierenden Proben wurde das Medium entfernt und verworfen. Sofort im Anschluss wurden die Zellen mit 250  $\mu$ l des WB-Lysispuffers bedeckt, mit einer Pipetten-Spitze homogenisiert, die entstandene Suspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20 °C eingefroren. Für die Analyse aus Gewebeproben wurde das Gewebe in Precellys Röhrchen mit 600  $\mu$ l WB-Lysispuffer überführt, 3 x 15 sec bei 6500 rpm homogenisiert und bei -20 °C gelagert.

### 4.10.2 SDS-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Laemmli verwendet<sup>156</sup>. Hierzu wurde ein 10 %iges Trenngel und ein 4 %iges Sammelgel in einer Größe von 8 x 7,3 cm gegossen (Tabelle 3). Die auspolymerisierten Gele wurden in eine vertikale Gelelektrophoresekammer eingespannt und diese mit Elektrophoresepuffer (1x) gefüllt. Währenddessen wurden die zu analysierenden Proben 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend gerüttelt. Nach dem Füllen der Kammer und dem Spülen der Sammelgeltaschen mit Elektrophoresepuffer (1x) wurden die Taschen mit 7,5  $\mu$ l Marker sowie 20-25  $\mu$ l denaturierter Probe gefüllt. Anschließend wurde die Elektrophorese gestartet. Es folgte die Migration der Proben in das Sammelgel bei 70 V für 15 min, gefolgt von der Auftrennung nach der Molekülmasse bei 200 V für 55 min im Trenngel.

**Tabelle 3** Pipettierschema für die verwendeten Gele

	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
H <sub>2</sub> O	2,45 ml	3,2 ml
Trenngelpuffer	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
Acrylamid/ Bisacrylamid	1,25 ml	0,5 ml
SDS 10 %	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	2,5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
APS 10 %	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l

#### **4.10.3 Western Blot Analyse**

Um spezifische Proteinbanden zu detektieren, wurde ein Nass-Blot Verfahren verwendet. Hierfür wurde eine Nitrozellulosemembran auf Größe des Gels geschnitten, in Blotpuffer eingelegt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde das Gel der Gelelektrophorese und die Nitrozellulosemembran in eine vertikale Western Blot-Kammer eingespannt und die Kammer mit Blotpuffer gefüllt. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 75 V über einen Zeitraum von 1,5 h. Hierbei war zu beachten, dass die Kammer während des gesamten Blotvorganges gekühlt wurde. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran entnommen und für eine Stunde in einer 5 % Trockenmilchlösung inkubiert, um die unspezifischen Bindestellen der Membran zu blockieren. Nachdem die Membran über Nacht mit dem Primärantikörper bei 4 °C inkubiert, folgte ein zweimaliges Waschen mit T-TBS für je 15 min bei RT und eine einstündige Inkubation mit dem HRP gekoppelten Sekundärantikörper bei RT auf dem Schüttler. Im Anschluss wurde wiederum zweimal für 15 min mit T-TBS gewaschen, bevor die Proteinbande mithilfe des Super Signal West Femto Substrats detektiert wurde. Die quantitative Auswertung der Banden erfolgte mit Hilfe der BIO-1D Software.

#### **4.10.4 Strippen von Western Blot Membranen**

Um bereits analysierte Membranen auf weitere Proteine zu untersuchen, wurden die Membranen mit dem Restore Plus Western Blot Stripping Buffer inkubiert. Vor dem eigentlichen Stripping Schritt wurde die Membran 2 x 5 min in T-TBS gewaschen und 10 min in 12 ml Stripping Buffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut 2 x 5 min mit T-TBS gewaschen und für 60 min in Blockpuffer inkubiert. Das weitere Vorgehen entspricht der Western Blot Analyse aus Abschnitt 4.10.3.

## 4.11 Molekularbiologische Methoden

### 4.11.1 RNA-Isolation

Zur Isolation der totalen RNA wurde das Nucleo Spin RNA II Kit der Firma Macherey Nagel GmbH nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die resultierende RNA wurde aliquotiert und ein Aliquot direkt im Anschluss an die Isolation (Abschnitt 4.11.1) in cDNA umgeschrieben, während das zweite bei -80 °C eingefroren wurde.

### 4.11.2 Reverse Transkription

RNA wurde mittels der Reversen Transkriptase der Firma Fermentas nach dem Pipettierschema in Tabelle 4 in einem Thermo Cycler mit dem Programm in Tabelle 5 in cDNA umgeschrieben.

**Tabelle 4** Pipettierschema für eine Reverse Transkription Reaktion

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
RNase freies Wasser	5,5 µl	
Reaktionspuffer (5x)	4,0 µl	1 x
dNTP	2,0 µl	1 mM
Random Hexamer Primer	2,0 µl	0,04 U/ µl
RNase-Inhibitor	0,5 µl	50 U
Reverse Transkriptase	1 µl	20 U
RNA	5 µl	

Verwendet wurde ein Thermo Light-Cycler mit folgenden Programmen:

**Tabelle 5** Programmfolge des Thermo Cyclers für die Reverse Transkription

	Temperatur	Dauer
Hybridisierung	25 °C	10 min
Reverse Trankription	50 °C	30 min
Inaktivierung des Enzyms	85 °C	5 min
Kühlung	4 °C	∞

#### 4.11.3 Quantitative RT-PCR

Zur quantitativen Auswertung der Geninduktion wurde die quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR) verwendet. Hierzu wurden Glaskapillaren der Firma Roche und das SYBR Green Kit SensiMix der Firma Bioline verwendet (siehe Pipettierschema und Light Cyler Programm in Tabelle 6 und Tabelle 7). Die spezifischen Primersequenzen befinden sich im Abschnitt 3.8.2.

**Tabelle 6** Pipettierschema für die qRT-PCR

Reagenz	Volumen
SensiMix Capillary Mix	4 µl
Enzyme Mix	1,5 µl
50x SYBR Green Solution	0,4 µl
Forward Primer (20 µM)	0,2 µl
Reverse Primer (20 µM)	0,2 µl
RNase freies Wasser	11,7 µl
cDNA	2 µl

Die Reaktion erfolgte in einem LightCycler 1.0 mit dem folgenden Programm:

**Tabelle 7** Programmablauf der qRT-PCR im Light Cyler

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	10 sec	45
Primerhybridisierung	60 °C	5 sec	45
Elongation	72 °C	10 sec	45

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der LightCycler Data Analyzer Software. Die Daten wurden entsprechend des Referenzgens 18S rRNA normalisiert. Die quantitative Auswertung erfolgte als „fold change“ (x-fache Änderung). Hierbei wird die Änderung der Genexpression nach entsprechender Stimulation gegenüber der unstimulierten Kontrolle dargestellt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{fold change} = 2^{-(x-y)}$$

Wobei x der stimulierte Probe normalisiert gegen 18S rRNA und y der unstimulierten Probe normalisiert gegen 18S rRNA entsprechen.

#### **4.12 Statistik**

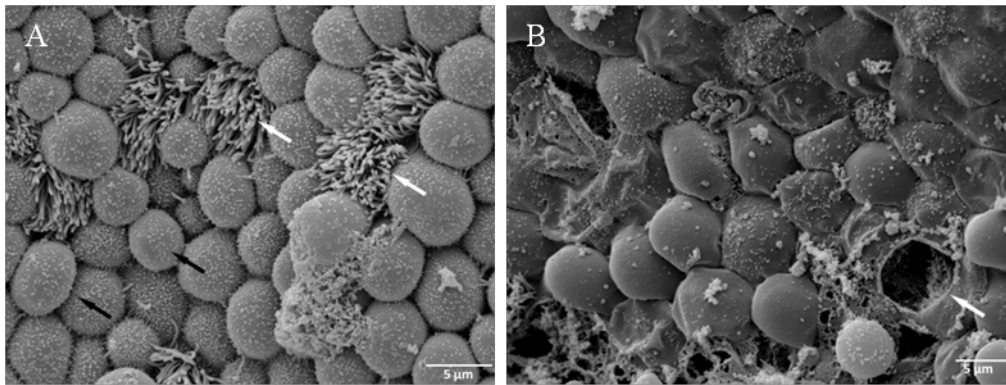
Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel, die Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Für die Statistische Auswertung wurde ein Student's t-test (einseitig, ungepaart) verwendet. P-Werte von  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Humanes Eileiterepithelmodell

#### 5.1.1 Detektion von Veränderungen nach einer Chlamydieninfektion

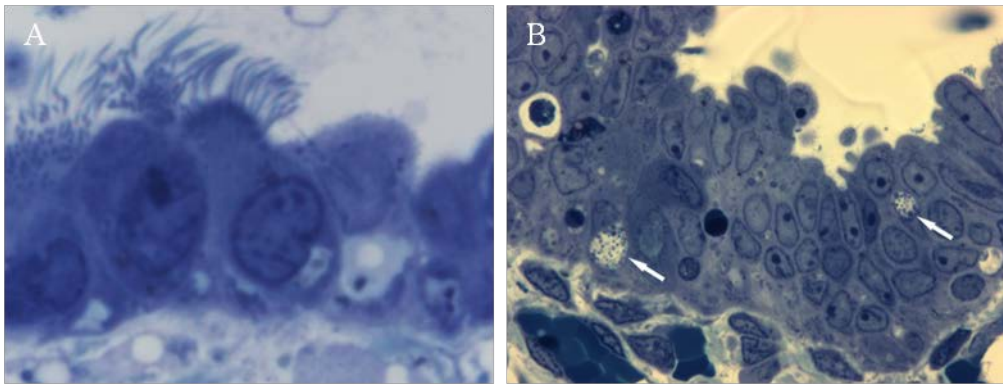
Ein Zielbereich dieser Arbeit war die Untersuchung zur Verwendungsmöglichkeit von humanen Eileitern als *ex vivo* Infektionsmodell für Chlamydieninfektionen. Um den Einfluss von primären Infektionen auf das Eileiterepithel zu untersuchen, wurde die REM genutzt. Ziel war es, das Eileiterepithel nach erfolgter Infektion zu visualisieren und auf, durch Chlamydien verursachte, Schädigungen zu untersuchen. Wie in Absatz 2.2 beschrieben, wurden humane Eileiter präpariert und infiziert. Nach 24 h wurden sie fixiert und für die REM aufbereitet. Als Vergleich dienten nicht infizierte Eileiterstücke derselben Spenderin, welche 24 h in Medium ohne Chlamydien inkubierten. Abbildung 3 A zeigt das Epithel eines nicht infizierten Eileiters. Deutlich erkennbar sind die zilientragenden Zellen (weiße Pfeile) sowie die regelmäßig gerundeten Epithelzellen (schwarze Pfeile). Vergleicht man dieses Epithel mit einem infizierten (Abbildung 3 B) fällt die deutlich veränderte Morphologie der Zellen auf. Es ist eine große Anzahl an geschädigten Zellen sichtbar. Da es sich um einen morphologischen Phänotyp handelt, der nur bei infizierten Eileitern auftritt, kann ein Artefakt durch die Präparation ausgeschlossen werden. Weiterhin sind vereinzelte lysierte Zellen mit einer markant nach außen gestülpten Zellmembran auffällig. Es handelt sich hierbei um infizierte Zellen, die beim Austritt der Chlamydien aus der Zelle lysiert wurden. Eine weitere Besonderheit ist das Fehlen von zilientragenden Zellen. Dies kann einerseits am Gewebe liegen, da zilientragende Zellen nicht homogen über das gesamte Epithel verteilt sind oder aber an einem infektionsbedingten Verlust.



**Abbildung 3** REM von humanem Eileitergewebe mit und ohne *C. trachomatis* Infektion nach 24 h. Nicht infizierter Eileiter (A) mit zilierttragenden Epithelzellen (weiße Pfeile) und nicht zilierttragende Epithelzellen (schwarze Pfeile). Infizierter Eileiter (B) mit lysierten Epithelzellen (weißer Pfeil).

### 5.1.2 Detektion von Chlamydieneinschlüssen mit Hilfe von Semi-Dünnschnitten

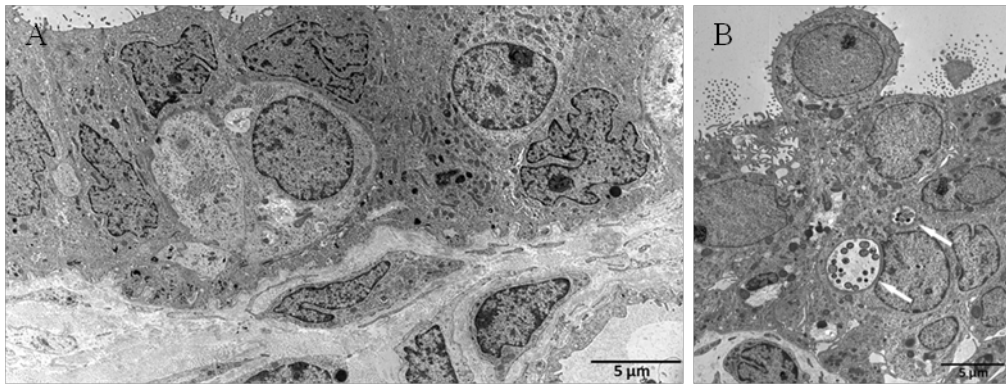
Nach Kenntnis der infektionsbedingten Schädigungen des Eileiterepithels wurden Versuche unternommen, intrazelluläre Chlamydieneinschlüsse zu visualisieren. Hierzu wurden Semi-Dünnschnitte von infizierten und nicht infizierten Eileitern angefertigt und gefärbt. Vorteil dieser Methode ist die relativ einfache Auswertung im Lichtmikroskop. Bereits bei 100-facher Vergrößerung lässt sich erkennen, ob Chlamydieneinschlüsse im Epithel vorhanden sind. In Abbildung 4 A ist ein Semi-Dünnschnitt eines nicht infizierten Eileiters gezeigt. Deutlich erkennbar ist hier das Epithel mit den zilierttragenden Zellen. Die Schichtung von mehreren übereinander liegenden Epithelzellen ergibt sich aus dem Winkel indem der Probenblock angeschnitten wurde. Direkt unter der Epithelschicht erkennt man die *Lamina propria* und den Beginn der Muskelzellen. Vergleicht man mit Semi-Dünnschnitten eines infizierten Eileiters (Abbildung 4 B), so fallen im Epithel vereinzelt intrazelluläre runde Einschlüsse auf (weiße Pfeile). Diese Einschlüsse sind gefüllt mit runden Einschlusskörpern verschiedener Größe, die morphologisch EK und RK entsprechen.



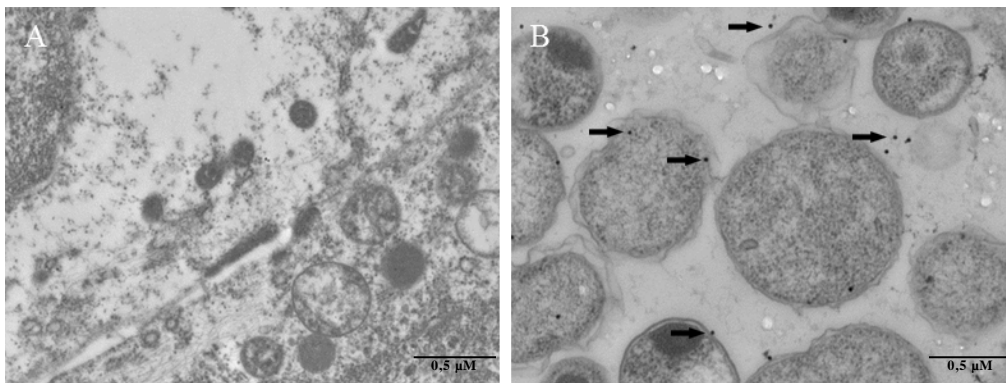
**Abbildung 4** Lichtmikroskopie von Semi-Dünnschnitten aus humanem Eileiterepithel mit und ohne *C. trachomatis* Infektion nach 24 h. Nicht infiziertes Eileiterepithel (A); infiziertes Eileiterepithel (B) mit charakteristischen intrazellulären *C. trachomatis* Einschlüssen (weiße Pfeile).

### 5.1.3 Detektion von Chlamydieneinschlüssen mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur besseren Darstellung und morphologischen Analyse der Einschlüsse wurden TEM-Bilder angefertigt. Diese ermöglichen eine Verbesserung der Auflösung im Vergleich zu Semi-Dünnschnitten. In Abbildung 5 A ist ein nicht infizierter Eileiter dargestellt. In dieser ist sehr gut die Epithelschicht mit zilierten Zellen oberhalb der *Lamina propria* zu sehen. Vergleicht man mit einem infizierten Eileiter (Abbildung 5 B) sieht man ebenfalls ein gut erhaltenes Epithel, welches aufgrund des Block-Anschnittes aus mehreren Zellschichten zu bestehen scheint. Auffällig sind die beiden Chlamydieneinschlüsse, welche der Morphologie der Einschlüsse aus den Semi-Dünnschnitten entsprechen. In dieser Abbildung ist ein Größenunterschied zwischen den einzelnen Einschlüssen deutlich erkennbar. Gründe hierfür können verschiedene Entwicklungsstadien der Einschlüsse oder aber der Ansnitt des Gewebes sein. Um sicher zu stellen, dass es sich bei den Einschlüssen um Chlamydien handelt, wurden die Ultra-Dünnschnitte mit Antikörpern gegen Chlamydien LPS behandelt. In Abbildung 6 B ist eine Akkumulation von markierten Antikörpern innerhalb eines Einschlusses erkennbar, während umliegende Zellorganellen ebenso wie die Organellen der nicht infizierten Kontrolle (Abbildung 6 A) nicht markiert werden. Deutlich sichtbar sind runde Einschlusskörper verschiedener Größe, die morphologisch Elementarkörpern und Retikularkörpern entsprechen.



**Abbildung 5** TEM von humanem Eileiterepithel mit und ohne *C. trachomatis* Infektion nach 24 h. Nicht infiziertes Eileiterepithel (A); infiziertes Eileiterepithel (B) mit charakteristischen intrazellulären *C. trachomatis* Einschlüssen (weiße Pfeile).

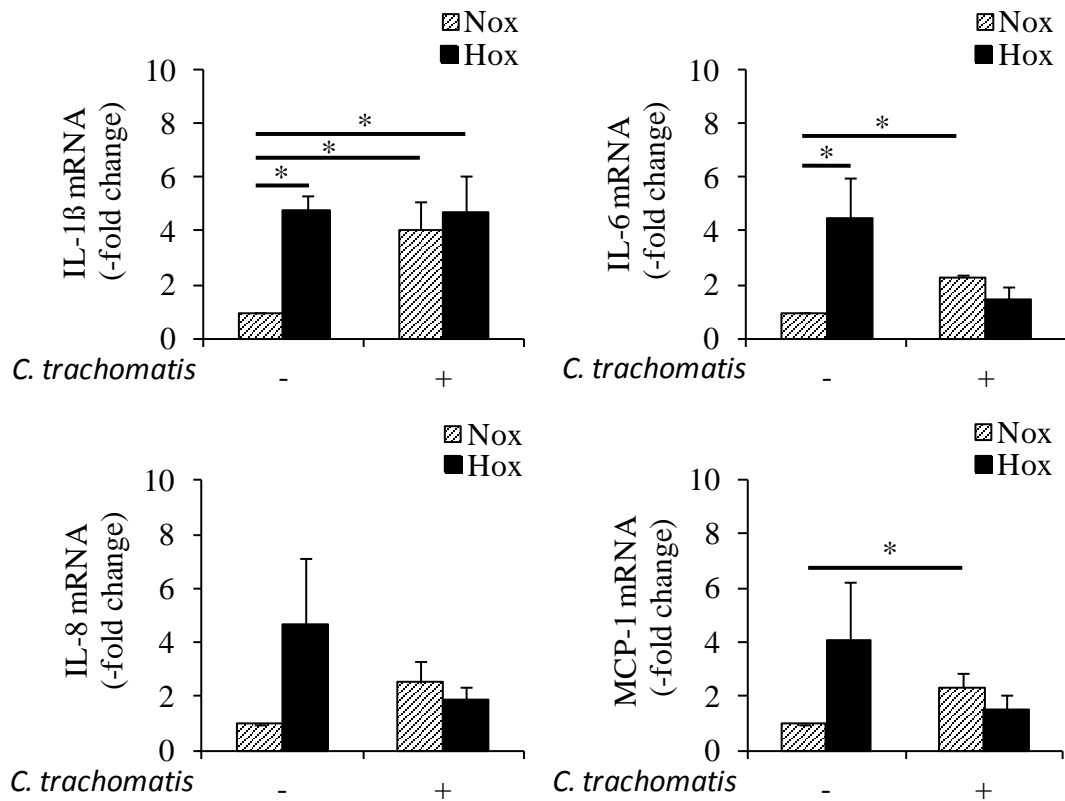


**Abbildung 6** TEM von humanem Eileiterepithelzellen mit und ohne *C. trachomatis* Infektion nach 24 h, inkubiert mit Gold-markierten Antikörpern gegen Chlamydien-LPS (schwarze Pfeile). Nicht infizierte Eileiterepithelzelle (A); infizierte Eileiterepithelzelle (B).

