

**MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG  
DES PERSISTENZSTADIUMS VON  
*CHLAMYDOPHILA PSITTACI***

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)



---

seit 1558

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Stefanie Göllner  
geboren am 08.10.1979 in Eisenach

Jena, im Juli 2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
1.1 Biologie und Taxonomie der Chlamydien.....	3
1.2 Lebenszyklus.....	4
1.3 Chlamydien-assoziierte Erkrankungen.....	6
1.3.1 <i>Chlamydomphila psittaci</i> .....	6
1.3.2 <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> .....	7
1.3.3 <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	8
1.4 Persistenz.....	9
1.4.1 Persistenz und chronische Erkrankungen.....	9
1.4.2 <i>In-vitro</i> -induzierte Persistenzarten.....	10
1.4.3 <i>In-vivo</i> -Persistenz.....	12
1.5 Chlamydien und Apoptose.....	13
1.5.1 Persistenz und Apoptose.....	16
1.6 Zielsetzung.....	17
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>19</b>
2.1 Material.....	19
2.1.1 Geräte und Laborausstattung.....	19
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.3 Chemikalien.....	21
2.1.4 Puffer, Medien und Lösungen.....	23
2.1.5 Zelllinien und Chlamydienstämme.....	25
2.1.6 Nukleinsäuren.....	25
2.1.7 Antikörper, Marker für Western Blots.....	25
2.1.8 Enzyme und Kits.....	26
2.1.9 Software.....	26
2.2. Methoden.....	27
2.2.1 Kultivierung und Passagierung eukaryotischer Zellen.....	27
2.2.2 Kryokonservierung von Zellen.....	27
2.2.3 Chlamydieninfektion zum Anlegen von Kryokonserven.....	27
2.2.4 Immunfluoreszenz.....	28
2.2.5 Titerbestimmung.....	29
2.2.6 Test auf Mycoplasmenfreiheit.....	29
2.2.7 Infektiositätsassay.....	30
2.2.8 Chlamydieninfektion und Persistenzinduktion.....	30
2.2.9 Reaktivierungsassay.....	30
2.2.10 Ernte.....	31
2.2.11 Elektronenmikroskopie.....	31
2.2.12 Auswahl spezifischer Gene und Primer-Design.....	32
2.2.13 DNA-Isolation.....	32

2.2.14 PCR.....	32
2.2.15 Agarose-Gelelektrophorese .....	33
2.2.16 Sequenzierung der PCR-Fragmente.....	33
2.2.17 RNA-Isolation .....	34
2.2.18 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	34
2.2.19 cDNA-Synthese .....	34
2.2.20 Quantitative Real time-PCR (RTQ-PCR).....	34
2.2.21 Statistische Analyse der Real-time-PCR Experimente .....	36
2.2.22 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	36
2.2.23 TCA- Fällung.....	36
2.2.24 SDS-PAGE .....	36
2.2.25 Western Blot.....	37
2.2.26 Strippen der Membran .....	37
2.2.27 Apoptose-Assays .....	38
2.2.28.MTT-Test.....	39
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Etablierung der Persistenzmodelle .....</b>	<b>40</b>
3.1.1 Die Gabe an zunehmenden Konzentrationen von Persistenzinduktoren führt zur Abnahme der Infektiosität von <i>Cp.-psittaci</i> .....	40
3.1.2 Die Gabe ausgewählter Konzentrationen an Persistenzinduktoren führt zu einer abnormen Morphologie der chlamydialen Inklusionen und Retikularkörper .....	41
3.1.3 Der Entzug von Persistenzinduktoren ermöglicht eine Reaktivierung der persistenten Chlamydien .....	44
3.1.4 Die chlamydiale Persistenz lässt sich über die Dauer eines produktiven Entwicklungszyklus hinaus aufrechterhalten .....	45
<b>3.2 Transkriptionsunterschiede zwischen akuter und persistenter Infektion.....</b>	<b>45</b>
3.2.1 Die Ausbildung und Aufrechterhaltung der chlamydialen Persistenz in HEp2-Wirtszellen geht mit Veränderungen in der Expression spezifischer Gene einher.....	47
3.2.2 Persistenz-charakteristische, herunterregulierte Gene der HEp2-Infektionsmodelle sind auch in Fibroblasten herunterreguliert.....	60
<b>3.3 Wechselwirkungen zwischen persistenten Chlamydien und ihren Wirtszellen.....</b>	<b>60</b>
3.3.1 Die IFN- $\gamma$ -Gabe führt zu einer starken Zunahme derIDO-Transkriptmenge.....	60
3.3.2 Sowohl die persistente als auch die akute <i>Cp.-psittaci</i> DC15-Infektion induziert keine Wirtszellapoptose .....	61
3.3.3. Persistent und akut infizierte Wirtszellen sind resistent gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose.....	67
3.3.4 Die <i>Cp.-psittaci</i> -Infektion reduziert die Proliferationsfähigkeit der Wirtszelle.....	68
3.3.5 <i>Cp.-psittaci</i> DC15 stimuliert die Expression des Inhibitor of Apoptosis 2 (cIAP2) in der Wirtszelle.....	70
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>74</b>
<b>4.1 Die <i>Cp.-psittaci</i>-Persistenz.....</b>	<b>74</b>
4.1.1. Etablierung der Persistenzmodelle und Kulturbedingungen.....	74
4.1.2. Die chlamydiale Genexpression während Persistenzetablierung und-aufrechterhaltung.....	79
<b>4.2 Der Einfluss der persistenten <i>Cp.-psittaci</i>-Infektion auf die Wirtszellapoptose.....</b>	<b>90</b>
4.2.1 Die akute und persistente <i>Cp.-psittaci</i> -Infektion stimuliert keine Wirtszellapoptose und ist in der Lage, die induzierte Apoptose zu hemmen.....	91
4.2.2 Die Chlamydieninfektion führt zu einer verminderten Proliferation der Wirtszelle.....	93
4.2.3 <i>Cp.-psittaci</i> -infizierte Zellen zeigen eine Hochregulation des Inhibitors of Apoptosis 2 (cIAP2) ....	95
<b>5. AUSBLICK.....</b>	<b>99</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>100</b>

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>X</b>
<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>XI</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>XII</b>
<b>PUBLIKATIONS LISTE .....</b>	<b>XIII</b>
<b>ANHANG.....</b>	<b>XIV</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
AB	Aberrant Body (Aberrantes Körperchen)
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin Triphosphat
bp	base pairs (Basenpaare)
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
crmA	cowpox virus serpin cytokine response modifier A
d	Tag
Da	Dalton
DAM	Deferoxamin Mesylat
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DEPEC	Diethylpyrocarbonat
dd H <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EB	Elementary Body (Elementarkörper)
EDTA	Etylendiaminotetraacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ m/s}^2$ )
GAG	Glykosaminoglykane
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IAP	Inhibitor of Apoptosis
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IFU	Infection Forming Unit (Infektiöse Einheit)
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
mM	Millimolar
M	Molar

min	Minute
MOI	multiplicity of infection (Anzahl infektiöser Einheiten pro Zelle)
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
RA	Reaktive Arthritis
RB	Reticulate Body (Retikularkörper)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBP	Penicillin Binding Protein (Penicillin Binde Protein)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Periphere Blutmonozyten)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PenG	Penicillin G
PID	Pelvic Inflammatory Disease
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
p.i.	post infectionem (nach Infektion)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
RTQ-PCR	quantitative Real-Time-PCR
sec	Sekunden
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat (Natriumdodecylsulfat)
spp.	Subspezies
STS	Staurosporin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TNF- $\alpha$	Tumor Necrose Factor $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonucleic Acid
trp	Tryptophan
TrisHCl	Tris Base-Puffer (auf spez. pH-Wert eingestellt mit HCl)
U	Units
V	Volt
v/v	Volumen per Volume (Volumen pro Volumen bei Prozentangaben)
w/v	Weight per Volume (Gewicht pro Volumen bei Prozentangaben)

## Zusammenfassung

Persistente Chlamydieninfektionen sind an der Entstehung chronischer Erkrankungen wie Pelvic Inflammatory Disease (PID), Trachom und vermutlich auch kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt. Im Vergleich zu Chlamydien eines akuten, produktiven Entwicklungszyklus weisen persistente Chlamydien eine veränderte Gen- und Proteinexpression sowie eine veränderte metabolische Aktivität auf und sind oftmals resistent gegenüber antibiotischen Therapien.

In dieser Arbeit konnten drei verschiedene Persistenzmodelle für *Chlamydophila (Cp.) psittaci* etabliert werden, welche auf Eisenmangel, Penicillin-G-Behandlung bzw. IFN- $\gamma$ -Gabe beruhen. Damit einhergehend wurden Expressionsänderungen spezifischer Chlamydien-Gene festgestellt, die unabhängig vom angewendeten Persistenzstimulus auftraten. Dies beinhaltete die Herunterregulation von Genen, welche für die Membranproteine OmcA und OmcB, das Zellteilungsprotein FtsW, die Proteine des Zweikomponentensystems CtcB und CtcC sowie für die GTPase YphC codieren. Diese Ergebnisse konnten unter Verwendung einer zweiten Zelllinie bestätigt werden und legen den Schluss nahe, dass es sich dabei um ein persistenzspezifisches Expressionsmuster der Spezies *Cp. psittaci* handelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit erstmals exakte molekulare Daten zur Genregulation während der persistenten *Cp.-psittaci*-Infektion.

Als intrazelluläre Erreger stehen Chlamydien in vielfältiger Wechselwirkung mit ihrer Wirtszelle. Die Fähigkeit, keine Apoptose in der Wirtszelle auszulösen beziehungsweise induzierte Apoptose hemmen zu können, ist von Vorteil für das Überleben und die Vermehrung einer Vielzahl intrazellulärer Erreger. Für die persistente und akute *Cp.-psittaci*-Infektion konnte hier gezeigt werden, dass die Chlamydien keine Wirtszell-Apoptose auslösen. Dieser Effekt korrelierte mit einer Zunahme der Transkript- und Proteinmenge des Inhibitor-of-Apoptosis-Proteins 2 (cIAP2), für welches ein inhibitorischer Effekt auf Caspase-3 und -7 beschrieben ist. Darüber hinaus wurde in den akut und persistent infizierten Wirtszellen die Staurosporin-induzierte Apoptose gehemmt. Die hier gezeigte Fähigkeit zur Modulation der Wirtszellapoptose kann es den persistenten *Cp. psittaci* ermöglichen, eine Langzeitbeziehung mit der Wirtszelle auszubilden, was u. a. zur Entstehung chronischer Erkrankungen führen kann.

Die in dieser Arbeit für die Spezies *Cp. psittaci* erhaltenen Daten bezüglich des chlamydialen Expressionsverhaltens und des Einflusses auf die Wirtszellapoptose erlauben einen Vergleich mit den Persistenzcharakteristika der beiden intensiver untersuchten

Spezies *C. trachomatis* und *Cp. pneumoniae* und können somit zur Herausarbeitung genereller Persistenzmerkmale der *Chlamydiaceae* beitragen. Darüber hinaus können diese Daten einen Ausgangspunkt für die weitere Aufklärung der molekularen Pathogenesemechanismen bei chronischen Infektionskrankheiten darstellen.



# 1. Einleitung

## 1.1 Biologie und Taxonomie der Chlamydien

Chlamydien sind obligat intrazelluläre, Gram-negative Bakterien, die als Parasiten in eukaryotischen Zellen leben und durch einen charakteristischen, zweiphasigen Entwicklungszyklus gekennzeichnet sind. Dieser Entwicklungszyklus wechselt zwischen zwei morphologisch verschiedenen Formen, dem Elementarkörper (Elementary Body = EB) und dem Retikularkörper (Reticulate Body = RB). Chlamydien sind nicht zu einem vollständigen Energiemetabolismus in der Lage und ihnen fehlen einige Biosynthesepathways, weshalb sie von einer Versorgung mit ATP und anderen Intermediaten durch ihre Wirtszelle abhängig sind.

Beschreibungen „Chlamydien-ähnlicher“ Erkrankungen des menschlichen Auges, heute als Trachom bekannt, reichen bis in die altägyptische und –chinesische Zeit zurück.

Halberstädter und von Prowazek gelang es 1907 erstmals, chlamydiale, Elementar- und Retikularkörper-beinhaltende Inklusionen in Giemsa-gefärbten, konjunktivalen Epithelzellen nachzuweisen und sie als Auslöser des Trachoms abzuleiten. Aufgrund der eingefärbten Matrix, in die die chlamydialen Partikel eingebettet waren, wurde der Mikroorganismus „*Chlamydozoa*“ (griech. chlamys: Mantel/Umhang) genannt (Halberstädter und von Prowazek, 1907; Collier *et al.*, 1990 ).

In den Jahren 1929/30 führten weit verbreitete Ausbrüche einer von Papageien ausgehenden, Psittakose genannten, atypischen, oftmals schweren Pneumonie des Menschen zur Entdeckung des für die Chlamydien charakteristischen, biphasischen Entwicklungszyklus (Bedson and Bland, 1932). Jedoch konnte erst 1965 mit dem Aufkommen von Zellkulturtechniken und der Elektronenmikroskopie eindeutig geklärt werden, dass Chlamydien den Eubakterien und nicht den Viren zuzuordnen sind (Moulder, 1966). Im Jahre 1966 wurde schließlich durch Page die Gattung *Chlamydia* eingeführt. (Page, L. A., 1966). Bis in die späten 1990er Jahre bestand die Ordnung *Chlamydiales* aus nur einer Familie und einer Gattung (*Chlamydiaceae* und *Chlamydia*) mit den vier Spezies *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia psittaci* (Page, 1968) sowie *Chlamydia pneumoniae* (Grayston *et al.*, 1989) und *Chlamydia pecorum* (Fukushi, H. and K. Hirai, 1992). Phylogenetische Analysen der 16S - und 23S rRNA führten schließlich zu einer neuen Taxonomie der Ordnung *Chlamydiales* (Everett *et al.*, 1999), die die Familie *Chlamydiaceae* in die zwei Gattungen *Chlamydia* und *Chlamydophila* teilt, welche insgesamt neun Spezies beinhalten (Abb. 1). Desweiteren wurde die Ordnung

*Chlamydiales* um die drei neue Familien *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae* erweitert.

Die Ordnung *Chlamydiales* ist unter den Abteilungen der *Bacteria* einzigartig, da keines ihrer Mitglieder zu extrazellulärem Leben in der Lage ist. Alle Mitglieder der Ordnung *Chlamydiales* weisen eine 80-90%ige 16S rRNA Sequenzhomologie auf.

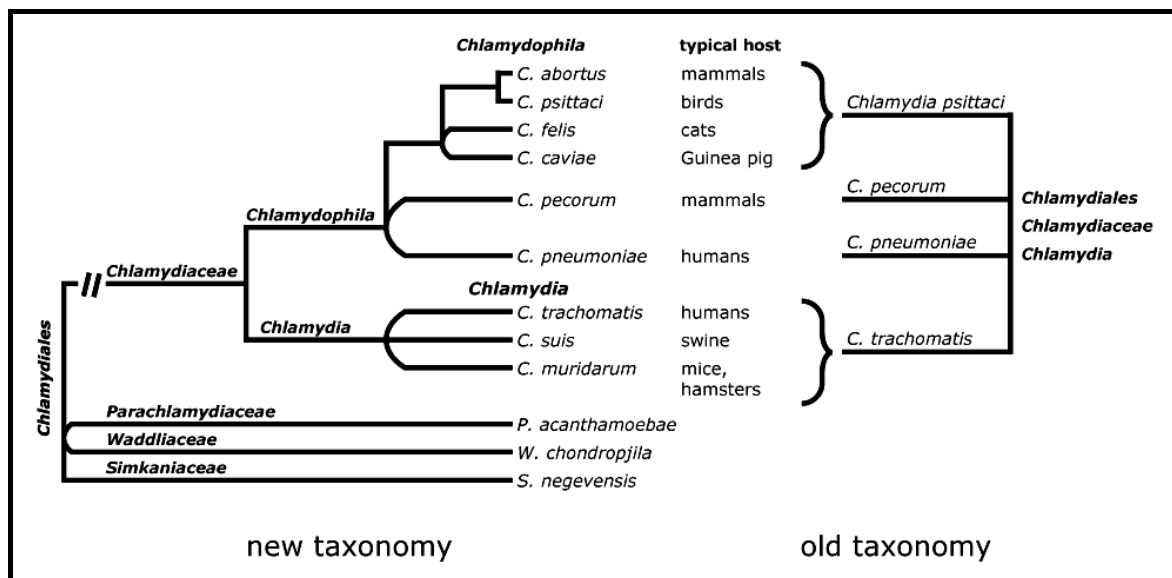
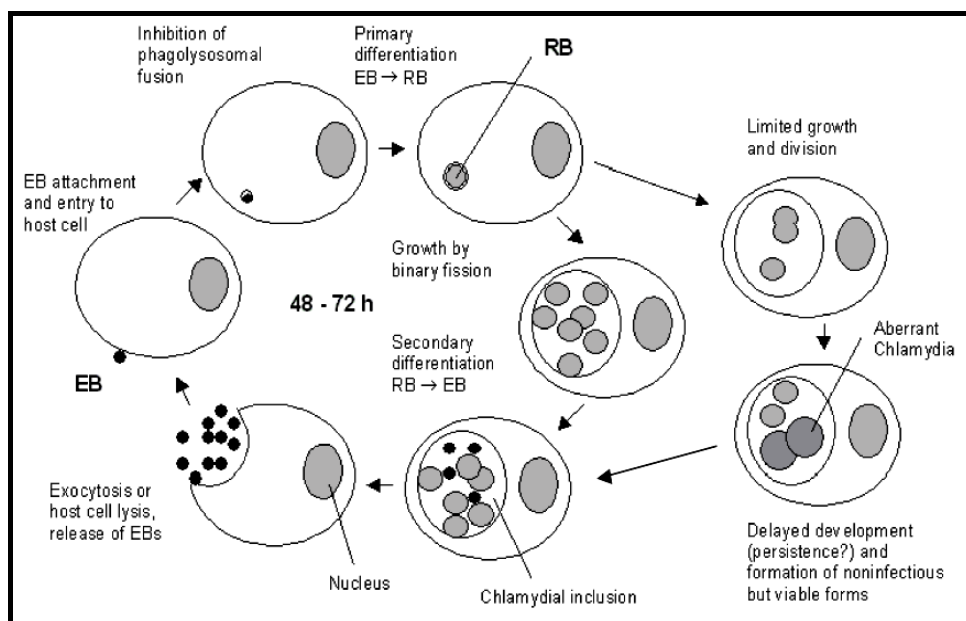


Abb. 1: Genetische Struktur der Ordnung Chlamydiales ( nach Bush R. M., Everett D. E., 2001). Dargestellt ist die neue Klassifizierung mit insgesamt 9 Spezies im Vergleich zur alten Klassifizierung, die 4 Spezies beinhaltete.

## 1.2 Lebenszyklus

Chlamydien haben erfolgreich eine intrazelluläre Lebensweise etabliert und mussten dabei eine Reihe von Hindernissen wie Eintritt in die Wirtszelle, Existenz und Vermehrung in der Wirtszelle sowie Überleben während des Übergangs auf einen neuen Wirt bewältigen. Um diese Hindernisse zu überwinden, haben Chlamydien einen Lebenszyklus entwickelt, der sich durch zwei unterschiedliche funktionelle und morphologische Formen auszeichnet (Abb. 2). Die infektiöse, extrazelluläre Entwicklungsform wird als Elementarkörper (Elementary Body) bezeichnet, ist zirka 0,3 µm groß, trägt ein stark kondensiertes Genom und ist metabolisch inaktiv. Die intrazelluläre, replikative Entwicklungsform nennt man Retikularkörper (Reticulate Body). Diese sind ca. 1 µm groß und gekennzeichnet durch eine aufgelockerte Chromatinstruktur, metabolische Aktivität und das Fehlen von Infektiosität.

Der chlamydiale Entwicklungszyklus wird durch die Anheftung und Aufnahme eines EBs durch die eukaryotische Wirtszelle initiiert, was die Beteiligung bakterieller Liganden und Wirtszellrezeptoren erfordert. Dabei werden verschiedenen Oberflächenmolekülen wie z. B. dem MOMP, dem HSP70, dem OmcB oder Glykosaminoglykanen (GAG) eine wichtige Rolle bei der chlamydialen Anheftung an die Wirtszelle zugeordnet (Hackstadt *et al.*, 1985; Bavoil *et al.*, 2000; Fadel und Elay, 2007; Wuppermann *et al.*, 2001). So binden die Heparansulfat-ähnlichen Glykosaminoglykane auf der Oberfläche der EBs z. B. Wirtszell-Fibronektin (Kleba *et al.*, 2002). Für die Aufnahme der Chlamydien in die Wirtszelle wird je nach Spezies und Zelltyp Phagozytose (Finlay & Cossart, 1997) und Rezeptor-vermittelte Endozytose (Hodinka *et al.*, 1988) diskutiert. Die internalisierten Chlamydien verbleiben während ihres gesamten Entwicklungszyklus in einer Membranhüllten Vakuole (Phagosom), welche Einschlusskörper (Inklusion) genannt wird und nicht mit Lysosomen fusioniert. Die Hemmung der Fusion mit Lysosomen scheint durch chlamydiale Oberflächenproteine vermittelt zu sein und ist abhängig vom Vorhandensein lebender chlamydialer EBs (Eissenberg *et al.*, 1983).



**Abb. 2: Chlamydialer Lebenszyklus (modifiziert nach Beatty *et al.*, 1994)**

Kurz nach der Internalisierung beginnen sich die EBs zu reorganisieren und differenzieren zu RBs, welche wachsen und sich durch Zweiteilung vermehren. Später im Entwicklungszyklus stoppt die Vermehrung der RBs in den Einschlusskörpern und die RBs beginnen wiederum, sich zu EBs zu differenzieren, welche dann durch Lyse oder Exozytose (Moulder, 1991) aus der eukaryotischen Wirtszelle freigesetzt werden, um

Nachbarzellen zu infizieren und somit einen neuen Infektionszyklus zu initiieren. Je nach Chlamydienart beträgt die Dauer des Entwicklungszyklus, wie in Zellkulturmodellen bestimmt, zwischen ca. 48-72 Stunden.

Alternativ dazu kann die Infektion auch in einem Persistenzstadium verharren. Persistenz wird durch verschiedene Bedingungen induziert und führt zu Lebensformen mit stark veränderter Morphologie (siehe Abschnitt 1.4). Die Bakterien können auf unbestimmte Zeit in der persistenten Lebensform verbleiben, treten nach Wegfall der Persistenzinduktoren aber wieder in den akuten Entwicklungszyklus über.

### 1.3 Chlamydien-assoziierte Erkrankungen

Chlamydien infizieren verschiedene Wirte und verschiedene Zelltypen und rufen ein breites Erkrankungsspektrum bei Mensch und Tier hervor. *C. trachomatis* und *Cp. pneumoniae* sind vorwiegend humanpathogene Erreger (Schachter J., 1989; Kuo *et al.*, 1995), obwohl bei *Cp. pneumoniae* auch Stämme aus Frosch, Pferd und Koala isoliert werden konnten (Bodetti *et al.*, 2002; Berger *et al.*, 1999; Wardrop *et al.*, 1999). *Cp. psittaci* dagegen infiziert eine Vielzahl verschiedener Wirte wie z. B. Vögel und Säugetiere, u. a. auch den Menschen.

Neben den gut mit Antibiotika zu therapierenden akuten, produktiven Infektionen können Chlamydien eine Reihe chronischer Erkrankungen auslösen bzw. ihre Beteiligung an diesen chronischen Erkrankungen wird angenommen. Hierbei wird ein Vorliegen des Erregers im Persistenzstadium diskutiert

#### 1.3.1 *Chlamydophila psittaci*

*Cp. psittaci* ist der Erreger der Psittakose bzw. Ornithose. Als Reservoir von *Cp. psittaci* sind vor allem Vögel und viele Haustiere (z. B. Katzen, Hunde, Ziegen, Schafe, Kühe) zu nennen. Stämme von Vögeln, insbesondere Psittaciden (Papageienartige) weisen eine höhere Humanpathogenität auf als Stämme anderer Tierarten. Vögel, vor allem auch Nutzgeflügel wie z. B. Truthühner oder Enten, aber auch Tauben spielen als Infektionsquelle für den Menschen die wichtigste Rolle (daher auch der Begriff „Ornithose“). *Cp. psittaci* kommt bei infizierten Tieren in respiratorischen Sekreten, Exkrementen und Federn vor und kann bei Raumtemperatur selbst bei Austrocknung ca. 4 Wochen infektiös bleiben. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt aerogen, aber auch durch unmittelbare Berührung der Vögel, sehr selten hingegen von Mensch zu Mensch. Infizierte Vögel können asymptomatisch oder auch schwer erkrankt sein. Sie scheiden den

Erreger mit dem Kot aus. Unbehandelt werden ca. 10 % der infizierten Vögel zu chronischen, asymptomatischen Trägern.

Die Übertragung der Infektion von Vögeln auf den Menschen führt zu fieberhaften Erkrankungen, die durch Pneumonien und systemische Manifestationen charakterisiert sein können. Das klinische Bild kann außerordentlich vielfältig sein und neben der Lunge fast jedes Organ betreffen. Die Pneumonien sind häufig durch einen plötzlichen Beginn mit Schüttelfrost, hohem Fieber, trockenem Husten, Bradykardie und Kopfschmerzen gekennzeichnet. Der Schweregrad reicht von leichten Erkrankungen bis zu tödlich verlaufenden systemischen Infektionen, bei denen respiratorische Symptome im Vordergrund stehen. Systemische Manifestationen sind seltener, sie sind vorwiegend durch Fieber, Husten, Kopfschmerzen, Muskel- und Gelenkschmerzen, Hepatomegalie, gastrointestinale Beschwerden und Bewusstseinsstörungen gekennzeichnet. Aber auch Erkrankungsbilder wie Endokarditis, Myokarditis, Perikarditis, Enzephalitis, reaktive Arthritis und Konjunktivitis sind möglich. In einer Reihe von Publikationen wird außerdem eine Assoziation von *Cp. psittaci* mit der Entstehung von okularen adnexalen MALT Lymphomen diskutiert, wobei geographische Unterschiede aufzutreten scheinen (Ferreri *et al.*, 2004; Mulder *et al.*, 2006; Chanudet *et al.*, 2006).

Die bis zum 31.12.2000 in Deutschland meldepflichtige Zoonose „Ornithose“ (Psittakose) wurde in den letzten Jahren in Deutschland nur relativ selten gemeldet (1999: 107 Erkrankungen, 2000: 86 Erkrankungsfälle; Quelle: Robert-Koch-Institut, Berlin), jedoch scheint die Dunkelziffer der Erkrankungsfälle höher zu sein.

### **1.3.2 *Chlamydophila pneumoniae***

*Cp. pneumoniae* wurde erst 1989 anhand des TWAR-Stammes als eigenständige Spezies klassifiziert und bis dahin der Art *Chlamydia psittaci* untergeordnet (Grayston *et al.*, 1989). Erregerreservoir für *Cp. pneumoniae* ist der Mensch. Animale *Cp.-pneumoniae*-Biovare (Pferd, Koala, Frosch) sind wahrscheinlich für menschliche Erkrankungen nicht von Bedeutung. *Cp. pneumoniae* wird auf aerogenem Weg und durch Speichelkontakt von Mensch zu Mensch übertragen

Das klinische Spektrum von *Cp.-pneumoniae*-Infektionen umfasst akute Pharyngitiden, Sinusitiden, Bronchitiden und Pneumonien. Am häufigsten sind asymptomatische Infektionen oder leichter verlaufende atypische Pneumonien und Bronchitiden. Grundsätzlich können alle Symptome auftreten, die auch durch *Cp. psittaci*-Infektionen verursacht werden können; in sehr seltenen Fällen werden eine Endokarditis, Myokarditis,

Meningoradikulitis, Erythema nodosum oder reaktive Arthritis durch *Cp. pneumoniae* verursacht. Eine mögliche Rolle von *Cp.-pneumoniae*-Infektionen in der Pathogenese von chronischen Erkrankungen wie z. B. der Arteriosklerose (Hammerschlag, 1998), Multipler Sklerose (Hammerschlag *et al.*, 2005) oder Alzheimer'scher Erkrankung (Balin *et al.*, 1998) wird seit einiger Zeit kontrovers diskutiert.

