

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. W. Solbach

Kinematografischer Vergleich der chlamydialen
Entwicklung und Einfluss der Vaginalflora auf
Chlamydia trachomatis

Inauguraldissertation

Zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt

von

Michael Staber

aus München

Lübeck 2009

1. Berichtstatter/Berichtstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Jens Gieffers

2. Berichtstatter/Berichtstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. univ. MSc. Georg Griesinger

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.01.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Geschichte und Klassifikation der Chlamydien	1
1.2 Chlamydiale Krankheitsbilder	2
1.3 Der chlamydiale Entwicklungszyklus	3
1.4 Fusion und Persistenz	6
1.5 Klassifizierung und Bedeutung der verwendeten Bakterien	7
1.5.1 <i>Mycoplasma hominis</i>	7
1.5.2 <i>Lactobacillus</i> sp.	7
1.5.3 <i>Gardnerella vaginalis</i>	8
1.5.4 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	8
1.6 Zielsetzung	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Material	10
2.1.1 Reagenzien und Chemikalien	10
2.1.2 Zusammensetzung der verwendeten Medien, Puffer und Färbungen	11
2.1.3 Laborausrüstung	13
2.1.4 Gebrauchsmaterialien	14
2.1.5 Bakterien	14
2.1.5.1 Chlamydien	14
2.1.5.2 Bakterienstämme	15
2.1.6 Wirtszellen	15
2.1.7 Computersoftware	16
2.2 Methoden	17
2.2.1 Zellkultur	17
2.2.1.1 Wirtszellen und deren Passage	17

2.2.1.2	Aussaat der Wirtszellen auf Zellkulturplatten	18
2.2.2	Infektion mit <i>Chlamydien</i>	20
2.2.3	Erstellen der Zeitreihen	21
2.2.4	Darstellung der Einschlüsse mit Hilfe des indirekten Fluoreszenztests	22
2.2.5	Einfluss verschiedener Bakterien auf das Wachstum und die Entwicklung von <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar D	24
2.2.5.1	Kultivierung der Bakterien	25
2.2.5.2	Infektion der Zellkultur mit Bakterien	26
2.2.5.3	Superinfektion mit <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar D .	27
2.2.5.4	Quantifizierung der Bakterien mit Acridin-Orange	28
2.2.5.5	Auswertung des Einflusses von Bakterien auf die Adhäsion und Internalisierung von <i>Chlamydia</i> <i>trachomatis</i> Serovar D	29
2.2.5.6	Auswertung des Einflusses von Bakterien auf das intrazelluläre Wachstum von <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar D	29
2.2.5.7	Statistische Auswertung	30
2.2.6	Folgeversuche	31
2.2.6.1	Einfluss von <i>Lactobacillus sp.</i> auf <i>Chlamydia</i> <i>trachomatis</i> Serovar B	31
2.2.6.2	Morphologische Darstellung der chlamydialen Einschlüsse unter dem Einfluss von <i>Mycoplasma</i> <i>hominis</i>	31
2.2.6.3	Einfluss von konzentrierten Aminosäuren auf die Koinfektion von <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar D und <i>Mycoplasma hominis</i>	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Kinematografische Darstellung von Chlamydien	33
3.1.1	Entwicklungszyklus von <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar L2 ...	33
3.1.2	Zeitlicher Vergleich zwischen <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar L2 und <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar A, B, D und I	37

3.1.3	<i>Morphologischer Vergleich zwischen Chlamydia trachomatis Serovar L2 und Chlamydia trachomatis Serovar A, B, D und I</i>	41
3.1.4	<i>Fusion zweier Einschlüsse und Zellteilung infizierter Zellen</i>	44
3.1.5	<i>Überblick I</i>	44
3.2	Einfluss von Bakterien auf Chlamydia trachomatis	45
3.2.1	<i>Einfluss von Bakterien auf Chlamydia trachomatis Serovar D...</i>	46
3.2.2	<i>Einfluss von Lactobacillus sp. auf Chlamydia trachomatis Serovar B</i>	52
3.2.3	<i>Einfluss von Aminosäuren auf die Koinfektion von Chlamydia trachomatis Serovar D mit Mycoplasma hominis</i>	54
3.2.4	<i>Überblick II</i>	54
4	Diskussion	56
4.1	Kinematografische Darstellungen	56
4.1.1	<i>Entwicklungszyklus</i>	56
4.1.2	<i>Morphologie</i>	58
4.1.3	<i>Fusion von Einschlüssen und Zellteilung infizierter Zellen</i>	59
4.1.4	<i>Überblick III</i>	60
4.2	Einfluss von Bakterien auf das Wachstum von Chlamydia trachomatis	61
4.2.1	<i>Einfluss von Mycoplasma hominis auf Chlamydia trachomatis Serovar D</i>	61
4.2.2	<i>Einfluss von Lactobacillus sp. auf Chlamydia trachomatis Serovar D und B</i>	62
4.2.3	<i>Einfluss von Neisseria gonorrhoeae und Gardnerella vaginalis auf Chlamydia trachomatis Serovar D</i>	63
4.2.4	<i>Überblick IV</i>	63

5	Zusammenfassung	64
6	Referenzen	65
7	Danksagung	70
8	Curriculum Vitae	71

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
C.	<i>Chlamydia</i>
Ctr	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EB	Elementarkörperchen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
FKS	Fetales Kälberserum
G	Beschleunigungskonstante
g	Gramm
<i>G. vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinylethanesulfonsäure
IFT	indirekter Fluoreszenzstest
IFU	infection forming unit (infektiöse Einheit)
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
<i>M. hominis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
mg	Milligramm
Min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MOMP	Major outer membran protein

<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
omp	outer membran protein
p.i.	post infectionem
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
RB	Retikularkörper
RNS	Ribonukleinsäure
RPE	R-Phycoerythrin
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
s.	siehe
S.	Seite
sp.	Spezies
SPG-Puffer	Sucrose-Phosphat-Glutaminsäure Puffer
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
<i>U.</i>	<i>Ureaplasma</i>
µl	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Geschichte und Klassifikation der Chlamydien

Chlamydien sind DNS- und RNS-haltige Bakterien, die sich von gewöhnlichen Bakterien durch ihren einzigartigen, obligat intrazellulären Entwicklungszyklus unterscheiden. Halberstaedter und Prowazek gelang es 1907 erstmals, Chlamydien nachzuweisen und anzuzüchten, nachdem sie Epithelzellen von Orang-Utans mit Materialien von Trachompatienten inkubiert hatten [4]. Zuerst wurden Chlamydien als Protozoen klassifiziert. Später wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich um ein besonders großes Virus handle. Anfang der sechziger Jahre wurden die Chlamydien den Bakterien zugeordnet und innerhalb der Bakterien die Familie der Chlamydiaceae begründet. Diese bestand lange Zeit nur aus einer Gattung mit zwei Spezies: *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia trachomatis*. Diese Einteilung basierte auf der Morphologie, der Fähigkeit Glykogen zu akkumulieren und der Sensibilität gegenüber Sulfadiazin [35].

1971 wurde ein Isolat, TW-183, entdeckt, welches sich von den bisher bekannten *Chlamydia-psittaci*-Isolaten deutlich unterschied. Als 1983 ein weiteres Isolat mit Namen AR-39 entdeckt wurde, das erstaunliche Ähnlichkeiten zu dem Isolat TW-183 aufwies, schuf man einen neuen *Chlamydia psittaci* Serovar. Sein Name wurde aus den Buchstaben der beiden Isolate gebildet: „TWAR„. *Chlamydia psittaci* war als Verursacher der Papageienkrankheit bekannt, die neuen Isolate wurden vor allem mit Infektionen der Atemwege und der Lunge in Verbindung gebracht. 1989 begründete man deshalb eine neue Spezies: *Chlamydia pneumoniae* [9, 32].

Ende der neunziger Jahre resultierte aus phylogenetischen Analysen der 16S- und 23S-rRNS-Gene eine Neuordnung der Systematik, verbunden mit einer Veränderung der Taxonomie. Innerhalb der Familie Chlamydiaceae werden seit 1999 zwei Gattungen unterschieden [15]: *Chlamydia* und *Chlamydophila*. Die Gattung *Chlamydia* enthält unter anderem die Spezies *Chlamydia trachomatis* und weitere tierpathogene Spezies. Die Spezies *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci* und die von *Chlamydia psittaci* abgeleiteten tierpathogenen

Spezies werden der Gattung *Chlamydophila* zugeordnet. Für die ausführliche Taxonomie sei auf die Abbildung 1.1 verwiesen.

Die Neuordnung der Chlamydien wurde nicht von allen Chlamydienforschern unterstützt [43]. In dieser Arbeit wird deshalb die alte Bezeichnung *Chlamydia pneumoniae* benutzt. Im Folgenden wird *Chlamydia* mit „C.“ abgekürzt.

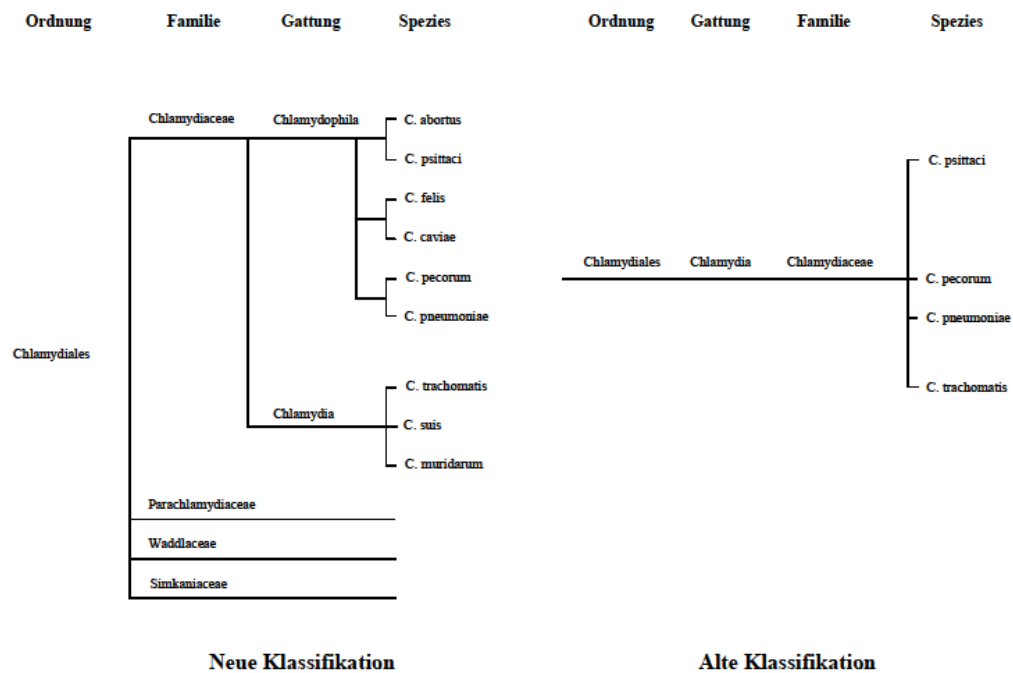


Abb.: 1.1: Gegenüberstellung der neuen und der alten Klassifikation

1.2 Chlamydiale Krankheitsbilder

Chlamydien können bei Menschen und Tieren verschiedene Erkrankungen auslösen. *C. pneumoniae* und *C. psittaci*, der Erreger der Papageienkrankheit, verursachen beim Menschen vor allem Erkrankungen der Atemwege. Im Folgenden werden nur die Krankheitsbilder, die mit *C. trachomatis* verbunden sind, besprochen.

C. trachomatis lässt sich serologisch durch die antigenetische Variation im „major outer membrane protein“ (MOMP) in mehr als 15 Serovare unterteilen (A-C, D-K,

L1-3). *C. trachomatis* Serovare A, B, Ba und C sind die Erreger des Trachoms, das in den Entwicklungsländern die häufigste infektiöse Ursache für die Erblindung von Menschen ist [40]. Der Erreger wird durch direkten Kontakt oder indirekt, über Gegenstände, selten auch durch Fliegen, übertragen. Es kommt zu einer follikulären Keratokonjunktivitis. Betroffen sind vor allem Kinder bis zum zehnten Lebensjahr. Nach akutem Beginn kommt es ohne Behandlung zu einer chronischen Hornhautvernarbung, die schließlich zur Erblindung führt.

Die Erkrankungen durch *C. trachomatis* Serovare D-K gehören zum Formenkreis der sexuell übertragbaren Krankheiten. Infizierte Männer sind häufig asymptomatisch oder leiden an einer Urethritis. Es kann zu einer aufsteigenden Infektion mit Beteiligung der Prostata und des Nebenhodens kommen [52].

Bei Frauen steht ebenfalls die ascendierende Infektion im Vordergrund. Über Cervix und Uterus werden schließlich die Tuben und Eierstöcke infiziert. In Amerika hat sich dafür der Begriff „pelvic inflammatory disease“ durchgesetzt. Die Prävalenz wird in Europa mit fünf bis sieben Prozent angegeben [51]. Häufige Folgen dieser chronischen Erkrankung sind eine ektopische Schwangerschaft oder Unfruchtbarkeit [11]. In seltenen Fällen kommt es nach der Infektion mit Chlamydien zu einer reaktiven Arthritis mit der Symptom-Trias Arthritis, Konjunktivitis und Urethritis, auch Reitersyndrom genannt [39].

Die Serovare L1-3 lösen im Gegensatz zu den Serovaren D-K eine invasive sexuell übertragbare Infektion aus. Nach dem Durchdringen des Epithels werden die Submukosa und das lymphatische Gewebe infiziert. Die Folge ist eine chronisch granulomatöse Entzündung, welche den Eigennamen Lymphogranuloma venerum trägt und vor allem in den Tropen vorkommt.

1.3 Der chlamydiale Entwicklungszyklus

Chlamydien sind auf eine intrazelluläre Vermehrung angewiesen. Man unterscheidet dabei zwei Entwicklungsstufen: die Elementarkörper (elementary bodies, EBs) und die Retikularkörper (reticulate bodies RBs). Gleichbedeutend für „RB“ wird auch der Begriff „Initialkörper“ benutzt. Außerhalb der Zellen existieren Chlamydien als EBs. Diese sind etwa 0,25 bis 0,3 µm im Durchmesser groß. Ihre Zell-

wand besteht vor allem aus, stark durch Disulfidbrücken vernetzten, Proteinen (outer membrane protein, OMP) [5, 14], welche für die dichte, starre Struktur, die das Überleben außerhalb der Wirtszelle ermöglicht, verantwortlich sind. Die EBs sind die infektiöse, stoffwechsellinaktive Form. Ihre DNS liegt stark kondensiert vor, so dass nur wenig transkriptionelle Aktivität möglich ist. Die RBs sind die intrazelluläre und stoffwechselaktive Form, das heißt, die DNS im RB ist locker gepackt und erlaubt so die Synthese von DNS, RNS und Proteinen. RBs sind etwa 1 µm groß und durch Reduktion der Disulfidbrücken weniger starr [24]. Sie vermehren sich durch Zellteilung.

Der Entwicklungszyklus kann in drei Abschnitte gegliedert werden: Aufnahme des EB, intrazelluläre Entwicklung und schließlich Freisetzung der Chlamydien. Der Entwicklungszyklus ist in Abbildung 1.2 zusammengefasst.

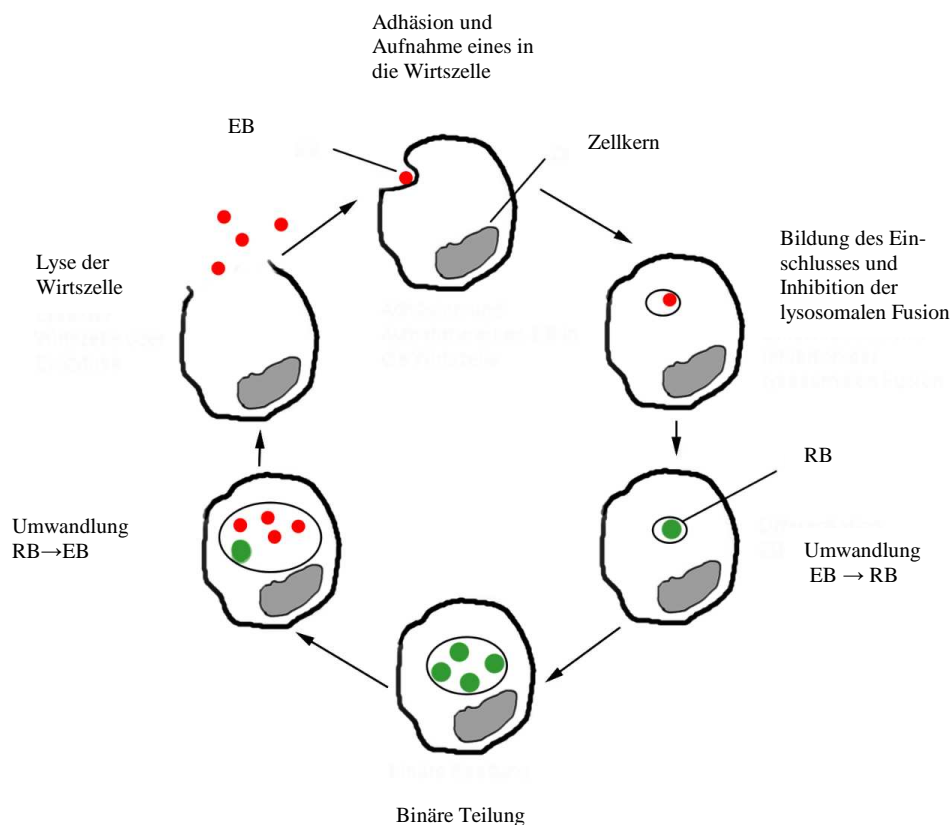


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des chlamydialen Entwicklungszyklus. Der EB nimmt Kontakt mit der Wirtszelle auf, wird internalisiert und wandert zur perinuklearen Region. Es kommt zur Differenzierung zum RB und zur Zellteilung. Nach Rekondensierung zum EB wird dieser freigesetzt.

Aufnahme des EB:

Nach Anhaften an die Wirtszelle wird der EB in die Zelle aufgenommen. Innerhalb der Zelle kommt es zur Konversion in die metabolisch aktive Form, den RB.

Der genaue Mechanismus der Bindung an und der Aufnahme in die Zelle ist nicht endgültig geklärt. Die entscheidende Rolle wird den heparansulfatähnlichen Glycosaminoglykanen (GAGs) zugesprochen [47, 41]. Auch MOMP (major outer membrane protein) soll daran beteiligt sein [55]. Nach der Adhäsion kommt es zu einer rezeptorvermittelten Endozytose. Der EB liegt im Zytoplasma der Zelle in einer phagosomalen Vakuole, „Einschluss“, genannt, vor. Die lysosomale Fusion wird während des Entwicklungszyklus inhibiert [12].

Intrazelluläre Entwicklung:

Nach Aufnahme in die Zelle wandert der Einschluss in die Peri-Golgi-Region. Für diesen Transport benutzt der sich entwickelnde Einschluss das zelluläre Transportsystem, das Microtubulsystem. Voraussetzung des Transports ist eine chlamydiale Expression von Proteinen [21]. Es kommt zur Wechselwirkung des Einschlusses mit dem exozytotischen Weg der Zelle [45], was zur Aufnahme von Sphingomyelin und Cholesterol in den Einschluss führt. Die Lipide werden in die Membran des Einschlusses eingebaut.

Nach etwa zwei Stunden differenziert sich der EB bei *C. trachomatis* zum RB. Es kommt zur Replikation, wodurch sich der Einschluss vergrößert. Etwa 18 Stunden post infectionem, abhängig von der benutzten Spezies, kommt es zur Rekondensation zum EB. Der Zyklus ist asynchron, das heißt, dass einige RBs sich bereits in EBs zurückverwandeln, während andere sich noch teilen.

Die Chlamydien benötigen Nährstoffe, die durch die Membran des Einschlusses geschleust werden müssen. Die Membran ist durchlässig für Moleküle bis 520 KiloDalton [19, 26]. Ionen können somit frei in den Einschluss diffundieren [22]. Einige Arbeiten legten nahe beziehungsweise konnten zeigen, dass es für bestimmte Moleküle, zum Beispiel ATP oder Aminosäuren, spezifische Transporter gibt [17, 25, 49]. Auch die Entschlüsselung des genetischen Codes der Chlamydien lässt

weitere spezifische Transporter vermuten. Einige Autoren nehmen an, dass die Verschmelzung mit Vehikeln des exozytotischen Weges der Nährstoffaufnahme dient [23, 41].

Obwohl die Replikation der Chlamydien von Stoffwechselprodukten der Wirtszelle abhängig ist, werden die Wirtszellfunktionen wenig gestört. Sowohl die DNS als auch die Proteinsynthese finden in infizierten Zellen weiter statt [3, 20]. Glykolyse und Zellatmung sind während der chlamydialen Infektion erhöht.

Freisetzung:

Der Entwicklungszyklus endet mit der Freisetzung der EBs, in der Regel durch Zellyse. Über die Mechanismen der Freisetzung ist bis jetzt wenig bekannt [28]. Die Literatur gibt den Zeitraum bis zur Freisetzung der EBs bei *C. trachomatis* mit 36 Stunden, bei *C. pneumoniae* mit 72 Stunden, an. Dabei gehen die Zellen meist zugrunde. In seltenen Fällen wird der Einschluss aus der Zelle ausgeschleust, ohne dass diese abstirbt [10].

1.4 Fusion und Persistenz

Bei hohen Infektionsdosen kommt es vor, dass zwei EBs eine Zelle infizieren. Auch wurde beobachtet, dass bei *Chlamydia trachomatis* mehrere Einschlüsse in einer Zelle fusionieren können. Eine wichtige Rolle spielt dabei das in der Einschlussmembran lokalisierte Protein IncA (inclusion membrane protein A) [16, 42].

Bei Anwesenheit von Antibiotika, Interferon- γ oder durch den Entzug essentieller Aminosäuren kann es zu aberranten morphologischen Formen der Einschlüsse kommen. Die Einschlüsse sind kleiner und enthalten wenige, große RBs („giant bodies“). Eine Rekondensation zu EBs findet nicht statt. Man spricht bei diesem Phänomen von Persistenz. Bei Entzug des Stimulus setzen die Chlamydien ihre Entwicklung fort. Da persistierende Chlamydieninfektionen einer antibiotischen Therapie nur schwer zugänglich sind [18], ist das Phänomen der Persistenz von klinischem Interesse.

