

Aus der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Jan Rupp

**Funktionelle Unterschiede von respiratorischen und vaskulären
Chlamydia pneumoniae Stämmen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Jonas Coopmeiners, geb. Anselm

aus Braunschweig

Lübeck 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jan Rupp
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Thorns

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2017

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 19.12.2017

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung.....	5
2 Einleitung.....	6
2.1 Grundlagen von Chlamydien.....	7
2.1.1 Taxonomische Einteilung	7
2.1.2 Entwicklungszyklus.....	8
2.1.3 Persistenz	10
2.1.4 Pathogenität von <i>C. pneumoniae</i>	10
2.1.5 <i>C. pneumoniae</i> und die systemische Dissemination.....	11
2.2 Genomische Aspekte von <i>C. pneumoniae</i> und der Kontext des Gewebetropismus	11
2.2.1 SNPs und ihre genetische Grundlagen	11
2.2.2 Der Gewebetropismus einzelner Isolate	12
2.2.3 Phylogenetischer Stammbaum von <i>C. pneumoniae</i> Isolaten.....	12
2.2.4 Die nsSNPs in respiratorischen – und vaskulären Isolaten	14
2.3 Hypoxie	15
2.3.1 Die Bedeutung des variierenden Sauerstoffgehalts im Organismus	15
2.3.2 Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1).....	16
2.3.3 <i>C. pneumoniae</i> -Infektion unter Hypoxie	17
2.4 <i>C. pneumoniae</i> und die Wechselwirkung mit dem Immunsystem	18
2.5 Fragestellung	21
3 Material.....	22
3.1 Laborgeräte.....	22
3.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
3.3 Chemikalien und Reagenzien	24
3.4 Puffer und Lösungen	26
3.5 Inhibitoren	27
3.6 Enzyme und Kits	27
3.7 Medien und Medienzusätze	28
3.8 Zelllinien.....	28
3.9 Antikörper.....	29
3.9.1 Antikörper für Western Blot Analysen.....	29

3.10 Oligonukleotide	30
3.10.1 Primer für die cDNA Synthese.....	30
3.10.2 Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen.....	30
3.10.3 Primer für die quantitative RT-PCR.....	31
3.11 Softwareprogramme	31
4 Methoden	32
4.1 Zellkultur	32
4.1.1 Anzucht von HEp-2 Zellen.....	32
4.1.2 Isolierung von humanen Monozyten aus <i>Buffy Coats</i>	32
4.2 Zellzahlbestimmung	33
4.3 Infektionsbiologische Methoden	34
4.3.1 Bestimmung der Infektiosität	34
4.3.2 Herstellung eines Infektionsstocks von <i>C. pneumoniae</i>	34
4.3.3 Berechnung des Chlamydien-Gehalts	35
4.3.4 Infektion von HEp-2 Zellen mit <i>C. pneumoniae</i>	36
4.3.5 Infektion von Monozyten mit <i>C. pneumoniae</i>	36
4.3.6 Wiederanzucht.....	37
4.3.7 Inhibitionsversuche.....	37
4.3.7.1 Caspase-1 Inhibitor II (Ac-YVAD-CMK)	37
4.3.7.2 p38 Kinase-Inhibitor (SB203580).....	38
4.4 Proteinbiochemische Methoden	38
4.4.1 Probenaufbereitung.....	38
4.4.2 SDS-PAGE	38
4.4.3 Western Blot Analyse.....	39
4.4.3.1 Blotten	39
4.4.3.2 Immundetektion.....	39
4.4.3.3 Visualisierung.....	40
4.4.3.4 Stripping	40
4.5 Molekularbiologische Methoden.....	40
4.5.1 RNA-Isolation	40
4.5.2 Reverse Transkription.....	41
4.5.3 Quantitative RT-PCR	42
4.5.4 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	44
4.6 Direkter Immunfluoreszenztest	44

4.7	Indirekter Immunfluoreszenztest	44
4.8	Elektronenmikroskopie.....	45
4.9	Anfertigen von Zytospins	45
4.10	LPS-Konzentrationsbestimmung.....	46
4.11	Interleukin-1 β -ELISA.....	46
4.12	Statistik und Auswertung	47
5	Ergebnisse	48
5.1	Der respiratorische - (CWL029) und der vaskuläre Stamm (PB2) unterscheiden sich hinsichtlich ihres Entwicklungszyklus und morphologischer Charakteristika	48
5.1.1	Die Infektionsrate und die Einschlussgröße unterscheiden sich unter Normoxie und Hypoxie.....	48
5.1.2	Unterschiede im Wiederanzuchtverhalten unter Normoxie und Hypoxie.....	53
5.2	CWL029 und PB2 zeigen eine unterschiedliche Wechselwirkung mit PBMCs.....	54
5.2.1	Erhöhte mRNA Expression von IL-1 β und IL-8 bei einer Infektion mit PB2.....	54
5.2.2	Erhöhte Aktivierung der MAP-Kinase p38 bei einer Infektion mit PB2	56
5.2.3	Die NLRP3-abhängige IL-1 β Sekretion von PBMCs nach Infektion mit CWL029 bzw. PB2	58
5.3	HSP60 als möglicher Stimulus für die erhöhte mRNA Expression und MAP Kinase p38 Aktivierung in mit PB2 infizierten PBMCs.....	60
6	Diskussion	62
6.1	Unterschiede zwischen dem respiratorischen – (CWL029) und dem vaskulären Stamm (PB2) im Entwicklungszyklus und ihrer Morphologie	62
6.1.1	Funktioneller Unterschied hinsichtlich der Infektionsrate	62
6.1.2	Funktioneller Unterschied bezüglich der Einschlussgröße und Wiederanzuchtsrate	63
6.1.3	Mögliche transkriptionelle Unterschiede zwischen CWL029 und PB2.....	64
6.2	Unterschiedliche Immunantwort von PBMCs nach einer Infektion mit CWL029 bzw. PB2	67
6.2.1	Unterschiedliche Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren in PBMCs	67
6.2.2	PB2 führt zu einer vermehrten Aktivierung der MAP-Kinase p38.....	68

6.2.3	Die Sekretion von IL-1 β nach der Infektion mit CWL029 und PB2 wird über das Inflammasoms NLRP3 reguliert	68
6.3	Chlamydiales HSP60 als wichtigstes Signalmolekül von PB2 im Zusammenhang mit der erhöhten mRNA Expression und der Aktivierung der MAP-Kinase p38.....	69
6.4	Schlussbetrachtung	71
7	Literaturverzeichnis.....	72
8	Abbildungsverzeichnis.....	88
9	Tabellenverzeichnis.....	89
10	Veröffentlichungen.....	90
10.1	Review	90
10.2	Kongressbeiträge	90
11	Danksagung	91
12	Lebenslauf.....	92

Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind die Abkürzungen aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden; englische Abkürzungen wurden dabei ins Deutsche übersetzt, soweit diese im deutschen Sprachgebrauch existieren.

°C	Grad Celsius
A. dest.	Destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
ASC	<i>Apoptosis associated speck-like protein</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>Base pairs</i> , Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Rinderserumalbumin
Bspw.	Beispielsweise
Bzgl.	Bezüglich
Bzw.	Beziehungsweise
CAP	<i>Community acquired pneumonia</i> , ambulant erworbene Pneumonie
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , komplementäre DNA
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i> , chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CPAF	<i>Chlamydial protease-like activity factor</i>
<i>Cpn</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
CXCR	C-X-C Chemokinrezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunoabsorbent Assay</i> , antikörperbasiertes Nachweisverfahren
EM	Elektronenmikroskop
EK	Elementarkörperchen
<i>et al.</i>	Und andere
Fa.	Firma

FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FIH	<i>Factor-inibiting HIF</i> , Faktor-inhibierender HIF
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FZ	Forschungszentrum
GLUT	Glukosetransporter
h	<i>Hour</i> , Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanosulfonsäure
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor-1</i> , Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1
hpi	<i>Hours post infection</i>
HRE	<i>Hypoxia responsive element</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSP	<i>Heat shock protein</i> , Hitzeschockprotein
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon-gamma
IFT	Immunfluoreszenztest
IFU	<i>Inclusion forming units</i>
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
Inc.	<i>Incorporated</i> , Eintragung im Handelsregister
Inst.	Institut
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
LDHA	Laktatdehydrogenase A
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
min	Minute
Mip	Macrophage infectivity potentiator
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	<i>Messenger RNA</i>

MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NEAA	<i>Non-essential amino acid</i> , nicht-essentielle Aminosäuren
NF- κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor pyrin domain containing 3</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
nsSNP	<i>Non-synonymous single nucleotide polymorphism</i> , nicht-synonymer Einzelnukleotid-Polymorphismus
Omp	<i>Outer membrane protein</i>
Omc	<i>Outer membrane complex</i>
ORF	<i>Open reading frame</i> , offenes Leseraster
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDK	Pyruvatdehydrogenase Kinase
PHD	Prolyl-Hydroxylase
PGN	Peptidoglykan
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
pVHL	Von Hippel-Lindau Protein
qRT-PCR	Quantitative Reverse-Transkriptase PCR
RK	Retikularkörperchen
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
rsb	<i>regulator of sigma B</i>
RT	Raumtemperatur
SAPK	<i>Stress-activated phospho-kinase</i>

SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	<i>Second</i> , Sekunde
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SNP	<i>Singel nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
sog.	Sogenannte
sSNP	<i>Synonymous singel nucleotide polymorphism</i> , synonymer Einzelnukleotid-Polymorphismus
T ₃ SS	<i>Type III secretion system</i> , Typ-III-Sekretionssystem
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Th	T-Helferzellen
TLR	Toll- <i>Like</i> Rezeptor, Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> , Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris (hydroxymethyl) -aminomethan
tyrP	Tyrosin/Tryptophan Permease
U	<i>Units</i> , Unit-Einheit
Ub	Ubiquitin
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

1 Zusammenfassung

Chlamydia pneumoniae (*C. pneumoniae*) ist ein humanpathogenes und obligat intrazelluläres Bakterium, welches akute und chronische Erkrankungen hervorruft. Mit der Infektion von Epithelzellen sind Erkrankungen des oberen - und unteren Respirationstrakts und die COPD assoziiert. Die Infektion monozytärer Zellen trägt zur systemischen Dissemination bei und wird als mögliche Ursache in der Pathogenese der Atherosklerose gesehen. Mithilfe von Genomsequenzierung konnten genetische Unterschiede von vaskulären - (PB2) und respiratorischen Isolaten (CWL029) dargelegt werden. Genetische Unterschiede scheinen dabei den Gewebetropismus einzelner Isolate zu determinieren. Wie sich genomische Unterschiede einzelner Isolate im speziellen auf den Phänotyp auswirken ist ungeklärt. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal untersucht, ob Unterschiede zwischen vaskulären - und respiratorischen Isolaten existieren. Dabei wurden deren Eigenschaften auch im Zusammenhang mit den physiologisch unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen untersucht. So sinkt etwa bei chronischen Entzündungsprozessen der Sauerstoffgehalt im Gewebe. *C. pneumoniae* profitiert dabei von diesen sog. hypoxischen Bedingungen. So konnten mittels der Infektion von HEp-2 Zellen sowohl unter Normoxie und Hypoxie signifikante Unterschiede bezüglich der Infektionsrate, Einschlussgröße und Wiederanzuchtsrate dargelegt werden. Bei der Infektion von monozytären Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass PB2 eine signifikante Induktion der IL-1 β und IL-8 mRNA Expression im Sinne einer Aktivierung bewirkt. Dabei zeigte die Infektion mit PB2 einen gesteigerten, zeitabhängigen Anstieg der IL-1 β - und IL-8 mRNA Expression 5 hpi im Vergleich zu CWL029. Zudem führt die Infektion mit PB2 5 hpi zu einer erhöhten Aktivierung der MAP-Kinase p38. Es konnte anhand eines Inhibitionsversuches gezeigt werden, dass das Inflammasom NLRP3 für die IL-1 β Sekretion von monozytären Zellen, nach einer Infektion mit CWL029 und PB2, verantwortlich ist. Die Analyse der chlamydialen Signalmoleküle LPS, Mip und HSP60 zeigte, dass HSP60 vermutlich eine Schlüsselrolle hinsichtlich der mRNA Expression von IL-1 β und IL-8, sowie der Aktivierung der MAP-Kinase p38 nach einer Infektion mit PB2 spielt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass genetische Unterschiede existieren, die zu funktionellen Unterschieden zwischen respiratorischen - und vaskulären Isolaten führen könnten. Genetische Manipulationsexperimente könnten zukünftig dazu beitragen, den Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp einzelner Isolate zu klären.

2 Einleitung

Eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) ist mit akuten, oder chronischen Erkrankungen assoziiert. Es gibt Infektionen der Atemwege, wie Asthma bronchiale und chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD). Dem Erreger wird zudem eine Bedeutung in der Entstehung der Atherosklerose zugeschrieben. Die Eigenschaft ein persistentes Stadium einzunehmen, ist vor allem bei chronischen Krankheitsverläufen, wie der Atherosklerose, von Bedeutung. Chlamydien konnten aus unterschiedlichen Kompartimenten des menschlichen Körpers isoliert werden. Einer der zentralen Unterschiede hinsichtlich der Isolationsherkunft besteht in der Variation des Sauerstoffgehalts in Abhängigkeit des Isolationsgewebes. So fand sich das Isolat CWL029 im Pharynx, während PB2 aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) isoliert wurde. Mithilfe der Genomsequenzierung lassen sich anhand von Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNPs) unterschiedliche Isolate des Erregers unterscheiden. Es lassen sich unter anderem respiratorische von nicht-respiratorischen Stämmen abgrenzen. Neue Arbeiten zeigen nun, dass sich diese Stämme in bestimmten nicht-synonymen Einzelnukleotid-Polymorphismen (*non-synonymous single nucleotide polymorphism*, nsSNPs) voneinander unterscheiden. Somit können scheinbar genetische Unterschiede für den Gewebetropismus verantwortlich gemacht werden. Die nsSNPs stehen dabei im Zusammenhang mit dem Metabolismus, Entwicklungszyklus und der Genregulation von *C. pneumoniae*.

Entzündungsprozesse sind mit einem Abfall des Sauerstoffgehalts (Hypoxie) im Gewebe assoziiert. Zu berücksichtigen ist dabei, dass diese hypoxischen Bedingungen das Wachstum von *C. pneumoniae* begünstigen. Ziel der Arbeit war es, funktionelle Unterschiede zwischen respiratorischen - und vaskulären Stämmen unter Normoxie und Hypoxie darzulegen. Immunzellen interagieren mit bestimmten chlamydialen Oberflächenstrukturen, wie bspw. chlamydiales LSP, Mip und HSP60. Es kommt zur Aktivierung von Signalkaskaden, wie bspw. MAP-Kinasen, woraufhin proinflammatorische Mediatoren als Antwort auf den Erreger sezerniert werden. Das Inflammasom NLRP3 ist dabei im Zusammenhang mit IL-1 β essentiell. Bevor die relevanten Themen dazu erörtert werden, soll ein Überblick über die Grundlagen von Chlamydien, deren Taxonomie und deren Entwicklungszyklus mit dem Aspekt der Persistenz gegeben werden.

2.1 Grundlagen von Chlamydien

Chlamydien sind gramnegative, obligat intrazelluläre Bakterien, die einen einzigartigen Lebenszyklus haben. Aufgrund des intrazellulären Wachstums wurden sie in der Vergangenheit den klassischen Viren zugeordnet. Im Jahre 1907 entdeckte Ludwig Halberstädter und Stanislaus Prowazek Einschlusskörperchen von Chlamydien in Konjunktivalabstrichen von Trachomen, die damals auch als Halberstädter-Prowazek Körperchen bezeichnet wurden (63). Bedson *et al.* beschrieben erstmalig im Jahre 1932 den charakteristischen Entwicklungszyklus für Chlamydien (15). Im Jahre 1966 wurden Chlamydien schließlich den Bakterien zugeordnet (124). Es existieren drei humanpathogene Chlamydienspezies. Zu diesen zählen *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia pneumoniae*. Eine Vielzahl an Erkrankungen können in Abhängigkeit von der jeweiligen Chlamydienspezies hervorgerufen werden. Eine Infektion mit *C. psittaci* führt beim Menschen zur Ornithose (16). *C. trachomatis* infiziert ausschließlich den Menschen. Verschiedene Serovare und Biovare sind bekannt (186). In Abhängigkeit des Serovares kommt es dabei zu sexuell übertragbaren Infektionen des Urogenitaltraktes und zu Infektionen des Auges (31,138). Im Fokus dieser Arbeit steht *C. pneumoniae*, welches im Jahre 1965 erstmals aus dem Konjunktivalabstrich eines Kindes aus Taiwan isoliert wurde. Im Jahre 1971 erlangte es die Bezeichnung TW-183 (105). 1983 konnte von einem Studenten in Seattle ein respiratorisches Isolat (AR-39) isoliert werden. Anfangs war die Bezeichnung TWAR üblich, die sich aus den beiden Isolaten ableitete. Schließlich wurde im Jahre 1989 die ursprüngliche Bezeichnung durch *C. pneumoniae* abgelöst (105).

2.1.1 Taxonomische Einteilung

Chlamydien gehören zur Ordnung der Chlamydiales, die sich wiederum in die Familien Chlamydiaceae, Parachlamydiaceae, Waddliaceae und Simkaniaceae unterteilen (Abbildung 1). Die Vertreter der drei letztgenannten Familien leben im Gegensatz zu den Chlamydiaceae als Symbionten in Amöben (10,47,73). Die Familie der Chlamydiaceae beinhaltet human- und tierpathogene Organismen (10,24,44). Durch phylogenetische Analysen der 16S- und 23S-rRNA unterteilte man ab 1999 die Familie der Chlamydiaceae in die Gattungen Chlamydophila und Chlamydia (44). Diese Unterteilung konnte sich in der Fachwelt nicht behaupten, sodass als Bezeichnung der Gattung ausschließlich Chlamydia verwendet wird (154,168). In der vorliegenden Arbeit wurde einzig die Bezeichnung *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) verwendet (56).

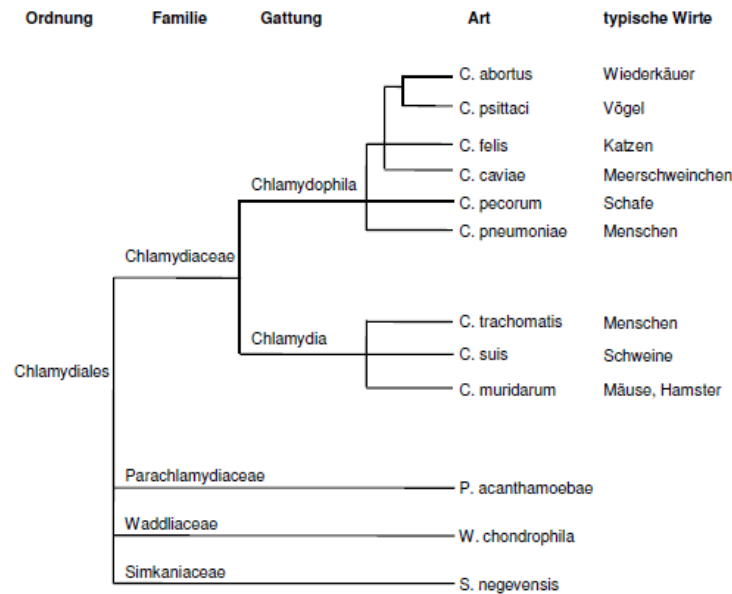


Abbildung 1: Taxonomie der Ordnung Chlamydiales.

Schematische Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse der Taxonomie von 1999 unter Einbeziehung der typischen Wirte. Dabei stellt die Länge der Linien nicht die phylogenetischen Abstände dar. Abbildung modifiziert nach (24).

2.1.2 Entwicklungszyklus

Als obligat intrazelluläre Bakterien sind Chlamydien auf eine intakte Wirtszelle angewiesen. Alle Spezies der Familie der Chlamydiaceae besitzen den einzigartigen, biphasischen Entwicklungszyklus (Abbildung 2). Initial kommt es zur Adhäsion des Elementarkörperchens (EK) an die Wirtszelle. Dabei handelt es sich um die ca. 0,3 µm große und infektiöse Form (1,125,182). Die EKs teilen sich nicht und sind beständig gegenüber extrazellulären Umwelteinflüssen (64). Die Internalisierung erfolgt durch Phagozytose bzw. Rezeptor-vermittelter Endozytose. Dabei spielen sowohl Clathrin- und Caveolin-vermittelte Wege, als auch sog. *lipid rafts* eine Rolle (100,170). Infolgedessen entsteht ein eigenes zelluläres Kompartiment, die Inklusion (Einschlusskörperchen) und die Fusion mit Lysosomen wird unterbunden (64,158). Mithilfe des Typ-III-Sekretionssystems (T₃SS) und dem Einschleusen von Effektorproteinen erfolgt eine Modulation der Wirtszelle (94,187). Es lassen sich dabei sowohl nicht-apoptotische, als auch anti-apoptotische Signale von Signalen, die den Zelltod einleiten, unterscheiden (Abbildung 2; farbige Hinterlegung der Zellen) (17,25). Ca. 8 h nach der Infektion erfolgt die Dekondensation der DNA und mit ihr die Umwandlung in die Retikularkörperchen (RK) (182). Diese haben eine Größe von ca. 1 µm und stellen die intrazelluläre, nicht-infektiöse und metabolisch aktive Form der Chlamydien dar (64).

Zwischenprodukte werden mithilfe von Transportern vom Wirt bezogen, um den unvollständigen Energiestoffwechsel zu vervollständigen. So kommt es bspw. zur Interaktion mit dem Golgi-Apparat (59,70). Die Replikation mittels binärer Teilung erfolgt schließlich 12 - 24 *hours post infection* (hpi) (64). Daraufhin folgt zwischen 48 - 72 hpi die Redifferenzierung zu den infektiösen EKs. Nach Lyse der Wirtszellen, werden diese freigesetzt und können erneut Zellen infizieren (76). Neben diesen Mechanismus existiert auch die Extrusion, bei der es zur Abschnürung des Einschlusskörpers kommt und die Wirtszelle intakt bleibt (76). Durch bestimmte Stimuli kann das Bakterium eine Konformation einnehmen, die als Persistenz, Persistenzkörperchen, *cryptic bodies* oder als *aberrant bodies* bezeichnet wird (25). All diese Bezeichnungen bringen die atypische Morphologie dieser Form zum Ausdruck (Abschnitt 2.1.3).

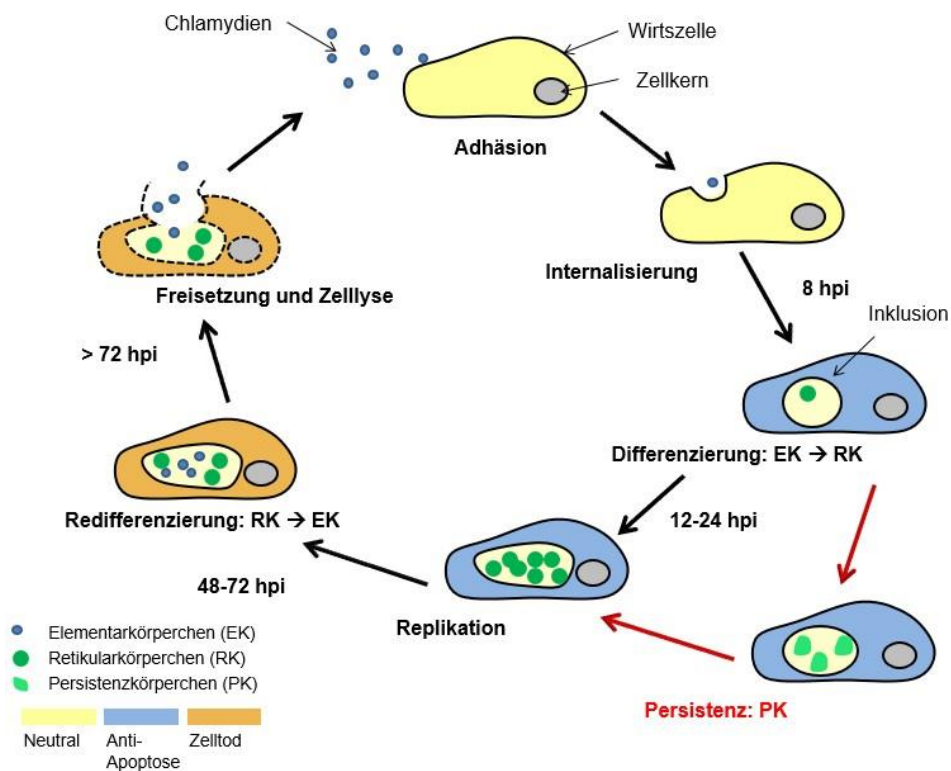


Abbildung 2: Darstellung des Entwicklungszyklus von Chlamydien.

Der mit schwarzen Pfeilen dargestellte Zyklus zeigt den Verlauf einer aktiven Infektion und dauert bei *C. pneumoniae* 72 - 96 Stunden. Dabei infiziert ein Elementarkörperchen (EK) die Wirtszelle und innerhalb der Inklusion erfolgt die Differenzierung zu einem Retikularkörperchen (RK). Nach der Replikation erfolgt die Redifferenzierung zurück zu den EKs und unter Zellyse (gestrichelte Linien) erfolgt die Erregerfreisetzung. Unter bestimmten Umständen erfolgt der Eintritt in die Persistenz (rote Pfeile) mit vorliegenden Persistenzkörperchen (PK), diese können wieder in den aktiven Entwicklungszyklus eintreten. Mithilfe von chlamydialen Effektorproteinen erfolgt eine Modulation der Wirtszelle (farbige Hinterlegung der Zelle). Hpi: *hours post infection*.

2.1.3 Persistenz

Die Persistenz ist ein Stadium, indem es dem Immunsystem nicht möglich ist, den Erreger erfolgreich zu eliminieren (Abbildung 2) (126). In diesem Stadium haben Chlamydien dysmorphe und im Gegensatz zum RK vergrößerte Einschlusskörperchen und weisen einen reduzierten Metabolismus auf (125). In diesem Zustand können sie monate- bis jahrelang im Organismus verweilen und weisen kein Wachstum auf und sind nicht kultivierbar (14). *In vitro* kann die Persistenz gleichermaßen durch Behandlung mit Antibiotika, Eisenentzug sowie Depletion essentieller Nährstoffe (z.B. Aminosäuren, Glukose) hervorgerufen werden (8,52,66). Ein weiterer Induktor der Persistenz stellt das Interferon-gamma (IFN- γ) dar (118). *In vitro* erfolgt durch das Entfernen der Persistenz-Stimuli bspw. durch das Hinzufügen von L-Tryptophan oder dem IFN- γ Entzug ein Wiedereintritt in den chlamydialen, replikativen Entwicklungszyklus (72). Chlamydien können auch *in vivo* persistente Formen einnehmen, was die Assoziation mit chronischen Erkrankungen erklären könnte (Abschnitt 2.1.4 und 2.1.5). So zeigten Airene *et al.*, dass *C. pneumoniae* in Monozyten kleine, aberrante Einschlüsse aufweist (4). Auch Bellmann-Weiler *et al.* konnten zeigen, dass *C. pneumoniae* eine persistente Form in Monozyten einnimmt, während in Epithelzellen eine Differenzierung und Proliferation erfolgte (18). Molekularbiologische Untersuchungen konnten Hinweise auf das Vorhandensein persistenter Formen *in vivo* liefern. Gerard *et al.* konnten bezüglich der chlamydialen Gen- und Proteinexpression Ähnlichkeiten zwischen persistenten Zellkulturen und Gewebeproben chronisch erkrankter Patienten aufzeigen (49). Der Aspekt der Persistenz hat klinische Relevanz, da weder zuverlässige diagnostische Methoden zur Erkennung dieses Stadiums, noch ausreichend effiziente Therapiemöglichkeiten existieren.

2.1.4 Pathogenität von *C. pneumoniae*

Das humanpathogene Bakterium kann akute und chronische Infektionen hervorrufen. Die Prävalenz einer Infektion mit *C. pneumoniae* steigt mit zunehmendem Alter. So können positive Antikörpertiter bei 80% der Männer und 70% der Frauen im Alter über 65 Jahre detektiert werden; im Vergleich zu 50% im Alter von 20 Jahren (54,104). Da obere - und untere Atemwege betroffen sein können, treten Erkrankungen wie Sinusitis, Pharyngitis, Laryngitis, Bronchitis und Pneumonie auf (32,55). Ca. 10% der ambulant erworbenen Pneumonien (*Community acquired pneumonia*, CAP) werden durch *C. pneumoniae* hervorgerufen (22). Einer der Gründe für die vielfältigen Krankheitsbilder ist, dass Epithelzellen des Respirationstraktes das primäre Ziel der Infektion darstellen (80).