#### 5.1.4 Analyse von pro-inflammatorischen Zytokinen nach einer *C. trachomatis* Infektion

Um die primäre Immunantwort des Gewebes nach der Chlamydieninfektion zu charakterisieren, wurde von Gewebestücken RNA isoliert und diese auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine (mRNA) untersucht. Die Analyse der Genexpression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und MCP-1 erfolgte aus drei Eileitern von verschiedenen Spenderinnen. Aus der Abbildung 7 geht hervor, dass der nicht infizierte Eileiter unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie bereits eine vermehrte mRNA Expression pro-inflammatorischer aufweist. Nach der Infektion sah man bei den normoxischen Eileitern einen Anstieg aller Zytokine gegenüber der nicht infizierten Kontrolle, während es sich bei den hypoxischen Eileitern gegenläufig

verhielt. So zeigte sich bei den infizierten Proben, bis auf IL-1 $\beta$ , ein Trend zur verringerten mRNA Expression im Vergleich mit der Kontrolle.



**Abbildung 7** mRNA Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und MCP-1 in humanen Eileiter 24 h nach Infektion mit *C. trachomatis* unter normoxischen (Nox) und hypoxischen (Hox) Bedingungen (n=3, \*= p $\leq$  0,05).

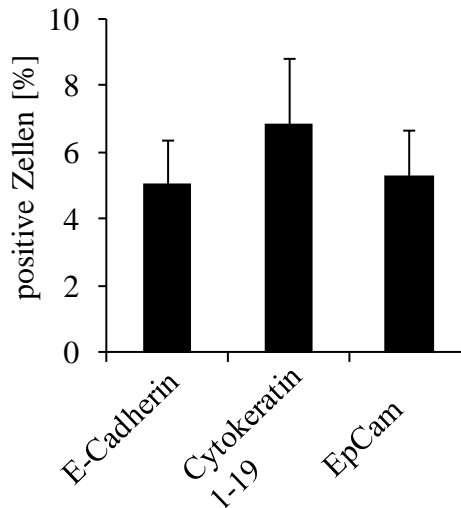
## **5.2 Humanes epitheliales Eileiterzellmodell**

### **5.2.1 Isolation primärer epithelialer Zellen aus humanen Eileitern**

Da die Untersuchung von Signalwegen in humanen epithelialen Eileiterzellen einfacher und über einen längeren Zeitraum gewährleistet werden kann als in Gewebe, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, eine möglichst stabile primäre epitheliale Eileiterzellkultur zu etablieren. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden humane Eileiter zwei verschiedenen Protokollen zur Zellisolation unterzogen und die resultierenden Primärzellen mittels FACS-Messungen auf Zusammensetzung und Zellfunktion untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse der unterschiedlichen Isolationsprotokolle dargestellt.

#### **5.2.1.1 Isolation von primären epithelialen Eileiterzellen mit Collagenase**

Zur Charakterisierung der Zellzusammensetzung wurden nach der Isolation primärer Eileiterzellen mit Collagenase, FACS-Untersuchungen von Oberflächenmarkern durchgeführt. Das hierfür verwendete Panel an Antikörpern wurde so gewählt, dass eine möglichst gute Unterscheidung zwischen Epithelzelle und Fibroblasten möglich war. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der FACS-Analyse der verwendeten Epithelzell spezifischen Antikörper (E-Cadherin, Cytokeratin 1-19, EpCam) direkt nach der Isolation dargestellt. Nach fünf Experimenten zur Primärzellisolation mit Collagenase konnte durchschnittlich eine Population von 5 % Epithelzellen isoliert werden. Da die Isolate zur Verwendung in einem Epithelzell-Infektionsmodell mindestens 50 % Epithelzell-Marker positive Zellen enthalten sollten, wurde die mit dieser Methode erzielte Ausbeute an Epithelzellen als zu gering eingeschätzt und die Methode als ungeeignet eingestuft.



**Abbildung 8** FACS-Analyse zum Vorkommen der Epithelzellmarker E-Cadherin, Cytokeratin 1-19 und EpCam in primären Eileiterzellisolaten nach Isolation mit Collagenase (n=5).

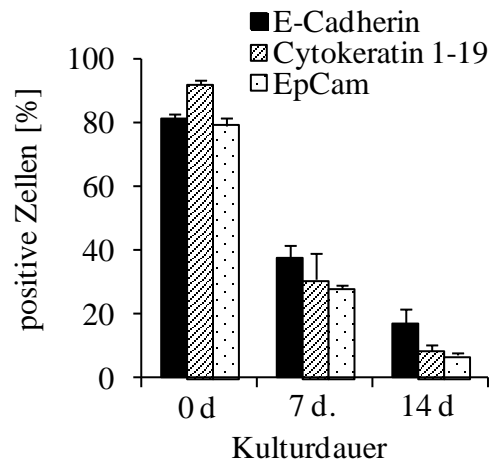
#### 5.2.1.2 Isolation von primären epithelialen Eileiterzellen mit Pronase/ DNase

Das zweite Protokoll zur Isolierung primärer epithelialer Eileiterzellen basiert auf einem Artikel von Levanon *et al.*<sup>157, 158</sup>. Die verwendete Methode wurde als schonender und effizienter für die Ausbeute an primären Epithelzellen beschrieben. Sie basiert auf der Verwendung von Pronase und DNase. Die isolierten Zellen wurden anhand ihrer Zellmarker mittels intrazellulärer Färbung und FACS-Messung charakterisiert. In Abbildung 9 ist gezeigt, dass nach Isolation mit dieser Methode ca. 80 % der Zellen positiv für die primären Epithelzell-Marker (E-Cadherin, Cytokeratin 1-19, EpCam) waren. Aufgrund dieser Ausbeute wurde beschlossen, diese Isolationsmethode als Basis für die Etablierung eines Infektionsmodells für Chlamydien zu nutzen.

#### 5.2.1.3 FACS-Analyse der Zell-Differenzierung im zeitlichen Verlauf

Da nicht bekannt war, ob sich die zelluläre Zusammensetzung der primären Zellisolate über eine Kulturdauer von drei Wochen verändert, wurde jede Woche eine Probe der Zellen entnommen und diese auf ihre Zellzusammensetzung untersucht. Hierfür wurde dasselbe Panel an Antikörpern wie für die FACS-Analyse der frisch isolierten Zellen verwendet. In Abbildung 9 ist das Ergebnis der FACS-Untersuchungen dargestellt. Nach einer Woche in Kultur waren etwa 30 % der

Zellen positiv für die verwendeten Epithelzell-Marker (E-Cadherin, Cytokeratin 1-19, EpCam). Eine Woche später waren noch etwa 8 % der Zellen positiv für die verwendeten Epithelzell-Marker. Eine genauere Untersuchung ergab, dass sich die Zellen in mesenchymale Stromazellen re-differenzieren. Diese Zellen sind aufgrund ihres Phänotyps für die Untersuchung von Infektionen primärer Epithelzellen ungeeignet.



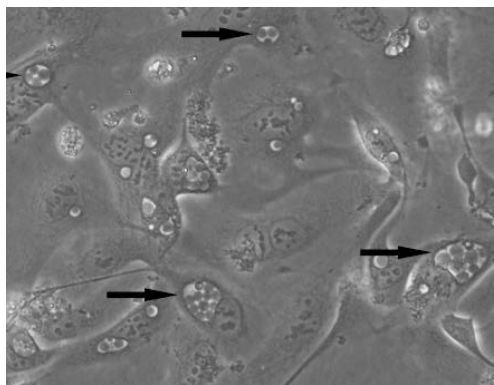
**Abbildung 9** FACS-Analyse zum Vorkommen der Epithelzell-Marker E-Cadherin, Cytokeratin 1-19 und EpCam in primären epithelialen Eileiterzellisolaten in Abhängigkeit der Kulturdauer nach Isolation mit Pronase und DNase (n=3).

### 5.2.2 Charakterisierung der primären epithelialen Eileiterzellen

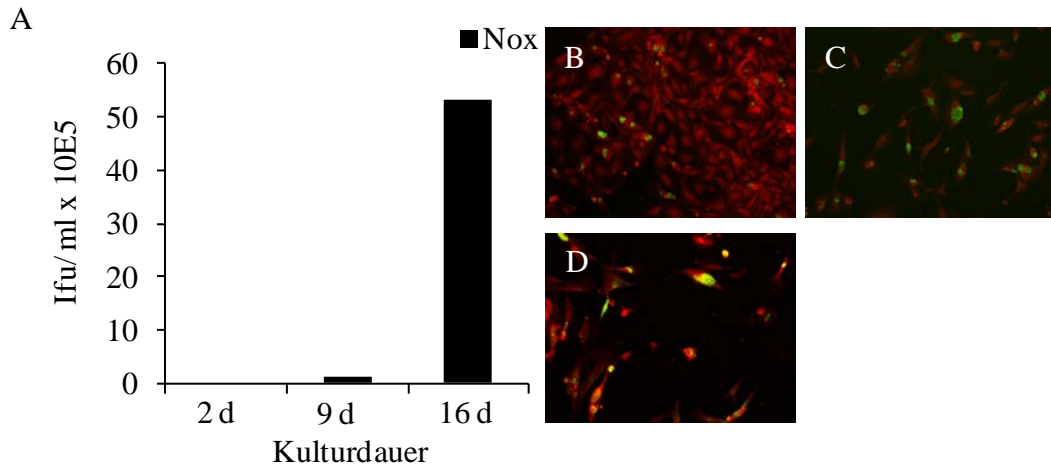
Um die isolierten Primärzellen mit HeLa-229 Zellen vergleichen zu können, wurde in beiden Modellen Versuche zur Infektion mit *C. trachomatis*, zur HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung, zur Induktion und Phosphorylierung von Stat-1 durch IFN- $\gamma$  sowie zur Apoptoseinduktion mittels Staurosporin durchgeführt. Auf der Basis der Ergebnisse sollten erste Aussagen über die Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus beiden Modellen ermöglicht werden. Die Versuche wurden gewählt, da sie zelluläre Eigenschaften untersuchen, die bei *C. trachomatis* Infektionen, unter Hypoxie und IFN- $\gamma$  Stimulation, eine zentrale Rolle spielen.

### 5.2.2.1 Infektion mit *C. trachomatis*

Die primären epithelialen Eileiterzellen wurden unter normoxischen wie auch hypoxischen Bedingungen mit *C. trachomatis* infiziert. Hierbei konnten 24 h nach Infektion nur einzelne Einschlüsse mit wenigen großen Einschlusskörpern detektiert werden (Abbildung 10). Nach 48 h war das Bild ähnlich. Es kam sowohl in Normoxie und Hypoxie zu einem „Persistenz-ähnlichen“ Infektionsverlauf, welcher sich durch vergrößerte RK und das Fehlen von infektiösen EB auszeichnete (Abbildung 11 A). Um den Einfluss der Zelldifferenzierung von Epithelzellen zu mesenchymalen Stromazellen auf den Infektionsverlauf zu untersuchen, wurden verschiedene Primärzellisolate 2 d, 9 d, und 16 d nach Isolation infiziert. Deutlich erkennbar waren die im Vergleich zu frischen Zellen (Abbildung 11 B) großen Einschlüsse bei den späteren Zeitpunkten (Abbildung 11 C, D), was auf eine produktive Infektion schließen lässt. Dies konnte im Vergleich der Anzahl infektiöser EB bestätigt werden (Abbildung 11 A). So zeigen die frisch isolierten Zellen den oben beschriebenen „Persistenz-ähnlichen“ Verlauf, während nach 16 d Kulturdauer eine produktive Infektion mit infektiösen EB beobachtet werden konnte.



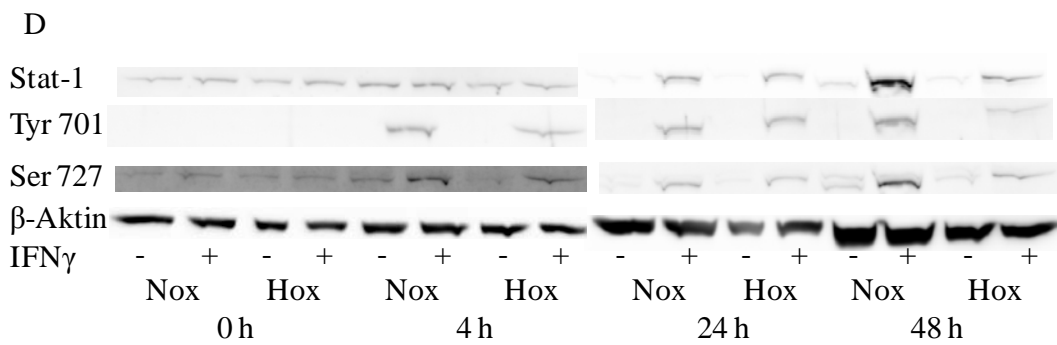
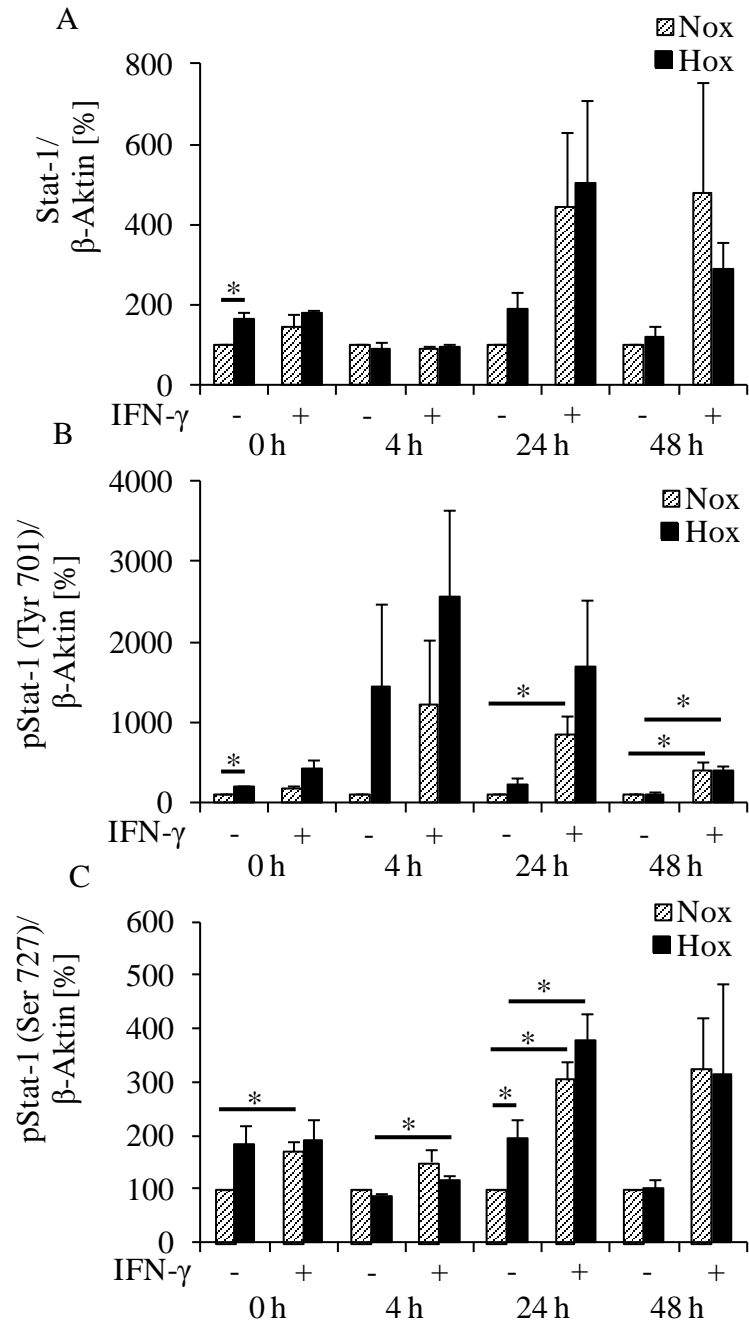
**Abbildung 10** Lichtmikroskopische Aufnahme von primären epithelialen Eileiterzellen zwei Tage nach Isolation, infiziert mit *C. trachomatis* für 24 h. Deutlich sichtbar sind intrazelluläre Einschlüsse von *C. trachomatis* (schwarze Pfeile) mit vergrößerten RK.



**Abbildung 11** Darstellung des Infektionsverlaufs von *C. trachomatis* (grün) über 48 h in primären epithelialen Eileiterzellen (rot) in Abhängigkeit von der Kulturdauer der Zellen; Bestimmung der Anzahl infektiöser EB (A); Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Infektion von Zellen kultiviert für 2 d (B), 9 d (C) und 16 d (D) (n=2).

#### 5.2.2.2 Induktion der Stat-1 Signalkaskade nach Zugabe von IFN- $\gamma$

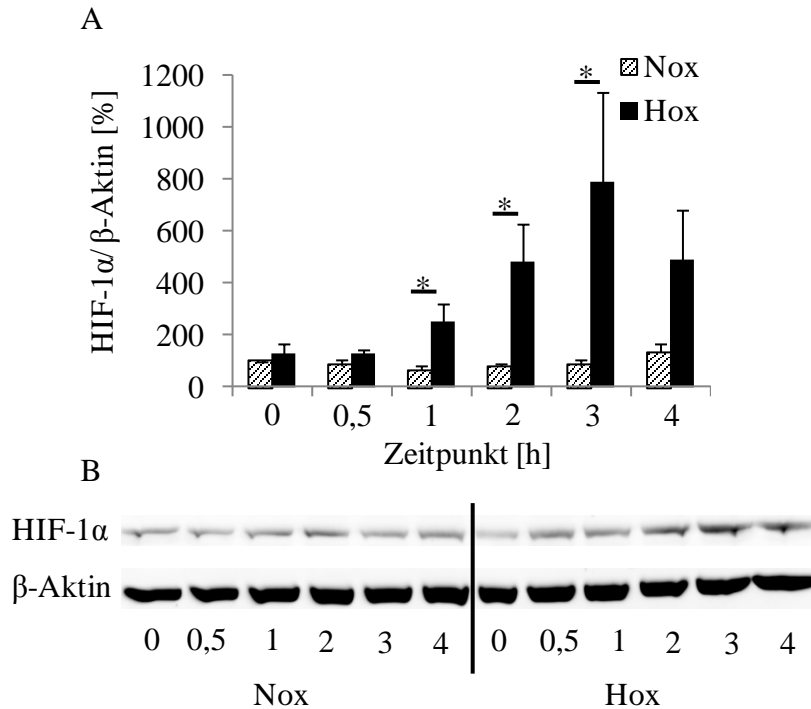
IFN- $\gamma$  ist eines der wichtigsten Zytokine bei der Abwehr einer Chlamydieninfektion und kann in HeLa-229 Zellen zur Induktion der Tryptophan Depletion über die Stat-1 Signalkaskade verwendet werden, die während einer Chlamydieninfektion zur Persistenz führt. Um den Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die Stat-1 Signalkaskade in primären Epithelzellen zu untersuchen, wurden die Zellen unter normoxischen sowie hypoxischen Bedingungen mit 5 U/ml IFN- $\gamma$  stimuliert. Nach den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 24 h und 48 h nach Zugabe von IFN- $\gamma$  wurden Western Blot Proben entnommen und auf die Proteine Stat-1, phosphoryliertes Stat-1 (Tyr 701) sowie phosphoryliertes Stat-1 (Ser 727) untersucht. Die densitometrische Auswertung der Western Blots zeigte nach 4 h eine deutliche Phosphorylierung am Tyrosinrest 701, während am Serinrest 727 diese erst nach 24 h ihren Höchstwert erreichte (Abbildung 12 B-C). Ebenso erreichte auch die Induktion des nicht phosphorylierten Stat-1 Proteins nach 24 h den höchsten Wert (Abbildung 12 A). Sowohl die Induktion des un-phosphorylierten Stat-1 Proteins als auch die Phosphorylierung an Ser 727 konnten nach 48 h noch in einer vergleichbaren Intensität wie zum 24 h Zeitpunkt gezeigt werden, wohingegen die Phosphorylierung von Tyr 701 bereits deutlich reduziert war.



**Abbildung 12** Western Blot Analyse zur Induktion von Stat-1 und der Phosphorylierung von Stat-1 am Tyrosinrest 701 und am Serinrest 727 nach Stimulation mit 5 U/ ml IFN- $\gamma$  unter Normoxie (Nox) und Hypoxie (Hox) in primären epithelialen Eileiterzellen; Densitometrische Auswertung der Expression von Stat-1 (A), pStat-1 Phosphorylierung (Tyr 701) (B)/ (Ser 727) (C). Repräsentative Western Blots (D) (n=3, \*= p $\leq$  0,05).