1.5 Klassifizierung und Bedeutung der verwendeten Bakterien

1.5.1 *Mycoplasma hominis*

Mykoplasmen sind zellwandlose Bakterien. Damit zählen sie zu den Mollicuten (Weichhäuter). Die Familie der *Mycoplasmataceae* wird in zwei Genera unterteilt: *Mycoplasma* und *Ureaplasma*. Mykoplasmen sind die kleinsten bis jetzt kultivierbaren Bakterien mit einer Größe von 0,3 bis 0,8 µm. Aufgrund ihrer geringen Größe und des Fehlens einer starren Wandstruktur können Mykoplasmen nicht durch herkömmliche Filtrationsverfahren eliminiert werden. Die wichtigsten Mykoplasmen als Krankheitserreger sind *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalis* und *U. urealyticum*. *M. pneumoniae* ist einer der häufigsten Erreger der atypischen Lungenentzündung. Obwohl *M. hominis*, *M. genitalis* und *U. urealyticum* häufig bei Patienten mit nicht-gonorrhöischer Urethritis gefunden werden (bis 62 %), ist die pathologische Bedeutung dieser Keime unklar, da sie auch bei Gesunden in hohen Prozentanteilen gefunden werden [44].

Ein häufiges Problem der Forschung ist die Kontamination von Zellkulturen und Chlamydienstämmen mit Mykoplasmen [31]. Der Einfluss von Mykoplasmen auf Chlamydien wird kontrovers diskutiert. Die Arbeitsgruppe um E. A. Castilla stellte fest, dass eine Kontamination von Chlamydien mit Mykoplasmen keinen Einfluss auf das Wachstum und die Vermehrung der Chlamydien habe [6]. Dem widersprachen einige Forscher, insbesondere die Arbeitsgruppe von J. G. Kuipers [27,30,31], welche eine Hemmung des Wachstums von Chlamydien unter dem Einfluss von Mykoplasmen beobachteten.

1.5.2 *Lactobacillus sp.*

Laktobazillen gehören zur Familie der *Lactobacillaceae*. Sie sind große, unbegeißelte, grampositive Bakterien und fakultative Anaerobier. Sie bilden aus dem Abbau von Glykogen Milchsäure und senken damit den pH-Wert ihrer Umgebung. Somit sind sie die Ursache des sauren Scheidenmilieus, wo sie auch Döder-

leinstäbchen genannt werden. Die Besiedelung der Vagina mit Laktobazillen wirkt einer Überwucherung mit pathologischen Erregern, zum Beispiel *G. vaginalis*, entgegen [2]. Maßgebend hierbei sind die Konkurrenz beim Adhärenieren am Epithel, die Senkung des pH-Wertes und die Produktion antibakterieller Wirkstoffe, wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid.

1.5.3 *Gardnerella vaginalis*

G. vaginalis gehört in geringer Zahl zur Normalflora der Vagina. Es handelt sich dabei um ein kleines, vielgestaltiges, unbewegliches, gramnegatives Stäbchenbakterium aus der Familie der *Bifidobacteriaceae*.

Bei einem Anstieg des pH-Wertes über 4,5, etwa bei einer gestörten Vaginalflora, vermehren sich die Gardnerellen sprunghaft, und es kann zu einer unspezifischen Vaginitis kommen, deren Leitsymptom aus vermehrtem Ausfluss mit Fischgeruch besteht. Die Prävalenz der durch Gardnerellen ausgelösten Vaginitiden wird in der Literatur zwischen 8 und 75 Prozent angesetzt [36]. In einer für Europa repräsentativen Studie aus Italien wurde sie mit 33,2 Prozent beziffert [8].

1.5.4 *Neisseria gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae, auch Gonokokken genannt, ist der Krankheitserreger der Gonorrhöe, einer der klassischen Geschlechtskrankheiten. Es ist ein gramnegatives Kokkenbakterium, meist in Diplokokkenform zusammen gelagert, und wird der Familie *Neisseriaceae* zugeordnet. Neben einigen apathogenen Spezies gibt es eine weitere humanpathogene Spezies, *N. meningitidis*, die sogenannten Meningokokken, die Hirnhautentzündungen hervorrufen können.

Die Gonorrhöe, auch Tripper genannt, ist eine eitrige Entzündung der Harnröhre. Selten kommt es zu einer extragenitalen Manifestation. Beim Mann ist eine Chronifizierung und aufsteigende Verbreitung mit Beteiligung der Prostata und des Nebenhodens möglich. Bei der Frau sind zuerst die Zervix, später die Adnexe, betroffen. In 10 bis 30 Prozent der Fälle kommt es dabei zur Koinfektion mit *C. trachomatis* [29].

Gefürchtet ist die Übertragung von Gonokokken bei der Geburt, wo sie bei den Neugeborenen zu einer schweren Konjunktivitis führen können. In Deutschland geht man von rund 25.000 bis 35.000 Erkrankungen pro Jahr aus.

1.6 Zielsetzung

Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen ist der Entwicklungszyklus von Chlamydien gut dokumentiert [10, 53], doch kann auf diese Weise eine Zelle nicht während des ganzen Entwicklungszyklus ununterbrochen beobachtet werden. Die lichtmikroskopischen Darstellungen ganzer Entwicklungszyklen beschränken sich auf eine einzige Arbeit von I.D. Neepet et. al. aus dem Jahr 1990 [37].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem der gesamte Entwicklungszyklus von Chlamydien lichtmikroskopisch digital festgehalten werden kann. Durch eine Aneinanderreihung von Fotografien derselben Zelle zu unterschiedlichen Zeiten im Entwicklungszyklus soll eine kinematografische Darstellung entstehen.

Im Anschluss an die Etablierung der Methode ist es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, Entwicklungszyklen verschiedener *C. trachomatis* Serovaren mit Hilfe der Kinematografie zu vergleichen. Beobachtet wird insbesondere, wann die Einschlüsse das erste Mal sichtbar sind, ob sie die Fähigkeit zur Fusion haben, und der Zeitpunkt der Lyse. Auch die Morphologie der verschiedenen Serovaren wird beschrieben.

In vivo findet der Entwicklungszyklus von *C. trachomatis* in Gegenwart der physiologischen oder pathogenen Standardflora statt. Ihr Einfluss wurde in einem In-vitro-Modell des unteren weiblichen Genitaltrakts studiert. Dazu wurde *C. trachomatis* Serovar D mit Laktobazillen, Mykoplasmen, Gonokokken und Gardnerellen koinfiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Die genauen Angaben zu Konzentrationen und Molaritäten, sind, wo sie fehlen, dem Abschnitt 2.1.2 zu entnehmen.

	<u>Firma/Hersteller:</u>
• Acrdinorange	Sigma, München
• Antikörper	
○ Monoklonaler Anti-Chlamydien-LPS-AK von der Maus	Freundlicherweise überlassen von Prof. H. Brade (Forschungszentrum Borstel)
○ FITC- od. RPE markierter Anti-Maus-AK vom Kaninchen	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
• Cycloheximid (Arbeitskonzentration: 1 µg/ml)	Sigma, München
• DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (4,5 g/l))	PAA, Pasching, Österreich
• Essigsäure	Merck, Darmstadt
• FKS (Fetales Kälber Serum) Mycoplex™	PAA, Pasching, Österreich
• Gentamicin	PAA, Pasching, Österreich
• Glucose	Sigma, München
• HEPES-Puffer (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyloethanesulfonsäure)	PAA, Pasching, Österreich

1. KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
• L-Glutaminsäure	PAA, Pasching, Österreich
• Methanol (100%)	J.T. Baker, Deventer, Holland
• Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
• NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
• Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
• PBS (Phosphatpuffer)	Apotheke UKSH, Lübeck
• Pferdeserum	Vector, Kalifornien, USA
• Phenolrot	Merck, Darmstadt
• PPLO Broth	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
• Saccharose	Merck, Darmstadt
• Salzsäure	Roth, Karlsruhe
• Trypanblau (0,4 % Trypanblau in Phosphatpuffer)	ICN, Eschwege
• Trypsin/EDTA (0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA in PBS (1x))	PAA, Pasching, Österreich
• Yeast Extrakt	Sigma, München

2.1.2 Zusammensetzung der verwendeten Medien, Puffer und Färbungen

1. Zellmedium:

DMEM (1 x)

Zusätze zu 500 Milliliter Medium:

- 16,6 ml HEPES (1 M)
- 50 ml FKS MycoplexTM
- 550 µl Gentamicin (10 mg/ml)

2. PBS

Zusammensetzung für 500 Milliliter:

- NaCl 5,0 g
- KCl 0,125 g
- Na₂HPO₄ 2 H₂O 0,72 g
- KH₂PO₄ 0,125 g

Gelöst in aqua dest., pH-Wert 7,2

3. SPG-Puffer (Sucrose-Phosphat-Glutaminsäure-Puffer)

Zusammensetzung für 1 Liter:

- Saccharose 75,0 g
- Na₂HPO₄ 2,47 g
- NaH₂PO₄ 0,36 g
- L-Glutaminsäure 0,72 g

Gelöst in aqua dest., pH-Wert 7,3

4. Mycoplasma-Bouillon

Zusammensetzung für 100 Milliliter:

- 70 ml PPLO Broth (20 g/l) + 1,4 g Glucose
- 10 ml Yeast-Extrakt (15 g/l) in aqua dest.
- 20 ml Pferdeserum
- 100 µl Phenolrot in aqua dest.

pH-Wert: 6,3

5. Acridinorange-Färbung

Zusammensetzung für 1 Liter:

- Acridinorange 1,0 g
- NaOH 21,8 g
- 5M Essigsäure 105,0 ml
- 1M HCl 473,0 ml
- aqua dest. 421,0 ml

2.1.3 Laborausrüstung

	<u>Firma:</u>
• Analysewaage Bp619	Sartorius, Göttingen
• accu jet [®]	Brand, Wertheim
• Densitometer	Biomerieux, Nürtingen
• Euroflow Klasse II A Mikro-biologische Sicherheitswerkbank	Clean Air, Lausanne, Schweiz
• flammy L	Schütt, Göttingen
• HERAcell [®] 240 CO ₂ Incubator	Heraeus, Hanau
• Kamera: AxioCam HRC	Zeiss, Jena
• Magnetrührer	IKA, Staufen
• Mikro-Pinzette Uhrmacher Typ, 110 mm	Aeskulap, Tuttlingen
• Mikroskope	
○ Zeiss Standard 20	Zeiss, Jena
○ Axiovert 25	Zeiss, Jena
○ Axioskop 40	Zeiss, Jena
• Neubauer-Zählkammer und Deckglas	HHH Germany, Hamburg
• pH-Meter	WTW, Weilheim
• Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
• Vibrax VXR basic	IKA, Staufen
• Vortexer Reax top	Heidolph, Schwabach
• Zeitschaltuhr	Sonderanfertigung
• Zentrifugen:	
○ Multifuge [®] 3 S-R	Heraeus, Hanau
○ Centrifuge 2k 364	Hermle, Wehingen

2.1.4 Gebrauchsmaterialien

	<u>Firma:</u>
• 6-Loch-, 24-Loch-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
• Blutagarplatten COS	BioMerieux, Nürtingen
• Einweg-Stabpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
• Glasschrot (ca. 3 mm)	Assistent , Sondheim
• Kunststoff-Impföse	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
• Mikroröhre 1,5 ml mit Verschluss	Sarstedt, Nümbrecht
• Mikroskopische Deckgläser (rund, Ø 13 mm)	Assistent , Sondheim
• Objektträger (76 x 26 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
• Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
• Röhrchen (50 ml, 15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
• Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
• Zellspachtel 20 cm	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.5 Bakterien

2.1.5.1 Chlamydien

Alle verwendeten Chlamydienisolate stammen aus der Stammsammlung der Mikrobiologie, Medizinische Universität zu Lübeck.

	ATCC-Nr.
• <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar L2 Isolat 434	VR-902B
• <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar D Isolat CH 118	VR-885
• <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar A Isolat CH 725	VR-571B
• <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar B Isolat TW/5	VR-573
• <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar I Isolat Uw/12	VR-880

Alle Chlamydienstämme wurden mit Hilfe einer Ultrazentrifuge aus infizierten HeLa-Zellen aufgereinigt und in SPG-Puffer (20 µl oder 10 µl Aliquots) aufgenommen. Lagerung bei -80°C . Aufreinhit wurden sie von den MT As der Arbeitsgruppe Gieffers.

2.1.5.2 Bakterienstämme

	ATCC-Nr.
• <i>Gardnerella vaginalis</i>	ATCC 49145D
• <i>Lactobacillus</i> sp.	Patientenisolat, UKSH
• <i>Mycoplasma hominis</i>	ATCC 23114 (Überlassen von Dipl.-Biol. Roger Dumke, TU Dresden)
• <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 49226

2.1.6 Wirtszellen

	ATCC-Nr.
• Immortalisierte HeLa-Zellen	ATCC CCI-2.1

2.1.7 Computersoftware:

- Zeiss Axio Vision 4.2
- Excel
- InStat
- Quick Time Pro

Firma:

Zeiss, Jena

Microsoft, USA

GraphPad, USA

Apple, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Da Chlamydien obligat intrazelluläre Erreger sind, benötigt man für ihre Anzucht Zellkulturen. Im Rahmen dieser Arbeit werden hierfür HeLa-Zellen verwendet, eine immortalisierte epitheliale Zelllinie, die aus einem Zervixkarzinom gewonnen wurde. Um eine Kontaminierung der Zellkulturen mit Mykoplasmen auszuschließen, werden die Kulturen durch die MTAs der Arbeitsgruppe Gieffers einem regelmäßigen Screening unterzogen.

2.2.1.1 Wirtszellen und deren Passage

Als Nähr- und Puffermedium für die Zellen dient Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) der Firma PAA, welches mit den im Abschnitt 2.1.2 aufgeführten Zusätzen versehen ist. Es zeichnet sich durch eine hohe Glukose- (4,5 g/l) und Aminosäurekonzentration aus. Als Puffersystem fungiert das Bicarbonat und das zugefügte HEPES (PAA). Unerlässlich ist der Zusatz von zehn Prozent fetalen Kälberserums (FKS, PAA), welches Wachstumsfaktoren für die Zellen liefert.

Ist in einer Zellkulturflasche ein einschichtiger, geschlossener Zellrasen (Monolayer) zu erkennen, müssen die Zellen auf neue Zellkulturflaschen verteilt werden. Dafür wird das proteinspaltende Enzym Trypsin (PAA) benötigt. Trypsin löst die Zell-Zell-Verbindungen (tight-junctions) und die unspezifischen Haftungen der Zellen an der Zellkulturflasche (Greiner Bio-One). Die Passage der Zellen wird, um Kontaminationen zu verhindern, unter der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (Clean Air) vorgenommen.

Durchführung:

Das verbrauchte DMEM-Medium wird mit Hilfe einer Stabpipette (Greiner Bio-One) aus der Zellkulturflasche entfernt. Je nach Größe der Zellkulturflasche wird eine entsprechende Menge Trypsin (0,5 g/l) / EDTA (0,2 g/l) in die Flasche pipetiert und die Flasche leicht geschwenkt:

75 cm²-Flasche: 2 ml Trypsin/EDTA

175 cm²-Flasche: 4 ml Trypsin/EDTA

Anschließend wird das Trypsin/EDTA-Gemisch wieder mit der Pipette abgenommen. Dieser Schritt dient der Entfernung des restlichen Mediums. Nun wird erneut, je nach Flaschengröße (s.o.), Trypsin/EDTA in die Zellkulturflasche hinzugefügt, und die Flasche wird etwa fünf Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Um die durch das Trypsin ausgelöste Reaktion zu stoppen, wird frisches DMEM in die Zellkulturflasche pipettiert. Das dem Medium zugesetzte FKS enthält Proteaseinhibitoren, die Trypsin rasch inaktivieren. Die Menge des Mediums entspricht der Menge des Trypsin/EDTA. Die erhaltene Zellsuspension wird auf zwei (1:2), drei (1:3) oder vier (1:4) neue Zellkulturflaschen der gleichen Größe verteilt, je nachdem, wann die Zellen erneut benötigt werden:

1:2-Passage: Monolayer nach 24 Stunden Bebrütung

1:3-Passage: Monolayer nach 48 Stunden Bebrütung

1:4-Passage: Monolayer nach 72 Stunden Bebrütung

Zu der Zellsuspension wird, entsprechend der Flaschengröße, eine bestimmte Menge DMEM hinzugefügt:

75 cm²-Flasche: 10 ml Medium

175 cm²-Flasche: 20 ml Medium

Nun können die Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂ bebrütet werden.

2.2.1.2 Aussaat der Wirtszellen auf Zellkulturplatten

Für die mikroskopisch-kinematografische Darstellung werden 6-Lochplatten (Wellplatten, Greiner Bio-One) mit ausgesäten HeLa-Zellen verwendet. Diese bieten, verglichen mit den Zellkulturflaschen, bessere optische Verhältnisse. Die benötigte Zellsuspension wird, wie oben beschrieben, gewonnen. In der Neubauer-Zählkammer werden die Zellen, um eine definierte Anzahl zu gewinnen, gezählt. Zur Unterscheidung lebender und toter Zellen werden die Zellen vor der Zählung mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau angefärbt. Dieser Stoff dringt durch die defekten

Zellmembranen toter Zellen und färbt diese blau. Gezählt werden dann nur die nicht angefärbten, lebenden Zellen („trypan blue dye exclusion“).

Durchführung:

Der Monolayer einer Zellkulturflasche wird, wie im Abschnitt 2.2.1.1 erläutert, gelöst. Nach Durchmischung der Zellsuspension werden 50 µl dieser Suspension für die Zellzählung entnommen und mit 200 µl PBS-Puffer gemischt (1:5-Verdünnung). Nun werden wiederum 50 µl dieses Puffergemisches entnommen und mit 50 µl Trypanblau versetzt (1:2-Verdünnung). Man erhält so letztlich eine 1:10-Verdünnung (1:5 x 1:2) der Zellsuspension. Ein Teil dieser 1:10-Verdünnung wird in eine Neubauer-Zählkammer überführt, und die lebenden Zellen in den vier großen Eckquadraten werden ausgezählt. Um die Zellzahl in der Zellsuspension errechnen zu können, muss der Verdünnungsfaktor von 1:10 berücksichtigt werden. Ein Großquadrat der Zählkammer fasst ein Volumen von 0,1 mm³ (entspricht 10⁻⁴ ml). Die Zellzahl in der Zellsuspension lässt sich demnach mit folgender Formel berechnen:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen} \times 10 \times 10^4 \times \text{Volumen der Zellsuspension}}{4}$$

Für die Experimente, die sich mit dem Entwicklungszyklus (siehe 2.2.3) beschäftigen, wird kein Monolayer an Zellen benötigt. Die Zellen sollten einzeln oder in kleinen Gruppen auf der Zellkulturplatte verteilt sein, um die Zellgrenzen und Zellformen gut erkennbar zu machen. Erfahrungsgemäß ergeben 2,5 x 10⁵ Zellen pro ml nach 24 Stunden bzw. 4,5 x 10⁵ Zellen nach 5 Stunden Bebrütung (37°C, 5 % CO₂) die gewünschte Zelldichte. Das Volumen, welches die gewünschte Zellmenge enthält, wird durch einen Dreisatz berechnet. Das erhaltene Volumen wird weiter auf das gewünschte Volumen verdünnt (2 ml/Loch für 6-Lochplatten und 1 ml/Loch für 24-Lochplatten).

Für die Versuche, die sich mit dem Einfluss von Bakterien auf *Chlamydia trachomatis* Serovar D beschäftigen (siehe 2.2.5), wird ein Monolayer benötigt. Dementsprechend müssen konzentriertere Zellsuspensionen benutzt werden (1,4 x 10⁶ Zellen pro ml für 24 Stunden bzw. 2,6 x 10⁶ Zellen pro ml für 5 Stunden).

2.2.2 Infektion mit Chlamydien

Für die Infektion mit Chlamydien werden 6-Lochplatten mit ausgesäten HeLa-Zellen benötigt, die, wie unter Punkt 2.2.1.2 beschrieben, hergestellt werden. Zusätzlich wird Cycloheximid (Sigma) zugesetzt. Cycloheximid ist ein Zytostatikum, das die Peptidyltransferaseaktivität eukaryotischer Ribosomen hemmt. Die Proteinsynthese in den HeLa-Zellen und damit ihre Teilung werden verringert. Die Nährstoffe im Medium stehen so zum größten Teil für die Replikation der Chlamydien zur Verfügung.

Durchführung:

Pro ml Medium werden 10 µl Cycloheximid hinzugefügt. Die Menge an verwendeter Chlamydien suspension richtet sich nach der Konzentration und der Infektiosität der entsprechenden Aufreinigung der *Serovare*, so dass jeder neuer *Serovar* und jede Aufreinigung eine Austestung erfordern. Dies wird durch eine Fünfer-Verdünnungsreihe bewerkstelligt. Die Chlamydien liegen als 10-µl- bzw. 20-µl-Aliquots aufgereinigt vor. Sie werden im Verhältnis 1:50 verdünnt; entsprechend müssen zu den 10 µl der Aufreinigung 490 µl Medium, zu den 20 µl 980 µl Medium, pipettiert werden (=Stocklösung). Die Volumina, die für die kinematografische Darstellung pro Loch hinzugefügt werden müssen, können in der Tabelle 2.1 abgelesen werden. Die Zellen werden so inokuliert, dass statistisch jede zweite Zelle einen Einschluss enthält.

Chlamydia trachomatis	Ctr L2	Ctr D	Ctr A	Ctr B	Ctr I
Stocklösung/Loch	0,1-0,5 µl	20-30 µl	300-400 µl	300 µl	75 µl

Tab. 2.1: Volumen der verschiedenen *Chlamydia trachomatis Serovare* für die kinematografische Darstellung.

Nach der Infektion wird die Platte in der Zentrifuge (Hermle) bei 2.000 U/min (entspricht 700 x g) 60 Minuten zentrifugiert. Die Zentrifugation dient der besseren Adhäsion der Elementarkörperchen an die Wirtszellen. Bebrütet wird die Platte bei 37°C und 5 % CO₂.