Der Großteil der Infektionen verläuft dabei überwiegend asymptomatisch. Die Erstinfektion erfolgt jedoch zumeist im Kindesalter (89). Chronische Erkrankungen wie COPD, Asthma bronchiale und Atherosklerose sind mit persistenten *C. pneumoniae*-Infektionen assoziiert, wobei der Stellenwert des Erregers nach wie vor kontrovers diskutiert wird (61,110,177).

2.1.5 *C. pneumoniae* und die systemische Dissemination

C. pneumoniae kann unterschiedliche Wirtszellen infizieren (48). Anhand der Isolationsherkunft lassen sich unterschiedliche Stämme abgrenzen. Der Stamm CWL029, der in dieser Arbeit verwendet wurde, wird den respiratorischen Stämmen zugeordnet und wurde aus dem Pharynx isoliert. PB2 wurde aus PBMCs isoliert und repräsentiert nicht-respiratorische Stämme. Bei der Infektion mit *C. pneumoniae* erfolgt im Lungenepithel die Kontaktaufnahme mit Phagozyten und in den Kapillaren mit zirkulierenden Monozyten bzw. PBMCs (53,122,150). Nach Internalisierung des Erregers (Abschnitt 2.1.2) kommt es via Blutzirkulation zur systemischen Dissemination (181). Der Erreger kann dabei in Monozyten persistieren, besitzt anti-apoptische Mechanismen und ist einer Antibiotikatherapie gegenüber unempfindlich (Abschnitt 2.1.3) (4,5,51,151). Gemeinsam mit der systemischen Dissemination des Erregers sind dies die wesentlichen Aspekte bei der Entstehung chronischer Krankheitsverläufe. Eine Assoziation mit atherosklerotischen Entzündungsprozessen scheint wahrscheinlich, wobei ungeklärt ist, ob *C. pneumoniae* eine initiale oder sekundäre Rolle hinsichtlich der Initiierung von Entzündungskaskaden spielt (110,147,178).

2.2 Genomische Aspekte von *C. pneumoniae* und der Kontext des Gewebetropismus

2.2.1 SNPs und ihre genetische Grundlagen

Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNPs) lassen sich in *synonymous SNPs* (sSNPs) und *non-synonymous SNPs* (nsSNPs) einteilen. Bei den sSNPs kommt es zur Veränderung des Codons, wobei die Aminosäuresequenz des Proteins aufgrund des degenerierten Codes unverändert bleibt. Bei den nsSNPs kommt es zu einem Aminosäureaustausch und infolgedessen zu einer Änderung der Polypeptidsequenz. Dies könnte ein Grund sein, dass nsSNPs einem stärkeren Selektionsdruck unterliegen als sSNPs (144).

Darüber hinaus diente die Analyse von SNPs der stammesgeschichtlichen Rekonstruktion des *M. tuberculosis* Komplexes und einzelner Stämme von *B. anthracis* (58,137).

2.2.2 Der Gewebetropismus einzelner Isolate

Infolge der angepassten Lebensweise an die Wirtszellen, weist *C. pneumoniae* ein mit 1,2 Mio. Basenpaare (bp) reduziertes Genom auf (84). Chlamydien haben eine spezielle homöostatische Nische inne. So weisen nicht zuletzt 80% der bei Chlamydiaceae sequenzierten Gene eine Orthologie zu anderen Chlamydiaceae-Spezies auf. Der hohe Erhaltungsgrad der Gene und das hohe Maß der Syntenie erschweren es unterschiedliche Biovare und Pathotypen für *C. pneumoniae* zu definieren, wie es für *C. trachomatis* bereits üblich ist (84,145). Mithilfe der SNPs kann eine Einteilung verschiedener Isolate von *C. pneumoniae* in Cluster vorgenommen werden. So war es Rattei *et al.* bereits möglich anhand von 232 sSNPs die Phylogenie von 38 *C. pneumoniae* Isolaten zu untersuchen und diese trotz minimaler Sequenzdivergenz in vier Gruppen einzuteilen (144). Die genomische Ähnlichkeit der Isolate aus einem Isolationsgewebe lässt vermuten, dass bestimmte genetische Unterschiede eine für den Gewebetropismus von *C. pneumoniae* determinierende Funktion haben müssen (120,144,179). Bisher konnte gezeigt werden, dass sich respiratorische – von vaskulären Stämmen in der Anzahl von Tyrosin/Tryptophan Permease-Kopien (*tyrP*-Kopien) unterscheiden. Dabei wiesen vaskuläre Stämme nur eine *tyrP*-Genkopie auf; was die Neigung für die vaskuläre Infektion und das Persistenzverhalten begünstigen könnte (50,179).

2.2.3 Phylogenetischer Stammbaum von *C. pneumoniae* Isolaten

Die Anwesenheit der *tyrP*-Genkopie in vaskulären Isolaten zeigt die phylogenetische Verwandtschaft zwischen den Isolaten aus einer gemeinsamen Isolationsherkunft.

Weinmaier *et al.* haben die Genome von 19 klinischen *C. pneumoniae* Isolaten sequenziert und zusammen mit bereits 5 veröffentlichten Genomsätzen einen umfangreichen Datensatz für die Rekonstruktion der Evolutionsgeschichte des humanpathogenen Bakteriums geschaffen (179). Mittels 13324 SNP-Lokalisationen konnte ein Stammbaum erstellt werden (Abbildung 3). Dieser zeigte eine Separation zwischen nicht-menschlichen - und menschlichen Isolaten; DC9 wurde aus einem Frosch isoliert, während LPCoLN aus einem Koala isoliert wurde. Die menschlichen Isolate lassen sich dabei in drei Cluster unterteilen (179). So bilden TW183 und UZG1 einen Cluster. CM1, AR39, YK41, GiD und J138 bilden den zweiten Cluster. Die restlichen Isolate bilden den dritten Cluster, der sich wiederum in drei Untergruppen aufteilt (179).

CWL029 ist in der zweiten Untergruppe des dritten Clusters und PB2 in der dritten Untergruppe zu finden (179). Die jeweiligen Entfernungen in diesem Stammbaum stimmen im Allgemeinen mit der Anzahl an SNPs zwischen den einzelnen Isolaten überein (179). Eine bemerkenswerte Übereinstimmung der Cluster, basierend auf dem Attribut des Isolationsgewebes einzelner Stämme und der Topologie des Stammbaums, führte zur Annahme, dass genetische Unterschiede für den Gewebetropismus verantwortlich gemacht werden können (179). Es wurde eine große Klonalität für die humanen *C. pneumoniae* Isolate gefunden (120,144,179).

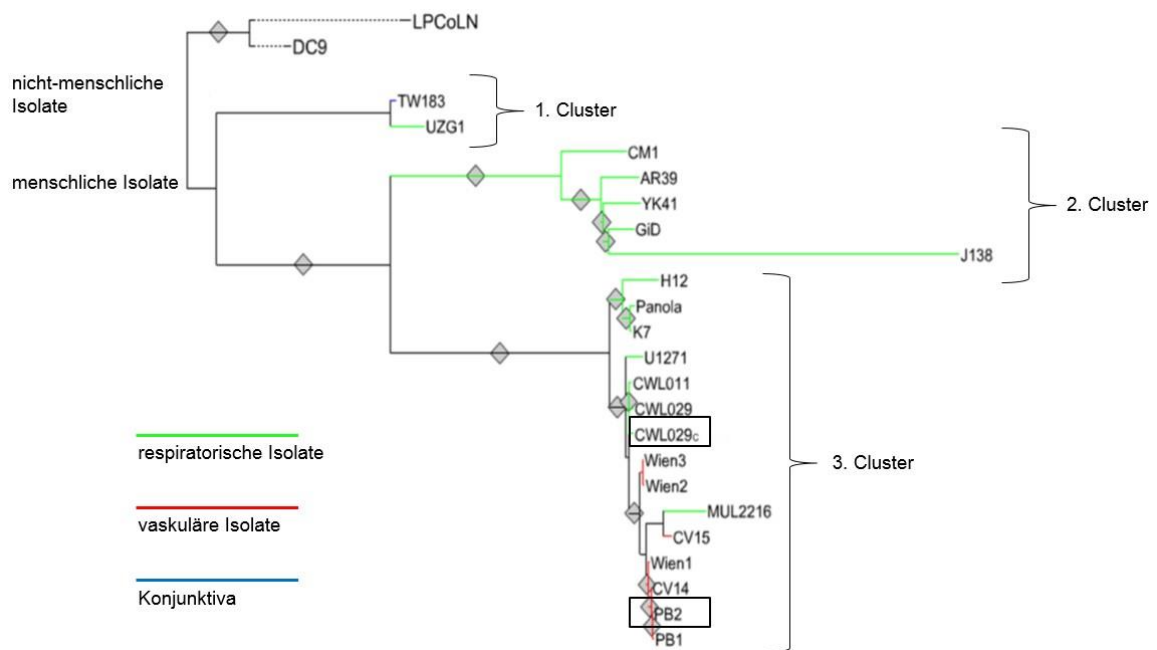


Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum der *C. pneumoniae* Isolate.

Mithilfe von Genomsequenzierung ist es möglich einen Stammbaum einzelner *C. pneumoniae* Isolate zu erstellen. Dieser zeigt eine klare Separation der nicht-menschlichen Isolate DC9 und LPCoLN von den restlichen menschlichen Isolaten. Diese lassen sich in drei Cluster einteilen. Man kann diese in respiratorische - und vaskuläre Isolate, sowie ein Isolat aus der Konjunktiva (gekennzeichnet mit grüner, roter und blauer Linie) unterteilen. Die in dieser Arbeit benutzten Stämme CWL029 und PB2 (markiert mit einem Kästchen), befinden sich in einem Cluster. Die jeweiligen Entfernungen in diesem Baum stimmen im Allgemeinen mit der Anzahl an SNPs zwischen den einzelnen Isolaten überein, sodass sich CWL029 und PB2 genomischen stark ähneln. Abbildung modifiziert nach (179).

2.2.4 Die nsSNPs in respiratorischen – und vaskulären Isolaten

Der phylogenetische Stammbaum (Abbildung 3) zeigt eine Trennung zwischen respiratorischen/konjunktival Isolaten gegenüber den vaskulären Isolaten. Weinmaier *et al.* bestimmten die SNP, welche diese Gruppen voneinander unterscheiden. Neun verschiedene Positionen, die für den Typ des Isolates (respiratorisch/konjunktival oder vaskulär) charakteristisch waren, konnten gefunden werden (179). Die nsSNPs sind tabellarisch (Tabelle 1) aufgeführt. Diese stehen im Zusammenhang mit dem Metabolismus und dem Entwicklungszyklus, der Formation der Einschlussmembran, der Lipopolysaccharid (LPS)-Synthese, der Regulation von Sigmafaktoren und der Beeinflussung der RNA-Polymerase. Noch immer ist unklar, welche Bedeutung diese nsSNPs für vaskuläre und respiratorische Stämme haben.

Tabelle 1: Auflistung der neun nsSNPs in nicht-respiratorischen Isolaten

Gennummer	Genprodukt
CPn0081	RNA Polymerase β -Untereinheit
CPn0289	Glutamattransporter
CPn0292	Einschlussmembranprotein C
CPn0496	Hypothetisches Protein CT391
CPn0650	UDP-N-Acetylglucosamin-3-O-Acyltransferase
CPn0714	Glutamyl tRNA Reduktase
CPn0793	PP2C Phosphatase / RsbW Antagonist
CPn0920	Bisphosphat Nukleotidase
CPn1006	Hypothetisches Protein CT849

2.3 Hypoxie

2.3.1 Die Bedeutung des variierenden Sauerstoffgehalts im Organismus

Der Sauerstoffgehalt *in vivo* variiert in Abhängigkeit vom Gewebetyp bzw. der Körperregion (Tabelle 3). Physiologischerweise sinkt dieser kontinuierlich innerhalb der Blutzirkulation vom arteriellen zum venösen Schenkel und auch im Gewebe zeigt sich ein Sauerstoffgefälle in Abhängigkeit der Entfernung zum versorgenden Gefäß (20,164). Im Rahmen von Entzündungsprozessen wird die Sauerstoffkonzentration zusätzlich reduziert (20,135). Chronisch entzündetes Gewebe zeigt eine erhöhte metabolische Aktivität, die sich in einem erhöhten Sauerstoffbedarf äußert (87). Entzündungsprozesse führen auch zur Vaskulopathie, die zu einer Minderperfusion mit verringerter Sauerstoffversorgung führt (68). Hypoxische Bedingungen stellen somit ein Entzündungskorrelat *in vivo* dar. In Zellkulturexperimenten werden Sauerstoffkonzentrationen von 0,5 - 3% allgemein als hypoxisch bezeichnet (135). Aufgrund der genannten Aspekte wurde 2% O₂ in dieser Arbeit als hypoxische Bedingung gewählt.

Tabelle 2: Sauerstoffkonzentrationen in ausgewählten Geweben bzw. Regionen

Modifiziert nach (28,36,82).

Gewebe/Region	O ₂ [mmHg]	O ₂ [%]
Atmosphärische Luft	160	21,1
Brutschrank	151	20
Alveolarluft	110	14,5
Lunge	42,8	5,6
Arteriell Blut	100	13,2
Venöses Blut	40	5,3
Myokard	34	4,5
Zervix	13 - 48	1,7 - 6,3
Vagina	3,8	0,5
Bindehaut	58	7,7

2.3.2 Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1)

Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF) spielen eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase unter Hypoxie. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert Gene der Angiogenese, Erythropoese und der Glykolyse. Somit wird erstens eine optimale Sauerstoffversorgung der Zielzelle und zweitens die Versorgung mit Adenosintriphosphat (ATP) gewährleistet (164). Folgend wird nur auf den Transkriptionsfaktor HIF-1 eingegangen. HIF-1 besteht aus einer α - und β -Untereinheit (Abbildung 3), die beide konstitutiv exprimiert werden. Die β -Untereinheit liegt stabil im Zellkern vor, während die α -Untereinheit unter Normoxie einem ständigen Abbau unterliegt. Dabei wird HIF-1 α durch sauerstoffabhängige Prolyl-Hydroxylasen (PHD), die zugleich als Sauerstoffsensoren fungieren, im Zytoplasma an zwei Prolinresten (Pro) hydroxyliert. Nach der Hydroxylierung wird HIF-1 α vom von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein (pVHL) erkannt und dem E3-Ubiquitinligase-Komplex zugeführt, welcher das Protein durch Polyubiquitinierung für die Degradation durch das Proteasom markiert (79,83). Der HIF-1-inhibierende Faktor (FIH-1) stellt einen weiteren Sauerstoffsensoren im Zytoplasma dar, mithilfe dessen ein Asparaginrest (Asn) des HIF-1 α hydroxyliert wird. Dadurch erfolgt eine zusätzliche Hemmung auf transkriptioneller Ebene, indem die Bindung des transkriptionellen Koaktivators p300/CBP unter Normoxie verhindert wird (83,114,157). Aufgrund der ausbleibenden Hydroxylierung erfolgt unter Hypoxie die Stabilisierung und Akkumulation von HIF-1 α im Zytoplasma. Nach Translokation in den Nukleus erfolgt die Dimerisierung mit der konstitutiv exprimierten β -Untereinheit. Das Heterodimer bindet an das *hypoxia responsive element* (HRE) in den Promoterregionen von HIF-1 regulierten Genen (135). Der Transkriptionsvorgang wird dabei von p300/CBP unterstützt (57). HIF-1 stellt den wohl wichtigsten Transkriptionsfaktor als zelluläre Antwort auf Hypoxie dar. Auch andere Faktoren wie NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) spielen bei der Regulation eine Rolle (146,171). Eine HIF-1 α Stabilisierung ist nicht allein auf niedrige Sauerstoffkonzentration zurückzuführen, sondern kann auch durch eine Vielzahl anderer Einflussfaktoren (z.B. LPS, ROS, NO und Eisenentzug) unter Normoxie erreicht werden (23,46).

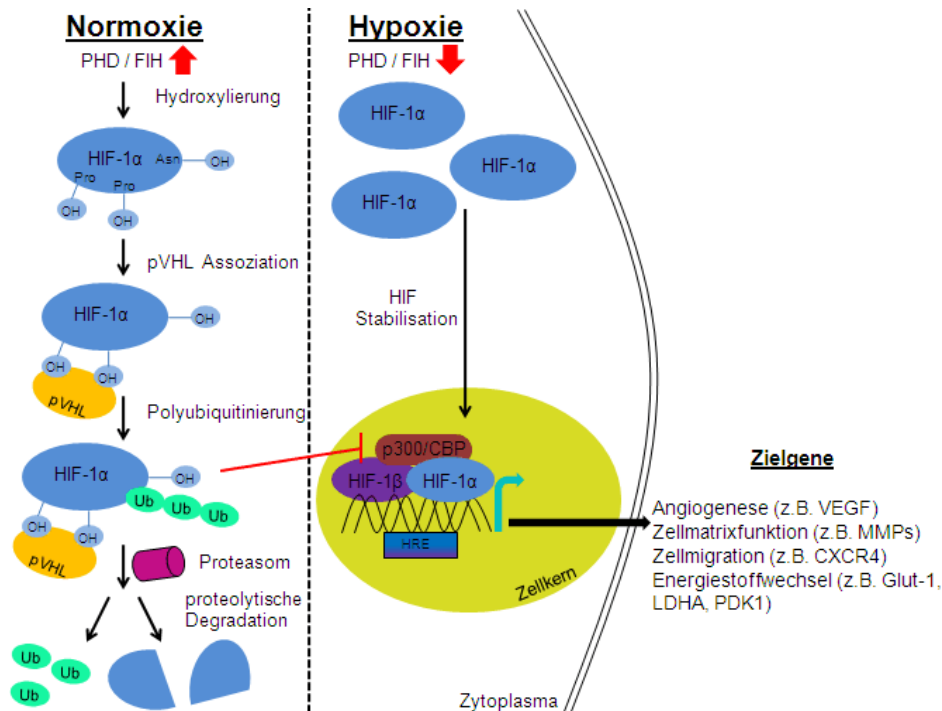


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der HIF-1 α Regulation unter Normoxie und Hypoxie. In Anwesenheit von Sauerstoff wird HIF-1 α unter Beteiligung von Prolylhydroxylasen (PHD) an Prolinresten (Pro) hydroxyliert. Mithilfe des von Hippel-Lindau-Proteins (pVHL) und der Polyubiquitinierung (Ub) erfolgt schließlich die Degradation durch das Proteasom. Der HIF-inhibierende Faktor (FIH) hydroxyliert ein Asparaginrest (Asn) und verhindert damit die spätere Bindung des Koaktivators p300/CBP. Es resultiert eine geringere transkriptionelle Aktivität. Unter hypoxischen Bedingungen sind die PHD und FIH inaktiv und HIF-1 α akkumuliert im Zytoplasma und gelangt in den Zellkern, wo es mit HIF-1 β einen Komplex bildet. Durch Bindung an HRE-Sequenzen (*hypoxia responsive element*) und mithilfe des Koaktivators p300/CBP werden die jeweiligen Zielgene transkribiert. VEGF: *vascular endothelial growth factor*, MMP: Matrixmetalloproteasen, CXCR4: CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, GLUT: Glukosetransporter, LDHA: Laktatdehydrogenase A, PDK1: Pyruvatdehydrogenase Kinase 1.

2.3.3 *C. pneumoniae*-Infektion unter Hypoxie

Auch unter hypoxischen Bedingungen kommt es zu Pathogen-Wirt-Interaktion (Abschnitt 2.1.2). *C. pneumoniae* moduliert innerhalb der Wirtszelle die HIF-1 α Expression in biphasischer Weise. In der frühen Phase der *C. pneumoniae*-Infektion wird HIF-1 α unter Normoxie, als auch unter Hypoxie stabilisiert. Es resultiert eine erhöhte Glucoseaufnahme der Wirtszelle, die zur Replikation benötigt wird und sich in der erhöhten Infektionsrate unter Hypoxie äußert (149). Unter Hypoxie kommt es auch zu einer Zunahme der Einschlussgröße und einem schnelleren Wachstum, welches sich in einer erhöhten Wiederanzuchtsrate widerspiegelt (82). In der späten Phase würde HIF-1 α die Replikation durch Initiierung der Apoptose abschwächen und stellt von Seiten des Bakteriums einen unerwünschten Effekt dar. Mithilfe der chlamydialen Protease CPAF (*chlamydial protease-like activity factor*) wird HIF-1 α schließlich degradiert.

Durch den Abbau unterbindet das Bakterium in der späten Phase der Infektion unter Hypoxie aktiv die Apoptose und kann den Replikationszyklus fortsetzen (149).

2.4 *C. pneumoniae* und die Wechselwirkung mit dem Immunsystem

Das Immunsystem reagiert mittels Rezeptoren auf verschiedenste chlamydiale Stimuli (Abbildung 4). Das angeborene Immunsystem erkennt über spezielle *pattern recognition receptors* (PRR) die hoch-konservierten chlamydialen Strukturen, welche als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet werden. Dazu gehören Proteine des *outer membrane complex* (OmpA/B, Omp3, OmcB), chlamydiales LPS, Hitzeschockproteine (*heat shock proteins*, HSPs), Lipoproteine wie *macrophage infectivity potentiator* (Mip) und peptidoglykan-ähnliche (PGN) Strukturen (104,109,116). Studien konnten zeigen, dass Toll-like-Rezeptoren 2 (TLR2) und TLR4 eine wichtige Rolle bei der Erkennung von *C. pneumoniae* in unterschiedlichen Wirtszellen einnehmen (65,131,139,153). Einerseits wurde TLR2 die größere Bedeutung in der Erregererkennung beigemessen (131,139), andererseits stand TLR4 im Fokus (65,153). Für eine effektive und potente Immunantwort scheinen sowohl TLR2, als auch TLR4 benötigt zu werden (81). Dieser Aspekt scheint wahrscheinlich, da MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) als Adaptermolekül von TLR2 und TLR4 eine zentrale Rolle in der Erkennung des Erregers und in der Initiierung der Immunantwort einnimmt (129). Auch TLR-unabhängige Mechanismen sind bei der Wirtszellaktivierung durch *C. pneumoniae* von Bedeutung (132). Da Chlamydien obligat intrazellulär wachsen, scheinen auch die *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD) Proteine, als zytoplasmatische Proteine in der intrazellulären Mustererkennung beteiligt zu sein; bisher ist vieles diesbezüglich noch unbekannt (77,136,160). Es konnten auch synergistische Effekte zwischen TLRs und NOD-Rezeptoren beobachtet werden (174). Die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) und deren Kaskaden nehmen Einfluss auf die Regulation der Genexpression (29). In humanen Endothelzellen kommt es nach einer Infektion mit *C. pneumoniae* zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen p42/44, p38, sowie JNK/SAPK (c-Jun N-terminale Kinase/*Stress-activated phospho-kinase*) (102,103). Mithilfe des Transkriptionsfaktors NF- κ B erfolgt die Expression zahlreicher proinflammatorische Zytokine, zu denen auch IL-1 β und IL-8 gehören, die in dieser Arbeit analysiert wurden (123,143).

IL-1 β , als systemischer Schlüsselmediator in akuten und chronischen Entzündungen, wird auf transkriptioneller Ebene durch Transkriptionsfaktoren und auf posttranslationeller Ebene durch das Inflammasom reguliert (37,163). Als Inflammasom bezeichnet man dabei eine Assoziation von multimeren, zytosolischen Proteinkomplexen (107,112). Gut beschrieben ist das Inflammasom, welches aus dem *NOD-like receptor pyrin domain containing 3* (NLRP3) besteht und mitverantwortlich für die IL-1 β Aktivierung ist (108). NLRP3 gehört zusammen mit den NOD-Proteinen zu den *NOD-like receptors* (NLRs) (2). Durch Bindung an das Adaptermolekül *Apoptosis associated speck-like protein* (ASC) kann schließlich das Proenzym Caspase-1 gebunden und aktiviert werden (111). Caspase-1 kann IL-1 β und IL-18 in die aktive Form versetzen (45,169). NLRP3 wird dabei durch eine Vielzahl an Stimuli aktiviert; dies ist in Abbildung 5 als aktivierende Stimuli zusammengefasst dargestellt (38,41,86,188). Die Aktivierung des NLRP3 unterliegt dabei zwei Signalen. Das erste Signal liegt dabei auf transkriptioneller Ebene, indem über TLRs oder NLRs die Expression der inaktiven Pro-Form von IL-1 β bzw. IL-18 sowie NLRP3 selbst reguliert werden. In einem zweiten Schritt entsteht, über die oben aufgeführten aktivierenden Stimuli, letztlich der NLRP3 Inflammasom-Komplex, an dessen Ende die katalytisch aktive Caspase-1 entsteht (13,113). IL-8 ist unter anderem in der chemotaktischen Rekrutierung von Entzündungszellen beteiligt und dessen Expression unterliegt einer Reihe von Transkriptionsfaktoren; NF- κ B nimmt dabei die wesentliche Bedeutung in der Induktion der Transkription ein (71,128).

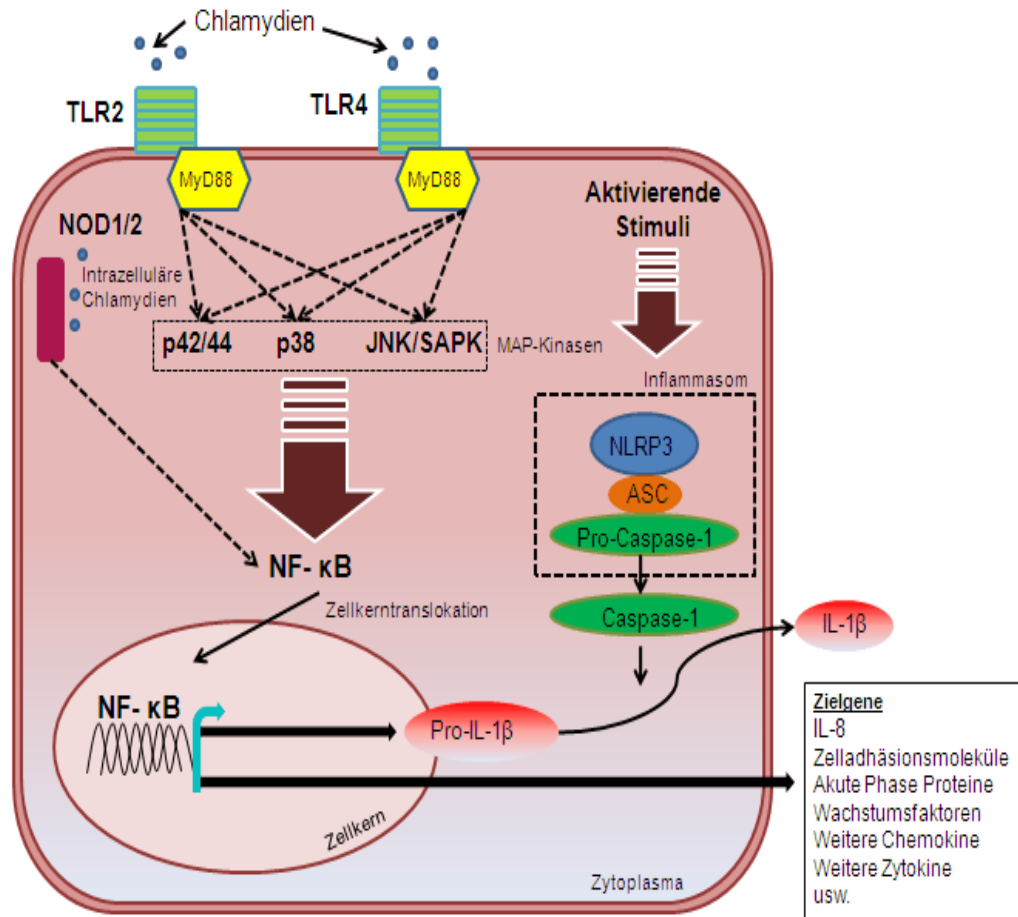


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Wechselwirkung von *C. pneumoniae* mit dem Immunsystem und der Initiierung der Immunantwort.