### 5.2.2.3 Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$

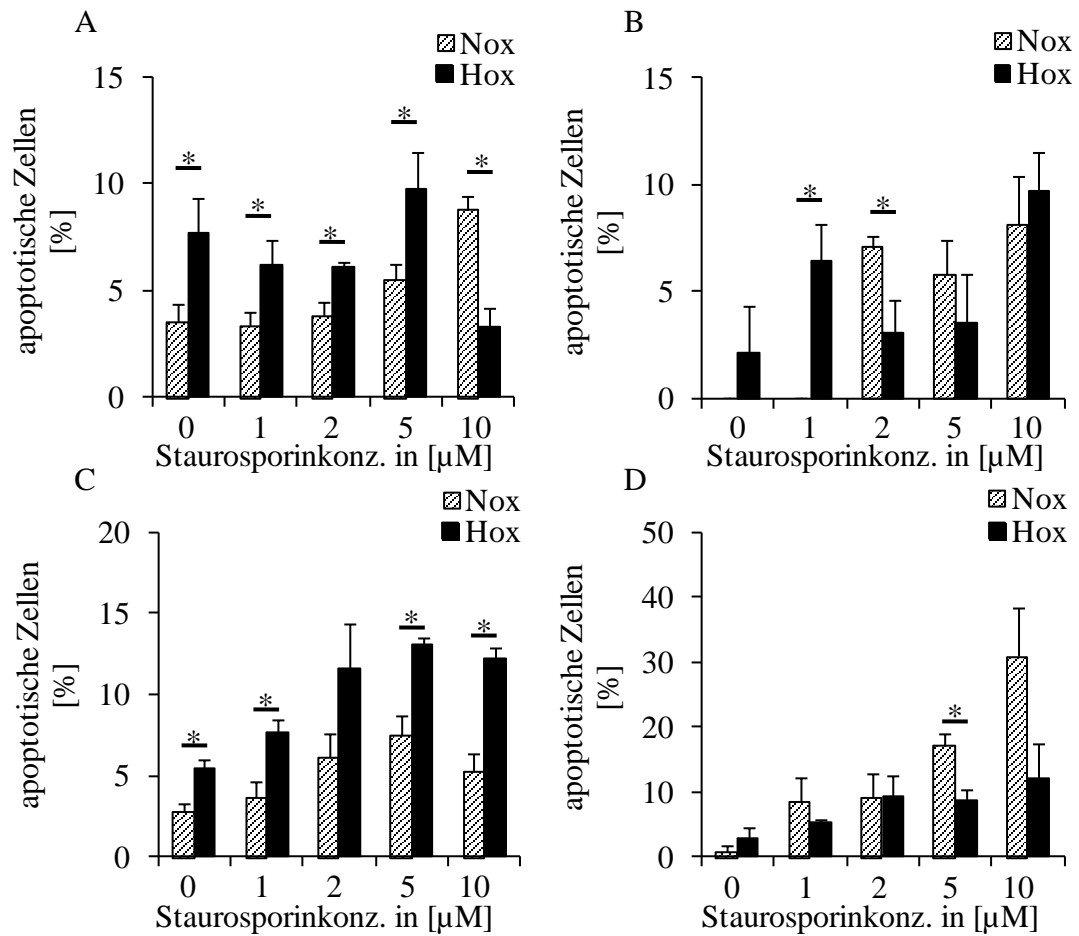
Hypoxie hat in HeLa-229 Zellen einen starken Einfluss auf die Wirksamkeit von IFN- $\gamma$ . So ist es in HeLa-229 Zellen nicht möglich unter Hypoxie und IFN- $\gamma$ , eine persistente *C. trachomatis* Infektion zu etablieren. Der wichtigste Transkriptionsfaktor der während der Hypoxie stabilisiert wird und eine Vielzahl von Genen reguliert, ist HIF-1 $\alpha$ . Da aber wenig über dessen Aktivität in primären epithelialen Eileiterzellen bekannt ist wurde die Stabilisierung auf Proteinebene im Western Blot untersucht. Hierzu wurden primäre epitheliale Eileiterzellen ausgesät und nach 24 h unter normoxischer Bebrütung in Hypoxie (2 % O<sub>2</sub>) überführt. Zu den Zeitpunkten 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h sowie 4 h wurden Proben entnommen und auf HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung analysiert. In Abbildung 13 A ist die Analyse zur HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung dargestellt. Anhand des repräsentativen Western Blots ist ersichtlich, dass primäre epitheliale Eileiterzellen unter Normoxie über eine basale HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung verfügen (Abbildung 13 B), die in Hypoxie verstärkt wurde. Dies konnte durch die densitometrische Auswertung der Western Blots bestätigt werden. Bereits nach 1 h unter Hypoxie konnte eine signifikant erhöhte Induktion verglichen mit Normoxie festgestellt werden.



**Abbildung 13** Western Blot zur HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung in primären epithelialen Eileiterzellen unter Normoxie (Nox) und Hypoxie (Hox). Densitometrische Auswertung der HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung (A); Repräsentativer Western Blot (B) zeigt die basale Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  unter Nox sowie die additive Stabilisierung unter Hox (n=3, \*= p $\leq$  0,05).

#### 5.2.2.4 Induktion der zellulären Apoptose

In dieser Arbeit wurden erste Versuche zur Charakterisierung der Apoptose in primären epithelialen Eileiterzellen nach Staurosporin Behandlung durchgeführt. Da in späteren Versuchen auch der Einfluss einer IFN- $\gamma$  induzierten persistenten Chlamydieninfektion auf die Apoptose bestimmt werden soll, wurden ebenfalls erste Untersuchungen zum Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die Apoptoseinduktion durchgeführt. In Abbildung 14 ist ersichtlich, dass ohne und mit IFN- $\gamma$  nach einer Inkubationszeit von 4 h in ca. 10 % der Zellen DNA-Fragmentation eingesetzt hat. Nach 8 h Inkubationsdauer mit Staurosporin ohne IFN- $\gamma$  fällt eine signifikant erhöhte Apoptoserate unter hypoxischen gegenüber normoxischen Bedingungen auf. Wohingegen in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  unter normoxischen Bedingungen eine stärkere Sensibilisierung für die Apoptose gezeigt werden konnte als unter Hypoxie.



**Abbildung 14** Lichtmikroskopische Auswertung der Apoptoseinduktion durch Staurosporin (1-10 µM) in primären epithelialen Eileiterzellen mit und ohne IFN- $\gamma$ , unter Normoxie (Nox) und Hypoxie (Hox), ohne IFN- $\gamma$ , 4 h Inkubationsdauer (A); 5 U/ml IFN- $\gamma$ , 4 h Inkubationsdauer (B); ohne IFN- $\gamma$ , 8 h Inkubationsdauer (C); 5 U/ml IFN- $\gamma$ , 8 h Inkubationsdauer (D) (n=1, \* = p ≤ 0,05).

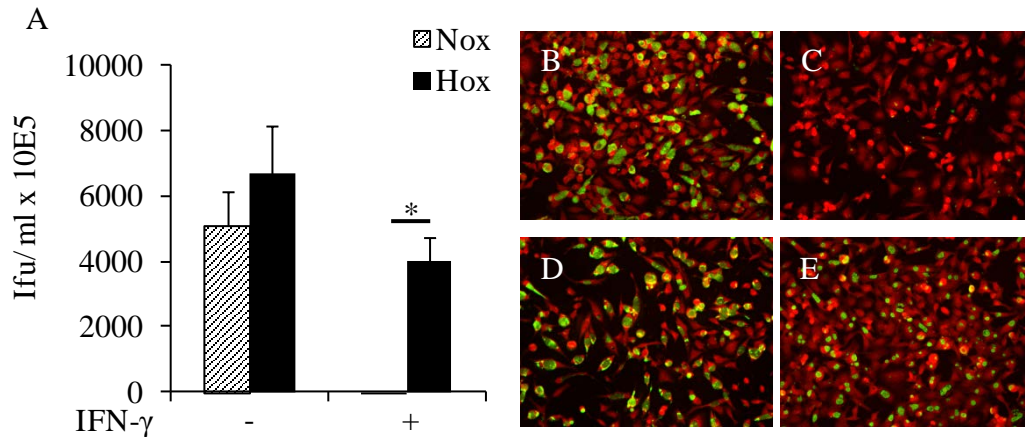
### 5.3 HeLa-229 Zellmodell

#### 5.3.1 Charakterisierung des HeLa-229 Infektionsmodelles

Um die isolierten Primärzellen mit HeLa-229 Zellen vergleichen zu können, wurden in diesen ebenfalls die Infektion mit *C. trachomatis*, die HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung, die Induktion und Phosphorylierung von Stat-1 durch IFN- $\gamma$ , die Apoptoseinduktion mittels Staurosporin sowie zusätzlich die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 und die Induktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , Il-6, IL-8 und MCP-1 untersucht.

##### 5.3.1.1 Infektion mit *C. trachomatis*

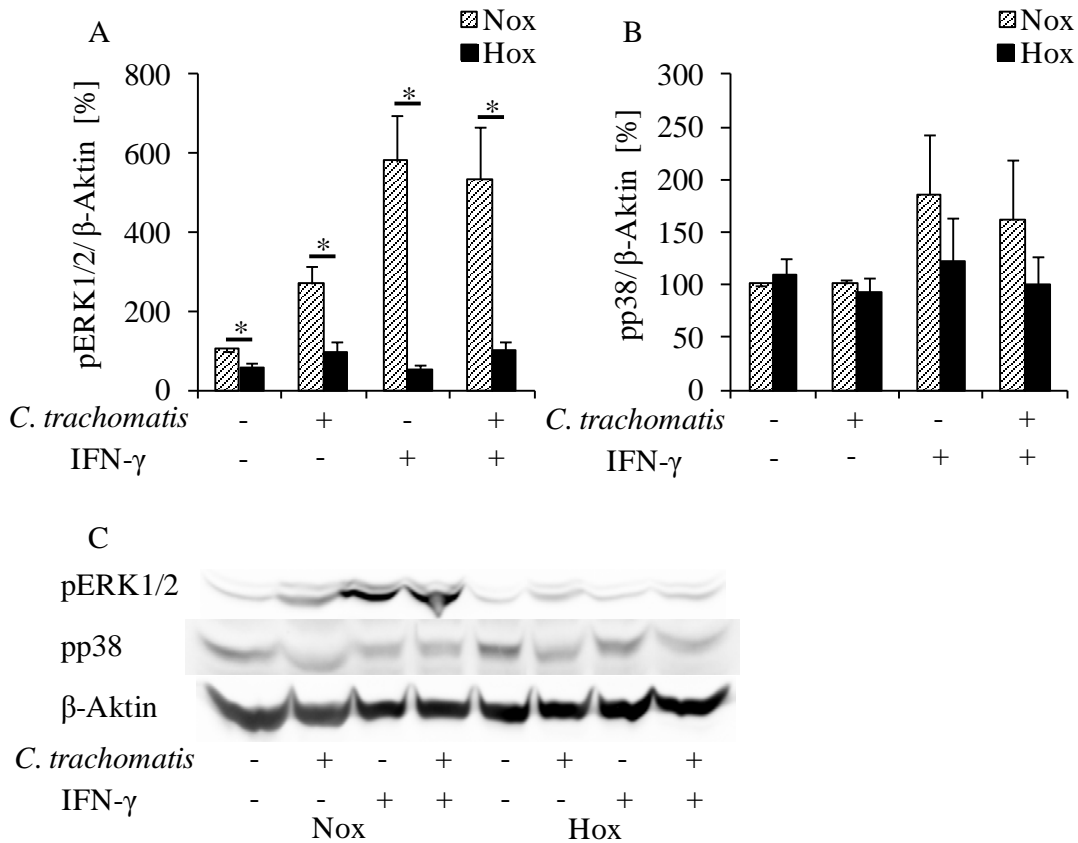
Die Infektion von HeLa-229 Zellen mit *C. trachomatis* wurde entsprechend dem experimentellen Aufbau mit oder ohne IFN- $\gamma$  Stimulation unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Da der Entwicklungszyklus von Serovar D nach 48 h beendet ist, wurden zu diesem Zeitpunkt Zellen für die Bestimmung der infektiösen EB, den direkten Immunfluoreszenztest, Western Blot sowie Proben zur RNA-Isolation entnommen. Die Infektion unter Normoxie (Abbildung 15 B) und Hypoxie (Abbildung 15 D) ohne IFN- $\gamma$  verlief in etwa gleich. Unter beiden Bedingungen waren die Einschussgröße sowie die Infektionsrate ähnlich. Dies wurde durch die Anzahl an infektiösen EB, welche für beide Bedingungen vergleichbar war, bestätigt (Abbildung 15 A). In Anwesenheit von IFN- $\gamma$  veränderte sich die Situation. Unter normoxischen Bedingungen (Abbildung 15 C) sah man eine deutlich verringerte Einschussgröße, während unter hypoxischen Bedingungen (Abbildung 15 E) die Einschüsse ebenfalls etwas kleiner, aber deutlich größer als unter Normoxie waren. Entsprechend dieser Beobachtung war unter Normoxie mit IFN- $\gamma$  die Anzahl an infektiösen EB signifikant geringer als unter Hypoxie mit IFN- $\gamma$ .



**Abbildung 15** Darstellung des *C. trachomatis* (grün) Infektionsverlaufes in HeLa-229 Zellen (rot) mit und ohne IFN- $\gamma$  unter Normoxie (Nox) und Hypoxie (Hox) 48 h nach Infektion. Bestimmung der infektiösen EB (A); Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Infektionen unter Normoxie ohne (B) oder mit 5 U/ ml IFN- $\gamma$  (C) und unter Hypoxie ohne (D) und mit 5 U/ ml IFN- $\gamma$  (E) (n=3, \*= p $\leq$  0,05).

### 5.3.1.2 Phosphorylierung der ERK1/2 und p38 MAP-Kinasen nach Infektion mit *C. trachomatis*

Um die Auswirkungen einer Chlamydieninfektion auf die Induktion proinflammatorischer MAP-Kinasen zu untersuchen, wurden 48 h nach Infektion Western Blot Proben entnommen und auf die Phosphorylierung der ERK1/2 und p38 MAP-Kinasen untersucht. Betrachtet man die densitometrische Auswertung der Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase 48 h nach Infektion (Abbildung 16 B) unter Normoxie und Hypoxie mit und ohne IFN- $\gamma$  wird deutlich, dass nur eine geringe Verstärkung der Phosphorylierung unter normoxischen Bedingungen in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  gegenüber der Kontrolle ohne IFN- $\gamma$  detektiert werden konnte. Es war auffällig, dass die Anwesenheit einer produktiven Chlamydieninfektion unter Normoxie keinen Effekt auf die Phosphorylierung hatte. Gleiches konnte für Hypoxie gezeigt werden. Es konnte weder durch IFN- $\gamma$  noch während einer produktiven Chlamydieninfektion, eine erhöhte Phosphorylierung festgestellt werden. Dagegen konnte für die ERK1/2 MAP-Kinase eine signifikant erhöhte Phosphorylierung sowohl während einer produktiven Infektion als auch nach IFN- $\gamma$  Stimulation in Normoxie, aber nicht in Hypoxie gezeigt werden (Abbildung 16 A).

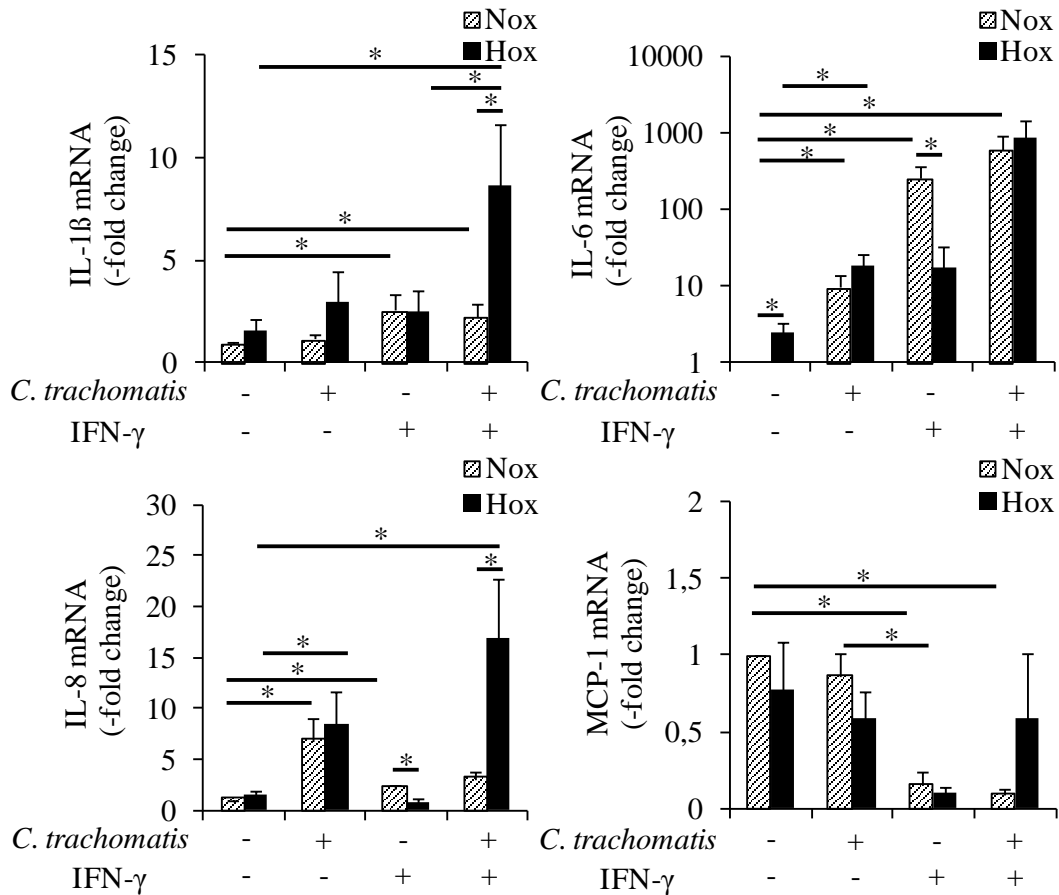


**Abbildung 16** Western Blot Analyse zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 48 h nach Infektion mit *C. trachomatis* mit und ohne IFN- $\gamma$  unter Normoxie (Nox) und Hypoxie (Hox) in HeLa-229 Zellen; Densitometrische Auswertung der ERK1/2 (A)/ p38 Phosphorylierung (B); Repräsentative Western Blots (C) (n=3, \*= p $\leq$  0,05).

### 5.3.1.3 Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen nach Infektion mit *C. trachomatis*

Um die Auswirkungen einer Chlamydieninfektion auf die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine zu untersuchen, wurden 48 h nach Infektion Proben für die RNA-Isolierung entnommen und die Änderung der Genexpression mittels qRT-PCR bestimmt. Eine deutliche Induktion durch Chlamydieninfektion konnte bei der Expression von IL-6 und IL-8 (Abbildung 17) gemessen werden. Diese Induktion trat während einer produktiven Infektion sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen auf. Weiterhin konnte für IL-6 eine signifikant erhöhte Expression unter Normoxie mit IFN- $\gamma$  gegenüber Hypoxie mit IFN- $\gamma$  gezeigt werden. In Anwesenheit einer Infektion und IFN- $\gamma$  war diese für Normoxie als auch Hypoxie vergleichbar. Wohingegen für IL-8 ein deutlicher Anstieg der Expression während einer Infektion in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  unter hypoxischen Bedingungen, aber

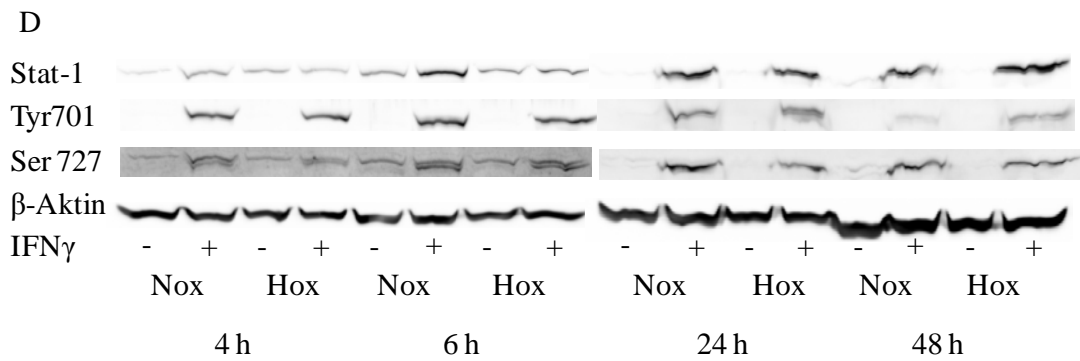
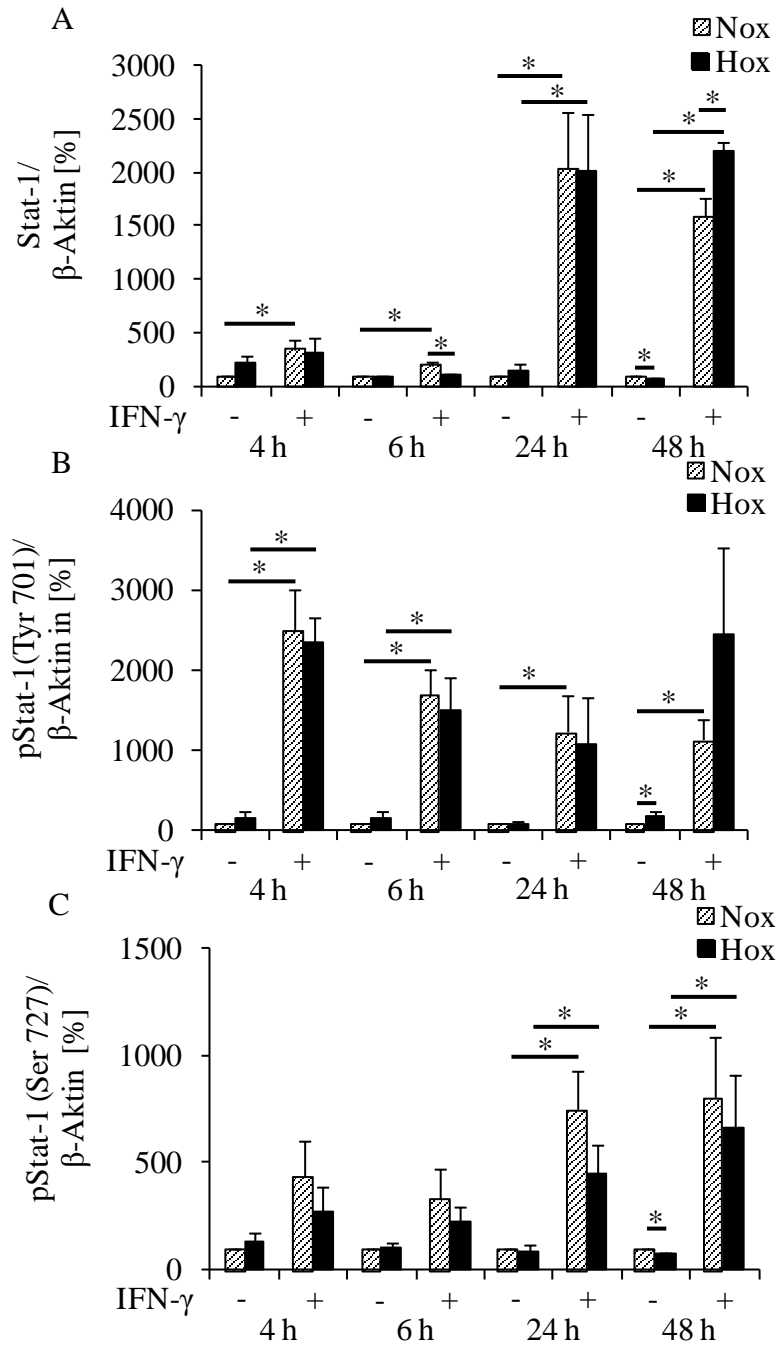
nicht unter Normoxie gemessen werden konnte. IFN- $\gamma$  allein rief dagegen keine erhöhte Expression hervor. Weiterhin wurde deutlich, dass eine Infektion (persistent/produktiv) bei gleichzeitigem Vorhandensein von IFN- $\gamma$  bei fast allen gemessenen Zytokinen zu einer Induktion der Expression geführt hat. Einzig MCP-1 war hierbei eine Ausnahme, hier konnte in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  eine Verringerung der Expression beobachtet werden.