### 1.3.3 *Chlamydia trachomatis*

Die Spezies *C. trachomatis* läßt sich in die zwei Biovarianten (Biovare) Trachoma und Lymphogranuloma venerum (LGV) unterteilen. Diese Biovare lassen sich ihrerseits wieder in verschiedene Serovarianten (Serovare) unterscheiden. *C. trachomatis trachoma* wird in die 14 Serovare A bis K, einschließlich Ba, Da und Ia eingeteilt (Wang & Graystone, 1990) und *C. trachomatis* LGV in die vier Serovare L1, L2, L2a und L3.

Erregerreservoir für *C. trachomatis* ist nur der Mensch. Eine Übertragung ist durch sexuellen Kontakt sowie perinatal möglich (Serovare D-L). Weiterhin kann der Erreger durch infektiöses Augensekret (Fliegen und Schmierinfektionen) und durch die Hände übertragen werden (Serovare A-C). Die Serovare von *C. trachomatis* lösen verschiedene Erkrankungen aus:

Die Serovare A - C verursachen das Trachom, eine in den Tropen verbreitete chronisch rezidivierende Erkrankung der Bindehäute und der Hornhaut, die den häufigsten Grund für vermeidbare Erblindungen mit über 400 Millionen Infizierten weltweit und geschätzten 6 Millionen Erblindeten darstellt.

Die D-L Serovare von *C. trachomatis* gehören weltweit zu den häufigsten Erregern sexuell übertragbarer Erkrankungen (STD - sexually transmitted disease) sowie, nach perinataler Übertragung, von Neugeborenen-Infektionen. Bei Männern bildet *C. trachomatis* die häufigste Ursache der nicht-gonorrhoeischen Urethritis, die sich durch Aszendenz zu einer Prostatitis oder Epididymitis entwickeln kann. Bei Frauen manifestiert sich eine *C. trachomatis*-Infektion gewöhnlich als Zervizitis. Davon ausgehend kommt es häufig zur Aszendenz der Erreger in den oberen Genitaltrakt. Als Folge dessen kann sich eine Salpingitis, auch als PID (pelvic inflammatory disease) bezeichnet, entwickeln. Andere folgenschwere Manifestationen neben der PID sind eine tubenbedingte Infertilität oder eine ektopische Schwangerschaft (Cates & Wasserheit, 1991). Eine weitere Komplikation chlamydialer Urogenitalinfektionen ist die Entwicklung einer reaktiven Arthritis in 1 – 3% der Krankheitsfälle (Keat *et al.*, 1979).

Die *C. trachomatis* Serovare L1, L2 und L3 verursachen das Lymphogranuloma venereum, eine sexuell übertragbare Krankheit, die vorwiegend in den Tropen vorkommt.

## 1.4 Persistenz

Der Begriff „Persistenz“ beschreibt die Langzeitbeziehung zwischen Chlamydien und ihren Wirtszellen, in denen die Chlamydien zwar lebend aber nicht kultivierbar vorliegen. (Beatty *et al.*, 1994b). „Persistenz“ bezeichnet die Abwesenheit einer produktiven Chlamydieninfektion, was die Präsenz der Chlamydien in einer veränderten intrazellulären morphologischen Form annehmen lässt.

Wesentliche Merkmale einer persistenten Chlamydieninfektion sind dabei die aberrante Morphologie der Chlamydien, der Verlust der Infektiosität, die Möglichkeit einer Reaktivierung aus dem Persistenzstadium und ein verändertes transkriptionelles und translationelles Profil der Chlamydien.

Persistente *Chlamydia (Chlamydophila)* spp. entwickeln sich nicht zu normalen RBs sondern bilden in einer kleineren Inklusion einzelne größere und diffuse „aberrante“ Körperchen (AB = Aberrant Body) mit einer insgesamt veränderten metabolischen Aktivität aus. Da sich die ABs nicht zu infektiösen EBs differenzieren und die Wirtszelle nicht lysieren, sind persistente Infektionen nicht produktiv. (Beatty *et al.*, 1994b; Gerard *et al.*, 2002; Mathews *et al.*, 2001; Byrne *et al.*, 2001; Belland *et al.*, 2003b).

### 1.4.1 Persistenz und chronische Erkrankungen

Chronische Infektionen sind charakteristisch für die Spezies in der Familie der *Chlamydiaceae*. Sie folgen einer akuten Infektion, können sich über Jahre oder sogar Jahrzehnte erstrecken und sind verantwortlich für die am schwierigsten zu behandelnden Erkrankungen, die mit Chlamydien assoziiert werden. Chronische Infektionen mit *Cp. pneumoniae* z. B. werden mit einer Vielzahl respiratorischer und systemischer Krankheiten wie Asthma, Arteriosklerose oder Alzheimer'scher Krankheit in Verbindung gebracht und infektionsbiologisch mit dem sogenannten Persistenzstadium der Bakterien erklärt (Hammerschlag *et al.*, 2005). Sie induzieren eine permanente, unterschwellige Aktivierung der Immunantwort und können somit zu schwelenden Entzündungen und Gewebsschädigungen über längere Zeit hinweg führen.

### **1.4.2 In-vitro-induzierte Persistenzarten**

Für das Studium der Persistenz *in vitro* wurden bisher verschiedene Zellkultur-Modelle etabliert. Spontan und irreversibel persistent verlaufen Infektionen von *Cp. pneumoniae* in Fibroblasten-ähnlichen, synovialen Zellen oder peripheren Blutmonozyten (PBMC) (Koehler *et al.*, 1997; Airene *et al.*, 1999). Auch in Epithelzellen, dem Standardmodellsystem für akute Infektionen, führt die über einen längeren Zeitraum fortgesetzte Infektion bei einem kleinen Teil der Inklusionen zu einem Persistenz-Phänotyp.

Vollständige Persistenz in epithelialen Zellen erreicht man durch suboptimale Kulturbedingungen wie Nährstoffmangel (z. B. Glucose, Eisen, Aminosäuren), Antibiotikabehandlung oder die Zugabe inflammatorischer Cytokine wie z. B. TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  (Byrne *et al.*, 1986; Summersgill *et al.*, 1995). Die dabei benötigten Konzentrationen können sich je nach Chlamydienspezies, Stamm und auch verwendeter Wirtszelle unterscheiden.

#### **1.4.2.1 Eisenmangel**

Eisen ist ein essentielles Element für fast alle Mikroorganismen. Als generelle Verteidigungsstrategie gegen pathogene Erreger haben höhere Eukaryoten daher effektive Wege gefunden, die frei zugängliche Eisenmenge in allen Geweben gering zu halten. Sie erreichen dies mit Hilfe hochaffiner, intra- und extrazellulärer, komplexierender Trägerproteine wie Transferrin, Ferritin und Laktoferrin, deren Bindungsaffinitäten für das wasserlösliche, reduzierte Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) unterhalb des  $\text{Fe}^{2+}$ -Schwellenwertes liegen, den Bakterien zum Wachstum benötigen (Weinberg, 1984; Ratledge und Dover, 2000).

Eine Verminderung der Eisenkonzentration im Wachstumsmedium allein oder verstärkend mit anderen Induktoren kann die Persistenz bei Chlamydien auslösen (Igietseme *et al.*, 1998). Bei Zusatz des Eisen-Chelators Deferoxamin-Mesylat (DAM) verharret der Entwicklungszyklus der Chlamydien und es kommt zur Ausbildung von ABs, die durch Entfernen des Chelators wieder reaktiviert werden und die Chlamydien somit wieder in den produktiven Infektionszyklus eintreten können (Al Younes *et al.*, 2001).

#### **1.4.2.2 IFN- $\gamma$**

Das am häufigsten angewendete in-vitro-Persistenzmodell ist die Gabe des inflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$ .



IFN- $\gamma$  induziert die Expression des Wirtszell-Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), welche den Indolaminring von L-Tryptophan spaltet und so die Konzentration der freien Aminosäure in der Zelle herabsetzt. Darüber hinaus reduziert IFN- $\gamma$  die Tryptophan-Verfügbarkeit für die Bakterien, indem es die humane *trp*-tRNA Synthetase hochreguliert, die nur von der Wirtszelle als Tryptophanquelle verwendet werden kann (Takikawa *et al.*, 1988; Flohr *et al.*, 1992). Einhergehend mit einer verminderten Tryptophanmenge durch die Gabe von IFN- $\gamma$  ist auch die Beobachtung, dass ein Überschuss an Tryptophan im Wachstumsmedium den Einfluss von IFN- $\gamma$  revertiert und den Chlamydien die Rückkehr in den produktiven Lebenszyklus ermöglicht (Beatty *et al.*, 1995). Neben dem Einfluss auf den Tryptophan-Haushalt gibt es eine weitere Erklärung für den IFN- $\gamma$ -Wirkmechanismus in der Wirtszelle. So wurde eine Aktivierung der induzierbaren Stickstoff-Monoxid (NO)-Synthase nachgewiesen, was zur Produktion von NO und anderer reaktiver Stickstoffspezies (RNS) mit bakterioziden Eigenschaften führt. NO bindet als freies Radikal mit hoher Affinität an Eisenatome und inhibiert so die Aktivität zahlreicher Enzyme, die Eisen als Kofaktor enthalten (Igietseme, 1996). Weiterhin wird durch IFN- $\gamma$  der verfügbare Eisengehalt der Zelle durch Drosselung der Transferrin-Rezeptor-Synthese vermindert (Byrd und Horwitz, 1993).

#### **1.4.2.3 Antibiotika**

Antibiotika, welche die DNA- oder Peptidoglykan-Synthese beeinflussen, können die Zweiteilung der RBs und somit eine Umwandlung in EBs inhibieren und dadurch zur Persistenz führen. Das klassischste Beispiel für eine Antibiotika-induzierte Persistenz ist die Gabe von Penicillin G.

In einer Studie von Rupp *et al.* (2004) konnte jedoch auch gezeigt werden, dass suboptimale Konzentration von antichlamydialen Antibiotika wie z. B. Ciprofloxacin, Doxycyclin, Erythromycin oder Rifampin Persistenz hervorrufen, womit eine unzureichende Therapie zu Beginn einer Infektion zur späteren Unempfindlichkeit gegenüber der weiteren Antibiotika-Behandlung führen kann.

#### **Penicillin G**

Bereits 1970 beschrieben Matsumoto und Manire die Auswirkung von Penicillin auf die chlamydialen RBs, was die Ausbildung großer, abnormer RBs und eine Teilungsunfähigkeit beinhaltete. Zu dieser Zeit war der Begriff Persistenz für diese aberrante, chlamydiale Form jedoch noch nicht geprägt.

Obwohl Chlamydien über ein komplettes Genset zur Synthese von Peptidoglykan verfügen (Chopra *et al.*, 1998), findet sich nur wenig bzw. kein Peptidoglykan in ihrer Zellwand. Bisher konnte erst in einer Studie gezeigt werden, dass chlamydiale Elementarkörper Spuren von Peptidoglykan in ihrer Zellwand aufweisen (Sue *et al.*, 1985). Diese werden aber als zu gering erachtet, als dass sie einen konventionellen Peptidoglykan-Sacculus, der Strukturstabilität verleiht, ausbilden könnten (Moulder *et al.*, 1993). Die Beobachtung, dass RBs kein nachweisbares Peptidoglykan besitzen, basiert bisher nur auf einer Studie (Garrett *et al.*, 1974) und ist deshalb ebenso kritisch zu betrachten. Trotz des Fehlens nachweisbarer Mengen an Peptidoglykan zeigt Penicillin einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die Zweiteilung der chlamydialen RBs (Barbour *et al.*, 1982; Moulder *et al.*, 1993) mit Ausnahme von *Simkania*. Durch die Inhibition der Zweiteilung der RBs wird eine Umwandlung der RBs zu EBs verhindert und chlamydiale Persistenz ausgelöst. Als Angriffsziel für das Penicillin werden Penicillinbindeproteine (PBPs) diskutiert (Barbour *et al.*, 1982, Moulder *et al.*, 1993), welche sowohl in EBs als auch in RBs vorhanden sind, wobei die Zugänglichkeit der PBPs in den RBs aber höher sein soll (Barbour *et al.*, 1982). Moulder (1993) stellte dabei die Hypothese auf, dass das Penicillin die Transpeptidase- oder Carboxypeptidase-Aktivität der PBPs inhibiert. Der genaue Mechanismus, der dieser Penicillin-ausgelösten Persistenz zugrunde liegt, ist jedoch weiterhin ungeklärt.

### **1.4.3 In-vivo-Persistenz**

Erste Vermutungen, dass Chlamydien in der Lage sind, persistente Infektionen in ihrem Wirt hervorzurufen, gehen auf die frühen Beschreibungen der latenten Psittakose in Vögeln zurück (Meyer & Eddie, 1933). Die Annahme vom Vorliegen persistenter Formen *in vivo* stammt hauptsächlich aus experimentellen Tiermodellen und klinischen Daten humaner Erkrankungen. Verschiede Beobachtungen führten dabei zum Schluss, dass chlamydiale Persistenz kein reines in-vitro-Phänomen ist.

So konnten in Synovialmembranen von Patienten mit *C. trachomatis*-assoziiierter RA elektronenmikroskopisch aberrante, chlamydiale Formen beobachtet werden, die den in-vitro erzeugten, aberranten RBs gleichen (Nanagara *et al.*, 1995). In Aortenklappen-Proben von Patienten mit einer degenerativen Aortenklappenstenose wurden ebenfalls aberrante Formen von *Cp. pneumoniae* gefunden, die jenen aus in-vitro-Modellen ähneln (Skowasch *et al.*, 2003). Weiterhin können chlamydiale Makromoleküle wie z. B. DNA, RNA und Antigen aus erkranktem Gewebe in Abwesenheit anzüchtbarer Organismen isoliert werden, was auf ein Vorliegen des Erregers im Persistenzstadium hindeutet. Chlamydiale

RNA konnte z. B. in experimentell induzierten Trachomen von Primaten und in Biopsien von Patienten mit Reiter-Syndrom detektiert werden (Gerard *et al.*, 1998; Rahman *et al.*, 1992). Auch konnte die Reaktivierung persistenter Chlamydien *in vivo* gezeigt werden. Patienten aus Trachom-Endemiegebieten mit einer akuten *C. trachomatis*-Augeninfektion im Kindesalter entwickelten Jahre nachdem sie das Endemiegebiet verlassen hatten ein Trachom, was die Reaktivierung einer persistenten Infektion wahrscheinlicher macht als eine Reinfektion (Thygeson, 1963).

Ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein persistenter chlamydialer Formen *in vivo* stammt aus molekularbiologischen Untersuchungen. Hier konnten z. B. Ähnlichkeiten bezüglich der chlamydialen Gen- und Proteinexpression zwischen persistenten Zellkulturen und Gewebeproben chronisch infizierter Patienten gezeigt werden (Gérard *et al.*, 2001).

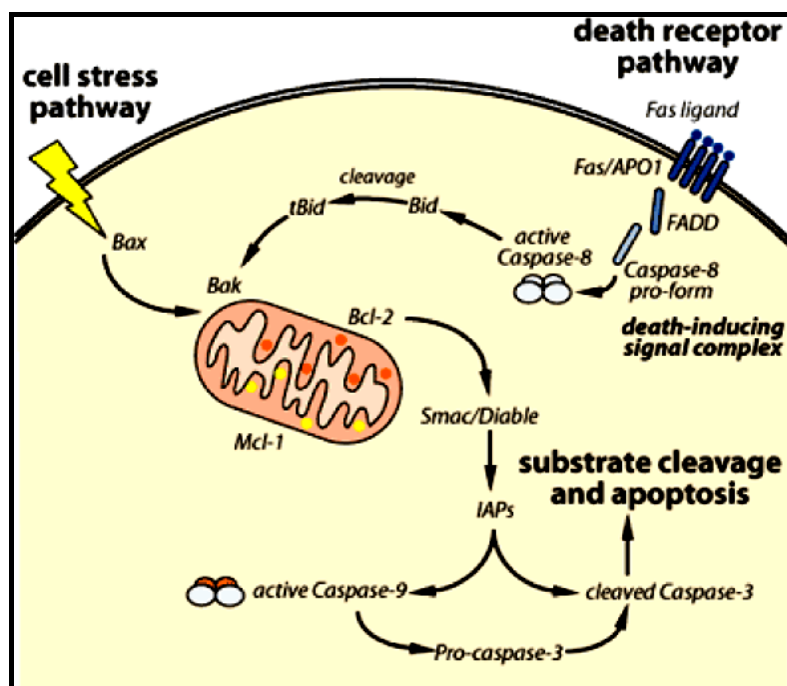
## 1.5 Chlamydien und Apoptose

Eine wichtige Strategie, die Chlamydien entwickelt haben, um ihr Überleben in der Wirtszelle zu sichern, ist die Modulation der Wirtszellapoptose.

Unter Apoptose versteht man einen genetisch kontrollierten Mechanismus des Zelltodes, der in die Regulation der Gewebe-Homöostase involviert ist und somit eine regulatorische Funktion während Entwicklung und Erhalt des Organismus besitzt. Dieser Zelltod wird der Nekrose gegenüber gestellt, bei der die Zelle aufgrund von Schädigungen der Zellmembran platzt und Zytoplasma ausfließt, was zu einer Entzündungsreaktion führt (Kerr *et al.*, 1972; Kanduc *et al.*, 2002). Der Prozeß der Apoptose ist morphologisch gekennzeichnet durch Zellschrumpfung, Membranamformung und Bläschenbildung, Chromatinkondensation, DNA-Fragmentation und Verpackung dieser Fragmente in apoptotische Körperchen (Kerr *et al.*, 1972). Diese apoptotischen Körperchen werden von Nachbarzellen und Makrophagen mittels Oberflächenproteinen und ausgestülpten Phosphatidylserinen erkannt und abgebaut ohne dabei Entzündungsreaktionen auszulösen (Wyllie *et al.*, 1980). Je nach Zelltyp und Auslöser existieren zwei verschiedene Mechanismen, nach denen Apoptose in der Zelle ablaufen kann, der extrinsische und der intrinsische Weg (Abb. 3). Das gemeinsame Ziel der unterschiedlichen, Apoptose-auslösenden Wege ist die Initiierung der Caspase-Kaskade, die ihrerseits den Zelltod einleitet.

Im extrinsischen oder Rezeptor-vermittelten Pathway binden spezifische Signalmoleküle bzw. Liganden an transmembranale Todesrezeptoren der Zielzelle. Diese Bindung wie im Bsp. von FasL an den Fas-Rezeptor, führt zu einer Rezeptoraggregation (Chinnaiyan *et al.*,

1995), was Adaptorproteine wie das FADD (Fas-associated death domain protein) an die zytoplasmatische Seite des Rezeptorkomplexes rekrutiert. FADD rekrutiert dann seinerseits die Initiator-Caspase-8 und diese beiden bilden den Death-inducing-Signal-Complex (DISC) (Muzio *et al.*, 1996). Durch die Rekrutierung wird Caspase-8 in seine aktive Form gespalten und kann nun seinerseits durch proteolytische Spaltung die Effektor-Caspase-3 aktivieren. Caspase-3 initiiert dann die Spaltung zellulärer und nukleärer Substrate (z. B. Laminine, Proteine des Cytoskeletts, Nuklease-bindende Proteine) und somit die Vollendung der Apoptose.



**Abb. 3. Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Pathways der Zelle ( nach Yau P., 2004)**

Der intrinsische Pathway bzw. mitochondriale Weg wird durch zellulären Stress, speziell mitochondrialen Stress, der durch DNA-Schädigung oder beispielsweise Hitzeschock ausgelöst wird, angeschaltet. Nach einem Apoptosestimulus binden proapoptotische Proteine im Zytoplasma, wie das Bax und Bid, an die äußere Mitochondrienmembran, um die Freisetzung von Cytochrom-c zu stimulieren. Dazu wird ein weiteres proapoptotisches Protein, das Bak, benötigt, welches in den Mitochondrien lokalisiert ist. Nach der Freisetzung aus den Mitochondrien bildet das Cytochrom-c im Zytoplasma der Zelle einen Komplex mit ATP und Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) und aktiviert die Initiator-Caspase-9. Die aktivierte Caspase-9, das Cytochrom-c, ATP und Apaf-1 bilden das Apoptosom, welches wiederum Caspase-3 aktiviert.

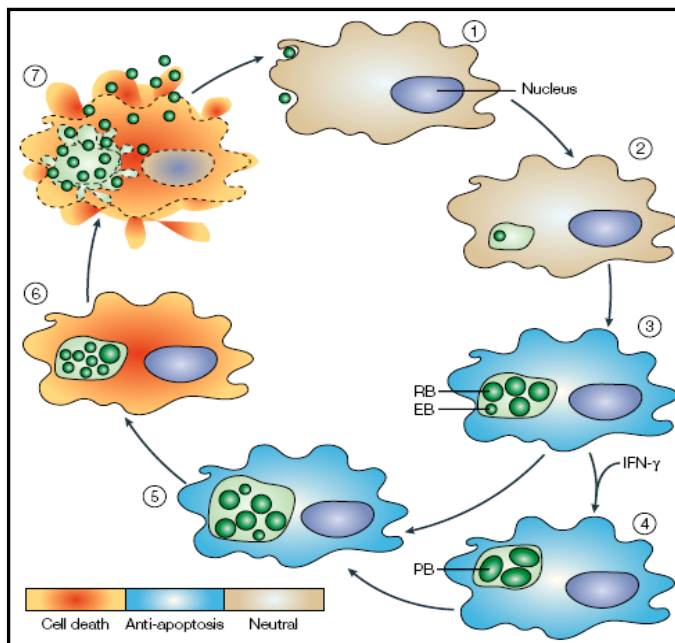
Neben dem Cytochrom-c wird aus den Mitochondrien auch AIF (apoptosis inducing Factor) freigesetzt, welches die DNA-Fragmentation begünstigt sowie Smac/Diablo, welches die Mitglieder der IAP (Inhibitor of Apoptosis)-Familie hemmt, die ihrerseits Caspasen inhibieren. Eine Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Weg besteht über das Bid, welches durch die aktive Caspase-8 in tBid (truncated Bid) gespalten wird und daraufhin an die Mitochondrienmembran binden kann.

Die Steuerung der Apoptose ist eine Strategie der Wirtszelle, die mikrobielle Infektion und Replikation zu verhindern bzw. zu beseitigen (Finlay & Cossart, 1997). Deshalb spielen die Möglichkeiten der Pathogene zur Inhibition oder Induktion der Apoptose eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Infektion und für das Überleben innerhalb der Wirtszelle. Für Chlamydien konnte bisher gezeigt werden, dass sie je nach Spezies und Zeitpunkt im Entwicklungszyklus (Abb. 4) in der Lage sind, Apoptose sowohl zu stimulieren (Gibellini *et al.*, 1998; Ojcius *et al.*, 1998; Ying *et al.*, 2006) als auch zu inhibieren (Fan *et al.*, 1998; Ojcius *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 2001). Dabei können Chlamydien sowohl über Caspase-unabhängige (Yarai *et al.*, 2005; Perfettini *et al.*, 2002a) als auch über Caspase-abhängige Prozesse (Fan *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 2004) die Wirtzellapoptose modulieren.

Für *C. trachomatis* konnte z. B. gezeigt werden, dass in infizierten, Apoptosestimuli ausgesetzten Wirtszellen die Caspase-3-Aktivierung sowie Cytochrom-c-Freisetzung aus den Mitochondrien gehemmt wird und somit die induzierte Apoptose inhibiert wird (Fan *et al.*, 1998). Dieselbe Hemmung der Caspase-3-Aktivierung und Cytochrom-c-Freisetzung konnte auch in Apoptose-stimulierten *Cp.-pneumoniae*-infizierten Wirtszellen gefunden werden (Fischer *et al.*, 2001). Als weiterer antiapoptotischer Mechanismus und Erklärung der Hemmung der Cytochrom-c-Freisetzung konnte die Hemmung der Bax- und Bak-Aktivierung in Chlamydien-infizierten Zellen beschrieben werden (Xiao *et al.*, 2004, Zhong *et al.*, 2006). Desweiteren zeigten Dong und Kollegen (2005) sowie Ying und Mitarbeiter (2005), dass eine *C.-trachomatis*-Infektion zum Abbau proapoptotischer BH3-only Proteine führt, was somit auch eine Hemmung der Cytochrom-c-Freisetzung zur Folge hat.

Neben diesen Beschreibungen der chlamydialen antiapoptotischen Aktivität wurden auch Mechanismen der Apoptoseinduktion durch Chlamydien beschrieben. In *C.-trachomatis* L2- und *Cp.-caviae*-infizierten Zellen z. B. konnte eine Caspase-unabhängige Apoptoseinduktion festgestellt werden, die im Falle von *Cp. caviae* mit einer Aktivierung von Bax und Translokation zu den Mitochondrien einhergeht (Perfettini *et al.*, 2002).

Sowohl die Apoptoseinduktion als auch –inhibition scheint dabei abhängig von der chlamydialen Proteinsynthese zu sein (Schoier *et al.*; 2001, Fan *et al.*, 1998). Bisher wurden aber erst zwei chlamydiale Proteine entdeckt, die direkt mit einer Apoptosemodulation in Verbindung gebracht werden konnten: Zum einen das chlamydiale CPAF (Chlamydial Protease- or Proteasome-like Activity Factor), welches proapoptische BH3-only-Proteine degradiert und somit zu einer Apoptose-Inhibition führt (Pirbhai *et al.*, 2006), zum anderen das chlamydiale CADD (Chlamydia protein Associating with Death Domains), welches durch Interaktion mit Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie zur Apoptosemodulation beitragen soll (Stenner-Liewen *et al.*, 2002).



**Abb.4: Apoptoseverhalten während der verschiedenen Stadien des chlamydialen Entwicklungszyklus (aus Byrne and Ojcius, 2004).** Dargestellt ist der chlamydiale Entwicklungszyklus inclusive Persistenzstadium. (1) Anheftung an die Wirtszelle, (2) Internalisierung, (3) Differenzierung zu RBs, (4) durch IFN- $\gamma$ -erzeugtes Persistenzstadium, (5) Zweiteilung und Vermehrung der RBs, (6) RB-EB-Differenzierung und (7) Freisetzung der EBs aus der Wirtszelle. Der Zeitpunkt im Entwicklungszyklus bzw. das Stadium der Chlamydieninfektion (produktives oder persistentes Stadium) beeinflusst, ob

Wirtszell-Tod initiiert wird (orange), Apoptose gehemmt wird (blau) oder die Zelle weder apoptotische noch antiapoptische Signale empfängt (braun)

### 1.5.1 Persistenz und Apoptose

Während die Modulation der Wirtszellapoptose im Laufe der akuten Infektion relativ umfangreich untersucht wurde, gibt es bezüglich des Apoptoseverhaltens in persistenten Infektionsmodellen noch vergleichsweise wenig Informationen. Es wird aber angenommen, dass eine Inhibition der Wirtszellapoptose die Ausbildung einer persistenten Chlamydieninfektion begünstigen und unterstützen kann.

Dean and Powers (2001) beschrieben eine Resistenz gegenüber Apoptose-Stimulatoren wie Staurosporin und Etoposid in einem *C.-trachomatis*-IFN- $\gamma$ -Persistenzmodell.