Extrazellulär befindliche TLR2 und TLR4, sowie die intrazellulären Rezeptoren NOD1/2 können *C. pneumoniae* erkennen. Nach Kontakt des Erregers mit TLR2 und TLR4, wobei MyD88 als Adaptermolekül fungiert, werden Kaskaden aktiviert; hierzu zählen p42/44, p38 und JNK/SAPK. Die gestrichelten Pfeile deuten dabei die kaskadenartigen Reaktionsschritte an. Anschließend wird über eine Vielzahl von Reaktionsschritten der Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert. Bei der Erkennung intrazellulärer Chlamydien durch NOD 1/2 steht letztlich die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB. Unter Zellkerntranslokation und Bindung an die Zielgene erfolgt, die Expression und Sekretion zahlreicher Botenstoffe; unter anderem IL-8. Bei der Sekretion von IL-1β ist das Inflammasom NLRP3 mit seinen Adapterproteinen involviert. Die aktive Caspase-1 spaltet das Pro-IL1β in seine aktive Form und katalysiert zugleich diesen Reaktionsschritt. NLRP3 wird dabei durch zahlreiche Stimuli aktiviert. TLR: Toll-Like-Rezeptor, NOD: *nucleotide-binding oligomerization domain*, MAP-Kinasen: *Mitogen-activated protein-Kinasen*, JNK/SAPK: *c-Jun N-terminale Kinase/Stress-activated phospho-kinase*, NF-κB: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*, NLRP3: *NOD-like receptor pyrin domain containing 3*, ASC: *Apoptosis associated speck-like protein*.

2.5 Fragestellung

Genetische Unterschiede scheinen den Gewebetropismus einzelner Isolate von *C. pneumoniae* zu determinieren. Genomisch unterscheiden sich vaskuläre – und respiratorische Isolate im Wesentlichen in den bisher identifizierten neun nsSNPs. Unklar ist, ob vaskuläre und respiratorische *C. pneumoniae* Isolate ebenfalls funktionelle Unterschiede aufweisen. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit zwei Isolate von *C. pneumoniae* mit verschiedener Isolationsherkunft untersucht werden. Physiologischer Weise variiert der Sauerstoffgehalt im Organismus. Zu berücksichtigen ist dabei, dass ein verminderter Sauerstoffgehalt das Wachstum von *C. pneumoniae* begünstigt. Bislang wurde nicht untersucht, wie sich dieser Aspekt auf unterschiedliche Isolate von *C. pneumoniae* auswirkt. Die funktionellen Unterschiede wurden in dieser Arbeit unter normoxischen - und hypoxischen Bedingungen analysiert. Chlamydiale Oberflächenmerkmale können Immunzellen stimulieren und aktivieren proinflammatorische Mediatoren, die eine große Bedeutung in der Initiierung einer Entzündungsreaktion haben. Bei den zugrundeliegenden Signalkaskaden spielen MAP-Kinasen und das Inflammasom NLRP3 eine große Bedeutung. Die vorliegende Arbeit hatte somit folgende Ziele:

- Es sollte untersucht werden, ob funktionelle Unterschiede unter Normoxie und Hypoxie hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und morphologischer Aspekte von CWL029 und PB2 bestehen.
- Unter Normoxie sollte der Einfluss von CWL029 und PB2 auf die Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren und die MAP-Kinase p38 überprüft werden. Zusätzlich sollte die Beteiligung des Inflammasoms NLRP3 an der IL-1 β Sekretion in PBMCs untersucht werden.
- Es sollten Unterschiede der chlamydialen Signalmoleküle LPS, Mip und HSP60 als mögliche Stimuli hinsichtlich der Aktivierung inflammatorischen Mediatoren aufgezeigt werden.

3 Material

3.1 Laborgeräte

Blotapparatur Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Brutschränke (37 °C, 5% CO ₂)	
Forma Series II 3131	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA
Typ: BB 6220	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Brutschränke (37 °C, 5% CO ₂ , N ₂ -Regulation, O ₂ -Sensor)	
Forma Series II 3141	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA
Hypoxiekammer THC08 124	Toepffer Lab Systems, Göppingen
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
LightCycler 1.0	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnetrührer, RMO	Gerhardt GmbH, Königswinter
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
Photometer Model 680	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Pippetierhilfe accu-jet	Brand GmbH, Wertheim
PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Präzisionswaage KB	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommen

Sicherheitswerkbänke

EN 12469	Clean Air Techniek B.V., Woerden, Niederlande
SterilGard Hood Class II A/B3	Baker Company, Sanford, ME, USA
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH, Schwalbach
Thermocycler C1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortex-Schüttler REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH, Schwalbach
Vibrationsmischer (VXR basic IKA-Vibrax)	IKA Werke GmbH, Staufen
X-RAY Cassette IEC 60406 (30 x 40 cm)	Rego X-Ray GmbH, Augsburg
Zentrifugen	
Biofuge Fresco	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Megafuge 2.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Rotina 38 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Universal 30 F	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

3.2 Verbrauchsmaterialien

6-, 24-Lochplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Blotpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Deckgläser, Ø 10 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
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, Ø 3 mm	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
LightCycler Kapillaren (20 µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Thermanox Plastic Coverslips	Nunc Brand Products, Rochester, NY, USA
96-Loch-Mikrotiterplatte	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Neubauer-Zählkammer	Hassa Laborbedarf, Lübeck
Nitrocellulosemembran Protran	Whatman Inc, Florham Park, NJ, USA
Objektträger (76 x 26 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	Bemis, Neenah, WI, USA

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
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Röhrchen (12, 15, 50 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Transferpipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellkulturflaschen Cellstar Filter Top (175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen (9,6 cm ²)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zyto-System	Hettich, Tuttlingen

3.3 Chemikalien und Reagenzien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Acrylamid-Bis (40%) Lösung, 19:1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Agarose	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
1% BSA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
DMSO	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol, absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
HEPES Buffer Solution (1 M)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

HRP-Substrat	
Immobilon Western	Millipore, Billerica, MA, USA
Super Signal West Femto	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA
Isopropanol 70%	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kalibrierpuffer: pH 6,865	WTW, Weilheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
L-Glutamin (10 mg/ml)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Mounting Fluid	Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, GB
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Natriumazid (NaN ₃)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt
PCR Nukleotid Mix (dNTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
RNase AWAY Spray	Molecular Bio Products, San Diego, CA, USA
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt
Titriplex III (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
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
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA

3.4 Puffer und Lösungen

ELISA-Blockpuffer	35 ml PBS-Puffer, 1% BSA, pH 7,2 - 7,4
Blockpuffer (5%)	5 g Trockenmilchpulver, 100 ml T-TBS Puffer
Blotpuffer	3 g Tris, 14,4 g Glycin, 200 ml Methanol, ad 1 l A. dest.
Cycloheximid, Stammlösung	1 g Cycloheximid, ad 1 ml A. dest.
Diluent	50 ml PBS-Puffer, 1% BSA, pH 7,2 - 7,4
Elektrophoresepuffer (5x)	15 g Tris, 72 g Glycin, 5 g SDS, ad 1 l A. dest., pH 8,3
Lysispuffer (Western-Blot)	3,94 g Tris HCl, 40 ml Glycerol, 8 g SDS, 20 ml DTT (1 M), Bromphenolblau, ad 200 ml A. dest., pH 7,8
Montis Fixanz	156 ml Natrium-Kacodylat-Puffer (0,1 M), 25 ml Glutaraldehyd (25%), 19 ml Paraformaldehyd (10%), 3 ml CaCl ₂ -Lösung (3%), pH 3,75
Natrium-Kacodylat-Puffer (0,2 M)	42,8 g Dimethylarinsäure-Natriumsalz, 68,46 g Saccharose, ad 1 l A. dest.
PBS-Puffer	80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na ₂ HPO ₄ 12 x H ₂ O, 2 g KH ₂ PO ₄ , ad 1 l A. dest., pH 7,2
Sammelgelpuffer	30 g Tris, ad 500 ml A. dest. pH 6,8
SPG-Puffer	75 g Saccharose, 2,47 g Na ₂ HPO ₄ , 0,36 g NaH ₂ PO ₄ , 0,72 g L-Glutaminsäure, ad 1 l A. dest., pH 7,3
Stripping-Puffer	7,5 g Glycin, ad 500 ml A. dest., pH 2,5, gekühlt auf 4 °C
TBS-Puffer (10x)	24,2 g Tris, 80 g NaCl, ad 1 l A. dest., pH 7,6
Trenngelpuffer	90,5 g Tris, ad 500 ml A. dest., pH 8,8
T-TBS Puffer	100 ml TBS-Puffer (10x), 1 ml Tween-20, ad 1 l A. dest.
Waschpuffer	1 l PBS-Puffer, 500 µl 0,05% Tween-20, pH 7,2 - 7,4

3.5 Inhibitoren

Caspase-1 Inhibitor II (Ac-YVAD-CMK)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
SB203580 (MAP-Kinase p38 Inhibitor)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt

3.6 Enzyme und Kits

Human IL-1 β /IL-1F2 DuoSet	R&D Systems, Minneapolis, USA
IMAGEN Chlamydia Kit	Oxoid, Cambridgeshire, Großbritannien
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Limulus Amebocyte Lysate, Endosafe KTA	Charles River Laboratories, Charleston, SC, USA
Mykoplasmen-Test, Venor GeM	Minerva Biolab, Berlin
NucleoSpin RNA II	Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Substrate Reagent Pack (8 vials Color A, 8 vials Color B)	R&D Systems, Minneapolis, USA
SensiMix Capillary Kit	Bioline GmbH, Luckenwalde
Reverse Transkriptase, RevertAid Premium	Fermentas, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase, Transcriptor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase-Inhibitor, Protector	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase-Inhibitor, RiboLock	Fermentas, St. Leon-Rot
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden

3.7 Medien und Medienzusätze

Sofern nicht anders angegeben, stammen die hier aufgeführten Medien und -zusätze von der Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe.

Dauerkulturmedium	DMEM mit Glucose (4,5 g/l) und L-Glutamin, versetzt mit 10% FKS, 20 µg/ml Gentamycin, 33,2 mM HEPES-Puffer
Versuchsmedium	RPMI 1640 ohne L-Glutamin, versetzt mit 5% FKS, 0,1 mg/ml L-Glutamin, 1x NEAA
Anzuchtmedium für Monozyten	500 ml RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA), 10% FKS (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA), 5 ml HEPES Puffer (1 M), 5 ml L-Glutamin, 1 ml steril filtriertes β-Mercaptoethanol (25 mM)
Lymphozyten-Separationsmedium	LSM 1077

3.8 Zelllinien

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien

Name	Ursprung	Nummer	Vertrieb
HEp-2	Epidermoides Larynxkarzinom	CCL-23	ATCC, Manassas, USA
PBMCs	Isoliert aus <i>Buffy Coats</i>	Unbekanntes Spenderblut	Inst. für Transfusionsmedizin, Universität zu Lübeck

3.9 Antikörper

3.9.1 Antikörper für Western Blot Analysen

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper für Western Blot Analysen

Name	Herkunft	Hersteller	Verdünnung	Klonalität
Anti- β -Aktin	Kaninchen	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:1000	polyklon
Anti-Phospho-p38 MAP-Kinase	Kaninchen	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:1000	polyklon
Anti-Heat Shock Protein 60	Maus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA	1:1000	monoklon

Anti-Mip-Protein: Das rekombinante *Cpn*-Mip-Protein wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. Guido Hansen aus dem Institut der Biochemie der Universität zu Lübeck zur Verfügung gestellt. Das dialysierte, rekombinante *Cpn*-Mip-Protein wurde zur Immunisierung von weiblichen BALB/c Mäusen (Charles River, Köln) verwendet. Der Antikörper wurde in einer 1:1000 Verdünnung verwendet.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper für Western Blot Analysen

Name	Herkunft	Hersteller	Verdünnung	Klonalität
Anti-Kaninchen IgG, HRP konjugiert	Ziege	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:2000	polyklon

3.10 Oligonukleotide

3.10.1 Primer für die cDNA Synthese

Von der Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim stammen die Random Hexamer Primer p(dN)₆, die für die Synthese der komplementären DNA (cDNA) verwendet wurden.

3.10.2 Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

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

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

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

3.10.3 Primer für die quantitative RT-PCR

Sämtliche Primer wurden als Lyophilisat von der Fa. TIB MOLBIOL, Berlin bezogen.

Nach Herstellerangaben wurden die Primer zu einer Arbeitskonzentration von 20 μ M mit 250 μ l RNase-freiem H₂O gelöst und anschließend aliquotiert.

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Primerpaare

Primerpaar	Sequenz 5' > 3'	Primerlänge (bp)
ActB	Forward CCTGGCACCCAGCACAAT	18
	Reverse GGGCCGGACTCGTCATAC	18
Cp16S	Forward TCGCCTGGGAATAAGAGAGA	20
	Reverse AATGCTGACTTGGGGTTGAG	20
IL-1 β	Forward TCCCCAGCCCTTTTGTTGA	19
	Reverse TTAGAACCAAATGTGGCCGTG	21
IL-8	Forward CCAGGAAGAAACCACCGGA	19
	Reverse GAAATCAGGAAGGCTGCCAAG	21

3.11 Softwareprogramme

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
GraphPad Prism Statistik Software	Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Image J	National Institutes of Health, USA
LightCycler Data Analysis	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Microplate Manager	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Microsoft Office 2007/2010/2013	Microsoft Cooperation, Redmond, USA
Reference Manager 12	Thomson Reuters, New York City, NY, USA

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Erreger, sodass die Anzucht in Wirtszellen erfolgte. Als solche dienten in dieser Arbeit sowohl HEp-2 Zellen, als auch PBMCs. Die HEp-2-Zellkultur wurde wöchentlich mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) auf eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen getestet. PBMCs wurden vor jedem Versuch frisch isoliert. Vor Versuchsbeginn wurden alle benötigten Medien und -zusätze auf Raumtemperatur (RT) gebracht.

4.1.1 Anzucht von HEp-2 Zellen

HEp-2 Zellen wurden in Dauerkulturmedium bei 37 °C und 5% CO₂ in Zellkulturflaschen kultiviert. Vor dem Umsetzen der Zellen wurde von den konfluenten, adhären Zellen das Dauerkulturmedium entfernt und die Zellen mit 6 ml sterilem PBS-Puffer gewaschen. Durch Inkubation mit 4 ml Trypsin/EDTA für 5 min bei 37 °C und 5% CO₂ konnten die Zellen vom Flaschenboden gelöst werden. Nach Zugabe von 6 ml Dauerkulturmedium wurde die Wirkung des Trypsins/EDTAs gestoppt. Mithilfe der Transferpipette wurde die Suspension gemischt. Vereinzelte Zellen konnten nun für die Aussaat in neue Zellkulturflaschen bzw. für die Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer verwendet werden (Abschnitt 4.2).

4.1.2 Isolierung von humanen Monozyten aus *Buffy Coats*

Die PBMCs wurden für jeden Versuch aus *Buffy Coats* frisch isoliert. Der *Buffy Coat* besteht hauptsächlich aus Leukozyten und Thrombozyten und ist ein Nebenprodukt bei der Verarbeitung einer Vollblutspende zu Erythrozytenkonzentrat und gefrorenen Frischplasma. Die *Buffy Coats* stammten von unbekanntem Blutspendern und wurden vom Inst. für Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck bezogen. Der Inhalt des *Buffy Coats* wurde mit 250 ml PBS-Puffer verdünnt. Zu Beginn wurden je 15 ml des Lymphozyten-Separationsmediums in mehrere 50 ml Rörchen vorgelegt und mit 35 ml des mit PBS-Puffer verdünnten *Buffy Coats* überschichtet. Das Lymphozyten-Separationsmedium diente der Trennung der Zellen in einem Ficoll-Gradienten anhand ihrer spezifischen Dichte. Der Dichtegradient kommt durch Ficoll, ein ungeladenes Polymer aus Saccharose, zustande. Erythrozytenaggregate, Granulozyten und tote Zellen können dabei die Ficollschicht passieren und sich als dunkelrotes Pellet am Boden des 50 ml Rörchens absetzen.

Die leichten Thrombozyten verbleiben in der Plasmaphase, wohingegen sich die Lymphozyten und Monozyten in der weißlich erscheinenden Interphase zwischen Plasma und Ficoll ansammeln. Durch isopyknische Zentrifugation (2080 x g, 25 min, RT) erfolgte die Auftrennung der Zellpopulation in diesem Gradienten. Zum Aufrechterhalten des Dichtegradientens wurde die Zentrifuge weder beschleunigt, noch gebremst. Die Interphase wurde mit einer sterilen Transferpipette abpipettiert und in ein neues 50 ml Röhrchen überführt, welches dann mit PBS-Puffer aufgefüllt wurde. Es folgte eine weitere Zentrifugation (2080 x g, 10 min, RT), wobei sowohl mit Beschleunigung, als auch mit Bremse zentrifugiert wurde. Man erhielt ein weißliches Pellet, indem die PBMCs enthalten waren. Ein dreimaliger Waschschrift mit sterilem PBS-Puffer diente der Aufreinigung diesen Pellets. Dabei wurde mit 832 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden jeweils zwei Gradienten mit 2 ml PBS-Puffer zusammengeführt. Die Monozyten wurden in der Neubauer-Zählkammer gezählt und entsprechend des geplanten Versuchs auf die Platten mit Anzuchtmedium und den Zusätzen (Abschnitt 3.7) ausgesät (Abschnitt 4.2).

4.2 Zellzahlbestimmung

Die jeweilige Zellsuspension wurde nach Abschnitt 4.1.1 und 4.1.2 gewonnen. Die Anzahl der HEp-2 Zellen in der Zellsuspension ließ sich ermitteln, indem 50 µl dieser Suspension mit 200 µl PBS-Puffer gemischt wurden (1:5-Verdünnung). Anschließend wurden wiederum 50 µl dieses Puffergemisches entnommen und mit 50 µl Trypanblau versetzt (1:2-Verdünnung). Durch diese beiden Verdünnungsschritte lag letztlich eine 1:10-Verdünnung vor (1:5 x 1:2), die es bei der Ermittlung der Zellzahl zu berücksichtigen galt. Von dieser 1:10-Verdünnung wurde 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer mit einer Tiefe von 0,1 mm pipettiert und die lebenden Zellen in den vier großen Eckquadraten mithilfe des Lichtmikroskops unter zehnfacher Vergrößerung ermittelt. Aus der Anzahl der lebenden Zellen und dem Verdünnungsverhältnis wurde daraufhin die Zellzahl pro ml Suspension nach unten stehender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl [ml]} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Volumen} \cdot 10^4}{\text{Anzahl gezählter Großquadrate (4)}}$$

Für die Bestimmung der PBMCs in der Zellsuspension, wurden 10 µl der Zellsuspension in 90 µl Trypanblau überführt, sodass auch hier eine 1:10-Verdünnung vorlag. Davon wurden 10 µl in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Mithilfe der Formel konnte nun die Zellzahl für HEp-2 Zellen, sowie für PBMCs pro ml Suspension ermittelt werden. Im Folgenden sind tabellarisch die einzelnen Versuchsbedingungen aufgeführt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Zellkulturbedingungen in den durchgeführten Versuchen

Versuche	Zellkulturplatte	Zellzahl / Loch	Volumen / Loch [ml]	Medium
Infektionsstock	6-Loch	8×10^5	2	Dauerkulturmedium
Wiederanzucht	24-Loch	3×10^5	1	Dauerkulturmedium
Infektion von HEp-2 Zellen	24-Loch	$0,5 \times 10^5$	1	Versuchsmedium
Infektion von PBMCs	24-Loch	6×10^5	1	Anzuchtmedium für Monozyten

4.3 Infektionsbiologische Methoden

Zur Infektion von HEp-2 Zellen und PBMCs wurden die *C. pneumoniae*-Stämme CWL029 und PB2 verwendet. Bei den Experimenten war darauf zu achten, dass mit einem gleichen DNA-Verhältnis der Stämme infiziert wurde (Abschnitt 4.5.4).

4.3.1 Bestimmung der Infektiosität

Die Infektiosität von Chlamydien wird gebräuchlich in IFU/ml (*inclusion forming units*) angegeben. Dabei entspricht ein IFU einem lichtmikroskopisch darstellbaren Einschlusskörperchen; somit entspricht die Anzahl der gefärbten Einschlüsse der Anzahl an IFUs in der Ausgangslösung. Das Vorgehen wird in den folgenden Abschnitten 4.3.2 und 4.3.3 erklärt.

4.3.2 Herstellung eines Infektionsstocks von *C. pneumoniae*

Für die Herstellung des *C. pneumoniae*-Infektionsstocks wurden HEp-2 Zellen in zwölf 6-Lochplatten mit je 8×10^5 Zellen pro Loch in Dauerkulturmedium ausgesät und über Nacht bei Normoxie inkubiert. Am folgenden Tag lagen konfluente Zellen vor, die mit dem entsprechenden *C. pneumoniae*-Stamm infiziert werden konnten.

Hierzu wurde das Medium verworfen und 2 ml Dauerkulturmedium, versetzt mit 1 µg/ml Cycloheximid, in das jeweilige Loch zugegeben. Die Zellen wurden mit dem jeweiligen *C. pneumoniae*-Stamm (5×10^5 IFU/ml) durch Zentrifugation bei 700 x g für 1 h und bei 35 °C infiziert und anschließend für 72 h bei Normoxie im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die infizierten Zellen mit einem Zellschaber sorgsam vom Plattenboden abgelöst und zusammen mit dem Medium in 50 ml Röhrchen überführt. Die Röhrchen enthielten bis zur 5 ml Eichmarke Glasschrott, mit deren Hilfe nun die infizierten Zellen nach 5 min auf dem Vibrationsmischer aufgeschlossen werden konnten. Die Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (200 x g, 5 min, 4 °C) und die Chlamydien blieben aufgrund der geringen Zentrifugalkraft im Überstand. Die chlamydienhaltigen Überstände wurden nun in sterile 50 ml Röhrchen zusammengeführt, ohne dabei das Pellet aufzuwirbeln. Mittels Zentrifugation (15500 x g, 99 min, 4 °C) erhielt man das Chlamydien-Pellet, welches in 2 - 3 ml SPG-Puffer gelöst wurde. Das Pellet wurde mit Spritzenkanülen homogenisiert. Es wurden jeweils 20 µl in sterile Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Ermittlung des Chlamydien-Gehalts wurde mithilfe einer 1:5-Verdünnungsreihe in einer von HEp-2 Zellen bewachsenen 24-Lochplatte durchgeführt, wobei die Chlamydieneinschlüsse gefärbt, gezählt (Abschnitt 4.7) und die Menge der IFUs bestimmt wurden (Abschnitt 4.3.3).

4.3.3 Berechnung des Chlamydien-Gehalts

Die Einschlüsse von Chlamydien wurden mittels indirekten Immunfluoreszenztests (IFT) (Abschnitt 4.7) angefärbt und schließlich ausgezählt. Zehn Gesichtsfelder eines Loches der Verdünnungsreihe wurden am Fluoreszenzmikroskop mit einem 40er Objektiv ausgezählt. Basierend auf der verwendeten Verdünnungsreihe war bekannt, wie viel µl der Chlamydien-Suspension eingesetzt wurde. Durch die bekannten Parameter wie der Fläche eines Lochs einer 24-Lochplatte (200 mm²) und der Größe eines Gesichtsfelds (0,139 mm²), ergab sich somit zur Bestimmung des Chlamydien-Gehalts folgende Formel:

$$\text{IFUs}/\mu\text{l} = \frac{\text{Gezählte Einschlüsse} \cdot 200 \text{ mm}^2}{\text{Gezählte Gesichtsfelder} \cdot \text{Eingesetzte } \mu\text{l} \cdot 0,139 \text{ mm}^2}$$

4.3.4 Infektion von HEp-2 Zellen mit *C. pneumoniae*

Nachdem wie in den obigen Abschnitten 4.1.1 und 4.2 bereits erläutert, die Anzucht von HEp-2 Zellen und die entsprechende Aussaat in die Löcher erfolgte, wurde nach 24 h Inkubation dem Versuchsmedium Cycloheximid in einer Konzentration von 0,1 µg/ml hinzugefügt. Cycloheximid bewirkt eine Hemmung der Proteinbiosynthese, wodurch den Chlamydien die Infektion erleichtert wird. Die jeweiligen Infektionsdosen der Stämme CWL029 und PB2 wurden auf die gleiche Menge an DNA durch Bestimmung der Kopieanzahl von 16S-rRNA mithilfe der qRT-PCR eingestellt (Abschnitt 4.5.4). Basierend auf dem Titer des CWL029 Infektionsstocks (Abschnitt 4.3.3), erfolgte die Infektion mit 3×10^5 IFU/ml. Nach Zugabe der Stämme CWL029 bzw. PB2 in das Medium des Loches, erfolgte die Infektion mittels Zentrifugation (700 x g, 1 h, 35 °C). Anschließend wurden die Platten bei Normoxie bzw. Hypoxie inkubiert und entsprechend der Versuchsanordnungen weiterverarbeitet. Deckgläschen dienten der Kontrolle der Infektion und wurden mit den direkten IFT (Abschnitt 4.6) untersucht. Die Infektionsrate wurde dabei in Prozent von *C. pneumoniae* infizierten Zellen zu insgesamt 390 Zellen auf 39 unterschiedlichen Deckgläsern in 6 unabhängigen Experimenten angegeben. Der Durchmesser der Einschlüsse wurde in 6 unabhängigen Experimenten bei insgesamt 360 Einschlüssen ermittelt und als jeweiliger Mittelwert für den Stamm angegeben.

4.3.5 Infektion von Monozyten mit *C. pneumoniae*

Wie in den obigen Abschnitten 4.1.2 und 4.2 bereits erläutert, erfolgte die Isolation der PBMCs aus *Buffy Coats* und nach der Aussaat in die Löcher wurden die Platten infiziert. Die jeweiligen Infektionsdosen der Stämme CWL029 und PB2 wurden auf die gleiche Menge an DNA durch Bestimmung der Kopieanzahl von 16S-rRNA mithilfe der qRT-PCR eingestellt (Abschnitt 4.5.4). Basierend auf dem Titer des CWL029 Infektionsstocks (Abschnitt 4.3.3), erfolgte die Infektion mit 5×10^5 IFU/ml am darauffolgenden Tag. Mit der Transferpipette wurden die Chlamydien mit den noch in Suspension befindlichen Monozyten vermischt und in Kontakt gebracht. Auf eine Zentrifugation wurde verzichtet, um eine Aktivierung der Monozyten zu verhindern. Die Infektion wurde mithilfe der Anfertigung von Zytospins (Abschnitt 4.9) und dem direkten IFT (Abschnitt 4.6) kontrolliert.

4.3.6 Wiederanzucht

Am Vortag der Wiederanzucht wurden HEp-2 Zellen in einer 24-Lochplatte ausgesät (Abschnitt 4.2). Am Tag der Wiederanzucht wurde dem Dauerkulturmedium 1 µg/ml Cycloheximid hinzugefügt. Die Zellen, die zur Wiederanzucht verwendet werden sollten, wurden zuvor für 48 h mit Chlamydien infiziert. Diese Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers vom Plattenboden gelöst und suspensiert. Anschließend wurde die Suspension in ein 10 ml Röhrchen mit ca. 1 ml Glasschrott überführt und für 5 min auf einen Vibrationsmischer gegeben. Dadurch wurden infizierte Zellen aufgeschlossen und Chlamydien freigesetzt. Nun wurde das erste Loch der 24-Lochplatte mit 250 µl der Suspension infiziert. 250 µl wurden aus diesem Loch entnommen und in das nächste überführt. Dieses Vorgehen wurde über 6 Löcher fortgeführt, sodass man am Ende eine Verdünnungsreihe von 1:5 erhielt. Im Anschluss wurden die Chlamydien auf die Zellen zentrifugiert (700 x g, 1 h, 35 °C) und für 72 h bei Normoxie inkubiert. Dann wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen mit Methanol bei -20 °C fixiert. Um die Wiederanzuchtsrate zu bestimmen, wurden die Einschlüsse der Chlamydien mit dem indirekten IFT (Abschnitt 4.7) nachgewiesen und ausgezählt (Abschnitt 4.3.3). Der Mittelwert der Wiederanzuchtsrate wurde anhand von sechs unabhängigen Experimenten gebildet.

4.3.7 Inhibitionsversuche

Um den Einfluss der MAP-Kinase p38 und des Inflammasoms NLRP3 auf die Induktion bzw. Sekretion von IL-1β zu untersuchen, wurden die Infektionsversuche mit den Inhibitoren Caspase-1 Inhibitor II und p38 Kinase-Inhibitor (SB203580) durchgeführt.

4.3.7.1 Caspase-1 Inhibitor II (Ac-YVAD-CMK)

Die Isolierung der Monozyten aus *Buffy Coats* und die Aussaat wurde in Abschnitt 4.1.2 und 4.2 beschrieben. Am Tag nach der Isolation erfolgte vorab eine Inkubation mit dem in DMSO gelösten Caspase-1 Inhibitor II (in einer Konzentration von 100 µM pro Loch) für 1 h bei 37 °C unter Normoxie. Im Anschluss erfolgte die Infektion, die in Abschnitt 4.3.5 beschrieben wurde. Die Überstände wurden nach einer fünf bis achtstündigen Infektion gewonnen, indem der Inhalt des Loches unter Abschaben des Bodens in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde und dieses zentrifugiert wurde (457 x g, 5 min, RT). Die Überstände wurden abpipettiert, bei -80 °C gelagert und schließlich für ELISA (Abschnitt 4.11) verwendet.