**Abbildung 17** Zytokininduktion (mRNA) in HeLa-229 Zellen 48 h nach Infektion mit *C. trachomatis* mit und ohne IFN- $\gamma$ , unter normoxischen (Nox) und hypoxischen (Hox) Bedingungen (n=3, \*= p ≤ 0,05).

#### **5.3.1.4 Induktion der Stat-1 Signalkaskade nach Zugabe von IFN- $\gamma$**

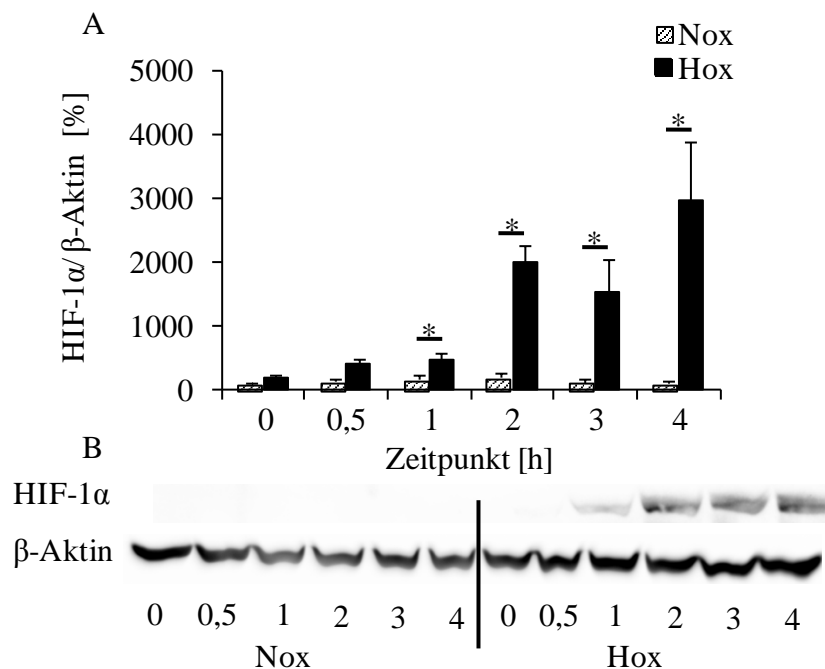
Um den Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die Aktivierung der Stat-1 Kaskade darzustellen, wurden die HeLa-229 Zellen unter normoxischen sowie hypoxischen Bedingungen mit 5 U/ ml IFN- $\gamma$  stimuliert und die entnommenen Proben auf die Proteine Stat-1, phosphoryliertes Stat-1 (Tyr 701) sowie phosphoryliertes Stat-1 (Ser 727) untersucht. Die Auswertung ergab eine detektierbare Phosphorylierung von Stat-1 bereits vier Stunden nach Zugaben von IFN- $\gamma$  sowohl an der Position Tyr 701 als auch an der Position Ser 727 (Abbildung 18). Diese fällt unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen annähernd gleich aus. Vergleicht man dieses mit den späteren Zeitpunkten, ergibt sich dasselbe Bild auch für 6 h, 24 h und 48 h nach Induktion. Die Phosphorylierung am Tyr 701 nimmt über einen Zeitraum von 48 h langsam ab, während die Phosphorylierung am Ser 727 nach 24 h ihr Maximum erreicht. Weiterhin konnte zu jedem Zeitpunkt eine deutlich erhöhte Induktion des Stat-1 Proteins (Abbildung 18) gemessen werden. Diese erreichte 24 h nach Stimulation den höchsten Wert, konnte aber genauso wie phosphoryliertes Ser 727 auch nach 48 h noch in vergleichbarer Intensität detektiert werden.



**Abbildung 18** Western Blot Analyse zur Induktion von Stat-1 und der Phosphorylierung von Stat-1 am Tyrosinrest 701 und am Serinrest 727 nach Stimulation mit 5 U/ ml IFN- $\gamma$  unter Normoxie (Nox) und Hypoxie (Hox) in HeLa-229 Zellen; Densitometrische Auswertung der Stat-1 Induktion (A); Stat-1 Phosphorylierung (Tyr 701) (B)/ (Ser 727) (C); Repräsentative Western Blots (D) (n=3, \*= p $\leq$  0,05).

### 5.3.1.5 Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$

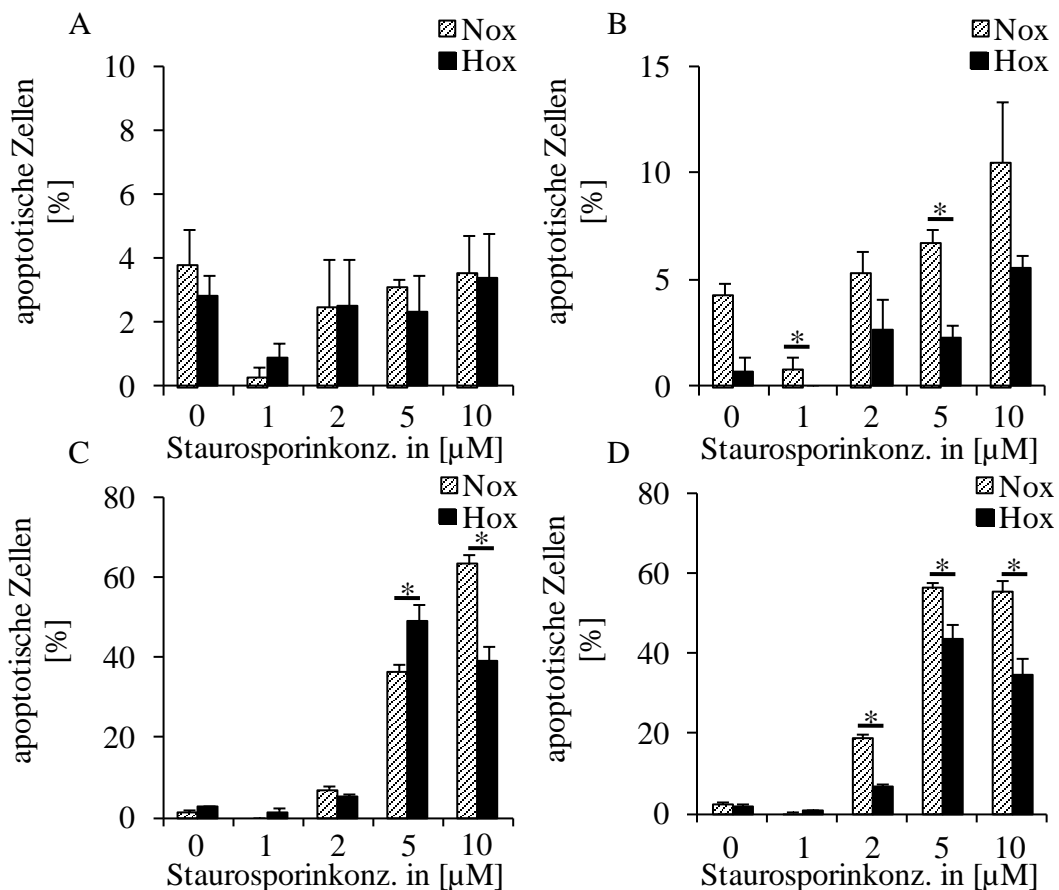
Um die HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung zwischen HeLa-229 Zellen und primären epithelialen Eileiterzellen vergleichen zu können, wurden HeLa-229 Zellen nach 24 h normoxischer Inkubation in Hypoxie überführt. Zu den Zeitpunkten 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h und 4 h wurden Proben entnommen und analysiert. Wie der densitometrischen Darstellung in Abbildung 19 A als auch dem repräsentativen Western Blot (Abbildung 19 B) zu entnehmen ist, wiesen HeLa-229 Zellen nach 1 h unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  auf, wohingegen unter Normoxie keine Stabilisierung detektiert werden konnte.



**Abbildung 19** Western Blot zur HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung in HeLa-229 Zellen unter Normoxie (Nox) und Hypoxie (Hox); Densitometrische Auswertung der HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung (A); Repräsentativer Western Blot (B) zeigt die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  unter Hox (n=3, \*= p $\leq$  0,05).

### 5.3.1.6 Apoptoseinduktion durch Staurosporin

Um die Apoptoseinduktion in HeLa-229 Zellen mit der in primären epithelialen Eileiterzellen vergleichen zu können, wurde der Einfluss von Staurosporin unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen mit und ohne IFN- $\gamma$  untersucht. In Abbildung 20 ist ersichtlich, dass nach 4 h Inkubation mit Staurosporin sowohl in den IFN- $\gamma$  unbehandelten (Abbildung 20 A), als auch in den IFN- $\gamma$  behandelten (Abbildung 20 B) Proben nur ca. 10 % der Zellen DNA-Fragmentation aufweisen. Erst nach 8 h Inkubation mit Staurosporin wurden verstärkt Zellen mit fragmentierter DNA sichtbar. Die Zugabe von IFN- $\gamma$  (Abbildung 20 D) führte im Vergleich zu den IFN- $\gamma$  unbehandelten Proben (Abbildung 20 C) weder unter Normoxie noch unter Hypoxie zu einer Sensibilisierung der Zellen für die Staurosporin induzierte Apoptose. Weiterhin konnte nach 8 h eine signifikant erhöhte Apoptoserate in Normoxie gegenüber Hypoxie gezeigt werden.



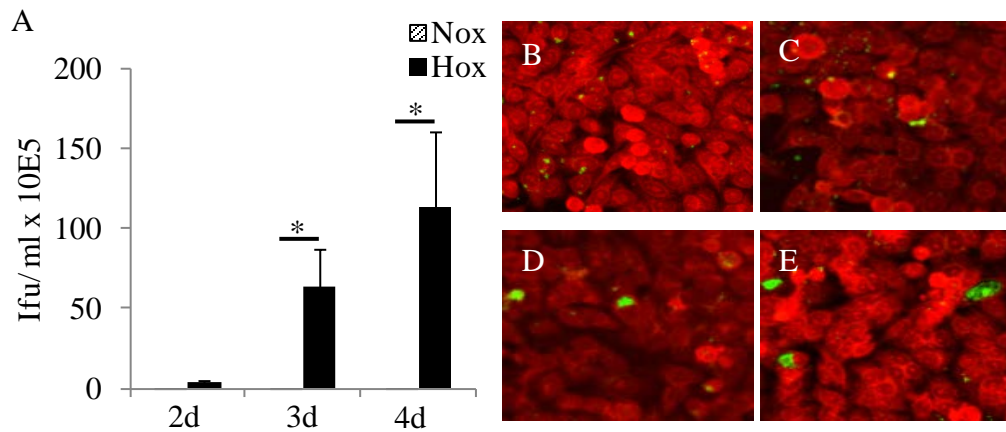
**Abbildung 20** Lichtmikroskopische Auswertung der Apoptoseinduktion durch Staurosporin (1-10 µM) in HeLa-229 Zellen mit und ohne IFN- $\gamma$ , unter Normoxie (Nox) und Hypoxie (Hox), ohne IFN- $\gamma$ , 4 h Inkubationsdauer (A); 5 U/ml IFN- $\gamma$ , 4 h Inkubationsdauer (B); ohne IFN- $\gamma$ , 8 h Inkubationsdauer (C); 5 U/ml IFN- $\gamma$ , 8 h Inkubationsdauer (D) (n=1, \*= p<0,05).

## **5.4 Verlauf einer *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ in Normoxie und Hypoxie**

Aufgrund der Erkenntnisse aus den Infektionsversuchen in HeLa-229 Zellen stellte sich die Frage, ob die IFN- $\gamma$  induzierte chlamydiale Persistenz nach Überführung aus normoxischen in hypoxische Bedingungen überwunden werden könnte. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Zellen für 24 h mit IFN- $\gamma$  in Normoxie inkubiert und mit Chlamydien infiziert. Nach weiteren 24 h stellte sich die Persistenz ein und die Zellen wurden in Hypoxie überführt. Zu den Zeitpunkten 2 d, 3 d und 4 d nach Überführung wurden Proben genommen und ausgewertet. Das Augenmerk lag hierbei auf der Anzahl an infektiösen EB, der Immunfluoreszenz der Chlamydieneinschlüsse und der Untersuchung von Wirt-Pathogen Wechselwirkungen am Beispiel der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 sowie die Untersuchung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und MCP-1.

### **5.4.1 Vergleich der *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ in Normoxie und Hypoxie**

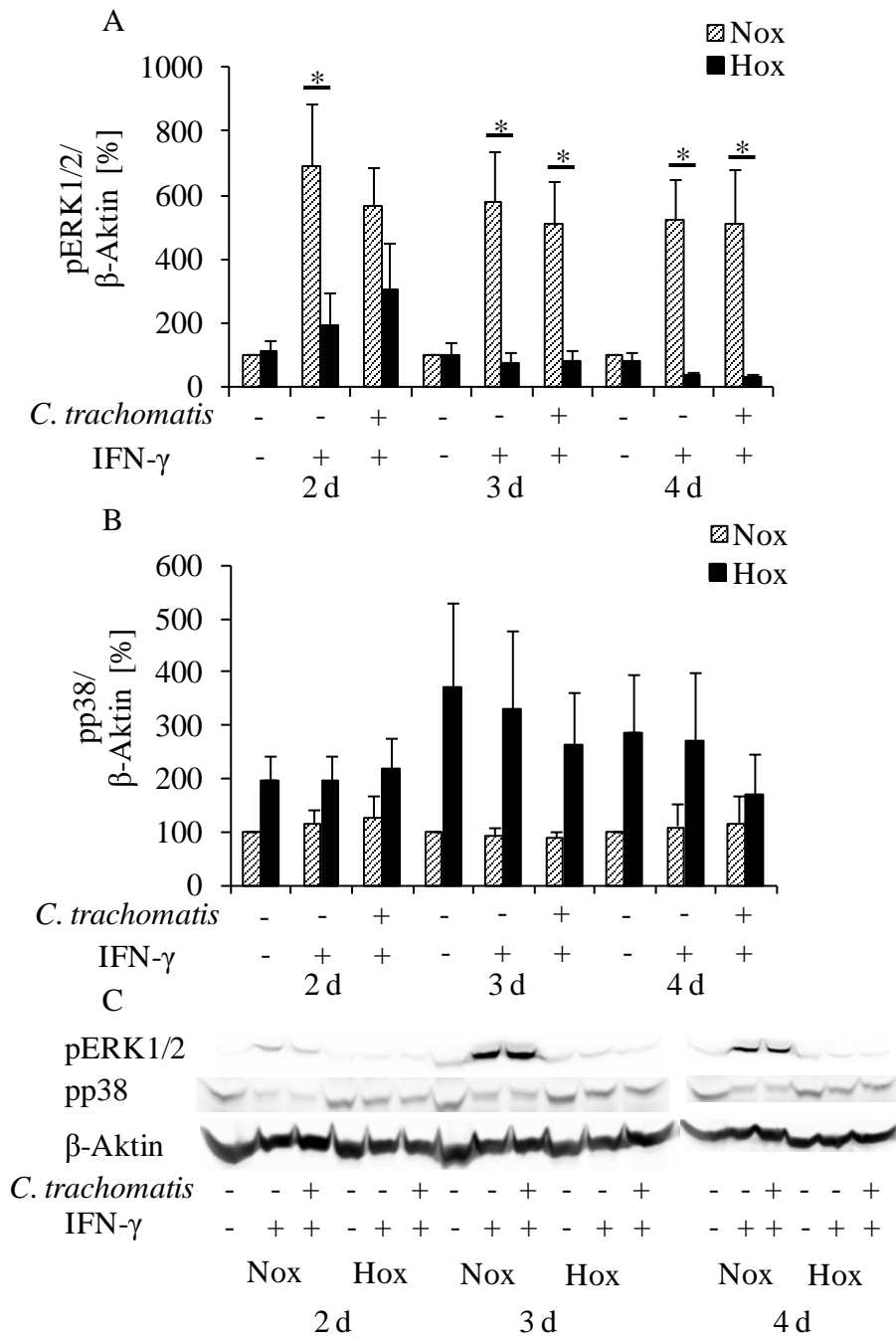
Es wurden an den Tagen 2, 3 und 4 nach dem Transfer der Proben von Normoxie in Hypoxie mit Hilfe des direkten Immunfluoreszenztest die Morphologie der Chlamydieneinschlüsse sowie die Anzahl an infektiösen Chlamydien unter Normoxie und Hypoxie bestimmt. Es konnte mit fortschreitender Zeit in Hypoxie, ein Wachstum der Chlamydieneinschlüsse beobachtet werden (Abbildung 21 C-E). So sind an Tag zwei in Hypoxie (Abbildung 21 C) kleine Einschlüsse erkennbar, welche nach vier Tagen bereits relativ groß erscheinen (Abbildung 21 E). Dieses deutet auf eine Reaktivierung der persistenten Infektion und Etablierung einer produktiven Infektion hin. Dies konnte durch die Bestimmung der infektiösen Chlamydien bestätigt werden, da bereits nach 2 d in Hypoxie infektiöse EB detektiert werden konnte (Abbildung 21 A). Die Anzahl der infektiösen EB stieg nach 3 und 4 Tagen in Hypoxie weiter an. Betrachtet man im Gegensatz dazu die normoxischen Proben wird deutlich, dass dort keine Veränderungen in der Einschlussgröße (exemplarisch nur für 2 d dargestellt, Abbildung 21 B) sowie der Anzahl an infektiösen EB vorlag (Abbildung 21 A).



**Abbildung 21** Darstellung des *C. trachomatis* (grün) Infektionsverlaufes in HeLa-229 Zellen (rot) nach IFN- $\gamma$  Stimulation in Normoxie (Nox) und Hypoxie (Hox). Bestimmung der infektiösen EB nach 2, 3, 4 d (A); Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Infektion unter Normoxie (B); Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Infektion 2, 3, 4 d in Hypoxie (C-E) (n=7, \*= p $\leq$  0,05).