In einer weiteren Studie, in welcher *C. muridarum* mit IFN- $\gamma$  behandelt wurde, zeigten v. a. die *C.-muridarum*-infizierten Zellen eine Resistenz gegenüber Apoptosestimuli im Gegensatz zu uninfizierten Zellen (Perfettini *et al.*, 2002b). Weiterhin wurde im Genitaltrakt von *C.-muridarum*-infizierten WT-Mäusen eine signifikant geringere Anzahl apoptotischer Zellen gefunden als in infizierten INF- $\gamma$ -Knock-out-Mäusen, was zu der Schlussfolgerung führte, dass dieser Persistenzstimulus zur Pathogenese der persistenten chlamydialen Infektion durch Inhibierung der Apoptose beiträgt (Perfettini *et al.*, 2002b). In einer weiteren Studie mit kontinuierlichen *Cp.-pneumoniae*-Kulturen konnte nur bei 1-5 % der kontinuierlich infizierten A-549 Wirtszellen Apoptose festgestellt werden, wohingegen in 3 bis 4 Tage alten *Cp.-pneumoniae*-infizierten A-549-Zellen mit einer produktiven Infektion eine Apoptoserate von 50-80% zu verzeichnen war (Roblin *et al.*, 2002). Die Ergebnisse dieser Studien lassen also vermuten, dass in persistent infizierten Wirtszellen ein Apoptoseblock vorliegt, was somit das intrazelluläre Überleben der Chlamydien sichern könnte.

## 1.6 Zielsetzung

Die Untersuchung und Charakterisierung der chlamydialen Persistenz nimmt eine zunehmend wichtige Position in der Chlamydienforschung ein, da speziell die persistenten Chlamydieninfektionen zu einer dauerhaften Schädigung des Wirtsorganismus führen, zudem antibiotisch nur schwierig zu behandeln sind und ein Reservoir für akute Infektionen darstellen können.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten im Wesentlichen zwei Aspekte der chlamydialen Persistenz untersucht werden; zum einen die Auswirkungen auf die Chlamydie selbst und zum anderen die dabei in der Wirtszelle ausgelösten Prozesse.

Im ersten Teil der Arbeit wurden morphologische Eigenschaften und Persistenzcharakteristika sowie Genexpressionsänderungen von *Cp. psittaci* am Beispiel dreier verschiedener Persistenzmodelle untersucht. In der Literatur existieren verschiedene Arbeiten zur chlamydialen Persistenz und den damit einhergehenden Genexpressionsunterschieden im Vergleich zur akuten Infektion. Dabei wurden verschiedene Spezies, verschiedene Stämme, Wirtszellen und Persistenzmodelle verwendet (Belland *et al.*, 2003; Byrne *et al.*, 2001; Polkinghorne *et al.*, 2006; Mathews *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003; Gerard *et al.*, 2002). Diese Arbeiten beschränken sich jedoch nur auf die beiden Spezies *C. trachomatis* und *Cp. pneumoniae* und vergleichen dabei größtenteils nur ein spezifisches Persistenzmodell mit der akuten Chlamydieninfektion. Neben dabei

auftretenden Unterschieden ließen sich auch transkriptionelle Gemeinsamkeiten feststellen, welche die chlamydiale Persistenz charakterisieren können. In keiner der existierenden Arbeiten wurde jedoch *Cp. psittaci* untersucht und auch das Spektrum der Persistenzmodelle beschränkte sich vorwiegend nur auf das IFN- $\gamma$ -Modell. Die Ergebnisse dieser Dissertation unter Verwendung von *Cp. psittaci* in drei verschiedenen Persistenzmodellen sollten also dazu beitragen, genauer herausstellen zu können, welche Veränderungen spezifisch für die chlamydiale Persistenz *per se* sind, um davon die variablen, Spezies-, Stamm-, Persistenzinduktor- und Wirtszell-basierenden Veränderungen abgrenzen zu können.

Zusätzlich zu den Chlamydien-bezogenen Veränderungen sollte im zweiten Teil der Arbeit die Wechselwirkung mit der Wirtszelle bzw. die Auswirkung der persistenten Chlamydieninfektion auf ausgewählte Aspekte der Wirtszellantwort untersucht werden. Intrazelluläre Erreger sind für ihr Überleben und ihre Vermehrung auf ihr Vorliegen in der Wirtszelle angewiesen. Um das Überleben in der Wirtszelle zu sichern, interagieren sie in vielfältiger Art und Weise mit Wirtszellprozessen. Ein besonders wichtiger Aspekt für das Überleben in der Wirtszelle ist die Fähigkeit der Erreger, die Wirtzellapoptose modulieren zu können, um somit eine erfolgreiche Reproduktion zu sichern. Für produktive Chlamydieninfektionen sind die Fähigkeiten zur Apoptosemodulation je nach Spezies und Wirtszelle schon relativ gut charakterisiert. Speziell bei der persistenten und somit dauerhaften Infektion ist es aber von besonderem Interesse, ob und wodurch die Wirtzellapoptose durch die Chlamydien moduliert wird, um somit ihre Langzeitbeziehung mit der Wirtszelle und das Überleben zu sichern. Deshalb sollte im zweiten Teil der Arbeit untersucht werden, welche Auswirkungen die *Cp.- psittaci*-Persistenz auf die Apoptose der Wirtszelle hat, um diese Prozesse dann im gegebenen Fall etwas genauer charakterisieren zu können. Zusammengefasst sollten die Ergebnisse dieser Dissertation eine umfangreiche Charakterisierung der *Cp.- psittaci*-Persistenz ermöglichen, um somit zur Herausarbeitung der generellen, spezifischen Persistenzmerkmale der *Chlamydiaceae* beizutragen.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Laborausstattung

ABI 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschrank Hera <i>Cell</i>	Heraeus
Blockthermostat RT 100	Kleinfeld Labortechnik
Concentrator 5301	Eppendorf
Elektrophoresekammern für vertikale Gele	PeqLab
Digital Sonifier	Branson
EM Trim	Leica
FACSCalibur™	Becton Dickinson
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop BX-51 M	Olympus
Fluoreszenzmikroskop Axiolab	Zeiss
GelVue UV-Transilluminator	Syngene
Hyperscreen™ Photomappe	Amersham
Heißluftsterilisator	Heraeus
Labor-pH-Meter C 6840	Schott
Kühlzentrifuge 4K10	Sigma
Laminar-Box Hera <i>Safe</i>	Heraeus
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss
Magnetrührer/Heizplatte IKAMAG® RCT	IKA-Labortechnik
Mikrowelle 8018	Privileg
Mini oven	Biometra
Mini Protean II Electrophoresis System	Bio-Rad
Mastercycler	Eppendorf
MX 3000P QPCR System	Stratagene
Orbital Shaker IKA-VIBRAX-VXR	IKA Labortechnik Staufen
Power Pac	Bio-Rad
Sonorex RK 100	Bandelin
Schüttler Vibrax VXR	IKA-Labortechnik

SLT Rainbow	SLT Labinstrumente
T3 Thermocycler	Biometra
Thermomixer 5436	Eppendorf
Trans-Blot® SD	Bio-Rad
Transmissions-Elektronenmikroskop	Tecnai
Ultramikrotom Ultracut UCT-GA-DE 1/00	Leica
Vortex Genie 2™	Scientific Industries, Inc
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge <i>stratos</i>	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus
Zentrifuge Rotanta 96RS	Hettich

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Coverslipröhrchen	Dunn, bezogen über Fischer Scientific
Deckgläschen	Roth
Eppendorf-Tubes (1,7 ml)	Roth
Eppendorf-Tubes (2 ml)	Roth
Einmalfilterspitzen	Starlab
Einmalspritzen Omnifix® 5 ml	Braun
Einmalspritzennadel 22xG	Braun
FACS-Röhrchen	BD Biosciences
Kodak BioMax® XAR Film	Perkin Elmer
Kryo-Röhrchen (2 ml)	Roth
Kupfernetzchen (200 mesh)	Plano
Objektträger	Roth
Optitran BA-S 83 Reinforced NC Membran	Schleicher & Schuell
PCR-Platten, 96-Loch	Biozym
PCR-Strips, PCR-Caps	Biozym
PCR-Tubes (0,5 ml)	Eppendorf
Spritzenfilter steril, 0,2 µm	Roth
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	TPP
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner BioOne, TPP
Zellkulturplatten, 96-well	Greiner BioOne
Zellschaber	TPP

### 2.1.3 Chemikalien

Aceton	Roth
Agarose	Applichem
Araldite CY212	Serva
Ammonium Persulfat (APS)	Serva
Bleicitrat	Merck
Bromphenolblau	Roth
Borsäure	Serva
BSA	Roth
Calciumchlorid x 12 H <sub>2</sub> O	Roth
Complete Mini (protease inhibitor cocktail tablets)	Roche
Coomassie Brilliant blau G 250	Roth
DEPC	Roth
Deferoxamin Mesylat (DAM)	Sigma
Dibutylphtalat	SysKem Chemiehandel GmbH
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
DMSO	Sigma
Dodecenylnbernsteinsäure	Merck
EDTA	NeoLab
EMEM	Cambrex
Essigsäure	Merck
Ethanol (≥ 99,8% (v/v))	Roth
Ethidiumbromid	Roth
FKS	PAA
Glucose	Roth
Glutamin	Sigma
Glutaraldehyd (25 %)	Roth
Glycerin (≥ 99,5% (v/v))	Merck
Glycin	Merck
Hoechst 33258	Sigma
Isopropanol	Merck
Isoamylalkohol	Roth

---

Kaliumchlorid	Germed
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
2x Loading Dye Solution (for RNA)	MBI Fermentas
Magnesiumchlorid	Roth
MEM Vitamin Solution	Sigma
Methanol	Roth
2-Mercaptoethanol	Serva
Milchpulver Blotting grade granuliert	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumcacodylat	Roth
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumhydrogenphosphat	Roth
Nephros	Bio Whittaker
N,N-Dimethylbenzylamin	Trigon Chemie GmbH
Nonessential Amino Acids Solution	Sigma
Nonidet P - 40	Sigma
Osmiumtetroxid-Lösung (4 %)	Roth
Paraformaldehyd (37%)	Sigma
Penicillin G	Sigma
Phosphorsäure	Roth
Ponceau S	Serva
rh IFN $\gamma$	PeptoTech
RNAse Away®	Roth
Roti®-Phenol	Roth
Roti®-Phenol/Chloroform	Roth
Rotiphorese® Gel 30	Roth
Röntgentankfixierpulver	Calbe Fotochemie GmbH
Röntgentankentwicklerpulver	Calbe Fotochemie GmbH
Salzsäure	Merck
Saccharose	Roth
SDS	Merck
Staurosporin	Roche

Temed	Serva
Toluidinblau	Roth
Trichloressigsäure	Merck
Tris	Roth
Triton® X-100	Serva
Trypsin	Roth
Tween®20	Roth
Uranylacetat	Merck

### 2.1.4 Puffer, Medien und Lösungen

**Tabelle 1: Verwendete Puffer, Medien und Lösungen und ihre Zusammensetzung**

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Ammonium Persulfat-Lösung (40 % (m/v))	40 g Ammonium Persulfat auf 100 ml ddH <sub>2</sub> O
Araldite CY212 Mischung 1	10 ml Araldite CY212, 10 ml Dodecenybernsteinsäure, 0,1-0,2 ml Dibutylphthalat
Araldite CY212 Mischung 2	10 ml Araldite CY212, 10 ml Dodecenybernsteinsäure, 0,1-0,2 ml Dibutylphthalat, 0,3-0,4 ml N,N-Dimethylbenzylamin Mischung 1 und 2 für 15-30 min gut durchmischen und für weitere 15 min im Trockenschrank homogenisieren
Bleictrat-Lösung	0,665 g Bleictrat und 0,88 g Tri-Natrium-2-Hydrat in 15 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, stark schütteln, 4 ml 1N NaOH zugeben, auf 25 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
Blockierungslösung (Western Blot)	5 g Magermilchpulver in 100 ml TBST (1x) lösen
Bradford-Lösung	100 mg Coomassie Brilliant Blau G250 in 95 % (v/v) Ethanol und 100 ml 85 % (v/v) Phosphorsäure lösen, mit ddH <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen, filtrieren
Coomassie-Entfärbelösung	45 % Methanol, 10 % Essigsäure, 45 % ddH <sub>2</sub> O
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 45 % Methanol, 45 % H <sub>2</sub> O, 10 % Eisessig
DEPC-H <sub>2</sub> O (0,1 % (v/v))	1 ml DEPC auf 1l H <sub>2</sub> O, 2-4 h rühren, autoklavieren
dNTP-Stammlösung (10 mM)	je 10 µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM) + 60 µl ddH <sub>2</sub> O
Einfriermedium Zellkultur	EMEM + 10 % FKS, 2mM Glutamin und 10 % DMSO
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml; bei +4°C in lichtgeschütztem Gefäß lagern
Glutaminstammlösung (200 mM)	2,922 g L-Glutamin in 100 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern
Glutaraldehyd-Lösung (2,5 %)	25 %iges Glutaraldehyd 1:10 mit Natrium- Cacodylat-Puffer verdünnen
HCL (1 M)	37%ige Salzsäure 1:10 in ddH <sub>2</sub> O verdünnen
Konservierungsmedium Chlamydien (SPGA)	74,6 g Saccharose, 0,52 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,25 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,92 g L-Glutaminsäure (Na-Salz) in 1000 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, 1 g bovines Albumin (Fraktion V) zugeben

	und lösen, sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern
Lauf-Puffer (10x) für SDS-PAGE	30 g Tris, 144 g Glycin, 15 g SDS; auf 1 l auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O
Lyse-Puffer	6,06 g Tris einwiegen, auf pH 8 mit HCl einstellen, 8,77 g NaCl und 1 ml NP-40 zugeben, auf 1 l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
Natrium-Cacodylat-Puffer	21,4 g Natriumcacodylat in 1 l ddH <sub>2</sub> O lösen, pH mit 1 N HCl auf 7,2-7,4 einstellen
NaOH (1M)	0,4 g in 10 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, sterilfiltrieren
Osmiumtetroxid-Lösung (2 %)	4 %ige Osmiumtetroxid-Lösung 1:1 mit Natriumcacodylatpuffer verdünnen
Paraformaldehydlösung (1 %)	1 Teil der Paraformaldehydstammlösung mit 36 Teilen PBS (1x) mischen
PBS (1x)	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,3 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x12H <sub>2</sub> O, 0,2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> einwiegen, in 1 l ddH <sub>2</sub> O mischen und auf pH 7,2 einstellen
Ponceau-Färbelösung	0,3 g Ponceau S in 1 ml Essigsäure lösen, auf 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
Proben-Lade-Puffer (Lämmli)	19,7 g Tris HCl (pH6,8), 40g SDS, 100 ml Glycerin (≥99,5% (v/v)), 0,006% Bromphenolblau, 18 ml Mercaptoethanol, auf 1 l auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O
Proben-Lade-Puffer (Gelelektrophorese)	20 % Glycerin, 0,2mol/l EDTA, 0,01 % Bromphenolblau
Sammelgel-Puffer	30,5 g Tris, 20 ml 10% SDS, auf 500 ml auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O, auf pH 6,7 einstellen
Sammelgel (3 %)	1 ml Rotiphorese® Gel 30, 1,88 ml Sammelgelpuffer, 4,5 ml ddH <sub>2</sub> O, 12 µl APS (40%), 9 µl Temed
Transfer-/Blotting-Puffer	6 g Tris, 93 g Glycin, 0,1 g SDS, 200 ml Methanol, auf 1 l auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O
Toluidinblau-Stammlösung (1 %)	1g Toluidinblau auf 100 ml mit 2,5 %iger NaHCO <sub>3</sub> -Lösung auffüllen
Toluidin-Gebrauchslösung	Stammlösung 1:4 mit ddH <sub>2</sub> O verdünnen
TBST (10x)	24,22 g Tris HCl (pH 7,5), 87,6 g NaCl, 1 ml Tween®20, auf 1l auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O
Trenngel-Puffer	91 g Tris, 20 ml 10% SDS, auf 500 ml auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O, pH 8,8 einstellen
Trenngel (12 %)	6 ml Rotiphorese® Gel 30, 3,8 ml Trenngelpuffer, 2,6 ml H <sub>2</sub> O, 2,5 ml Glycerin, 18 µl APS (40%), 12 µl Temed
TE-Puffer (1x)	1 ml Tris HCl (pH 8,0), 0,2 ml 0,5M EDTA, auf 1 l auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O, autoklavieren
Trypsin/EDTA-Lösung	8 g NaCl, 0,8 g KCl, 1 g Glucose, 0,58 g NaHCO <sub>3</sub> , 0,5 g Trypsin, 0,2 g EDTA, in 1 l ddH <sub>2</sub> O lösen, pH 7,2 einstellen, sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20 °C lagern
Uranylacetat-Lösung (1 %)	1 g Uranylacetat zu 100 ml ddH <sub>2</sub> O geben, in lichtgeschütztem Gefäß lagern
Zellkulturmedium	EMEM mit 5 % FKS und 1 % einer 200 mM Glutaminstammlösung mischen; zur Sterilkontrolle 2 d bei 37 °C bebrüten, Lagerung bei +4 °C
Zellkulturmedium für Chlamydienanzucht	Nephros mit 1% einer 200 mM Glutaminstammlösung, 1 % Nonessential Amino Acid Solution und 1 % MEM Vitamin Solution mischen, zur Sterilkontrolle 2 d bei 37 °C bebrüten, Lagerung bei +4 °C

### 2.1.5 Zelllinien und Chlamydienstämme

HEp2	humane Epithelzellen (Larynxkarzinom) (ATCC-CCL23)
Humane synoviale Fibroblasten	Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena
<i>Cp. psittaci</i> Stamm DC15	Isolat aus einem abortierten Rinderfetus (Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, Fachbereich Veterinärmedizin Stendal)

### 2.1.6 Nukleinsäuren

100 Bp DNA Ladder Plus	Genaxxon
RNA Ladder	Fermentas
dNTP Set	MBI Fermentas
Primer (wenn nicht anders erwähnt)	Jena Bioscience

Die Primer-Sequenzen der chlamydialen und humanen Primer sind in Tabelle 7 und 8 im Anhang aufgeführt.

### 2.1.7 Antikörper, Marker für Western Blots

Anti-mouse Ig horseradish peroxidase linked antibody	Upstate
Anti-rabbit Ig horseradish peroxidase linked antibody	Amersham
Anti-Human cIAP2 antibody	Santa Cruz
Anti-Human GUSB antibody	Santa Cruz
MagicMark™ Western Standard	Invitrogen
Prestained Protein Marker	MBI Fermentas

### 2.1.8 Enzyme und Kits

ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
APO-DIRECT™ Apoptosis Detection Kit	BD Bioscience
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche
MTT Cell Growth Assay Kit	Chemicon
RNase One	Promega
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Proteinase K	Sigma
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
qPCR MasterMix Plus for SYBR® Green I	Eurogentec
SuperScript™ III First Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen
Taq DNA-Polymerase	Genaxxon

### 2.1.9 Software

Adobe Illustrator CS3	Adobe
AnalySIS™	SIS
CellQuest™	Becton Dickinson
Excel 97	Microsoft
Word 97	Microsoft
Gene Genius Gel Documentation and Analysis System	Syngene
Primerexpress	Applied Biosystem
Vector NTI	Invitrogen
Sigma Plot 9.0	STATCON
MX3000P	Stratagene



## **2.2. Methoden**

### **2.2.1 Kultivierung und Passagierung eukaryotischer Zellen**

HEp2-Zellen (ATCC CCL-23) und embryonale Fibroblasten (zur Verfügung gestellt von Prof. E. Straube, Medizinische Mikrobiologie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität, Jena) wurden im Brutschrank unter Kulturbedingungen von 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in EMEM-Medium mit 5 % FKS und 2mM L-Glutamin kultiviert und regelmäßig bei annäherndem Erreichen der Konfluenz passagiert. Nach Absaugen des Mediums aus der Zellkultur-Flasche wurde mit 1x PBS-Puffer gewaschen und Trypsin (0,05 % (m/v))-EDTA (0,02 % (m/v)) -Lösung für ca. 5 min zugegeben. Nach Ablösen der Zellen im Brutschrank bei 37 °C wurde die Trypsinaktivität mit Kulturmedium gestoppt und die Zellen in einem sterilen Zentrifugenröhrchen für 11 min bei 1500 g abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands konnte das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in gewünschter Menge neu ausgesät werden.

### **2.2.2 Kryokonservierung von Zellen**

Zum Anlegen von Kryokonserven wurden die Zellen zunächst wie unter 2.2.1. beschrieben geerntet und abzentrifugiert, das Zellpellet anschließend aber in EMEM mit 10 % FKS, 2 mM Glutamin und 10 % DMSO aufgenommen und in sterile Kryoröhrchen abgefüllt. Nach dreistündiger Abkühlung bei +4 °C in einem speziellen, mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter wurden die Zellen dann in einen -80 °C Tiefkühlschrank überführt und gelagert. Zur erneuten Aussaat wurden die Kryokonserven langsam in warmem Wasser aufgetaut, die Zellsuspension in sterile Zentrifugenröhrchen überführt, das gleiche Volumen an Medium zugegeben und für 11 min bei 1500 g abzentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium vorsichtig suspendiert. Anschließend konnte die Zellsuspension in gewünschter Menge auf Zellkulturflaschen aufgeteilt und das entsprechende Volumen an Medium zugegeben werden.

### **2.2.3 Chlamydieninfektion zum Anlegen von Kryokonserven**

Der verwendete *Cp. psittaci* Stamm DC15 wurde aus einem abortierten Rinderfetus isoliert und von Dr. Gaede (Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, Fachbereich Veterinärmedizin Stendal) für die Stammsammlung des Nationalen Referenzlabors für Psittakose am FLI Jena zur Verfügung gestellt. Da es sich um ein Rinderisolat und somit

nicht um einen aviären *Cp. psittaci* Stamm handelte, konnten alle Arbeiten unter S2-Bedingungen durchgeführt werden.

Annähernd konfluente HEp2-Monolayer wurden mit einer MOI von 10 infiziert und bei 2000 g und 37 °C für 1 h zentrifugiert, um die Infektion zu unterstützen. Die infizierten Zellen wurden eine weitere Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen des Mediums und Waschen mit 1x PBS-Puffer wurde ein serumfreies Medium (Nephros) zugegeben, um die Infektion zu fördern. 48 Stunden nach Infektion wurde der Überstand vorsichtig von den infizierten Zellen abgesaugt und die Zell-Monolayer durch Abschaben in SPGA-Konservierungsmedium geerntet. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen abgefüllt und bei +4°C, für eine längerfristige Lagerung bei -80 °C gelagert. Für Anwendungen, welche reinere Elementarkörperpräparationen benötigten, wurden die infizierten Zellmonolayer nach Ernte durch Abschaben in 1x PBS zunächst durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen, um die reifen Elementarkörper freizusetzen, und danach die Zelltrümmer bei 500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bei 28.000 g und 4 °C für 1 h zentrifugiert, das Pellet in 1x PBS gewaschen und erneut bei 28.000 g und 4 °C für 1 h zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in SPGA-Konservierungsmedium aufgenommen, auf Kryoröhrchen verteilt und wie oben beschrieben gelagert.

#### **2.2.4 Immunfluoreszenz**

Um die Infektionsrate kontrollieren und den Verlauf der Infektion verfolgen zu können, wurden bei jeder Infektion zusätzlich zu den Zellkulturflaschen Deckglasröhrchen mit den der Zellzahl entsprechenden IFU/ml parallel infiziert.

Die auf Deckgläschen gewachsenen, infizierten Zellmonolayer wurden zu entsprechenden Zeitpunkten mit Methanol fixiert und mit dem IMAGEN Chlamydia Kit gefärbt.

Die Färbung mittels anti-LPS *Chlamydiaceae*-spezifischem, FITC-markierten Antikörper und Evans Blue als Zellgegenfärbung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die Präparate wurden mittels eines BX-51 M Fluoreszenzmikroskops (Olympus, Ballerup, Denmark) oder eines Axiolab Fluoreszenzmikroskops (Zeiss, Jena) bei  $\lambda=525$  nm und 400-facher Vergrößerung ausgewertet, die Infektionsrate abgeschätzt und gegebenenfalls Aufnahmen gemacht (BX-51 Fluoreszenzmikroskop).

### 2.2.5 Titerbestimmung

Nach dem Anlegen von Chlamydienkryokonserven wurde der Titer durch Titration des Chlamydien-Stocks auf Zellmonolayern bestimmt. Dazu wurden HEp2-Zellen in Deckglasröhrchen ausgesät. Für die Infektion wurden Verdünnungsstufen der Konserve im Bereich von 1:1000 bis 1:100.000 in 1x PBS angelegt und die Zellen wie unter 2.2.3 beschrieben infiziert. Der Mediumwechsel erfolgte jedoch mit EMEM+5 % FKS und 2 mM L-Glutamin. 48 Stunden nach Infektion wurde das Medium abgesaugt, die Zellen durch Zugabe von Methanol fixiert, mit dem IMAGEN Chlamydia Kit nach Angaben des Herstellers gefärbt und die Präparate mittels eines Axiolab Fluoreszenzmikroskops (Zeiss, Jena) bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden jeweils die Verdünnungsstufen ausgezählt, die eine nicht zu hohe Infektionsrate aufwiesen. Die Anzahl der Einschlüsse wurde jeweils in 20 Gesichtsfeldern gezählt und unter Einberechnung der Verdünnungsstufe und des Flächenfaktors (je nach verwendetem Objektiv) als Inclusion-forming units per milliliter (IFU/ml) angegeben. Der Flächenfaktor ergibt sich aus dem Verhältnis der Gesichtsfeldfläche zur Deckglasfläche. Desweiteren fließt ein Korrekturfaktor ein, der die Differenz zwischen Deckglasfläche und Röhrchenbodenfläche ausgleicht. Für das Axiolab-Mikroskop betrug der Flächenfaktor für das 20er Objektiv 196 und für das 40er Objektiv 784,17.

### 2.2.6 Test auf Mycoplasmenfreiheit

Nach Anlegen der Kryokonserven von Zellen und Chlamydien sowie in regelmäßigen Abständen aus der Zellkultur wurde eine Mycoplasmen-PCR zum Test auf Mycoplasmenfreiheit durchgeführt.

Die dabei verwendeten Primer MW28/MW29 binden in der 16S- rRNA Gensequenz von Mycoplasmen-Spezies. Als Positivkontrolle diente *Mycoplasma-ovis*-DNA.

Jeder 50 µl PCR-Ansatz enthielt 5 µl 10x Puffer, 200 nM Primer fwd und 200 nM Primer rev, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,2 mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP, 1U Taq-Polymerase, ddH<sub>2</sub>O sowie 1-5 µl der zu testenden Probe als Template.