2.2.3 Erstellen der Zeitreihen

Um den chlamydialen Entwicklungszyklus darzustellen, müssen in definierten Zeitabständen Bilder ein und derselben Zelle aufgenommen werden. Dazu wird ein inverses Phasenkontrastmikroskop (Zeiss) mit einer Kamera (Zeiss) in einen Brutschrank mit CO₂-Begasung gestellt (Abb. 2.1). Der Wasserbehälter, der normalerweise für eine ausreichende Luftfeuchtigkeit im Brutschrank sorgt, wird entfernt, um die Elektronik der Kamera nicht zu beschädigen.

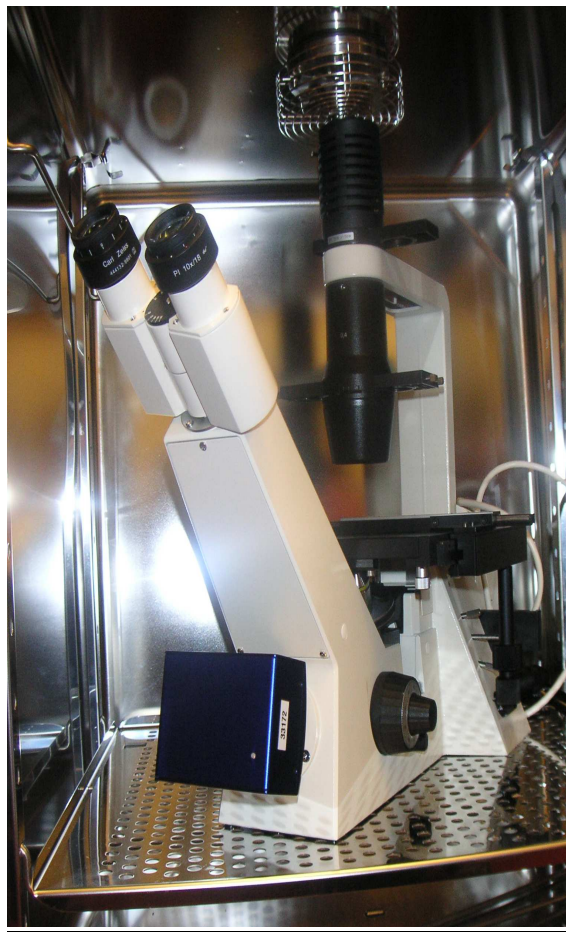


Abb. 2.1: Versuchsaufbau. Das Foto zeigt ein inverses Lichtmikroskop und eine digitale Kamera in einem Brutschrank.

Durchführung:

Es empfiehlt sich, das Mikroskop mindestens fünf Stunden vor Beginn der Zeitreihe in den Brutschrank zu stellen, um eine Angleichung an die Temperatur im Brutschrank zu erreichen. Etwa acht Stunden nach der Infektion wird die Platte unter das Mikroskop gelegt. Mit dem 40er-Objektiv wird eine Stelle mit möglichst intakten Zellen aufgesucht. Mit der Option „Livebild“ des Programms Axiovision 4.2 kann das Mikroskopbild auf dem Computerbildschirm dargestellt werden. Gearbeitet wird im Schwarzweiß-Modus, fokussiert wird das Bild am Mikroskop.

Sind alle Einstellungen vorgenommen, kann eine Aufnahme des aktuellen Areals gemacht werden. Zur Aufnahme einer Fotosequenz wird das Software-Modul „Zeitreihen“ benötigt. Das Zeitintervall und der Gesamtzeitraum der Bildaufnahmen können ausgewählt werden. Für die vorliegende Arbeit wurden die zu beobachtenden infizierten Zellen alle zwölf Minuten fotografiert. Der Gesamtzeitraum der Aufnahmen betrug 60 bis 100 Stunden.

Da die Zellen durch die Lampe des Mikroskops stark erhitzt werden, darf das Mikroskoplicht nur während der Aufnahme brennen. Dazu ist eine Zeitschaltuhr (Sonderanfertigung) notwendig. Diese wird bei einem Aufnahmeintervall von zwölf Minuten so eingestellt, dass das Licht drei Minuten ein- und neun Minuten ausgeschaltet ist.

Zur Erstellung eines Films im Movie-Format (Quick Time Player, Apple) müssen die Bilder der Zeitreihe aus dem Zeiss-Format „zvi“ in das jpg-Format konvertiert werden. Die Einzelbilder können dann mit dem Programm Quick Time Pro als bewegte Bilder dargestellt werden.

2.2.4 Darstellung der Einschlüsse mit Hilfe des indirekten Fluoreszenztests

Um zu beweisen, dass es sich bei den gefilmten Einschlüssen tatsächlich um Chlamydien handelt, wird ein indirekter Fluoreszenztest (IFT) durchgeführt. Dabei wird ein Gesichtsfeld erst nativ fotografiert, im zweiten Schritt fixiert, danach mit einem fluoreszierenden, chlamydienspezifischen Antikörper markiert und schließlich ein zweites Mal fotografiert. Bei dem Testverfahren bindet in einem ersten Schritt ein monoklonaler, chlamydienspezifischer Lipopolysaccharid-Antikörper

(LPS) (Prof. H. Brade, Forschungszentrum Borstel). In einem zweiten Schritt wird ein weiterer, mit einem Fluoreszenzfarbstoff (RPE oder FITC) gekoppelter Antikörper (DakoCytomation), der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, hinzugegeben (siehe Abb. 2.2).

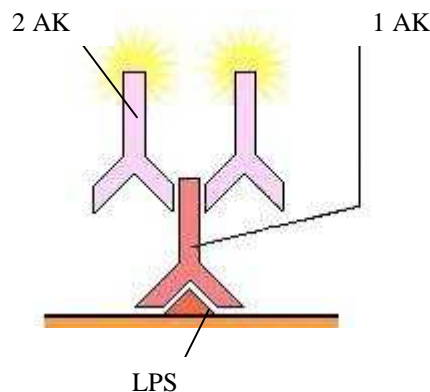


Abb. 2.2: Prinzip des indirekten Fluoreszenztestes. Der erste Antikörper ist gegen das chlamydiale LPS, welches sich auf der Bakterienoberfläche befindet, gerichtet. Der zweite, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörper bindet an den ersten Antikörper.

Durchführung:

Der vermutete Einschluss wird mit Hilfe des oben genannten Fotoprogramms abgelichtet. Die zu fotografierende Stelle wird, um sie später wiederzufinden, mit Hilfe einer Millimeterskalierung gekennzeichnet. Anschließend wird das Medium aus dem Loch abgesaugt und durch hundertprozentiges Methanol (J.T. Baker) (1 ml bei 6-Lochplatten, 300 µl bei 24-Lochplatten) ersetzt. Nach fünfminütiger Fixierung wird das Präparat drei Minuten lang luftgetrocknet. Dann wird das Loch mit dem ersten unverdünnten LPS-Antikörper überschichtet und bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. Das Volumen des Antikörpers entspricht dabei dem des Methanols.

Nach der Inkubation wird zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Stammlösung des zweiten Antikörpers wird im Verhältnis 1:250 mit PBS verdünnt und das entsprechende Volumen (1 ml, bzw. 300 µl) hinzupipettiert. Es folgen weitere 45 Minuten Inkubation bei 37°C. Nach zweimaligem Waschen des Präparats mit PBS benetzt man die Oberfläche des Lochs mit PBS. Nun kann die zu untersuchende Stelle im Fluoreszenzmikroskop wieder aufgesucht und mit Hilfe der AxioCam aufgenommen werden. Die mit Antikörper markierten chlamydialen Einschlüsse

leuchten nun unter dem Fluoreszenzlicht grün (FITC) beziehungsweise rot (RPE) auf.

2.2.5 Einfluss verschiedener Bakterien auf das Wachstum und die Entwicklung von *Chlamydia trachomatis* Serovar D

Um den Einfluss verschiedener Bakterien auf *Chlamydia trachomatis* D zu untersuchen, entwickelte unsere Arbeitsgruppe ein In-vitro-Modell, welches sich an der mikrobiologischen Besiedelung des weiblichen Genitaltrakts orientiert. In diesem Modell werden HeLa-Zellen, welche aus der Zervix stammen, mit Bakterien infiziert und nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden mit Chlamydien superinfiziert. Die einzelnen Arbeitsschritte werden in den folgenden Kapiteln (2.2.5.1 bis 2.2.5.7) detailliert beschrieben.

Als Bakterien werden Erreger weiblicher genitaler Infektionen verwendet: *N. gonorrhoeae*, *G. vaginalis* und *M. hominis*. Weiter wird der Einfluss von *Lactobacillus* sp. untersucht, der zur physiologischen vaginalen Standortflora gehört.

In einer ersten Reihe von Experimenten wird der Einfluss der oben genannten Bakterien auf Adhäsion und Aufnahme der Chlamydien untersucht. Dazu werden die chlamydialen Einschlüsse unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt und mit einer mitgeführten Negativkontrolle, frei von den oben genannten Bakterien, verglichen.

In einer zweiten Reihe von Experimenten werden die intrazelluläre Vermehrung und die Produktion infektiöser EBs untersucht. Dazu wird 48 Stunden nach der Koinfektion ein Monolayer aus der Platte gelöst. Zu diesen Zeitpunkt haben sich bei unbeeinflusstem Wachstum Einschlüsse entwickelt, die bereits wieder EBs enthalten. Mit Hilfe von Glaskügelchen werden die Zellen aufgeschlossen und die chlamydialen Einschlüsse freigesetzt [46]. Diese Suspension wird benutzt, um von neuem frische und sterile Zellen mit den gewonnenen EBs zu infizieren. Nach weiteren 36 Stunden werden die IFUs ausgewertet und mit der mitgeführten Negativkontrolle verglichen.

Die Abbildung 2.3 gibt das Ablaufschema wieder.

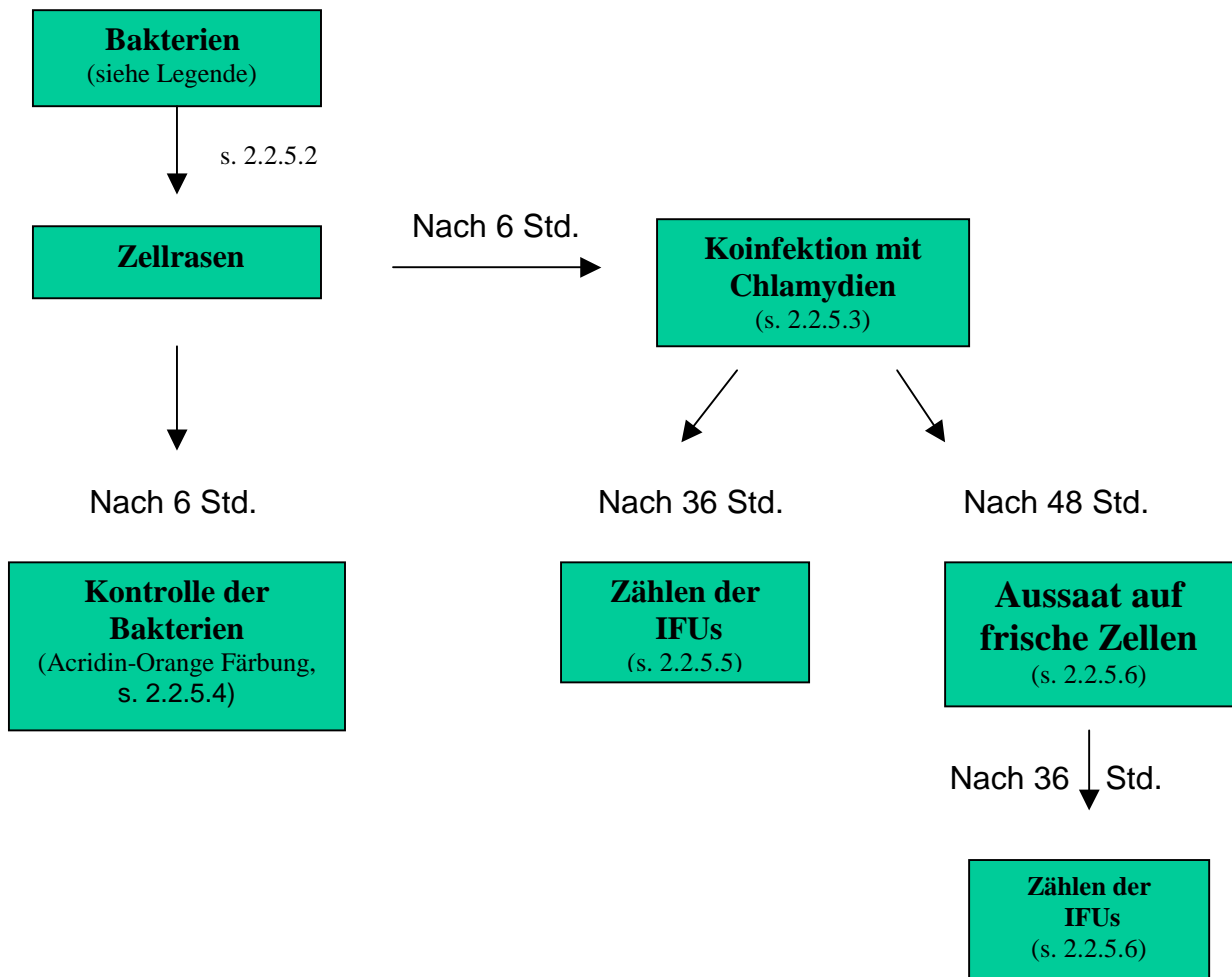


Abb. 2.3: Schema des Versuchsaufbaus zur Messung des Einflusses der verwendeten Bakterien (*Lactobacillus sp.*, *N. gonorrhoeae*, *G. vaginalis*, *M. hominis*) auf *C. trachomatis* Serovar *D*.

2.2.5.1 Kultivierung der Bakterien

Zur Koinfektion von *Chlamydia trachomatis* Serovar *D* mit anderen Mikroorganismen ist es nötig, letztere zu kultivieren.

Durchführung:

Die Bakterienkulturen von *Lactobacillus sp.*, *N. gonorrhoeae*, *G. vaginalis* (Erreger mit Zellwand) werden auf Blutagarplatten (COS/BioMerieux) gezüchtet. Dabei werden mit einer Kunststofföse (Greiner Bio-One) mehrere Kolonien der alten Kultur entnommen und mit einem Dreiösenausstrich auf einer neuen Blutagarplatte verteilt. Die zellwandlosen Mykoplasmen werden in einer Mykoplasmenbouillon (Zusammensetzung s. 2.1.2) gezüchtet und ebenfalls jede Woche auf eine neue

Bouillon umgeimpft. Der Stoffwechsel der Mykoplasmen ändert den pH-Wert der Bouillon (Zusammensetzung s. 2.1.2). Durch den pH-Indikator Phenolrot (pH-Umschlagpunkt: 6,4 bis 8,2) wird ein Farbumschlag von Gelb nach Rot erreicht.

Nach dem Farbumschlag, welcher anzeigt, dass sich die Bakterien ausreichend vermehrt haben, werden 200 µl einer alten Kultur in 2 ml frische Bouillon pipettiert.

2.2.5.2 Infektion der Zellkultur mit Bakterien

Für die Versuche, welche die Auswirkung einer Koinfektion mit *Chlamydia trachomatis* D untersuchen, wird ein Monolayer benötigt. Die Zellkulturen werden, wie in 2.2.1.2 beschrieben, angelegt. Um eine Beeinträchtigung der Bakterien durch Antibiotika zu vermeiden, wird auf den Zusatz von Gentamicin verzichtet. Die Bakterien werden hierfür in das flüssige Nährmedium (DMEM) überführt. Um eine konstante Menge von Bakterien mit Zellwand hinzugeben, wird dabei die Trübung der Suspension, bestehend aus Bakterien und dem Flüssigmedium (DMEM), mit einem Densitometer (Biomerieux) nach MC-Farland gemessen.

Durchführung:

Es werden 6-Lochplatten mit $1,4 \times 10^6$ Zellen/ml angelegt. (s. 2.2.1.2). Nach 24 Stunden hat sich ein Monolayer gebildet, welcher lichtmikroskopisch auf seine Geschlossenheit überprüft wird. Es werden 10 µl Cycloheximid zu 1 ml Medium hinzugegeben.

In ein für das Densitometer geeignetes Röhrchen werden 5 ml Medium gegeben. Es werden so lange Bakterien hinzugegeben, bis ein McFarland-Score von 0,5 erreicht ist. Die Bakterien müssen zwei Tage zuvor frisch umgesetzt werden. Um eine homogene Trübung zu erhalten, muss die Lösung zwischendurch gemischt werden. Anschließend werden die Bakteriensuspensionen nach folgendem Schema auf die Zellkultur verteilt:

1.000 µl *Lactobacillus* sp./Napf

250 µl *G. vaginalis*/Napf

25 µl *N. gonorrhoeae*/Napf

Die benutzten Mengen der Bakterien wurden in Vorversuchen ermittelt und so gewählt, dass eine möglichst hohe Bakterienlast im System erzielt wird, ohne dass eine toxische Wirkung die Wirtszellen beeinträchtigt.

Da Mykoplasmen keine Trübung hervorrufen, muss in diesem Fall auf die Densitometrie verzichtet werden. Die zellwandlosen Bakterien werden, nachdem der Indikator umgeschlagen ist, direkt in die Zellkultur überführt. Durch Vorversuche wurde ausgeschlossen, dass die Bouillon, die zur Kultivierung von Mykoplasmen benutzt wird, das Wachstum von *C. trachomatis* Serovar *D* beeinflusst. Die Laborarbeiten mit *M. hominis* werden in einem separaten Labor mit eigenen Gerätschaften vorgenommen, um eine Kontamination der Zellkulturen, welche für andere Versuche benutzt werden, zu vermeiden.

Durchführung:

Nach dem Farbumschlag durch pH-Indikator Phenolrot (s. 2.2.5.1) werden zum Monolayer 1.000 µl beziehungsweise 100 µl Mykoplasmenbouillon additiert.

2.2.5.3 Superinfektion mit *Chlamydia trachomatis* Serovar *D*

Nach sechs Stunden wird die mit den Bakterien versehene Lochplatte mit *C. trachomatis* Serovar *D* koinfiziert (s. 2.2.2).

Durchführung:

Für die Platten, die nach 36 Stunden ausgewertet werden sollen, werden folgende Volumina der Stocklösung benutzt: 2,5 µl, 0,5 µl, 0,1 µl (entspricht einer MOI 0,1; 0,02; 0,0004) Die Versuche werden mit verschiedenen Konzentrationen von Chlamydien durchgeführt, weil nicht auszuschließen ist, dass das Ergebnis auch von der Anzahl der chlamydialen Einschlüsse im System abhängt.

Für die Platten, die nach 48 Stunden wieder angezüchtet werden sollen, verwendet man den Wert 2,5 µl (MOI 0,1). Alle drei Konzentrationen der ersten Passage wurden zum Wiederanzüchten ausgetestet. Bei einer Konzentration von 2,5 µl der Stocklösung auf einen Napf konnten die konstantesten Werte für die zweite Pas-

sage dokumentiert werden. Nach dem Zentrifugationsschritt werden die Platten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.5.4 Quantifizierung der Bakterien mit Acridin-Orange

Um die Menge der hinzugefügten Bakterien zu messen und um kontrollieren zu können, ob die Quantität der Bakterienlast in den verschiedenen Versuchsreihen konstant ist, werden die Bakterien, nachdem sie mit Acridin-Orange gefärbt wurden, lichtmikroskopisch ausgezählt. Acridin-Orange färbt Nukleinsäuren. DNS leuchtet grün bis gelb, RNS rot.

Durchführung:

In einen Napf werden, bevor die Zellen hinzugefügt werden, mikroskopische Deckgläser (Assistent) gelegt. Die weiteren Schritte sind die gleichen, wie oben in Abschnitt 2.2.5.1 und 2.2.5.2 beschrieben. Zum Zeitpunkt der Koinfektion werden die Deckgläschen in 24-Lochplatten überführt und mit Methanol (300 µl) zwei Minuten lang fixiert. Anschließend werden diese mit 300 µl Acridin-Orange-Lösung (s. 2.1.2) überschichtet und zwei Minuten lang gefärbt. Dann werden die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen und auf Objektträger (Menzel-Gläser) fixiert. Die Objektträger werden mit dem 100er-Objektiv (Axioskop 40) ausgewertet.

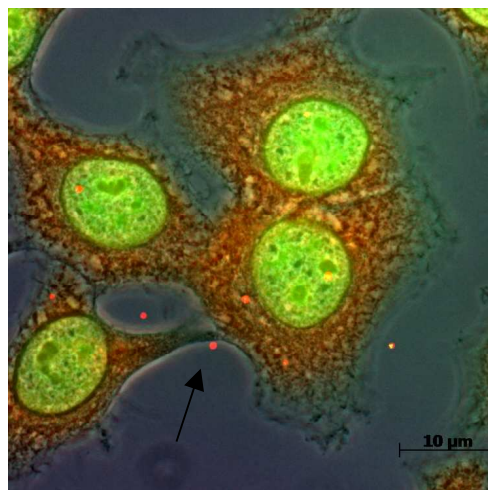


Abb. 2.2.4: Acridin-Orange-Färbung von HeLa-Zellen und Gonokokken. Der Pfeil zeigt exemplarisch auf ein Bakterium.

2.2.5.5 Auswertung des Einflusses von Bakterien auf die Adhäsion und Internalisierung von *Chlamydia trachomatis* Serovar D

Nach 36 Stunden werden die Platten der ersten Passage (s. Abb. 2.3) ausgewertet. Dazu werden die chlamydialen Einschlüsse mit Hilfe des IFT gefärbt und anschließend unter einem inversen Mikroskop ausgezählt.

Durchführung:

Nach Ablauf von 36 Stunden werden die Platten mit Medium (DMEM) gewaschen, um störende extrazelluläre Bakterien zu beseitigen. Mit dem Lichtmikroskop wird, um falsche positive Ergebnisse aufgrund eines Zelluntergangs auszuschließen, kontrolliert, ob der Monolayer erhalten ist. Anschließend werden die Proben mit Methanol fixiert und gefärbt (zur IFT-Färbung s. 2.2.4). Nach der Färbung werden die Platten unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Die chlamydialen Einschlüsse pro Gesichtsfeld werden ausgezählt. Bei einer Infektionsdosis von 0,1 µl werden 70, bei 0,5 µl 50, bei 2,5 µl 25 Gesichtsfelder durchgemustert. Die Volumenangabe bezieht sich auf die Stocklösung (s. 2.2.5.3). Die beiden niedrig infizierten Ansätze werden mit dem 20er-Objektiv gezählt, der höher infizierte mit dem 40er-Objektiv.