#### **5.4.2 Vergleich der ERK1/2 und p38 MAP-Kinase Phosphorylierung während einer *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ in Normoxie und Hypoxie**

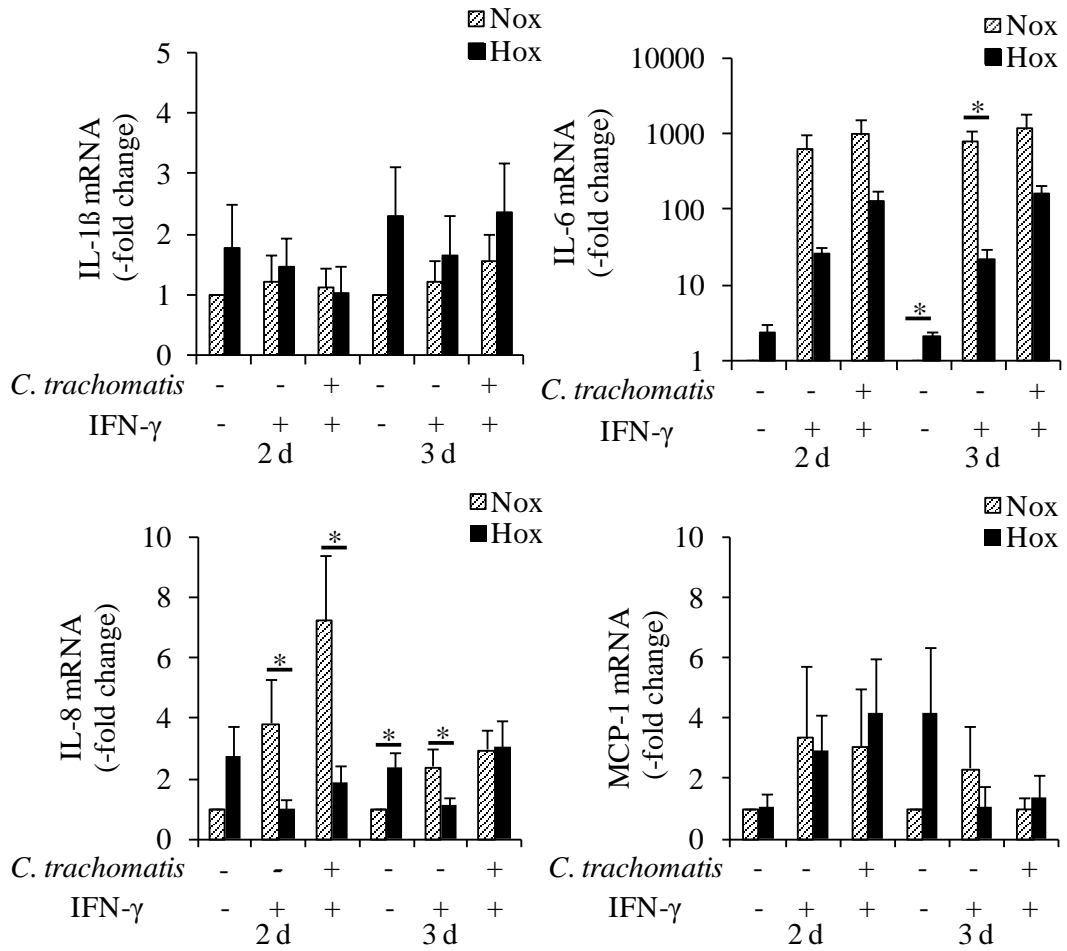
Da gezeigt werden konnte, dass die IFN- $\gamma$  vermittelte chlamydiale Persistenz durch Hypoxie überwunden werden kann und die Chlamydien in eine produktive Infektion übergehen, sollte im Folgenden untersucht werden, ob dies Auswirkungen auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen in den Wirtszellen hat. Zu diesem Zwecke wurden an den Tagen 2, 3, 4 d Proben zur Analyse im Western Blot entnommen und mit den entsprechenden normoxischen Proben verglichen. Bei Betrachtung der densitometrischen Auswertung der Western Blots (Abbildung 22) fällt auf, dass die Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase unter Hypoxie tendenziell höher ist als unter normoxischen Bedingungen (Abbildung 22 B). Es kam weder durch IFN- $\gamma$  Stimulation, noch durch eine Kombination von IFN- $\gamma$  und Chlamydien, zu einer erhöhten Phosphorylierung gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Betrachtet man die Phosphorylierung der ERK1/2 MAP-Kinase (Abbildung 22 A) wird ersichtlich, dass diese unter normoxischen Bedingungen und IFN- $\gamma$  Stimulation deutlich erhöht ist. Hierbei handelte es sich um einen IFN- $\gamma$  vermittelten Effekt, da die Phosphorylierung in der nicht behandelten normoxischen Probe signifikant niedriger war. Weiterhin konnte keine Zunahme der Phosphorylierung durch das Vorhandensein von persistenten Chlamydien festgestellt werden. Unter hypoxischen Bedingungen und IFN- $\gamma$  war dagegen keine verstärkte Phosphorylierung gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu messen.



**Abbildung 22** Western Blot Analyse zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 während einer *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach IFN-γ Stimulation in Normoxie (Nox) und Hypoxie (Hox). Densitometrische Auswertung der ERK1/2 (A) und p38 Phosphorylierung (B); Repräsentative Western Blots (C) (n=7, \*= p<0,05).

### **5.4.3 Vergleich der Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen während einer *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach IFN- $\gamma$ Stimulation in Normoxie und Hypoxie**

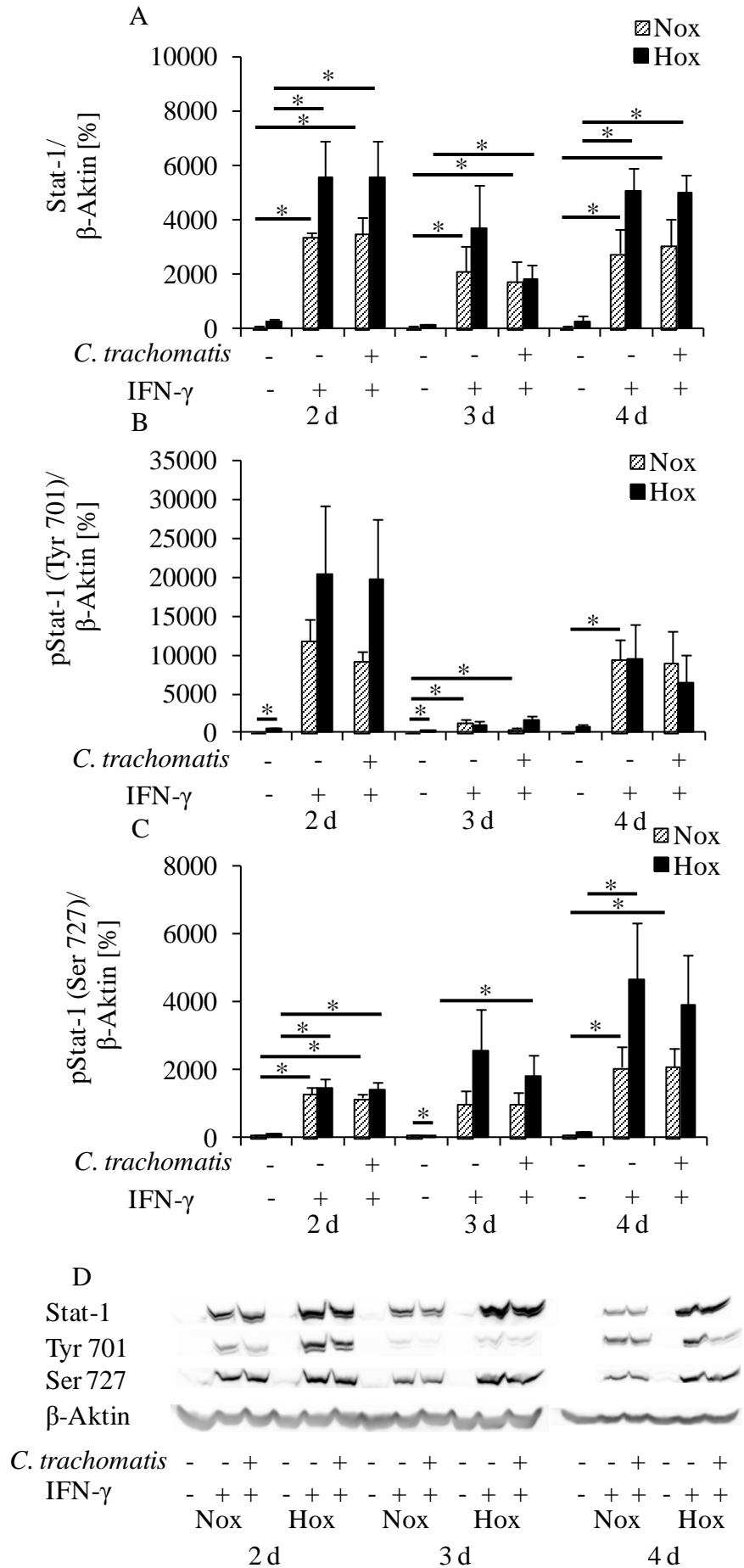
Obwohl die Wirtszellen nicht mit einer Phosphorylierung der MAP-Kinasen auf die Reaktivierung der persistenten Chlamydien unter hypoxischen Bedingungen reagierten, stellte sich die Frage, ob es dennoch zu einer vermehrten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen kommen würde. Aus diesem Grund wurde mRNA isoliert und diese auf die Genexpression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und MCP-1 untersucht. Wie in Abbildung 23 gezeigt, konnte für die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und MCP-1 keine signifikante Erhöhung der Expression durch die Reaktivierung der persistenten Chlamydien unter Hypoxie detektiert werden. Für IL-6 und IL-8 konnte ein Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die Expression beobachtet werden (Abbildung 23). So war IL-6 unter Einfluss von IFN- $\gamma$  signifikant erhöht. Dieser Einfluss war in Normoxie signifikant stärker als in Hypoxie. Bei zusätzlichem Vorhandensein einer reaktivierten Infektion konnte ein additiver Effekt unter Hypoxie detektiert werden, der aber geringer war als der Wert der persistenten Infektion unter Normoxie. Eine zweite Auffälligkeit ergab sich bei Betrachtung des Zytokin IL-8 (Abbildung 23). Auch hier kam es am Tag 2 unter Normoxie zu einer signifikanten Induktion durch IFN- $\gamma$ , welche durch die Anwesenheit persistenter Chlamydien verstärkt wurde. Unter hypoxischen Bedingungen konnte dagegen keine Induktion durch IFN- $\gamma$  gemessen werden.



**Abbildung 23** Zytokininduktion (mRNA) während einer *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation in Normoxie (Nox) und Hypoxie (Hox), (n=7, \*= p $\leq$  0,05).

#### **5.4.4 Vergleich der Induktion und Phosphorylierung des Stat-1 Proteins während einer *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach IFN- $\gamma$ Stimulation in Normoxie und Hypoxie**

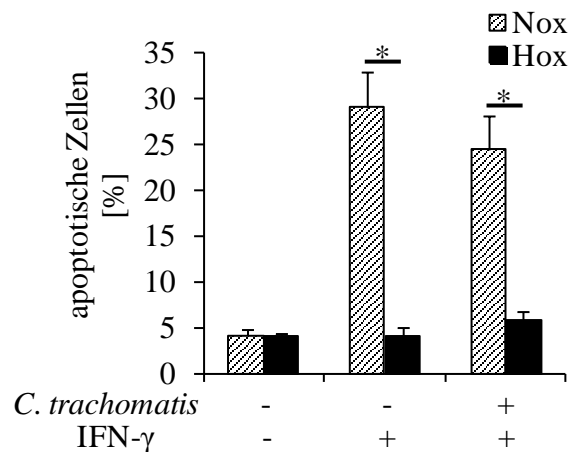
Da gezeigt werden konnte, dass die IFN- $\gamma$  vermittelte Chlamydien Persistenz trotz der Anwesenheit von IFN- $\gamma$  durch Hypoxie überwunden wurde, sollte im Folgenden untersucht werden, ob Unterschiede in der Induktion und der Phosphorylierung des Stat-1 Proteins nach IFN- $\gamma$  Stimulation über einen längeren Zeitraum unter Normoxie und Hypoxie auftraten. Die Zellen wurden entsprechend dem Versuchsaufbau zum Verlauf einer *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation in Normoxie und Hypoxie behandelt. An den Tagen 2, 3, und 4 wurden Proben entnommen und im Western Blot auf Stat-1 Induktion sowie auf Stat-1 Phosphorylierung (Tyr 701, Ser 727) untersucht. Nach der densitometrischen Auswertung von drei Versuchen wurde deutlich, dass Stat-1 unabhängig von der Versuchsdauer als auch von den Versuchsbedingungen (Nox, Hox, mit/ ohne *C. trachomatis*) durch IFN- $\gamma$  induziert sowie phosphoryliert wird (Abbildung 24 A-C). Es war hierbei eine leichte Tendenz zur erhöhten Induktion/ Phosphorylierung unter hypoxischen Bedingungen zu erkennen. Weiterhin wurde deutlich, dass der Mediumwechsel, der sowohl an Tag eins und drei nach Bedingungswechsel mit der Zugabe von neuem IFN- $\gamma$  erfolgte, einen stimulierenden Einfluss hatte. Dies wird besonders bei der Phosphorylierung am Tyrosinrest 701 aber nicht am Serinrest 727 deutlich (Abbildung 24 B-C). Aus den hier gezeigten Daten ist ersichtlich, dass die Zellen in der Lage sind, die Aktivierung aufrecht zu erhalten, aber dass IFN- $\gamma$  scheinbar nicht über den Zeitraum von zwei Tagen in einer Menge vorliegt die eine maximale Aktivierung gewährleistet.



**Abbildung 24** Western Blot Analyse zur Induktion von Stat-1 und der Phosphorylierung von Stat-1 am Tyrosinrest 701 und am Serinrest 727 während einer *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation in Normoxie (Nox) und Hypoxie (Hox); Densitometrische Auswertung der Stat-1 Induktion (A), Stat-1 Phosphorylierung Tyr 701 (B)/ Ser 727 (C); Repräsentative Western Blots (D) (n=3, \*= p $\leq$  0,05).

#### 5.4.5 Vergleich der Apoptoseinduktion durch Staurosporin während einer *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach IFN- $\gamma$ Stimulation in Normoxie und Hypoxie

Da für Chlamydien beschrieben wurde, dass sie die Apoptose der Wirtszelle blockieren, sollte untersucht werden, ob auch die reaktivierten Chlamydien in der Lage sind, die Apoptoseinduktion mittels Staurosporin zu verhindern. Zu diesem Zweck wurden zu den Zeitpunkten 2 d und 4 d die Zellen für 4 h mit 2  $\mu$ M Staurosporin behandelt und die Apoptoserate bestimmt. In Abbildung 25 ist die Auswertung der Bildanalyse exemplarisch für den Zeitpunkt 2 d dargestellt. Es wird deutlich, dass die Zellen für die Induktion der Apoptose durch IFN- $\gamma$  unter normoxischen aber nicht hypoxischen Bedingungen sensibilisiert werden. Weiterhin konnte kein Einfluss der persistenten Chlamydien auf die Apoptoseinduktion in den Wirtszellen gezeigt werden. Die Apoptoserate ist mit  $29 \pm 4$  % unter IFN- $\gamma$  Einfluss gegenüber  $25 \pm 4$  % unter IFN- $\gamma$  mit persistenten Chlamydien vergleichbar.



**Abbildung 25** Lichtmikroskopische Auswertung der Apoptoseinduktion während einer IFN- $\gamma$  induzierten persistenten Chlamydieninfektion in HeLa-229 Zellen unter Normoxie (Nox) und Hypoxie (Hox) (n=3, \*= p $\leq$  0,05).

## 6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis zur Pathogenese der genitalen *C. trachomatis* Infektion bei der Frau zu erlangen. Dabei standen zwei Fragestellungen im Mittelpunkt 1) die Darstellung des Infektionsverlaufes in humanem Gewebe und primären epithelialen Eileiterzellen, 2) die Unterschiede im Infektionsverlauf nach IFN- $\gamma$  Stimulation unter Normoxie und Hypoxie. Im ersten Teilbereich wurde ein Zellkulturmodell sowie ein Gewebemodell auf der Basis von humanen Eileitern, für die *C. trachomatis* Infektion, etabliert. Der Verlauf der Infektion wurde mit der Infektion in dem seit vielen Jahren etabliertem HeLa-229 Zellkulturmodell verglichen. Hierbei lag ein Augenmerk auf der Darstellung morphologischer Unterschiede. Ein weiteres Augenmerk lag auf den Unterschieden in der Immunreaktion, wie der Aktivierung von MAP-Kinasen oder der Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen während der Infektion.

Im zweiten Teilbereich wurden Unterschiede im *C. trachomatis* Infektionsverlauf während einer IFN- $\gamma$  Stimulation zwischen Normoxie und Hypoxie analysiert. Weiterhin wurden zum ersten Mal die Wirt-Pathogen Interaktionen während der hypoxischen Reaktivierung einer IFN- $\gamma$  induzierten Persistenz untersucht. Hierbei standen besonders die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 sowie die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und MCP-1 im Vordergrund. In einem weiteren Teilbereich wurden zelluläre Eigenschaften von primären epithelialen Eileiterzellen im Vergleich zu HeLa-229 Zellen charakterisiert. Dabei wurde die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  sowie die Suszeptibilität für die Staurosporin induzierten Apoptose näher analysiert.

## 6.1 Vergleich der *C. trachomatis* Infektion in primären epithelialen Eileiterzellen, HeLa-229 Zellen und Eileitergewebe

*C. trachomatis* ist ein Gram-negatives obligat intrazelluläres Bakterium. Mit ca. 92 Millionen Neuinfektionen pro Jahr, von denen 60 % Frauen sind, handelt es sich um die weltweit häufigste sexuell-übertragbare Erkrankung<sup>28, 159-161</sup>. Eine langjährige unbehandelte Infektion kann in einem Eileiterverschluss resultieren, wodurch der Transport der Eizelle innerhalb des Eileiters nicht mehr gewährleistet werden kann und die Patientinnen infertil werden<sup>27, 162</sup>.

Die meisten Infektionsmodelle für *C. trachomatis* basieren auf Zellkultur- oder Mausmodellen. Diese Modelle verfügen über einige Vorteile, wie beispielsweise die gute Verfügbarkeit oder die Reproduzierbarkeit. Nachteilig ist bei Nutzung eines Mausmodells vor allem die Speziesbarriere und die Unterschiede in der Immunantwort auf eine *C. trachomatis* Infektion zwischen Mensch und Maus<sup>2, 107, 109</sup>. Diese Nachteile entfallen bei der Nutzung von humanen Zellkulturmodellen. Sie basieren überwiegend auf Karzinomzelllinien wie HeLa-229 oder HEP-2. Im Vergleich zu Primärzellen weisen Karzinomzelllinien deutliche Unterschiede in den metabolischen Funktionen, der Teilungsrate sowie der Apoptose-Regulation auf<sup>111</sup>. Es wurde bislang nicht gezeigt, welchen Einfluss diese zellulären Eigenschaften auf die Chlamydieninfektion haben. Um diese Nachteile zu überwinden, war eine Zielsetzung der Arbeit, möglichst lebensnahe Infektionsmodelle auf der Basis von humanen Eileitern zu entwickeln. Zum besseren Verständnis der Pathogenese von *C. trachomatis* Infektionen, sollte der intrazelluläre Entwicklungszyklus in den neu etablierten Modellen charakterisiert und mit dem etabliertem HeLa-229 Modell verglichen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, ein Zellkulturmodell auf der Basis von primären epithelialen Eileiterzellen zu etablieren. Bei der Infektion dieser Zellen fielen deutliche Unterschiede im Vergleich zu HeLa-229 Zellen auf. So konnten zwar intrazelluläre Chlamydien Einschlüsse nachgewiesen werden, die morphologisch denen einer produktiven Infektion in HeLa-229 entsprachen.

Sie wiesen aber mikroskopisch sichtbar vergrößerte Retikularkörper auf, die morphologisch aberranten Retikularkörpern entsprachen. Außerdem konnten nach 48 h keine infektiösen Chlamydien beobachtet werden weshalb hier von einer „Persistenz-ähnlichen“ Infektion zu sprechen ist. Der Mechanismus der zu einem „Persistenz-ähnlichen“ Infektionsverlauf in primären epithelialen Eileiterzellen führt,

ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht verstanden. Es ist bekannt, dass während eines Mangels an Nährstoffen häufig ein persistenter Phänotyp beobachtet werden kann<sup>51-53</sup>. Da die primären epithelialen Eileiterzellen während der Kulturdauer zu mesenchymalen Stromazellen re-differenzieren, wäre ein Mangel an essentiellen Nährstoffen wie z.B. ATP aufgrund des Zellmetabolismus während der Differenzierungsprozesse denkbar. Für diese These spricht, dass in 16 Tage alten Zellen, in denen der überwiegende Teil der Zellen positiv für mesenchymale Stromazell-Marker ist, eine produktive Infektion beobachtet werden konnte.

Pattappa *et al.* konnten zeigen, dass mesenchymale Stromazellen einen Metabolismus aufweisen, der in zentralen Aspekten dem von Karzinomzellen entspricht<sup>163</sup>. So konnte in ihnen ebenso wie in Karzinomzellen der Warburg Effekt detektiert werden. Zellen dieses Typs nutzen neben der oxydativen Phosphorylierung auch die Glykolyse zur Energiegewinnung, aufgrund dessen sie über eine höhere ATP-Generierung verfügen<sup>163</sup>. Dagegen konnte für die humane Endosalpinx eine Energiegewinnung über die oxidative Phosphorylierung gezeigt werden<sup>164</sup>. Da die primären epithelialen Eileiterzellen aus der Endosalpinx stammen, nutzen sie vermutlich ebenfalls nur die oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung. Es scheint demnach, dass nach der Re-Differenzierung zu mesenchymalen Stromazellen mehr ATP produziert wird und somit auch für die Chlamydien zur Verfügung steht. Dies könnte ein Grund für die Veränderung im Infektionsverlauf von „Persistenz-ähnlich“ in primären Epithelzellen zu produktiver Infektion in mesenchymalen Stromazellen sein.

Eine weitere Möglichkeit ist die Existenz von endogenen Persistenz induzierenden Mechanismen. Ihre Existenz wurde bereits für andere primäre Zellisolate beschrieben. Rödel *et al.* dokumentierten in Fibroblasten einen Mechanismus, der über die Sekretion von endogenem IFN- $\beta$  zur Persistenz führte<sup>54</sup>. Sie konnten zeigen, dass eine *C. trachomatis* Infektion von Fibroblasten zu einer Sekretion von IFN- $\beta$  führt, welches in einer vermehrten Expression derIDO resultierte. Dadurch wurde der Gehalt an Tryptophan reduziert, wodurch chlamydiale Persistenz induziert wurde<sup>54</sup>. Die endogene Expression von IFN- $\beta$  nach Infektion konnte aber nicht in HeLa-229 Zellen detektiert werden<sup>54</sup>. Möglicherweise ist dieser Persistenz induzierende Signalweg in HeLa-229 Zellen nicht existent bzw. die Regulation unterscheidet sich gegenüber der in Primärzellen. Neben der Persistenzinduktion durch IFN- $\beta$  sind noch weitere Faktoren der primären Persistenz in Zellen

beschrieben. So konnten Koehler *et al.* in humanen Monozyten ebenfalls ohne die Zugabe von exogenen Faktoren einen persistenten Phänotyp nachweisen<sup>55</sup>. Im Gegensatz zu dem beschriebenen Mechanismus in Fibroblasten, konnte in Monozyten jedoch keine mechanistische Erklärung gefunden werden.