Die PCR erfolgte nach folgendem Thermalprofil: Initiale Denaturierung bei 96 °C für 15 sec; 35 Zyklen mit 96 °C für 1 min, 55 °C für 1 min und 72 °C für 1 min sowie finale Extension bei 72 °C für 1 min. Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

### 2.2.7 Infektiositätsassay

Die Infektiosität der Chlamydien in den Persistenzmodellen wurde unter Verwendung der folgenden Konzentrationen an Persistenzinduktoren bestimmt: 0 bis 250  $\mu\text{M}$  DAM für das Eisenmangel-Modell, 0 bis 400 U/ml Penicillin G für das Penicillin Modell und 0 bis 40 ng/ml (= 480 U/ml) IFN- $\gamma$  für das IFN- $\gamma$ -Modell. In Zellkulturröhrchen mit eingelegtem Deckgläschen kultivierte, infizierte Zellen wurden 48 h p.i. mittels Ultraschall (Amplitude von 80 % für 8 sec mit 10 Pulsen) aufgeschlossen um chlamydiale Formen freizusetzen, und der Überstand wurde anschließend auf frische, unbehandelte Zellen übertragen und für 1 h bei 37 °C und 2000 g aufzentrifugiert. Eine akute Infektion diente dabei als Kontrolle zu den Persistenzmodellen. 48 h nach der Reinfektion wurden die auf Deckgläschen befindlichen Zellmonolayer mit Methanol fixiert und mit anti-Chlamydien-LPS-Antikörper gefärbt, wie in 3.4 genauer beschrieben. Die Anzahl der Inklusionen wurde durch Auszählen von 20 Gesichtsfeldern bestimmt und unter Einbeziehung der Verdünnungsstufe und des Flächenfaktors als „Inclusion-forming Units per milliliter (IFU/ml)“ angegeben. Anhand dieses Assays konnten die spezifischen Persistenzinduktorkonzentrationen für alle weiterführenden Arbeiten bestimmt werden.

### 2.2.8 Chlamydieninfektion und Persistenzinduktion

Annähernd konfluente Zellmonolayer (ca.  $1-2 \times 10^6$  Zellen in T25-Kulturflaschen) wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit einer MOI von 5 infiziert, um eine 100% ige Infektionsrate zu gewährleisten und bei 2000 g und 37 °C für 1 h zentrifugiert. Die infizierte Zellen wurden für eine weitere Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Absaugen des Kulturmediums, um ungebundene Elementarkörper zu entfernen, wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und frisches EMEM sowie die entsprechenden Persistenzinduktoren zugegeben. Die Endkonzentration an DAM betrug 150  $\mu\text{M}$ , die Endkonzentration an Penicillin G 200U/ml. Im Falle des IFN  $\gamma$ - Persistenzmodells wurden die uninfizierten Zellen zunächst 24 h mit 20 ng/ml (=240 U/ml) IFN- $\gamma$  vorinkubiert, bevor die Infektion erfolgte. Nach dem Mediumwechsel der infizierten Zellkulturen 2 h p.i. wurde dann wiederum 20 ng/ml IFN- $\gamma$  zugegeben.

### 2.2.9 Reaktivierungsassay

HEp2-Monolayer, kultiviert in Zellkulturröhrchen mit eingelegtem Deckgläschen, wurden infiziert, und Persistenz wurde wie unter 2.2.8 beschrieben induziert. 24 h oder 48 h p.i. wurde das Medium abgesaugt und wie folgt ersetzt: Im Fall der akuten Infektion und des

PenG Modells wurde frisches EMEM zugegeben, für das Eisenmangelmodell EMEM mit Zusatz von 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  und im Falle des IFN- $\gamma$ -Modells EMEM, welches mit der 10-fachen Menge an Tryptophan (Endkonzentration 102 mg/l) angereichert war. Nach weiteren 24 h (bzw. 48 h) wurden die chlamydialen Formen durch Ultraschallbehandlung geerntet und mit dem Überstand frische HEP2-Monolayer infiziert. Der Mediumwechsel nach der Infektion erfolgte mit EMEM ohne Zusätze an Persistenzinduktoren. 48 h später wurden die Monolayer mit Methanol fixiert, die Zellen wurden wie in 2.2.4 beschrieben gefärbt und die IFU/ml durch Auszählen von 20 Gesichtsfeldern bestimmt.

### 2.2.10 Ernte

12 h, 24 h, 36 h, 48 h (sowie 72 h und 96 h p.i. je nach Experimenttyp) erfolgte die Ernte der infizierten Zellen aus den 25  $\text{cm}^2$ - Kulturflaschen. Die Zellen wurden zunächst mit 1x PBS-Puffer gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung versetzt und bei 37 °C bis zum Ablösen des Zellrasens inkubiert. Zur Neutralisierung der Trypsin-EDTA-Lösung wurde EMEM zugegeben und die Zellsuspension bei 1500 g für 11 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Pellett je nach weiterem Verwendungszweck in dem entsprechenden Lysepuffer aufgenommen. Alternativ dazu erfolgte die Ernte teilweise auch durch Abschaben des Zellrasens mittels eines Zellschabers anstelle von Abtrypsinierung. Wenn nicht anders erwähnt, wurden für alle Arten von Experimenten mind. zwei unabhängige Infektionsversuche durchgeführt.

### 2.2.11 Elektronenmikroskopie

Nach Entfernen des Zellkulturmediums wurden ca.  $1 \times 10^6$  infizierte Zellen 48 h p.i. mit 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylat-Puffer für 2 h bei +4 °C fixiert. Die fixierten Zellen wurden mittels eines Zellschabers aus den Zellkulturflaschen geerntet und bei 1500 g für 5 min in Eppendorf Tubes abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 2 %iger Agarose eingebettet und zu jeweils 1-3  $\text{mm}^3$  Agarblöckchen geschnitten. Die Blöckchen wurden in 2 % Osmiumtetroxid fixiert, durch eine Reihe stufenweise ansteigender Acetonkonzentrationen (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %) entwässert und in dem Epoxyharz Araldit Cy212 eingebettet. Semidünnschnitte wurden hergestellt und mit Toluidinblau zur besseren Übersicht gefärbt, um Bereiche mit hoher Zelldichte für die Ultramikrotomie auszuwählen. Die Ultradünnschnitte (85 nm) wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt, um den Kontrast der Präparate zu erhöhen, auf Kupfer-Netzchen aufgezogen und mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Tecnai) ausgewertet.

### 2.2.12 Auswahl spezifischer Gene und Primer-Design

Da die komplette Genomsequenz von *Cp. psittaci* zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht verfügbar war, wurden die spezifischen, aus den *C.-trachomatis*- und *Cp.-pneumoniae*-Genom-Sequenzen ausgewählten Gene von Interesse unter Benutzung des *Cp.-abortus*-Genoms als Matrix geblastet ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/C\\_abortus/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_abortus/)). Aufgrund einer sehr großen Homologie der Gensequenzen von *Cp. psittaci* und *Cp. abortus* konnte das *Cp.-abortus*-Genom für das Design der Primer herangezogen werden.

Zusätzlich wurden zum damaligen Zeitpunkt unpublizierte Sequenzen des Typ III Sekretionssystem-Operons (zur Verfügung gestellt von Prof. Matthias Horn, Universität Wien, Österreich) sowie der Pmp-Genfamilie (zur Verfügung gestellt von Dr. David Longbottom, Moredun Institute, Edinburgh, UK) zur Primersynthese verwendet.

Entsprechende Primer für insgesamt 31 chlamydiale Gene wurden mithilfe des Programms Primer Express (Applied Biosystems) erstellt.

Die Sequenzen der humanen Gene von Interesse wurden aus GenBank<sup>®</sup> des National Center for Biotechnology Information (NCBI) bezogen und die entsprechenden Primer ebenfalls mittels Primer Express erstellt

Alle Primer wurden nach Möglichkeit so generiert, dass sie eine einheitliche  $T_m$  von 59°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) aufwiesen.

### 2.2.13 DNA-Isolation

Chlamydiale und Wirtszell-DNA zum Testen der entwickelten Primer wurde entweder über Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion oder mittels High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers isoliert

### 2.2.14 PCR

Vor Einsatz in der Quantitativen Real time-PCR (RTQ-PCR) wurden alle Primerpaare in einer konventionellen PCR getestet.

Jeder 50  $\mu\text{l}$  PCR-Ansatz enthielt 5  $\mu\text{l}$  10x Puffer, 200 nM Primer fwd und 200 nM Primer rev, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , je 0,2 mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP, 1U Taq-Polymerase, ddH<sub>2</sub>O sowie 50 ng *Cp.-psittaci*-DC15-DNA als Template

Nach einer initialen Denaturierung bei 94°C für 5 min im Thermocycler erfolgte die PCR-Reaktion mit 30 Zyklen nach folgendem Temperaturprofil: Denaturierung bei 94 °C für 45 sec, Primer-Annealing bei 56 °C (in Abhängigkeit der Primer  $T_m$  von 59 °C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ )) für 45

sec, Primer-Extension bei 72 °C für 1 min. Zum Abschluss erfolgte eine finale Extension für 10 min bei 72 °C, danach Kühlung bei 4 °C.

### **2.2.15 Agarose-Gelelektrophorese**

Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden die PCR-Produkte bzw. Proben in 1- oder 2 % igen Agarose-Gelen mittels 1x TBE- Elektrophoresepuffer bei 50-110 V aufgetrennt. Den Agarose-Gelen wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,3 µg/ ml zur Visualisierung der DNA zugegeben. Die Proben wurden mit Gelladepuffer versetzt und aufgetragen. Zur Abschätzung der Größe der jeweiligen Proben wurde zusätzlich ein Molekulargewicht-Größenmarker aufgetragen. Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte mittels eines „GelVue UV-Transilluminators“ bei 254 nm, das Ergebnis wurde mit einer CCD-Kamera dokumentiert.

Die weitere Bearbeitung und Dokumentation der Gele erfolgte mittels des Gene Genius Gel Documentation and Analysis Systems.

### **2.2.16 Sequenzierung der PCR-Fragmente**

Da Gensequenzen aus dem *Cp.-abortus*-Genom als Matrix für die Primersynthese herangezogen wurden, wurde jedes PCR-Produkt sequenziert und die Sequenz anschließend geblastet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), um sicherzugehen, dass es sich bei der amplifizierte DNA um Fragmente aus dem gewünschten Gen handelt.

Die spezifischen PCR-Fragmente wurden nach Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Für die Sequenzierung wurde der ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers mit sequenzspezifischen Primern. Die Amplifikate wurden mittels Ethanol/Natriumacetatfällung gereinigt, das getrocknete Probenpellet in 20 µl dd H<sub>2</sub>O aufgenommen und in die Analysetubes überführt. Die kapillarelektrophoretische Analyse erfolgte mittels ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### 2.2.17 RNA-Isolation

Zwei unabhängige Infektionsexperimente wurden mit einer MOI von 1 durchgeführt. Zu den Zeitpunkten 12 h, 24 h, 36 h und 48 h p.i. (für spezielle Experimente bzgl. längerer Persistenzintervalle auch 72 h und 96 h p.i.) wurden die infizierten Zellen mittels Abschaben geerntet, bei 500 g für 5 min abzentrifugiert und die Total-RNA mittels RNeasy Mini Kit, inklusive DNase I-Behandlung (Qiagen) zur Entfernung der genomischen DNA, nach Angaben des Herstellers isoliert.

Die Konzentration und Qualität der isolierten RNA wurde mittels UV-Spektrophotometrie und Agarosegelelektrophorese bestimmt (s. 2.2.18 sowie 2.2.15)

Zur Feststellung der Freiheit von genomischer DNA wurden ca. 100 ng der isolierten RNA in einer PCR mit den 16S rRNA-Primern (für chlamydiale DNA) sowie  $\beta$ -Actin-Primern (für Wirtszell-DNA) eingesetzt wie unter 2.2.14 beschrieben.

### 2.2.18 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine  $OD_{260}$  entsprach 50  $\mu\text{g/ml}$  DNA bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA. Die Nukleinsäurekonzentration berechnete sich dabei nach folgender Formel:

$$c [\text{ng}/\mu\text{l}] = OD_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \text{ (für RNA) bzw. } 50 \text{ (für DNA)}.$$

### 2.2.19 cDNA-Synthese

Jeweils 5  $\mu\text{g}$  Total-RNA wurden unter Verwendung von Random Hexamer Primern mittels des SuperScript III First-Strand Synthesis System for Reverse Transcription-Kits (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben.

### 2.2.20 Quantitative Real time-PCR (RTQ-PCR)

Die Quantitative Real time-PCR basiert auf der Detektion eines Fluoreszenzsignals, welches proportional während der Amplifikation eines PCR-Produktes entsteht. (Lee, 1993; Livak *et al.*, 1995). Im Gegensatz zur Endpunkt-Detektion einer konventionellen PCR detektiert die Real-time PCR die während jedes Zyklus emittierte Fluoreszenz als einen Parameter für die Template-Vermehrung während der exponentiellen Phase der PCR



(Higuchi, 1992; Higuchi, 1993). Dadurch ermöglicht sie zum einen die Quantifizierung der Templatmenge in einer Reaktion (absolute Quantifizierung) und zum anderen lassen sich auch Unterschiede in der Abundanz eines Templates zwischen verschiedenen Proben messen (relative Quantifizierung).

Für die in dieser Arbeit angewandte Methode zur relativen Quantifizierung wurde der unspezifisch in dsDNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I für die Detektion des Fluoreszenzsignals verwendet. Die Messung und Auswertung der mRNA Expressionslevel erfolgte mit einem Mx3000P Thermocycler System (Stratagene) mit folgendem Temperaturprofil: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 10 min, 40 Zyklen von 95 °C für 30 sec und 59 °C für 1 min, sowie anschließende Schmelzkurvenanalyse des Amplifikats zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte.

Vor Beginn der Experimente mit den cDNA-Proben aus akuter Infektion und Persistenzmodellen wurde die optimale Konzentration jedes Primerpaares in der Real-time-PCR getestet. Mit Ausnahme der *ompA*- (300 nM fwd/300 nM rev), *ctcB*- (300 nM fwd/300 nM rev) und *dnaK*-Primer (500 nM fwd/500 nM rev) konnten alle Primer in einer Konzentration von 200 nM eingesetzt werden. Unter Verwendung des qPCR MasterMix Plus for SYBR® Green I (Eurogentec) enthielt jeder Reaktionsansatz 12,5 µl des 2x qPCR Mastermix Plus for SYBR Green I Assays (3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM je dNTP, 0,75 µl SYBR Green I, 0,625 U Taq Polymerase sowie 2x Puffer), 200 nM Primer fwd, 200 nM Primer rev sowie ca. 10 ng cDNA und wurde auf 25 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Die relative Genexpressionsrate eines Zielgens (target) wurde auf Basis der Amplifikationseffizienz (E) und der Threshold-Cycle-Differenz ( $\Delta CP$ ) einer Probe (jeweiliges Persistenzmodell) versus der Kontrolle (akute Infektion oder uninfiziert, je nach Experimenttyp) wie in Pfaffl (2001) beschrieben nach unten aufgeführter Formel berechnet. Für die Normalisierung wurden dabei im Falle der chlamydialen Genexpressions-Experimente *16SrRNA* und *gyrA* (Gyrase A) und im Falle der humanen Genexpressionsexperimente  *$\beta$ -Actin* und *gusB* (Glucuronidase b) als Housekeeping-Gene (ref) verwendet.

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

ratio = Expressionsverhältnis

E = Effizienz =  $10^{[-1/slope]}$

CP\* = crossing point (= Threshold Cycle)

Sample= Probe (jeweiliges Persistenzmodell)

Control = Kontrolle (akute Infektion oder uninfiziert)

Gene, die eine Hoch- bzw. Herunterregulation um mehr als den Faktor 2 aufwiesen, wurden dabei als differentiell reguliert angesehen.

### **2.2.21 Statistische Analyse der Real-time-PCR Experimente**

Um die mRNA-Expression der 31 verschiedenen Gene aus Proben zweier unabhängiger Infektionsversuche und Normalisierung mittels zweier Housekeeping-Gene vergleichen zu können, wurde der Student's-t-Test verwendet. Ein P-value von 0.05 wurde dabei als statistisch signifikant angesehen. Die Varianzanalyse (ANOVA) wurde angewandt, um multiple Daten (alle Daten pro Gen aus den zwei unabhängigen Infektionsexperimenten) entlang der Zeitachse auf signifikant verschiedene Ergebnisse zu testen.

### **2.2.22 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die in NP-40 Lysepuffer unter Zugabe eines Protease-Inhibitor-Cocktails aufgenommenen Zellen wurden zunächst für 4x 5 sec ultrabeschallt und die Zelltrümmer anschließend bei 1600 g abzentrifugiert. Die Proteinkonzentrationen im Überstand wurden nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Zunächst wurden folgende Protein-Standardlösungen zur Eichung des Spektrophotometers aus einer 10 mg/ml BSA-Stammlösung in H<sub>2</sub>O hergestellt: 0 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,6 mg/ml; 1 mg/ml. Sowohl für die Eichkurve als auch für die Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Jeweils 1 ml Bradford-Lösung wurde in eine Küvette pipettiert, 10 µl Protein-Standardlösung bzw. Probe hinzupipettiert und gemischt. Nach 15 min wurde von jedem Ansatz die Extinktion bei 595 nm gemessen. H<sub>2</sub>O diente dabei als Blindwert.

### **2.2.23 TCA- Fällung**

Die TCA-Fällung von Proteinen wurde nach Lowry *et al.* (1951) durchgeführt. Die TCA-Fällung wurde zum einen als Vorreinigungsmethode genutzt, um Kontaminationen (z. B. Salz, Lösungsmittel, Nukleinsäuren, Lipide, etc.), die bei einer späteren Proteinanalysemethode wie SDS-PAGE stören würden, zu entfernen. Zum anderen konnten zu niedrig konzentrierte Proben durch die Fällung aufkonzentriert werden.

### **2.2.24 SDS-PAGE**

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde wie durch Laemmli (1970) beschrieben durchgeführt.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurde ein Proteinproben-Aliquot mit dem gleichen Volumen an 2x Proben-Lade-Puffer versehen und 5 min bei 95 ° C erhitzt, um die Proteine für die SDS-PAGE zu denaturieren. Die Menge an aufgetragenem Protein betrug jeweils ca. 40 µg. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in einem 12 %-igen SDS-Gel. Die Elektrophoresedauer betrug ca. 2 h bei maximal 0,03 A. Als Molekulargewichtsmarker wurden die PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) sowie der MagicMark XP™ (Invitrogen) eingesetzt.

### **2.2.25 Western Blot**

Nach vollendeter SDS-PAGE wurden die im Gel befindlichen Proteine mittels Semi-Dry-Blotverfahrens bei 15 V für 1 h auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Der Protein-Transfer wurde anschließend durch 10-minütige Ponceau-Färbung der Membran überprüft. Nach 10-minütiger Entfärbung der Membran mit ddH<sub>2</sub>O erfolgte eine Inkubation in 5 %igem Magermilch-TBST-Puffer für eine Stunde, um noch freie Bindungsstellen zu blocken. Der primäre Antikörper wurde nach Herstellerempfehlung im 5 %igen Magermilch-TBST-Puffer verdünnt und direkt auf die Membran gegeben. Nach einstündiger Inkubation (bzw. ü. N. bei +4 °C) wurde die Membran zunächst einmal für 15 min in 1x TBST und anschließend zweimal für jeweils 5 min in 1x TBST gewaschen. Der sekundäre, Merrettich-Peroxidase-gekoppelte Antikörper wurde ebenfalls nach Herstellerangaben in 5 %igem Magermilch-TBST-Puffer verdünnt. Die Inkubationszeit auf der Membran betrug hierbei 1 h, um die Hintergrundstörungen so gering wie möglich zu halten. Das anschließende Waschen der Membran zur Entfernung von nicht-gebundenem Sekundärantikörper erfolgte einmal für 15 min und viermal für je 5 min in 1x TBST. Die Detektion der Banden erfolgte mit Hilfe des ECL Plus Systems (Amersham) nach Angaben des Herstellers auf KODAK X-OMAT AR Film.

### **2.2.26 Strippen der Membran**

Die mit Antikörper behandelten Nitrocellulosemembranen konnten mittels „Stripping“ von Antikörpern gereinigt werden und standen somit für eine Detektion mit einem neuen Antikörper zur Verfügung. Die Membran wurde hierzu für 30 min bei 37 °C unter leichtem Schwenken im Stripping- Puffer inkubiert und anschließend vor dem erneuten Einsatz 2x10 min in 1xTBST gewaschen.

## 2.2.27 Apoptose-Assays

### 2.2.27.1 DNA-Fragmentations-Assay

Die Durchführung des DNA-Fragmentationsassays zur qualitativen Apoptose-Analyse erfolgte nach dem Protokoll von Yeung (2002).

Ca.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden mittels Abschaben und Zentrifugation bei 1500 g für 11 min geerntet und das Zellpellet in 500  $\mu$ l NP-40-Lysepuffer aufgenommen und resuspendiert. Die Zelltrümmer wurden durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 1600 g abgetrennt und der Überstand wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und bei 11400 g für 5 min zentrifugiert. Die DNA enthaltende, obere, wässrige Phase wurde abgenommen und mit 1/10 Volumen 3M NaAcetat (pH 5,2), 0,6 Volumen Isopropanol und 1  $\mu$ l Glycogen gemischt und bei -20 °C für 5 min gefällt. Die gefällte DNA wurde bei 12900 rpm für 10 min abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 R), mit 70 % Ethanol gewaschen, in 1x RNase One Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 10 U RNase ONE™ Ribonuclease 30 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend in einem 1,8 % igem Agarosegel aufgetrennt.

Als Negativkontrolle dienten unbehandelte, uninfizierte Zellen. Als Positivkontrolle wurden uninfizierte, für 4 h mit 1  $\mu$ M Staurosporin behandelte Zellen verwendet.

### 2.2.27.2 Hoechst-Färbung

Zell-Monolayer, kultiviert in Zellkulturröhrchen mit eingelegtem Deckgläschen, wurden infiziert und Persistenz wurde wie unter 2.2.7 beschrieben induziert. 48 h p.i. wurden die Zellmonolayer mit Methanol fixiert und anschließend mit 10  $\mu$ M Hoechst 33258 zur Anfärbung der Zellkerne für 15 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Die Morphologie der Zellkerne (Fragmentierung, Kondensation) wurde mittels eines BX-51 M Fluoreszenzmikroskops (Olympus, Ballerup, Denmark) bei 360 nm und 400-facher sowie 1000-facher Vergrößerung bewertet und aufgenommen.

Die Anzahl der Zellkerne in 20 Zufallsfeldern wurde bei einer Vergrößerung von 400 ausgezählt, und die Prozentzahl an apoptotischen Zellen wurde dabei nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ apoptotische Zellen} = \frac{\text{Zahl apoptischer Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl} \times 100}$$

Es wurden nur die Zellkerne jener Zellen gezählt, welche chlamydiale Inklusionen aufwiesen.

### **2.2.27.3 TUNEL**

Die Analyse des Apoptosestatus akut und persistent infizierter Wirtszellen durch TUNEL-Färbung wurde mittels APO-DIRECT™ Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ca.  $1 \times 10^6$  der entsprechend infizierten und/oder behandelten Zellen wurden für 1 h mit 1 % Paraformaldehyd fixiert und nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS in 70 % Ethanol zu ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml suspendiert und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Färbung gelagert. Für die auf den Einbau von FITC-dUTP-basierende Färbung wurden die Zellen nach Abzentrifugation und Entfernung des Ethanols in 50  $\mu\text{l}$  Färbelösung (Reaktionspuffer, TdT-Enzym, FITC-dUTP, ddH<sub>2</sub>O) für 1-2 h inkubiert, mit dem Rinsing Puffer gespült und anschließend in 0,5 ml Rinsing Puffer aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde anschließend in FACS-Röhrchen überführt und innerhalb einer Stunde in einem FACSCalibur™ -Durchflußzytometer (Becton Dickinson) bei 520 nm (FITC) bzw. 623 nm (PI) vermessen. Die Erfassung der Daten erfolgte mittels der Software CellQuest™.

### **2.2.28.MTT-Test**

Um den Einfluss der akuten und persistenten Chlamydieninfektion auf die Lebensfähigkeit bzw. Proliferationsfähigkeit der Wirtszelle ermitteln zu können, wurde ein MTT-Test (Chemicon) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde zunächst in einem Vorversuch die optimale Zellzahl durch Anlegen von Verdünnungsreihen bestimmt und betrug für die HEp2-Zelllinie 1000 Zellen pro well einer 96-well Platte und für die Fibroblasten 10.000 Zellen pro well.

Nach Bestimmung der optimalen Zellzahl wurden die HEp2-Zellen sowie Fibroblasten in 96-well-Zellkultur-Platten mit flachem Boden ausgesät, mit einer MOI von 5 infiziert und mit den entsprechenden Persistenzinduktoren, wie unter 2.2.7 beschrieben, behandelt. Zum Zeitpunkt 48 h p.i. wurde pro well 10  $\mu\text{l}$  MTT-Lösung zugegeben, für ca. 4 h bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert, anschließend je 100  $\mu\text{l}$  der Entwicklerlösung (Isopropanol mit 0,04 N HCl) zugegeben und die Zellen darin resuspendiert. Innerhalb einer Stunde wurde die Absorption der Proben in einem Platten-Reader (SLT Rainbow) gemessen und anschließend ausgewertet. Die Absorption wird dabei als direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen betrachtet (Mosman, 1983).

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Etablierung der Persistenzmodelle

Für die nachfolgenden Untersuchungen zur molekularen Charakterisierung der chlamydialen Persistenz wurden drei verschiedene Persistenzmodelle etabliert, die auf dem Entzug von Eisen (DAM-Modell), der Gabe von Antibiotika (Penicillin-G-Modell) sowie dem Entzug der Aminosäure Tryptophan (IFN- $\gamma$ -Modell) basieren. Zunächst wurde die Auswirkung der verschiedenen Persistenzinduktoren auf die Infektiosität der Chlamydien getestet und dabei verschiedene Konzentrationen verwendet, um die optimale Konzentration für alle folgenden Arbeiten zu bestimmen. Für jedes Persistenzmodell wurden anschließend die weiterhin für Chlamydien charakteristischen Merkmale wie veränderte Morphologie und Reaktivierbarkeit für den *Cp.-psittaci*-Stamm DC15 überprüft, bevor Untersuchungen zum chlamydialen Expressionsverhalten und zur Wechselwirkung mit der Wirtszelle angeschlossen wurden.

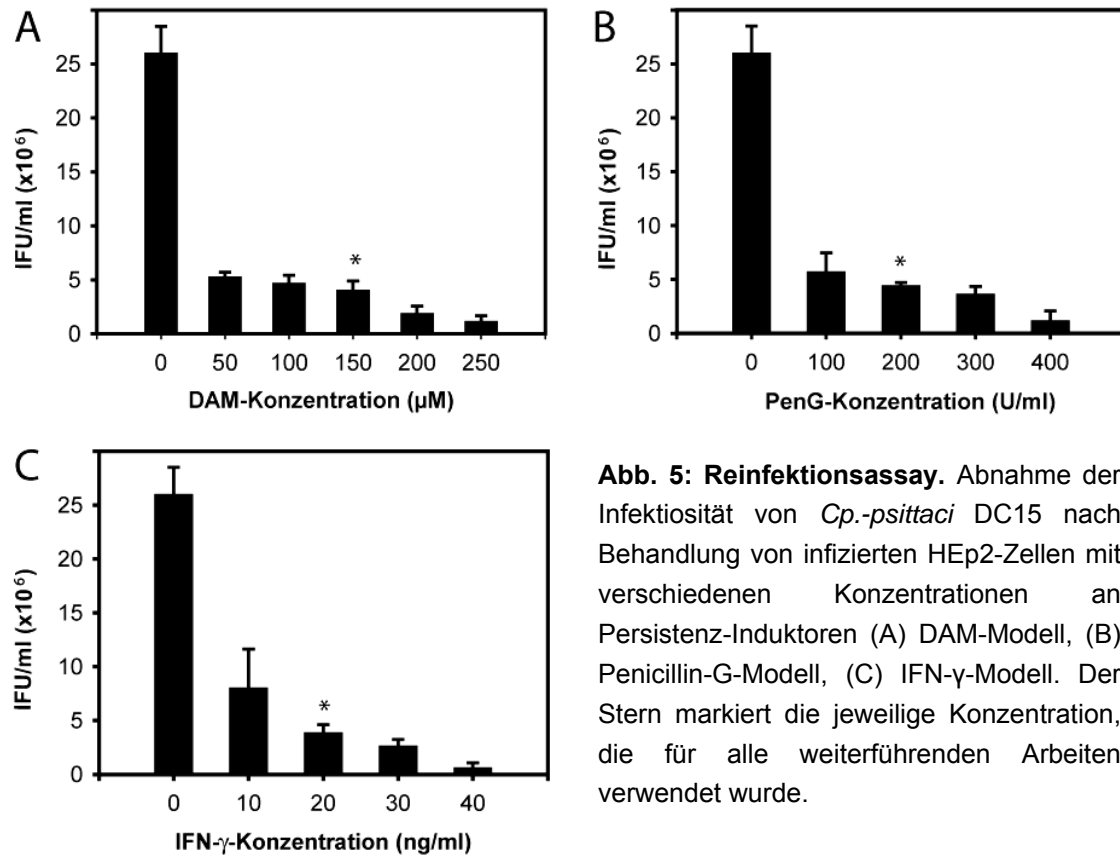
#### 3.1.1 Die Gabe an zunehmenden Konzentrationen von Persistenzinduktoren führt zur Abnahme der Infektiosität von *Cp.-psittaci*

Basierend auf Studien zur DAM-vermittelten *Cp.-pneumoniae*- und *C.-trachomatis*-L2-Persistenz (Al-Younes *et al.*, 2001) wurden verschiedene DAM-Konzentrationen ausgetestet. Da es bereits aus einigen Studien zur IFN- $\gamma$ -vermittelten Persistenz ersichtlich war, dass sich *Cp. psittaci* weniger sensitiv gegenüber IFN- $\gamma$ -Behandlung als *Cp. pneumoniae* oder *C. trachomatis* verhält (Byrne *et al.*, 1989 im Vergleich zu Mehta *et al.*, 1998 und Beatty *et al.*, 1994a), wurden auch höhere DAM-Konzentrationen im Bereich von 50-250  $\mu$ M ausgetestet.