2.2.5.6 Auswertung des Einflusses von Bakterien auf das intrazelluläre Wachstum von *Chlamydia trachomatis* Serovar D

Um zu prüfen, ob in den chlamydialen Einschlüssen, die sich unter dem Einfluss der oben genannten Bakterien entwickeln, auch infektiöse EBs enthalten sind, werden die chlamydialen Einschlüsse 48 Stunden nach der Koinfektion aufgeschlossen. Die gewonnenen EBs werden benutzt, um neue sterile Zellen zu infizieren [46]. Nach weiteren 36 Stunden Inkubation werden die Platten wieder mit Hilfe des IFT-Tests (s. 2.2.4) ausgewertet.

Durchführung:

Die Zellen werden koinfiziert, wie oben beschrieben. Es werden die gleichen Mengen der vier Bakterienstämme benutzt wie bei der ersten Passage (s. 2.2.5.2).

Von *C. trachomatis* Serovar D werden 2,5 µl der Stocklösung (entspricht einer MOI von 0,1) hinzugegeben. 24 Stunden nach der Zugabe der Chlamydien werden 24-Lochplatten angesetzt (s. 2.2.1.2). Die Zelldichte ist so zu wählen, dass sich nach weiteren 24 Stunden ein Monolayer gebildet hat.

Die Zellrasen der Platten, die zur Wiederanzüchtung benutzt werden sollen, werden nach 48 Stunden Bebrütung lichtmikroskopisch auf Kontinuität überprüft. Das Medium wird nach einem Waschgang (DMEM) durch frisches Medium (2ml) ersetzt. Damit wird sichergestellt, dass alle Näpfe das gleiche Volumen enthalten. Der Zellrasen wird mit Hilfe einer Zellspachtel (TPP) abgehoben und im Medium verteilt. Mit Hilfe der 1.000-µl-Pipette wird die Plattenoberfläche nochmals abgekratzt und mit dem enthaltenen Medium gespült. Nach dieser Prozedur wird die Suspension in ein Plastikröhrchen (Sarstedt) überführt, das Glaskügelchen (Assistent) enthält. Die Röhrchen werden mit dem Gerät Vibrax VXR basic (IKA) bei 1.500 Schwingungen pro Minute zweieinhalb Minuten lang geschüttelt. Nach einer Ruhephase von eineinhalb Minuten wird die Prozedur wiederholt. Es ist darauf zu achten, dass es nicht zur Schaumbildung kommt. Die Kügelchen zerschlagen die Zellen und setzen die Chlamydien frei.

Mit der Suspension werden die vor 24 Stunden angelegten 24-Loch-Platten infiziert. Benutzt wird dabei eine 2,5-Verdünnungsreihe (1,5; 0,6; 0,24 µl). Die neuinfizierten Platten werden nach 36 Stunden, wie unter 2.2.5.5 beschrieben, ausgewertet. Bei der Konzentration von 1,5 µl werden 20, bei 0,6 µl 30 und bei 0,24 µl 40 Gesichtsfelder ausgezählt.

2.2.5.7 Statistische Auswertung

Für die erste Passage werden die chlamydialen Einschlüsse pro Quadratmillimeter mit Hilfe der Fläche eines Gesichtsfeldes berechnet. In der zweiten Passage wird die Zahl der chlamydialen Einschlüsse im Gesamtvolumen von 2 ml hochgerechnet. Die statistische Auswertung basiert auf dem Programm InStat (GraphPad). Berechnet werden der Mittelwert und der Standardfehler der einzelnen Proben. Zusätzlich wird untersucht, ob die einzelnen Proben sich signifikant von der Negativkontrolle unterscheiden. Hierfür wird der t-Test für unverbundene Stichproben benutzt. Die Berechnungen basieren auf fünf unabhängigen Versuchsreihen.

2.2.6 Folgeversuche

Bei der Auswertung der Platten kam es zu erstaunlichen Ergebnissen, die im Folgenden noch genauer untersucht werden sollen.

2.2.6.1 Einfluss von *Lactobacillus sp.* auf *Chlamydia trachomatis* Serovar **B**

Nachdem ein positiver Einfluss von Laktobazillen auf das Wachstum von *C. trachomatis* Serovar *D* nachgewiesen war, stellte sich die Frage, ob dies eine Erklärung der Standortspezifität verschiedener *C. trachomatis* Serovare sein könnte.

Durchführung:

Die Versuchsanordnung ist die gleiche, wie in 2.2.5 ff. beschrieben. Für die 36-Stunden-Platten werden 40 µl und 100 µl (entspricht einer MOI von $4,5 \times 10^{-3}$ und $MOI = 18 \times 10^{-3}$) einer wieder auf 1:50 verdünnten Stocklösung von *C. trachomatis* Serovar *B* benutzt. Für die Wiederanzüchtungsversuche wird die erste Zellpassage mit 100 µl der Grundkonzentration von *C. trachomatis* Serovar *B* infiziert. Zu den sterilen Zellen für die zweite Passage werden von der ersten Zellreihe, nachdem diese, wie oben beschrieben, wieder aufgespalten ist, folgende Volumina pipettiert: 24 µl, 9,6 µl, 3,8 µl.

Die Auswertung folgt, wie oben beschrieben, nach 36 Stunden.

2.2.6.2 Morphologische Darstellung der chlamydialen Einschlüsse unter dem Einfluss von *Mycoplasma hominis*

Bei Versuchen, die sich mit der Koinfektion von *C. trachomatis* *D* mit *M. hominis* beschäftigten, zeigte sich bei der ersten Passage ein morphologischer Unterschied zu der Negativkontrolle. Dieser wird lichtmikroskopisch nochmals dargestellt.

Durchführung:

Die lichtmikroskopische Darstellung folgt der Beschreibung im Abschnitt 2.2.4.

2.2.6.3 Einfluss von konzentrierten Aminosäuren auf die Koinfektion von *Chlamydia trachomatis* Serovar D und *Mycoplasma hominis*

Nachdem bewiesen ist, dass *M. hominis* das Wachstum von *C. trachomatis* Serovar D hemmt, wird eine weitere Versuchsfolge angeschlossen, um diesen Einfluss zu erklären. Eine mögliche Ursache könnte die Konkurrenz um Nährstoffe sein. Deshalb werden dem Medium in einem neuen Ansatz hundertfach konzentrierte, nichtessentielle Aminosäuren (PAA) hinzugefügt. In einen Vorversuch wurde der Konzentrationsgrad der Aminosäuren getestet: um einen Einfluss nachzuweisen, sollte die Konzentration hoch sein. Eine zu hohe Konzentration allerdings hemmt das Wachstum der Chlamydien.

Durchführung:

Vor der Zugabe von *M. hominis* werden 200 µl Aminosäurenkonzentrat in die Näpfe von zwei 6-Lochplatten, die bereits 2 ml Medium enthalten, pipettiert. Die negative Kontrolle erhält die gleiche Menge an Aminosäuren. Das weitere Procedere folgt der Beschreibung unter 2.2.5 ff.

3. Ergebnisse

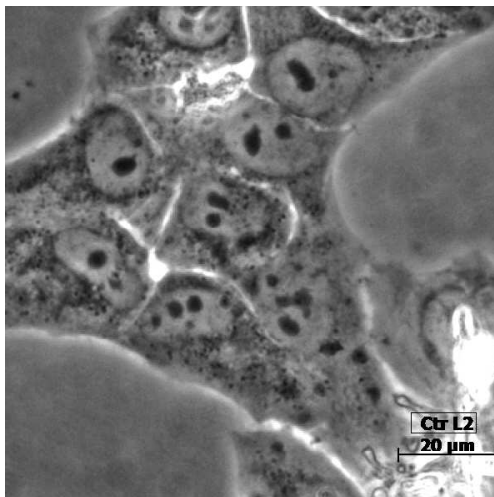
3.1 Kinematografische Darstellung von Chlamydien

Ziel des ersten Abschnitts dieser Arbeit ist die Entwicklung einer kinematografischen Methode zur Herstellung von Filmen, die den Entwicklungszyklus verschiedener *C. trachomatis* Serovare dokumentieren. *C. trachomatis* Serovar L2 dient als Referenzstamm, die anderen *C. trachomatis* Serovare werden mit Serovar L2 verglichen.

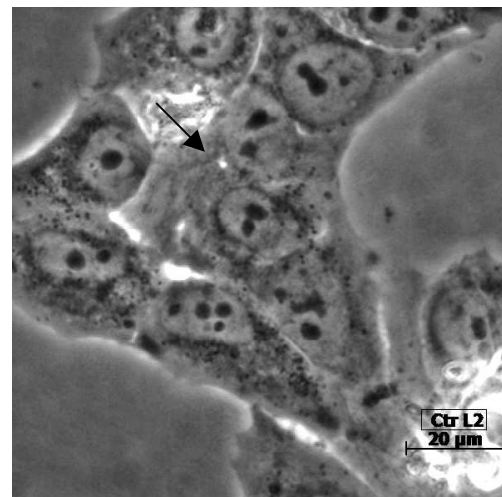
3.1.1 Entwicklungszyklus von *Chlamydia trachomatis* Serovar L2

Abbildung 3.1 zeigt ausgewählte Fotografien zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Entwicklungszyklus von *C. trachomatis* Serovar L2. Neun Stunden post infectionem ist noch kein Einschluss in der Zelle zu erkennen (A), 13 Stunden nach Infektion ist ein Einschluss in Zellkernnähe zu sehen (B). Die Abbildungen C bis E stellen das Wachstum des Einschlusses dar, der den Zellkern am Ende verdrängt. Die Ruption der Zelle und das Freisetzen der Elementarkörperchen folgen in der dargestellten Zeitreihe nach 80 Stunden (F).

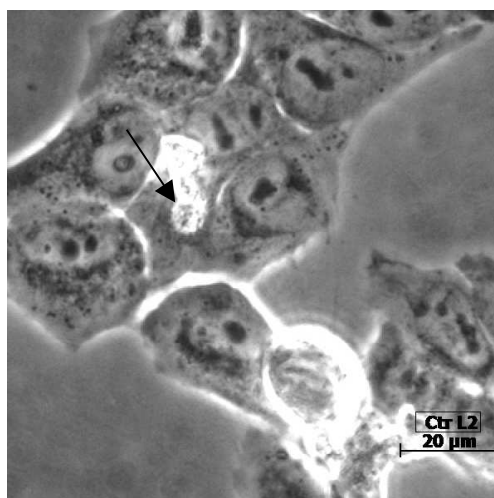
Die dieser Arbeit beigelegte CD enthält den Entwicklungszyklus von *C. trachomatis* L2 als Film (EntwicklungszyklusCtrL2.mov). Er kann mit dem Programm-Tool „Apple Quick Time Player“, das entgeltfrei im Internet erhältlich ist (<http://www.apple.com/quicktime/download/>), betrachtet werden. Die Einschlüsse sind in den Filmen mit Pfeilen markiert, die Zellkerne mit Sternen.



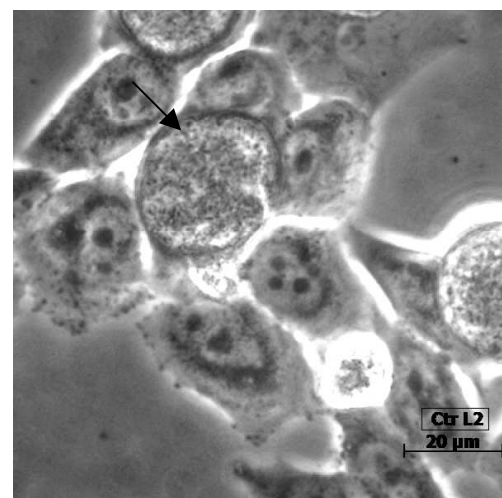
A: 9 Std. p.i.



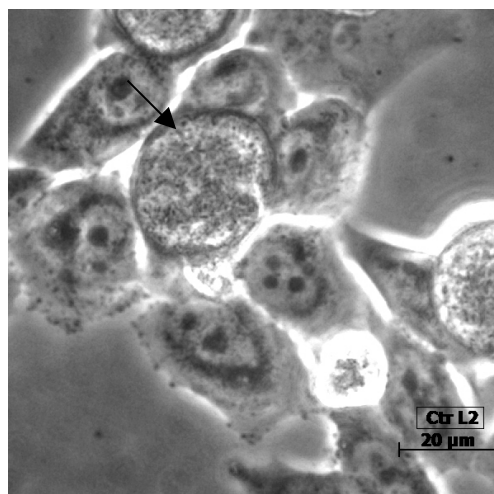
B: 13 Std. p.i.



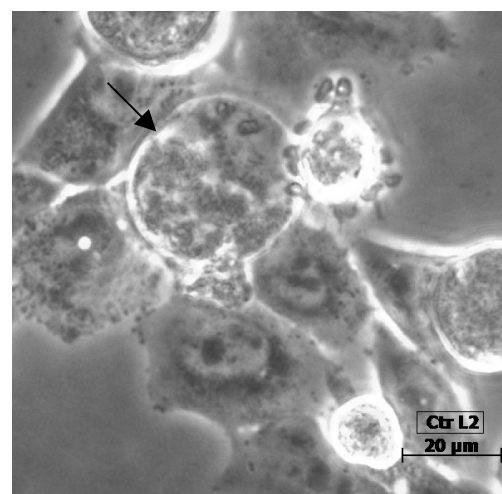
C: 20 Std. p.i.



D: 40 Std. p.i.



E: 60 Std. p.i.

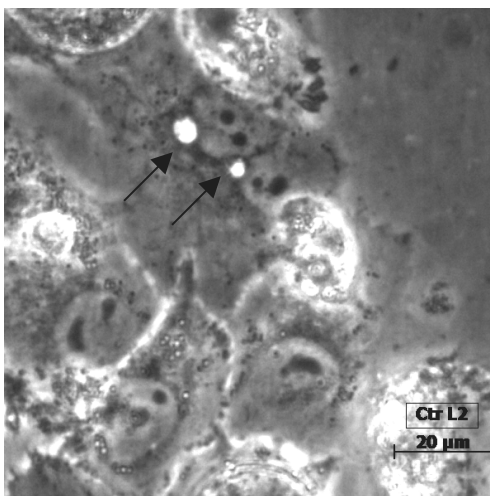


F: 80 Std. p.i.

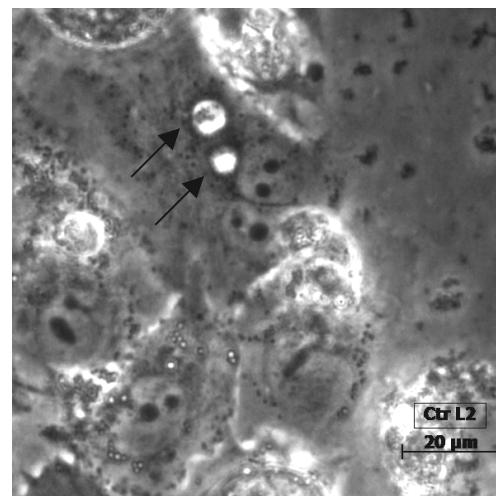
Abb. 3.1: Entwicklungszyklus *C. trachomatis* Serovar L2. Die Abbildungen A bis F zeigen eine lichtmikroskopische Darstellung des Entwicklungszyklus von *C. trachomatis* Serovar L2 vom ersten Erkennen des Einschlusses (A) bis zur Zelllyse (F). Die Dauer des Zyklus beträgt 80 Stunden. Die Einschlüsse sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die Fusion von Einschlüssen ist für *C. trachomatis* beschrieben [16, 42]. Wir konnten sie erstmals in mehreren Zeitreihen digital und in Echtzeit dokumentieren.

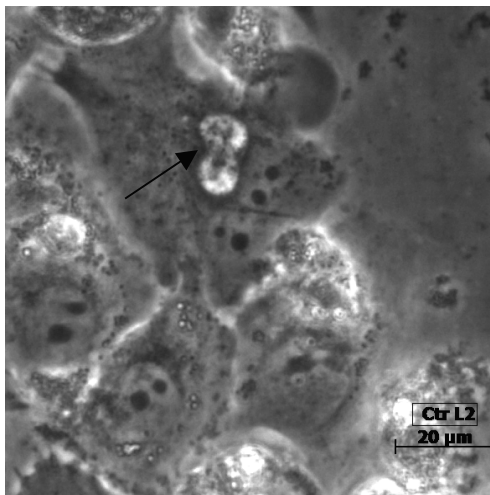
Abbildung 3.2 verdeutlicht in einer Bildreihe die Verschmelzung der Einschlüsse. In den Bildern A und B sind noch zwei Einschlüsse zu sehen, Bild C zeigt die Fusion, in Bild D ist nur noch ein Einschluss zu erkennen. Nach dem ersten lichtmikroskopischen Erkennen der Einschlüsse dauerte es 15 Stunden, bis die beiden Einschlüsse vollständig fusionierten. Auf der dieser Arbeit beigelegten CD ist die Fusion in Form eines Films („Fusion.mov“) dokumentiert.



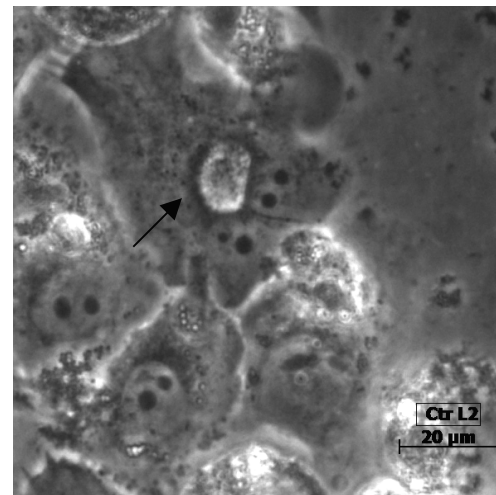
A: 20 Std. p.i.



B: 24 Std. p.i.



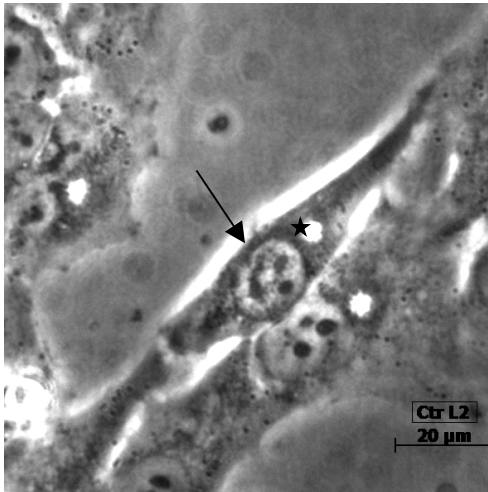
C: 29 Std. p.i.



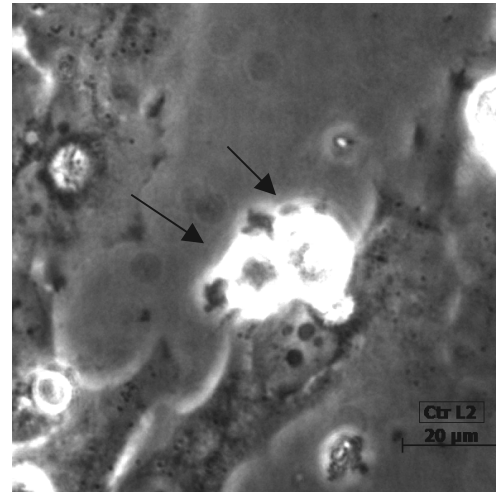
D: 29 Std. 36 min p.i.

Abb. 3.2: Fusion zweier Einschlüsse (Pfeile) von *C. trachomatis* Serovar L2. In Bild A und B sind noch zwei Einschlüsse zu erkennen, in Bild C fusionieren die beiden Einschlüsse, in Bild D ist nur noch ein Einschluss zu sehen.

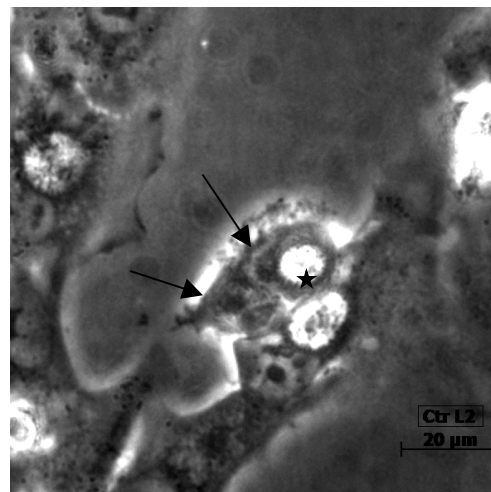
Auch Mitosen infizierter Zellen konnten dargestellt werden. Die Zugabe von Cycloheximid zum Medium kann die Mitose nicht gänzlich unterbinden. Abbildung 3.3 zeigt die Teilung einer mit *C. trachomatis* Serovar L2 infizierten HeLa-Zelle, wobei der chlamydiale Einschluss nach der Mitose in einer Tochterzelle verbleibt. Der Zeitraum der dargestellten Mitose betrug zweieinhalb Stunden. Die Datei „Mitose_mit_Infektion.mov“ stellt dieses Phänomen in Form eines Films dar.



A: 16 Std. p.i.



B: 22 Std. p.i.



C: 22 Std. p.i.

Abb. 3.3: Mitose einer mit *C. trachomatis* Serovar L2 infizierten HeLa-Zelle. Die sich teilende Zelle und die Tochterzellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Der Stern zeigt den chlamydialen Einschluss. In Bild B sind zwei Zellen zu sehen. Der Einschluss ist hier nicht zu erkennen, da die Zellen sich bei der Zellteilung aus der Ebene nach oben verschieben und damit unscharf werden. In Bild C ist die Zellteilung vollendet und der Einschluss wieder erkennbar.