4.3.7.2 p38 Kinase-Inhibitor (SB203580)

Die Isolierung der Monozyten aus *Buffy Coats* und die Aussaat wurde in Abschnitt 4.1.2 und 4.2 beschrieben. Nach der Isolation erfolgte am nächsten Tag die Inkubation mit dem in DMSO gelösten p38 Kinase-Inhibitor (in einer Konzentration von 20 μ M pro Loch) für 1 h bei 37 °C unter Normoxie. Im Anschluss erfolgte die Infektion, die in Abschnitt 4.3.5 beschrieben wurde. Nach fünfstündiger Infektion wurde wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben weiterverfahren.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Probenaufbereitung

Es wurden Proteine von *C. pneumoniae* infizierten PBMCs nach 0, 2 und 5 hpi gewonnen. Die adhärennten Zellen wurden mit der Pipettenspitze vom Boden gelöst. Die Suspension wurde in Reaktionsgefäße gegeben und anschließend zentrifugiert (457 x g, 5 min, RT). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 250 μ l Lysispuffer gelöst. Bis zur Western Blot Analyse wurden die Probe bei -20 °C gelagert.

4.4.2 SDS-PAGE

Die Proteine des jeweiligen Lysats wurden elektrophoretisch anhand ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli wurde benutzt (106). Es wurde ein 8%iges Trenngel mit einem 5%igem Sammelgel in einer Größe von 8 x 7,3 cm mit zehn Taschen gegossen.

Tabelle 10: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel

	Trenngel (8%)	Sammelgel (5%)
A. dest.	5,4 ml	6,15 ml
1,5 M Tris	2,5 ml	-
0,5 M Tris	-	2,5 ml
Acrylamid-Bisphosphonat	2 ml	1,25 ml
10% SDS-Lösung	100 μ l	100 μ l
TEMED	5 μ l	10 μ l
10% APS-Lösung	50 μ l	50 μ l

Das Trenngel wurde nach dem Gießen mit A. dest. überschichtet, um eine gleichmäßige Polymerisation zu gewährleisten. Die Taschen im Sammelgel wurden mit Agarose luftdicht verschlossen. Die Polymerisation des Trenngels, als auch die des Sammelgels waren nach ca. 45 min abgeschlossen. Die auspolymerisierten Gele wurden in eine vertikale Elektrophoresekammer eingesetzt, mit Elektrophoresepuffer übergossen und die Gelkammern mit dem Puffer gespült. Die Proteine (Abschnitt 4.4.1) wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert, das entstandene Kondensat in den Reaktionsgefäßen abzentrifugiert und 30 µl Probematerial in die jeweilige Gelkammer aufgetragen. Als Größenstandard dienten 7,5 µl eines Molekulargewichtsmarkers im Molekulargewichtsbereich von 7 - 175 kDa. Die Migration durch das Sammelgel erfolgte bei einer Spannung von 70 V für 15 min. Die Auftrennung der Proteine anhand ihrer Molekularmasse erfolgte im Trenngel bei einer Spannung von 200 V für 55 min.

4.4.3 Western Blot Analyse

Durch den Blot erfolgt nach der Elektrophorese ein Transfer der separierten Proteine auf Nitrocellulosepapier. Nun konnten immunologische Analysen gemacht werden. Die sich anschließenden Arbeitsschritte (Immundetektion, Visualisierung und Stripping der Membran) werden ebenfalls in diesem Abschnitt beschrieben.

4.4.3.1 Blotten

Die Proteine wurden nach der SDS-Page aus dem Gel elektrophoretisch auf ein Nitrocellulosepapier mittels Nass-Blot übertragen. Das Sammelgel wurde vom Trenngel entfernt. Die Blotkassetten wurden ausgehend von der dunklen Seite, die in Richtung der Kathode zeigt, ohne Lufteinschlüsse in folgender Reihenfolge bestückt: Schaumstoff, Blotpapier, Trenngel, Membran, Blotpapier, Schaumstoff. Anschließend wurde die Blotkammer mit 4 °C kaltem Blotpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte bei konstanter Kühlung und einer elektrischen Spannung von 75 V für 150 min.

4.4.3.2 Immundetektion

Unspezifische Bindungsstellen der Membran wurden mit Blockpuffer für 1 h bei RT mithilfe des Taumelschüttlers blockiert. Im Anschluss wurden die Membranen zweimal für je 15 min mit T-TBS Puffer auf dem Schüttler gewaschen. Der Primärantikörper wurde mit Blockpuffer verdünnt (Abschnitt 3.9.1). Die Membran wurde über Nacht auf einem Taumelschüttler bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die Membran zweimal für je 15 min mit T-TBS Puffer auf dem Schüttler gewaschen.

Der Sekundärantikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt ist, wurde in Blockpuffer verdünnt (Abschnitt 3.9.1) und für 1 h bei RT mit der Membran auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein zweimaliges Waschen für je 15 min mit T-TBS Puffer.

4.4.3.3 Visualisierung

Gleiche Volumina des Peroxidasesubstrats Luminol und des Kosubstrats Wasserstoffperoxid wurden nach Herstellerangaben vermischt und die zu detektierenden Membranen darin inkubiert. Die dabei entstehende Lumineszenz konnte im Chemilumineszenz-Imager detektiert werden und trat dabei nur in den Bereichen auf, wo die Immunkomplexe zuvor binden konnten. In dieser Arbeit wurde jeweils ein repräsentatives Ergebnis der Western Blot Analysen dargestellt und die Proteinmenge wurde dabei gegen das *Housekeeping*-Protein β -Aktin normalisiert (Abschnitt 4.4.3.4). Die Bande mit der stärksten Intensität wurde hier als 100% definiert und die Auswertung der Bandenintensität erfolgte mit der Software Bio1D (Abschnitt 3.11).

4.4.3.4 Stripping

Als Stripping bezeichnet man den Vorgang Primär- und Sekundärantikörper von der Blotmembran zu lösen. Nach zweimaligem Waschen mit T-TBS Puffer für je 5 min wurden die Membranen mit saurem (pH 2,5), auf 4 °C gekühltem Glycin-Puffer (Abschnitt 3.4) schüttelnd für 5 min inkubiert. Nach zweimaligen Waschen für je 15 min mit T-TBS Puffer, wurden die Membranen in 5%iger Blocklösung inkubiert. Dann erfolgten die Arbeitsschritte, die unter Abschnitt 4.4.3.2 und 4.4.3.3 beschrieben wurden. Als Primärantikörper wurde ein Anti- β -Aktin Antikörper verwendet.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 RNA-Isolation

Die Isolierung der mRNA aus infizierten PBMCs erfolgte mittels NucleoSpin RNA II Kit nach definierten Zeitpunkten (0, 2 und 5 hpi). Das Anzuchtmedium wurde abpipettiert, das Loch gespült und die gewonnene Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (457 x g, 5 min, RT). Der RNA-Lysispuffer wurde im Verhältnis 1:100 mit β -Mercaptoethanol versetzt und das entstandene Pellet wurde in 350 μ l Lysispuffer lysiert und anschließend bei -70 °C gelagert.

Die eigentliche RNA-Isolation erfolgte nach Herstellerangaben, wobei die RNA mit 60 μ l RNase freiem H₂O von der Säule eluiert wurde. Im Anschluss erfolgte die reverse Transkription (Abschnitt 4.5.2).

4.5.2 Reverse Transkription

Die fragile RNA wurde mit Hilfe der reversen Transkription in die stabilere cDNA umgeschrieben, da die RNA nicht direkt als Template in die PCR eingesetzt werden konnte. Dieses Verfahren beruht auf RNA-abhängige DNA-Polymerasen.

Tabelle 11: Das jeweilige Pipettierschema der reversen Transkription mit Fermentas und Roche

Reagenzien	Fermentas		Roche	
	Volumen [μ l]	End- konzentration	Volumen [μ l]	End- konzentration
RNase-freies H ₂ O	5,5	-	6,0	-
Reaktionspuffer [5x]	4,0	1x	4,0	1x
dNTP Mix	2,0	1 mM	2,0	1 mM
Random Hexamer Primer	2,0	0,04 U/ml	2,0	0,04 U/ μ l
RNase-Inhibitor	0,5	2 U	0,5	50 U
Reverse Transkriptase	1,0	10 U	0,5	20 U
RNA aus Isolation	5,0	-	5,0	-

Anschließend erfolgte die Reaktion im Thermocycler mit den folgenden Programmen (Tabelle 12). Die Proben wurden im Anschluss bei -20 °C gelagert.

Tabelle 12: Temperaturprofil der reversen Transkription in Abhängigkeit der verwendeten Reagenzien

Arbeitsschritte	Temperatur [°C]	Dauer in min (Fermentas)	Dauer in min (Roche)
Hybridisierung	25	10	10
Reverse Transkription	50	30	60
Denaturierung des Enzyms	85	5	5
Kühlung	4	∞	∞

4.5.3 Quantitative RT-PCR

Bei der quantitativen Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR) handelt es sich um eine Methode, bei der man aus der Menge an amplifizierten Produkten auf die Menge der eingesetzten RNA-Matrizen schließen kann. Somit lassen sich Aussagen bezüglich der Transkriptionshäufigkeit bestimmter Gene treffen. Ein Thermocycler für LightCycler Glas-Kapillaren wurde verwendet, wobei PCR-Produkte direkt während ihrer Entstehung erfasst wurden. Hierfür wurde der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green der Fa. Roche, sowie der Fa. Bioline in die DNA eingebaut; die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge an PCR-Produkten zu. Die entstandene cDNA aus der reversen Transkription (Abschnitt 4.5.2) wurde mit den entsprechenden Primern (Abschnitt 3.10.2) analysiert. Als Negativkontrolle wurde dem Ansatz anstelle der cDNA A. dest. zugefügt. Dem Light Cycler Fast Start Reaktionsmix wurden vor der Nutzung 10 µl LightCycler Fast Start Enzym hinzugefügt, während bei dem Produkt der Fa. Bioline keine enzymatische Aktivierung erforderlich war.

Tabelle 13: Pipettierschema der qRT-PCR der Fa. Roche und Bioline

Reagenzien	Roche		Bioline	
	Volumen [μ l]	End- konzentration	Volumen [μ l]	End- konzentration
H ₂ O	12,6	-	11,7	-
Mg ₂ Cl	2,4	4,0 mM	-	-
Forward Primer [20 μ M]	0,5	0,5 μ M	0,2	100 nM
Reverse Primer [20 μ M]	0,5	0,5 μ M	0,2	100 nM
Light Cycler Fast Start Reaktionsmix SYBR-Green	2,0	1 x	-	-
50 x SYBR Green Lösung	-	-	0,4	1 x
Sensi Mix Capillary Mix	-	-	4,0	1 x
Enzym Mix	-	-	1,5	1 x
cDNA	2,0	-	2,0	-

Die Amplifizierung erfolgte im Light Cycler bei folgendem Temperaturprofil:

Tabelle 14: Temperaturprofil der qRT-PCR

Arbeitsschritte	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10 min	
Denaturierung	95	10 sec	45
Primerhybridisierung	60	5 sec	45
Elongation	72	10 sec	45

Die Analyse und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Light Cycler Data Analysis (Abschnitt 3.11). Dabei wurden die Daten entsprechend der mRNA Menge des *Housekeeping*-Gens 18S-rRNA normalisiert und die Probe mit der stärksten Expression wurde als 100% definiert. Bei der Betrachtung von chlamydialen Genen wurde gegen die Expression von β -Aktin normalisiert.

4.5.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Um eine Vergleichbarkeit von CWL029 mit PB2 in den Experimenten zu gewährleisten, musste die Infektion im gleichen DNA-Verhältnis erfolgen. Hierfür erfolgte die Isolierung der DNA mittels QIAamp DNA Mini Kit nach Protokollvorgabe. Nach der Isolation der DNA erfolgte die qRT-PCR mit den Produkten der Fa. Roche (Abschnitt 4.5.3). Als Primer diente Cp16S (Abschnitt 3.10.2). Als Grundlage sämtlicher Versuche wurde festgelegt, dass der Anteil der zur Infektion benötigten Chlamydien für beide Stämme gleich sein musste. Dafür wurden die jeweiligen Infektionsdosen auf die gleiche Menge an DNA durch Bestimmung der Kopieanzahl von 16S-rRNA mithilfe der qRT-PCR eingestellt. Die Infektionsdosis von PB2 wurde dabei gegen das DNA-Verhältnis von CWL029 normalisiert.

4.6 Direkter Immunfluoreszenztest

Mithilfe des direkten IFTs wurde die Infektionsrate ermittelt, sowie die morphologischen Charakteristika der chlamydialen Einschlüsse analysiert. Die Deckgläser mit infizierten Zellen wurden in einer 24-Lochplatte mit Methanol für 15 min bei -20 °C fixiert. Dann wurde das Methanol verworfen und die Deckgläschen in der 24-Lochplatte bei RT getrocknet. Vor Gebrauch des IMAGEN Chlamydia Kits wurde 1 ml PBS-Puffer hinzugefügt. Die Zellen auf dem Deckgläschen wurden mit 10 µl des verdünnten Antikörpers gefärbt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer erfolgte die Fixation mit der Zellseite nach unten auf einem Objektträger in einem Tropfen Mounting Fluid. Die Fixierung mit gebräuchlichem Nagellack diente dem Luftausschluss, der die Bildaufnahme und -qualität beeinflusst hätte. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erschienen zelluläre Bestandteile rot und chlamydiale Einschlusskörperchen grün. Die Lagerung der Deckgläschen erfolgte bei 4 °C.

4.7 Indirekter Immunfluoreszenztest

Der indirekte IFT wurde in 24-Lochplatten durchgeführt (Abschnitt 4.3.2 und 4.3.6). Das Medium wurde verworfen und es erfolgte die Fixierung mit Methanol für 20 min bei -20 °C. Nachdem das Methanol verworfen wurde, wurde 300 µl eines Anti-Chlamydien-LPS-Antikörpers hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 45 min bei 37 °C. Danach wurde der Antikörper abgenommen und zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Nach zweimaligem Waschen der Löcher mit PBS-Puffer, wurde zu jedem Loch 300 µl des 1:250 mit PBS-Puffer verdünnten Sekundärantikörpers gegeben.

Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 45 min bei 37 °C. Der Chlamydien spezifische Sekundärantikörper (FITC-konjugierter Anti-Maus-Antikörper, Dako) wurde nach der Inkubation verworfen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer konnte die Infektionsrate mithilfe des Fluoreszenzmikroskops ermittelt werden (Abschnitt 4.3.3).

4.8 Elektronenmikroskopie

Es wurde wie in Abschnitt 4.1.1 und 4.2 bereits beschrieben verfahren. Zusätzlich wurden Thermanox Plastic Coverslips in die 24-Lochplatten gelegt. Über Nacht konnten die Zellen an diese adhären. Am darauffolgenden Tag erfolgt die Infektion, die in Abschnitt 4.3.4 erläutert wurde. Das Medium der infizierten Zellen wurde 48 hpi bzw. 72 hpi verworfen und die Fixierung der Zellen erfolgte mit 1 ml Montis Fixanz. Für 1 h erfolgte die Fixierung bei RT im Dunkeln. Dann wurde das Montis Fixanz verworfen und die Löcher mit PBS-Puffer aufgefüllt. Die sich anschließenden Arbeitsschritte sowie die Aufnahmen der EM-Bilder wurden von Mitarbeitern des Instituts für Anatomie der Universität zu Lübeck unter der Leitung von PD Dr. med. Matthias Klinger durchgeführt.

4.9 Anfertigen von Zytospins

Die Isolierung der PBMCs, die Aussaat und die Infektion wurden bereits in Abschnitt 4.1.2, 4.2 und 4.3.5 beschrieben. Nach 72 hpi wurden schließlich 100 µl der Zellsuspension aus dem jeweiligen Loch in die Zyto-Einsätze pipettiert und mit Parafilm verschlossen. Nachdem die Zyto-Einsätze in die Zyto-Behälter gestellt wurden, erfolgte die Zentrifugation (260 x g, 3 min, RT). Dabei adhären die Zellsuspension auf dem Objektträger und der restliche Überstand konnte abpipettiert werden. Unter der Sicherheitswerkbank erfolgte die Trocknung der Objektträger. Im Anschluss erfolgte für 15 min bei -20 °C die Fixierung in Methanol. Daraufhin wurden die Objektträger für 15 min bei 37 °C getrocknet, um dann die Immunfluoreszenzfärbung mit dem IMAGEN Chlamydia Kit vorzunehmen (Abschnitt 4.6).

4.10 LPS-Konzentrationsbestimmung

Das Limulus Amebocyte Lysate, Endosafe KTA wurde für die Bestimmung des LPS-Gehalts nach Herstellerangaben verwendet. Als Negativkontrolle wurde A. dest. verwendet. Anhand einer 1:10-Verdünnungsreihe wurde geschaut, in welchem endotoxinfreien Röhrchen unter Zugabe der jeweiligen Probeverdünnung sich eine gallertartige Substanz bildete. Wenn diese Probe trotz Drehung des Röhrchens um 180° bestehen blieb, galt diese Probe als positiv. Mittels des mitgelieferten Kontrollstandards konnte nun die in der Probe enthaltene Endotoxinkonzentration (EU/ml) der Chlamydien bestimmt werden.

4.11 Interleukin-1 β -ELISA

Die Isolierung der PBMCs aus *Buffy Coats*, das Aussäen der Zellen in die Platten, die Infektion und der Gebrauch des Caspase-1 Inhibitors II wurde in den Abschnitten 4.1.2, 4.2, 4.3.5 und 4.3.7.1 beschrieben. Zur Bestimmung der IL-1 β -Konzentration im Zellüberstand von PBMCs 5 - 8 hpi wurde ein indirekter „Sandwich“-ELISA durchgeführt. Nach Titration der optimalen Antikörper- und Substratkonzentrationen wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

Zu Beginn wurde eine 96-Lochplatte mit dem monoklonalen Maus-anti-hIL-1 β -Antikörper (4,0 μ g/ml, 100 μ l/Loch) bestückt, nach 12 - 24 h Inkubation bei RT wurde die Platte ausgeschlagen und dreimal mit Waschpuffer gespült. Im Anschluss wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit dem ELISA-Blockpuffer (300 μ l/Loch) blockiert. Die Platte wurde mit Parafilm zwecks Verdunstungsschutzes abgeklebt und für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Der ELISA-Blockpuffer wurde verworfen und die Platte dreimal mit Waschpuffer gespült. Dann konnten die Proben (50 μ l, 1:2 mit Diluent verdünnt) und die hIL-1 β -Standards in Duplikaten (3,91 - 250 pg/ml in sieben Verdünnungsschritten von je 1:2) pipettiert werden. Nachfolgend wurde der Detektionsantikörper, ein polyklonaler, biotinylierter Ziege anti-hIL-1 β -Antikörper nach Herstellerangaben (200 ng/ml, 100 μ l/Loch) aufpipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei RT erfolgte ein dreimaliges Waschen. Nach einer 20-minütigen Inkubation im Dunklen mit Streptavidin-HRP (1:200-Verdünnung mit Diluent) erfolgte erneut ein dreimaliger Waschschrift. Im Anschluss wurde das Entwickler-Substrat (1:1-Verdünnung mit Tetramethylbenzidine und Wasserstoffperoxid, 100 μ l/Loch) zugegeben und lichtgeschützt für 20 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch 2 M Schwefelsäure (50 μ l/Loch) gestoppt.

Zügig erfolgte im Anschluss die Messung der optischen Dichte am Photometer (450 nm). Die Berechnung der IL-1 β -Konzentration gelang mithilfe einer sigmoiden Standardkurve und wurde dankenswerterweise von Mitarbeitern von Dr. med. Kristina Rohmann aus der medizinischen Klinik III für Pulmologie / Infektiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, durchgeführt.

4.12 Statistik und Auswertung

Die vorliegenden Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Sobald drei oder mehrere Gruppen in einem Versuch analysiert wurden, wurde bei einem statistisch signifikanten (P-Werte $\leq 0,05$), einfaktoriellen ANOVA, multiple Vergleiche nach Šidák durchgeführt. Die statistische Berechnung zwischen zwei Gruppen erfolgte anhand des Student's *t*-Tests (einseitig, gepaart). Sowohl für die multiplen Vergleiche nach Šidák, als auch für den Student *t*-Test wurden P-Werte von $\leq 0,05$ als statistisch signifikant (*) angesehen. Des Weiteren wurden P-Werte von $\leq 0,01$ (**) und $\leq 0,001$ (***) angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Der respiratorische - (CWL029) und der vaskuläre Stamm (PB2) unterscheiden sich hinsichtlich ihres Entwicklungszyklus und morphologischer Charakteristika

Epithelzellen des Respirationstraktes stellen den Ort der Erstinfektion mit *C. pneumoniae* dar. In der Lunge erfolgt auch die Kontaktaufnahme zwischen dem Erreger und PBMCs, die für die systemische Dissemination verantwortlich gemacht werden.

Ziel der Arbeit war, durch Infektion von HEp-2 Zellen, die funktionellen Unterschiede zwischen CWL029 und PB2 hinsichtlich der Infektionsrate, Einschlussgröße und Wiederanzuchtverhalten darzulegen. Vor dem Hintergrund, dass bei Entzündungsprozessen der Sauerstoffgehalt sinkt und das Umgebungsmilieu hypoxisch wird, wurden die funktionellen Unterschiede unter Normoxie und Hypoxie untersucht.

5.1.1 Die Infektionsrate und die Einschlussgröße unterscheiden sich unter Normoxie und Hypoxie

Die Infektion von HEp-2 Zellen mit CWL029 und PB2 konnte 48 hpi mittels direktem IFT dargestellt werden (Abbildung 6 A und B) und anhand derer erfolgte die Quantifizierung der Infektionsrate (Abbildung 7 A und B) und der Einschlussgröße (Abbildung 8 A und B). Die Infektion von HEp-2 Zellen unter Normoxie ergab eine signifikant höhere Infektionsrate für CWL029 von $30\% \pm 6\%$ gegenüber PB2 mit $25\% \pm 6\%$ (Abbildung 7 A). Unter Hypoxie ergab sich für CWL029 eine Infektionsrate von $36\% \pm 3\%$, die signifikant erhöht gegenüber der von PB2 mit $29\% \pm 4\%$ gewesen ist (Abbildung 7 B).

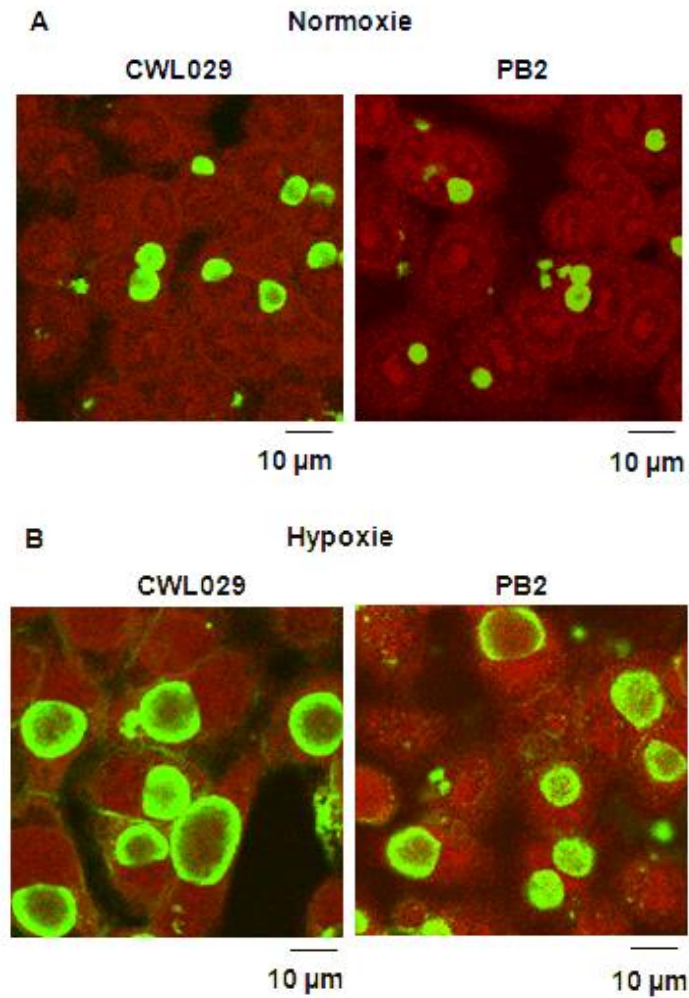


Abbildung 6: Einschlusskörper von CWL029 und PB2 in HEp-2 Zellen unter Normoxie und Hypoxie (48 hpi).

Im direkten IFT stellten sich mit Maus-Anti-Chlamydien-LPS-Antikörper die intrazellulären Chlamydieneinschlüsse (grün) und die HEp2-Zellen als Wirtszellen (rot) dar. (A) zeigt die Einschlüsse der Stämme unter Normoxie und (B) unter Hypoxie. Die Abbildung stammt aus einem repräsentativen Experiment (n=6).

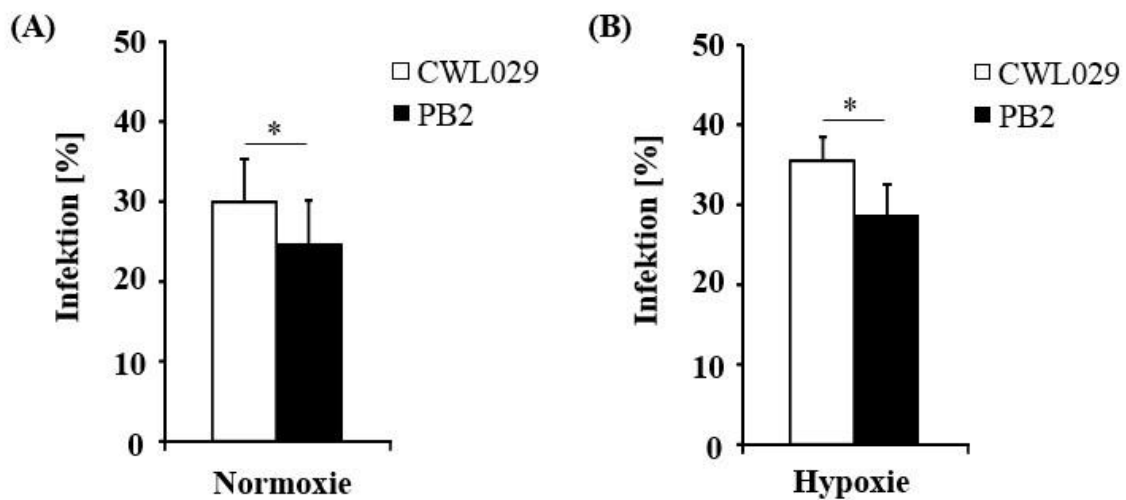


Abbildung 7: Vergleich der Infektionsraten [%] von CWL029 und PB2 in HEp-2 Zellen unter Normoxie (A) und Hypoxie (B) (48 hpi).

CWL029 zeigte sowohl unter Normoxie (A), als auch unter Hypoxie (B) eine signifikant höhere Infektionsrate als PB2. (n=6; Mittelwert \pm Standardfehler; Student *t*-Test * $p \leq 0,05$).

Zudem wies CWL029 im Vergleich zu PB2 signifikant größerer Einschlüsse unter Normoxie, als auch unter Hypoxie auf (Abbildung 8 A und B). Unter Normoxie hatte CWL029 eine durchschnittliche Einschussgröße von $7 \mu\text{m} \pm 0,4 \mu\text{m}$, während für PB2 eine von $6 \mu\text{m} \pm 0,3 \mu\text{m}$ (Abbildung 8 A) angegeben werden konnte. Die Einschussgröße unter Hypoxie von CWL029 war dabei mit $13 \mu\text{m} \pm 0,4 \mu\text{m}$ signifikant größer gegenüber der von PB2 mit $12 \mu\text{m} \pm 0,3 \mu\text{m}$ (Abbildung 8 B).