Für die Penicillin-G- und IFN- $\gamma$ -Modelle wurde der getestete Konzentrationsbereich an Daten aus Studien der frühen 1980er bzw. 1970er Jahre angepasst (Moulder, 1983; Matsumoto und Manire, 1970) und betrug für das Penicillin G-Modell 100-400 U/ml und für das IFN- $\gamma$ -Modell 10-40 ng/ml (bzw. 120-480 U/ml).

Mittels Reinfektion konnte die Anzahl der noch produktiven Chlamydien pro Konzentration im jeweiligen Modell bestimmt werden. Für alle weiteren Arbeiten wurde je Modell die Konzentration ausgewählt, bei der ca. 5 % der Chlamydien noch produktiv waren und sich somit nicht im Persistenzstadium befanden, um bei allen drei Persistenzmodellen eine Vergleichbarkeit bezüglich der noch vorhandenen Infektiosität

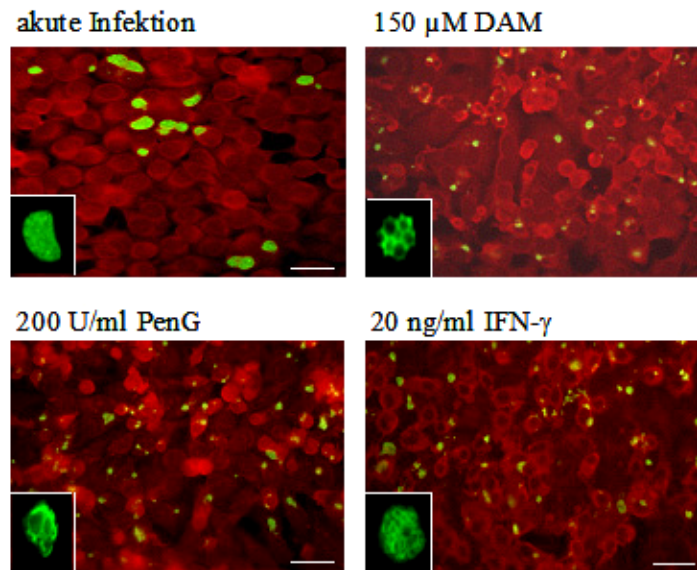
bzw. der Prozentzahl an persistenten Chlamydien zu gewährleisten. Für das DAM-Modell wurde eine Konzentration von 150  $\mu\text{M}$ , für das Penicillin-G-Modell von 200 U/ml und für das IFN- $\gamma$ -Modell von 20 ng/ml gewählt.



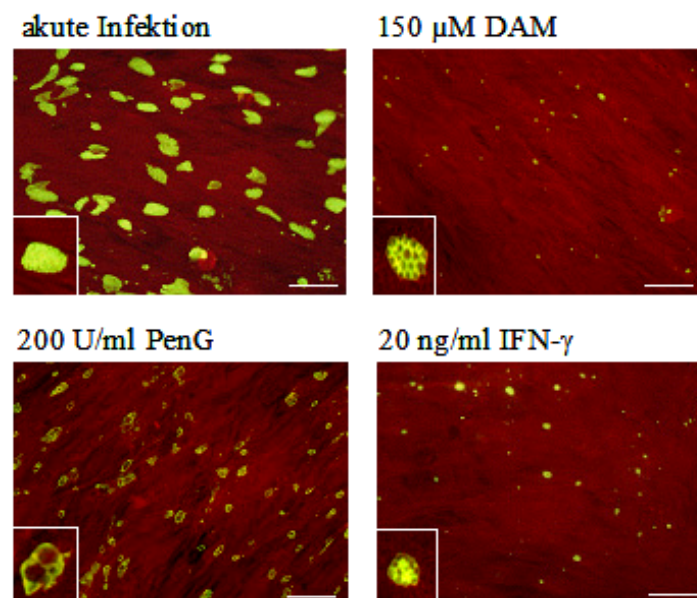
**Abb. 5: Reinfektionsassay.** Abnahme der Infektiosität von *Cp.-psittaci* DC15 nach Behandlung von infizierten HEp2-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Persistenz-Induktoren (A) DAM-Modell, (B) Penicillin-G-Modell, (C) IFN- $\gamma$ -Modell. Der Stern markiert die jeweilige Konzentration, die für alle weiterführenden Arbeiten verwendet wurde.

### 3.1.2 Die Gabe ausgewählter Konzentrationen an Persistenzinduktoren führt zu einer abnormen Morphologie der chlamydialen Inklusionen und Retikularkörper

Zusätzlich zur HEp2-Zelllinie wurde eine weitere Zelllinie, synoviale Fibroblasten, getestet, die vor allem in den späteren Wirtszellstudien zum Einsatz kommen sollte, da eine primäre Zelllinie die *in-vivo*-Verhältnisse eher widerspiegelt als eine Krebszelllinie. Während in der akuten Infektion fluoreszenzmikroskopisch große, um den Wirtszellkern gelagerte Einschlüsse zu finden waren, zeigten sich in allen drei Persistenzmodellen verkleinerte Einschlüsse, die bei 1000-facher Vergrößerung eine aufgelockerte Struktur aufwiesen (Abb. 6 und 7).



**Abb. 6: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von akut und persistent infizierten HEp2-Zellen 48 h p. i.** 400-fache Vergrößerung, Skalierungsbalken = 20  $\mu\text{m}$ . Vergrößerungen einer für jedes Modell typischen Inklusion sind in der linken unteren Ecke dargestellt und entsprechen nicht dem Maßstab des Skalierungsbalkens.



**Abb. 7: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von akut und persistent infizierten Fibroblasten 48 h p.i.** 400-fache Vergrößerung, Skalierungsbalken = 20  $\mu\text{m}$ . Vergrößerungen einer für jedes Modell typischen Inklusion sind in der linken unteren Ecke dargestellt und entsprechen nicht dem Maßstab des Skalierungsbalkens.

Um die Morphologie der Inklusionen genauer darstellen zu können, wurden Präparate für die Transmissionselektronenmikroskopie angefertigt.

### 3.1.2.1 DAM-Modell

Die typischen, durch Eisenmangel induzierten Chlamydieninklusionen waren 3-4-mal kleiner als im akuten Infektionsmodell (Abb. 8). Weiterhin fanden sich im Einschluss aberrante Retikularkörper (ABs) mit der doppelten Größe der RBs, die in akuten Infektionen zu finden waren. Die ABs im DAM-Modell waren vorwiegend irregulär geformt und unter den welligen Zellmembranen fanden sich Knospungen kleiner



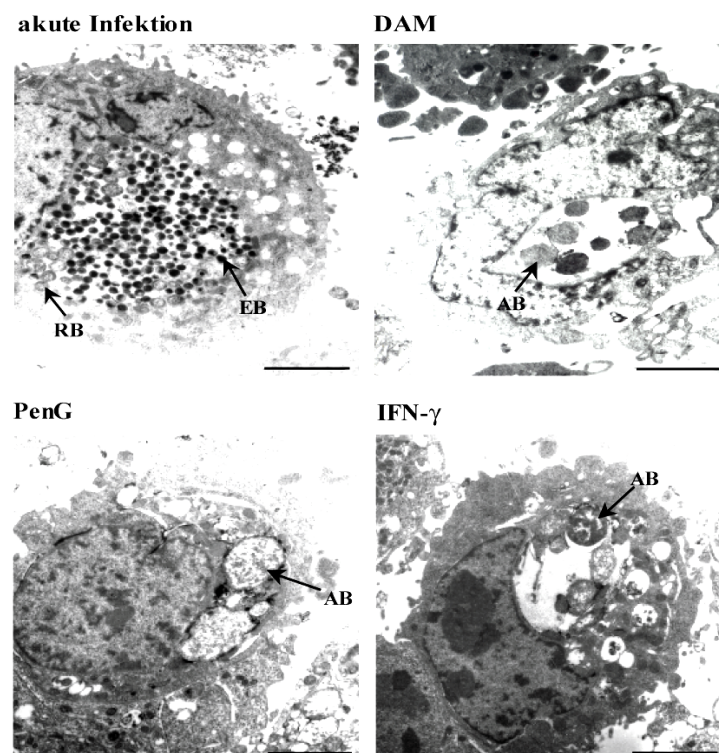
Körperchen. Außerdem waren viele intrainklusionale Membranvesikel für das DAM-Modell charakteristisch.

### 3.1.2.2 Penicillin-G-Modell

Die Behandlung mit Penicillin G führte zu Inklusionen mit wenigen, locker strukturierten ABs (Abb. 8). In den Inklusionen fanden sich sowohl ABs, deren Größe sich kaum von den RBs im akuten Infektionsmodell unterschied bis hin zu ABs, die um das 10-fache größer waren als die RBs im akuten Infektionsmodell. Speziell die größeren ABs verfügten über ein elektronen-transparentes Zytoplasma mit einem lockeren Netzwerk an Filamenten und elektronendichten Spots. Eine multifokale Ablagerung des elektronendichten Materials war an den äußeren Membranen der ABs zu beobachten.

### 3.1.2.3 IFN- $\gamma$ -Modell

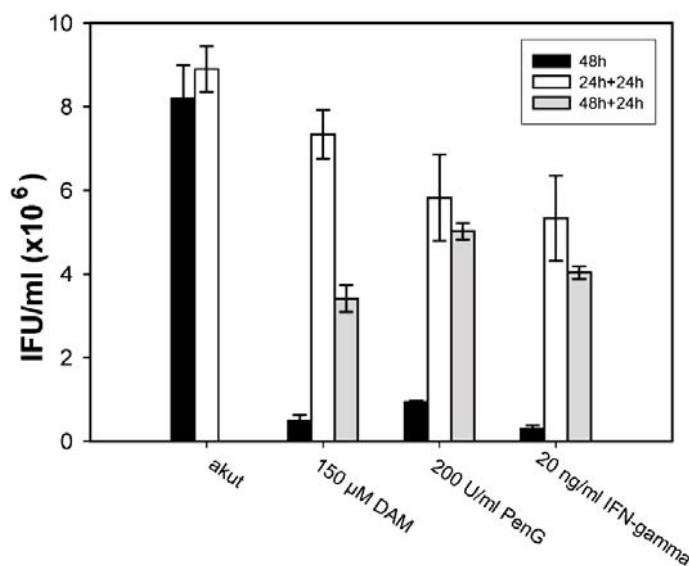
Die Aufnahmen des IFN- $\gamma$ -Persistenzmodells zeigen ABs, welche ca. 10-mal größer als die RBs im akuten Infektionsmodell sind (Abb. 8). Die ABs weisen in ihrer Peripherie eine variable Form auf und besitzen amorphes, granuläres Material im Zentrum. Das Zytoplasma der ABs ist vorwiegend klumpig mit einigen elektronen-transparenten Spots.



**Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen akut und persistent infizierter HEp2-Zellen 48 h p.i. 6000-fache Vergrößerung, Skalierungsbalken 2  $\mu$ m**

### 3.1.3 Der Entzug von Persistenzinduktoren ermöglicht eine Reaktivierung der persistenten Chlamydien

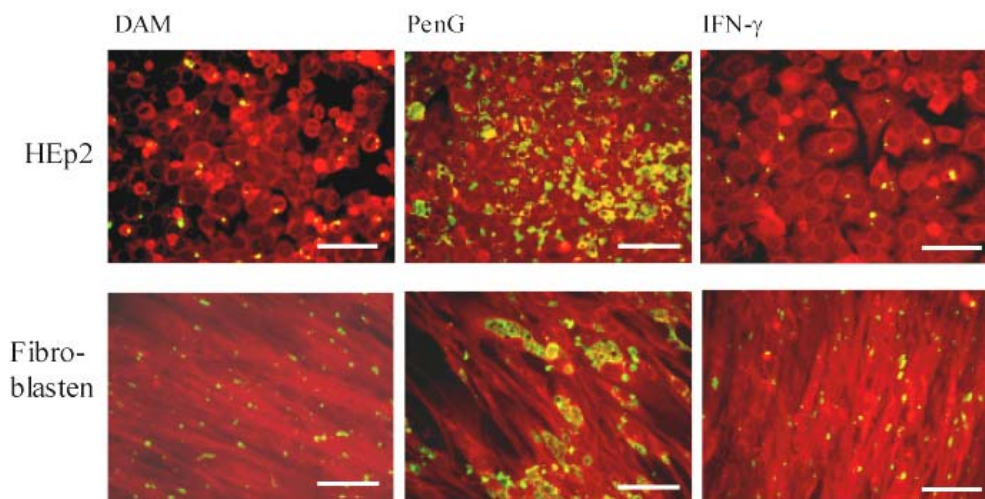
Um die Reversibilität des Persistenzzustandes in den jeweiligen Modellen zu überprüfen, wurde die Fähigkeit der persistenten RBs, sich in infektiöse EBs umzuwandeln und neue Wirtszellen zu infizieren, untersucht. Dazu wurden die Persistenzinduktoren entfernt und stattdessen frisches Medium (Penicillin-G-Modell) oder mit Eisenchlorid bzw. Tryptophan supplementiertes Medium (DAM-Modell bzw. IFN- $\gamma$ -Modell) zugegeben. In einer ersten Versuchsreihe erfolgte der Abzug der Persistenzinduktoren 24 h p.i., in einer zweiten Versuchsreihe zu einem späteren Zeitpunkt, 48 h p.i. Die Ergebnisse des Reaktivierungstests in Abb. 9 zeigen, dass nach einem Entzug der Persistenzinduktoren sowohl 24 h p.i. als auch 48 h p.i. wieder infektiöse EBs gebildet wurden. Verglichen mit dem akuten Infektionsmodell betrug die Prozentzahl infektiöser EBs 85,4 % im DAM-Modell, 68,1 % im Penicillin G-Modell und 62,3 % im IFN  $\gamma$ -Modell. Erfolgte der Abzug der Persistenzinduktoren erst 48 h p.i. waren die Chlamydien zwar immer noch zur Rückgewinnung ihrer Infektiosität in der Lage, jedoch in geringeren Prozentzahlen als bei einer Reaktivierung 24 h p.i. Im DAM-Modell war nach Abzug der Persistenzinduktoren 48 h p.i. eine Infektiosität von 38,4 % im Vergleich zur akuten Infektion zu verzeichnen, im Penicillin-G-Modell war eine 56,4 %ige und im IFN- $\gamma$ -Modell eine 59,9 %igen Rückgewinnung der Infektiosität festzustellen (Abb. 9).



**Abb. 9: Reaktivierung der persistenten Chlamydien nach Abzug der Persistenzinduktoren 24 h p.i. und 48 h p. i.** Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Infektionsversuchen. Für die akute Infektion erfolgte kein Mediumwechsel 48 h p.i., da zu diesem Zeitpunkt die reifen EBs freigesetzt und somit mit dem Medium entfernt worden wären.

### 3.1.4 Die chlamydiale Persistenz lässt sich über die Dauer eines produktiven Entwicklungszyklus hinaus aufrechterhalten

Da Persistenz als Langzeitbeziehung zwischen den Chlamydien und der Wirtszelle definiert ist (Beatty *et al.*, 1994b) wurde ausgetestet, ob sich durch einen andauernden Persistenzstimulus die Persistenz länger als 48 h p.i. aufrechterhalten lässt. Dazu wurde 48 h p.i. das Medium von den persistenten Kulturen entfernt, um verbrauchte Persistenzinduktoren nachzufüllen und somit Konzentrationen wie zu Beginn der Persistenzentwicklung zu gewährleisten. Die Morphologie der Chlamydien wurde anschließend 72 h und 96 h p.i. überprüft. Sowohl 72 h p.i. als auch 96 h p.i. (Abb. 10) ließ sich die typische persistente Morphologie in jedem Modell fluoreszenzmikroskopisch nachweisen.



**Abb. 10: Immunfluoreszenzbilder der persistenten *Cp.-psittaci*-Infektionen 96 h p.i..** Dargestellt sind HEp2-Zellen und Fibroblasten, die mit 150  $\mu$ M DAM, 200 U/ml PenG bzw. 20 ng/ml IFN- $\gamma$  behandelt und mit *Cp.-psittaci* DC15 (MOI 1) infiziert wurden. Nach 48 h erfolgte ein Mediumwechsel und die Zugabe von frischen Persistenzinduktoren entsprechender Konzentrationen. 400-fache Vergrößerung, Skalierungsbalken: 20  $\mu$ m

### 3.2 Transkriptionsunterschiede zwischen akuter und persistenter Infektion

Zur Untersuchung chlamydialer Transkriptionsunterschiede zwischen produktiver und persistenter Infektion wurde zunächst eine Reihe von Genen ausgewählt, die z. T. in vorangegangenen Arbeiten zur Persistenz von *Cp. pneumoniae* oder *C. trachomatis* ein differentielles Expressionsverhalten zeigten ( Belland *et al.*, 2004b; Polkinghorne *et al.*,

2006; Hogan *et al.*, 2003) bzw. solche Gene, deren differentielle Regulation in den Persistenzmodellen aufgrund der Funktion der von ihnen codierten Proteine vermutet wurde. Die ausgewählten 31 Gene, die von ihnen codierten Proteine und eine Zuordnung zu funktionellen Klassen sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2. Für Expressionsuntersuchungen ausgewählte chlamydiale Gene**

Gen	Genprodukt	Funktionelle Klasse
<i>groEL-1</i>	Heat Shock Protein 60 (HSP60)	Stress Response
<i>grpE</i>	Cofaktor HSP70	Stress Response
<i>dnaK</i>	Heat Shock Protein 70 (HSP70)	Stress Response
<i>groES</i>	Heat Shock Factor 10	Stress Response
<i>ompA</i>	Major Outer Membrane Protein (MOMP)	Membran Protein
<i>omcB</i>	Cystein-rich Outer Membrane Protein B	Membran Protein
<i>omcA</i>	Cystein-rich Outer Membrane Protein A	Membran Protein
<i>pomp91A</i>	Polymorphic Outer Membrane Protein 91A	Membran Protein
<i>pomp91B</i>	Polymorphic Outer Membrane Protein 91B	Membran Protein
<i>euo</i>	DNA-Binde-Protein	Regulation
<i>cpaf</i>	Protease-like Activity Factor	Apoptose
<i>efp2</i>	Elongationsfaktor P	Translation
<i>hctA</i>	Histone-like Protein 1	Chromosomenkondensation
<i>cadd (CT610)</i>	Chlamydial Protein associating with Death Domains	Apoptose
<i>ftsW</i>	Zellteilungsprotein	Zellteilung
<i>ctcB</i>	Response Regulator	Signaltransduktion
<i>ctcC</i>	Histidin Kinase	Signaltransduktion
<i>rpoD</i>	Sigma Faktor (sig 66)	Sigmafaktoren
<i>rpsD</i>	Sigma Faktor (sig 28)	Sigmafaktoren
<i>rpoN</i>	Sigma Faktor (sig 54)	Sigmafaktoren
<i>dcrA</i>	Divalent cation-dependent regulator A	Regulation
<i>sctN</i>	sekretiertes Effektor-Protein	Typ III Sekretion
<i>incA</i>	Inclusion Membrane Protein A	Typ III Sekretion
<i>pknD</i>	Ser/Thr-Protein Kinase	Signaltransduktion
<i>pkn5</i>	Ser/Thr-Protein Kinase	Signaltransduktion/Typ III Sekretion
<i>pkn1</i>	Ser/Thr-Protein Kinase	Signaltransduktion
<i>pp2C</i>	PP2C Phosphatase	Signaltransduktion
<i>hflX</i>	GTPase	Signaltransduktion
<i>yphC</i>	GTPase	Signaltransduktion
<i>yhbZ</i>	GTPase	Signaltransduktion
<i>ychF</i>	GTPase	Signaltransduktion

### 3.2.1 Die Ausbildung und Aufrechterhaltung der chlamydialen Persistenz in HEP2-Wirtszellen geht mit Veränderungen in der Expression spezifischer Gene einher

Die in Tabelle 2 aufgeführten chlamydialen Gene wurden mittels quantitativer Real-Time-PCR (RTQ-PCR) hinsichtlich bestehender Unterschiede in der Transkriptmenge zwischen akuter und persistenter Chlamydieninfektion während des chlamydialen Entwicklungszyklus untersucht. Bei der Berechnung der Expressionsunterschiede wurde zum einen gegen das *16S rRNA*-Gen (Tabellen 3-6) und zum anderen gegen *gyrA*, welches für eine chlamydiale Gyrase codiert (Tabellen 9-12 im Anhang), normalisiert.

Daraus ergaben sich im Allgemeinen zwei Auffälligkeiten: Während im frühen bzw. mittleren Stadium des Entwicklungszyklus (12 h p.i.) noch kaum Expressionsänderungen auftraten bzw. einige Gene eine leichte Heraufregulation zeigten (Tabelle 3), war ab 24 h p.i. eine zunehmende Herunterregulation der Transkripte der untersuchten Gene in den Persistenzmodellen zu verzeichnen (Tabellen 4, 5 und 6). Speziell 48 h p.i. war eine Herunterregulation von 54 % der untersuchten Gene in allen drei Persistenzmodellen gemeinsam festzustellen. (Tabelle 6).

Zum anderen zeigte sich eine größere Übereinstimmung zwischen den Daten des DAM- und IFN- $\gamma$ -Modells als zwischen dem Penicillin-G-Modell und den beiden anderen Modellen.

**Tabelle 3. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener *Cp.-psittaci*-Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 12 h p.i. (normalisiert gegen 16S rRNA), Wirtszelle HEP2**

Gen	Expressionsänderung (x-fach $\pm$ SD) <sup>a</sup>		
	DAM vs. akut	PenG vs. akut	IFN- $\gamma$ vs. akut
<i>groEL1-1</i>	1,29 $\pm$ 0,35	1,19 $\pm$ 0,37	1,18 $\pm$ 0,28
<i>grpE</i>	1,46 $\pm$ 0,33	1,37 $\pm$ 0,39	1,28 $\pm$ 0,10
<i>dnaK (hsp70)</i>	1,10 $\pm$ 0,10	1,16 $\pm$ 0,16	1,96 $\pm$ 0,09
<i>groES</i>	1,37 $\pm$ 0,27	<b>2,26<math>\pm</math>0,21</b>	1,59 $\pm$ 0,14
<i>ompA</i>	1,84 $\pm$ 0,50	1,33 $\pm$ 0,63	0,72 $\pm$ 0,15
<i>omcA</i>	<b>3,27<math>\pm</math>0,57*</b>	<b>3,68<math>\pm</math>0,73</b>	<b>6,18<math>\pm</math>0,84</b>
<i>omcB</i>	1,52 $\pm$ 0,27	1,15 $\pm$ 0,49	<b>2,68<math>\pm</math>0,62</b>
<i>pomp 91A</i>	<b>2,46<math>\pm</math>0,33*</b>	1,69 $\pm$ 0,15	1,75 $\pm$ 0,20
<i>pomp 91B</i>	1,08 $\pm$ 0,31	<b>2,62<math>\pm</math>0,46</b>	<b>9,19<math>\pm</math>1,35</b>
<i>euo</i>	1,32 $\pm$ 0,23	<b>2,49<math>\pm</math>0,30</b>	<b>2,60<math>\pm</math>0,35*</b>
<i>cpaf</i>	1,52 $\pm$ 0,23	<b>2,47<math>\pm</math>0,29</b>	1,15 $\pm$ 0,52

<i>efp2</i>	1,21±0,39	1,27±0,34	1,64±0,18
<i>hctA</i>	1,71±0,99	1,56±0,22	11,81±0,85
<i>cadd (CT610)</i>	1,12±0,52	1,61±0,15	2,10±0,32
<i>ftsW</i>	1,22±0,20	1,47±0,19	1,92±0,18
<i>ctcC</i>	1,29±0,38	1,21±0,41	1,30±0,13
<i>ctcB</i>	1,84±0,33	1,32±0,26	3,47±0,83
<i>rpoD (sigA)</i>	1,68±0,33	1,05±0,20	1,02±0,27
<i>rpsD (sig28)</i>	1,17±0,13	1,28±0,49	1,30±0,25
<i>rpoN (sig54)</i>	2,06±0,32	1,34±0,24	4,66±0,40
<i>dcrA</i>	1,25±0,59	1,32±0,32	1,15±0,12
<i>sctN</i>	1,28±0,26	1,01±0,31	3,78±0,49*
<i>incA</i>	3,59±1,08	1,11±0,30	3,08±0,50
<i>PP2C (CT259)</i>	1,42±0,84	1,92±0,76	1,11±0,26
<i>pknD</i>	1,28±0,24	1,27±0,56	1,18±0,45
<i>pkn1</i>	1,61±0,24	1,01±0,32	6,97±0,72
<i>pkn5</i>	1,26±0,21	1,31±0,20	1,20±0,49
<i>hflX</i>	1,11±0,10	1,04±0,16	1,54±0,075
<i>yhbZ</i>	1,71±0,24	1,17±0,16	1,43±0,09
<i>yphC</i>	1,43±0,13	1,25±0,48	-2,67±0,52
<i>yehF</i>	1,57±0,42	1,37±0,37	1,03±0,26

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung ± Standardabweichung (SD) dargestellt

\* Expressionsunterschiede waren nicht signifikant, wenn gegen *gyrA* normalisiert wurde  
 Rotfärbung indiziert signifikante Hochregulation (≥ Faktor 2)  
 Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulation (≤ Faktor 2)

**Tabelle 4. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener *Cp.-psittaci*-Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 24 h p.i. (normalisiert gegen 16SrRNA), Wirtszelle HEp2**

Gen	Expressionsänderung (x-fach ± SD) <sup>a</sup>		
	DAM vs. akut	PenG vs. akut	IFN-γ vs. akut
<i>groEL-1</i>	1,25±0,06	2,32±0,29	-3,85±1,8*
<i>grpE</i>	1,00±0,35	2,72±0,52	-5,88±1,5*
<i>dnaK (hsp70)</i>	-5,88±0,41	1,13±0,23	-4,55±0,59
<i>groES</i>	1,96±0,27	-5,0±2,77*	-2,78±0,18
<i>ompA</i>	1,96±0,19	1,09±0,45	1,39±0,09
<i>omcA</i>	10,0±4,12	6,67±2,5	25,0±8,33
<i>omcB</i>	-25,0±4,0	-4,55±0,69	-5,0±2,3
<i>pomp 91A</i>	-5,88±0,10	-2,94±0,94	-12,50±3,5
<i>pomp 91B</i>	-7,14±2,14	-2,56±0,25	-5,80±1,38