3.1.2 Zeitlicher Vergleich zwischen *Chlamydia trachomatis* Serovar L2 und Serovar A, B, D und I

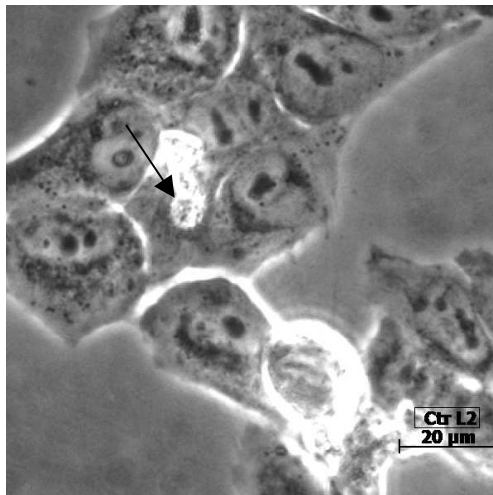
Während bei *C. trachomatis* Serovar L2 nach etwa zwölf Stunden unter dem Lichtmikroskop die ersten Einschlüsse zu erkennen sind, können zu diesem Zeitpunkt bei den anderen Serovaren noch keine Einschlüsse nachgewiesen werden. Bei *C. trachomatis* Serovar D treten die ersten Einschlüsse nach 13 Stunden auf, bei *C. trachomatis* Serovar A und I nach etwa 20, bei *C. trachomatis* Serovar B erst nach 22 Stunden.

Die Abbildungen 3.4 bis 3.6 zeigen ausgewählte Fotografien von *C. trachomatis* Serovar L2, A, B, D und I 20, 40 und 60 Stunden nach Infektion.

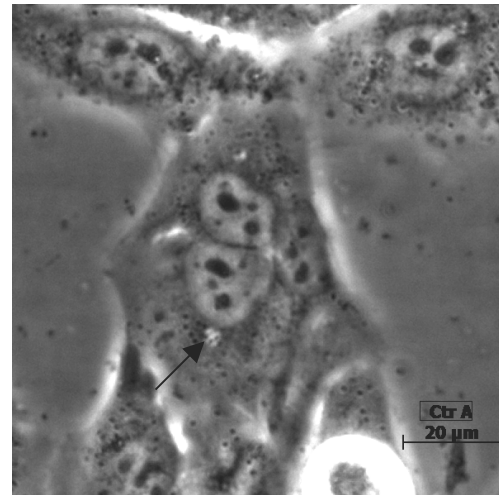
In Abbildung 3.4 sind nach 20 Stunden bei *C. trachomatis* Serovar L2 und D die Einschlüsse bereits gut zu sehen, die Einschlüsse von *C. trachomatis* Serovar A und I sind zu erahnen, bei *C. trachomatis* Serovar B sind noch keine Einschlüsse zu erkennen.

Obwohl die Einschlüsse von *C. trachomatis* Serovar B erst spät zu erkennen sind, weisen sie in den nächsten Stunden ein deutliches Wachstum auf und erreichen nach 40 Stunden (Abb. 3.5) fast die Größe der Einschlüsse von *C. trachomatis* Serovar D und I. Die Einschlüsse von *C. trachomatis* Serovar A hingegen wachsen sehr langsam und nehmen nur wenig an Volumen zu. Neben den schnell wachsenden Einschlüssen von *C. trachomatis* Serovar B sind von diesem Stamm auch einige Einschlüsse zu erkennen, deren Volumen gleichbleibt und die sich ähnlich wie die Einschlüsse von *C. trachomatis* Serovar A verhalten. *C. trachomatis* Serovar L2 weist zu diesem Zeitpunkt die größten Einschlüsse aller untersuchten Stämme auf.

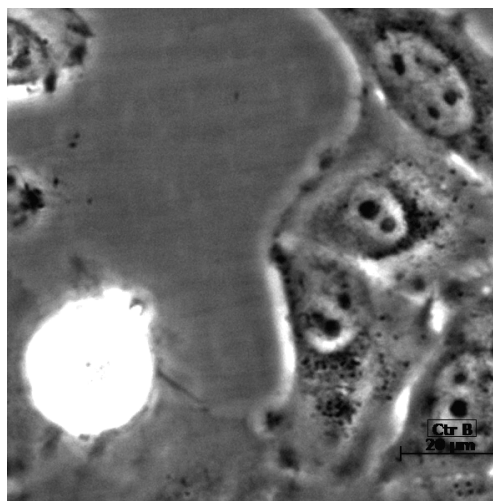
Nach 60 Stunden (Abb. 3.6) haben die Einschlüsse von Serovar L2 fast die Größe der infizierten Zelle erreicht. Der Zellkern ist teilweise nicht mehr zu erkennen. Die anderen Stämme erreichen diese Größe nicht. Die Einschlüsse von *C. trachomatis* Serovar A haben nur mäßig an Volumen zugenommen. Bei *C. trachomatis* Serovar B und D sind die ersten Einschlüsse bereits ruptiert.



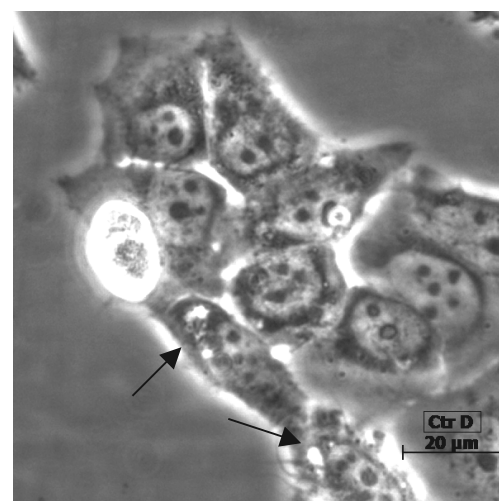
A: Ctr L2



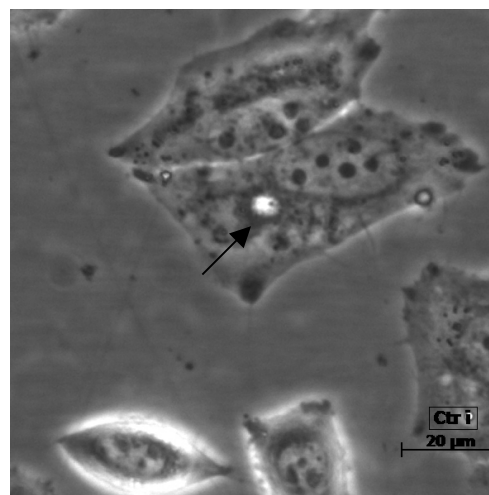
B: Ctr A



C: Ctr B

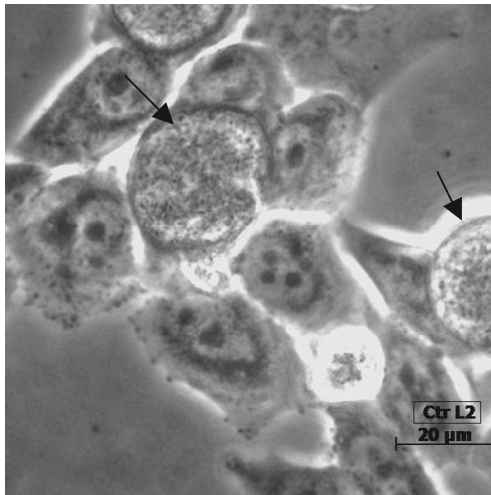


D: Ctr D

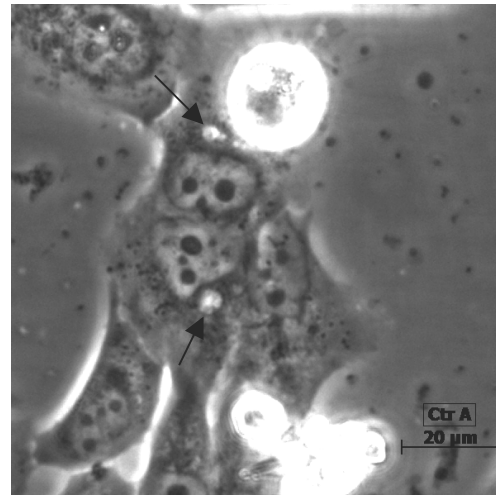


E: Ctr I

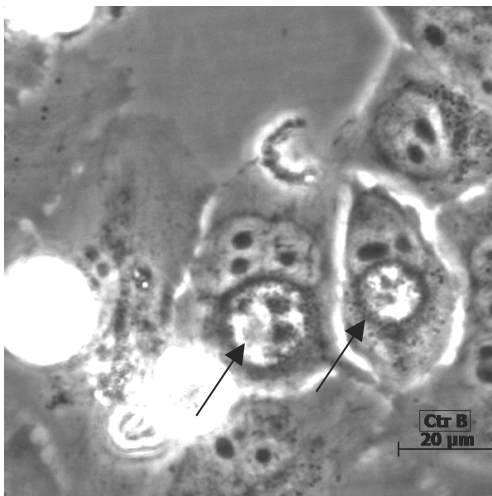
Abb. 3.4: 20 Stunden post infectionem: Vergleich zwischen *C. trachomatis* Serovar L2 (A) und *C. trachomatis* Serovar A (B), B (C), D (D) und I (E). Die chlamydialen Einschlüsse sind mit Pfeilen markiert. Bei *C. trachomatis* B sind noch keine Einschlüsse zu erkennen.



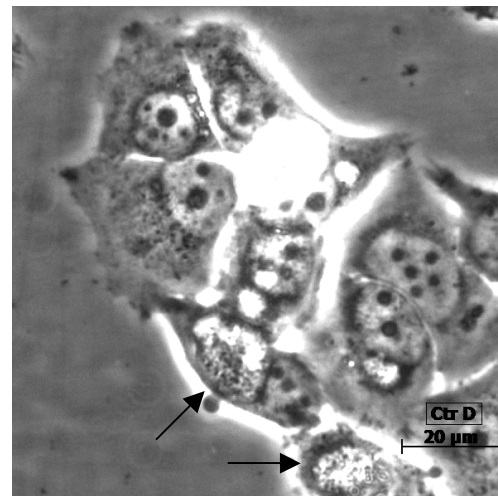
A: Ctr L2



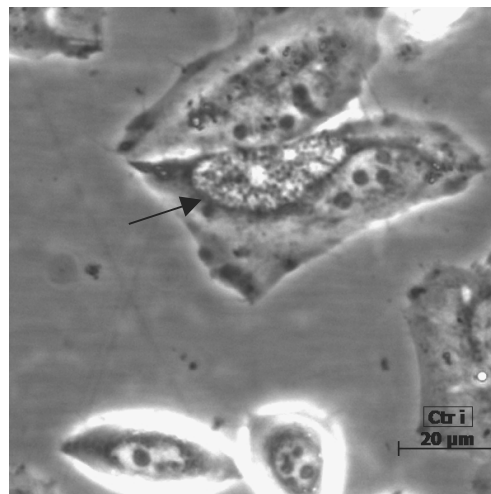
B: Ctr A



C: Ctr B

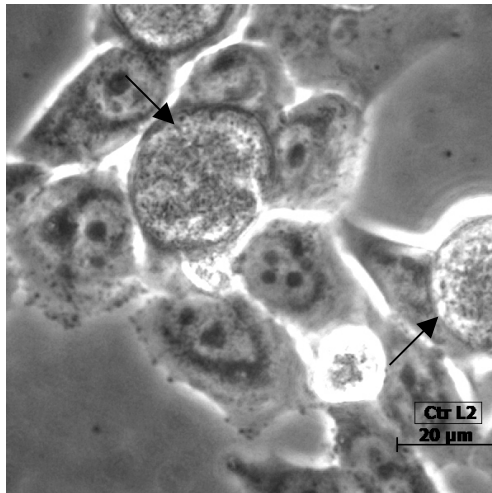


D: Ctr D

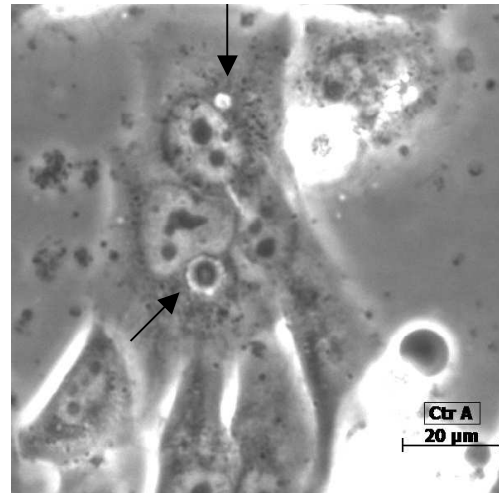


E: Ctr I

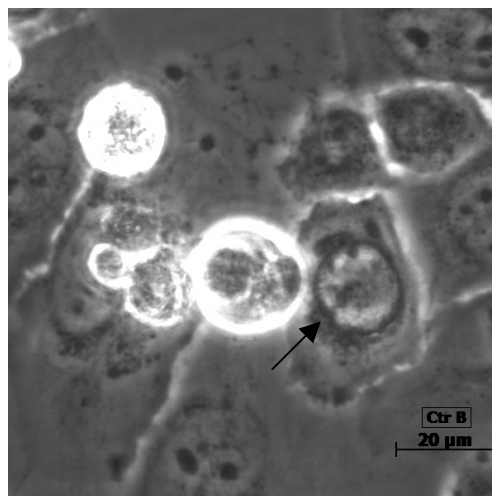
Abb. 3.5: 40 Stunden post infectionem: Vergleich zwischen *C. trachomatis* Serovar L2 (A) und *C. trachomatis* Serovar A (B), B (C), D (D) und I (E). Die chlamydialen Einschlüsse sind mit Pfeilen markiert. Die Einschlüsse von *C. trachomatis* Serovar B haben deutlich an Volumen zugenommen. *C. trachomatis* Serovar A wächst dagegen sehr langsam.



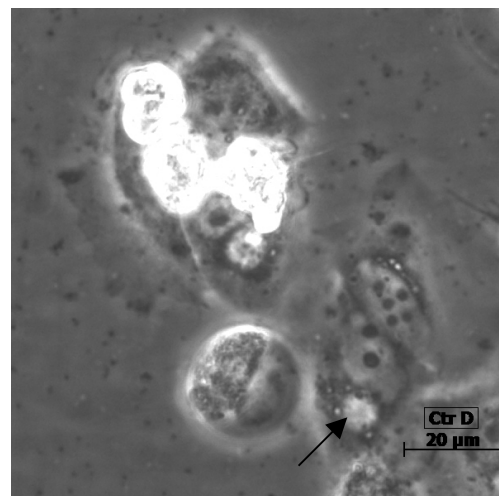
A: Ctr L2



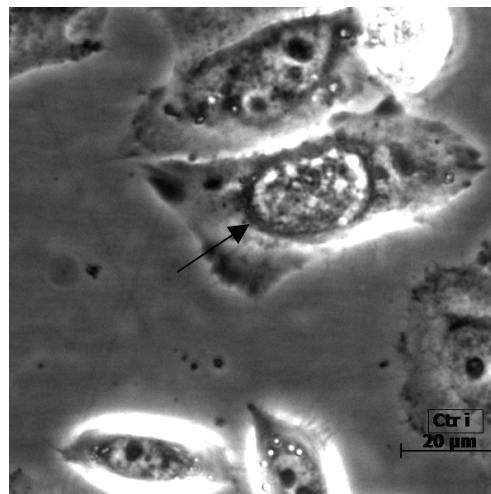
B: Ctr A



C: Ctr B



D: Ctr D



E: Ctr I

Abb. 3.6: 60 Stunden post infectionem: Vergleich von *C. trachomatis* Serovar L2 (A) und *C. trachomatis* Serovar A (B), B (C), D (D) und I (E). Die chlamydialen Einschlüsse sind mit Pfeilen markiert. Bei *C. trachomatis* Serovar D und B sind die ersten Einschlüsse bereits ruptiert.

Bei L2 lysieren die Einschlüsse etwa 63 bis 100 Stunden nach Infektion, die mit *C. trachomatis* A und I infizierten Zellen etwa 62 bis 95 Stunden nach Infektion. Die mit den Stämmen B und D infizierten Zellen gehen bereits früher zugrunde (B nach etwa 54 bis 61 Stunden, D nach etwa 58 bis 70 Stunden).

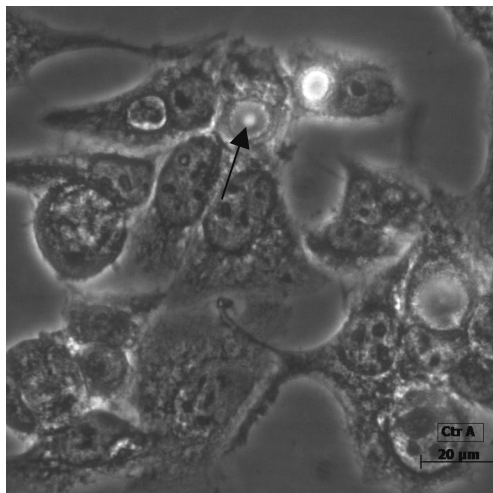
Auf der CD sind die zugehörigen Filme unter Entwicklungszyklus Ctr- A, B, D und I zu finden.

3.1.3 Morphologischer Vergleich zwischen *Chlamydia trachomatis* Serovar L2 und *Chlamydia trachomatis* Serovar A, B, D und I

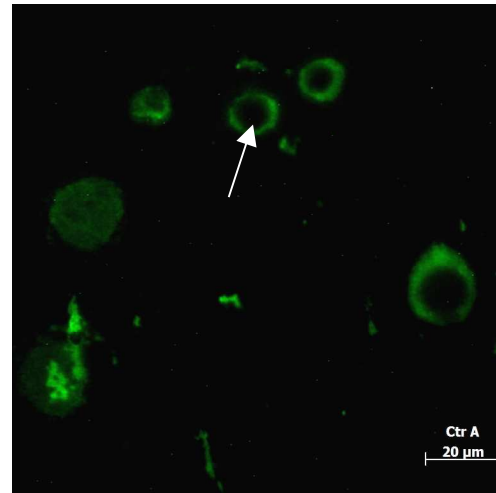
Serovar A:

Am auffälligsten ist der Unterschied zwischen *C. trachomatis* Serovar L2 und *C. trachomatis* Serovar A. Während *C. trachomatis* Serovar L2 kontinuierlich wächst, bis der Einschluss die ganze Zelle einnimmt, zeigt *C. trachomatis* Serovar A eine langsame Wachstumsprogredienz. Der Einschluss erscheint die meiste Zeit kontrastreich. Bevor die Zelle zugrunde geht, ohne dass der Einschluss sie annähernd ausfüllt, ändert der Einschluss seine Morphologie und zeigt ein schießscheibenähnliches Bild. Diese Morphologie ist in der Literatur nicht beschrieben. In Anlehnung an hämatologische Krankheitsbilder, bei denen Erythrozyten bei gestörter Erythropoese (zum Beispiel bei der Thalassämie) ein zielscheibenähnliches Bild („target cells“) zeigen, haben wir die Einschlüsse „Target-Einschlüsse“ genannt.

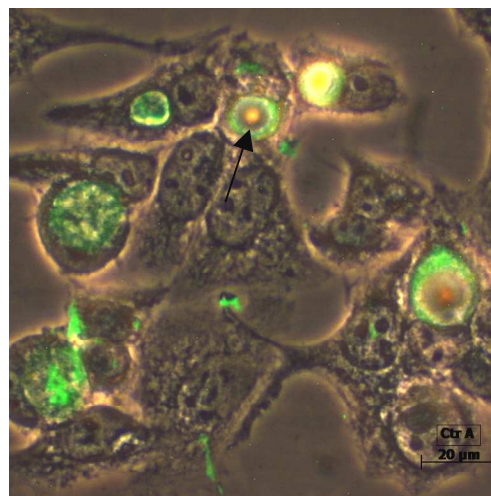
Um zu beweisen, dass es sich bei diesem Phänomen wirklich um chlamydiale Einschlüsse handelt, wird ein indirekter Fluoreszenztest (s. 2.2.4) durchgeführt (Abb. 3.7). Bei den Aufnahmen wird festgestellt, dass neben den oben beschriebenen Einschlüssen auch solche existierten, die den anderen Stämmen gleichen. Bei den kinematografischen Aufzeichnungen werden aber nur die atypischen Einschlüsse festgehalten.



A: Nativbild



B: Fluoreszenzbild



C: Überlagerungsbild

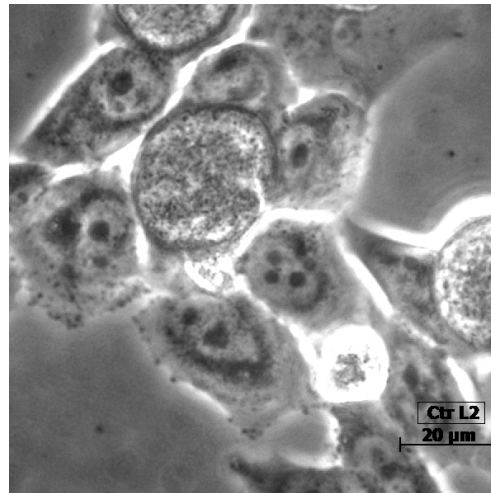
Abb. 3.7: IFT, 65 Stunden nach Infektion mit *C. trachomatis* Serovar A. Es sind sowohl „Target-Einschlüsse“ als auch morphologisch normalkonfigurierte Einschlüsse zu erkennen. Links unten ist ein Einschluss bereits ruptiert. Dies erklärt die verstreut liegenden extrazellulären Chlamydien. Der Pfeil zeigt exemplarisch auf einen Target-Einschluss.

Serovar B:

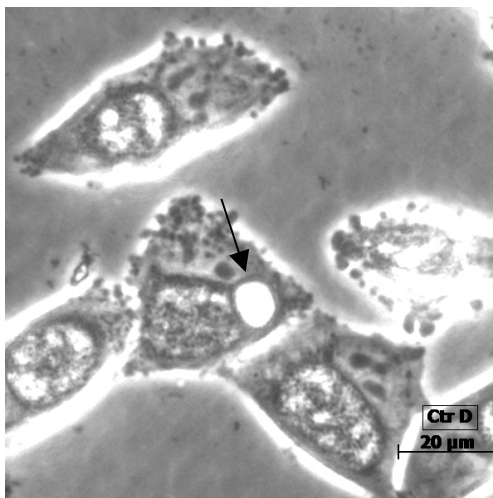
Auch bei *C. trachomatis* B sind Einschlüsse ohne besondere Größenzunahme zu erkennen. Allerdings weisen diese Einschlüsse nicht die Morphologie einer Zielscheibe auf.