Neben dem primären Zellkulturmodell wurde ein Gewebemodell auf der Basis von humanen Eileitern etabliert<sup>165</sup>. Dieses zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass die Wirt-Pathogen Interaktionen in der physiologischen Gewebszusammensetzung untersucht werden kann. Nach Infektion mit *C. trachomatis* wies das Eileiterepithel morphologisch deutliche Veränderungen auf. So konnte großflächig beschädigtes Epithel mit vereinzelt lysierten Zellen beobachtet werden. Diese Tatsache deutete darauf hin, dass außer der Zellyse durch die Chlamydien noch weitere Faktoren an den Schädigungen des Eileiterepithels beteiligt sind.

Neben den REM/ TEM Untersuchungen wurde die Expression proinflammatorischer Zytokine auf mRNA Ebene während der Infektion von Eileitergewebe bestimmt. Hierbei konnte eine signifikante Induktion der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und MCP-1 sowie eine vermehrte Induktion von IL-8 beobachtet werden. Im Vergleich dazu konnten in HeLa-229 Zellen während der Primärinfektion nur eine signifikante Induktion der Zytokine IL-6 und IL-8 detektiert werden.

Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten in denen für HEP-2 Zellen, HeLa-229 Zellen und humane Eileiter gezeigt werden konnte, dass durch eine *C. trachomatis* Infektion IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 induziert werden<sup>58, 62, 63</sup>. Dabei kam der Freisetzung von IL-1 $\alpha$  eine besondere Bedeutung zu. So konnte Birkelund *et al.* zeigen, dass exogen zugeführtes oder auch endogen durch eine *C. trachomatis* Infektion gebildetes IL-1 $\alpha$  zu einer Schädigung des Eileiterepithels und dem Verlust der zilienträgenden Zellen führen<sup>58</sup>. Neben der durch Cooper *et al.* beschriebenen durch Chlamydien verursachten Zellyse<sup>166</sup>, könnte dies einer der Gründe für die beobachteten Schädigungen des Eileitergewebes in unserem Eileitermodell sein. Ein Grund für die vor allem langfristig auftretenden Veränderungen am Eileiterepithel könnte die vermehrte Expression von IL-6 sein<sup>167</sup>. Dieses Zytokin wirkt stimulierend auf die Fibrosierung und verringert in hohen Dosen >1 ng/ ml den Zilienschlag, wodurch der gezielte Transport im Eileiter beeinträchtigt und einem Eileiterverschluss Vorschub geleistet wird<sup>162, 168, 169</sup>.

Zum ersten Mal konnte in dieser Arbeit die vermehrte Expression von MCP-1 während einer *C. trachomatis* Infektion nachgewiesen werden. Hierbei handelt es

sich um ein kleines Molekül von 13 kD, dass bei Gewebeverletzungen oder Infektionen sekretiert wird<sup>161, 170</sup>. MCP-1 spielt als ein Chemokin für Monozyten bei der Initiierung einer Immunantwort eine entscheidende Rolle<sup>161, 170, 171</sup>. Summersgill *et al.* konnten bereits in *C. pneumoniae* infizierten HUVEC Zellen eine erhöhte Expression von MCP-1 zeigen<sup>172</sup>. Im Gegensatz dazu konnte diese für die *C. trachomatis* Serovare L2, A und E nicht beobachtet werden<sup>173</sup>. Die hier gezeigte Expression von MCP-1 im Gewebemodell impliziert, dass auch während einer *C. trachomatis* Infektion Monozyten an den Ort der Infektion geleitet werden können und die Entzündungsreaktion initiieren.

## 6.2 Verlauf einer *C. trachomatis* Infektion in Anwesenheit von IFN- $\gamma$ unter Hypoxie

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit dem Verlauf einer *C. trachomatis* Infektion während der Stimulation mit IFN- $\gamma$  unter Hypoxie. Die O<sub>2</sub>-Konzentration im Cervix beträgt *in vivo* 0,5-5 % und ist damit geringer als die in den meisten gängigen Modellen verwendeten 20 %<sup>175</sup>. Der Zustand der Hypoxie kann im weiblichen Urogenitaltrakt vor allem während der Menstruation oder aber während Infektionen und Entzündungsreaktionen auftreten<sup>174, 175</sup>. Die lokale O<sub>2</sub>-Konzentration kann den Verlauf einer *C. trachomatis* Infektion maßgeblich beeinflussen. So kann bei O<sub>2</sub>-Konzentrationen unter 4 % keine Persistenz von *C. trachomatis* durch IFN- $\gamma$  induziert werden<sup>57</sup>. Roth *et al.* konnten zeigen, dass eine reduzierte Aktivität von IFN- $\gamma$  aufgrund einer verminderten IFN- $\gamma$ -Rezeptorexpression als auch einer geringeren Phosphorylierung am Stat-1 Protein unter Hypoxie vorliegt<sup>57</sup>.

Weiterhin konnte eine reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 unter Hypoxie detektiert werden<sup>57</sup>. Ein Co-stimulatorischer Zusammenhang zwischen der ERK1/2 MAP-Kinase Aktivierung und der Expression von IFN- $\gamma$  induzierten Genen wurde bereits früher beschrieben<sup>160, 176, 177</sup>. Man nimmt an, dass sich eine verminderte Aktivierung der MAP-Kinasen unter Hypoxie negativ auf die IFN- $\gamma$  Effektivität auswirkt<sup>57</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls eine reduzierte Aktivierung der MAPK-Kinasen unter Hypoxie im Rahmen der Infektion mit *C. trachomatis* gezeigt werden. Dabei war die ERK1/2 Phosphorylierung signifikant verringert, während für p38 nur eine leicht verminderte Phosphorylierung nach IFN- $\gamma$  Stimulus gezeigt werden konnte. Während dessen konnten sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie nach Infektion und Stimulation mit IFN- $\gamma$  die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 gezeigt werden. Neben der Inhibierung der IFN- $\gamma$  induzierten Persistenz während einer Primärinfektion führen niedrige O<sub>2</sub> Konzentrationen auch zur Reaktivierung einer persistenten Infektion und zur erneuten Etablierung einer produktiven Infektion<sup>57</sup>. In dieser Arbeit wurde nun zum ersten Mal die Immunreaktion während der hypoxischen Reaktivierung in HeLa-229 Zellen untersucht. Dabei standen die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38, sowie die Expression pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MCP-1) im Fokus. Überraschenderweise konnte während der Reaktivierung im Gegensatz zur Primärinfektion keine Aktivierung von

MAP-Kinasen oder eine vermehrte Zytokin-Expression detektiert werden. Die Zellen scheinen somit nicht in der Lage zu sein, eine reaktivierte Infektion unter Hypoxie zu erkennen und aktiv zu bekämpfen. Vermeintlich gibt es Unterschiede in der Erkennung einer Primärinfektion und der Reaktivierung einer intrazellulären Infektion.

Während einer Primärinfektion kommen die Erreger direkt mit Oberflächenrezeptoren wie den TLR's in Kontakt. Man weiß, dass verschiedene PRR's wie TLR2 und TLR4 bestimmte PAMP's, wie LPS, Hsp60 oder MOMP der Chlamydien erkennen und eine Immunreaktion einleiten<sup>6,9,15,28,65,66</sup>. Als intrazellulärer PRR wurde für *C. trachomatis* Erkennung NOD1 beschrieben<sup>178</sup>. So konnte eine Aktivierung des NOD1 Rezeptors durch chlamydiales Peptidoglycan beobachtet werden, welche über NF-κB zur Expression von IL-8 führte<sup>178</sup>.

Während der Reaktivierung liegen die Chlamydien bereits intrazellulär in ihren Einschlüssen vor, wodurch diese ausschließlich über intrazelluläre PRR's wie NOD1 und TLR9 erkannt werden können. Anscheinend findet eine intrazelluläre Erkennung im Rahmen der Reaktivierung aber nicht oder nur unzureichend statt. Man könnte sich vorstellen, dass keine PAMP's aus dem Einschluss zu den intrazellulären PRR's vordringen und somit keine zelluläre Aktivierung ausgelöst wird.

Möglicherweise werden hypoxisch reaktivierte Chlamydien aber auch nicht erkannt, weil sie Mechanismen entwickelt haben, die gezielt eine Aktivierung der Rezeptoren bzw. die Signaltransduktion und Expression von Effektormolekülen unterbinden. Für die Primärinfektion der Chlamydien wurden bereits Möglichkeiten zur Minimierung einer Immunantwort beschrieben. Dabei sind Chlamydien in der Lage, die IFN-γ induzierte Hochregulation von MHC-II Rezeptoren zu unterbinden, NF-κB proteolytisch zu degradieren oder die Apoptose zu verhindern<sup>179</sup>. Es ist jedoch unklar, wie sich diese Mechanismen während der hypoxischen Reaktivierung verhalten. Weiterhin gibt es bis jetzt keinen bekannten Mechanismus wie die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine während einer Chlamydieninfektion unterbunden wird.

Es ist jedoch für andere intrazelluläre Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Ehrlichia chaffeensis* beschrieben, dass sie in der Lage sind, die Immunreaktion des Wirtes zu umgehen, indem die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen unterbunden oder aber die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 initiiert wird<sup>180, 181</sup>. Es ist daher vorstellbar, dass einige chlamydiale Gene mit bis

dato unbekannter Funktion, Proteine kodieren, die eine Immunmodulation ermöglichen. Da es nach Überwindung der Persistenz nicht zu einer Aktivierung des Immunsystems kommt, können sie ungehindert vom humanen Immunsystem proliferieren. Neben diesen Möglichkeiten könnte auch die O<sub>2</sub>-Konzentration ein Grund für das Ausbleiben einer Immunreaktion sein. Es konnte gezeigt werden, dass p38 nach einer längeren Inkubation der HeLa-229 Zellen in Hypoxie unabhängig von einer Reaktivierung oder IFN- $\gamma$  Stimulus phosphoryliert war. Währenddessen konnte aber keine Expression pro-inflammatorischen Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6) detektiert werden.

Für die p38 MAP-Kinase ist beschrieben, dass sie durch verschiedene Stimuli (bakterielles LPS, Zytokine) aktiviert werden kann und direkten Einfluss auf entzündliche Prozesse wie die Sekretion von verschiedenen Zytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) aber auch auf die Expression von Oberflächenmarkern (VCAM-1) und Transkriptionsfaktoren (ATF-1, ATF-2) hat<sup>182-185</sup>. Weiterhin wird diskutiert, dass p38 nach Aktivierung abhängig vom Zellzyklus sowie von den Mikrobedingungen (IL-1 Stimulation) verschiedene pro- oder anti-inflammatorische Effekte ausübt<sup>186</sup>. Eventuell führt eine anhaltende hypoxische Stimulation zu anti-inflammatorischen Effekten von p38, wodurch eine pro-inflammatorische Immunantwort unterdrückt wird. In der Literatur diskutierte Mechanismen sind die *de novo* Transkription von Genen, die Stabilisierung von mRNA oder auch post-translationelle Modifikation wie die Phosphorylierung<sup>186</sup>. Dies wäre ein neuer Ansatz und könnte generell zum Verständnis der Immunantwort in hypoxischen Gewebe beitragen.

Da aber bereits Unterschiede in der Infektion zwischen HeLa-229 Zellen und Primärzellen auftraten, bleibt die Frage, ob sich die Reaktivierung und die fehlende Immunantwort in Primärzellen in der gleichen Form darstellen. So führte die *C. trachomatis* Infektion von Primärzellen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zu einem „Persistenz-ähnlichen“ Zustand.

### 6.3 Vergleich der zellulären Eigenschaften von Primärzellen und HeLa-229 Zellen

Neben dem Vergleich des Verlaufes einer intrazellulären *C. trachomatis* Infektion wurden weitere Eigenschaften von primären epithelialen Eileiterzellen und HeLa-229 Zellen verglichen. Der Fokus lag hierbei auf der Induktion von HIF-1 $\alpha$  sowie der Induktion und Phosphorylierung von Stat-1 nach IFN- $\gamma$  Stimulus. Weiterhin wurden die Auswirkungen der Hypoxie auf die Staurosporin induzierte Apoptose mit und ohne IFN- $\gamma$  untersucht. Im Vergleich der Primärzellen mit HeLa-229 Zellen konnte in beiden Zelltypen eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie gezeigt werden. Jedoch war in Primärzellen bereits unter Normoxie eine basale HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung zu detektieren. Bei der basalen Stabilisierung handelt es sich möglicherweise um ein generelles Erscheinungsbild in Primärzellen, da auch verschiedene andere Arbeitsgruppen eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  unter Normoxie in primären HUVEC, Hautfibroblasten sowie embryonalen Stammzellen nachweisen konnten<sup>187, 188, 189</sup>. Demgegenüber konnten Harris *et al.* in gesundem humanen Gewebe (Haut, Uterus Thymus, etc.) unter Normoxie nur eine schwache HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung detektieren<sup>190</sup>.

Da HIF-1 $\alpha$  über 500 verschiedene Gene aus allen Bereichen des Zellmetabolismus, wie der Energieversorgung, Glukose Aufnahme und Apoptose reguliert, könnte eine Stabilisierung starke Auswirkungen auf die Effektivität einer Infektion haben. So wurde für *C. pneumoniae* und *Bartonella henselae* beschrieben, dass sie von einer HIF-1 $\alpha$  Induktion profitieren<sup>132, 133</sup>.

Während der IFN- $\gamma$  Stimulation konnten in beiden Zelltypen ein vergleichbares Induktions- und Phosphorylierungs-Muster des Stat-1 Proteins beobachtet werden. Unterschiede konnten dagegen in der Apoptoseinduktion nach Staurosporin Behandlung gezeigt werden. Es wurde in Primärzellen ohne IFN- $\gamma$  Stimulation eine signifikant erhöhte Apoptoserate unter Hypoxie im Vergleich zu normoxisch behandelten Zellen beobachtet. Hingegen zeigten sich in HeLa-229 Zellen unter Normoxie erhöhte Apoptoseraten. Während einer IFN- $\gamma$  Stimulation war die Apoptoserate sowohl in den Primärzellen als auch in den HeLa-229 unter Normoxie am Höchsten. Auffällig war eine ca. 30 % erhöhte Apoptoserate in HeLa-229 Zellen unter Normoxie die gegenüber den Primärzellen auf eine erhöhte Suszeptibilität für die Staurosporin induzierte Apoptose hindeutet.

Ein möglicher Grund, warum ohne IFN- $\gamma$  Stimulation in den HeLa-229 Zellen unter Normoxie die höchste Apoptoserate gemessen wurden, ist die für Karzinomzellen beschriebene Induktion der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine unter Hypoxie<sup>111</sup>. Diese verhindern die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C nach einem apoptotischen Stimulus. Es wurde durch die Induktion der Bcl-2 Proteine unter Hypoxie für humane Endothelzellen aus Tumoren eine etwa 20 % Abnahme der Apoptoserate unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie beschrieben<sup>191</sup>.

Denkbar ist, dass es sich bei dieser Beobachtung um ein Artefakt aus der Nutzung einer Karzinomzelllinie handelt. Denn im Gegensatz dazu wiesen Primärzellen ohne IFN- $\gamma$  Stimulus unter Hypoxie die höchsten Apoptoseraten auf. Möglicherweise tritt Hypoxie, welche oftmals gleichbedeutend mit einer Infektion oder anderen pathologischen Prozessen ist, als Stressfaktor auf und begünstigt die Apoptose<sup>192</sup>. Bei der Stimulation der Zellen mit IFN- $\gamma$  kommt es dagegen zu einem weiteren Stressfaktor, der unter Hypoxie eine reduzierte Effektivität aufweist und somit in den Zellen eine höhere Apoptoseinduktion unter Normoxie beobachtet werden kann.

#### 6.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, ein Zellkulturmodell auf der Basis von humanem Eileitergewebe zu etablieren. Dieses Modell weist in der ersten Woche nach Isolation primäre epitheliale Eileiterzellen auf, welche aufgrund einer schnell voranschreitenden Differenzierung zu mesenchymalen Stromazellen nicht für längerfristige Versuchsansätze geeignet sind. Es ist daher ein zukünftiges Ziel, die Zellkultur zu stabilisieren. Eine Möglichkeit dies zu erreichen, wäre die Verwendung von Transwell-Inserts. Levanon *et al.* konnten in diesen eine stabile Kultur mit zilientragenden und sekretorischen Epithelzellen dokumentieren<sup>158</sup>.

Der größte Vorteil der primären epithelialen Eileiterzellkultur ist die Nutzung von gesunden Epithelzellen, die relativ natürlich auf die entsprechenden Stimuli wie Hypoxie, IFN- $\gamma$  oder eine Infektion reagieren. Dieses Modell stellt ein Bindeglied zwischen den HeLa-229 Zellkulturmodellen und den Eileitergewebemodellen dar. Es ermöglicht vergleichende Untersuchungen mit HeLa-229 Zellen sowie die Analyse von relevanten Signalwegen für die *C. trachomatis* Infektion unter verschiedenen O<sub>2</sub>-Konzentrationen.

Besonders interessant ist der „Persistenz-ähnliche“ Verlauf der *C. trachomatis* Infektion in primären epithelialen Eileiterzellen und die damit verbundenen

Mechanismen sowie der Einfluss der Re-Differenzierung. Außerdem ermöglicht eine Primärzellkultur Vergleiche mit bestehenden Zellkulturmodellen bzgl. der Wirt-Pathogen Interaktionen. Dies könnte von Interesse sein für die Analyse von Pathogen-assoziierten Veränderungen (Transkriptom) oder Zell-assoziierten Änderungen des Stoffwechsels (Metabolom) bzw. der Entzündungsantwort.

Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der Nutzung von Eileitern verschiedener Spenderinnen, aufgrund dessen eine breite Basis an genetisch verschiedenen Primärzellkulturen für die Vergleiche zur Verfügung steht. Weiterhin könnte der Einfluss von Hormonen auf die Infektion analysiert werden. In der Literatur wurde beschrieben, dass diese einen gravierenden Einfluss auf die Zellmorphologie haben, trotzdem werden sie in den meisten Modellen nicht berücksichtigt<sup>193-196</sup>. Ferner wurden Co-Infektionen mit anderen physiologisch-vorkommenden Bakterien, die gerade in Zusammenhang mit genitalen Chlamydieninfektionen wichtig sein können, bisher nicht durchgeführt<sup>196</sup>. Da Chlamydien über einen Tryptophan-Synthase Komplex verfügen, der es ihnen ermöglicht, Tryptophan aus Indol zu synthetisieren stellt das Mikrobiom eine wichtige Einflussgröße der genitalen Infektion dar<sup>197</sup>. Urogenitale Bakterien, die Indol produzieren können und aufgrund dessen für eine Co-Infektion in Frage kommen würden, wären *Peptostreptococcus sp.*, *Fusobacterium sp.* oder *Bacteriodes sp.*<sup>198-200</sup>.

Außerdem können weitere Untersuchungen zu weiteren Persistenzinduktoren durchgeführt und auf ihre Gültigkeit in primären Zellen überprüft werden. Für HeLa-229 Modelle wurden bis jetzt beispielsweise die Limitierung von Nährstoffen wie Eisen oder sub-inhibitorische Antibiotika-Konzentrationen als Induktoren beschrieben<sup>51-53</sup>.

Neben dem primären Zellkulturmodell ist es gelungen, ein Eileitergewebe-Modell zu etablieren, welches die Untersuchung von Wirt-Pathogen Interaktionen unter komplexen Bedingungen ermöglicht. Zusammen mit der Möglichkeit, die Interaktionen auch unter verschiedenen O<sub>2</sub>-Konzentrationen beobachten zu können, ergibt sich ein Modell, welches den *in vivo* Bedingungen deutlich ähnlicher ist als viele der bereits existierenden Modelle. Neben der Beobachtung von Wirt-Pathogen Interaktionen eignet es sich vor allem zur Untersuchung von Therapiemöglichkeiten (z.B. Antibiotika) unter möglichst lebensnahen Bedingungen. Für Untersuchungen dieser Art ist dieses Modell sehr gut geeignet, da es auf der einen Seite über eine komplexe Zellzusammensetzung verfügt und auf der anderen Seite der Einfluss von

Antibiotika auf die Chlamydien direkt nachgewiesen werden kann. Da es im Rahmen dieser Arbeit gelang intrazelluläre Chlamydieneinschlüsse mit Hilfe der TEM zu visualisieren, könnte man in weiterführenden Versuchen den Einfluss der Antibiotika anhand der Morphologie der Chlamydien in den Einschlüssen analysieren. Über den Verlauf der Chlamydieninfektion ließe sich bestimmen, ob die Chlamydien überleben, getötet oder persistent werden. Mithilfe dieser Ergebnisse ließen sich Erfolgchancen für die Therapie herleiten. Weiterhin kann mit Hilfe des REM auch der Einfluss der Therapie auf das Epithel beobachtet werden.