<i>omcA</i>	-25,0±8,3	-6,25±2,85	-5,0±2,37
<i>euo</i>	1,37±0,16	1,97±0,13	1,02±0,31
<i>cpaf</i>	1,69±0,29	1,01±0,18	-5,26±2,23*
<i>efp2</i>	1,06±0,47	1,02±0,50	1,05±0,20
<i>hctA</i>	-20,0±7,5	-5,0±1,97	-16,6±9,57
<i>cadd (CT610)</i>	1,05±0,25	1,07±0,43	2,39±0,32
<i>ftsW</i>	-3,22±1,05	-2,56±0,52	-5,26±2,56
<i>ctcC</i>	-5,88±2,75	-10,0±2,31	-9,09±1,4
<i>ctcB</i>	-3,85±1,35	-7,14±1,26	-5,56±1,85
<i>rpoD (sigA)</i>	-2,22±0,19	-1,56±0,07	-1,64±0,25
<i>rpsD (sig28)</i>	-16,67±6,67	-5,56±1,21	-6,67±3,44
<i>rpoN (sig54)</i>	-4,0±1,3	-1,32±0,18	1,46±0,20
<i>dcrA</i>	-1,72±0,12	1,01±0,11	-4,55±1,32
<i>sctN</i>	-2,5±0,12	-1,96±0,08	-2,78±0,45
<i>incA</i>	3,96±0,99	1,16±0,33	1,01±0,32
<i>PP2C (CT259)</i>	-6,67±1,90	-1,37±0,14	-1,35±0,20
<i>pknD</i>	-2,78±0,56*	-1,36±0,08	1,39±0,21
<i>pkn1</i>	-5,0±1,0	-2,2±0,22	-2,86±0,42
<i>pkn5</i>	-3,03±0,24	-1,89±0,19	-3,57±1,0*
<i>hflX</i>	-2,82±0,75	-1,53±0,27	-13,39±3,88
<i>yhbZ</i>	2,05±0,59	1,73±0,156	1,35±0,27
<i>yphC</i>	-15,39±0,46	-3,38±0,106	-74,16±3,9
<i>yehF</i>	-1,69±0,16	1,72±0,45	-2,9±0,37

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung ± Standardabweichung (SD) dargestellt

\* Expressionsunterschiede waren nicht signifikant, wenn gegen *gyrA* normalisiert wurde  
 Rotfärbung indiziert signifikante Hochregulation (≥ Faktor 2)  
 Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulierung (≤ Faktor 2)

**Tabelle 5. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener *Cp.-psittaci*-Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 36 h p.i. (normalisiert gegen 16SrRNA), Wirtszelle HEP2**

Gen	Expressionsänderung (x-fach ± SD) <sup>a</sup>		
	DAM vs. akut	PenG vs. akut	IFN-γ vs. akut
<i>groEL1</i>	-2,63±0,63	1,10±0,17	-6,67±1,9
<i>grpE</i>	-1,19±0,33	1,85±0,08	-5,55±2,22
<i>dnaK (hsp70)</i>	-5,0±1,00	0,69±0,12	-6,25±1,90
<i>groES</i>	-1,14±0,28	2,97±0,29*	-3,85±1,28
<i>ompA</i>	-3,13±1,16	1,61±0,72	-5,26±2,23
<i>omcA</i>	-14,29±6,59	-3,85±1,62	-14,29±4,29

<i>omcB</i>	-25,0±10,7	-7,69±2,43	-25,0±7,5
<i>pomp 91A</i>	-4,0±0,97	-1,14±0,13	-16,67±6,67
<i>pomp 91B</i>	-3,57±1,07	-2,27±0,23	-4,17±0,94
<i>euo</i>	1,15±0,13	2,75±0,14	1,38±0,31
<i>cpaf</i>	-2,63±0,71	1,78±0,17	-2,86±0,42*
<i>efp2</i>	3,71±0,22*	2,49±0,39*	1,08±0,20
<i>hctA</i>	-5,5±1,85	1,44±0,17	1,17±0,16
<i>cadd (CT610)</i>	-1,30±0,35	-1,06±0,12	2,83±0,53*
<i>ftsW</i>	-4,35±1,31	-2,5±0,37	-3,85±0,51
<i>ctcC</i>	-14,29±5,95	-2,86±0,77	-16,67±7,58
<i>ctcB</i>	-5,26±0,71	-2,44±0,36	-4,17±1,46
<i>rpoD (sigA)</i>	-2,27±0,10	1,15±0,46	-1,06±0,12
<i>rpsD (sig28)</i>	-1,45±0,07	-1,22±0,48	-7,69±2,93
<i>rpoN (sig54)</i>	3,33±1,25	1,05±0,13	1,24±0,35
<i>dcrA</i>	1,12±0,16	1,76±0,14	1,08±0,23
<i>sctN</i>	-3,70±1,14	1,57±0,12	-1,26±0,13
<i>incA</i>	1,09±0,21	-3,13±1,04	1,33±0,38
<i>PP2C (CT259)</i>	-2,70±0,43	3,77±1,21	1,25±0,34
<i>pknD</i>	-1,23±0,23	2,81±0,77*	-1,14±0,69
<i>pkn1</i>	-1,14±0,10	3,15±0,89	1,52±0,27
<i>pkn5</i>	-3,57±1,00	1,46±0,25	-1,79±0,19
<i>hflX</i>	-5,81±0,48	-1,85±0,12	-1,49±0,44
<i>yhbZ</i>	-1,32±0,09	2,36±0,27	2,68±0,38
<i>yphC</i>	-50,0±4,30	-2,94±0,30	-17,86±3,75
<i>ychF</i>	-1,61±0,02	2,04±0,25	1,34±0,33

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung ± Standardabweichung (SD) dargestellt

\* Expressionsunterschiede waren nicht signifikant, wenn gegen *gyrA* normalisiert wurde  
 Rotfärbung indiziert signifikante Hochregulation (≥ Faktor 2)  
 Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulierung (≤ Faktor 2)

**Tabelle 6. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener *Cp.-psittaci*-Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 48 h p.i. (normalisiert gegen *16SrRNA*), Wirtszelle HEp2**

Gen	Expressionsänderung (x-fach ± SD) <sup>a</sup>		
	DAM vs. akut	PenG vs. akut	IFN-γ vs. akut
<i>groEL1</i>	-1,27±0,22	1,64±0,32	-9,09±3,83*
<i>grpE</i>	-2,44±0,55	1,70±0,53	-25,0±10,71
<i>dnaK (hsp70)</i>	-4,34±0,87	-3,03±0,86	-16,67±5,56



<i>groES</i>	-1,25±0,15	1,60±0,38	-11,1±3,97
<i>ompA</i>	-2,94±0,17	2,45±0,33	-6,67±1,67*
<i>omcA</i>	-12,5±4,80	-9,09±2,84	-100,0±16,67
<i>omcB</i>	-9,09±2,42	-6,67±1,11	-100,0±50,0
<i>pomp 91A</i>	-3,57±0,93	-3,13±0,69	-12,5±4,17
<i>pomp 91B</i>	-5,88±2,18	-9,09±2,84	-20,0±8,89
<i>euo</i>	-4,55±1,76	-2,86±0,68	-7,69±2,69
<i>cpaf</i>	-3,125±0,18	-1,02±0,35	-4,55±0,38*
<i>efp2</i>	-11,1±4,44	-3,85±1,35	-4,55±1,42*
<i>hctA</i>	-8,33±1,67	-3,03±0,81	-100,0±16,67
<i>cadd (CT610)</i>	-2,44±0,52	-2,78±0,93	-2,86±0,58
<i>ftsW</i>	-4,55±0,55	-2,78±0,46	-20,0±4,6
<i>ctcC</i>	-8,33±2,78	-4,34±1,22	-11,11±2,78
<i>ctcB</i>	-3,45±0,59	-4,35±1,22	-11,10±1,11
<i>rpoD (sigA)</i>	-2,56±0,18	-2,12±0,23	-9,09±2,42
<i>rpsD (sig28)</i>	-4,35±0,90	-4,0±0,88	-33,33±8,33
<i>rpoN (sig54)</i>	-2,63±0,35	-3,45±0,59	-6,25±1,25
<i>dcrA</i>	-3,57±0,54	-1,47±0,15	-5,88±1,12
<i>sctN</i>	-2,63±0,99	-1,41±0,14	-8,33±2,78
<i>incA</i>	0,42 ±0,13	-4,35±1,65*	-2,78±0,40*
<i>PP2C (CT259)</i>	-3,57±1,13	-1,14±0,07	-6,67±2,82
<i>pknD</i>	-2,33±0,16	-1,03±0,25	-6,67±2,12
<i>pkn1</i>	1,03±0,10	1,20±0,29	-1,25±0,26
<i>pkn5</i>	-3,07±1,11	-2,44±0,21*	-2,63±0,41
<i>hflX</i>	-2,95±0,5	1,4±0,17	-8,25±3,6
<i>yhbZ</i>	-2,31±0,5	-1,35±0,19	-4,46±1,45
<i>yphC</i>	-14,76±1,71	-2,17±0,028	-76,34±12,8
<i>yehF</i>	-1,78±0,49	1,46±0,36	-4,58±1,4

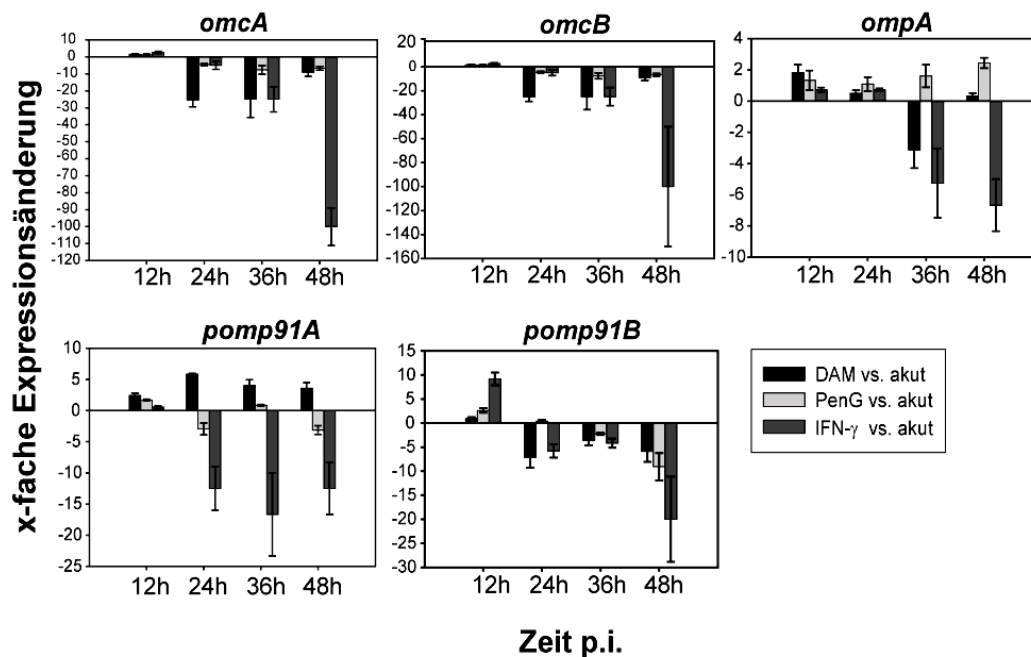
<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung ± Standardabweichung (SD) dargestellt

\* Expressionsunterschiede waren nicht signifikant, wenn gegen *gyrA* normalisiert wurde  
 Rotfärbung indiziert signifikante Hochregulation (≥ Faktor 2)  
 Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulierung (≤ Faktor 2)

Um die Daten der einzelnen Gene übersichtlicher darstellen zu können, sind im folgenden die Ergebnisse, nach der funktionellen Klassifizierung der Genprodukte unterteilt, graphisch dargestellt.

### 3.2.1.1 Membran-Proteine (*ompA*, *omcB*, *omcA*, *pomp91A*, *pomp91B*)

Von den hier untersuchten Membran-Protein-codierenden Genen sind besonders die Daten für *omcA* und *omcB* auffällig. *Omca* und *omcB* codieren für cysteinreiche Membranproteine, welche einen wesentlichen Bestandteil der Außenmembran der Chlamydien ausmachen. Besonders im IFN- $\gamma$ -Persistenzmodell, zum Zeitpunkt 48 h p.i., war eine starke Abnahme der Transkriptmenge von *omcB* und *omcA* um ca. den Faktor 100 zu verzeichnen. Wie aus den Graphen in Abbildung 11 ersichtlich, war eine große Übereinstimmung in der Expression von *omcA* und *omcB* bezüglich der Zeit und auch der drei Persistenzmodelle festzustellen. Wie schon im Falle von *omcA* und *omcB* zeigte sich auch für die drei weiteren, in dieser Gruppe untersuchten Gene, *ompA*, *pomp91A* und *pomp91B*, die größte Expressionsänderung im IFN- $\gamma$ -Modell.

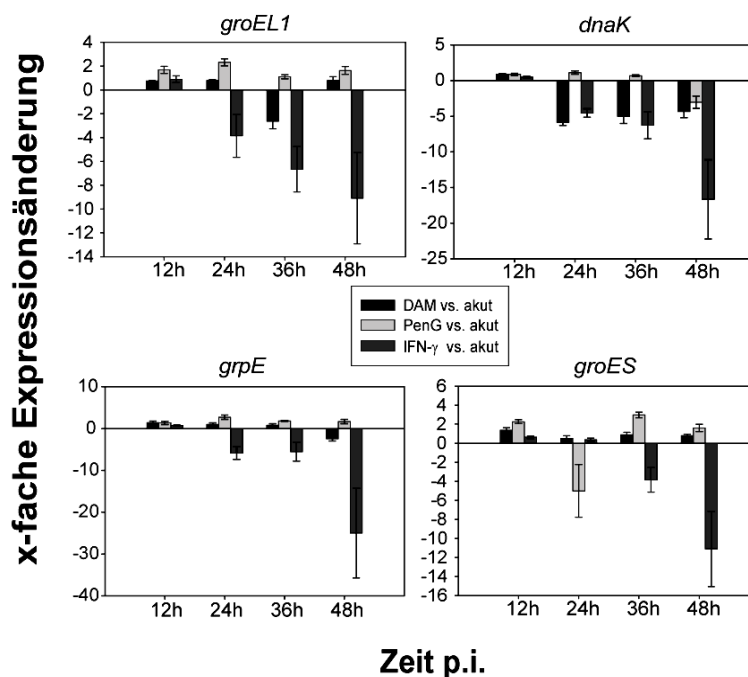


**Abb. 11: Expression Membranprotein-codierender Gene 12 h bis 48 h p.i.** Dargestellt sind die Expressionsänderungen der persistenten Infektionsmodelle im Vergleich zur akuten Infektion. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen mit jeweils Dreifachbestimmung in der RTQ-PCR.

### 3.2.1.2 Stress Response (*groELI*, *dnaK*, *grpE*, *groES*)

Die in dieser Gruppe zusammengefassten Gene codieren im Wesentlichen für Hitzeschock-Proteine, denen eine Rolle in der Stress Response zugeordnet wird. Das chlamydiale *groELI* codiert für das Hitzeschockprotein 60 (HSP60), *dnaK* für das Hitzeschockprotein 70 (HSP70), *grpE* codiert für einen Kofaktor des HSP70 und das *groES* codiert für den

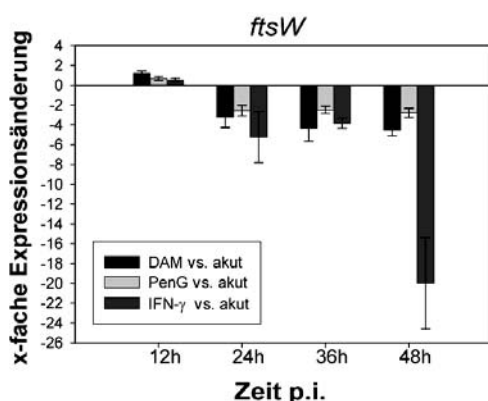
Hitzeschock-Faktor 10. Hinsichtlich der Expression ließ sich für die Hitzeschockprotein-codierenden Gene kein gemeinsamer Trend zwischen den Modellen untereinander ausmachen. Innerhalb der einzelnen Modelle zeigten sich bezüglich der 4 untersuchten Gene jedoch Ähnlichkeiten im Expressionsverhalten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle Hitzeschockprotein-codierenden Gene in dieser Gruppe im IFN- $\gamma$ -Modell mehr oder weniger stark herunterreguliert waren, wohingegen sich im DAM-Modell (mit Ausnahme des *dnaK*) und im Penicillin-G-Modell keine Expressions-Unterschiede im Vergleich zur akuten Infektion zeigten.



**Abb. 12: Expression Stress-Response-Protein-codierender Gene 12 h bis 48 h p.i.** Dargestellt sind die Expressionsänderungen der persistenten Infektionsmodelle im Vergleich zur akuten Infektion. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen mit jeweils Dreifachbestimmung in der RTQ-PCR.

### 3.2.1.3 Zellteilung (*ftsW*)

*FtsW* codiert für ein Zellteilungsprotein, dessen *E.-coli*- Homolog in die Septierung sowie die Stabilisierung des Z-Ringes während der Zellteilung involviert ist (Donachie, 1993).



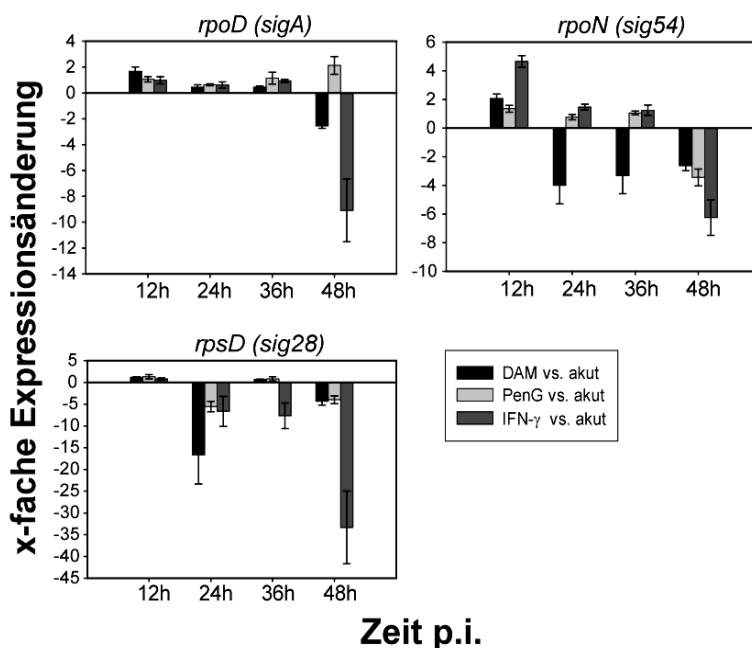
**Abb. 13: Expression von *ftsW* 12 h bis 48 h p.i.** Dargestellt sind die Expressionsänderungen der persistenten Infektionsmodelle im Vergleich zur akuten Infektion. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen mit jeweils Dreifachbestimmung in der RTQ-PCR.

Das *ftsW* zeigte ab einem Zeitpunkt von 24 h p.i. in allen drei Persistenzmodellen verglichen mit der akuten Infektion eine Herunterregulation, die bis zum Ende des Versuchszeitraumes, 48 h p.i., aufrechterhalten blieb (Abb. 13). Speziell im IFN- $\gamma$ -Modell waren hierbei wiederum die stärksten Expressionsänderungen zu verzeichnen.

Zu Beginn der Untersuchungen (12 h p.i.) hingegen, fanden sich, wie generell für eine Mehrzahl der untersuchten Gene zu beobachten, keine Expressionsänderungen.

### 3.2.1.4 Transkriptionsfaktoren (*rpoD*, *rpsD*, *rpoN*)

Die Genomsequenz von *C. trachomatis* weist drei Gene auf, welche für Sigma-Faktoren codieren und Homologe in den anderen Chlamydienspezies haben: *rpoD* (*sigmaA*), *rpsD* (*sigma28*) und *rpoN* (*sigma54*) (Stephens *et al.*, 1998). Diese Gene werden zu unterschiedlichen Zeiten im chlamydialen Entwicklungszyklus exprimiert, wobei *rpoD* im frühen Stadium exprimiert wird und *rpoN* sowie *rpsD* zu späteren Stadien exprimiert werden (Mathews *et al.*, 1999).



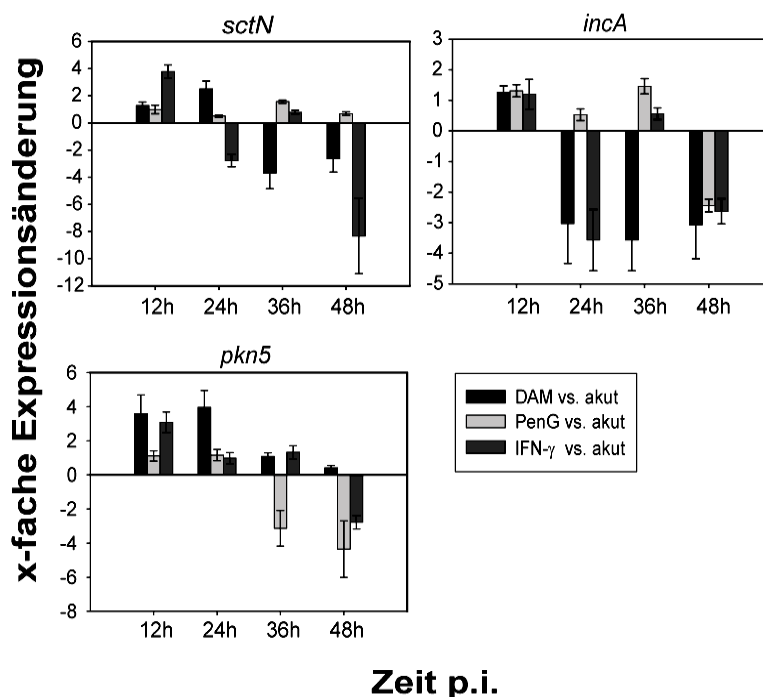
**Abb. 14: Expression der Sigma-Faktor-codierenden Gene 12 h bis 48 h p.i.** Dargestellt sind die Expressionsänderungen der persistenten Infektionsmodelle im Vergleich zur akuten Infektion. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen mit jeweils Dreifachbestimmung in der RTQ-PCR.

Während *rpoN* im DAM-Modell zu Zeitpunkten ab 24 h p.i. herunterreguliert war, zeigte sich im Penicillin-G- und IFN- $\gamma$ -Modell erst zum finalen 48 h p.i.-Zeitpunkt eine Herunterregulation. *RpoD* war in allen drei Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 48 h p.i. herunterreguliert. Das für den Sigmafaktor 28 codierende *rpsD* war nur im IFN- $\gamma$ -Modell zu allen Zeitpunkten ab 24 h p.i. herunterreguliert. Für die Sigma-Faktor-codierenden Gene lässt sich also kein gemeinsames Muster in der Expression erkennen, außer einer

Herrunterregulation im DAM- und IFN- $\gamma$ - Persistenzmodell zum Zeitpunkt 48 h p.i. Ebenso wenig ist ein Übergang in der Expression eines Sigma-Faktors zum nächsten zu verzeichnen, wie es bei einer Sigma-Faktor-Kaskade der Fall wäre.

### 3.2.1.5 Typ-III-Sekretion (*sctN*, *incA*, *pkn5*)

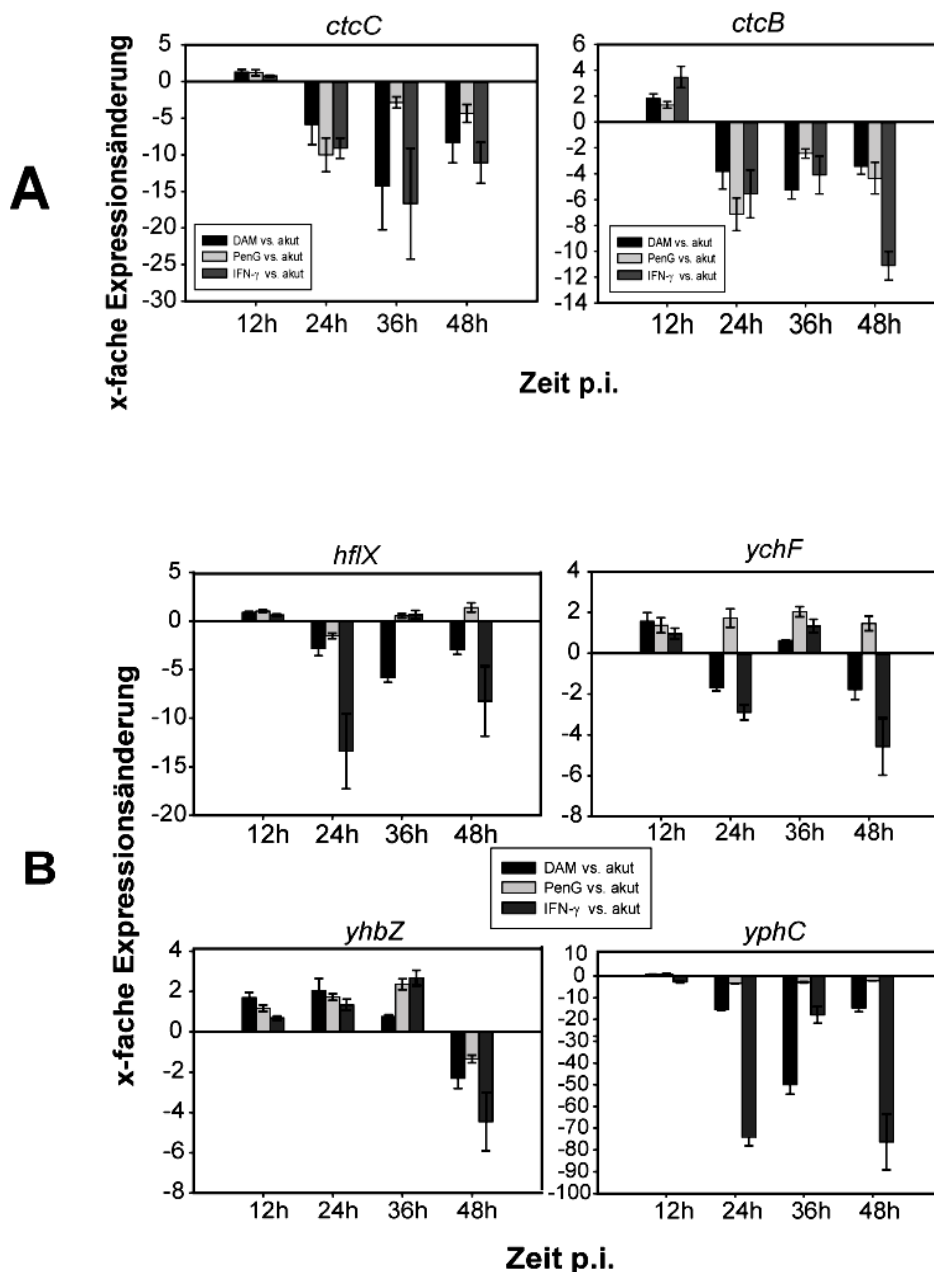
Die hier untersuchten Gene *sctN* und *incA* codieren für ein sekretiertes Effektorprotein bzw. das Inclusion Membran Protein A, welche beide eine Rolle im chlamydialen Typ-III-Sekretionssystem spielen. Das IncA ist an der Außenseite der Inklusionsmembran in Richtung Wirtszellzytosol lokalisiert, wohingegen das SctN in der Herunterregulierung des Typ III-Sekretionssystems und des physikalischen Abschaltens des Injektisoms involviert ist (Peters *et al.*, 2007). Das durch das Gen *pkn5* codierte Protein lässt sich in zwei funktionelle Klassen eingruppierten. Zum einen spielt die durch *pkn5* codierte Serin/Threonin-Kinase eine Rolle in der Signaltransduktion, zum anderen wird diese Kinase durch das Injektisom sekretiert und erfüllt damit eine Funktion als Typ III-System-Effektor-Protein. Zwischen der Expression von *sctN*, *incA* und *pkn5* ließ sich im Wesentlichen kein gemeinsames Muster in den Persistenzmodellen (verglichen mit der akuten Infektion) erkennen. Auffällig war jedoch eine leichte Hochregulation von *incA* und *sctN* im IFN  $\gamma$ -Modell 12 h p.i.