Serovar D und I:

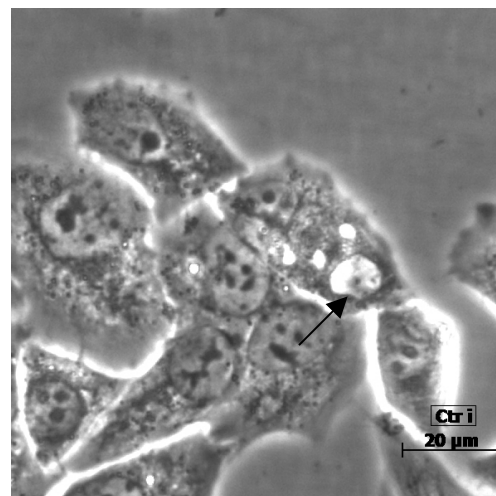
Während die Einschlüsse von *L2* gleichmäßig und feinkörnig erscheinen, sind sie bei den Serovaren *D* und *I* unregelmäßig und teilweise grobkörnig (Abb 3.8).



A: Ctr. L2



B: Ctr D



C: Ctri I

Abb 3.8: Morphologischer Vergleich zwischen *C. trachomatis* Serovar *L2* (A) und *C. trachomatis* Serovar *D* (B) bzw. *C. trachomatis* *I* (C). Bild B zeigt das unregelmäßige Bild von *C. trachomatis* Serovar *D* und *I* mit sehr hellen Raumforderungen im Einschluss (Pfeil).

3.1.4 Fusion zweier Einschlüsse und Zellteilung von infizierten Zellen

Die Fusion von zwei Einschlüssen, wie unter 3.1.1 (Abb. 3.2) beschrieben, kann bei allen untersuchten Stämmen beobachtet werden. Ebenso ist eine Teilung (Abb. 3.3) infizierter Zellen bei allen Stämmen möglich. Bei Zellteilungen mit sehr großen Einschlüssen kommt es teilweise zum Zelluntergang.

3.1.5 Überblick I

In der Tabelle 3.1 werden die Ergebnisse der kinematographischen Ergebnisse zusammengefasst.

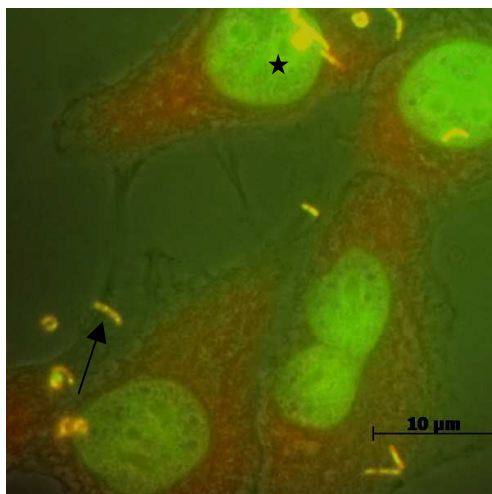
Serovar	Einschluss zum ersten Mal sichtbar	Fusion	Zeit bis zur Zell-lyse	Lyseverhalten	Besonderheiten
L2	ca. 12 Std. p.i..	möglich	ca. 63 bis 100 Std. p.i	maximales Ausfüllen der Zelle bis zur Lyse	feinkörnig, regelmäßig
A	ca. 18 Std. p.i.	möglich	ca. 62 bis 90 Std. p.i.	vorzeitiger Untergang der Zelle	kontrastreiche, kleine Einschlüsse („Target“-Einschlüsse)
B	ca. 22 Std. p.i.	möglich	ca. 54 bis 61 Std. p.i.	vorzeitiger Untergang der Zelle	kontrastreiche, kleine Einschlüsse
D	ca. 13 Std. p.i.	möglich	ca. 58 bis 70 Std. p.i.	vorzeitiger Untergang der Zelle	grobkörnig, unregelmäßig
I	ca. 20 Std. p.i.	möglich	ca. 62 bis 95 Std. p.i.	vorzeitiger Untergang der Zelle	grobkörnig, unregelmäßig

Tab. 3.1: Vergleich zwischen *C. trachomatis* Serovaren auf der Grundlage kinematografischer Beobachtung des Entwicklungszyklus

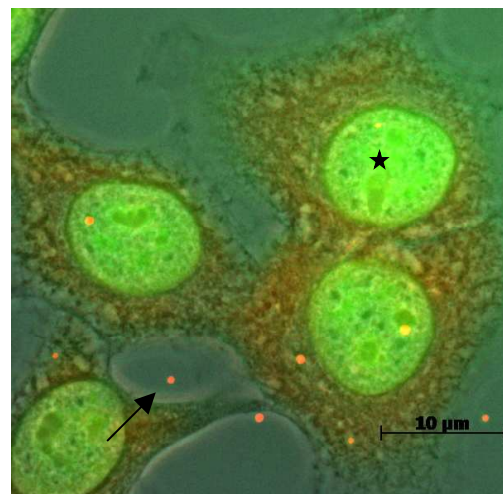
3.2 Einfluss von Bakterien auf *Chlamydia trachomatis*

In vivo findet der Entwicklungszyklus von *C. trachomatis* in Gegenwart der physiologischen oder pathogenen Standardflora statt. Ihr Einfluss wurde in einem In-vitro-Modell des unteren weiblichen Genitaltrakts studiert. Dazu wurde *C. trachomatis* Serovar D mit Laktobazillen, Mykoplasmen, Gonokokken und Gardnerellen koinfiziert (s. 2.2.5 ff).

Um in den verschiedenen Messreihen eine möglichst gleiche Anzahl von Bakterien zu gewährleisten, werden die zur Beimpfung benutzten Bakteriensuspensionen mit einem Densitometer nach McFarland auf die gleiche Trübung (0,5) eingestellt. Zusätzlich wird die Bakterienlast zum Zeitpunkt der Koinfektion durch mikroskopische Auswertung kontrolliert (Abb. 3.9). Die Quantifizierung kann aus der Abb. 3.10 entnommen werden.



A: *Lactobacillus* sp.



B: *N. gonorrhoeae*

Abb. 3.9: Bild A zeigt beispielhaft die zur mikroskopischen Kontrolle benutzte Acridin-Orangefärbung von *Lactobacillus* sp., Bild B von *N. gonorrhoeae*. Die Sterne markieren Zellkerne, die Pfeile markieren Bakterien.

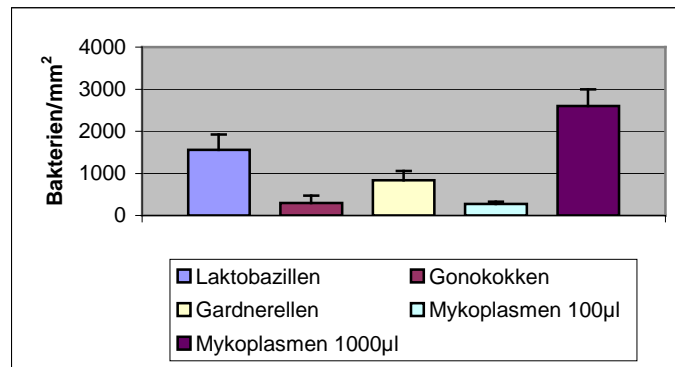


Abb. 3.10: Anzahl der Bakterien pro Quadratmillimeter zum Zeitpunkt der Koinfektion

3.2.1 Einfluss von Bakterien auf *Chlamydia trachomatis* Serovar D

In einer ersten Reihe von Experimenten wird der Einfluss der Bakterien auf Adhäsion und Aufnahme der Chlamydien untersucht. Da nicht auszuschließen ist, dass auch die Anzahl der Chlamydien Einfluss auf das System hat, werden Versuchsreihen mit unterschiedlicher Konzentration von *Chlamydia trachomatis* Serovar D durchgeführt. Jede Koinfektion wird mit einer Negativkontrolle verglichen, welche nur Chlamydien und HeLa-Zellen enthält. Für die statistische Auswertung (s. 2.2.5.7) werden fünf Versuchsreihen verglichen.

Nach 32 Stunden zeigt sich in der Negativkontrolle und in den Koinfektionen die gleiche Anzahl von Chlamydieneinschlüssen. Auch die Konzentration der Chlamydien bleibt ohne Einfluss auf das System. In den Abbildungen 3.11, 3.12 und 3.13 sind die Ergebnisse in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Das Diagramm 3.11 zeigt die Ergebnisse für die Chlamydienkonzentration 4×10^{-3} MOI, 3.12 mit einer MOI von 0,02 und 3.13 mit 0,1 MOI.

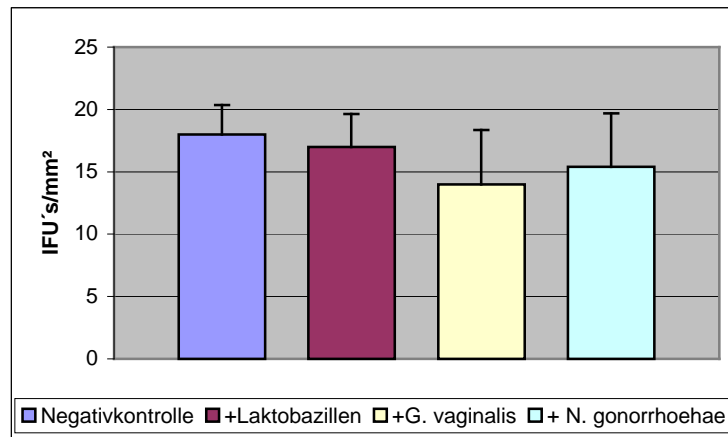


Abb. 3.11: Die Abbildung zeigt die IFUs pro Quadratmillimeter Monolayer HeLa-Zellen nach 36 Stunden. *C. trachomatis* Serovar *D* Inokulum 0,1 μ l der Stocklösung, entspricht einer MOI von 4×10^{-3} . Die linke Säule ist die Negativkontrolle (nur Chlamydien und HeLa-Zellen). Die rechten drei Säulen zeigen die Anzahl der IFUs der Koinfektionen (Chlamydien, HeLa-Zellen und die oben genannten Bakterien). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Negativkontrolle und den IFUs der Koinfektionen.

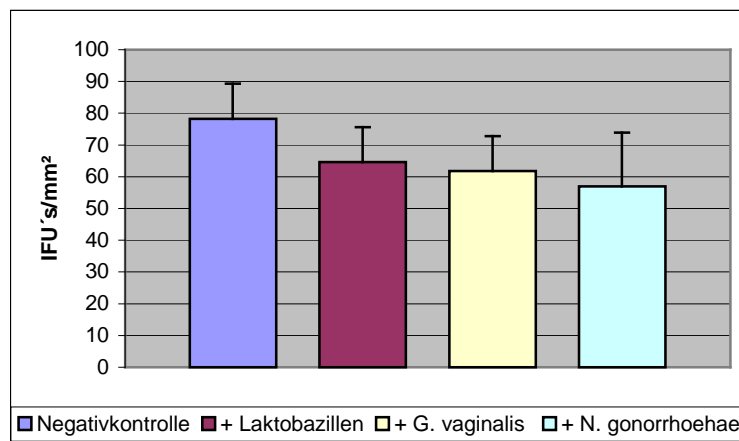


Abb. 3.12: Die Abb. zeigt die IFUs pro Quadratmillimeter Monolayer HeLa-Zellen nach 36 Stunden. *C. trachomatis* Serovar *D* Inokulum 0,5 μ l der Stocklösung, entspricht einer MOI von 0,02. Die linke Säule ist die Negativkontrolle (nur Chlamydien und HeLa-Zellen). Die rechten drei Säulen zeigen die Anzahl der IFUs der Koinfektionen (Chlamydien, HeLa-Zellen und die oben genannten Bakterien). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Negativkontrolle und den IFUs der Koinfektionen.

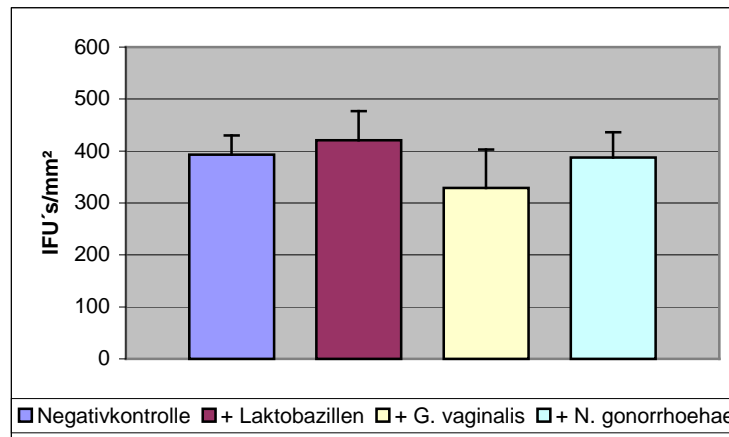
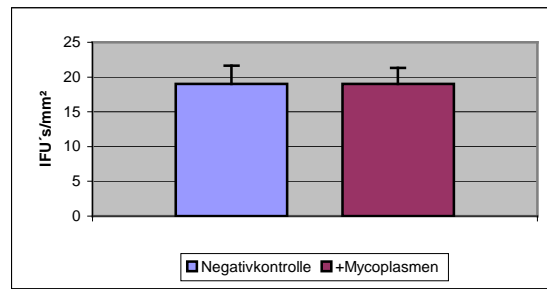


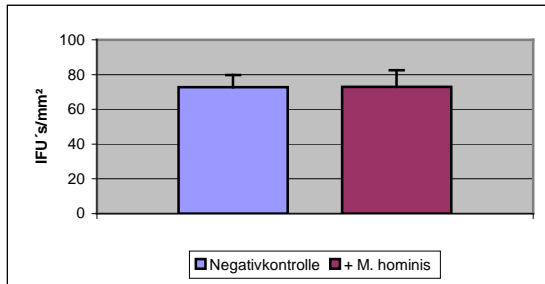
Abb. 3.13: Die Abb. zeigt die IFUs pro Quadratmillimeter Monolayer HeLa-Zellen nach 36 Stunden. *C. trachomatis* Serovar *D* Inokulum 2,5 µl der Stocklösung, entspricht einer MOI von 0,1. Die linke Säule ist die Negativkontrolle (nur Chlamydien und HeLa-Zellen). Die rechten drei Säulen zeigen die Anzahl der IFUs der Koinfektionen (Chlamydien, HeLa-Zellen und die oben genannten Bakterien). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Negativkontrolle und den IFUs der Koinfektionen.

Der gleiche Versuchsaufbau mit Mykoplasmen wird, um eine Kontamination der Zellkulturen zu vermeiden, in anderen Laborräumen vorgenommen. Es werden Versuchsreihen mit 1.000 µl und mit 100 µl Mykoplasmenbouillon angesetzt.

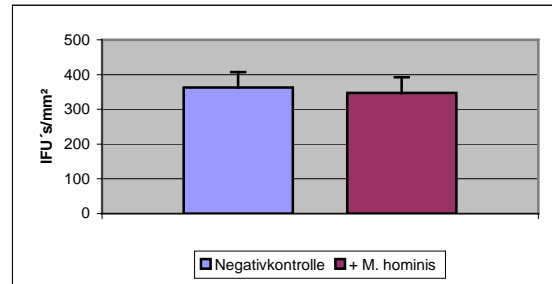
In der ersten Passage, den Versuchsreihen, welche die Adhäsion und Internalisierung der Chlamydien untersuchten, ergab sich kein Unterschied in der Anzahl der Einschlüsse. Abbildung. 3.14 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Versuche mit einer Mykoplasmenkonzentration von 1.000 µl.



A



B



C

Abb. 3.14: Die Abbildung zeigt die IFUs pro Quadratmillimeter Monolayer nach 36 Stunden, **A:** *C. trachomatis* Serovar D Inokulum 0,1 µl Stocklösung, entspricht einer MOI von 4×10^{-4} . **B:** *C. trachomatis* Inokulum 0,5 µl der Stocklösung (MOI=0,02). **C:** *C. trachomatis* Inokulum 2,5 µl (MOI 0,1). Es wurden 1.000 µl Mykoplasmenbouillon dazugegeben. Die linke Säule ist die Negativkontrolle (Chlamydien und HeLa-Zellen), die rechte Säule zeigt die Anzahl der IFUs unter dem Einfluss von *M. hominis*. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Negativkontrolle und den IFUs der Koinfektionen.

Unter dem Lichtmikroskop ist jedoch zu sehen, dass die chlamydialen Einschlüsse unter dem Einfluss von Mykoplasmen deutlich kleiner sind als in der Negativkontrolle (Abb. 3.15).

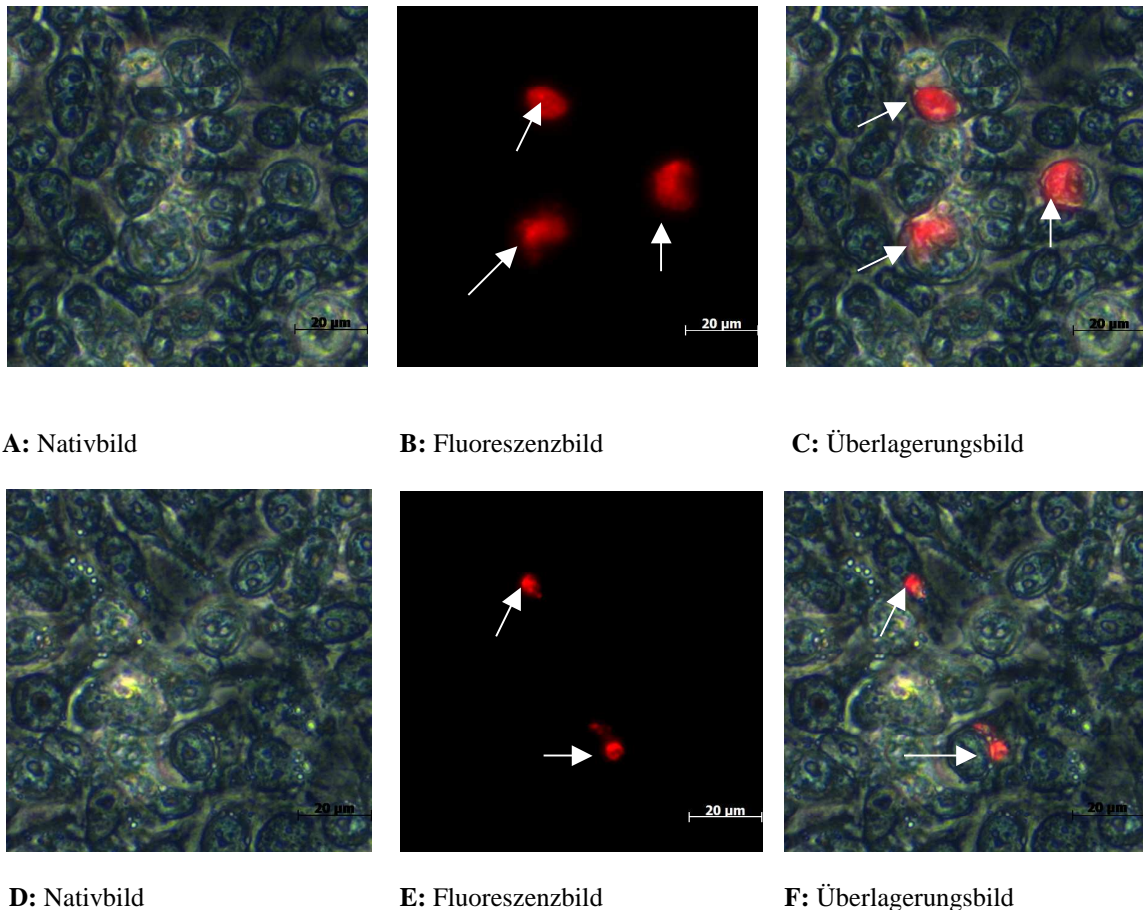


Abb. 3.15: Die Bilder zeigen den Größenvergleich der chlamydialen Einschlüsse der Negativkontrolle (A,B,C) und der Koinfektion mit Mykoplasmen (D,E,F) nach 36 Stunden. Die Bilder A und D zeigen das Nativbild, B und E die Fluoreszenzaufnahme, C und F das Overlaybild. Die chlamydialen Einschlüsse sind mit Pfeilen markiert.

Die Ergebnisse legen einen Einfluss der Mykoplasmen auf das Wachstum der Einschlüsse und die Rekondensierung zu infektiösen EBs nahe. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurden Chlamydien nach Koinfektion wieder angezüchtet (s. 2.2.5.6).

Auch wenn sich bei der Primärinfektion unter dem Einfluss von *Lactobacillus sp* keine Größenunterschiede feststellen lassen, können fast die doppelte Anzahl von Chlamydieneinschlüssen gewonnen ($p=0,018$) werden.

Bei Koinfektionen mit *G. vaginalis* und *N. gonorrhoeae* ergibt sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,5489$ und $0,9761$), doch lässt sich bei der Koinfektion mit *G. vaginalis* ein Trend zu weniger Einschlüssen erkennen. Abbildung 3.16 verbildlicht die Ergebnisse.

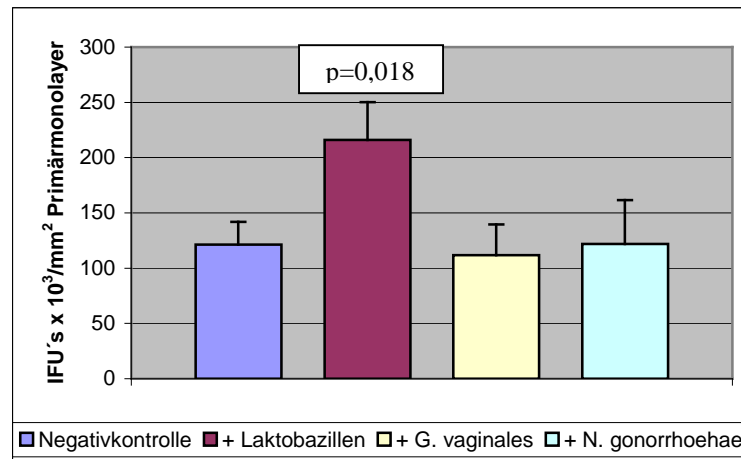


Abb. 3.16: Die Abbildung zeigt das Verhältnis der IFUs nach dem Wiederanzüchten. Die IFUs wurden dabei auf einen Quadratmillimeter der ersten Passage hochgerechnet. Die erste Passage wurde mit einer MOI von 0,1 infiziert. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Negativkontrolle und der Koinfektion mit *Lactobacillus sp.* Die anderen Koinfektionen unterscheiden sich nicht signifikant von der Negativkontrolle.