Besonders interessant sind Experimente zur Antibiotikatherapie unter verschiedenen O<sub>2</sub>-Konzentrationen, denn Shima *et al.* konnten in einem Zellkulturmodell Unterschiede in der Effektivität von Antibiotika gegen *C. trachomatis* unter Normoxie und Hypoxie detektieren<sup>201</sup>.

Aufgrund der nach 48-72 h einsetzenden Zelluntergänge war es nicht möglich, die chlamydiale Persistenz in dem Gewebemodell darzustellen. Diese Untergänge basieren vermutlich auf der inadäquaten Versorgung mit Nährstoffen im aktuellen Versuchsaufbau. Eine Verbesserung könnte in der Zukunft beispielsweise über eine Verkleinerung der Probenstücke oder durch eine mechanische Bewegung während der Infektion erreicht werden.

Die etablierten Infektionsmodelle sind jedoch nicht allein auf Chlamydien beschränkt. So könnten sie auch für die Untersuchungen von Wirt-Pathogen Interaktionen mit anderen urogenital vorkommenden Bakterien, wie *Neisseria gonorrhoeae* oder *Mycoplasma genitalium* eingesetzt werden.

## 6.5 Schlussbetrachtung

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, zwei Infektionsmodelle für *C. trachomatis* auf der Basis von humanen Eileitern zu etablieren. Damit wurde eine Grundlage für die weitere Erforschung der genitalen Chlamydien Infektion unter möglichst lebensnahen Bedingungen geschaffen. Beide Modelle haben genau wie die bereits etablierten Karzinomzell- und Tiermodelle ihre Vor- und Nachteile. Die neu etablierten Modelle zeichnen sich gegenüber den Zellkulturmodellen durch eine deutlich erhöhte Komplexität aus, die eine bessere Vergleichbarkeit mit den *in vivo* Bedingungen zulässt. Der größte Nachteil ist die verminderte Verfügbarkeit sowie die kurze Kulturdauer der Zellen, welche längerfristige Versuche derzeit noch nicht möglich machen. Für diese Versuche bieten sich bis auf weiteres nur immortalisierte Zelllinien an, da diese auch über längere Zeiten kultivierbar sind. Sie ermöglichen weitergehende Untersuchungen, wie z.B. zur Reaktivierung einer persistenten Chlamydien Infektion. Ein weiterer Nachteil der Zell- und Gewebemodelle ergibt sich aus der Abwesenheit einer sekundären Immunreaktion, zu der Immunzellen aus dem Blut einwandern müssten. Für Untersuchungen dieser Art sind derzeit nur Tierversuche geeignet. Es steht aber außer Frage, dass derart gewonnene Ergebnisse sorgfältig geprüft und wenn möglich zumindest in einem humanen Primärzellmodell wiederholt werden sollten.

Eine weitere Limitation besteht möglicherweise in den verwendeten Eileitern. Es wurden im Laufe der Arbeit nur anatomisch unauffällige Eileiter von pre-menopausalen Frauen verwendet. Da aber keine weitere Unterteilung nach Alter, Menstruationszyklus oder vorherigen Krankheiten unternommen wurde, ist unklar, ob sich diese Faktoren auf die Infektiosität und die Immunantwort auswirken können.

Die Infektion mit *C. trachomatis* konnte in allen Modellen nachgewiesen werden. Dabei war jedoch bereits der Verlauf der Primärinfektion sehr unterschiedlich. So stellt sich die Frage nach den Persistenzinduktoren in primären epithelialen Eileiterzellen sowie den entsprechenden Immunreaktionen (MAP-Kinase Phosphorylierung, Zytokin Expression). Des Weiteren steht die Induktion einer Chlamydien Persistenz in humanen Eileitern mit Visualisierung des entsprechendem Phänotyps und Detektion der primären Immunantwort noch aus. Von großem Interesse ist dabei, ob eine MAP-Kinase Aktivierung sowie eine Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und MCP-1 detektiert werden kann und wie sich diese

über die Zeit verändert. Ebenso ist die Etablierung eines Reaktivierungs-Modelles und die damit einhergehenden Veränderungen in der MAP-Kinase Aktivierung und Zytokininduktion sowohl im primären Zellkulturmodell als auch im Eileitergewebemodell ein Ziel für zukünftige Experimente. Sollte sich auch in diesen Modellen zeigen, dass die Reaktivierung wie sie in HeLa-229 Zellen gefunden wurde, keine zelluläre Immunreaktion hervorruft, wäre ein weiteres Fragment zum Verständnis von chronischen Infektionsverläufen gefunden.

Ziel bei der Weiterführung des Projektes ist es, die Pathogenese von *C. trachomatis* in humanen Eileitern besser zu verstehen und neue Therapien zu finden.

Während der Versuche ist weiterhin deutlich geworden, dass es Unterschiede im Verhalten der Zellen unter Normoxie und Hypoxie gibt. So konnte unter Hypoxie eine deutlich verringerte Aktivierung der Zellen durch IFN- $\gamma$  Stimulus detektiert werden. Ebenso hat es den Anschein, als wenn eine längerfristige Kultivierung von Zellen unter hypoxischen Bedingungen einen anderen Einfluss auf die Aktivierung der p38 MAP-Kinase hat als die kurzfristige Stimulation mit Hypoxie. Es stellt sich die Frage, welche weiteren zellulären Mechanismen betroffen sind und ob sich diese in HeLa-229 Zellen erzeugten Resultate in Primärzellen reproduzieren lassen.

Ein wichtiger Schritt zum besseren Verständnis von genitalen Chlamydien Infektionen ist mit der Reaktivierung von Chlamydien unter Hypoxie gelungen. Da dies interessanterweise ohne pro-inflammatorische Immunantwort der Wirtszelle geschieht, könnte die Reaktivierung im Verlauf einer Infektion ein wiederkehrendes Phänomen sein, das weitestgehend unerkannt vom Immunsystem abläuft. In weiteren Experimenten bleibt zu klären, ob die ausbleibende Immunantwort bei jeder Art von Reaktivierung auftritt oder auf eine hypoxische Reaktivierung beschränkt ist.

## Literaturverzeichnis

1. Halberstaedter L, von Prowazek S. Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. *Arbb Kaiserl Gesundheitsamte* 1907;(26):44-4.
2. Patton DL, Landers DV, Schachter J. Experimental Chlamydia trachomatis salpingitis in mice: initial studies on the characterization of the leukocyte response to chlamydial infection. *J Infect Dis* 1989;159(6):1105-1110.
3. Patton DL, Sweeney YT, Kuo CC. Demonstration of delayed hypersensitivity in Chlamydia trachomatis salpingitis in monkeys: a pathogenic mechanism of tubal damage. *J Infect Dis* 1994;169(3):680-683.
4. Tonello A, Poli G. Tubal ectopic pregnancy: macrophages under the microscope. *Hum Reprod* 2007;22(10):2577-2584.
5. Vanrompay D, Andersen AA, Ducatelle R, Haesebrouck F. Serotyping of European isolates of Chlamydia psittaci from poultry and other birds. *J Clin Microbiol* 1993;31(1):134-137.
6. Girjes AA, Hugall AF, Timms P, Lavin MF. Two distinct forms of Chlamydia psittaci associated with disease and infertility in Phascolarctos cinereus (koala). *Infect Immun* 1988;56(8):1897-1900.
7. Spears P, Storz J. Biotyping of Chlamydia psittaci based on inclusion morphology and response to diethylaminoethyl-dextran and cycloheximide. *Infect Immun* 1979;24(1):224-232.
8. Sachse K, Grossmann E, Jager C, Diller R, Hotzel H. Detection of Chlamydia suis from clinical specimens: comparison of PCR, antigen ELISA, and culture. *J Microbiol Methods* 2003;54(2):233-238.
9. Borel N, Thoma R, Spaeni P et al. Chlamydia-related abortions in cattle from Graubunden, Switzerland. *Vet Pathol* 2006;43(5):702-708.
10. Blumer S, Greub G, Waldvogel A et al. Waddlia, Parachlamydia and Chlamydiaceae in bovine abortion. *Vet Microbiol* 2011;152(3-4):385-393.
11. Myers GS, Mathews SA, Eppinger M et al. Evidence that human Chlamydia pneumoniae was zoonotically acquired. *J Bacteriol* 2009;191(23):7225-7233.
12. Wong SY, Gray ES, Buxton D, Finlayson J, Johnson FW. Acute placentitis and spontaneous abortion caused by chlamydia psittaci of sheep origin: a histological and ultrastructural study. *J Clin Pathol* 1985;38(6):707-711.
13. Meijer A, Brandenburg A, de VJ, Beentjes J, Roholl P, Dercksen D. Chlamydia abortus infection in a pregnant woman associated with indirect contact with infected goats. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23(6):487-490.

14. Vanrompay D, Harkinezhad T, van de Walle M et al. Chlamydophila psittaci transmission from pet birds to humans. *Emerg Infect Dis* 2007;13(7):1108-1110.
15. Rohde G, Straube E, Essig A, Reinhold P, Sachse K. Chlamydial zoonoses. *Dtsch Arztebl Int* 2010;107(10):174-180.
16. Grayston JT, Aldous MB, Easton A et al. Evidence that Chlamydia pneumoniae causes pneumonia and bronchitis. *J Infect Dis* 1993;168(5):1231-1235.
17. Kuo CC, Shor A, Campbell LA, Fukushi H, Patton DL, Grayston JT. Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis* 1993;167(4):841-849.
18. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ* 2004;82(11):844-851.
19. Mabey DC, Solomon AW, Foster A. Trachoma. *Lancet* 2003;362(9379):223-229.
20. Mabey D, Peeling RW. Lymphogranuloma venereum. *Sex Transm Infect* 2002;78(2):90-92.
21. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 2010;5(4):e10088.
22. European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe, 1990-2009. ECDC 2011, 2011
23. Stamm WE. Chlamydia trachomatis infections: progress and problems. *J Infect Dis* 1999;179 Suppl 2:S380-S383.
24. Rahm VA, Gnarpe H, Odland V. Chlamydia trachomatis among sexually active teenage girls. Lack of correlation between chlamydial infection, history of the patient and clinical signs of infection. *Br J Obstet Gynaecol* 1988;95(9):916-919.
25. Kosseim M, Brunham RC. Fallopian tube obstruction as a sequela to Chlamydia trachomatis infection. *Eur J Clin Microbiol* 1986;5(5):584-590.
26. Jones RB, Ardery BR, Hui SL, Cleary RE. Correlation between serum antichlamydial antibodies and tubal factor as a cause of infertility. *Fertil Steril* 1982;38(5):553-558.
27. Thompson SE, Washington AE. Epidemiology of sexually transmitted Chlamydia trachomatis infections. *Epidemiol Rev* 1983;5:96-123.
28. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Chlamydia on the rise in Europe: new ECDC report on sexually transmitted infections. 2011

29. Joki-Korpela P, Sahrakorpi N, Halttunen M, Surcel HM, Paavonen J, Tiitinen A. The role of *Chlamydia trachomatis* infection in male infertility. *Fertil Steril* 2009;91(4 Suppl):1448-1450.
30. Mazzoli S, Cai T, Addonisio P, Bechi A, Mondaini N, Bartoletti R. *Chlamydia trachomatis* infection is related to poor semen quality in young prostatitis patients. *Eur Urol* 2010;57(4):708-714.
31. Paavonen J, Saikku P, Vesterinen E, Aho K. *Chlamydia trachomatis* in acute salpingitis. *Br J Vener Dis* 1979;55(3):203-206.
32. Paavonen J. Pelvic inflammatory disease. *Semin Dermatol* 1990;9(2):126-132.
33. Centers for Disease Control and Prevention. Pelvic inflammatory disease. Sexually transmitted disease treatment guidelines. 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2002
34. Chernes TL, Wiesenfeld HC, Melan MA et al. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sex Transm Dis* 2006;33(12):747-752.
35. Debattista J, Timms P, Allan J, Allan J. Immunopathogenesis of *chlamydia trachomatis* infections in women. *Fertil Steril* 2003;79(6):1273-1287.
36. Matsumoto A. Fine structures of cell envelopes of *Chlamydia* organisms as revealed by freeze-etching and negative staining techniques. *J Bacteriol* 1973;116(3):1355-1363.
37. Wyrick PB. *Chlamydia trachomatis* persistence in vitro: an overview. *J Infect Dis* 2010;201 Suppl 2:S88-S95.
38. Omsland A, Sager J, Nair V, Sturdevant DE, Hackstadt T. Developmental stage-specific metabolic and transcriptional activity of *Chlamydia trachomatis* in an axenic medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(48):19781-19785.
39. Davis CH, Raulston JE, Wyrick PB. Protein disulfide isomerase, a component of the estrogen receptor complex, is associated with *Chlamydia trachomatis* serovar E attached to human endometrial epithelial cells. *Infect Immun* 2002;70(7):3413-3418.
40. Abdelrahman YM, Belland RJ. The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol Rev* 2005;29(5):949-959.
41. Clifton DR, Fields KA, Grieshaber SS et al. A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(27):10166-10171.

42. Scidmore MA, Rockey DD, Fischer ER, Heinzen RA, Hackstadt T. Vesicular interactions of the *Chlamydia trachomatis* inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry. *Infect Immun* 1996;64(12):5366-5372.
43. Plaunt MR, Hatch TP. Protein synthesis early in the developmental cycle of *Chlamydia psittaci*. *Infect Immun* 1988;56(12):3021-3025.
44. Karayiannis P, Hobson D. Amino acid requirements of a *Chlamydia trachomatis* genital strain in McCoy cell cultures. *J Clin Microbiol* 1981;13(3):427-432.
45. Shaw EI, Dooley CA, Fischer ER, Scidmore MA, Fields KA, Hackstadt T. Three temporal classes of gene expression during the *Chlamydia trachomatis* developmental cycle. *Mol Microbiol* 2000;37(4):913-925.
46. Iliffe-Lee ER, McClarty G. Glucose metabolism in *Chlamydia trachomatis*: the 'energy parasite' hypothesis revisited. *Mol Microbiol* 1999;33(1):177-187.
47. Nicholson TL, Olinger L, Chong K, Schoolnik G, Stephens RS. Global stage-specific gene regulation during the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 2003;185(10):3179-3189.
48. Hogan RJ, Mathews SA, Mukhopadhyay S, Summersgill JT, Timms P. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun* 2004;72(4):1843-1855.
49. Fischer SF, Harlander T, Vier J, Hacker G. Protection against CD95-induced apoptosis by chlamydial infection at a mitochondrial step. *Infect Immun* 2004;72(2):1107-1115.
50. Dean D, Powers VC. Persistent *Chlamydia trachomatis* infections resist apoptotic stimuli. *Infect Immun* 2001;69(4):2442-2447.
51. Tamura A, Matsumoto A, Manire GP, Higashi N. Electron microscopic observations on the structure of the envelopes of mature elementary bodies and developmental reticulate forms of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol* 1971;105(1):355-360.
52. Coles AM, Reynolds DJ, Harper A, Devitt A, Pearce JH. Low-nutrient induction of abnormal chlamydial development: a novel component of chlamydial pathogenesis? *FEMS Microbiol Lett* 1993;106(2):193-200.
53. Raulston JE. Response of *Chlamydia trachomatis* serovar E to iron restriction in vitro and evidence for iron-regulated chlamydial proteins. *Infect Immun* 1997;65(11):4539-4547.
54. Rodel J, Groh A, Hartmann M et al. Expression of interferon regulatory factors and indoleamine 2,3-dioxygenase in *Chlamydia trachomatis*-infected synovial fibroblasts. *Med Microbiol Immunol* 1999;187(4):205-212.

55. Koehler L, Nettelbreker E, Hudson AP et al. Ultrastructural and molecular analyses of the persistence of *Chlamydia trachomatis* (serovar K) in human monocytes. *Microb Pathog* 1997;22(3):133-142.
56. Askienazy-Elbhar M, Suchet JH. Persistent "silent" *Chlamydia trachomatis* female genital tract infections. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999;7(1-2):31-34.
57. Roth A, Konig P, van ZG et al. Hypoxia abrogates antichlamydial properties of IFN-gamma in human fallopian tube cells in vitro and ex vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(45):19502-19507.
58. Hvid M, Baczynska A, Deleuran B et al. Interleukin-1 is the initiator of Fallopian tube destruction during *Chlamydia trachomatis* infection. *Cell Microbiol* 2007;9(12):2795-2803.
59. Witkin SS. Immunological aspects of genital chlamydia infections. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16(6):865-874.
60. Van Voorhis WC, Barrett LK, Sweeney YT, Kuo CC, Patton DL. Repeated *Chlamydia trachomatis* infection of *Macaca nemestrina* fallopian tubes produces a Th1-like cytokine response associated with fibrosis and scarring. *Infect Immun* 1997;65(6):2175-2182.
61. Patton DL, Kuo CC, Wang SP, Halbert SA. Distal tubal obstruction induced by repeated *Chlamydia trachomatis* salpingeal infections in pig-tailed macaques. *J Infect Dis* 1987;155(6):1292-1299.
62. Chang Wen CFYPZG-M. Activation of MAPK/ERK and MAPK/P38 is Essential for Proinflammatory Response by *Chlamydia trachomatis*. *Progress in Biochemistry and Biophysics* 2008; 35(1):56-62.
63. Buchholz KR, Stephens RS. The extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway induces the inflammatory factor interleukin-8 following *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun* 2007;75(12):5924-5929.
64. Pearson G, Robinson F, Beers GT et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001;22(2):153-183.
65. Chen Z, Gibson TB, Robinson F et al. MAP kinases. *Chem Rev* 2001;101(8):2449-2476.
66. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000;351 Pt 2:289-305.
67. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68(2):320-344.
68. Wortzel I, Seger R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer* 2011;2(3):195-209.

69. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006;24(1):21-44.
70. Deng X, Ruvolo P, Carr B, May WS, Jr. Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(4):1578-1583.
71. Tamura Y, Simizu S, Osada H. The phosphorylation status and anti-apoptotic activity of Bcl-2 are regulated by ERK and protein phosphatase 2A on the mitochondria. *FEBS Lett* 2004;569(1-3):249-255.
72. Nowak G. Protein kinase C- $\alpha$  and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na<sup>+</sup> transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells. *J Biol Chem* 2002;277(45):43377-43388.
73. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994;372(6508):739-746.
74. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 2000;12(1):1-13.
75. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995;270(13):7420-7426.
76. Marie C, Roman-Roman S, Rawadi G. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in interleukin-8 production by human monocytes and polymorphonuclear cells stimulated with lipopolysaccharide or Mycoplasma fermentans membrane lipoproteins. *Infect Immun* 1999;67(2):688-693.
77. Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W et al. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 1996;15(8):1914-1923.
78. Magee DM, Williams DM, Smith JG et al. Role of CD8 T cells in primary Chlamydia infection. *Infect Immun* 1995;63(2):516-521.
79. Perry LL, Feilzer K, Caldwell HD. Immunity to Chlamydia trachomatis is mediated by T helper 1 cells through IFN- $\gamma$ -dependent and -independent pathways. *J Immunol* 1997;158(7):3344-3352.
80. Kinnunen A, Molander P, Morrison R et al. Chlamydial heat shock protein 60--specific T cells in inflamed salpingeal tissue. *Fertil Steril* 2002;77(1):162-166.
81. Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP. Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent Chlamydia trachomatis infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(9):3998-4002.

82. Beatty WL, Belanger TA, Desai AA, Morrison RP, Byrne GI. Role of tryptophan in gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Ann N Y Acad Sci* 1994;730:304-306.
83. Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol* 1995;58(4):373-381.
84. Todd I, Pujol-Borrell R, Hammond LJ, Bottazzo GF, Feldmann M. Interferon-gamma induces HLA-DR expression by thyroid epithelium. *Clin Exp Immunol* 1985;61(2):265-273.
85. Wong GH, Clark-Lewis I, Harris AW, Schrader JW. Effect of cloned interferon-gamma on expression of H-2 and Ia antigens on cell lines of hemopoietic, lymphoid, epithelial, fibroblastic and neuronal origin. *Eur J Immunol* 1984;14(1):52-56.
86. Wong GH, Clark-Lewis I, McKimm-Breschkin L, Harris AW, Schrader JW. Interferon-gamma induces enhanced expression of Ia and H-2 antigens on B lymphoid, macrophage, and myeloid cell lines. *J Immunol* 1983;131(2):788-793.
87. Kim SK, Angevine M, Demick K et al. Induction of HLA class I-restricted CD8+ CTLs specific for the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* in human genital tract infections. *J Immunol* 1999;162(11):6855-6866.
88. Hawkins RA, Rank RG, Kelly KA. A *Chlamydia trachomatis*-specific Th2 clone does not provide protection against a genital infection and displays reduced trafficking to the infected genital mucosa. *Infect Immun* 2002;70(9):5132-5139.
89. Vicetti Miguel RD, Harvey SA, Laframboise WA, Reighard SD, Matthews DB, Cherpes TL. Human Female Genital Tract Infection by the Obligate Intracellular Bacterium *Chlamydia trachomatis* Elicits Robust Type 2 Immunity. *PLoS One* 2013;8(3):e58565.
90. Takaoka A, Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* 2006;8(6):907-922.
91. Oritani K, Medina KL, Tomiyama Y et al. Limitin: An interferon-like cytokine that preferentially influences B-lymphocyte precursors. *Nat Med* 2000;6(6):659-666.
92. Lefevre F, Guillomot M, D'Andrea S, Battegay S, La BC. Interferon-delta: the first member of a novel type I interferon family. *Biochimie* 1998;80(8-9):779-788.
93. Roberts RM, Ealy AD, Alexenko AP, Han CS, Ezashi T. Trophoblast interferons. *Placenta* 1999;20(4):259-264.
94. Langer JA, Cutrone EC, Kotenko S. The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(1):33-48.