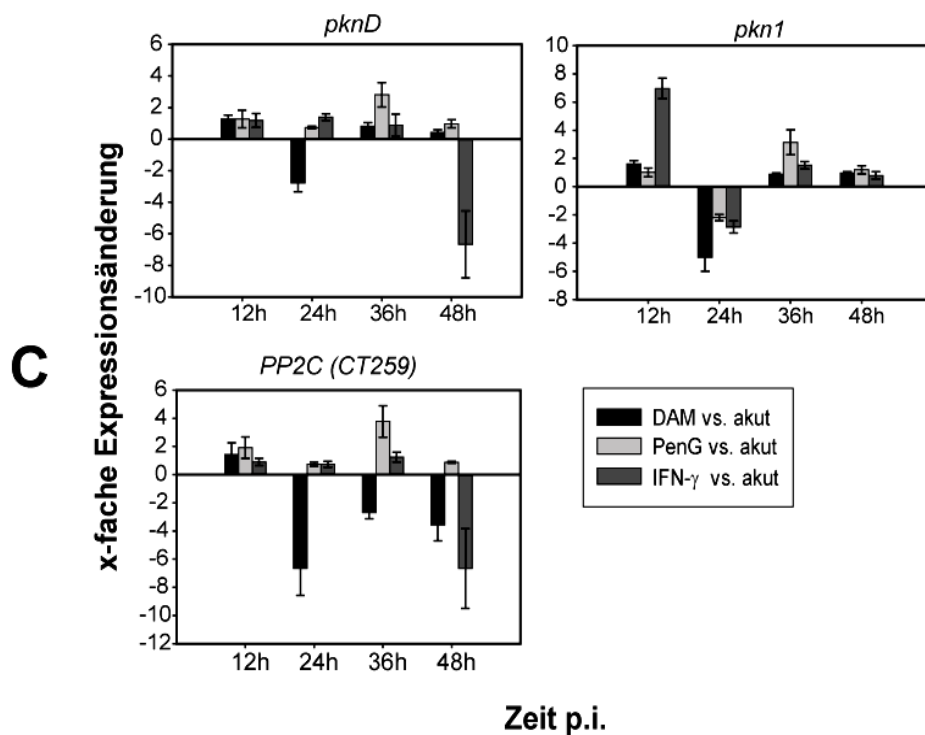


**Abb. 15: Expression von Typ-III-Sekretions-Genen 12 h bis 48 h p.i..** Dargestellt sind die Expressionsänderungen der persistenten Infektionsmodelle im Vergleich zur akuten Infektion. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen mit jeweils Dreifachbestimmung in der RTQ-PCR.

**3.2.1.6 Signaltransduktion (*pknD*, *pkn1*, *pkn5*, *PP2C*, *hflX*, *yphC*, *ychF*, *yhbZ*, *ctcB*, *ctcC*)**

Die drei Gene *pknD*, *pkn1* und *pkn5* codieren für Serin-Threonin-Kinasen (die Daten von *pkn5* sind schon im Abschnitt 3.2.1.5 dargestellt). Das „*PP2C*“ codiert für eine Serin-/Threonin-Phosphatase der PP2C-Familie. *HflX*, *yphC*, *ychF* und *yhbZ* codieren alle für GTPasen mit bisher unbekannter Funktion. Die beiden Gene *ctcB* und *ctcC* codieren für den Response-Regulator und die Histidin-Kinase eines Zwei-Komponenten-Systems. Es wird vermutet, dass dieses Zwei-Komponenten-System über eine Erfassung des Energielevels bzw. Redoxstatus die Umwandlung von RBs in EBs steuert (Koo and Stephens, 2003).





**Abb. 16: Expression von Signaltransduktions-Genen 12 h bis 48 h p.i.** Dargestellt sind die Expressionsänderungen der persistenten Infektionsmodelle im Vergleich zu akuten Infektion. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen mit jeweils Dreifachbestimmung in der RTQ-PCR (A) Zwei-Komponentensystem, (B) GTPasen, (C) Kinasen/Phosphatasen

In allen drei Persistenzmodellen ab 24 h p.i. waren *ctcC* und *ctcB* herunterreguliert, wobei die größten Expressionsänderungen im IFN- $\gamma$ -Modell zu beobachten waren.

Von den hier untersuchten GTPase-codierenden Genen zeigte nur das *yphC* eine Herunterregulation in allen drei Persistenzmodellen, speziell im IFN- $\gamma$ -Modell war eine starke Herunterregulation um ca. den Faktor 70 zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h p.i. festzustellen, wohingegen die Herunterregulierung im Penicillin-G-Modell eher leicht ausfiel. Im Expressionsverhalten von *hflX*, *yhbZ* und *yehF* zeigte sich kein einheitliches Muster zwischen den drei Persistenzmodellen.

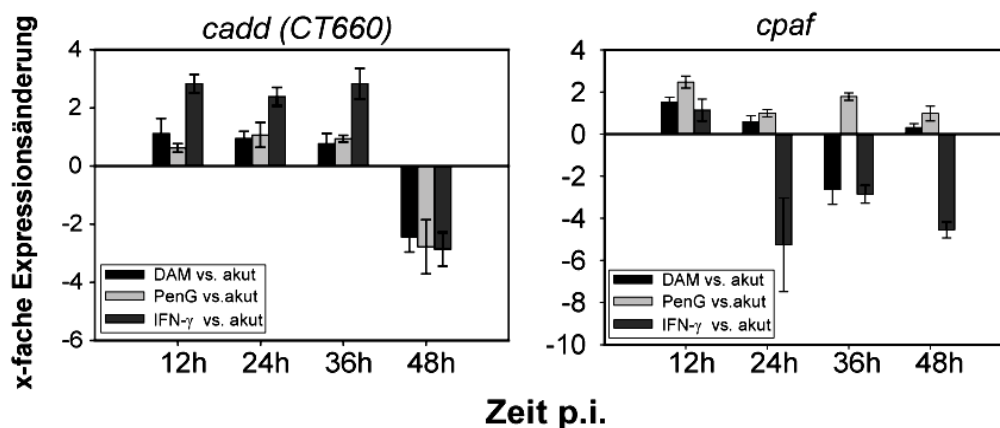
In der Expression von *pkn1* waren im Wesentlichen keine Änderungen während des Untersuchungszeitraumes zu verzeichnen. Einzige Auffälligkeiten waren eine Hochregulation im IFN- $\gamma$ -Modell 12 h p.i. und eine Herunterregulierung in allen drei Persistenzmodellen 24 h p.i. Ähnlich verhielt es sich für das *pknD*. Auch hier traten im Wesentlichen keine Expressionsänderungen auf. Für das Phosphatase-codierende *PP2C*

zeigte sich ebenfalls kein einheitliches Expressionsmuster. Während im DAM-Modell ab 24 h p.i. eine Herunterregulierung festzustellen war, zeigten sich im Penicillin-G-Modell keine Expressionsänderungen. Im INF- $\gamma$ -Modell waren außer der Herunterregulation 48 h p.i. ebenfalls keine weiteren Expressionsänderungen festzustellen.

### 3.2.1.7. Apoptose (*cadd*, *cpaf*)

Das erstmals im *C.-trachomatis*-Genom gefundene *cadd* (CT660) codiert für ein Protein, welches *in vitro* und *in vivo* mit Todes-Domänen der TNF-Rezeptor-Familie interagiert und bei Transfektion in verschiedenen Säugerzelllinien Apoptose induziert (Stenner-Liewen *et al.*, 2002). Das *cpaf* codiert für eine chlamydiale Protease bzw. einen Protease-like Activity Factor, welcher Wirtszelltranskriptionsfaktoren wie z. B. RFX5 degradieren kann (Zhong *et al.*, 2001). In einer neueren Studie wird zudem beschrieben, dass CPAF ebenfalls BH3-only-Proteine spaltet und somit zur antiapoptotischen Aktivität der Chlamydie beiträgt (Pirbhai *et al.*, 2006). Diese beiden Proteine sind zum momentanen Zeitpunkt die einzigen gefundenen chlamydialen Proteine, die eine Rolle in der Apoptosemodulation der Wirtszelle zu spielen scheinen. Auffällig in der Expression des *cadd* war eine konstante leichte Hochregulation im INF- $\gamma$ -Modell 12-36 h p.i., wohingegen in den anderen beiden Persistenzmodellen keine Expressionsänderungen festzustellen waren. 48 h p.i. allerdings war das *cadd* dann in allen drei Persistenzmodellen leicht um den Faktor 2,5 herunterreguliert.

Während im DAM- und im Penicillin-G-Modell das *cpaf* während des gesamten Untersuchungszeitraumes im Wesentlichen unverändert exprimiert wurde, zeigte sich im INF- $\gamma$ -Modell ab 24 h p.i. eine leichte Herunterregulierung.



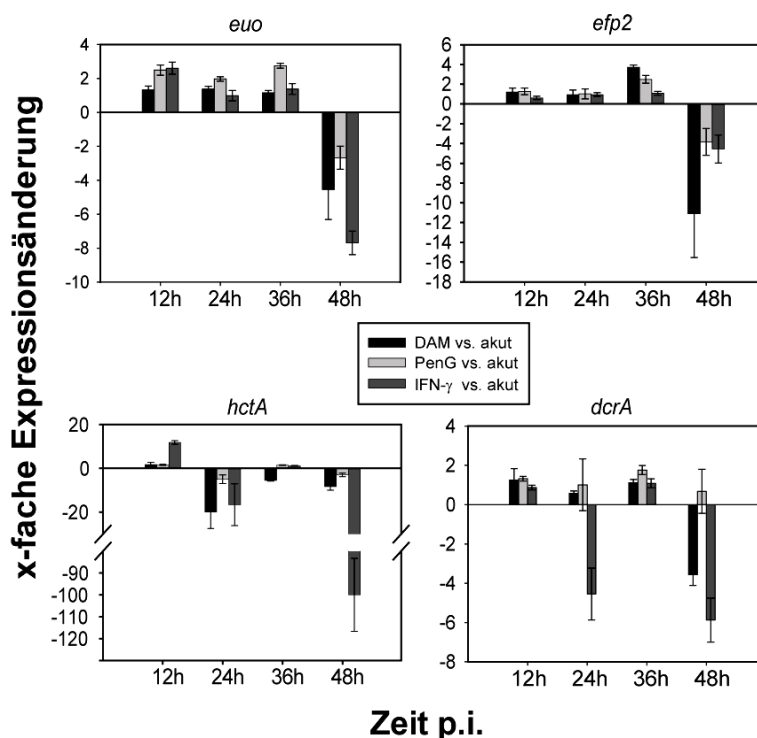
**Abb. 17: Expression Apoptose-Protein-codierender Gene 12 h bis 48 h p.i.** Dargestellt sind die Expressionsänderungen der persistenten Infektionsmodelle im Vergleich zu akuten Infektion. Die



gezeigten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen mit jeweils Dreifachbestimmung in der RTQ-PCR.

### 3.2.1.8 Diverses (*euo*, *efp2*, *hctA*, *dcrA*)

Diese Gruppe beinhaltet Gene, deren Proteinprodukte nicht eindeutig einer der anderen funktionellen Gruppen zuzuordnen sind. Das *euo* codiert für ein Protein, welchem eine Rolle als DNA-Bindeprotein (Zhang *et al.*, 1998) oder aber einer Histon-spezifischen Protease zugeordnet wird (Kaul *et al.*, 1997). Das durch das *efp2*-codierte Protein fungiert als Elongationsfaktor, welcher in die Ausbildung von Peptidbrücken involviert zu sein scheint. Das *hctA* codiert für ein Histone-like Protein, welches vermutlich eine Rolle bei der Nukleosomenkondensation spielt. Für das *dcrA*, welches einen Eisen-abhängigen Repressor codiert, wird eine Rolle in der Transkriptionsregulation spezifischer Gene angenommen



**Abb. 18: Expression diverser Regulations-assoziiierter Gene 12 h bis 48 h p.i.** Dargestellt sind die Expressionsänderungen der persistenten Infektionsmodelle im Vergleich zur akuten Infektion. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen mit jeweils Dreifachbestimmung in der RTQ-PCR.

Im Falle von *euo* zeigte sich ein Trend zur leichten Hochregulation, speziell im Penicillin-G-Modell, 12-36 h p.i. Zum finalen Zeitpunkt 48 h p.i. war jedoch in allen drei Persistenzmodellen eine Abnahme der Transkriptmenge zu verzeichnen. Ähnliches ließ sich für das *efp2* feststellen. Zwischen 12 h und 36 h p.i. zeigten sich keine Expressionsänderungen, jedoch war in allen drei Persistenzmodellen 48 h p.i. wieder eine

Abnahme der Transkriptmenge um den Faktor 3-10 zu verzeichnen. Für das Histon-like Protein-codierende *hctA* überwog im Zeitraum zwischen 24 h p.i. und 48 h p.i. eine Abnahme der Transkriptmenge. Besonders im IFN- $\gamma$ -Modell zeigte sich 48 h p.i. eine starke Herunterregulierung des *hctA* um den Faktor 100.

Für die Expression von *dcrA* war eine Herunterregulation im DAM- und IFN- $\gamma$ -Modell zum Zeitpunkt 48 h p.i. auffällig, wohingegen zu früheren Zeitpunkten, mit Ausnahme von 24 h p.i. im IFN- $\gamma$ -Modell, keine differentielle Regulation zu finden war.

### **3.2.2 Persistenz-charakteristische, herunterregulierte Gene der HEp2-Infektionsmodelle sind auch in Fibroblasten herunterreguliert**

Aus den differentiell regulierten Genen, die in allen drei Persistenzmodellen eine Herunterregulation zeigten, wurden die sechs ausgewählt, deren Herunterregulation während der Etablierung und Aufrechterhaltung der Persistenz besonders charakteristisch erschien, da sie ab 24 h p.i. konstant herunterreguliert waren: *omcA*, *omcB*, *ftsW*, *ctcB*, *ctcC*. und *ypbC*. Die Expression dieser Gene wurde unter Verwendung einer zweiten, allerdings primären Wirtszelllinie (synoviale Fibroblasten) überprüft, um eine Aussage über die Wirtszell-spezifische Expression dieser Gene treffen zu können.

Wie schon bei den Persistenzmodellen unter Verwendung der HEp2-Zelllinie als Wirtszelle festzustellen, waren die untersuchten Gene in allen drei Persistenzmodellen herunterreguliert (Tabellen 13-16 im Anhang). Auffällig dabei war, dass speziell im DAM-Persistenzmodell die Herunterregulation v. a. für *omcA*, *omcB*, *ctcB* und *ctcC* wesentlich drastischer ausfiel als unter Verwendung der HEp2-Zelllinie. Für das IFN- $\gamma$ -Modell hingegen schienen die Expressionsunterschiede zwischen akuter und persistenter Infektion hingegen weniger stark zu sein als in der HEp2-Wirtszelle.

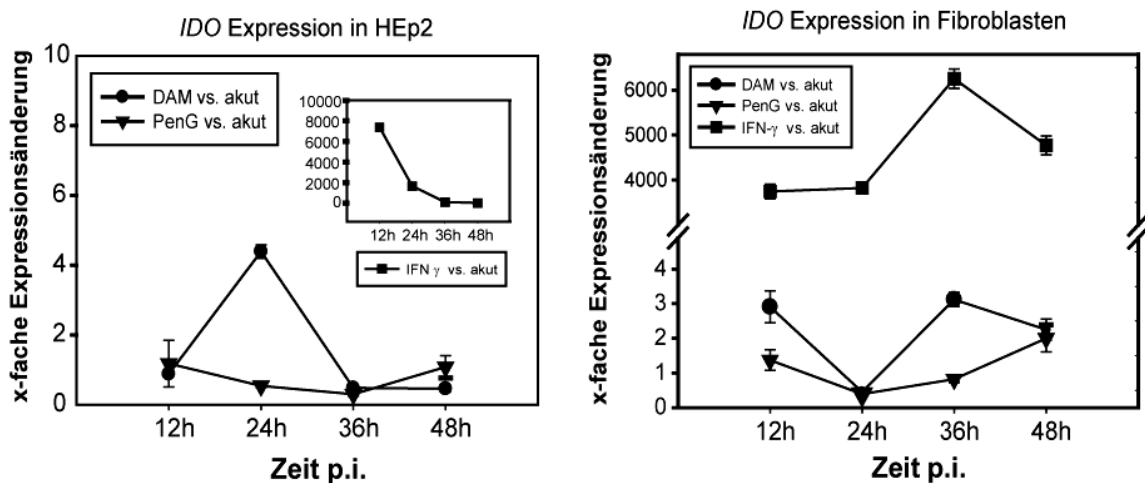
## **3.3 Wechselwirkungen zwischen persistenten Chlamydien und ihren Wirtszellen**

### **3.3.1 Die IFN- $\gamma$ -Gabe führt zu einer starken Zunahme der IDO-Transkriptmenge**

Da für das IFN- $\gamma$ -Persistenzmodell eine Wirkungsweise durch die Induktion des Wirtszellenzyms IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase) schon gezeigt werden konnte (Pantoja *et al.*, 2000), in den anderen zwei Modellen jedoch die Wirkungswege des Persistenzinduktors noch weitestgehend unbekannt sind, wurde die IDO-Expression in

allen drei Persistenzmodellen überprüft, zumal für die durch IFN- $\gamma$ - induzierte Persistenz eine Assoziation mit Eisenlimitierung gezeigt wurde (Igietsme *et al.*, 1998) und somit ein Zusammenhang zwischen Tryptophan- und Eisenlimitierung bestehen könnte.

Sowohl in der HEp2-Zelllinie als auch in Fibroblasten zeigten sich im DAM- und Penicillin-G-Modell im Wesentlichen keine Expressionsänderungen im Vergleich zur akuten Infektion, im IFN- $\gamma$ -Modell hingegen trat die erwartete starke Hochregulation der IDO-Transkriptmenge auf (Abb. 19). Während im IFN- $\gamma$ -Modell der HEp2-Zelllinie ein zunehmender Abfall in der IDO-Expression zu verzeichnen war, erreicht die IDO-Expression in den Fibroblasten jedoch erst 36 h p.i. (bzw. 48 h nach Gabe des IFN- $\gamma$ ) ihren Peak.



**Abb. 19:** IDO-Expressionsmuster der HEp2-Zelllinie und der Fibroblasten 12h-48h p.i. in den drei verschiedenen Persistenzmodellen verglichen mit der akuten Infektion. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Infektionsexperimenten mit jeweils Dreifachbestimmung in der RTQ-PCR.

### 3.3.2 Sowohl die persistente als auch die akute *Cp.-psittaci* DC15-Infektion induziert keine Wirtszellapoptose

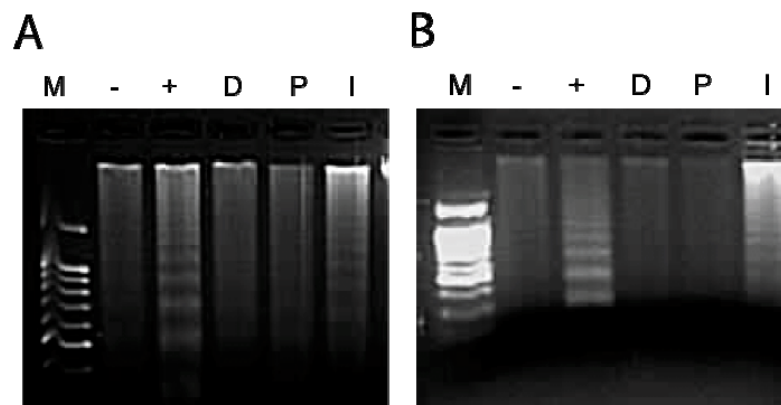
Da durch eine Studie bezüglich chlamydialer Persistenz und Modulation der Wirtszellapoptose die Vermutung nahe gelegt wurde, dass persistente Chlamydien keine Apoptose auslösen, aber die durch Staurosporin bzw. Etoposid induzierte Apoptose hemmen können (Dean and Powers, 2001), wurde die Fähigkeit der Apoptosemodulation persistenter und akuter *Cp. psittaci* untersucht.

Die Ergebnisse von DNA-Fragmentierungs-Assays, Hoechst-Staining und TUNEL-Assay zeigen dabei, dass sowohl in persistent als auch akut infizierten Wirtszellen keine Apoptose induziert wird.

### 3.3.2.1 Fragmentierungsmuster der Wirtszell-DNA

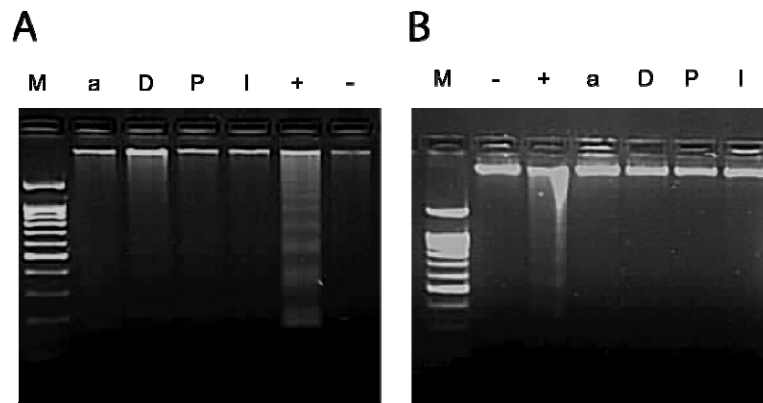
Ein Charakteristikum apoptotischer Zellen ist die Spaltung der genomischen DNA durch die Endonuklease CAD (Caspase-Activated DNase) (Enari *et al.*, 1998). Die CAD spaltet genomische DNA an internukleosomalen Linkerregionen und produziert so 180-185 bp-große DNA-Fragmente (bzw. Mehrfache davon), was sich auf Agarose-Gelen als ein typisches Leiter-Muster darstellt.

Um zunächst zu überprüfen, ob die Persistenzinduktoren alleine einen Einfluss auf die Wirtszellapoptose haben, was die Effekte der Chlamydieninfektion beeinflussen könnte, wurde der DNA-Laddering-Assay zunächst nur mit behandelten, aber nicht-infizierten Zellen durchgeführt. Für DAM und Penicillin G ließ sich dabei kein Effekt hinsichtlich einer Apoptosestimulation der Wirtszelle feststellen (Abb. 20). Nach 72-stündiger Einwirkzeit des IFN- $\gamma$  (also dem Einwirkungs-Zeitraum, dem der 48 h p.i. Zeitpunkt im IFN- $\gamma$ -Infektionsmodell entspricht), zeigte sich jedoch ein leichtes DNA-Laddering und somit eine Stimulation der Wirtszellapoptose durch das IFN- $\gamma$  (Abb. 20)



**Abb. 20: DNA-Fragmentationsassay nach Behandlung mit Persistenzinduktoren.** Dargestellt sind exemplarische Gelelektrophoresebilder der extrahierten DNA aus DAM (D)-, Penicillin G (P)- und IFN- $\gamma$  (I)-behandelten HEp2-Zellen (A) und Fibroblasten (B). M = Marker (100 Bp-DNA-Leiter), + = Staurosporin-behandelte Kontrolle, - = unbehandelte Kontrolle

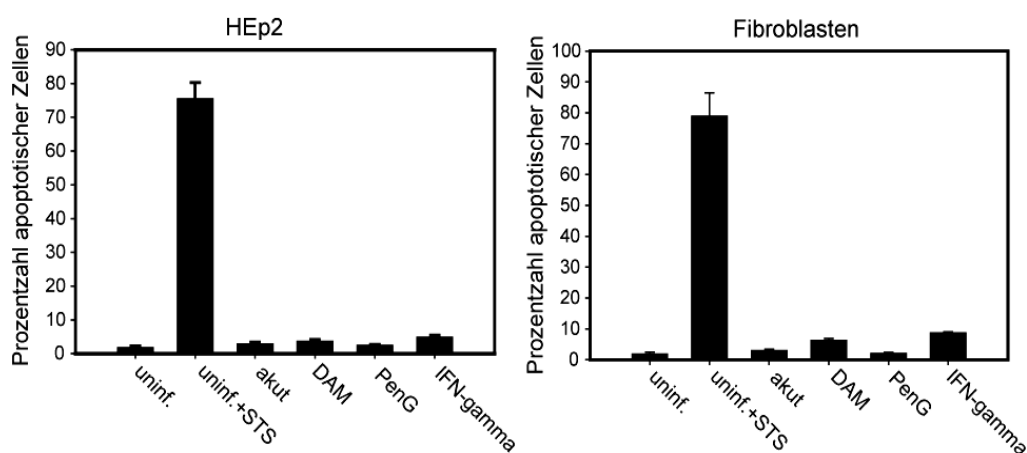
Nach diesen vorausgehenden Experimenten wurde der Einfluss der Chlamydien auf die Wirtszelle untersucht. Sowohl in der HEp2-Zelllinie als auch in den Fibroblasten zeigte sich weder für die akute Infektion noch für die persistenten Infektionen 48 h p.i., also gegen Ende des produktiven Entwicklungszyklus, ein solches Leitermuster (Abb. 21), was zeigt, dass die akute und persistente *Cp.-psittaci*-Infektion keine Wirtszellapoptose auslöst. Auch im IFN- $\gamma$ -Modell zeigte sich kein Leiter-Muster, obwohl für das IFN- $\gamma$  alleine eine leichte Apoptosestimulation festgestellt wurde.