Wie zu vermuten war die Zahl der Einschlüsse bei der Koinfektion mit Mykoplasmen signifikant geringer. Die Anzahl der wiederangezüchteten Einschlüsse war abhängig von der Anzahl der zugegebenen Mykoplasmen. Abbildung 3.17 zeigt die Ergebnisse unter den Einfluss von 100 µl, Abbildung 3.18 unter dem Einfluss von 1.000 µl Mykoplasmenbouillon. Bei der Koinfektion mit 100 µl wurden weniger als die Hälfte der IFUs gezählt ($p=0,009$). Die Zugabe von 1.000 µl bewirkte einen Unterschied von Faktor 20 (0,003).

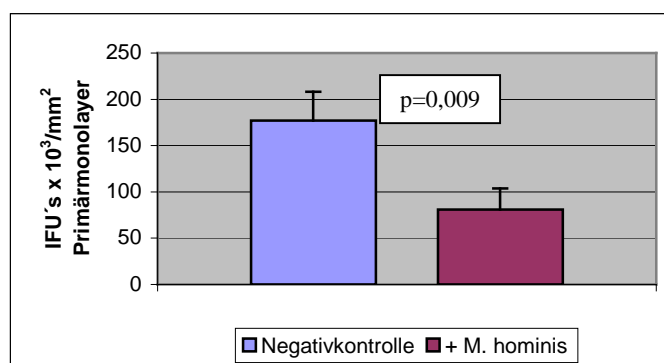


Abb. 3.17: Die Abbildung zeigt das Verhältnis der IFUs nach dem Wiederanzüchten. Die IFUs wurden dabei auf einen Quadratmillimeter der ersten Passage hochgerechnet. Die erste Passage wurde mit einer MOI von 0,1 infiziert. Der Unterschied zwischen der Negativkontrolle und der Koinfektion mit Mykoplasmen ist signifikant ($p=0,009$). Die zugegebene Mykoplasmenbouillon entspricht 100 µl.

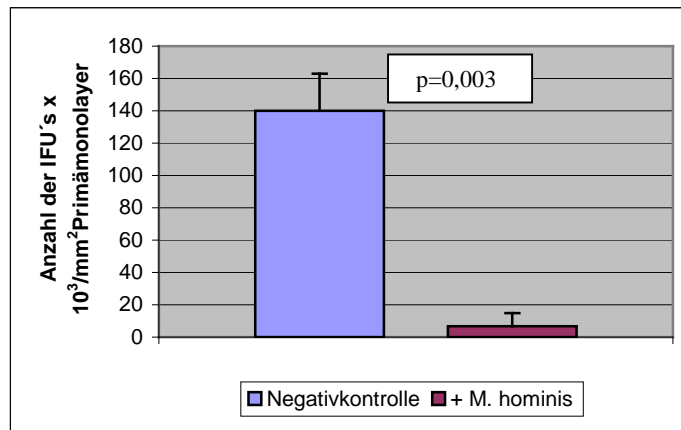


Abb. 3.18: Die Abbildung zeigt das Verhältnis der IFUs nach dem Wiederanzüchten. Die IFUs wurden dabei auf einen Quadratmillimeter der ersten Passage hochgerechnet. Die erste Passage wurde mit einer MOI von 0,1 infiziert. Der Unterschied zwischen der Negativkontrolle und der Koinfektion mit Mykoplasmen ist signifikant ($p=0,003$). Die zugegebene Mykoplasmenbouillon entspricht 1.000 μ l.

3.2.2 Einfluss von *Lactobacillus sp.* auf *Chlamydia trachomatis* Serovar B

Nachdem wir zeigen konnten, dass das Wachstum von Chlamydien durch Laktobazillen nicht gehemmt, sondern sogar gefördert wird, überlegten wir, ob dies auch für Chlamydienstämme, die primär für okuläre Infektionen verantwortlich sind, gilt, oder ob vielleicht *Lactobacillus sp.* ein Grund für die Standortselektivität ist und die für Augeninfektionen verantwortlichen Stämme unterdrückt.

Der Versuchsaufbau ist identisch. Benutzt werden *C. trachomatis* Serovar B, welcher primär Augeninfektionen hervorruft. Es werden nur noch zwei Konzentrationen von Chlamydien bei der Primärinfektion benutzt. Es zeigt sich, dass unter dem Einfluss von Laktobazillen 1,3 mal so viele Einschlüsse pro Quadratmillimeter auftreten (Abb. 3.19), (nicht signifikant, $p=0,08$ für eine MOI von $4,5 \times 10^{-3}$ und $p=0,08$ für eine MOI von 0,018).

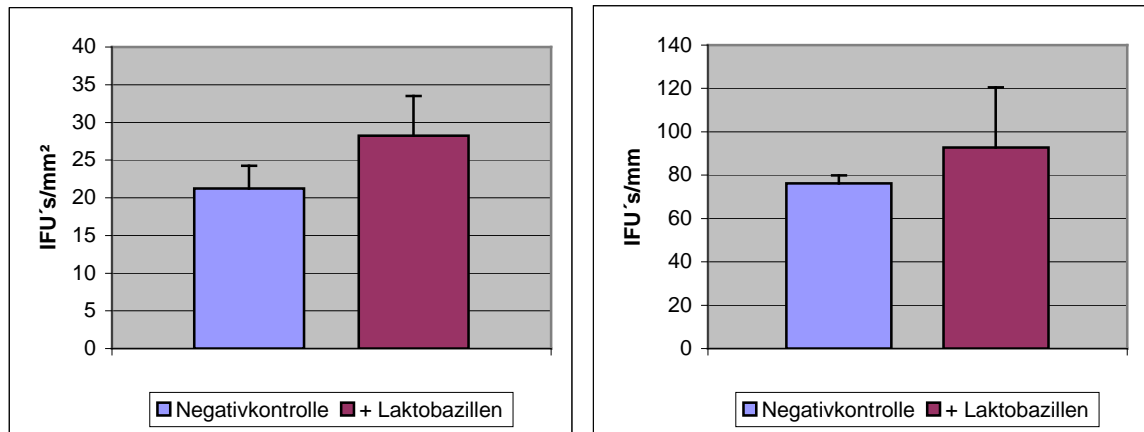


Abb. 3.19: Die Abbildung zeigt die IFUs pro Quadratmillimeter Monolayer nach 36 Stunden. **A:** *C. trachomatis Serovar B* Inokulum 25 μ l Stocklösung, entspricht einer MOI von $4,5 \times 10^{-3}$. **B:** *C. trachomatis Serovar B* Inokulum 100 μ l der Stocklösung (MOI=0,018). Die linken Säulen sind die Negativkontrollen (Chlamydien und HeLa-Zellen). Die rechten Säulen zeigen die Anzahl der IFUs unter den Einfluss von Laktobazillen. Es zeigt sich ein Trend zu verstärktem Wachstum von Chlamydien in Anwesenheit von *Lactobacillus sp.* (1,3fach, $p=0,08$)

Bei den Wiederanzuchtversuchen ergibt sich (Abb. 3.20), dass unter dem Einfluss von Laktobazillen ungefähr dreimal so viele Einschlüsse gewonnen werden können wie in der Negativkontrolle (signifikant, $p=0,012$).

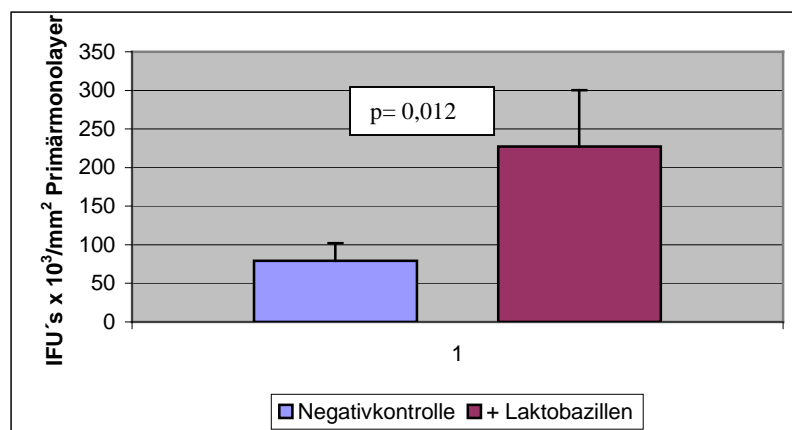


Abb. 3.20: Die Abbildung zeigt das Verhältnis der IFUs nach dem Wiederanzüchten. Die IFUs wurden dabei auf einen Quadratmillimeter der ersten Passage hochgerechnet. Die erste Passage wurde mit einer MOI von 0,018 infiziert. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,0126$) zwischen der Negativkontrolle und der Koinfektion mit Laktobazillen.

3.2.3 Einfluss von Aminosäuren auf die Koinfektion von *Chlamydia trachomatis* Serovar D mit *Mycoplasma hominis*

In diesem Folgeversuch wollen wir überprüfen, ob der hemmende Einfluss von *M. hominis* auf den Verbrauch von Aminosäuren zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck werden vor der Zugabe von *M. hominis* 200 µl eines Aminosäurekonzentrats hinzugegeben. Es zeigt sich, dass der Zusatz der Aminosäuren den negativen Effekt von *M. hominis* auf das Wachstum von *C. trachomatis* Serovar D nicht aufheben kann (Abb. 3.21).

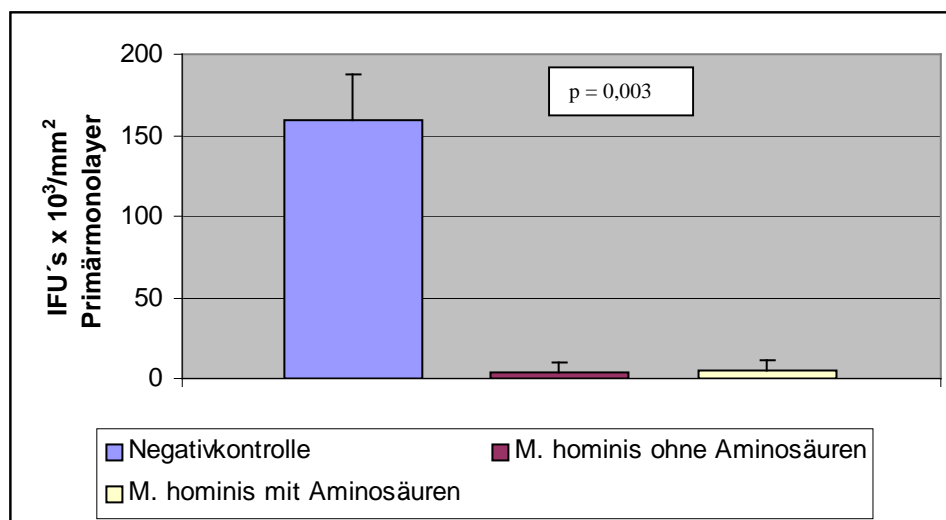


Abb. 3.20: Die Abbildung zeigt das Verhältnis der IFUs nach dem Wiederanzüchten. Die IFUs wurden dabei auf den Primärmonolayer hochgerechnet. Die erste Passage wurde mit einer MOI von 0,1 infiziert. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Negativkontrolle und der Koinfektion mit Mykoplasmen mit und ohne Zugabe von Aminosäuren. Die Einschlüsse der Koinfektionen (mit oder ohne Aminosäuren) unterscheiden sich nicht signifikant. Die zugegebene Mykoplasmenbouillon entspricht 1.000 µl.

3.2.4 Überblick II

Mit Hilfe der Versuche kann gezeigt werden, dass die Adhäsion und Initialisierung von *C. trachomatis* D durch die verwendeten Bakterien nicht gestört werden. Deshalb ergeben sich bei der ersten Passage nach der Koinfektion keine signifikanten Unterschiede.

Mykoplasmen und Laktobazillen wirken sich jedoch auf das Wachstum und die Rekondensierung der Einschlüsse *C. trachomatis* D aus. Durch Mykoplasmen wird das Wachstum um einen Faktor von 20 gehemmt. Dieser Einfluss kann durch die Zugabe von Aminosäuren nicht aufgehoben werden. Unter dem Einfluss von Laktobazillen werden nach dem Anzüchten fast dreimal so viele IFUs gezählt. Die These, dass der positive Einfluss von Laktobazillen auf *Chlamydia trachomatis* Serovar D die Standortspezifität verschiedener *C. trachomatis* Serovare erklärt, kann nicht verifiziert werden.

4 Diskussion

4.1 Kinematografische Darstellungen

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, einzelne, mit Chlamydien infizierte Zellen während ihres Entwicklungszyklus kontinuierlich zu beobachten und diesen Zyklus in digitalen Bildern festzuhalten. So kann der biologisch einzigartige Entwicklungszyklus von *C. trachomatis* Serovar L2, A, B, D, I in Form eines Films verfolgt und verglichen werden.

4.1.1 Entwicklungszyklus

Bereits am Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts konnten Chlamydien in konjunktivalen Epithelzellen von Trachompatienten lichtmikroskopisch dargestellt werden [4]. Da diese Erreger nicht auf Nährboden angezüchtet werden konnten, wurde die These aufgestellt, dass es sich um obligat intrazellulären Erreger mit einem notwendigen Entwicklungszyklus handle. In der Tat konnte Anfang der achtziger Jahre dieser Entwicklungszyklus elektronenmikroskopisch dokumentiert werden [10]. Um den ganzen Entwicklungszyklus beobachten zu können, muss auf zellzerstörende Präparationen verzichtet werden. Somit ist die Darstellung nur lichtmikroskopisch möglich. Ziel dieser Arbeit ist es, den vollständigen Entwicklungszyklus verschiedener *Chlamydia trachomatis* Serovare zu dokumentieren und zu vergleichen.

Adhäsion, Internalisierung und Differenzierung:

Die Adhäsion und Internalisierung der EBs und ihre Differenzierung zu RBs sind lichtmikroskopisch nicht zu erkennen. Erste lichtmikroskopische Strukturen, die ab 12 Stunden nach der Infektion erkennbar sind, stellen kleine Einschlüsse in der Peri-Golgi-Region dar. Diese Beobachtung deckt sich mit der beschriebenen Wanderung des Einschlusses mit Hilfe des Mikrotubulsystems [21].

Intrazelluläre Entwicklung:

Die Zeit bis zur Erkennbarkeit unter dem Lichtmikroskop beträgt, abhängig vom benutzten Serovar, 12 bis 22 Stunden. In der Literatur sind exakte Zeitangaben schwer zu finden; meist wird ein Zeitraum von 18 Stunden angegeben [37,38]. Insgesamt zeigt sich, dass sich die okulären *Serovare A* und *B* langsamer entwickeln als die okulogenitalen Stämme (*I*, *D*, *L2*). Dies stimmt überein mit dem Ergebnis einer Untersuchung der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten verschiedener *Serovare*, in der die Anzahl der Genomkopien mittels PCR bestimmt wurde [34]. Einschränkend ist zu berücksichtigen, dass die benutzten Epithelzellen aus dem Bereich der Zervix stammten und somit die Wachstumsbedingungen der okulären *Serovare* möglicherweise beeinträchtigt waren.

Freisetzung:

Die Zeitdauer bis zur Freisetzung liegt bei unseren Aufnahmen zwischen 54 und 100 Stunden, abhängig vom benutzten Serovar. Während die ersten Zelluntergänge bei Serovar *B* bereits nach 54 Stunden zu beobachten sind, können bei Serovar *L2* noch nach 100 Stunden intakte Einschlüsse nachgewiesen werden.

Während die Internalisierung der Chlamydien gut untersucht ist, ist die Freisetzung der Chlamydien zum größten Teil noch unverstanden. Vier Hypothesen werden diskutiert:

1. Zerstörung der Zellmembran durch mechanischen Stress
2. Induktion des Zelluntergangs durch Beeinflussung der Membran
3. Induktion der Apoptose
4. Exozytose der Chlamydien

Da bei *Chlamydia trachomatis L2* die Zellen durch den Einschluss voll ausgefüllt werden, kommt bei diesem *Serovar* mechanischer Stress als Ursache für den Zelluntergang in Betracht.

Bei der Infektion mit den anderen *Serovaren* lysieren die Zellen, ohne dass sie von den Einschlüssen annähernd ausgefüllt sind. Mechanischer Stress als Ursache des Zelltodes kann hier ausgeschlossen werden.

Mögliche Stütze der zweiten Hypothese ist die Freisetzung von Proteasen, welche die Membran der Zelle auflösen können. In der Literatur ist beschrieben, dass die Zugabe von Antiproteasen die Lyse infizierter Zellen vollständig unterbinden konnte [28].

Zelluntergang und Gewebeerstörung sprechen gegen die in vivo vorkommenden persistierenden Infektionen und die geringe Symptomatik bei Männern, so dass es sich bei der Zelllyse auch um einen In-vitro-spezifischen Vorgang handeln könnte. In vivo könnte der programmierte Zelltod ein wesentlicher Faktor sein.

Die Aktivität von Caspasen in Infizierten Zellen konnte in der Durchflusszytometrie zweifelsfrei nachgewiesen werden [54]. Die Apoptose kann also, auch wenn in unseren Aufnahmen keine Zeichen eines programmierten Zelltodes, etwa eine Karyopygnose mit Zellkernfragmentierung, zu erkennen sind, bei der Freisetzung der Chlamydien eine entscheidende Rolle spielen.

Auch die vierte Hypothese kann die geringe Symptomatik bei Chlamydieninfektionen möglicherweise erklären. Hybiske et. al. gelang die Dokumentation von Exozytosen durch fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Membranen [28].

In unseren Aufnahmen ist keine Exozytose von Chlamydien dokumentiert. Dies könnte an der Zugabe von Cycloheximid liegen, was bedeuten würde, dass dieser Prozess von der Proteinsynthese der Zelle abhängig wäre. Weiter wurde in der oben zitierten Arbeit, im Gegensatz zu unseren Versuchen, in einer CO₂-freien Atmosphäre gearbeitet.

4.1.2 Morphologie

Bei *Chlamydia trachomatis* A konnten kleine, kontrastreiche Einschlüsse mit einem schießscheibenähnlichen Bild zum ersten Mal dokumentiert werden. Die IFT-Färbung beweist, dass es sich bei diesen Einschlüssen tatsächlich um chlamydiale Einschlüsse handelt. In der Literatur sind keine Hinweise auf diese besondere Form zu finden. Möglicherweise können elektronenmikroskopische Aufnahmen Klarheit schaffen.

Die kontrastreichen Raumforderungen von *C. trachomatis* Serovar *I* und *D* (Abb. 4.1) könnten auf der Ansammlung von Glykogen basieren. Da Glykogen, wie elektronenmikroskopischen Aufnahmen beweisen [7], insbesondere in EBs gespeichert wird, könnte es sich hier um besonders große EBs handeln. Weiter wurde elektronenmikroskopisch nachgewiesen, dass sich die RBs häufig der Einschlussmembran annähern, so dass im Einschluss Hohlräume entstehen [38]. Bei den von uns beschriebenen Raumforderungen könnte es sich um solche Vakuole handeln.

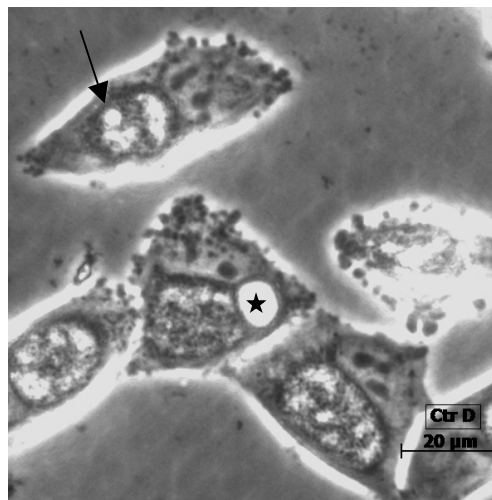


Abb.4.1: Das Bild zeigt Einschlüsse von *C. trachomatis* *D*. Die mit einem Pfeil gekennzeichnete Struktur könnte Glykogen entsprechen. Bei der mit einem Stern markierten Raumforderung könnte es sich um eine Vakuole handeln.

4.1.3 Fusion von Einschlüssen und Zellteilung infizierter Zellen

Die Fusion von Einschlüssen von *C. trachomatis* konnte fluoreszenzmikroskopisch andeutungsweise dargestellt werden [42]. Eine Beteiligung an diesem Prozess wurde dem in der Einschlussmembran lokalisierten Protein IncA (inclusion membrane protein A) zugesprochen [16]. Mit dem hier entwickelten Verfahren kann die Fusion bei allen verwendeten Serovaren zweifelsfrei dokumentiert werden. Ausgewählte Bilder sind in Abbildung 3.2 enthalten und in dem Film „Fusion.mov.“ zu sehen. Die Zeitdauer der beobachteten Fusionen betrug 12 bis 15 Stunden. Der Vorteil der Fusion könnte für Chlamydien im Austausch von Erbmaterial liegen

[42], wobei zu berücksichtigen ist, dass nur die Fusion der Einschlussmembran gezeigt werden kann. Eine Fusion oder ein Austausch von DNS-Abschnitten sind nicht beschrieben.

Die Fähigkeit zur DNS-Synthese und die Bildung von Mitosespindeln wurden von Greene et al. beschrieben [20]. Mit der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methode kann das Phänomen der Teilung einer infizierten Zelle für alle verwendeten *Serovare* erstmals digital festgehalten werden. Dabei erhielt in allen aufgezeichneten Fällen nur eine Tochterzelle einen chlamydialen Einschluss. Die anderen Zellen schienen nicht infiziert. Die beschriebene Möglichkeit, dass nach der Zellteilung beide Tochterzellen chlamydienfrei oder aber beide infiziert sind [20], wurde von uns nicht beobachtet. Der Versuch der Zellteilung bei sehr großen Einschlüssen endete mit dem Tod der Zelle.

Bei allen benutzten *Serovaren* konnte nachgewiesen werden, dass infizierte Zellen sich teilen können. Beispielhaft ist dieses Phänomen im Film „Mitose-mit-Infektion.mov“ festgehalten.

4.1.4 Überblick III

Die kinematografische Darstellung weist einige Vorteile auf:

- Der chlamydiale Entwicklungszyklus kann vollständig an einer Zelle beobachtet werden.
- Verschiedene *Serovare* können miteinander verglichen werden.
- Zeitspannen von Ereignissen während des Entwicklungszyklus, etwa die Dauer von Mitosen oder Fusionen, können mit diesen Verfahren gemessen, zweifelsfrei dargestellt und dokumentiert werden.