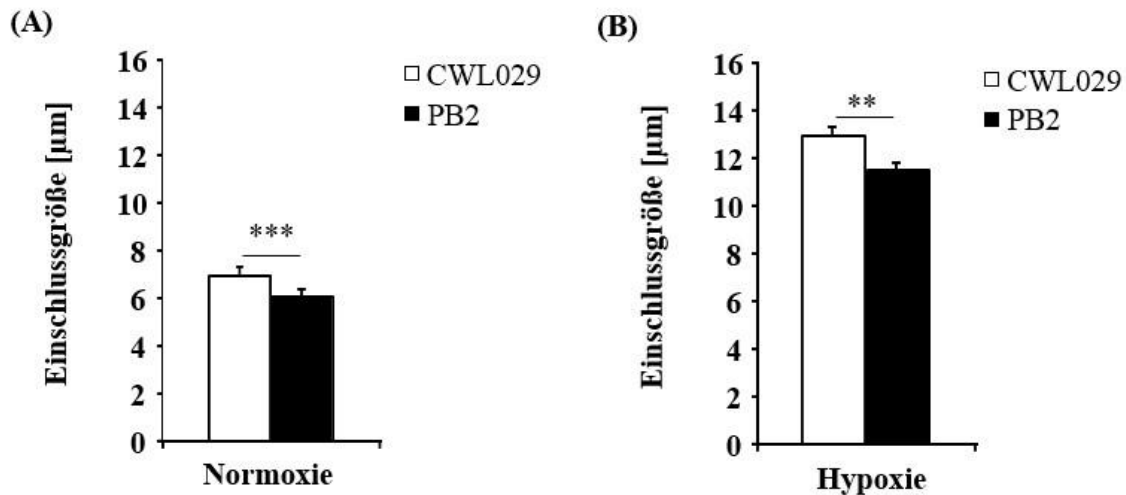


Abbildung 8: Vergleich der Einschussgröße [µm] von CWL029 und PB2 in HEp-2 Zellen unter Normoxie (A) und Hypoxie (B) (48 hpi).

Für CWL029 ergab sich sowohl unter Normoxie (A), als auch unter Hypoxie (B) signifikant größere Einschlüsse im Vergleich zu PB2. (n=6; insgesamt 360 Einschlüsse; Mittelwert ± Standardfehler; Student *t*-Test ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Mithilfe der EM-Bilder konnten die chlamydialen Einschlüsse mit ihren morphologischen Erscheinungsformen dargestellt werden. In diesen stellen sich die EKs aufgrund ihrer hohen Elektronendichte als kleine schwarze Punkte dar, während die RKs etwas größer und heller erscheinen (Abbildung 9 A und B). Die EM-Bilder zeigten, in Übereinstimmung mit den IFT-Bildern (Abbildung 6 A und B), dass 48 hpi unter Normoxie und Hypoxie CWL029 im Vergleich zu PB2 größere Einschlüsse aufwies (Abbildung 9 A und B). Unter Normoxie zeigte sich 48 hpi, dass der Einschluss von CWL029 sowohl EKs, als auch RKs enthielt (Abbildung 9 A). Der Einschluss von PB2 48 hpi unter Normoxie wiederum zeigte vermehrt RKs (Abbildung 9 A). Nach 72 hpi zeigte sich eine Größenzunahme der Einschlüsse unter Normoxie und Hypoxie für CWL029 und PB2 (Abbildung 9 A und B). Nach 72 hpi unter Normoxie zeigte der Einschluss von CWL029 ebenfalls EKs und RKs (Abbildung 9 A), wohingegen der Einschluss von PB2 72 hpi unter Normoxie ebenfalls vermehrt RKs aufwies (Abbildung 9 A). Unter Hypoxie zeigten die Einschlüsse 48 hpi und 72 hpi für beide Isolate sowohl EKs und RKs (Abbildung 9 B).

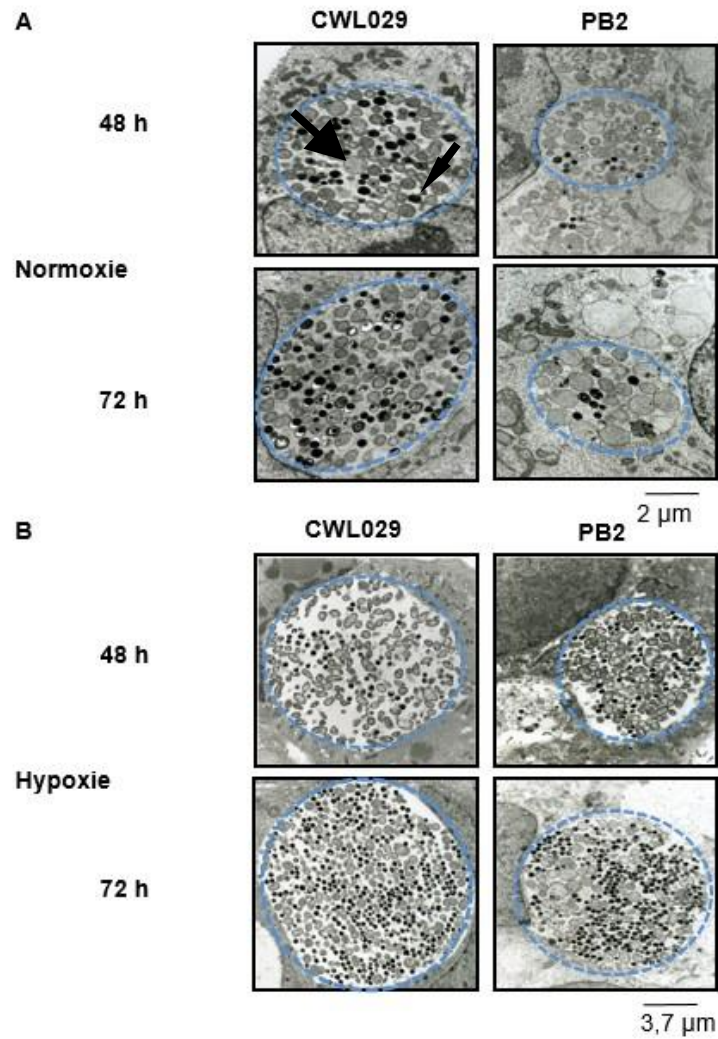


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CWL029 und PB2 in HEP-2 Zellen unter Normoxie und Hypoxie (48 hpi und 72 hpi).

Der breite Pfeil weist exemplarisch auf ein RK innerhalb des Einschlusses (gestrichelte blaue Linie), wohingegen der schmale Pfeil auf ein EK deutet. (A) zeigt die Einschlüsse 48 hpi und 72 hpi für beide Stämme unter Normoxie. (B) zeigt die Einschlüsse 48 hpi und 72 hpi für beide Stämme unter Hypoxie. Unter Normoxie und Hypoxie zeigte sich 48 hpi für CWL029 ein größerer Einschluss im Vergleich zu PB2. 72 hpi zeigte sich eine Größenzunahme der Einschlüsse für beide Stämme unter Normoxie und Hypoxie. Während der Einschluss von CWL029 unter Normoxie 48 hpi und 72 hpi sowohl EKs und RKs enthält, zeigen sich im Einschluss von PB2 vermehrt RKs und weniger EKs. Unter Hypoxie zeigten die Einschlüsse 48 hpi und 72 hpi für beide Isolate sowohl EKs und RKs.

5.1.2 Unterschiede im Wiederanzuchtverhalten unter Normoxie und Hypoxie

Mithilfe des indirekten IFTs erfolgte die Bestimmung des Wiederanzuchtverhaltens. Für CWL029 ließen sich $7,3 \times 10^6$ IFUs/ml $\pm 2,1 \times 10^6$ IFUs/ml und für PB2 $1,6 \times 10^6$ IFUs/ml $\pm 0,5 \times 10^6$ IFUs/ml *C. pneumoniae* ermitteln (Abbildung 10 A). PB2 zeigte somit unter Normoxie eine signifikant geringere Wiederanzuchtsrate als CWL029 (Abbildung 10 A). Unter Hypoxie hatte CWL029 eine mit $50,2 \times 10^6$ IFUs/ml $\pm 6,75 \times 10^6$ IFUs/ml signifikant höhere Wiederanzuchtsrate im Vergleich zu PB2 mit $31,6 \times 10^6$ IFUs/ml $\pm 13,2 \times 10^6$ IFUs/ml (Abbildung 10 B). Der Gehalt der EKs ist für das Wiederanzuchtverhalten verantwortlich, sodass die aufgezeigten Ergebnisse (Abbildung 10 A und B) mit den EM-Bildern 48 hpi übereinstimmen (Abbildung 9 A und B).

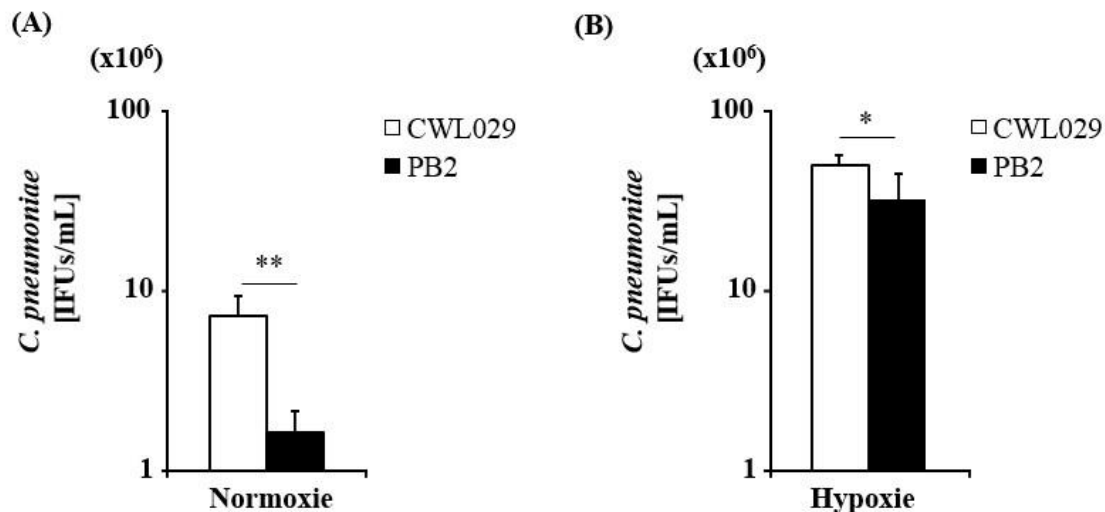


Abbildung 10: Vergleich des Wiederanzuchtverhaltens [IFUs/ml] von CWL029 und PB2 in HEp-2 Zellen unter Normoxie (A) und Hypoxie (B) (48 hpi).

Unter Normoxie wies PB2 eine signifikant geringere Wiederanzuchtsrate im Vergleich zu CWL029 auf (A). Auch unter Hypoxie wies PB2 eine signifikant geringere Wiederanzuchtsrate im Vergleich zu CWL029 auf (B). (n=6; Mittelwert \pm Standardfehler; Student *t*-Test * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

5.2 CWL029 und PB2 zeigen eine unterschiedliche Wechselwirkung mit PBMCs

Bei der systemischen Dissemination spielt die Infektion von PBMCs als Zielzelle eine entscheidende Rolle. In dem folgenden Abschnitt soll die Immunreaktivität bzw. die Interaktion zwischen CWL029 bzw. PB2 und PBMCs, unter Normoxie, dargelegt werden. Die mRNA Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β bzw. IL-8 wurde dabei zu unterschiedlichen Zeitpunkten betrachtet. Zudem wurde die Beteiligung der MAP-Kinase p38 in infizierten PBMCs geprüft. Im Zusammenhang mit IL-1 β erfolgte die Inhibition der MAP-Kinase p38 mit SB203580 und die Involvierung des Inflammasoms NLRP3 wurde mittels Caspase-1 Inhibitor II überprüft.

5.2.1 Erhöhte mRNA Expression von IL-1 β und IL-8 bei einer Infektion mit PB2

Eine Infektion von PBMCs mit *C. pneumoniae* führt zur Sekretion unterschiedlichster Zytokine. So wurden in dieser Arbeit das systemisch wirkende IL-1 β und das chemotaktisch wirkende IL-8 untersucht. Eine Infektion mit PB2 führte 2 hpi zu einer $16 \pm 3,6$ fachen Erhöhung der IL-1 β mRNA Expression gegenüber dem Medium (Abbildung 11). Diese war gegenüber der von CWL029 mit einer $9 \pm 2,7$ fachen Erhöhung der IL-1 β mRNA Expression nicht signifikant (Abbildung 11). PB2 hatte 5 hpi eine $84 \pm 27,4$ fache Erhöhung der IL-1 β mRNA Expression gegenüber dem Medium (Abbildung 11). Diese war gegenüber der von CWL029 mit einer $45 \pm 16,9$ fachen Erhöhung signifikant (Abbildung 11). Darüber hinaus konnte für 0 hpi ein nicht signifikanter Anstieg der IL-1 β mRNA Expression für beide Stämme gegenüber dem Medium gemessen werden (Abbildung 11).

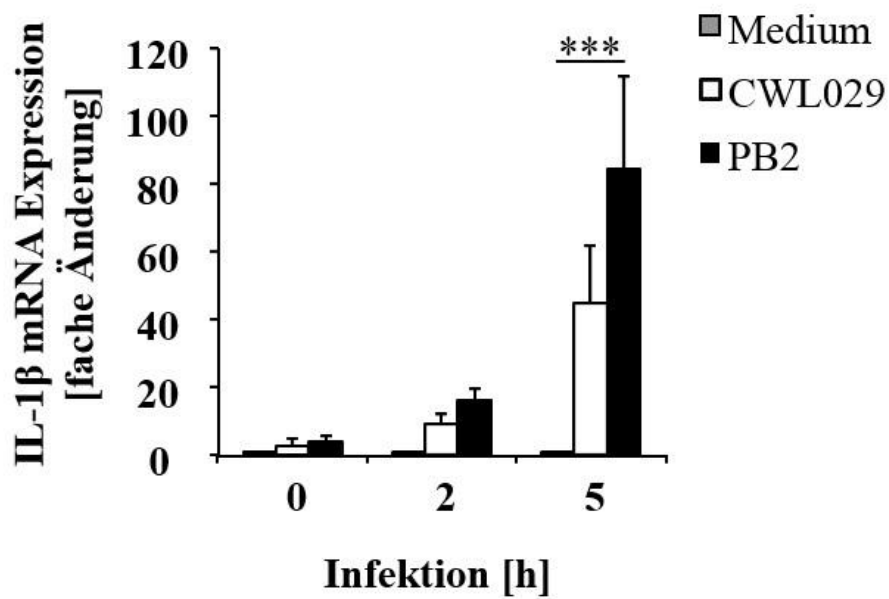


Abbildung 11: qRT-PCR von IL-1 β nach Infektion von PBMCs mit CWL029 und PB2 unter Normoxie (0, 2 und 5 hpi).

Für 0 hpi konnte ein nicht-signifikanter Anstieg beider Stämme gegenüber dem Medium gezeigt werden. 2 hpi zeigte sich für beide Stämme ein nicht-signifikanter Anstieg gegenüber dem Medium. PB2 zeigte einen signifikanten Anstieg 5 hpi. (n=6; Mittelwert \pm Standardfehler; multiple Vergleiche nach Šidák *** $p \leq 0,001$).

Eine Infektion mit PB2 führte 5 hpi zu einer $21 \pm 7,5$ fachen Erhöhung der IL-8 mRNA Expression gegenüber dem Medium (Abbildung 12). Diese war gegenüber der von CWL029 mit einer $12 \pm 4,7$ fachen Erhöhung der IL-8 mRNA Expression signifikant (Abbildung 12). Es konnte für 0 hpi und für 2 hpi ein nicht signifikanter Anstieg der IL-8 mRNA Expression für beide Stämme gegenüber dem Medium gemessen werden (Abbildung 11).

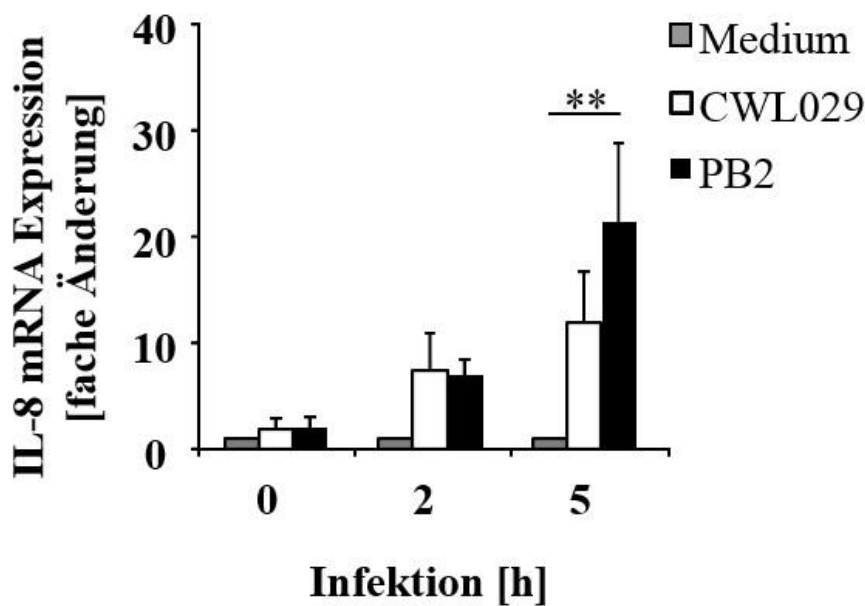


Abbildung 12: qRT-PCR von IL-8 nach Infektion von PBMCs mit CWL029 und PB2 unter Normoxie (0, 2 und 5 hpi).

Für 0 hpi und 2 hpi konnte für beide Stämme ein nicht-signifikanter Anstieg gegenüber dem Medium aufgezeigt werden. PB2 zeigte einen signifikanten Anstieg 5 hpi. (n=5; Mittelwert \pm Standardfehler; multiple Vergleiche nach Šidák $**p \leq 0,01$).

5.2.2 Erhöhte Aktivierung der MAP-Kinase p38 bei einer Infektion mit PB2

Für 0 hpi konnte keine signifikante Änderung der Aktivierung der MAP-Kinase p38 für die Stämme nachgewiesen werden (Abbildung 13 A und B). 2 hpi zeigte CWL029 eine $1,6 \pm 0,3$ fache Erhöhung der Aktivierung der MAP-Kinase p38 gegenüber dem Medium, während PB2 eine $1,9 \pm 0,3$ fache Erhöhung aufwies (Abbildung 13 A und B). Der Zeitpunkt 2 hpi zeigte dabei keine Signifikanz (Abbildung 13 A und B). CWL029 zeigte 5 hpi eine $2,1 \pm 0,4$ fache Erhöhung gegenüber dem Medium. Diese war nicht signifikant (Abbildung 13 A und B). Die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der MAP-Kinase p38 war für PB2 5 hpi mit einer $3,6 \pm 0,8$ fachen Erhöhung gegenüber dem Medium signifikant (Abbildung 13 A und B).

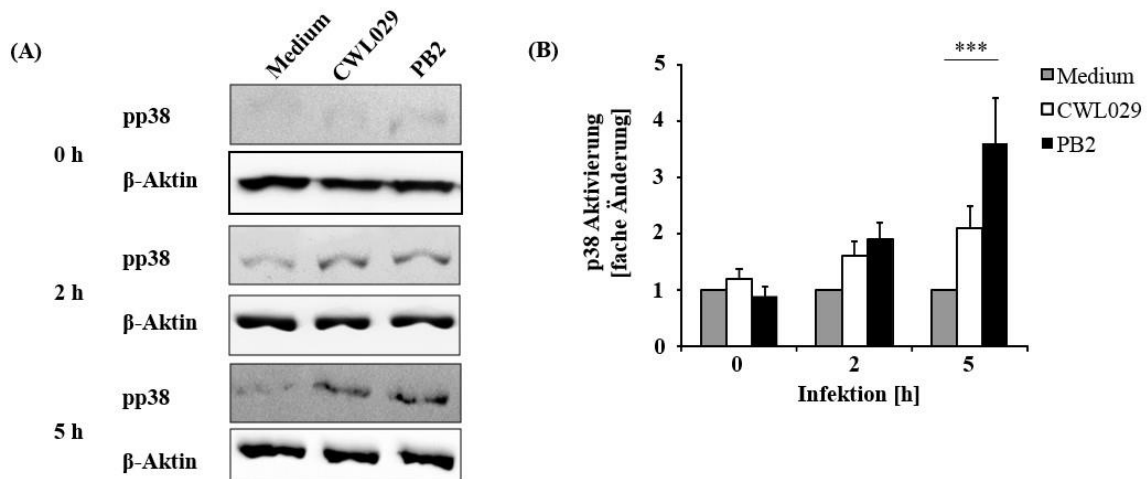


Abbildung 13: Expressionsanalyse der MAP-Kinase p38 nach Infektion von PBMCs mit CWL029 und PB2 unter Normoxie (0, 2 und 5 hpi).

Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot (A) und der densitometrischen Auswertung (B). Nach 0 hpi zeigte sich keine signifikante Änderung für die Stämme. 2 hpi konnte ein nicht signifikanter Anstieg für beide Stämme gezeigt werden. 5 hpi zeigte PB2 einen signifikanten Anstieg der phosphorylierten und aktiven MAP-Kinase p38. (n=5; Mittelwert \pm Standardfehler; multiple Vergleiche nach Šidák *** $p \leq 0,001$).

Vor dem Hintergrund der Aktivierung der MAP-Kinase p38 für CWL029 und PB2 erfolgte die Inhibition der Phosphorylierung mittels Inhibitor SB203580 (Abbildung 14). Ohne Inhibition bestätigte sich die signifikante Erhöhung der IL-1 β mRNA Expression von PB2 gegenüber CWL029 (Abbildung 11 und 14). Für CWL029 zeigte sich 5 hpi ein signifikanter Abfall der IL-1 β mRNA Expression von einer 157 ± 9 fachen Erhöhung ohne Inhibition auf eine 59 ± 15 fache Erhöhung unter Inhibition (Abbildung 14). Für PB2 zeigte sich 5 hpi ein signifikanter Abfall der IL-1 β mRNA Expression von einer 318 ± 51 fachen Erhöhung ohne Inhibition auf eine 91 ± 26 fache Erhöhung unter Inhibition (Abbildung 14). Die Aktivierung der MAP-Kinase p38 scheint somit in PB2 eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der IL-1 β mRNA Expression einzunehmen (Abbildung 14).

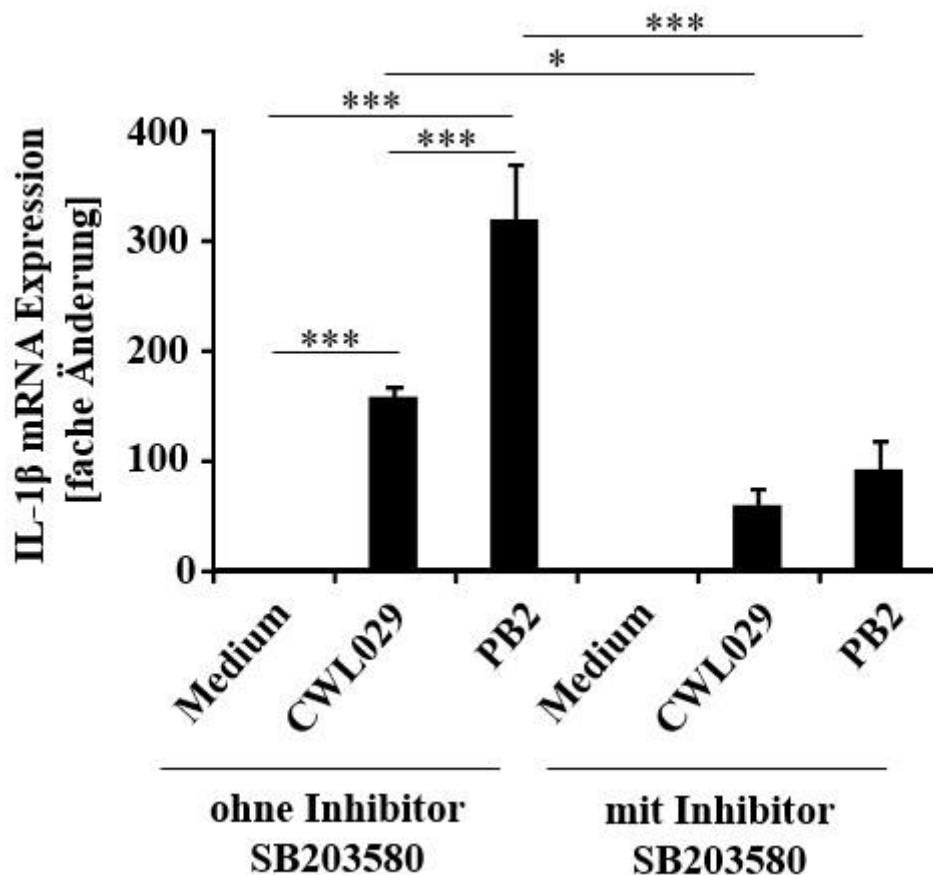


Abbildung 14: Darstellung der IL-1 β mRNA Expression in PBMCs nach Infektion mit CWL029 und PB2, sowohl mit und ohne p38-Inhibitor (SB203580) unter Normoxie (5 hpi). Ohne Inhibitor zeigte PB2 eine signifikant erhöhte Änderung der IL-1 β mRNA Expression gegenüber dem Medium, die signifikant gegenüber der erhöhten Änderung von CWL029 war. Unter Inhibition zeigten beide Stämme eine signifikante Erniedrigung ihrer IL-1 β mRNA Expression. (n=5; Mittelwert \pm Standardfehler; multiple Vergleiche nach Šidák * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

5.2.3 Die NLRP3-abhängige IL-1 β Sekretion von PBMCs nach Infektion mit CWL029 bzw. PB2

Einer der letzten Schritte in der Aktivierung von IL-1 β stellt die Spaltung von Pro-IL-1 β durch die aktivierte Caspase-1 in die aktive Form IL-1 β dar. Die Aktivierung des Inflammasoms NLRP3 ist dabei von Bedeutung. Die Involvierung des Inflammasoms NLRP3 für CWL029 und PB2 wurde mithilfe des Caspase-1 Inhibitors II 5 – 8 hpi untersucht (Abbildung 15 A und B). Unter Inhibition zeigte sich ein signifikanter Abfall der IL-1 β Sekretion für CWL029 und PB2 gegenüber der IL-1 β Sekretion ohne Caspase-1 Inhibitor II (Abbildung 15 A und B).

Für CWL029 zeigte sich ein signifikanter Abfall von $39 \text{ pg/ml} \pm 7 \text{ pg/ml}$ IL-1 β ohne Inhibition auf $22 \text{ pg/ml} \pm 7 \text{ pg/ml}$ unter Inhibition (Abbildung 15 A). PB2 zeigte einen signifikanten Abfall von $46 \text{ pg/ml} \pm 14 \text{ pg/ml}$ IL-1 β ohne Inhibition auf $31 \text{ pg/ml} \pm 13 \text{ pg/ml}$ mit dem Inhibitor (Abbildung 15 B). Das Inflammasom NLRP3 ist somit nach einer Infektion von PBMCs mit den jeweiligen Stämmen in der Sekretion von IL-1 β involviert (Abbildung 15 A und B).

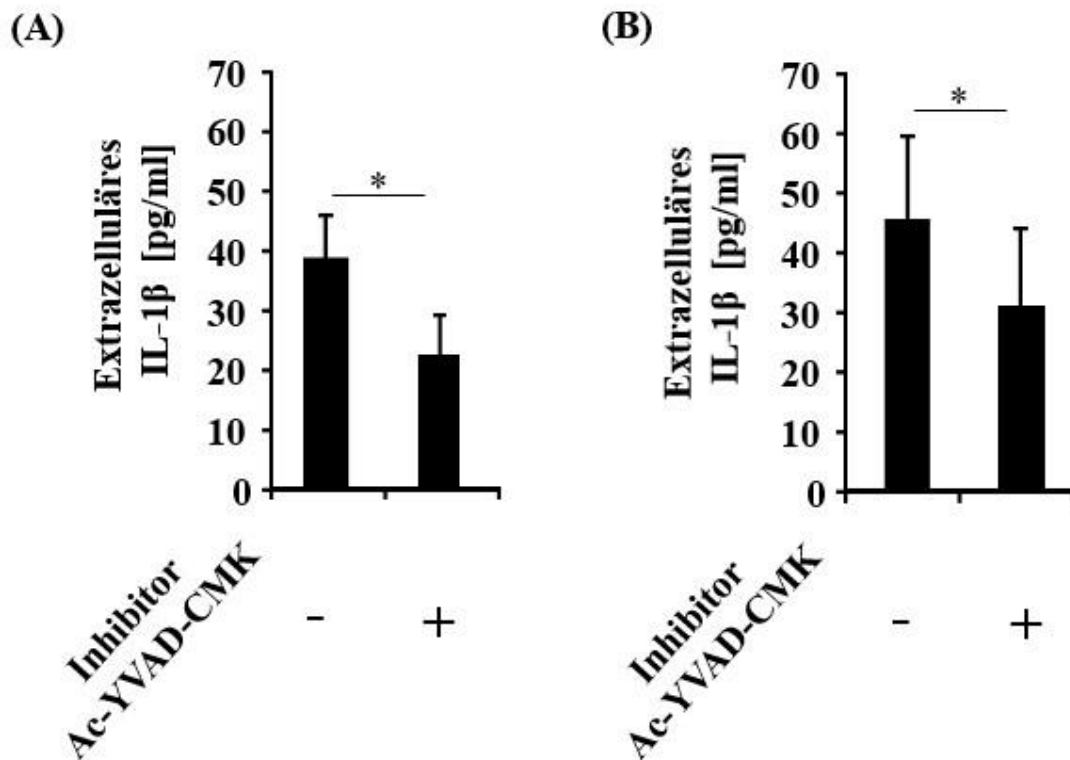


Abbildung 15: Darstellung der IL-1 β Sekretion [pg/ml] nach Infektion von PBMCs mit CWL029 (A) und PB2 (B), sowohl mit und ohne Caspase-1 Inhibitor II (Ac-YVAD-CMK) unter Normoxie (5 - 8 hpi).