95. Lafleur DW, Nardelli B, Tsareva T et al. Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem* 2001;276(43):39765-39771.
96. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1997;15:563-591.
97. Vilcek J. Novel interferons. *Nat Immunol* 2003;4(1):8-9.
98. Decker T, Muller M, Stockinger S. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* 2005;5(9):675-687.
99. King NJ, Thomas SR. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(12):2167-2172.
100. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13(2):95-109.
101. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264(5164):1415-1421.
102. Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene* 2000;19(21):2619-2627.
103. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 1995;82(2):241-250.
104. Nguyen H, Ramana CV, Bayes J, Stark GR. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J Biol Chem* 2001;276(36):33361-33368.
105. Wormald S, Hilton DJ. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 2004;279(2):821-824.
106. Brunham RC, Rey-Ladino J. Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine. *Nat Rev Immunol* 2005;5(2):149-161.
107. Roshick C, Wood H, Caldwell HD, McClarty G. Comparison of gamma interferon-mediated antichlamydial defense mechanisms in human and mouse cells. *Infect Immun* 2006;74(1):225-238.
108. Nelson DE, Virok DP, Wood H et al. Chlamydial IFN-gamma immune evasion is linked to host infection tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(30):10658-10663.
109. Taylor GA, Feng CG, Sher A. p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* 2004;4(2):100-109.

110. Read TD, Brunham RC, Shen C et al. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res* 2000;28(6):1397-1406.
111. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
112. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 2008;134(5):703-707.
113. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006;3(3):187-197.
114. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 2008;7(1):11-20.
115. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009;9(9):609-617.
116. Boyer PD, Chance B, Ernster L, Mitchell P, Racker E, Slater EC. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Annu Rev Biochem* 1977;46:955-966.
117. Zander R, Vaupel P. Proposal for using a standardized terminology on oxygen transport to tissue. *Adv Exp Med Biol* 1985;191:965-970.
118. Kellog R.H. Glossary on respiration and gas exchange. *J Appl Physiol* 1973;34(4):549-558.
119. Bosco MC, Puppo M, Blengio F et al. Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology* 2008;213(9-10):733-749.
120. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;59(1):15-26.
121. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 1999;59(16):3915-3918.
122. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003;63(5):1138-1143.
123. Semenza GL. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:551-578.
124. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 2001;20(18):5197-5206.

125. Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG, Jr., Pavletich NP. Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 2002;296(5574):1886-1889.
126. Hon WC, Wilson MI, Harlos K et al. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature* 2002;417(6892):975-978.
127. Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med (Berl)* 2007;85(12):1339-1346.
128. Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *EMBO J* 1998;17(17):5085-5094.
129. Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999;94(5):1561-1567.
130. Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J* 2006;396(3):517-527.
131. Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* 1998;274(2 Pt 1):L212-L219.
132. Kempf VA, Lebedziejewski M, Alitalo K et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation* 2005;111(8):1054-1062.
133. Rupp J, Gieffers J, Klinger M et al. Chlamydia pneumoniae directly interferes with HIF-1alpha stabilization in human host cells. *Cell Microbiol* 2007;9(9):2181-2191.
134. Juul N, Jensen H, Hvid M, Christiansen G, Birkelund S. Characterization of in vitro chlamydial cultures in low-oxygen atmospheres. *J Bacteriol* 2007;189(18):6723-6726.
135. Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* 2011;15(6):1239-1253.
136. Miyairi I, Byrne GI. Chlamydia and programmed cell death. *Curr Opin Microbiol* 2006;9(1):102-108.
137. Byrne GI, Ojcius DM. Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(10):802-808.
138. Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 2004;57(10):1009-1014.

139. Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O, Kimchi A. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J* 1996;15(15):3861-3870.
140. Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu XY. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997;17(9):5328-5337.
141. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-776.
142. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *Kidney Blood Press Res* 2000;23(3-5):173-174.
143. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006;25(34):4798-4811.
144. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998;254(3):439-459.
145. Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 2000;256(1):58-66.
146. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995;14(22):5579-5588.
147. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17(6):1675-1687.
148. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004;305(5684):626-629.
149. Saelens X, Festjens N, Vande WL, van GM, van LG, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004;23(16):2861-2874.
150. Cain K, Bratton SB, Langlais C et al. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 2000;275(9):6067-6070.
151. Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM et al. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J* 2001;20(5):998-1009.
152. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2(4):301-310.
153. Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature* 1995;374(6525):811-813.

154. Clemens MJ. Interferons and apoptosis. *J Interferon Cytokine Res* 2003;23(6):277-292.
155. Graziadei PP, Levine RR, Monti Graziadei GA. Plasticity of connections of the olfactory sensory neuron: regeneration into the forebrain following bulbectomy in the neonatal mouse. *Neuroscience* 1979;4(6):713-727.
156. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-685.
157. Fotheringham S, Levanon K, Drapkin R. Ex vivo culture of primary human fallopian tube epithelial cells. *J Vis Exp* 2011;(51).
158. Levanon K, Ng V, Piao HY et al. Primary ex vivo cultures of human fallopian tube epithelium as a model for serous ovarian carcinogenesis. *Oncogene* 2010;29(8):1103-1113.
159. World Health Organization. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: Overview and estimates. 2010
160. Li N, McLaren JE, Michael DR, Clement M, Fielding CA, Ramji DP. ERK is integral to the IFN-gamma-mediated activation of STAT1, the expression of key genes implicated in atherosclerosis, and the uptake of modified lipoproteins by human macrophages. *J Immunol* 2010;185(5):3041-3048.
161. Matsushima K, Larsen CG, DuBois GC, Oppenheim JJ. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med* 1989;169(4):1485-1490.
162. Paavonen J, Eggert-Kruse W. Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update* 1999;5(5):433-447.
163. Pattappa G, Heywood HK, de Bruijn JD, Lee DA. The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. *J Cell Physiol* 2011;226(10):2562-2570.
164. Brewis IA, Winston RM, Leese HJ. Energy metabolism of the human fallopian tube. *J Reprod Fertil* 1992;95(1):257-262.
165. Jerchel S, Knebel G, Konig P, Bohlmann MK, Rupp J. A human fallopian tube model for investigation of C. trachomatis infections. *J Vis Exp* 2012;(66).
166. Cooper MD, Rapp J, Jeffery-Wiseman C, Barnes RC, Stephens DS. Chlamydia trachomatis infection of human fallopian tube organ cultures. *J Gen Microbiol* 1990;136(6):1109-1115.
167. Pedroza M, Schneider DJ, Karmouty-Quintana H et al. Interleukin-6 contributes to inflammation and remodeling in a model of adenosine mediated lung injury. *PLoS One* 2011;6(7):e22667.

168. Papathanasiou A, Djahanbakhch O, Saridogan E, Lyons RA. The effect of interleukin-6 on ciliary beat frequency in the human fallopian tube. *Fertil Steril* 2008;90(2):391-394.
169. Kovacs EJ, DiPietro LA. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J* 1994;8(11):854-861.
170. Yoshimura T, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Adv Exp Med Biol* 1991;305:47-56.
171. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Kuratsu J, Leonard EJ. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med* 1989;169(4):1449-1459.
172. Molestina RE, Miller RD, Ramirez JA, Summersgill JT. Infection of human endothelial cells with *Chlamydia pneumoniae* stimulates transendothelial migration of neutrophils and monocytes. *Infect Immun* 1999;67(3):1323-1330.
173. Molestina RE, Miller RD, Ramirez JA, Summersgill JT. Infection of human endothelial cells with *Chlamydia pneumoniae* stimulates transendothelial migration of neutrophils and monocytes. *Infect Immun* 1999;67(3):1323-1330.
174. Nasu K, Nishida M, Fukuda J, Kawano Y, Nishida Y, Miyakawa I. Hypoxia simultaneously inhibits endostatin production and stimulates vascular endothelial growth factor production by cultured human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2004;82(3):756-759.
175. Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 1993;99(2):673-679.
176. Valledor AF, Sanchez-Tillo E, Arpa L et al. Selective roles of MAPKs during the macrophage response to IFN-gamma. *J Immunol* 2008;180(7):4523-4529.
177. Lombardi A, Cantini G, Piscitelli E et al. A new mechanism involving ERK contributes to rosiglitazone inhibition of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma inflammatory effects in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(4):718-724.
178. Buchholz KR, Stephens RS. The cytosolic pattern recognition receptor NOD1 induces inflammatory interleukin-8 during *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun* 2008;76(7):3150-3155.
179. Zhong G. Killing me softly: chlamydial use of proteolysis for evading host defenses. *Trends Microbiol* 2009;17(10):467-474.
180. Flynn JL, Chan J. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr Opin Immunol* 2003;15(4):450-455.
181. Ismail N, Olano JP, Feng HM, Walker DH. Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 2002;207(2):111-120.

182. Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariati S, Cohen P, Comb MJ. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J* 1996;15(17):4629-4642.
183. Pietersma A, Tilly BC, Gaestel M et al. p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;230(1):44-48.
184. Perregaux DG, Dean D, Cronan M, Connelly P, Gabel CA. Inhibition of interleukin-1 beta production by SKF86002: evidence of two sites of in vitro activity and of a time and system dependence. *Mol Pharmacol* 1995;48(3):433-442.
185. Hazzalin CA, Cano E, Cuenda A, Barratt MJ, Cohen P, Mahadevan LC. p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr Biol* 1996;6(8):1028-1031.
186. Ahmed ST, Mayer A, Ji JD, Ivashkiv LB. Inhibition of IL-6 signaling by a p38-dependent pathway occurs in the absence of new protein synthesis. *J Leukoc Biol* 2002;72(1):154-162.
187. Vissers MC, Gunningham SP, Morrison MJ, Dachs GU, Currie MJ. Modulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha in cultured primary cells by intracellular ascorbate. *Free Radic Biol Med* 2007;42(6):765-772.
188. Hu CJ, Iyer S, Sataur A, Covello KL, Chodosh LA, Simon MC. Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells. *Mol Cell Biol* 2006;26(9):3514-3526.
189. Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J* 2001;15(13):2445-2453.
190. Talks KL, Turley H, Gatter KC et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000;157(2):411-421.
191. Wang JH, Wu QD, Bouchier-Hayes D, Redmond HP. Hypoxia upregulates Bcl-2 expression and suppresses interferon-gamma induced antiangiogenic activity in human tumor derived endothelial cells. *Cancer* 2002;94(10):2745-2755.
192. Faggioli L, Merola M, Hiscott J et al. Molecular mechanisms regulating induction of interleukin-6 gene transcription by interferon-gamma. *Eur J Immunol* 1997;27(11):3022-3030.
193. Kugler P, Wrobel KH, Wallner HJ, Heinzmann U. [Histochemical and histological investigations on the human fallopian tube under different hormonal influences. I. Demonstration of ATPase with special reference to reactive ciliated cells (author's transl)]. *Arch Gynakol* 1976;221(4):345-366.

194. Shao R, Weijdegard B, Fernandez-Rodriguez J et al. Ciliated epithelial-specific and regional-specific expression and regulation of the estrogen receptor-beta2 in the fallopian tubes of immature rats: a possible mechanism for estrogen-mediated transport process in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293(1):E147-E158.
195. Donnez J, Casanas-Roux F, Ferin J, Thomas K. Changes in ciliation and cell height in human tubal epithelium in the fertile and post-fertile years. *Maturitas* 1983;5(1):39-45.
196. Amso NN, Crow J, Shaw RW. Comparative immunohistochemical study of oestrogen and progesterone receptors in the fallopian tube and uterus at different stages of the menstrual cycle and the menopause. *Hum Reprod* 1994;9(6):1027-1037.
197. Caldwell HD, Wood H, Crane D et al. Polymorphisms in *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates. *J Clin Invest* 2003;111(11):1757-1769.
198. Morris M, Nicoll A, Simms I, Wilson J, Catchpole M. Bacterial vaginosis: a public health review. *BJOG* 2001;108(5):439-450.
199. Hillier SL. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169(2 Pt 2):455-459.
200. Hellberg D, Nilsson S, Mardh PA. The diagnosis of bacterial vaginosis and vaginal flora changes. *Arch Gynecol Obstet* 2001;265(1):11-15.
201. Shima K, Szaszak M, Solbach W, Gieffers J, Rupp J. Impact of a low-oxygen environment on the efficacy of antimicrobials against intracellular *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(5):2319-2324.

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von <i>Chlamydia sp.</i> .....	15
Abbildung 2	Schematischer Aufbau zum experimentellen Ablauf einer <i>C. trachomatis</i> Infektion in HeLa-229 Zellen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ in Normoxie und Hypoxie .....	49
Abbildung 3	REM von humanem Eileitergewebe mit und ohne <i>C. trachomatis</i> Infektion nach 24 h.....	59
Abbildung 4	Lichtmikroskopie von Semi-Dünnschnitten aus humanem Eileiterepithel mit und ohne <i>C. trachomatis</i> Infektion nach 24 h.....	60
Abbildung 5	TEM von humanem Eileiterepithel mit und ohne <i>C. trachomatis</i> Infektion nach 24 h.....	61
Abbildung 6	TEM von humanem Eileiterepithelzellen mit und ohne <i>C. trachomatis</i> Infektion nach 24 h, inkubiert mit Gold-markierten Antikörpern gegen Chlamydien-LPS.....	61
Abbildung 7	mRNA Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und MCP-1 in humanen Eileiter 24 h nach Infektion mit <i>C. trachomatis</i> unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen.....	62
Abbildung 8	FACS-Analyse zum Vorkommen der Epithelzell-Marker E-Cadherin, Cytokeration 1-19 und EpCam in primären Eileiterzellisolaten nach Isolation mit Collagenase.....	64
Abbildung 9	FACS-Analyse zum Vorkommen der Epithelzell-Marker E-Cadherin, Cytokeratin 1-19 und EpCam in primären epithelialen Eileiterzellisolaten in Abhängigkeit der Kulturdauer nach Isolation mit Pronase und DNase. ....	65
Abbildung 10	Lichtmikroskopische Aufnahme von primären epithelialen Eileiterzellen zwei Tage nach Isolation, infiziert mit <i>C. trachomatis</i> für 24 h. ....	66
Abbildung 11	Darstellung des Infektionsverlaufs von <i>C. trachomatis</i> über 48 h in primären epithelialen Eileiterzellen in Abhängigkeit von der Kulturdauer der Zellen. ....	67
Abbildung 12	Western Blot Analyse zur Induktion von Stat-1 und der Phosphorylierung von Stat-1 am Tyrosinrest 701 und am Serinrest 727 nach Stimulation mit 5 U/ ml IFN- $\gamma$ unter Normoxie und Hypoxie in primären epithelialen Eileiterzellen. ....	69
Abbildung 13	Western Blot zur HIF-1 $\alpha$ Stabilisierung in primären epithelialen Eileiterzellen unter Normoxie und Hypoxie.. ....	70

- Abbildung 14 Lichtmikroskopische Auswertung der Apoptoseinduktion durch Staurosporin in primären humanen epithelialen Eileiterzellen, unter Normoxie und Hypoxie..... 71
- Abbildung 15 Darstellung des *C. trachomatis* Infektionsverlaufes in HeLa-229 Zellen mit und ohne IFN- $\gamma$  unter Normoxie und Hypoxie 48 h nach Infektion.. ..... 73
- Abbildung 16 Western Blot Analyse zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 48 h nach Infektion mit *C. trachomatis* mit und ohne IFN- $\gamma$  unter Normoxie und Hypoxie in HeLa-229 Zellen. .... 74
- Abbildung 17 Zytokininduktion (mRNA) in HeLa-229 Zellen 48 h nach Infektion mit *C. trachomatis* mit und ohne IFN- $\gamma$ , unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. .... 75
- Abbildung 18 Western Blot Analyse zur Induktion von Stat-1 und der Phosphorylierung von Stat-1 am Tyrosinrest 701 und am Serinrest 727 nach Stimulation mit 5 U/ ml IFN- $\gamma$  unter Normoxie und Hypoxie in HeLa-229 Zellen. .... 78
- Abbildung 19 Western Blot zur HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung in HeLa-229 Zellen unter Normoxie und Hypoxie..... 78
- Abbildung 20 Lichtmikroskopische Auswertung der Apoptoseinduktion durch Staurosporin in HeLa-229 Zellen mit und ohne IFN- $\gamma$ , unter Normoxie und Hypoxie..... 79
- Abbildung 21 Darstellung des *C. trachomatis* Infektionsverlaufes in HeLa-229 Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation in Normoxie und Hypoxie..... 81
- Abbildung 22 Western Blot Analyse zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 während einer *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation in Normoxie und Hypoxie..... 83
- Abbildung 23 Zytokininduktion (mRNA) während einer *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation in Normoxie und Hypoxie. .... 85
- Abbildung 24 Western Blot Analyse zur Induktion von Stat-1 und der Phosphorylierung von Stat-1 am Tyrosinrest 701 und am Serinrest 727 während einer *C. trachomatis* Infektion in HeLa-229 Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation in Normoxie und Hypoxie. .... 88
- Abbildung 25 Lichtmikroskopische Auswertung der Apoptoseinduktion während einer IFN- $\gamma$  induzierten persistenten Chlamydieninfektion in HeLa-229 Zellen unter Normoxie und Hypoxie. .... 88

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Extrazelluläre Sauerstoffkonzentration in verschiedenen Umgebungen, Flüssigkeiten und Geweben .....	24
Tabelle 2	Verwendete Dauerkulturzelllinien .....	41
Tabelle 3	Pipettierschema für die verwendeten Gele .....	53
Tabelle 4	Pipettierschema für eine Reverse Transkription Reaktion .....	55
Tabelle 5	Programmfolge des Thermo Cyclers für die Reverse Transkription .....	56
Tabelle 6	Pipettierschema für die qRT-PCR .....	56
Tabelle 7	Programmablauf der qRT-PCR im Light Cycler .....	56

## A. Anhang

### A.1 Publikationen

#### *Originalarbeiten*

**Jerchel S.**, Knebel G., König P., Bohlmann MK., Rupp J. (2012). A human fallopian tube model for investigation of *C. trachomatis* infections. *J Vis Exp*. 2012 Aug 11; (66)

**Jerchel S.**, Knebel G., König P., Rupp J. Host immune response is attenuated in hypoxic reactivation of IFN- $\gamma$  induced *C. trachomatis* persistence. Manuskript in Vorbereitung

#### *Übersichtsartikel*

Dietz I., **Jerchel S.**, Szaszak M., Shima K., Rupp J. (2012). When oxygen runs short: the microenvironment drives host-pathogen interactions. *Microbes Infect*, 14:311-316.

Dietz I., **Jerchel S.**, Rupp, J. (2011). Die Bedeutung von Sauerstoff und HIF-1 $\alpha$  für Infektionsprozesse. *Der Mikrobiologe*, 21:109-114.

## A.2 Kongressbeiträge

**Jerchel S., König P., Solbach W., Bohlmann MK., Rupp J. (2012)**  
Intracellular signaling after reactivation of persistent *Chlamydia trachomatis* under hypoxia. 10. Deutscher Chlamydien Workshop, Erfurt (Vortrag).

**Jerchel S., Knebel G., König P., Solbach W., Bohlmann MK., Rupp J. (2012).**  
A human fallopian tube model for investigation of *C. trachomatis* infections. 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Hamburg (Poster).

**Jerchel S., Lindner U., König P., Bohlmann MK., Rupp J. (2011).**  
Development of *Chlamydia trachomatis* infection models of human fallopian tubes *in vitro* and *ex vivo*. 9. Deutscher Chlamydien Workshop in Ascona, Schweiz (Poster).

**Jerchel S., König P., Solbach W., Bohlmann MK., Rupp J. (2011).**  
Intracellular signaling after reactivation of persistent *Chlamydia trachomatis* under hypoxia. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Düsseldorf (Poster).

### A.3 Danksagung

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei allen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jan Rupp für die Überlassung des Themas und der fortwährend wissenschaftlichen Betreuung. Seine stets konstruktiven Vorschläge und Anregungen haben zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Zudem bin ich für seine kritische Durchsicht des Manuskripts dankbar.

Herrn Prof. Dr. Werner Solbach möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung der vorliegenden Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene danken.

Ein großer Dank gilt Herr PD Dr. Michael K. Bohlmann und seinen Kolleginnen und Kollegen sowie der Gynäkologie des UK-SH, Campus Lübeck, für die Bereitstellung von Patientenmaterial.

Prof. Dr. Peter König und Gudrun Knebel möchte ich herzlich für die gute Zusammenarbeit und die produktiven Diskussionen zu allen Belangen der Elektronenmikroskopie danken.

Meinen Kollegen Kristin Wischnat, Siegrid Pätzmann, Anke Hellberg und Angela Gravenhorst gilt hier ein lieber Dank. Sie hatten zu jeder Zeit ein offenes Ohr für mich und unterstützten mich auch in schwierigen Situationen.

Ein großes Dankeschön geht an meine Kollegen Nadja Käding, Inga Dietz, Kensuke Shima und Marta Szaszak für die stets hilfreichen Diskussionen und Ratschläge.

Für die Finanzierung möchte ich dem DFG Exzellenzcluster “Inflammation at Interfaces” danken.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden dafür danken, dass sie immer für mich da waren.