Das entwickelte Verfahren kann auch verwendet werden, um den Entwicklungszyklus anderer Chlamydia-Spezies, wie zum Beispiel *C. pneumoniae*, kinematografisch darzustellen. Das Wachstumsverhalten verschiedener Spezies kann damit untersucht und verglichen werden. Von Interesse könnte ferner die Verwendung anderer Wirtszellen, wie zum Beispiel Granulozyten oder Makrophagen,

sein, und auch bei der Erforschung anderer intrazelluläre Erreger, etwa von Plasmodien oder Mykobakterien, könnte sich die Kinematografie als nützlich erweisen.

Mit einer leicht modifizierten Methode konnte inzwischen der Eintritt von Leishmanien in Granulozyten gefilmt werden [50].

4.2 Einfluss von Bakterien auf das Wachstum von *Chlamydia trachomatis*

4.2.1 Einfluss von *Mycoplasma hominis* auf *Chlamydia trachomatis* Serovar *D*

Es kann gezeigt werden, dass chlamydiale Einschlüsse während einer Koinfektion mit Mykoplasmen deutlich kleiner sind als chlamydiale Einschlüsse, die unter sterilen Bedingungen wachsen. Bei der Wiederanzucht gewonnener EBs werden unter dem Einfluss von Mykoplasmen signifikant weniger IFUs gezählt als in der Negativkontrolle. Die Ursache für die durch Mykoplasmen induzierte Verringerung des chlamydialen Wachstums ist unbekannt.

Es gibt drei Möglichkeiten, diese verminderte Wachstumsrate zu erklären:

- Die Aufnahme von Chlamydien in die Wirtszelle wird durch Mykoplasmen inhibiert.
- Mykoplasmen wirken zytotoxisch auf die Kulturzellen, so dass weniger Wirtszellen bereitstehen.
- Die Vermehrung der Chlamydien wird in der Wirtszelle behindert.

Die erste Aussage wird in der ersten Passage untersucht. Da die Anzahl der IFUs sich nicht signifikant von der Negativkontrolle unterscheidet, ist diese These widerlegt.

Gegen die zweite Aussage spricht, dass bei der lichtmikroskopischen Kontrolle keinerlei Schäden an den Zellrasen zu entdecken sind.

Die dritte Aussage wird durch die Tatsache, dass sich in der ersten Passage die Einschlüsse in der Größe unterscheiden, unterstützt. Es stehen weniger effektive

EBs für die Neuinfektion frischer Zellen zu Verfügung, und in der zweiten Passage werden nach dem Wiederanzüchten unter dem Einfluss vom Mykoplasmen weniger IFUs gemessen, was die dritte Hypothese bestätigt. Beide Feststellungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Kuipers, welche erstmals einen negativen Einfluss vom Mykoplasmen auf das Chlamydienwachstum belegten [31]. Die Arbeitsgruppe verglich dabei die Anzahl der Einschlüsse, die zum einen von kontaminierten, zum anderen von gereinigten Elementarkörperchen gewonnen wurden. Die Auswertung erfolgte, wie bei uns, mittels Fluoreszenzmikroskopie. Der negative Einfluss von Mykoplasmen könnte zu persistierenden Formen von Chlamydien führen und die chronische Entzündung fördern.

Um eine Beeinflussung durch Mykoplasmen zu vermeiden, ist in der Chlamydienforschung ein regelmäßiges Screening auf Mykoplasmen unabdingbar. Bei quantitativen Experimenten ist absolute Mykoplasmenfreiheit zu fordern.

Als Ursache der Behinderung der intrazellulären Entwicklung könnte die Konkurrenz um Nährstoffe eine Rolle spielen. Um zu klären, ob das geringere Wachstum auf einen Mangel an Aminosäuren zurückzuführen ist, wurden dem Ansatz der Koinfektion konzentrierte Aminosäuren zugesetzt. Das reduzierte Wachstum konnte dadurch jedoch nicht aufgehoben werden.

4.2.2 Einfluss von *Lactobacillus sp.* auf *Chlamydia trachomatis* Serovar *D* und *B*

Anders als Mykoplasmen scheinen Laktobazillen einen positiven Einfluss auf das Wachstum von Chlamydien zu haben. Es finden sich dazu jedoch weder Literatur noch Erklärungsansätze. Möglicherweise werden Nährstoffe von den Laktobazillen vorfermentiert, so dass sie von den Chlamydien besser aufgenommen werden können.

Aus den Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass Laktobazillen beim Schutz vor chlamydialen Infektionen im weiblichen Genitaltrakt nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Möglicherweise ist *Lactobacillus sp.* die Ursache dafür, dass Infektionen bei Frauen meist schwerwiegender verlaufen als die häufig asymptomatisch verlaufenden Infektionen bei Männern.

Der Einfluss von Laktobazillen auf das Wachstum war auch bei okulären Stämmen nachweisbar. Somit ist der Einfluss von *Lactobacillus sp.* vermutlich nicht ursächlich für die Standortspezifität genitaler *Serovare*.

4.2.3 Einfluss von *Neisseria gonorrhoeae* und *Gardnerella vaginalis* auf *Chlamydia trachomatis* Serovar D

Mit den verwendeten Konzentrationen von *N. gonorrhoeae* und *G. vaginalis* kann kein signifikanter Effekt auf *Chlamydia trachomatis* Serovar D erzielt werden. Höhere Konzentrationen sind toxisch für die Zellen. Man darf also annehmen, dass die Erreger sich bei hoher Konzentration durch die Zerstörung der Wirtszellen negativ auf die Vermehrung von *C. trachomatis* auswirken.

4.2.4 Überblick IV

Da sich in diesem In-vitro-Modell drei Organismen beeinflussen, war der Versuchsaufbau zwangsläufig sehr komplex. Es konnte jedoch zweifelsfrei gezeigt werden, dass sich Mycoplasmen negativ auf das Wachstum von *C. trachomatis* Serovar D auswirken. Weiter scheinen Laktobazillen eine untergeordnete Rolle beim Schutz vor Infektionen des weiblichen Genitaltrakts zu spielen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um den Einfluss anderer Erreger auf Chlamydien zu erforschen.

5 Zusammenfassung

Das wesentliche Charakteristikum aller Chlamydien ist ihr einzigartiger Entwicklungszyklus. Infektiöse Elementarkörper werden von der Wirtszelle in ein Phagosom aufgenommen. Es folgt die Differenzierung zu Retikularkörpern, welche sich durch binäre Teilung vermehren. Nach der Teilungsphase kondensieren die Retikularkörper zurück zu Elementarkörpern und werden durch Ruptur der Zelle in den Extrazellularraum freigesetzt. Der chlamydiale Entwicklungszyklus ist durch die Elektronenmikroskopie gut dokumentiert. Eine Beobachtung des gesamten chlamydialen Entwicklungszyklus in ein und derselben Wirtszelle ist nur ohne zellzerstörende Präparationen und damit allein mittels Lichtmikroskopie möglich.

Das erste Ziel dieser Arbeit ist es, ein Verfahren zu entwickeln, das es ermöglicht, den Entwicklungszyklus von *C. trachomatis* in HeLa-Zellen kinematografisch darzustellen und verschiedene Serovaren zu vergleichen. *C. trachomatis* Serovar L2 dient als Referenzstamm. Weiter konnte dokumentiert werden, dass HeLa-Zellen trotz Infektion zur Zellteilung fähig sind und dass Einschlüsse von *C. trachomatis* innerhalb einer Zelle miteinander fusionieren. Die dieser Arbeit beigelegte CD enthält ausgewählte Sequenzen der Entwicklungszyklen als Filme. Diese können mit dem Programm-Tool „Apple Quick Time Player“, das entgeltfrei im Internet erhältlich ist (<http://www.apple.com/quicktime/download/>), betrachtet werden.

Da Chlamydien in vivo gemeinsam mit anderen Bakterien vorkommen, stellen wir uns im zweiten Teil dieser Arbeit die Frage, welchen Einfluss Bakterien der weiblichen Genitalflora auf Chlamydien haben können. Die Versuche ergaben, dass die Adhäsion und die Initiierung von *C. trachomatis* durch die verwendeten Bakterien nicht gestört werden. In einer zweiten Versuchsreihe wird der Einfluss der Bakterien auf das intrazelluläre Wachstum auf Chlamydien untersucht. Durch Mykoplasmen wird das Wachstum bis zum Zwanzigfachen gehemmt. In der Chlamydienforschung ist deshalb ein regelmäßiges Mykoplasmen screening unerlässlich. Unter dem Einfluss von Laktobazillen werden nach dem Anzüchten mehr als doppelt so viele Einschlüsse gezählt, so dass Laktobazillen beim Schutz vor chlamydialen Infektionen im weiblichen Genitaltrakt nur eine untergeordnete Rolle spielen.

6 Referenzen

- 1 Bessen D., Gotschlich E.C.: Interactions of gonococci with HeLa cells: attachment, detachment, replication, penetration, and the role of protein II. *Infect Immun.* 54: 154-160. (1986)
- 2 Boris S., Barbés C.: Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect.* 2: 543-546. (2000)
- 3 Bose S.K., Liebhaber H.: Deoxyribonucleic acid synthesis, cell cycle progression, and division of Chlamydia-infected HeLa 229 cells. *Infect Immun.* 24: 953-957. (1979)
- 4 Budai I.: Chlamydia trachomatis: milestones in clinical and microbiological diagnostics in the last hundred years: a review. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 54: 5-22. (2007)
- 5 Caldwell H.D., Kromhout J., Schachter J.: Purification and partial characterisation of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. *Infect. Immun.* 31: 1161-1176. (1981)
- 6 Castilla E.A., Wadowsky R.M.: Effect of a Mycoplasma hominis-like Mycoplasma on the infection of HEp-2 cells by the TW-183 strain of Chlamydia pneumoniae. *J Clin Microbiol.* 38: 861-862. (2000)
- 7 Chiappino M.L., Dawson C., Schachter J., Nichols B.A.: Cytochemical localization of glycogen in Chlamydia trachomatis inclusions. *J Bacteriol.* 177: 5358-5363. (1995)
- 8 Cristiano L., Rampello S., Noris C., Valota V.: Bacterial vaginosis: prevalence in an Italian population of asymptomatic pregnant women and diagnostic aspects. *Eur J Epidemiol.* 12: 383-390. (1996)
- 9 Darougar S., Forsey T., Brewerton D.A., Rogers K.L.: Prevalence of antichlamydial antibody in London blood donors. *Br J Vener Dis.* 56: 404-407. (1980)
- 10 De la Maza L.M., Peterson E.M.: Scanning electron microscopy of McCoy cells infected with Chlamydia trachomatis. *Exp Mol Pathol.* 36: 217-226. (1982)
- 11 Debattista J., Gazzard C.M.: Interaction of microbiology and pathology in women undergoing investigations for infertility. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 12: 135-145. (2004)
- 12 Eissenberg L.G., Wyrick P.B., Davis C.H., Rump J.W.: Chlamydia psittaci elementary body envelopes: ingestion and inhibition of phagolysosome fusion. *Infect Immun.* 40: 741-751. (1983)

- 13 Engel J.: Tarp and Arp: How Chlamydia induces its own entry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 9947-9948. (2004)
- 14 Everett K. D. E. and Hatch T. P.: Architecture of the Cell Envelope of *Chlamydia psittaci* 6BC. *J. Bacteriol.* 77: 877-882. (1995)
- 15 Everett K. D. E., Bush R. M., Anderson A. A.: 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 identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 425-440. (1999)
- 16 Fields K.A., Fischer E., Hackstadt T.: Inhibition of fusion of *Chlamydia trachomatis* inclusions at 32 degrees C correlates with restricted export of IncA. *Infect Immun.* 70: 3816-3823. (2002)
- 17 Gieffers J., Durling L., Ouellette S.P., Rupp J., Maass M., Byrne G.I., Caldwell H.D., Belland R.J.: Genotypic differences in the *Chlamydia pneumoniae* tyrP locus related to vascular tropism and pathogenicity. *J Infect Dis.* 188: 1085-1093. (2003)
- 18 Gieffers J., Füllgraf H., Jahn J., Klinger M., Dalhoff K., Katus H.A., Solbach W., Maass M.: *Chlamydia pneumoniae* infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation.* 103: 351-356. (2001)
- 19 Gieffers J., Tamplin V., Maass M., Belland R.J., Caldwell H.D.: Micromanipulation of the *Chlamydia pneumoniae* inclusion: implications for cloning and host-pathogen interactions. *FEMS Microbiol Lett.* 226: 45-49. (2003)
- 20 Greene W., Xiao Y., Huang Y., McClarty G., Zhong G.: *Chlamydia*-infected cells continue to undergo mitosis and resist induction of apoptosis. *Infect Immun.* 72: 451-460. (2004)
- 21 Grieshaber S. S., Grieshaber N. A., Hackstadt T.: *Chlamydia trachomatis* uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process. *J Cell Sci.* 116: 3793-3802. (2003)
- 22 Grieshaber S., Swanson J.A., Hackstadt T.: Determination of the physical environment within the *Chlamydia trachomatis* inclusion using ion-selective ratiometric probes. *Cell Microbiol.* 4: 273-283. (2002)
- 23 Hackstadt T., Scidmore M.A., Rockey D.D.: Lipid metabolism in *Chlamydia trachomatis*-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion., *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 4877-4881. (1995)
- 24 Hackstadt T., Todd W.J., Caldwell H.D.: Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae? *J Bacteriol.* 161: 25-31. (1985)

- 25 Hatch T.P., Al-Hossainy E., Silverman J.A.: Adenine nucleotide and lysine transport in *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol.* 150: 662-670. (1982)
- 26 Heinzen R. A., Hackstadt T.: The *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuolar membrane is not passively permeable to low-molecular-weight compounds. *Infect Immun.* 65: 1088-1094. (1997)
- 27 .Huniche B.S., Jensen L.T., Birkelund S., Christiansen G.: Mycoplasma contamination of *Chlamydia pneumoniae* isolates. *Scand J Infect Dis.* 30: 181-187. (1998)
- 28 Hybiske K., Stephens R.S.: Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 11430-11435. (2007)
- 29 Kohl P. K.: Gonorrhoe. *Der Urologe.* 45:1501–1503. (2006)
- 30 Krausse-Opatz B., Dollmann P., Zeidler H., Köhler L., Kuipers J.G.: Mycoplasma fermentans, *M. hominis*, and *M. hyorhinitis* inhibit infectivity and growth of *Chlamydia trachomatis* and *C. pneumoniae* in HEp-2 cells. *J Clin Microbiol.* 38: 3910-3911. (2000)
- 31 Krausse-Opatz B., Dollmann P., Zeidler H., Kuipers J.G., Köhler L.: Frequent contamination of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* strains with mycoplasma. Biological relevance and selective eradication of mycoplasma from chlamydial cultures with mupirocin. *Med Microbiol Immunol.* 189: 19-26. (2000)
- 32 Kuo C.C., Chen H.H., Wang S.P., Grayston J.T.: Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR. *J Clin Microbiol.* 24: 1034-1037. (1986)
- 33 McCaw S.E., Liao E.H., Gray-Owen S.D.: Engulfment of *Neisseria gonorrhoeae*: revealing distinct processes of bacterial entry by individual carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule family receptors. *Infect Immun.* 72: 2742-2752. (2004)
- 34 Miyairi I., Mahdi O.S., Ouellette S.P., Belland R.J., Byrne G.I.: Different growth rates of *Chlamydia trachomatis* biovars reflect pathotype.; *J Infect Dis.* 194: 350-357. (2006)
- 35 Moulder J.W.: Characteristics of chlamydiae. In: Barron A. L., *Microbiology of chlamydia.* CRC press. 3-20. (1988)
- 36 Murta E.F., Silva A.O., Silva E.A., Adad S.J.: Frequency of infectious agents for vaginitis in non- and hysterectomized women. *Arch Gynecol Obstet.* 73: 152-156. (2005)
- 37 Neeper I.D., Patton D.L., Kuo C.C.: Cinematographic observations of growth cycles of *Chlamydia trachomatis* in primary cultures of human amniotic cells. *Infect Immun.* 58: 2042-2047. (1990)

- 38 Patton D.L., Chan K.Y., Kuo C.C., Cosgrove Y.T., Langley L.: In vitro growth of *Chlamydia trachomatis* in conjunctival and corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 29: 1087-1095. (1988)
- 39 Rahman M.U., Schumacher H.R., Hudson A.P.: Recurrent arthritis in Reiter's syndrome: a function of inapparent chlamydial infection of the synovium? *Semin Arthritis Rheum.* 21: 259-266. (1992)
- 40 Resnikoff S., Pascolini D., Etya'ale D., Kocur I., Pararajasegaram R., Pokharel G.P., Mariotti S.P.: Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ.* 82: 844-851. (2004)
- 41 Reynolds D.J., Pearce J.H.: Endocytic mechanisms utilized by chlamydiae and their influence on induction of productive infection. *Infect Immun.* 59: 3033-3039. (1991)
- 42 Ridderhof J.C., Barnes R.C.: Fusion of inclusions following superinfection of HeLa cells by two serovars of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 57: 3189-3193. (1989)
- 43 Schachter J., Stephens R.S., Timms P., Kuo C., Bavoil P.M., Birkelund S., Boman J., Caldwell H., Campbell L.A., Chernesky M., Christiansen G., Clarke I.N., Gaydos C., Grayston J.T., Hackstadt T., Hsia R., Kaltenboeck B., Leinonen M., Ojcius D., McClarty G., Orfila J., Peeling R., Puolakkainen M., Quinn T.C., Rank R.G., Raulston J., Ridgeway G.L., Saikku P., Stamm W.E., Taylor-Robinson D.T., Wang S.P., Wyrick P.B.: Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 51: 249 (2001)
- 44 Schlicht M.J. Lovrich S. D., Sartin J. S., Karpinsky P., Callister S. M., Agger W. A.: High prevalence of genital mycoplasmas among sexually active young adults with urethritis or cervicitis symptoms in La Crosse, Wisconsin. *J Clin Microbiol.* 42: 4636-4640. (2004)
- 45 Scidmore M., Fischer E., Hackstadt T.: Restricted fusion of *Chlamydia trachomatis* vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. *Infect Immun.* 71: 973-984. (2003)
- 46 Siewert K., Rupp J., Klinger M., Solbach W., Gieffers J.: Growth cycle-dependent pharmacodynamics of antichlamydial drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 1852-1856. (2005)
- 47 Stephens R. S., Fawaz F. S., Kennedy K. A., Koshiyama K., Nichols B., Van Ooij C., Engel J. N.: Eukaryotic Cell Uptake of Heparin-Coated Microspheres: Model of Host Cell Invasion by *Chlamydia trachomatis*, *Infect Immun.* 68: 1080-1085 (2000)
- 48 Su H., Raymond L., Rockey D. D., Fischer E., Hackstadt T., Caldwell H. D.: A rekombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. USA.* 93: 11143-11148. (1992)

- 49 Tjaden J., Winkler H.H., Schwöppe C., Van Der Laan M., Möhlmann T., Neuhaus H.E.: Two nucleotide transport proteins in *Chlamydia trachomatis*, one for net nucleoside triphosphate uptake and the other for transport of energy; *J Bacteriol.* 181: 1196-1202. (1999)
- 50 Van Zandbergen G., Klinger M., Mueller A., Dannenberg S., Gebert A., Solbach W., Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 173: 6521-6525. (2004)
- 51 Waugh, M.: Sexually Transmitted Infections. *Microbial Infections*, 2007 Update, *SKINmed.* 5: 242-244. (2007)
- 52 Wieder W., Wagenlehner F. M. E., Diemer T.: Urogenitale Chlamydieninfektion beim Mann. *Urologe.* 45: 1504-1508. (2006)
- 53 Wolf K., Fischer E., Hackstadt T.: Ultrastructural analysis of developmental events in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. *Infect Immun.* 68: 2379-2385. (2000)
- 54 Ying S., Fischer S. F., Pettengill M., Conte D., Paschen S. A., Ojcius D. M., Häcker G.: Characterization of host cell death induced by *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 74: 6057-66. (2006)
- 55 Zhang J. P., and Stephens R. S.: Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell.* 69: 861-869. (1992)

7 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Jens Gieffers für die Vergabe des Themas und für seine konstruktive Kritik und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. Werner Solbach danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Universität zu Lübeck anzufertigen. Auch für sein Interesse und seine hilfreiche Kritik möchte ich ihm danken.

Ferner danke ich Frau Kristin Roßdeutscher und Frau Siegrid Pätzmann für gute Zusammenarbeit und Unterstützung, ebenso den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Laskay, Herrn Dr. Ger van Zandbergen, Frau Uta Bußmeier, Herrn Alexander Wenzel, Herrn Christian Idel, Frau Kirsten Broszat und Frau Sonja Dannenberg für kooperatives Interesse und nützliche Hinweise in Sachen Mikroskopie.

Herzlicher Dank gilt Frau Dipl.-Stat. Anja Kühnlein für wertvollen Rat bei Fragen der statistische Auswertung.

Ganz besonders möchte ich meinen Freunden danken, die mich immer wieder unterstützt und aufgebaut haben. Dabei denke ich insbesondere an Mareike Middecke, Timm Aschka, Cora Nickels, Sebastian Brandl und Axel Kerner.

Meinen Eltern schließlich bin ich zutiefst verpflichtet für ihren zuverlässigen Rückhalt während der ganzen Zeit meines Studiums, insbesondere meiner Mutter, die mich ungeachtet ihrer schweren Krankheit immer wieder ermuntert und neu motiviert hat.

8 Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Michael Staber
Geburtsdatum, - ort: 16.01.1981, München

Schulabschluss:

06/2000 Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium Grafing

Zivildienst:

08/2000-07/2001 Kreisklinik Ebersberg

Studium:

10/2001-10/2003 Vorklinik, Georg-August-Universität Göttingen
10/2003-08/2006 Klinischer Abschnitt, Universität zu Lübeck
10/2006-10/2007 Praktisches Jahr, Technische Universität München
Chirurgie: städtisches Krankenhaus Bogenhausen
Wahlfach: Urologie, Klinikum Rechts der Isar
Innere Medizin: Städtisches Krankenhaus Bogenhausen

Prüfungen:

09/2003 Erster Abschnitt der ärztliche Prüfung
11/2007 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Dissertation:

Durchführung der experimentellen Arbeiten am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. W. Solbach)

Berufserfahrung:

02/2008 – 03/2009 Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik II, UKSH, Campus Lübeck
ab 04/2009 Weiterbildungsassistent im Labor Dr. Staber und Partner in München