Unter Inhibition zeigte sich ein signifikanter Abfall der IL-1 β Sekretion für CWL029 (A) und PB2 (B) gegenüber der IL-1 β Sekretion ohne Caspase-1 Inhibitor II. (n=3; Mittelwert \pm Standardfehler; Student *t*-Test * $p \leq 0,05$).

5.3 HSP60 als möglicher Stimulus für die erhöhte mRNA Expression und MAP Kinase p38 Aktivierung in mit PB2 infizierten PBMCs

Zahlreiche chlamydiale Strukturen können vom Immunsystem mithilfe bestimmter Rezeptoren erkannt werden; woraufhin es zur Initiierung der Immunantwort kommt. Um die Frage klären zu können, welches chlamydiale Protein vermutlich die größte Bedeutung für die erhöhte mRNA Expression, sowie die erhöhte Aktivierung der MAP-Kinase p38 unter einer Infektion mit PB2 spielt (Abschnitt 5.2.1 und 5.2.2), wurden die Oberflächenproteine LPS, Mip und HSP60 untersucht.

Die Bestimmung des LPS-Gehalts in den Infektionsstocks von CWL029 und PB2 zeigte, dass CWL029 einen signifikant höheren Gehalt an LPS (675 ± 189 EU/ml) aufwies als PB2 (297 ± 57 EU/ml) (Abbildung 16). Die erhöhte mRNA Expression (Abschnitt 5.2.1) und die erhöhte Aktivierung der MAP-Kinase p38 (Abschnitt 5.2.2) bei einer Infektion mit PB2, lässt sich nicht durch das LPS begründen.

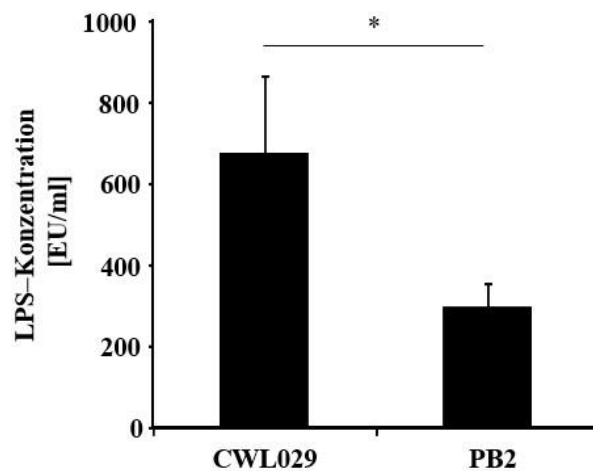


Abbildung 16: Darstellung der LPS-Konzentration [EU/ml] in den verwendeten Stocks von CWL029 und PB2.

CWL029 weist eine signifikant höhere LPS-Konzentration im Vergleich zu PB2 auf. (n=4; Mittelwert \pm Standardfehler; Student *t*-Test $*p \leq 0,05$).

Als weitere immunologische Stimuli wurde die Expression von chlamydialem Mip und chlamydialem HSP60 in den Infektionsstocks von CWL029 und PB2 überprüft. Es zeigte sich, dass PB2 eine signifikant höhere Expression von HSP60 gegenüber CWL029 aufwies (Abbildung 17 B und C), während für Mip kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden konnte (Abbildung 17 A und C). Der signifikante Unterschied von HSP60 kommt als mögliche Ursache für die erhöhte mRNA Expression (Abschnitt 5.2.1), sowie die erhöhte Aktivierung der MAP-Kinase p38 (Abschnitt 5.2.2) in PBMCs, nach einer Infektion mit PB2, in Betracht.

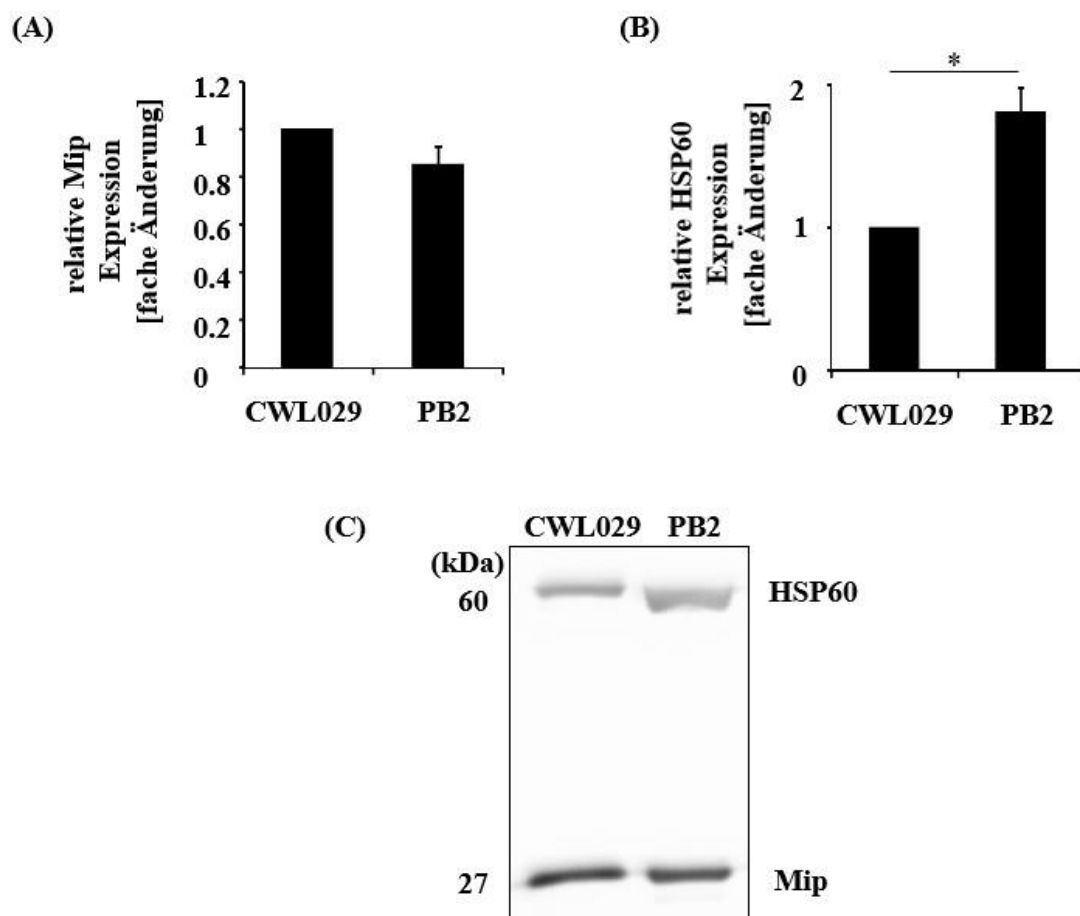


Abbildung 17: Darstellung der Expression von chlamydialen Mip und HSP60 in den verwendeten Stocks von CWL029 und PB2.

Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot (C) und der densitometrischen Auswertung (A und B). PB2 weist eine signifikant erhöhte Expression von HSP60 gegenüber CWL029 auf (B und C), während für Mip kein signifikanter Unterschied aufgezeigt wurde (A und C). (chlamydiales Mip n=4; chlamydiales HSP60 n=3; Mittelwert \pm Standardfehler; Student *t*-Test * $p \leq 0,05$).

6 Diskussion

6.1 Unterschiede zwischen dem respiratorischen – (CWL029) und dem vaskulären Stamm (PB2) im Entwicklungszyklus und ihrer Morphologie

Weinmaier *et al.* konnten zeigen, dass sich respiratorische - und vaskuläre Isolate von *C. pneumoniae* in bestimmten nsSNPs unterscheiden (179). In dieser Arbeit konnten nun zum ersten Mal funktionelle Unterschiede zwischen einem respiratorischen - und einem vaskulären Stamm unter Normoxie und Hypoxie aufgezeigt werden.

6.1.1 Funktioneller Unterschied hinsichtlich der Infektionsrate

Es konnte gezeigt werden, dass sich Stämme unterschiedlicher Isolationsherkunft signifikant in der Infektionsrate unter Normoxie und Hypoxie unterscheiden. CWL029 hatte unter Normoxie und Hypoxie im Vergleich zu PB2 eine signifikant höhere Infektionsrate. Einschlussmembranproteine könnten hier eine Rolle spielen, da sie die Pathogen-Wirt-Interaktion beeinflussen und somit das Überleben in der Wirtszelle sichern (Abschnitt 2.1.2). Bisher konnte gezeigt werden, dass Membranproteine des chlamydialen Einschusses an der Interaktion mit dem Golgi-Apparat und dem Vesikeltransport beteiligt sind (27,119). Das Einschlussmembranprotein CPn0585 kann Rab-GTPasen rekrutieren, die als Schlüsselenzyme im Vesikeltransport mit dem Golgi-Apparat und dem Endoplasmatischen Retikulum gesehen werden (33,152). Für das Einschlussmembranprotein A konnten SNARE-ähnliche (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) Motive aufgezeigt werden, die an Wirtszellproteine binden können und somit den intrazellulären Vesikeltransport zwischen Chlamydien und der Wirtszelle beeinflussen (35). Wie sich das Einschlussmembranprotein C, das durch das Gen *incC* (CPn0292) kodiert wird und einen nsSNP aufweist, auf die Pathogen-Wirt-Interaktion auswirkt, konnte bisher nicht geklärt werden. Es wird jedoch zusammen mit den anderen Genen der Einschlussmembranproteine früh während der Infektion exprimiert und könnte eine ähnliche Funktion bezüglich der Interaktion mit der Wirtszelle haben (159). Die EKs von Chlamydien stellen die infektiöse Form dar und müssen außerhalb der Wirtszellen resistent gegenüber extrazellulären Umwelteinflüssen sein (Abschnitt 2.1.2). Es konnte für andere Bakterien gezeigt werden, dass Rho - und Nudix Phosphohydrolasen (Faktoren der Terminationstranskription) in Stressreaktionen des Erregers involviert sind (78,117).

Das Gen CPn0714 kodiert das Enzym Glutamyl tRNA Reduktase und weist einen nsSNP auf. Das Enzym vermittelt den Stoffwechsel von Phenylalanin, der an der extrazellulären Proteinsynthese von Rho - und Nudix Phosphohydrolasen beteiligt ist; mittels dieser könnte *C. trachomatis* Zellschäden außerhalb der Wirtszelle mildern (62). Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, ob EKs bestimmter Isolate tatsächlich resistenter gegenüber Umwelteinflüssen sind, könnte die Syntheserate von Rho - und Nudix Phosphohydrolasen für die Isolate von *C. pneumoniae* bestimmt werden.

6.1.2 Funktioneller Unterschied bezüglich der Einschussgröße und Wiederanzuchtsrate

CWL029 besitzt durch die signifikant erhöhte Einschussgröße und Wiederanzuchtsrate einen Wachstumsvorteil gegenüber PB2. Dabei könnte die Verfügbarkeit von Aminosäuren für die Stämme von Bedeutung sein. Al-Younes *et al.* konnten zeigen, dass nicht-essentielle Aminosäuren wie Glutamat, Glutamin und Aspartat das Wachstum von *C. pneumoniae* stimulieren. Zudem konnten sie zeigen, dass diese drei Aminosäuren die Wiederanzuchtsrate von *C. pneumoniae* im Vergleich zu *C. trachomatis* stärker erhöhten (7). Das Gen (CPn0289) kodiert einen Glutamattransporter und weist einen nsSNPs auf. Zukünftig könnte man die Stämme hinsichtlich des Glutamatstoffwechsels untersuchen, um den Einfluss von Glutamat auf das Wachstum zu untersuchen.

Im Zusammenhang mit Aminosäuren konnten Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, deren Regulation durch Aminosäure-*responsive*-Mechanismen erfolgt. Schaumburg *et al.* konnten zeigen, dass Arginintransporter auf transkriptioneller Ebene mithilfe von Repressoren reguliert werden und damit womöglich die Einfuhr der Aminosäure von der Wirtszelle beeinflusst wird (155). Akers *et al.* konnten einen weiteren Repressor der Transkription aufzufinden, der durch Tryptophan reguliert wird und zugleich das Tryptophanoperon kontrolliert (6). Es bleibt zu klären, ob die Homöostase der Aminosäuren und die davon abhängige Genregulation das chlamydiale Wachstum beeinflusst. So könnte fehlendes Glutamat bspw. aufgrund des nsSNPs im Gen CPn0289, über Aminosäure-*responsive*-Mechanismen zu einer metabolischen Dysfunktion führen.

Das Gen CPn0920 kodiert die Hydrolase Bisphosphat Nukleotidase und weist einen nsSNP auf. Das Enzym ist in mehreren Reaktionsschritten involviert. So wird das 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat mittels H₂O in Adenosin-5'-Phosphosulfat und einen Phosphatrest umgesetzt (141). Dem Adenosin-5'-Phosphosulfat wird eine wichtige regulatorische Rolle, in Form einer negativen Rückkopplung zugeschrieben (127).

Das 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat wird auch als aktivierte Schwefelsäure bezeichnet, da die Sulfatgruppe mithilfe von Transferasen auf geeignete Substrate übertragen werden kann. Es nimmt somit eine wichtige Rolle im Schwefelstoffwechsel ein, bei dem unter anderem die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein synthetisiert werden (99).

Mithilfe von Cystein können Disulfidbrücken ausgebildet werden, die für den Entwicklungszyklus von Bedeutung sind (9). Bekannt ist, dass die Differenzierung von EKs zu RKs mit der Reduktion von Disulfidbrücken einhergeht und damit die morphologische Transformation und Infektion begünstigt wird (60,134). Bei der Redifferenzierung von RKs zu EKs werden die Disulfidbrücken erneut gebildet, sodass eine strukturelle Stabilität gewährleistet wird (60,67,134). Ein Fehlen des Cysteins könnte zu einer unzureichenden Reformierung von Disulfidbrücken führen, was Auswirkungen auf die Differenzierung und die Redifferenzierung haben könnte. Das 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphat, als Endprodukt der Reaktion der aktivierten Schwefelsäure mit Transferasen, ist ein kompetitiver Inhibitor für viele verschiedene Enzyme (93,156). Im Kontext mit *C. pneumoniae* ist die Auswirkung auf die enzymatische Regulation und deren Bedeutung bisher ungeklärt und könnte neue Versuchsansätze bieten.

6.1.3 Mögliche transkriptionelle Unterschiede zwischen CWL029 und PB2

Genregulatorische Mechanismen kontrollieren den biphasischen Entwicklungszyklus und halten den Einschluss als ökologische Nische aufrecht. Anhand der EM-Bilder konnte das unterschiedliche Verhältnis an EKs zu RKs in den Einschlüssen gezeigt werden, welches sich auch in der Quantifizierung mithilfe des Wiederanzuchtverhaltens widerspiegelt. Neue Versuche müssen hier zeigen, dass Unterschiede hinsichtlich der Redifferenzierung von RKs zu EKs zwischen den Stämmen bestehen. Die Redifferenzierung der RKs zurück zu den EKs wird von Genen, die spät im Entwicklungszyklus exprimiert werden, beeinflusst (159). Einige dieser Gene fallen unter die Regulation des Sigmafaktors σ^{28} (σ^{28} -Faktor) (121,185). Neben dem σ^{28} -Faktor treten noch der σ^{66} -Faktor und der σ^{54} -Faktor in Chlamydien auf, welche an die RNA-Polymerasen binden und für die Initiation der Transkription verantwortlich sind (115,159).

Der chlamydiale σ^{28} -Faktor weist Homologien zu den gut untersuchten σ^F -, σ^D - und σ^B -Faktor von *B. subtilis* auf (76). Bekannt ist für den σ^B -Faktor neben der Reaktionskaskade und der involvierten Gene auch die Aktivierung durch metabolisch bedingten -, als auch umweltbedingten Stress (42,85,176,184).

Die Regulation des σ^{28} -Faktors erfolgt durch die Gene *rsbU*, *rsbVI*, *rsbV2* und *rsbW* (*regulator of sigma B*) (84,167) (Abbildung 18). Ein Enzym in dieser Kaskade ist die Phosphatase RsbU, dessen Gen *rsbU* (CPn0793) ein nsSNP aufweist (Abbildung 18).

Hier müssten neue Versuche den Beweis erbringen, dass sich Stämme hinsichtlich der σ^{28} -Faktor-abhängige Genexpression voneinander unterscheiden.

Mithilfe weiterer Versuchsansätze lassen sich die Unterschiede in der Redifferenzierung zwischen CWL029 und PB2 prüfen. Yu *et al.* konnten einen σ^{28} -abhängigen Promotor für das Gen *hctB* während der späten Phase der Genexpression identifizieren (185). Dieses kodiert ein Histon-ähnliches Protein Hc2, welches bei der Redifferenzierung beteiligt zu sein scheint (21). Aufgrund des unterschiedlichen Wiederanzuchtverhaltens der Stämme könnte die Analyse des Proteins Hc2 Aufschluss über spezifische Unterschiede zwischen den Stämmen in der Redifferenzierung bringen.

Weiterhin wirken sich Stresstimuli auf die Regulation des σ^{28} -Faktors aus (76, 84, 115, 159, 167) (Abbildung 18). In Abwesenheit eines Stresssignals befindet sich der σ^{28} -Faktor in einem Komplex mit dem Anti-Sigmafaktor RsbW und ist inaktiv, sodass die Bindung an die RNA-Polymerase unterbleibt. In Anwesenheit eines Stressstimulus bindet der Anti-Sigmafaktor-Antagonist RsbV den Anti-Sigmafaktor RsbW, sodass der σ^{28} -Faktor an die RNA-Polymerase bindet und die Transkription von σ^{28} -Faktor-abhängigen Genen erfolgt (76, 84, 115, 159, 167) (Abbildung 18). Es muss geklärt werden, ob sich letztlich hypoxische Bedingungen auf die Regulation des σ^{28} -Faktors und damit auch auf die Redifferenzierung auswirken. Vorstellbar wäre, dass unter Hypoxie der Anti-Sigmafaktor RsbW blockiert wird und damit die σ^{28} -abhängige Transkription begünstigt wird (Abbildung 18).

Rao *et al.* konnten in *C. trachomatis* das T₃SS zugehörige Chaperon CT663 ausmachen, welches ab dem Zeitpunkt der Redifferenzierung zunehmend detektiert werden konnte (18 - 36 hpi). CT663 blockierte zugleich die σ^{66} -abhängige Genexpression, womöglich zugunsten der Genexpression der Redifferenzierung. Zudem war CT663 in EK-Proben signifikant erhöht (142). Es gibt Hinweise, dass solch ein homologes T₃SS Protein auch in *C. pneumoniae* existiert (19,162,165). Ob eine unterschiedlich erhöhte Expression dieses Proteins für das aufgezeigte Wiederanzuchtverhalten in Betracht kommt, kann Ansatz neuer Versuche sein.

Die chlamydialen RNA-Polymerasen werden durch die Gene *rpoA*, *rpoB* und *rpoC* kodiert (43,95). Das Gen *rpoB*, welches die RNA-Polymerase β -Untereinheit (CPn0081) kodiert, weist ein nsSNP auf.

Das Gen ist zusammen mit dem Gen des σ^{66} -Faktors in die Expression von *Housekeeping*-Genen zu Beginn des Entwicklungszyklus involviert (40,95,159). Um zukünftig Unterschiede zwischen respiratorischen – und vaskulären Stämmen bezüglich des Entwicklungszyklus aufzuzeigen, stellt die Analyse von *Housekeeping*-Genen eine Möglichkeit dar.

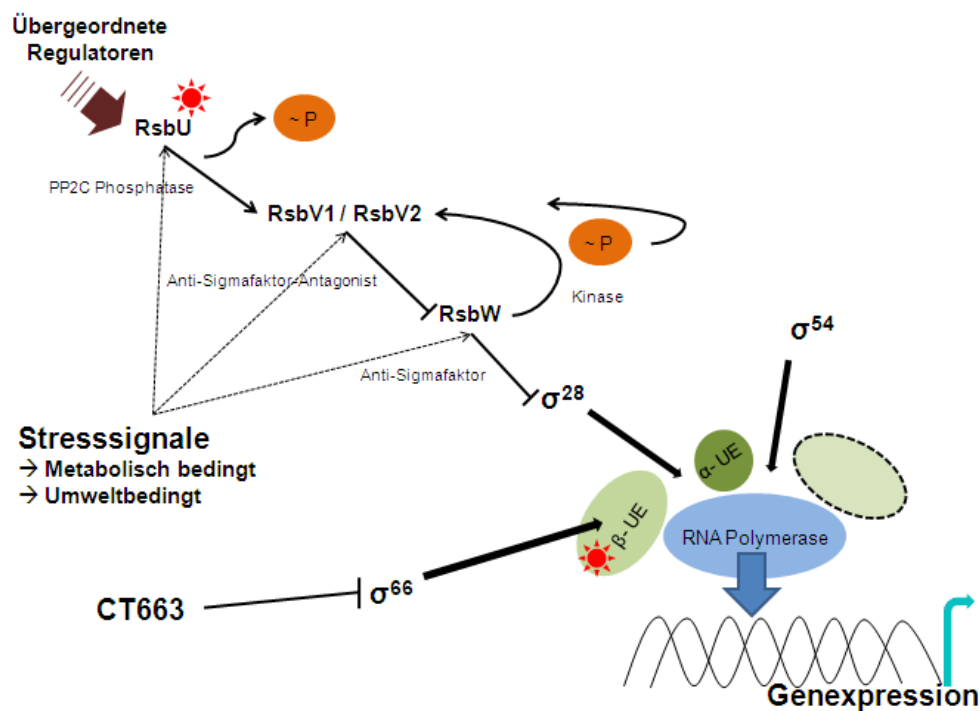


Abbildung 18: Vereinfachte Darstellung der Regulation der RNA Polymerase durch die chlamydialen Sigmafaktoren σ^{66} , σ^{54} bzw. σ^{28} und ihren Regulatoren unter Darstellung zweier nsSNPs in den Proteinen der Gene CPn0793 und CPn0081.

Die chlamydiale RNA Polymerase besteht aus einer α -, β - und weiteren Untereinheiten (UE) (gestrichelter Kreis). Die Bindung an die Zielgene erfolgt erst, wenn sie durch einen von bisher drei gefundenen chlamydialen Sigmafaktoren σ^{66} , σ^{54} bzw. σ^{28} aktiviert wird. Es folgt die Sigmafaktor-abhängige Genexpression. Es konnte gezeigt werden, dass σ^{28} homolog zum σ^B aus *B. subtilis* ist und σ^B durch Stresssignale aktiviert wird. Ungeklärt ist, ob auch Stresssignale bei *C. pneumoniae* zur Aktivierung der σ^{28} -Regulatoren führen können (gestrichelte Pfeile). Sigmafaktoren, wie RsbU, RsbV1 / RsbV2 und RsbW, sind an der σ^{28} -Aktivierung beteiligt und unterliegen zugleich übergeordneten Regulatoren. RsbU besitzt eine PP2C Phosphatase, mit der der Anti-Sigmafaktor-Antagonist RsbV1 / RsbV2 unter Abspaltung eines Phosphatrestes aktiviert wird. Der Anti-Sigmafaktor RsbW wird gebunden und blockiert, sodass die Hemmung des σ^{28} aufgehoben wird und der σ^{28} an die RNA Polymerase binden kann. Der Anti-Sigmafaktor besitzt zugleich eine Kinase, mit der der Anti-Sigmafaktor-Antagonist phosphoryliert und deaktiviert wird. RsbW kann nun den Sigmafaktor σ^{28} blockieren und die Assoziation mit der RNA Polymerase unterbleibt. Der Sigmafaktor σ^{66} bindet an die β -UE und wird vom T₃SS zugehörige Chaperon CT663 negativ kontrolliert. Es gibt Hinweise, dass auch in *C. pneumoniae* solch homologe Proteine existieren. Mit einem roten Stern gekennzeichnet sind die beiden nsSNPs in den Genen CPn0793 und CPn0081.

6.2 Unterschiedliche Immunantwort von PBMCs nach einer Infektion mit CWL029 bzw. PB2

In der Lunge kann *C. pneumoniae* neben Epithelzellen auch PBMCs infizieren, die dem Erreger als Vektor dienen und zur Ausbreitung im Organismus führen. Dies spielt bei der Entstehung von chronischen Erkrankungen wie bspw. der Atherosklerose eine wichtige Rolle (Abschnitt 2.1.5). Ob allein vaskuläre Stämme zur systemischen Dissemination neigen, könnte Grundlage für zukünftige Versuche sein. In dieser Arbeit sollte unter Normoxie die Wechselwirkung zwischen PBMCs und CWL029 bzw. PB2 untersucht werden.

6.2.1 Unterschiedliche Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren in PBMCs

Eine Aktivierung von PBMCs führt zur Produktion und Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Diese spielen bei der Entstehung chronischer Entzündungen eine Rolle (Abschnitt 2.1.5 und 2.4). In unterschiedlichen Zelltypen kann *C. pneumoniae* eine Reihe von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmoleküle induzieren (88,143,183). Hierzu gehören auch IL-1 β und IL-8, die bei der Pathogenese von Atherosklerose von Bedeutung sind (172). IL-1 β induziert unter anderem die Synthese von Zytokinen und Prostaglandinen in Makrophagen und steigert die Expression von Adhäsionsmolekülen (172). IL-8 ist bei der chemotaktischen Rekrutierung und der Migration von Entzündungszellen in die entzündlich veränderte Gefäßwand von Bedeutung (172). Vieles deutet daraufhin, dass *C. pneumoniae* nicht zuletzt aufgrund der Initiierung von Entzündungsreaktionen, der Bildung und Ruptur von atherosklerotischen Plaques durch die vaskuläre Rekrutierung, Schaumzellbildung und Sekretion von proatherosklerotischen Proteinen zur Pathogenese der Gefäßerkrankung beiträgt (147,178).

Nach Infektion von PBMCs mit dem vaskulären Stamm PB2 konnte für IL-1 β und IL-8 ein signifikanter Anstieg der mRNA Expression gezeigt werden. Dabei war die mRNA Expression in PBMCs unabhängig von der Infektionsrate der beiden Stämme, da diese keine signifikanten Unterschiede zeigte (Daten nicht gezeigt). Unterschiede in der Pathogen-Wirt-Interaktion wären demnach wahrscheinlich. So könnten besonders immunreaktive *C. pneumoniae* Stämme, wie die vaskulären Isolate, zur systemischen Dissemination neigen. Um jedoch generelle Aussagen zum Unterschied von respiratorischen - und vaskulären Stämmen treffen zu können, müssten weitere Isolate getestet werden.

6.2.2 PB2 führt zu einer vermehrten Aktivierung der MAP-Kinase p38

Bei der *C. pneumoniae*-vermittelten Signaltransduktion sind MAP-Kinasen, die unterschiedlichste Signalmoleküle induzieren, von Bedeutung (92,104). Auch die Induktion von MAP-Kinasen steht im Zusammenhang mit einer *C. pneumoniae*-Infektion (102,103). Rupp *et al.* konnten eine zeitabhängige Phosphorylierung der MAP-Kinasen p42/44 und p38 in *C. pneumoniae* infizierten PBMCs aufzeigen, die mit einer erhöhten Expression von Prostaglandin E₂ und MMP-1 einherging (148). Die Studie von Dean *et al.* lässt vermuten, dass eine gesteigerte Aktivität der MAP-Kinase p38, im Zuge einer Infektion von PBMCs mit *C. pneumoniae*, für eine effiziente Transkription der mRNA des Enzyms Cyclooxygenase-2 benötigt wird (34). Cipollone *et al.* konnten zeigen, dass eine gesteigerte Expression von Cyclooxygenase-2 und Prostaglandin E₂ in Monozyten mit einer erhöhten Instabilität von arteriosklerotischen Plaques einhergeht (30). Es existieren folglich Zusammenhänge zwischen der Induktion von MAP-Kinasen, der Induktion bestimmter Mediatoren und der Assoziation mit der Pathogenese von Atherosklerose.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der vaskuläre Stamm PB2 die MAP-Kinase p38 signifikant stärker induzieren konnte, als der respiratorische Stamm CWL029.

Hinsichtlich der Aktivierung der MAP-Kinase p38 könnten zukünftige Experimente klären, ob sich Unterschiede zwischen vaskulären - und respiratorischen Stämmen hinsichtlich der Expression von Cyclooxygenase-2 und Prostaglandin E₂ aufweisen lassen. Vor allem vaskuläre Stämme könnten somit hinsichtlich der Initiierung von Atherosklerose eine größere Rolle im Vergleich zu anderen Stämmen spielen.

6.2.3 Die Sekretion von IL-1 β nach der Infektion mit CWL029 und PB2 wird über das Inflammasoms NLRP3 reguliert

Abdul-Sater *et al.* konnten zeigen, dass eine Infektion von humanen Monozyten mit *C. trachomatis* mit einer Sekretion von IL-1 β verbunden ist und diese zugleich auf die NLRP3-abhängige Aktivierung der Caspase-1 zurückzuführen ist (3). Bedeutend ist auch, dass Shimada *et al.* eine Caspase-1-abhängige IL-1 β Sekretion *in vivo* bei einer *C. pneumoniae* Infektion zeigen konnten (161). In Übereinstimmung mit ihrer Feststellung konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl bei einer Infektion mit einem respiratorischen -, als auch mit einem vaskulären Stamm das Inflammasom NLRP3 bei der IL-1 β Sekretion beteiligt ist.

6.3 Chlamydiales HSP60 als wichtigstes Signalmolekül von PB2 im Zusammenhang mit der erhöhten mRNA Expression und der Aktivierung der MAP-Kinase p38

Zahlreiche chlamydiale Strukturen können vom Immunsystem mithilfe bestimmter Rezeptoren erkannt werden. In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, welche chlamydiale Struktur ursächlich für die Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren und der MAP-Kinase p38 ist. Das LPS von gramnegativen Bakterien stellt dabei einen typischen Liganden für TLR4 dar (74,90,91). Das chlamydiale LPS kann ebenfalls für die Expression verantwortlich sein. Dieses unterscheidet sich vom LPS anderer Spezies dadurch, dass es 4 - 5 Fettsäureketten anstatt der in *E. coli* üblichen sechs aufweist und diese ebenfalls längerkettig sind. Das Lipid A als Bestandteil des LPS ist somit hydrophober (75,101,140). Der immunstimulierende Effekt des LPS liegt dabei etwa 10 bis 100-fach unter dem von Enterobakterien stammenden LPS und scheint somit ein schwacher Induktor für Zytokine zu sein (69,173). Es konnte gezeigt werden, dass CWL029 eine höhere Konzentration an LPS im Vergleich zum vaskulären Stamm aufwies. Dieses Ergebnis stimmt mit bekannten Daten überein, die dem chlamydialen LPS eine geringe Bedeutung bezüglich der Zytokininduktion zuschrieben (131,133). Welche Rolle dabei der nsSNP im Gen CPn0650 spielt, welches ein Enzym der LPS-Biosynthese kodiert, bleibt zu klären. Das Enzym UDP-N-Acetylglucosamin-3-O-Acyltransferase katalysiert dabei den ersten Schritt der Lipid A Synthese (11,39,180). Um den Einfluss des nsSNPs auf die LPS-Synthese und besonders auf das Lipid A zu prüfen, sind Untersuchungen bzgl. der molekularen Zusammensetzung vorstellbar.

Das Lipoprotein Mip, das auf der Oberfläche von EKs lokalisiert ist und gut für *C. trachomatis* beschrieben wurde, stellt ebenfalls ein mögliches PAMP dar und weist einen hohen Grad an Sequenzkonservierung zu anderen chlamydialen Arten auf (109,130).

Bas *et al.* untersuchten neben *C. trachomatis*-inaktivierten EKs weitere sieben Antigene auf ihre Fähigkeit proinflammatorische Zytokine in humanen Monozyten bzw. Makrophagen zu induzieren. Sie zeigten, dass neben den EKs das rekombinante Mip das größte Potential zur Freisetzung von IL-1 β , TNF- α , IL-6 und IL-8 hatte (12). Des Weiteren zeigten sie, dass TLR1, TLR2 und TLR6, nicht aber TLR4 bei der Erkennung von Mip von Bedeutung sind (12). Für *C. pneumoniae* Stämme existieren diesbezüglich bisher keine Untersuchungen. In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression von Mip zwischen CWL029 und PB2 aufgezeigt werden.

In Atheromen lassen sich menschliches - und chlamydiales HSP60 nachweisen. Es konnte gezeigt werden, dass beide Formen Immunzellen stimulieren und zur Zytokininduktion führen und somit die Entzündungsreaktion während der Atherogenese triggern (96,98). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Immunzellen durch beide Formen des HSP60 MyD88-abhängig ist und dass TLR2 und TLR4 involviert sind (175). Zudem konnte die Involvierung der MAP-Kinasen p42/44, p38, JNK 1/2 und eine Aktivierung von NF- κ B im Zusammenhang mit beiden Formen des HSP60 dargelegt werden (96,97,175). Bekannt ist, dass chlamydiales HSP60 während persistenten Infektionen reichlich auf RKs exprimiert wird und dieses proinflammatorische Zytokine induzieren kann (26,96,166). Somit wurde auch das chlamydiale HSP60 als Ursache für die erhöhte Expression von IL-1 β und IL-8 und die Aktivierung der MAP-Kinase p38 untersucht. In dieser Arbeit konnte signifikant mehr chlamydiales HSP60 in dem vaskulären Stamm aufgezeigt werden. Auch die EM-Bilder spiegeln dieses Ergebnis in gewissermaßen wider, da sich überwiegend RKs in dem Einschluss von PB2 zeigten. Zur Verifizierung müssten hier neue Versuche ansetzen, um die genaue Zusammensetzung aus EKs und RKs in den chlamydialen Einschlüsse, auch für unterschiedlicher Isolate, zu quantifizieren bzw. zu spezifizieren. Zukünftig könnten auch Inhibitionsversuche bezüglich der involvierten TLRs, im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit analysierten Signalmolekülen, vorstellbar sein. Es ließen sich Aussagen treffen, ob unterschiedliche Isolate von *C. pneumoniae* und deren Oberflächenproteine unterschiedliche Rezeptoren aktivieren können.

6.4 Schlussbetrachtung

Es lassen sich mithilfe von nsSNPs innerhalb der klinischen *C. pneumoniae* Isolate unter anderem respiratorische von nicht-respiratorischen Stämmen abgrenzen. Zusammen mit weiteren genetischen Unterschieden scheinen diese den Gewebetropismus der Isolate zu determinieren. In dieser Arbeit konnten nun erstmalig signifikante, funktionelle Unterschiede zwischen einem respiratorischen und vaskulären *C. pneumoniae* Isolat unter Normoxie und Hypoxie dargelegt werden. Zukünftige Experimente müssen dies für weitere Stämme von *C. pneumoniae* prüfen. Auch müssen neue Techniken bzw. genetische Analysen etabliert werden, um zu zeigen, welche Rolle bzw. Auswirkung die nsSNPs tatsächlich spielen bzw. haben.

Die Daten zeigen auch, dass Hypoxie einen signifikanten Einfluss auf den Entwicklungszyklus und die Morphologie unterschiedlicher *C. pneumoniae* Isolate hat. Neue Versuchsansätze könnten der Fragestellung nachgehen, warum dies vor allem für *C. pneumoniae* Stämmen, im Vergleich zu bspw. *C. trachomatis*, von Bedeutung ist.

In dieser Arbeit konnten Unterschiede bei den Stämmen hinsichtlich der Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren in Immunzellen gezeigt werden. Es ließen sich zukünftig weitere Schlüsselmediatoren analysieren, um Einblick in die Immunreaktivität einzelner Isolate zu erlangen. Die signifikant erhöhte Aktivierung der MAP-Kinase p38 nach Infektion mit PB2, zeigt dass sich auch auf Ebene der Signalkaskaden Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen ergeben können. Welche Auswirkung hierbei Hypoxie hat bleibt zu klären. Es konnte gezeigt werden, dass chlamydiales HSP60 auf Ebene der Signalmoleküle die größte Rolle spielt. Inhibitionsversuche könnten hier ansetzen, um Rückschlüsse auf Rezeptorebene ziehen zu können, welche Rezeptoren bei der Initiierung der Immunantwort essentiell sein könnten. Bei chronischen Erkrankungen, die im Zusammenhang mit einer *C. pneumoniae* Infektion stehen, spielt die latente Aktivierung des Immunsystems eine wichtige Rolle. Vor diesem Hintergrund könnten therapeutische Ansätze, wie Immun- bzw. Antikörpertherapie, etabliert werden. In der Diagnostik chronischer Erkrankungen, die mit persistente *C. pneumoniae* Infektionen in Verbindung gebracht werden, könnte man sich chlamydialen Oberflächenproteine zunutze machen.

7 Literaturverzeichnis

1. **Abdelrahman, Y. M. and R. J. Belland.** 2005. The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol.Rev.* **29**:949-959.
2. **Abdul-Sater, A. A., N. Said-Sadier, D. M. Ojcius, O. Yilmaz, and K. A. Kelly.** 2009. Inflammasomes bridge signaling between pathogen identification and the immune response. *Drugs Today (Barc.)* **45 Suppl B**:105-112.
3. **Abdul-Sater, A. A., N. Said-Sadier, E. V. Padilla, and D. M. Ojcius.** 2010. Chlamydial infection of monocytes stimulates IL-1beta secretion through activation of the NLRP3 inflammasome. *Microbes.Infect.* **12**:652-661.
4. **Airenne, S., H. M. Surcel, H. Alakarppa, K. Laitinen, J. Paavonen, P. Saikku, and A. Laurila.** 1999. Chlamydia pneumoniae infection in human monocytes. *Infect.Immun.* **67**:1445-1449.
5. **Airenne, S., H. M. Surcel, J. Tuukkanen, M. Leinonen, and P. Saikku.** 2002. Chlamydia pneumoniae inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cell lines. *Scand.J Immunol.* **55**:390-398.
6. **Akers, J. C. and M. Tan.** 2006. Molecular mechanism of tryptophan-dependent transcriptional regulation in Chlamydia trachomatis. *J Bacteriol.* **188**:4236-4243.
7. **Al-Younes, H. M., J. Gussmann, P. R. Braun, V. Brinkmann, and T. F. Meyer.** 2006. Naturally occurring amino acids differentially influence the development of Chlamydia trachomatis and Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae. *J Med.Microbiol.* **55**:879-886.
8. **Al-Younes, H. M., T. Rudel, V. Brinkmann, A. J. Szczepek, and T. F. Meyer.** 2001. Low iron availability modulates the course of Chlamydia pneumoniae infection. *Cell Microbiol.* **3**:427-437.
9. **Allan, I., T. P. Hatch, and J. H. Pearce.** 1985. Influence of cysteine deprivation on chlamydial differentiation from reproductive to infective life-cycle forms. *J.Gen.Microbiol.* **131**:3171-3177.
10. **Amann, R., N. Springer, W. Schonhuber, W. Ludwig, E. N. Schmid, K. D. Muller, and R. Michel.** 1997. Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to Chlamydia spp. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**:115-121.
11. **Anderson, M. S. and C. R. Raetz.** 1987. Biosynthesis of lipid A precursors in Escherichia coli. A cytoplasmic acyltransferase that converts UDP-N-acetylglucosamine to UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine. *J Biol.Chem.* **262**:5159-5169.
12. **Bas, S., L. Neff, M. Vuillet, U. Spenato, T. Seya, M. Matsumoto, and C. Gabay.** 2008. The proinflammatory cytokine response to Chlamydia trachomatis elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14. *J.Immunol.* **180**:1158-1168.

13. **Bauernfeind, F., A. Ablasser, E. Bartok, S. Kim, J. Schmid-Burgk, T. Cavlar, and V. Hornung.** 2011. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol.Life Sci.* **68**:765-783.
14. **Beatty, W. L., R. P. Morrison, and G. I. Byrne.** 1994. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol.Rev.* **58**:686-699.
15. **Bedson SP and Bland JOW.** 1932. A morphological study of psittacosis virus, with the description of a developmental cycle. *Brit J Exp Path* **13**:461-466.
16. **Beeckman, D. S. and D. C. Vanrompay.** 2009. Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. *Clin.Microbiol.Infect.* **15**:11-17.
17. **Belland, R., D. M. Ojcius, and G. I. Byrne.** 2004. Chlamydia. *Nat.Rev.Microbiol.* **2**:530-531.
18. **Bellmann-Weiler, R., V. Martinz, K. Kurz, S. Engl, C. Feistritzer, D. Fuchs, J. Rupp, M. Paldanius, and G. Weiss.** 2010. Divergent modulation of *Chlamydia pneumoniae* infection cycle in human monocytic and endothelial cells by iron, tryptophan availability and interferon gamma. *Immunobiology* **215**:842-848.
19. **Betts-Hampikian, H. J. and K. A. Fields.** 2010. The Chlamydial Type III Secretion Mechanism: Revealing Cracks in a Tough Nut. *Front Microbiol.* **1**:114.
20. **Bosco, M. C., M. Puppo, F. Blengio, T. Fraone, P. Cappello, M. Giovarelli, and L. Varesio.** 2008. Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology* **213**:733-749.
21. **Brickman, T. J., C. E. Barry, III, and T. Hackstadt.** 1993. Molecular cloning and expression of *hctB* encoding a strain-variant chlamydial histone-like protein with DNA-binding activity. *J Bacteriol.* **175**:4274-4281.
22. **Brown, J. S.** 2012. Community-acquired pneumonia. *Clin.Med.* **12**:538-543.
23. **Brune, B. and J. Zhou.** 2007. Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling. *Cardiovasc.Res.* **75**:275-282.
24. **Bush, R. M. and K. D. Everett.** 2001. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **51**:203-220.
25. **Byrne, G. I. and D. M. Ojcius.** 2004. Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat.Rev.Microbiol.* **2**:802-808.
26. **Cappello, F., M. E. Conway de, F. Di, V, G. Zummo, and A. J. Macario.** 2009. *Chlamydia trachomatis* infection and anti-Hsp60 immunity: the two sides of the coin. *PLoS.Pathog.* **5**:e1000552.
27. **Carabeo, R. A., D. J. Mead, and T. Hackstadt.** 2003. Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**:6771-6776.

28. **Carreau, A., B. El Hafny-Rahbi, A. Matejuk, C. Grillon, and C. Kieda.** 2011. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol.Med.* **15**:1239-1253.
29. **Chang, L. and M. Karin.** 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**:37-40.
30. **Cipollone, F., C. Prontera, B. Pini, M. Marini, M. Fazia, C. D. De, A. Iezzi, S. Uchino, G. Boccoli, V. Saba, F. Chiarelli, F. Cuccurullo, and A. Mezzetti.** 2001. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation* **104**:921-927.
31. **Cook, J. A.** 2008. Eliminating blinding trachoma. *N.Engl.J.Med.* **358**:1777-1779.
32. **Cook, P. J., P. Davies, W. Tunnicliffe, J. G. Ayres, D. Honeybourne, and R. Wise.** 1998. Chlamydia pneumoniae and asthma. *Thorax* **53**:254-259.
33. **Cortes, C., K. A. Rzomp, A. Tvinnereim, M. A. Scidmore, and B. Wizel.** 2007. Chlamydia pneumoniae inclusion membrane protein Cpn0585 interacts with multiple Rab GTPases. *Infect.Immun.* **75**:5586-5596.
34. **Dean, J. L., M. Brook, A. R. Clark, and J. Saklatvala.** 1999. p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol.Chem.* **274**:264-269.
35. **Delevoeye, C., M. Nilges, P. Dehoux, F. Paumet, S. Perrinet, A. utry-Varsat, and A. Subtil.** 2008. SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium. *PLoS.Pathog.* **4**:e1000022.
36. **Dietz, I., S. Jerchel, M. Szaszak, K. Shima, and J. Rupp.** 2012. When oxygen runs short: the microenvironment drives host-pathogen interactions. *Microbes.Infect.* **14**:311-316.
37. **Dinarello, C. A.** 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu.Rev.Immunol.* **27**:519-550.
38. **Dostert, C., V. Petrilli, B. R. Van, C. Steele, B. T. Mossman, and J. Tschopp.** 2008. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* **320**:674-677.
39. **Dotson, G. D., I. A. Kaltashov, R. J. Cotter, and C. R. Raetz.** 1998. Expression cloning of a Pseudomonas gene encoding a hydroxydecanoyl-acyl carrier protein-dependent UDP-GlcNAc acyltransferase. *J Bacteriol.* **180**:330-337.
40. **Douglas, A. L. and T. P. Hatch.** 2000. Expression of the transcripts of the sigma factors and putative sigma factor regulators of Chlamydia trachomatis L2. *Gene* **247**:209-214.

41. **Duewell, P., H. Kono, K. J. Rayner, C. M. Sirois, G. Vladimer, F. G. Bauernfeind, G. S. Abela, L. Franchi, G. Nunez, M. Schnurr, T. Espevik, E. Lien, K. A. Fitzgerald, K. L. Rock, K. J. Moore, S. D. Wright, V. Hornung, and E. Latz.** 2010. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**:1357-1361.
42. **Dufour, A. and W. G. Haldenwang.** 1994. Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J Bacteriol.* **176**:1813-1820.
43. **Engel, J. N., J. Pollack, F. Malik, and D. Ganem.** 1990. Cloning and characterization of RNA polymerase core subunits of *Chlamydia trachomatis* by using the polymerase chain reaction. *J Bacteriol.* **172**:5732-5741.
44. **Everett, K. D., R. M. Bush, and A. A. Andersen.** 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **49 Pt 2**:415-440.
45. **Franchi, L., T. Eigenbrod, R. Munoz-Planillo, and G. Nunez.** 2009. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat.Immunol.* **10**:241-247.
46. **Frede, S., C. Stockmann, P. Freitag, and J. Fandrey.** 2006. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem.J* **396**:517-527.
47. **Fritsche, T. R., M. Horn, M. Wagner, R. P. Herwig, K. H. Schleifer, and R. K. Gautom.** 2000. Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl.Environ.Microbiol.* **66**:2613-2619.
48. **Gaydos, C. A., J. T. Summersgill, N. N. Sahney, J. A. Ramirez, and T. C. Quinn.** 1996. Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infect.Immun.* **64**:1614-1620.
49. **Gerard, H. C., B. Krausse-Opatz, Z. Wang, D. Rudy, J. P. Rao, H. Zeidler, H. R. Schumacher, J. A. Whittum-Hudson, L. Kohler, and A. P. Hudson.** 2001. Expression of *Chlamydia trachomatis* genes encoding products required for DNA synthesis and cell division during active versus persistent infection. *Mol.Microbiol.* **41**:731-741.
50. **Gieffers, J., L. Durling, S. P. Ouellette, J. Rupp, M. Maass, G. I. Byrne, H. D. Caldwell, and R. J. Belland.** 2003. Genotypic differences in the *Chlamydia pneumoniae* tyrP locus related to vascular tropism and pathogenicity. *J Infect.Dis.* **188**:1085-1093.
51. **Gieffers, J., H. Fullgraf, J. Jahn, M. Klinger, K. Dalhoff, H. A. Katus, W. Solbach, and M. Maass.** 2001. *Chlamydia pneumoniae* infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation* **103**:351-356.

52. **Gieffers, J., J. Rupp, A. Gebert, W. Solbach, and M. Klinger.** 2004. First-choice antibiotics at subinhibitory concentrations induce persistence of *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1402-1405.
53. **Gieffers, J., Z. G. van, J. Rupp, F. Sayk, S. Kruger, S. Ehlers, W. Solbach, and M. Maass.** 2004. Phagocytes transmit *Chlamydia pneumoniae* from the lungs to the vasculature. *Eur. Respir. J.* **23**:506-510.
54. **Grayston, J. T.** 2000. Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *J Infect. Dis.* **181 Suppl 3**:S402-S410.
55. **Grayston, J. T., M. B. Aldous, A. Easton, S. P. Wang, C. C. Kuo, L. A. Campbell, and J. Altman.** 1993. Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. *J Infect. Dis.* **168**:1231-1235.
56. **Greub, G.** 2010. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of the Chlamydiae: minutes of the inaugural closed meeting, 21 March 2009, Little Rock, AR, USA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**:2691-2693.
57. **Gu, J., J. Milligan, and L. E. Huang.** 2001. Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1 α -p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine. *J Biol. Chem.* **276**:3550-3554.
58. **Gutacker, M. M., J. C. Smoot, C. A. Migliaccio, S. M. Ricklefs, S. Hua, D. V. Cousins, E. A. Graviss, E. Shashkina, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser.** 2002. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* **162**:1533-1543.
59. **Hackstadt, T., E. R. Fischer, M. A. Scidmore, D. D. Rockey, and R. A. Heinzen.** 1997. Origins and functions of the chlamydial inclusion. *Trends Microbiol.* **5**:288-293.
60. **Hackstadt, T., W. J. Todd, and H. D. Caldwell.** 1985. Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae? *J. Bacteriol.* **161**:25-31.
61. **Hahn, D. L., R. W. Dodge, and R. Golubjatnikov.** 1991. Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. *JAMA* **266**:225-230.
62. **Haider, S., M. Wagner, M. C. Schmid, B. S. Sixt, J. G. Christian, G. Hacker, P. Pichler, K. Mechtler, A. Muller, C. Baranyi, E. R. Toenshoff, J. Montanaro, and M. Horn.** 2010. Raman microspectroscopy reveals long-term extracellular activity of Chlamydiae. *Mol. Microbiol.* **77**:687-700.
63. **Halberstaedter, L. and S. von Prowazek.** 1907. Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. *Arbb Kaiserl Gesundheitsamte* **26**:44-47.
64. **Hammerschlag, M. R.** 2002. The intracellular life of chlamydiae. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **13**:239-248.

65. **Haralambieva, I. H., I. D. Iankov, P. V. Ivanova, V. Mitev, and I. G. Mitov.** 2004. Chlamydia pneumoniae induces p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation in human fibroblasts through Toll-like receptor 4. *J Med.Microbiol.* **53**:1187-1193.
66. **Harper, A., C. I. Pogson, M. L. Jones, and J. H. Pearce.** 2000. Chlamydial development is adversely affected by minor changes in amino acid supply, blood plasma amino acid levels, and glucose deprivation. *Infect.Immun.* **68**:1457-1464.
67. **Hatch, T. P., M. Miceli, and J. E. Sublett.** 1986. Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during the developmental cycle of Chlamydia psittaci and Chlamydia trachomatis. *J.Bacteriol.* **165**:379-385.
68. **Hatoum, O. A., H. Miura, and D. G. Binion.** 2003. The vascular contribution in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* **285**:H1791-H1796.
69. **Heine, H., S. Muller-Loennies, L. Brade, B. Lindner, and H. Brade.** 2003. Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from Chlamydia trachomatis serotypes E and L2 and Chlamydia psittaci 6BC. *Eur.J Biochem.* **270**:440-450.
70. **Heuer, D., L. A. Rejman, N. Machuy, A. Karlas, A. Wehrens, F. Siedler, V. Brinkmann, and T. F. Meyer.** 2009. Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction. *Nature* **457**:731-735.
71. **Hoffmann, E., O. ttrich-Breiholz, H. Holtmann, and M. Kracht.** 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc.Biol.* **72**:847-855.
72. **Hogan, R. J., S. A. Mathews, S. Mukhopadhyay, J. T. Summersgill, and P. Timms.** 2004. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect.Immun.* **72**:1843-1855.
73. **Horn, M., M. Wagner, K. D. Muller, E. N. Schmid, T. R. Fritsche, K. H. Schleifer, and R. Michel.** 2000. Neochlamydia hartmannellae gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba Hartmannella vermiformis. *Microbiology* **146 (Pt 5)**:1231-1239.
74. **Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira.** 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* **162**:3749-3752.
75. **Hussein, A., L. Skultety, and R. Toman.** 2001. Structural analyses of the lipopolysaccharides from Chlamydia psittaci strain 6BC and Chlamydia pneumoniae strain Kajaani 6. *Carbohydr.Res.* **336**:213-223.
76. **Hybiske, K. and R. S. Stephens.** 2007. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**:11430-11435.
77. **Inohara, N. and G. Nunez.** 2003. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat.Rev.Immunol.* **3**:371-382.

78. **Italiani, V. C., L. F. Zuleta, and M. V. Marques.** 2002. The transcription termination factor Rho is required for oxidative stress survival in *Caulobacter crescentus*. *Mol.Microbiol.* **44**:181-194.
79. **Jaakkola, P., D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, K. A. von, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe.** 2001. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**:468-472.
80. **Jahn, H. U., M. Krull, F. N. Wuppermann, A. C. Klucken, S. Rosseau, J. Seybold, J. H. Hegemann, C. A. Jantos, and N. Suttorp.** 2000. Infection and activation of airway epithelial cells by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect.Dis.* **182**:1678-1687.
81. **Joyee, A. G. and X. Yang.** 2008. Role of toll-like receptors in immune responses to chlamydial infections. *Curr.Pharm.Des* **14**:593-600.
82. **Juul, N., H. Jensen, M. Hvid, G. Christiansen, and S. Birkelund.** 2007. Characterization of in vitro chlamydial cultures in low-oxygen atmospheres. *J Bacteriol.* **189**:6723-6726.
83. **Kaelin, W. G., Jr. and P. J. Ratcliffe.** 2008. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol.Cell* **30**:393-402.
84. **Kalman, S., W. Mitchell, R. Marathe, C. Lammel, J. Fan, R. W. Hyman, L. Olinger, J. Grimwood, R. W. Davis, and R. S. Stephens.** 1999. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat.Genet.* **21**:385-389.
85. **Kang, C. M., M. S. Brody, S. Akbar, X. Yang, and C. W. Price.** 1996. Homologous pairs of regulatory proteins control activity of *Bacillus subtilis* transcription factor sigma(b) in response to environmental stress. *J.Bacteriol.* **178**:3846-3853.
86. **Kanneganti, T. D., N. Ozoren, M. Body-Malapel, A. Amer, J. H. Park, L. Franchi, J. Whitfield, W. Barchet, M. Colonna, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, S. Akira, and G. Nunez.** 2006. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* **440**:233-236.
87. **Karhausen, J., V. H. Haase, and S. P. Colgan.** 2005. Inflammatory hypoxia: role of hypoxia-inducible factor. *Cell Cycle* **4**:256-258.
88. **Kaukoranta-Tolvanen, S. S., A. M. Teppo, K. Laitinen, P. Saikku, K. Linnavuori, and M. Leinonen.** 1996. Growth of *Chlamydia pneumoniae* in cultured human peripheral blood mononuclear cells and induction of a cytokine response. *Microb.Pathog.* **21**:215-221.
89. **Kauppinen, M. and P. Saikku.** 1995. Pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae*: prevalence, clinical features, diagnosis, and treatment. *Clin.Infect.Dis.* **21 Suppl 3**:S244-S252.

90. **Kawai, T. and S. Akira.** 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat.Immunol.* **11**:373-384.
91. **Kawai, T. and S. Akira.** 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* **34**:637-650.
92. **Kern, J. M., V. Maass, and M. Maass.** 2009. Chlamydia pneumoniae adversely modulates vascular cell properties by direct interaction with signalling cascades. *Thromb.Haemost.* **102**:1064-1070.
93. **Klaassen, C. D. and J. W. Boles.** 1997. Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *FASEB J* **11**:404-418.
94. **Kleba, B. and R. S. Stephens.** 2008. Chlamydial effector proteins localized to the host cell cytoplasmic compartment. *Infect.Immun.* **76**:4842-4850.
95. **Koehler, J. E., R. R. Burgess, N. E. Thompson, and R. S. Stephens.** 1990. Chlamydia trachomatis RNA polymerase major sigma subunit. Sequence and structural comparison of conserved and unique regions with Escherichia coli sigma 70 and Bacillus subtilis sigma 43. *J Biol.Chem.* **265**:13206-13214.
96. **Kol, A., T. Bourcier, A. H. Lichtman, and P. Libby.** 1999. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J.Clin.Invest* **103**:571-577.
97. **Kol, A., A. H. Lichtman, R. W. Finberg, P. Libby, and E. A. Kurt-Jones.** 2000. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J.Immunol.* **164**:13-17.
98. **Kol, A., G. K. Sukhova, A. H. Lichtman, and P. Libby.** 1998. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation* **98**:300-307.
99. **Kopriva, S., K. Fritzemeier, G. Wiedemann, and R. Reski.** 2007. The putative moss 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate reductase is a novel form of adenosine-5'-phosphosulfate reductase without an iron-sulfur cluster. *J Biol.Chem.* **282**:22930-22938.
100. **Korhonen, J. T., M. Puolakkainen, A. Haveri, A. Tammiruusu, M. Sarvas, and R. Lahesmaa.** 2012. Chlamydia pneumoniae entry into epithelial cells by clathrin-independent endocytosis. *Microb.Pathog.* **52**:157-164.
101. **Kosma, P.** 1999. Chlamydial lipopolysaccharide. *Biochim.Biophys.Acta* **1455**:387-402.
102. **Krull, M., A. C. Klucken, F. N. Wuppermann, O. Fuhrmann, C. Magerl, J. Seybold, S. Hippenstiel, J. H. Hegemann, C. A. Jantos, and N. Suttorp.** 1999. Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with Chlamydia pneumoniae. *J Immunol.* **162**:4834-4841.

103. **Krull, M., J. Kramp, T. Petrov, A. C. Klucken, A. C. Hocke, C. Walter, B. Schmeck, J. Seybold, M. Maass, S. Ludwig, J. G. Kuipers, N. Suttorp, and S. Hippenstiel.** 2004. Differences in cell activation by *Chlamydomphila pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* infection in human endothelial cells. *Infect.Immun.* **72**:6615-6621.
104. **Krull, M., M. Maass, N. Suttorp, and J. Rupp.** 2005. *Chlamydomphila pneumoniae*. Mechanisms of target cell infection and activation. *Thromb.Haemost.* **94**:319-326.
105. **Kuo, C. C., L. A. Jackson, L. A. Campbell, and J. T. Grayston.** 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin.Microbiol.Rev.* **8**:451-461.
106. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
107. **Lamkanfi, M., T. D. Kanneganti, L. Franchi, and G. Nunez.** 2007. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J Leukoc.Biol.* **82**:220-225.
108. **Lopez-Castejon, G. and D. Brough.** 2011. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**:189-195.
109. **Lundemose, A. G., D. A. Rouch, C. W. Penn, and J. H. Pearce.** 1993. The *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein is a lipoprotein. *J.Bacteriol.* **175**:3669-3671.
110. **Maass, M., C. Bartels, P. M. Engel, U. Mamat, and H. H. Sievers.** 1998. Endovascular presence of viable *Chlamydia pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. *J Am.Coll.Cardiol.* **31**:827-832.
111. **Mariathasan, S.** 2007. ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bona fide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes.Infect.* **9**:664-671.
112. **Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp.** 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol.Cell* **10**:417-426.
113. **Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp.** 2009. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu.Rev.Immunol.* **27**:229-265.
114. **Masson, N., R. S. Singleton, R. Sekirnik, D. C. Trudgian, L. J. Ambrose, M. X. Miranda, Y. M. Tian, B. M. Kessler, C. J. Schofield, and P. J. Ratcliffe.** 2012. The FIH hydroxylase is a cellular peroxide sensor that modulates HIF transcriptional activity. *EMBO Rep.* **13**:251-257.
115. **Mathews, S. A., K. M. Volp, and P. Timms.** 1999. Development of a quantitative gene expression assay for *Chlamydia trachomatis* identified temporal expression of sigma factors. *FEBS Lett.* **458**:354-358.
116. **McCoy, A. J. and A. T. Maurelli.** 2006. Building the invisible wall: updating the chlamydial peptidoglycan anomaly. *Trends Microbiol.* **14**:70-77.

117. **McLennan, A. G.** 2006. The Nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol.Life Sci.* **63**:123-143.
118. **Mehta, S. J., R. D. Miller, J. A. Ramirez, and J. T. Summersgill.** 1998. Inhibition of Chlamydia pneumoniae replication in HEp-2 cells by interferon-gamma: role of tryptophan catabolism. *J Infect.Dis.* **177**:1326-1331.
119. **Mital, J., N. J. Miller, D. W. Dorward, C. A. Dooley, and T. Hackstadt.** 2013. Role for chlamydial inclusion membrane proteins in inclusion membrane structure and biogenesis. *PLoS.One.* **8**:e63426.
120. **Mitchell, C. M., K. M. Hovis, P. M. Bavoil, G. S. Myers, J. A. Carrasco, and P. Timms.** 2010. Comparison of koala LPCoLN and human strains of Chlamydia pneumoniae highlights extended genetic diversity in the species. *BMC.Genomics* **11**:442.
121. **Miura, K., H. Toh, H. Hirakawa, M. Sugii, M. Murata, K. Nakai, K. Tashiro, S. Kuhara, Y. Azuma, and M. Shirai.** 2008. Genome-wide analysis of Chlamydia pneumoniae gene expression at the late stage of infection. *DNA Res.* **15**:83-91.
122. **Moazed, T. C., C. C. Kuo, J. T. Grayston, and L. A. Campbell.** 1998. Evidence of systemic dissemination of Chlamydia pneumoniae via macrophages in the mouse. *J Infect.Dis.* **177**:1322-1325.
123. **Molestina, R. E., R. D. Miller, A. B. Lentsch, J. A. Ramirez, and J. T. Summersgill.** 2000. Requirement for NF-kappaB in transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 1 by Chlamydia pneumoniae in human endothelial cells. *Infect.Immun.* **68**:4282-4288.
124. **Moulder, J. W.** 1966. The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses. *Annu.Rev.Microbiol.* **20**:107-130.
125. **Moulder, J. W.** 1991. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol.Rev.* **55**:143-190.
126. **Mpiga, P. and M. Ravaoarinoro.** 2006. Chlamydia trachomatis persistence: an update. *Microbiol.Res.* **161**:9-19.
127. **Mueller, J. W. and N. Shafqat.** 2013. Adenosin-5'-phosphosulfate (APS) - a multifaceted modulator of bifunctional PAPS synthases and related enzymes. *FEBS J* **280**:3050-3057.
128. **Mukaida, N., A. Harada, and K. Matsushima.** 1998. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**:9-23.

129. **Naiki, Y., K. S. Michelsen, N. W. Schroder, R. Alsabeh, A. Slepkin, W. Zhang, S. Chen, B. Wei, Y. Bulut, M. H. Wong, E. M. Peterson, and M. Ardit.** 2005. MyD88 is pivotal for the early inflammatory response and subsequent bacterial clearance and survival in a mouse model of Chlamydia pneumoniae. *J Biol.Chem.* **280**:29242-29249.
130. **Neff, L., S. Daher, P. Muzzin, U. Spenato, F. Gulacar, C. Gabay, and S. Bas.** 2007. Molecular characterization and subcellular localization of macrophage infectivity potentiator, a Chlamydia trachomatis lipoprotein. *J.Bacteriol.* **189**:4739-4748.
131. **Netea, M. G., B. J. Kullberg, J. M. Galama, A. F. Stalenhoef, C. A. Dinarello, and J. W. van der Meer.** 2002. Non-LPS components of Chlamydia pneumoniae stimulate cytokine production through Toll-like receptor 2-dependent pathways. *Eur.J.Immunol.* **32**:1188-1195.
132. **Netea, M. G., B. J. Kullberg, L. E. Jacobs, T. J. Verver-Jansen, d. van, V, J. M. Galama, A. F. Stalenhoef, C. A. Dinarello, and J. W. van der Meer.** 2004. Chlamydia pneumoniae stimulates IFN-gamma synthesis through MyD88-dependent, TLR2- and TLR4-independent induction of IL-18 release. *J Immunol.* **173**:1477-1482.
133. **Netea, M. G., C. H. Selzman, B. J. Kullberg, J. M. Galama, A. Weinberg, A. F. Stalenhoef, J. W. van der Meer, and C. A. Dinarello.** 2000. Acellular components of Chlamydia pneumoniae stimulate cytokine production in human blood mononuclear cells. *Eur.J.Immunol.* **30**:541-549.
134. **Newhall, W. J.** 1987. Biosynthesis and disulfide cross-linking of outer membrane components during the growth cycle of Chlamydia trachomatis. *Infect.Immun.* **55**:162-168.
135. **Nizet, V. and R. S. Johnson.** 2009. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat.Rev.Immunol.* **9**:609-617.
136. **Opitz, B., S. Forster, A. C. Hocke, M. Maass, B. Schmeck, S. Hippenstiel, N. Suttorp, and M. Krull.** 2005. Nod1-mediated endothelial cell activation by Chlamydia pneumoniae. *Circ.Res.* **96**:319-326.
137. **Pearson, T., J. D. Busch, J. Ravel, T. D. Read, S. D. Rhoton, J. M. U'Ren, T. S. Simonson, S. M. Kachur, R. R. Leadem, M. L. Cardon, M. N. Van Ert, L. Y. Huynh, C. M. Fraser, and P. Keim.** 2004. Phylogenetic discovery bias in Bacillus anthracis using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**:13536-13541.
138. **Pellati, D., I. Mylonakis, G. Bertoloni, C. Fiore, A. Andrisani, G. Ambrosini, and D. Armanini.** 2008. Genital tract infections and infertility. *Eur.J Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.* **140**:3-11.
139. **Prebeck, S., C. Kirschning, S. Durr, C. C. da, B. Donath, K. Brand, V. Redecke, H. Wagner, and T. Miethke.** 2001. Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in Chlamydia pneumoniae-induced activation of dendritic cells. *J Immunol.* **167**:3316-3323.

140. **Qureshi, N., I. Kaltashov, K. Walker, V. Doroshenko, R. J. Cotter, K. Takayama, T. R. Sievert, P. A. Rice, J. S. Lin, and D. T. Golenbock.** 1997. Structure of the monophosphoryl lipid A moiety obtained from the lipopolysaccharide of *Chlamydia trachomatis*. *J Biol.Chem.* **272**:10594-10600.
141. **Ramaswamy, S. G. and W. B. Jakoby.** 1987. (2')3',5'-Bisphosphate nucleotidase. *J Biol.Chem.* **262**:10044-10047.
142. **Rao, X., P. Deighan, Z. Hua, X. Hu, J. Wang, M. Luo, J. Wang, Y. Liang, G. Zhong, A. Hochschild, and L. Shen.** 2009. A regulator from *Chlamydia trachomatis* modulates the activity of RNA polymerase through direct interaction with the beta subunit and the primary sigma subunit. *Genes Dev.* **23**:1818-1829.
143. **Rasmussen, S. J., L. Eckmann, A. J. Quayle, L. Shen, Y. X. Zhang, D. J. Anderson, J. Fierer, R. S. Stephens, and M. F. Kagnoff.** 1997. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin.Invest* **99**:77-87.
144. **Rattei, T., S. Ott, M. Gutacker, J. Rupp, M. Maass, S. Schreiber, W. Solbach, T. Wirth, and J. Gieffers.** 2007. Genetic diversity of the obligate intracellular bacterium *Chlamydophila pneumoniae* by genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms: evidence for highly clonal population structure. *BMC.Genomics* **8**:355.
145. **Read, T. D., R. C. Brunham, C. Shen, S. R. Gill, J. F. Heidelberg, O. White, E. K. Hickey, J. Peterson, T. Utterback, K. Berry, S. Bass, K. Linher, J. Weidman, H. Khouri, B. Craven, C. Bowman, R. Dodson, M. Gwinn, W. Nelson, R. DeBoy, J. Kolonay, G. McClarty, S. L. Salzberg, J. Eisen, and C. M. Fraser.** 2000. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res.* **28**:1397-1406.
146. **Rius, J., M. Guma, C. Schachtrup, K. Akassoglou, A. S. Zinkernagel, V. Nizet, R. S. Johnson, G. G. Haddad, and M. Karin.** 2008. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* **453**:807-811.
147. **Rosenfeld, M. E. and L. A. Campbell.** 2011. Pathogens and atherosclerosis: update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb.Haemost.* **106**:858-867.
148. **Rupp, J., M. Berger, N. Reiling, J. Gieffers, C. Lindschau, H. Haller, K. Dalhoff, and M. Maass.** 2004. Cox-2 inhibition abrogates *Chlamydia pneumoniae*-induced PGE2 and MMP-1 expression. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **320**:738-744.
149. **Rupp, J., J. Gieffers, M. Klinger, Z. G. van, R. Wrase, M. Maass, W. Solbach, J. Deiwick, and T. Hellwig-Burgel.** 2007. *Chlamydia pneumoniae* directly interferes with HIF-1alpha stabilization in human host cells. *Cell Microbiol.* **9**:2181-2191.

150. **Rupp, J., M. Koch, Z. G. van, W. Solbach, E. Brandt, and M. Maass.** 2005. Transmission of *Chlamydia pneumoniae* infection from blood monocytes to vascular cells in a novel transendothelial migration model. *FEMS Microbiol.Lett.* **242**:203-208.
151. **Rupp, J., L. Pfliegerer, C. Jugert, S. Moeller, M. Klinger, K. Dalhoff, W. Solbach, S. Stenger, T. Laskay, and Z. G. van.** 2009. *Chlamydia pneumoniae* hides inside apoptotic neutrophils to silently infect and propagate in macrophages. *PLoS.One.* **4**:e6020.
152. **Rzomp, K. A., L. D. Scholtes, B. J. Briggs, G. R. Whittaker, and M. A. Scidmore.** 2003. Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner. *Infect.Immun.* **71**:5855-5870.
153. **Sasu, S., D. LaVerda, N. Qureshi, D. T. Golenbock, and D. Beasley.** 2001. *Chlamydia pneumoniae* and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circ.Res.* **89**:244-250.
154. **Schachter, J., R. S. Stephens, P. Timms, C. Kuo, P. M. Bavoil, S. Birkelund, J. Boman, H. Caldwell, L. A. Campbell, M. Chernesky, G. Christiansen, I. N. Clarke, C. Gaydos, J. T. Grayston, T. Hackstadt, R. Hsia, B. Kaltenboeck, M. Leinonen, D. Ojcius, G. McClarty, J. Orfila, R. Peeling, M. Puolakkainen, T. C. Quinn, R. G. Rank, J. Raulston, G. L. Ridgeway, P. Saikku, W. E. Stamm, D. T. Taylor-Robinson, S. P. Wang, and P. B. Wyrick.** 2001. Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **51**:249-3.
155. **Schaumburg, C. S. and M. Tan.** 2006. Arginine-dependent gene regulation via the ArgR repressor is species specific in chlamydia. *J Bacteriol.* **188**:919-927.
156. **Schneider, B., Y. W. Xu, J. Janin, M. Veron, and D. Deville-Bonne.** 1998. 3'-Phosphorylated nucleotides are tight binding inhibitors of nucleoside diphosphate kinase activity. *J Biol.Chem.* **273**:28773-28778.
157. **Schofield, C. J. and P. J. Ratcliffe.** 2004. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **5**:343-354.
158. **Scidmore, M. A., E. R. Fischer, and T. Hackstadt.** 2003. Restricted fusion of *Chlamydia trachomatis* vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. *Infect.Immun.* **71**:973-984.
159. **Shaw, E. I., C. A. Dooley, E. R. Fischer, M. A. Scidmore, K. A. Fields, and T. Hackstadt.** 2000. Three temporal classes of gene expression during the *Chlamydia trachomatis* developmental cycle. *Mol.Microbiol.* **37**:913-925.
160. **Shimada, K., S. Chen, P. W. Dempsey, R. Sorrentino, R. Alsabeh, A. V. Slepentin, E. Peterson, T. M. Doherty, D. Underhill, T. R. Crother, and M. Arditi.** 2009. The NOD/RIP2 pathway is essential for host defenses against *Chlamydomydia pneumoniae* lung infection. *PLoS.Pathog.* **5**:e1000379.

161. **Shimada, K., T. R. Crother, J. Karlin, S. Chen, N. Chiba, V. K. Ramanujan, L. Vergnes, D. M. Ojcius, and M. Arditì.** 2011. Caspase-1 dependent IL-1beta secretion is critical for host defense in a mouse model of Chlamydia pneumoniae lung infection. *PLoS.One.* **6**:e21477.
162. **Silva-Herzog, E., S. S. Joseph, A. K. Avery, J. A. Coba, K. Wolf, K. A. Fields, and G. V. Plano.** 2011. Scc1 (CP0432) and Scc4 (CP0033) function as a type III secretion chaperone for CopN of Chlamydia pneumoniae. *J.Bacteriol.* **193**:3490-3496.
163. **Simi, A., D. Lerouet, E. Pinteaux, and D. Brough.** 2007. Mechanisms of regulation for interleukin-1beta in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* **52**:1563-1569.
164. **Sitkovsky, M. and D. Lukashev.** 2005. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat.Rev.Immunol.* **5**:712-721.
165. **Spaeth, K. E., Y. S. Chen, and R. H. Valdivia.** 2009. The Chlamydia type III secretion system C-ring engages a chaperone-effector protein complex. *PLoS.Pathog.* **5**:e1000579.
166. **Stephens, R. S.** 2003. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol.* **11**:44-51.
167. **Stephens, R. S., S. Kalman, C. Lammel, J. Fan, R. Marathe, L. Aravind, W. Mitchell, L. Olinger, R. L. Tatusov, Q. Zhao, E. V. Koonin, and R. W. Davis.** 1998. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis. *Science* **282**:754-759.
168. **Stephens, R. S., G. Myers, M. Eppinger, and P. M. Bavoil.** 2009. Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **55**:115-119.
169. **Strowig, T., J. Henao-Mejia, E. Elinav, and R. Flavell.** 2012. Inflammasomes in health and disease. *Nature* **481**:278-286.
170. **Stuart, E. S., W. C. Webley, and L. C. Norkin.** 2003. Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by Chlamydiae into host cells. *Exp Cell Res.* **287**:67-78.
171. **Taylor, C. T.** 2008. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. *J Physiol* **586**:4055-4059.
172. **Tedgui, A. and Z. Mallat.** 2006. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* **86**:515-581.
173. **Tsutsumi-Ishii, Y., K. Shimada, H. Daida, R. Toman, and I. Nagaoka.** 2008. Low potency of Chlamydophila LPS to activate human mononuclear cells due to its reduced affinities for CD14 and LPS-binding protein. *Int.Immunol.* **20**:199-208.
174. **Underhill, D. M.** 2007. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. *Immunol.Rev.* **219**:75-87.

175. **Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, C. C. da, T. Miethke, C. J. Kirschning, H. Hacker, and H. Wagner.** 2001. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J.Biol.Chem.* **276**:31332-31339.
176. **van, S. W., M. H. Tempelaars, M. H. Zwietering, W. M. de Vos, and T. Abee.** 2005. Analysis of the role of RsbV, RsbW, and RsbY in regulating {sigma}B activity in *Bacillus cereus*. *J Bacteriol.* **187**:5846-5851.
177. **Von, H. L., H. Alakarppa, R. Koskinen, K. Liippo, H. M. Surcel, M. Leinonen, and P. Saikku.** 1997. Chlamydia pneumoniae infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Epidemiol.Infect.* **118**:155-164.
178. **Watson, C. and N. J. Alp.** 2008. Role of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis. *Clin.Sci.(Lond)* **114**:509-531.
179. **Weinmaier, T., J. Hoser, S. Eck, I. Kaufhold, K. Shima, T. M. Strom, T. Rattei, and J. Rupp.** 2015. Genomic factors related to tissue tropism in Chlamydia pneumoniae infection. *BMC.Genomics* **16**:268.
180. **Williamson, J. M., M. S. Anderson, and C. R. Raetz.** 1991. Acyl-acyl carrier protein specificity of UDP-GlcNAc acyltransferases from gram-negative bacteria: relationship to lipid A structure. *J Bacteriol.* **173**:3591-3596.
181. **Witte, L., D. Droemann, K. Dalhoff, and J. Rupp.** 2011. Chlamydia pneumoniae is frequently detected in the blood after acute lung infection. *Eur.Respir.J.* **37**:712-714.
182. **Wolf, K., E. Fischer, and T. Hackstadt.** 2000. Ultrastructural analysis of developmental events in Chlamydia pneumoniae-infected cells. *Infect.Immun.* **68**:2379-2385.
183. **Yang, J., W. C. Hooper, D. J. Phillips, M. L. Tondella, and D. F. Talkington.** 2003. Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during Chlamydia pneumoniae infection. *Infect.Immun.* **71**:614-620.
184. **Yang, X., C. M. Kang, M. S. Brody, and C. W. Price.** 1996. Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes Dev.* **10**:2265-2275.
185. **Yu, H. H. and M. Tan.** 2003. Sigma28 RNA polymerase regulates hctB, a late developmental gene in Chlamydia. *Mol.Microbiol.* **50**:577-584.
186. **Yuan, Y., Y. X. Zhang, N. G. Watkins, and H. D. Caldwell.** 1989. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 Chlamydia trachomatis serovars. *Infect.Immun.* **57**:1040-1049.
187. **Zhong, G., P. Fan, H. Ji, F. Dong, and Y. Huang.** 2001. Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J Exp Med.* **193**:935-942.

188. **Zhou, R., A. S. Yazdi, P. Menu, and J. Tschopp.** 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**:221-225.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomie der Ordnung Chlamydiales.	8
Abbildung 2: Darstellung des Entwicklungszyklus von Chlamydien.	9
Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum der <i>C. pneumoniae</i> Isolate.	13
Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der HIF-1 α Regulation unter Normoxie und Hypoxie.	17
Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Wechselwirkung von <i>C. pneumoniae</i> mit dem Immunsystem und der Initiierung der Immunantwort.	20
Abbildung 6: Einschlusskörper von CWL029 und PB2 in HEp-2 Zellen unter Normoxie und Hypoxie (48 hpi).	49
Abbildung 7: Vergleich der Infektionsraten [%] von CWL029 und PB2 in HEp-2 Zellen unter Normoxie (A) und Hypoxie (B) (48 hpi).	50
Abbildung 8: Vergleich der Einschlussgröße [μ m] von CWL029 und PB2 in HEp-2 Zellen unter Normoxie (A) und Hypoxie (B) (48 hpi).	51
Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CWL029 und PB2 in HEp-2 Zellen unter Normoxie und Hypoxie (48 hpi und 72 hpi).	52
Abbildung 10: Vergleich des Wiederanzuchtverhaltens [IFUs/ml] von CWL029 und PB2 in HEp-2 Zellen unter Normoxie (A) und Hypoxie (B) (48 hpi).	53
Abbildung 11: qRT-PCR von IL-1 β nach Infektion von PBMCs mit CWL029 und PB2 unter Normoxie (0, 2 und 5 hpi).	55
Abbildung 12: qRT-PCR von IL-8 nach Infektion von PBMCs mit CWL029 und PB2 unter Normoxie (0, 2 und 5 hpi).	56
Abbildung 13: Expressionsanalyse der MAP-Kinase p38 nach Infektion von PBMCs mit CWL029 und PB2 unter Normoxie (0, 2 und 5 hpi).	57
Abbildung 14: Darstellung der IL-1 β mRNA Expression in PBMCs nach Infektion mit CWL029 und PB2, sowohl mit und ohne p38-Inhibitor (SB203580) unter Normoxie (5 hpi).	58
Abbildung 15: Darstellung der IL-1 β Sekretion [pg/ml] nach Infektion von PBMCs mit CWL029 (A) und PB2 (B), sowohl mit und ohne Caspase-1 Inhibitor II (Ac-YVAD-CMK) unter Normoxie (5 - 8 hpi).	59
Abbildung 16: Darstellung der LPS-Konzentration [EU/ml] in den verwendeten Stocks von CWL029 und PB2.	60
Abbildung 17: Darstellung der Expression von chlamydialen Mip und HSP60 in den verwendeten Stocks von CWL029 und PB2.	61
Abbildung 18: Vereinfachte Darstellung der Regulation der RNA Polymerase durch die chlamydialen Sigmafaktoren σ^{66} , σ^{54} bzw. σ^{28} und ihren Regulatoren unter Darstellung zweier nsSNPs in den Proteinen der Gene CPn0793 und CPn0081.	66

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der neun nsSNPs in nicht-respiratorischen Isolaten	14
Tabelle 2: Sauerstoffkonzentrationen in ausgewählten Geweben bzw. Regionen	15
Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien	28
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper für Western Blot Analysen	29
Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper für Western Blot Analysen	29
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen	30
Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen	30
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Primerpaare	31
Tabelle 9: Zellkulturbedingungen in den durchgeführten Versuchen	34
Tabelle 10: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel	38
Tabelle 11: Das jeweilige Pipettierschema der reversen Transkription mit Fermentas und Roche	41
Tabelle 12: Temperaturprofil der reversen Transkription in Abhängigkeit der verwendeten Reagenzien	42
Tabelle 13: Pipettierschema der qRT-PCR der Fa. Roche und Bionline	43
Tabelle 14: Temperaturprofil der qRT-PCR	43

10 Veröffentlichungen

10.1 Review

Kensuke Shima, Jonas Coopmeiners, Simon Graspentner, Klaus Dalhoff and Jan Rupp (2016). Impact of micro-environmental changes on respiratory tract infections with intracellular bacteria. *FEBS Lett.* 2016 Nov; **590(21)**:3887-3904.

10.2 Kongressbeiträge

Coopmeiners J., Shima K., Klinger M., Solbach W., Weinmaier T., Rattei T., Rupp J. (30.09. - 03.10.2012). *Chlamydia pneumoniae* phenotypic characteristics of respiratory and non-respiratory isolates. 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) in Hamburg (Poster).

11 Danksagung

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Jan Rupp für die Bereitstellung und die Überlassung des Themas und der wissenschaftlichen Betreuung. Bei meinem Betreuer Dr. rer. nat. Kensuke Shima möchte ich mich für die stetige Ansprechbarkeit und die Begleitung während dieser Arbeit bedanken. Besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. med. Jan Rupp für die kritische Durchsicht und die hilfreichen Empfehlungen zur Überarbeitung der vorliegenden Dissertation. Dr. rer. nat. Kensuke Shima möchte ich herzlich für die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden im Labor, für die Hilfe bei der Konzeption der Experimente und die Unterstützung bei statistischen Fragestellungen und deren Auswertungen danken.

Herrn Prof. Dr. Werner Solbach möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation zum Beginn am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene meinen Dank aussprechen.

Herrn PD. Dr. med. Matthias Klinger danke ich ganz herzlich für die die Anfertigungen der elektronenmikroskopischen Bilder.

Frau Dr. med. Kristina Rohmann und Bianca Teegen danke ich ganz herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung des ELISA-Verfahrens.

Herrn Dr. rer. nat. Guido Hansen aus dem Institut der Biochemie der Universität zu Lübeck danke ich für die Bereitstellung des rekombinanten *Cpn*-Mip-Proteins.

Ganz besonderen Dank gilt hier auch meinen lieben Kollegen Siegrid Pätzmann, Kristin Wischnat, Anke Hellberg und Angela Gravenhorst, die mich zu jeder Zeit im Laboralltag unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten. Vielen Dank für die angenehme und in jeglicher Hinsicht bereichernde Arbeitsatmosphäre.

Ein großes Dankeschön auch an die Kollegen Dr. rer. nat. Inga Kaufhold, Dr. rer. nat. Stefan Jerchel, Dr. rer. nat. Nadja Käding und Dr. Marta Szaszak für die konstruktiven Ratschläge und die zahlreichen Anregungen zur Anfertigung dieser Arbeit.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und ganz besonders meiner Mutter zu tiefst danken, die mich fortwährend meines Studiums und dieser Arbeit unterstützt und ermutigt hat und mir half das Ziel niemals aus den Augen zu verlieren.

In Andenken auch an meinen Vater.

12 Lebenslauf

Jonas Coopmeiners, geb. Anselm



Geburtsdatum 14.04.1987 in Braunschweig

Hochschulausbildung

12.12.2014	Approbation als Arzt
12/2014	Mündlicher Teil des zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
10/2014	Schriftlicher Teil des zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
09/2009	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2007 – 12/2014	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck

Praktisches Jahr

03/2014 – 07/2014	Medizinische Kliniken der Universität zu Lübeck (Rheumatologie, Nephrologie, Intensiv)
12/2013 – 03/2014	Klinik für Chirurgie Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
08/2013 – 12/2013	Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe im Städtischen Klinikum Braunschweig

Beruflicher Werdegang

Seit 02/2015	Assistenzarzt in Weiterbildung zum Facharzt für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Städtisches Klinikum Braunschweig Frauenklinik Celler Straße
--------------	---

Zeitraum der Dissertation

09/2010 – 06/2014	Medizinischer Doktorand der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Jan Rupp, Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie der Universität zu Lübeck
09/2010 – 08/2013	Experimentelle Untersuchungen zu der hier vorliegenden Inauguraldissertation

Veröffentlichung

Kensuke Shima, Jonas Coopmeiners, Simon Graspeuntner, Klaus Dalhoff and Jan Rupp (2016). Impact of micro-environmental changes on respiratory tract infections with intracellular bacteria. FEBS Lett. 2016 Nov;590(21):3887-3904.

Schulausbildung

06/2006	Allgemeine Hochschulreife Gymnasium Martino Katharineum Braunschweig
---------	---