**Abb. 21: DNA-Fragmentationsassay Infektionen.** Dargestellt sind exemplarische Gelelektrophoresebilder der extrahierten DNA aus akut und persistent infizierten HEp2-Zellen (A) und Fibroblasten (B). M = Marker (100 Bp-DNA-Leiter), + = Staurosporin-behandelte Kontrolle, - = unbehandelte, uninfizierte Zellen, a = akut infizierte Zellen, D = DAM-Modell, P = Penicillin-G-Modell, I = IFN- $\gamma$ -Modell

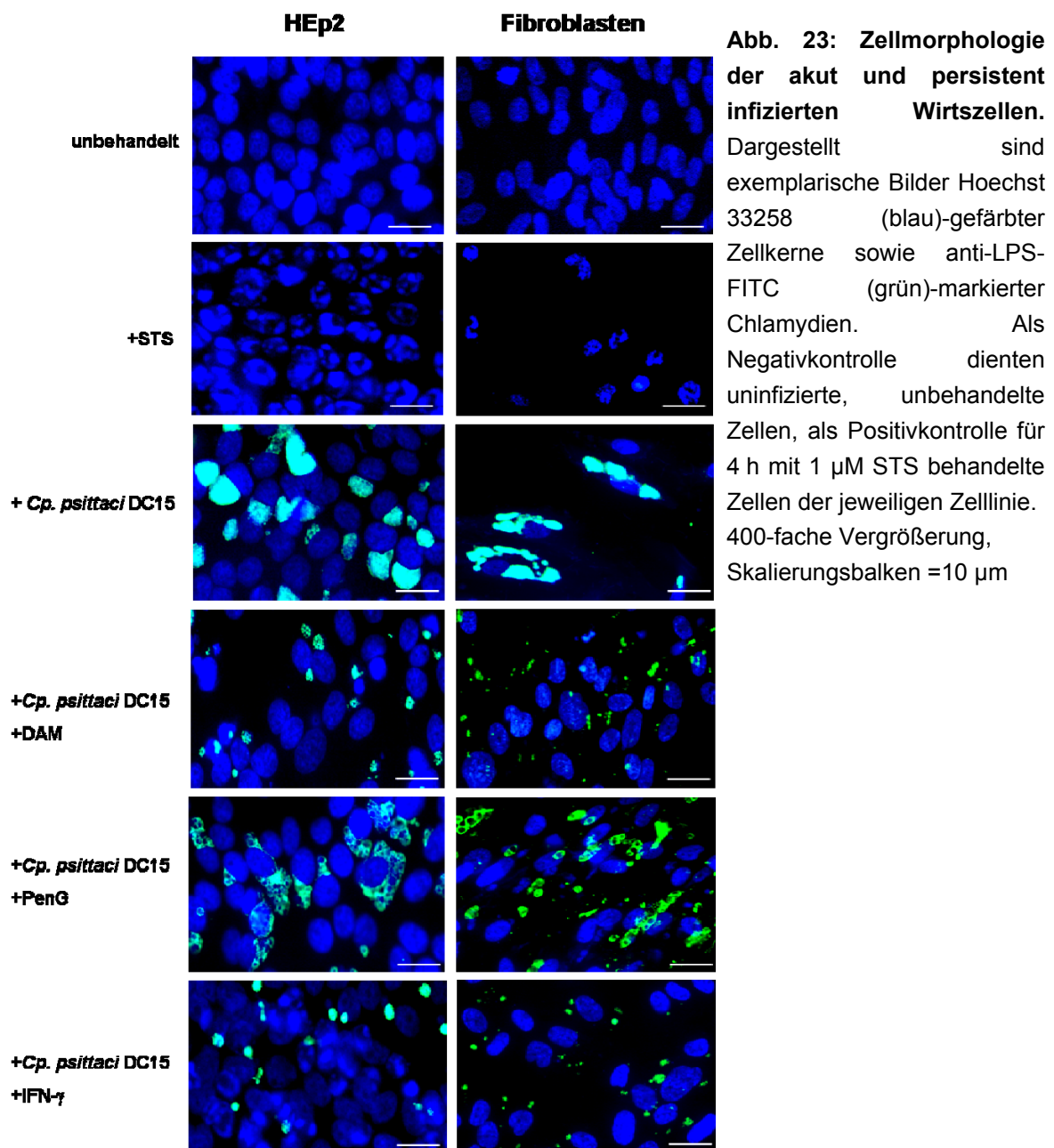
### 3.3.2.2 Die Kernmorphologie der *Cp.-psittaci*-infizierten Wirtszellen

Durch das Anfärben mit einem DNA-bindenden Farbstoff wie DAPI oder Hoechst 33258 bzw. 33342 und anschließender Fluoreszenzmikroskopie lässt sich direkt die Morphologie von Zellkernen begutachten, so dass fragmentierte bzw. kondensierte Zellkerne von intakten Zellkernen abgrenzt werden können. Die Zellkerne der *Cp.-psittaci*-infizierten und Persistenz-induzierten Wirtszellen wurden 48 h p.i. mit Hoechst 33258 gefärbt und die Chlamydien mittels FITC-konjugiertem, anti-LPS-Antikörper gegengefärbt.



**Abb. 22: Prozentzahl apoptotischer Kerne in akut bzw. persistent infizierten Wirtszellen.** Als Negativkontrolle dienten unbehandelte, uninfizierte Zellen der jeweiligen Zelllinie, für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit 1  $\mu$ M Staurosporin für 4 h behandelt. Es wurden jeweils nur Zellkerne solcher Zellen ausgezählt, die auch infiziert waren. uninf. = uninfiziert, STS = Staurosporin

Die Prozentzahl an apoptotischen Zellkernen bewegte sich je nach Infektionsmodell zwischen 2-5 % in der HEp2-Zelllinie (Abb. 22, linke Abbildung) und zwischen 2-9 % in den Fibroblasten (Abb. 22, rechte Abbildung), was ca. der Apoptoserate uninfizierter, unbehandelter Kontrollzellen entsprach. Exemplarische Beispiele fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen der Hoechst-gefärbten Zellkerne sind in Abb. 23 gezeigt.



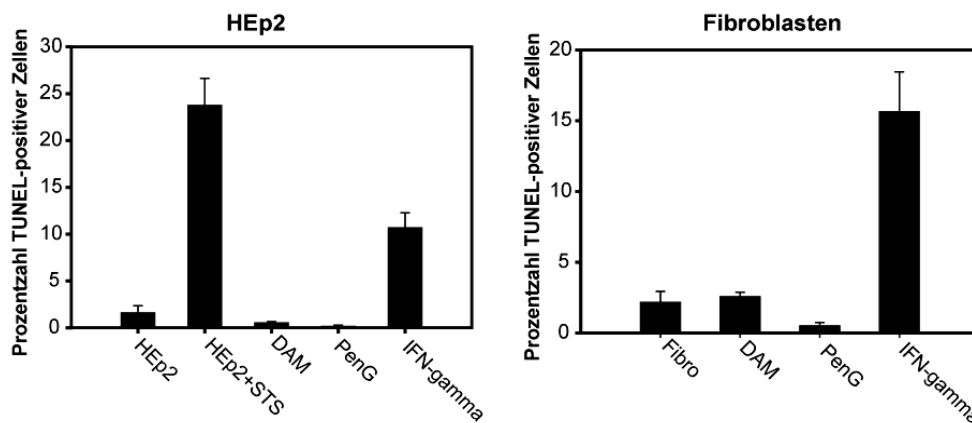
**Abb. 23: Zellmorphologie der akut und persistent infizierten Wirtszellen.** Dargestellt sind exemplarische Bilder Hoechst 33258 (blau)-gefärbter Zellkerne sowie anti-LPS-FITC (grün)-markierter Chlamydien. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte, unbehandelte Zellen, als Positivkontrolle für 4 h mit 1 µM STS behandelte Zellen der jeweiligen Zelllinie. 400-fache Vergrößerung, Skalierungsbalken = 10 µm

### 3.3.2.3 *Cp.-psittaci*-infizierte Wirtszellen sind TUNEL-negativ

Durch die während der Apoptose stattfindende Fragmentierung der DNA mittels der CAD werden an den Bruchenden der DNA-Stränge Hydroxylgruppen frei. Die TUNEL-Methode bedient sich des Enzyms Terminal-Deoxynucleotidyl-Transferase (TDT), welches die

freien 3'-Hydroxylgruppen mit einem markierten Nukleotid wie z. B. FITC-dUTP markieren kann. Auf diese Art und Weise können apoptotische Zellen dann mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie detektiert werden. Die Durchflusszytometrie stellt dabei eine gute Methode dar, eine hohe Anzahl von Zellen in geringer Zeit in Bezug auf verschiedene zelluläre Parameter zu charakterisieren.

Zunächst wurde wieder der Einfluss der Persistenzinduktoren auf die Wirtszellapoptose überprüft. Wie in Abb. 24 gezeigt, haben sowohl die DAM- als auch die Penicillin-G-Behandlung keinen Einfluss auf die Wirtszellapoptose in beiden untersuchten Zelllinien, wohingegen das IFN- $\gamma$  in ca. 10 % der HEp2 und ca. 15 % der Fibroblasten Apoptose auslöst.



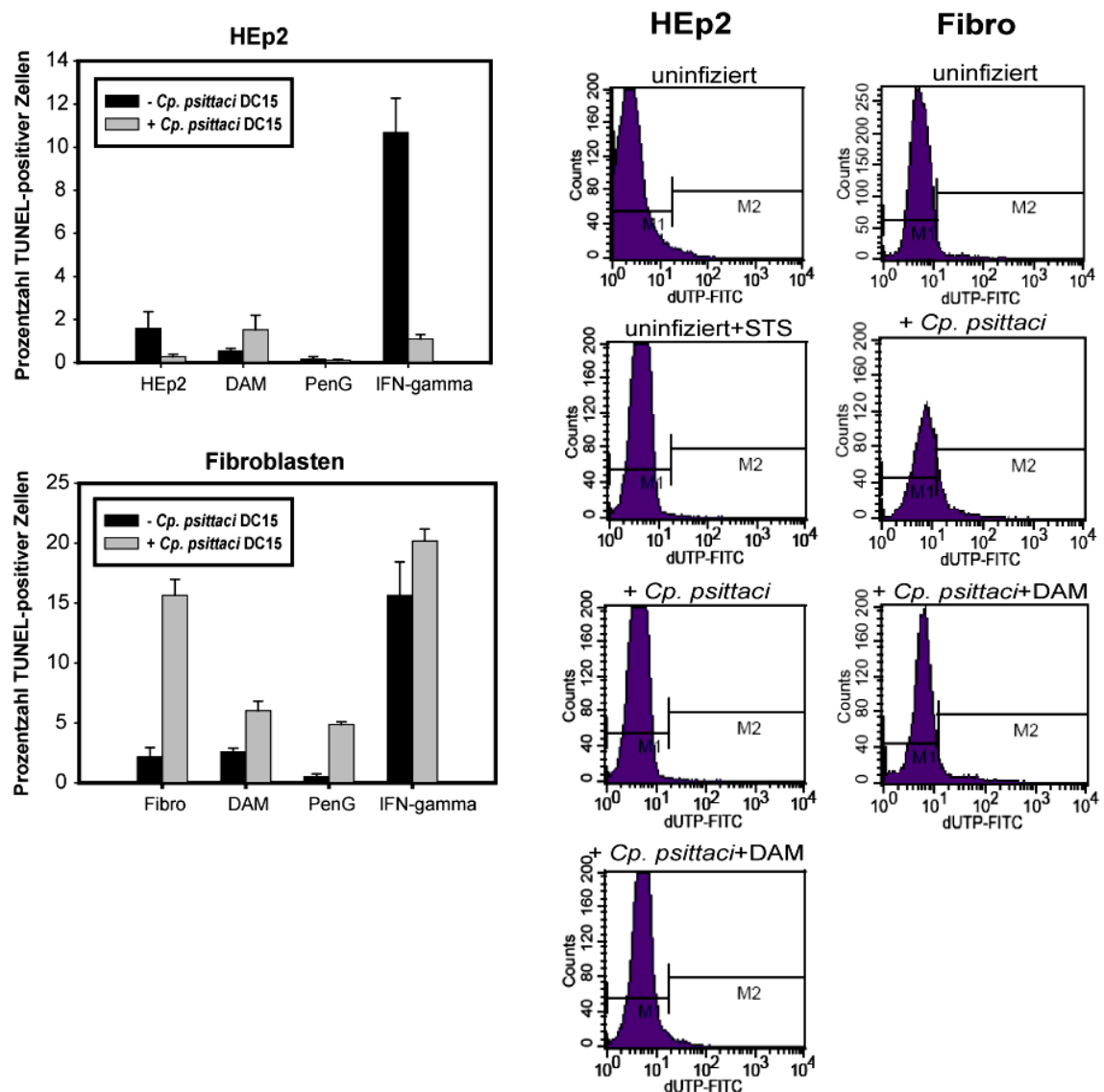
**Abb. 24: Prozentzahl TUNEL-positiver Zellen nach Behandlung mit Persistenzinduktoren.**

Als Negativkontrolle dienten unbehandelte, uninfizierte Zellen der jeweiligen Zelllinie, für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit 1  $\mu$ M Staurosporin (STS) für 4 h behandelt. Für die Fibroblasten konnte die Positivkontrolle nicht ausgewertet werden, da die Zellen bereits soweit abgebaut waren, dass sie auf die TUNEL-Färbung nicht mehr ansprachen und im FACS sich nur noch als Zelltrümmer darstellten. Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls bei der Hoechst 33258-Kernfärbung in Abb. 23, wo ebenfalls nur noch sehr wenige apoptotische Kerne zu finden waren.

Die Infektion der HEp2-Zelllinie mit *Cp. psittaci* DC15 führte weder in den Persistenzmodellen noch im akuten Infektionsmodell zu einer signifikanten Steigerung der Wirtszellapoptose im Vergleich zu uninfizierten Zellen (Abb. 24). Die Chlamydieninfektion war sogar in der Lage, den Effekt des IFN- $\gamma$  auf die Wirtszellapoptose um ca. 9% zu mindern.

Für die Fibroblasten ergab sich ein ähnliches Bild (Abb. 24), jedoch war hier ein Effekt der akuten Infektion auf die Wirtszellapoptose zu verzeichnen, da ca. 15 % der Zellen TUNEL-positiv waren. Im IFN- $\gamma$ -Persistenzmodell war ebenfalls ein Anstieg der TUNEL-positiven Zellen im Vergleich zu uninfizierten Zellen um ca. 20 % zu verzeichnen, was sich

jedoch größtenteils durch den Effekt des IFN- $\gamma$  selbst erklärt. Im Gegensatz zur HEp-2-Zelllinie wurde der Effekt des IFN- $\gamma$  hier jedoch nicht durch die Infektion aufgehoben.

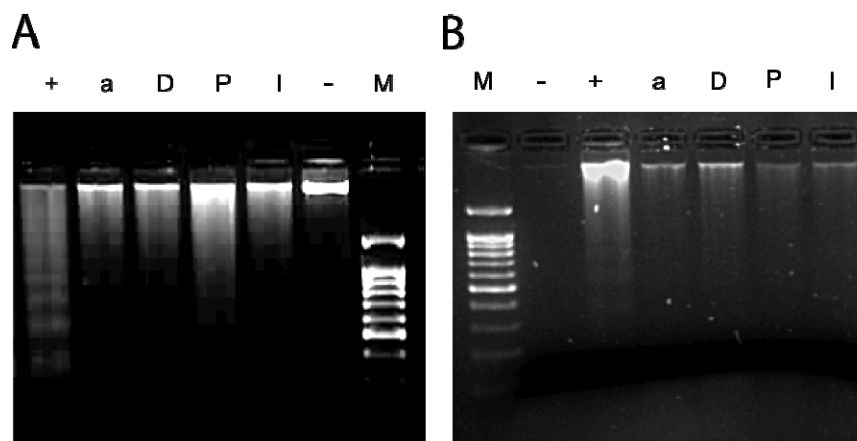


**Abb. 25: Prozentzahl TUNEL-positiver Zellen nach Behandlung mit Persistenzinduktoren und Infektion mit *Cp. psittaci* DC15.** Als Negativkontrolle dienten unbehandelte, uninferierte Zellen der jeweiligen Zelllinie. Die Ergebnisse der Behandlung mit den Persistenzinduktoren aus Abb. 24 (schwarze Balken) sind zur besseren Vergleichbarkeit zusammen mit den Daten der Chlamydieninfektionen (graue Balken) noch einmal dargestellt. Im rechten Teil der Abbildung sind exemplarische FACS-Plots zur Analyse apoptotischer und nicht-apoptotischer Zellpopulationen dargestellt. Das DAM-Modell ist dabei repräsentativ für die drei Persistenzmodelle gezeigt. M1 = nichtapoptotische, TUNEL-negative Population, M2 = apoptotische, TUNEL-positive Population. Für die STS-Kontrolle der Fibroblasten konnte keine entsprechende Populationsanalyse gemacht werden, da ein Großteil der Zellen sowie ihre DNA bereits in fortgeschrittenem Maße abgebaut war.



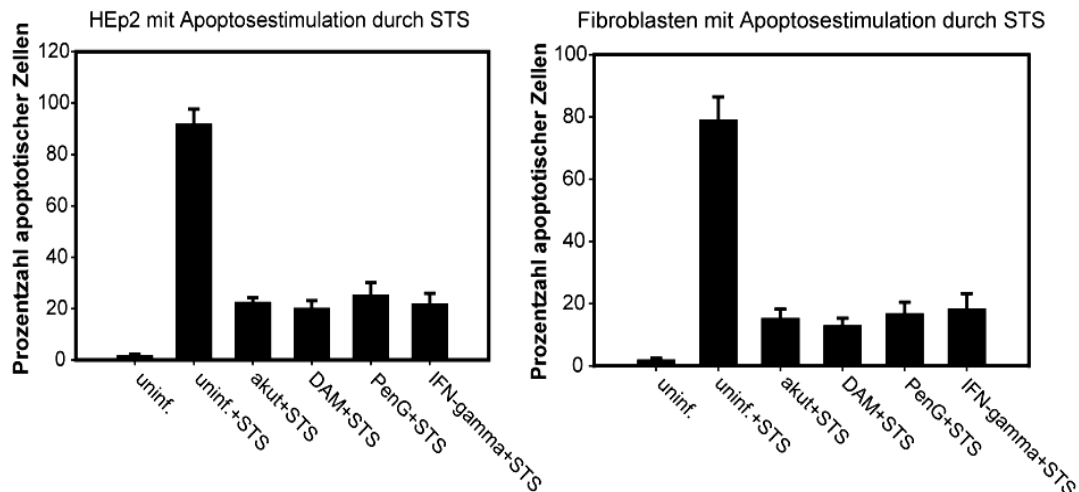
### 3.3.3. Persistent und akut infizierte Wirtszellen sind resistent gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose

Um zu testen, ob die persistente und auch akute *Cp.-psittaci*-Infektion in der Lage ist, die induzierte Apoptose der Wirtszelle zu hemmen, wurden die infizierten HEP2-Zellen und Fibroblasten für 4 h mit 1  $\mu$ M des Proteinkinase-Inhibitors Staurosporin (STS) behandelt und anschließend ein DNA-Fragmentations-Assay bzw. Hoechst 33258-Kernfärbung durchgeführt. Wie aus Abb. 27 ersichtlich, zeigte sich für die Chlamydien-infizierten, STS-behandelten Wirtszellen kein typisches DNA-Fragmentierungsmuster, jedoch war für die HEP2-Zelllinie ein leichter Schmier speziell im Penicillin-G-Persistenzmodell festzustellen.



**Abb. 26: DNA-Fragmentationsassay nach Apoptoseinduktion.** Dargestellt sind exemplarische Gelelektrophoresebilder der extrahierten DNA aus akut- und persistent-infizierten, mit Staurosporin behandelten HEP2-Zellen (A) und Fibroblasten (B). M = Marker (100 Bp-DNA-Leiter), + = Staurosporin (STS)-behandelte Kontrolle, - = uninfizierte, unbehandelte Kontrolle, a = akutes Infektionsmodell, D = DAM-Modell, P = Penicillin-G-Modell, I = IFN- $\gamma$ -Modell

Die Prozentzahl apoptotischer Kerne lag für die HEP2-Zelllinie mit 20-25% je nach Infektionsmodell und für die Fibroblasten mit 15-18 % je nach Infektionsmodell zwar über der Apoptoserate uninfizierter und nicht-Apoptosestimulierter Zellen, war jedoch signifikant geringer als die Apoptoserate STS-behandelter Kontrollzellen (Abb. 27).



**Abb. 27: Prozentzahl apoptotischer Zellen in akut bzw. persistent infizierten, Staurosporin-behandelten Wirtszellen.** Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte, uninfierte Zellen der jeweiligen Zelllinie, für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit 1  $\mu$ M Staurosporin für 4 h behandelt. Es wurden jeweils nur Zellkerne solcher Zellen ausgezählt, die auch infiziert waren. uninf. = uninfiert, STS = Staurosporin

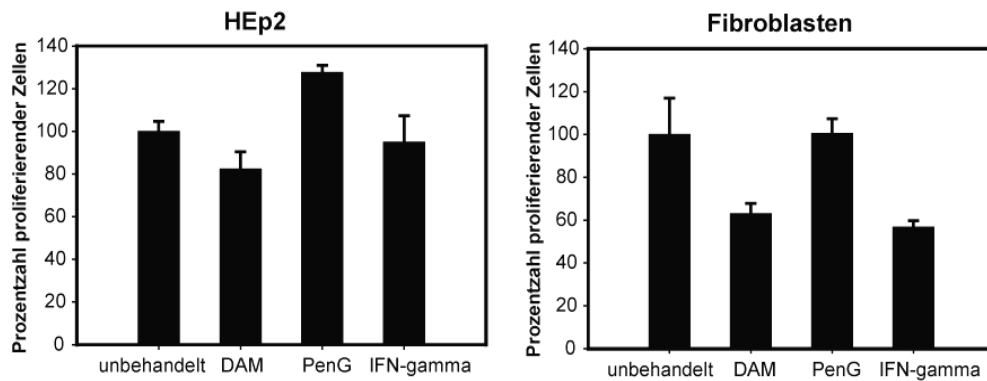
### 3.3.4 Die *Cp.-psittaci*-Infektion reduziert die Proliferationsfähigkeit der Wirtszelle

Nachdem ausgeschlossen wurde, dass akute und persistente *Cp.-psittaci*-Infektionen die Apoptose der Wirtszelle induzieren und somit zum Zelltod führen, sollte anschließend überprüft werden, ob die Infektion die Proliferationsfähigkeit der Wirtszelle beeinflusst bzw. ob durch die akuten und/oder persistenten Chlamydien nicht-apoptotischer Zelltod ausgelöst wird. Dazu wurde ein MTT-Test durchgeführt. Lebende Zellen nehmen das gelbe Tetrazoliumsalz MTT auf und setzen es mit Hilfe mitochondrialer Reduktasen zu einem stark blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff um, dessen Absorption photometrisch bei 570-590 nm gemessen werden kann. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen und die Absorption soll dabei direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen sein (Mosman, 1983).

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Gabe der Persistenzinduktoren alleine schon einen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen hat, wurde der MTT-Test zunächst nur mit entsprechend behandelten, uninfierten Zellen durchgeführt.

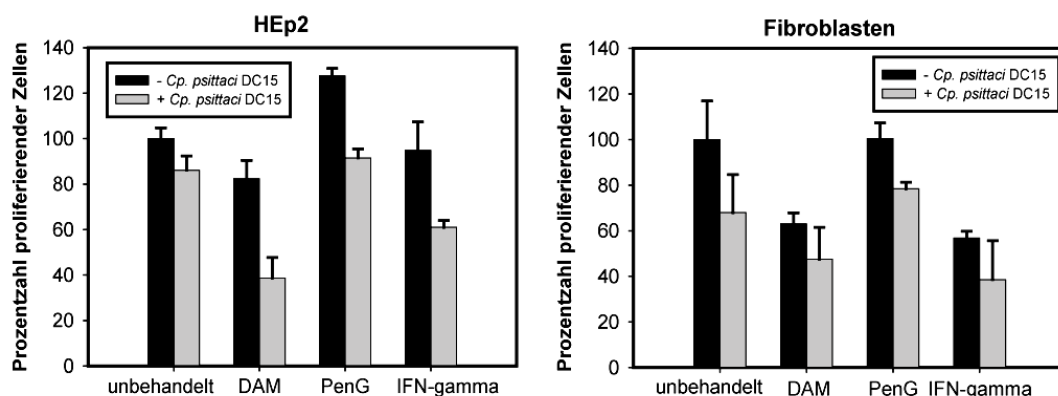
Wie in Abbildung 29 dargestellt, zeigte sich im Falle der DAM- und IFN- $\gamma$ -Behandlung ein Rückgang der Anzahl proliferierender Zellen auf 82,4% bzw. 94,5% für die HEp2-Zelllinie. Für die primäre Zelllinie, die synovialen Fibroblasten, war der Effekt von DAM und IFN- $\gamma$  auf die Zellproliferation drastischer und die Anzahl proliferierender Zellen

betrug nur noch 63% bzw. 56, 8% verglichen mit unbehandelten Zellen (Abb. 28 ). Im Fall der Penicillin-G-Behandlung zeigte sich kein Rückgang in der Anzahl proliferierender Zellen. Hier war sogar eine leichte Zunahme der Proliferationsrate bzw. Zellvitalität festzustellen.



**Abb. 28: Prozentzahl proliferierender Zellen nach Behandlung mit den Persistenzinduktoren.** Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Proliferation unbehandelter Zellen wurde als 100 % angesetzt und die Werte der behandelten Zellen darauf bezogen.

Die Chlamydieninfektion, sowohl akut als auch in den drei Persistenzmodellen, führte zusätzlich zu einem Rückgang in der Anzahl proliferierender Zellen (Abb. 29), was sich in der HEp2-Zelllinie am stärksten im DAM-Persistenzmodell mit nur noch 43 % proliferierender Zellen und in den Fibroblasten im IFN- $\gamma$ -Persistenzmodell mit 38 % proliferierender Zellen bemerkbar macht.



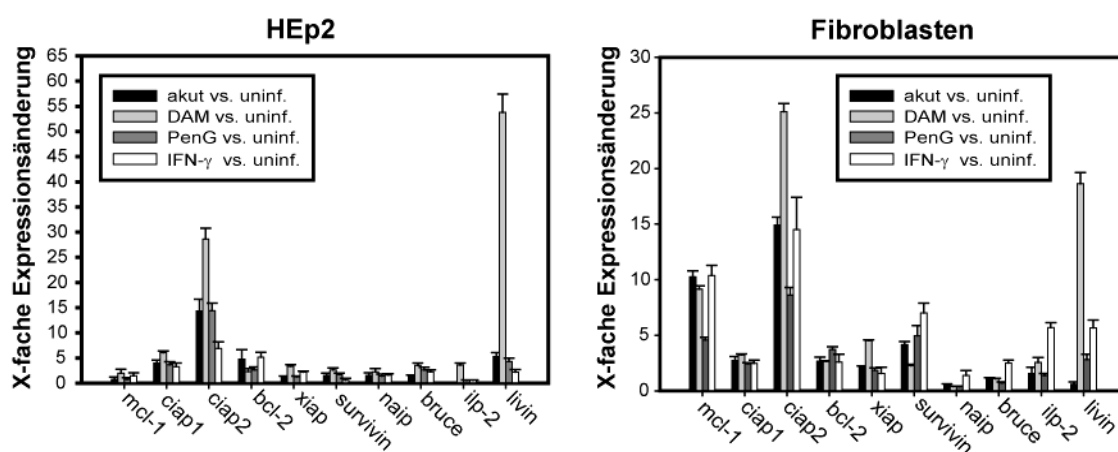
**Abb. 29: Prozentzahl proliferierender Zellen nach Behandlung mit den Persistenzinduktoren und Infektion mit *Cp. psittaci* DC15.** Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Proliferation unbehandelter Zellen wurde als 100 % angesetzt und die Werte der behandelten, infizierten Zellen darauf bezogen. Zum besseren Vergleich sind die Werte der behandelten, uninfizierten Zellen noch einmal dargestellt (schwarzer Balken).

Die akute sowie persistente *Cp.-psittaci*-Infektion führt somit also zu einem Rückgang der Zellproliferation.

### 3.3.5 *Cp.-psittaci* DC15 stimuliert die Expression des Inhibitor of Apoptosis 2 (cIAP2) in der Wirtszelle

Das humane Genom codiert für eine Reihe von Proteinen mit antiapoptotischer Funktion wie z. B. den antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie (BCL-X<sub>L</sub>, BCL-w, BCL-2 u. a.) oder aber den Mitgliedern der IAP (Inhibitor of Apoptosis)-Familie (XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, MLIAP, NAIP, Survivin und BRUCE). Mitglieder der IAP-Familie können Caspase-3, -7 und/oder -9 binden und somit Apoptose inhibieren. BCL-2 und BCL-X<sub>L</sub> binden den C-terminalen Part von Apaf-1 und verhindern somit die Interaktion mit Caspase-9.

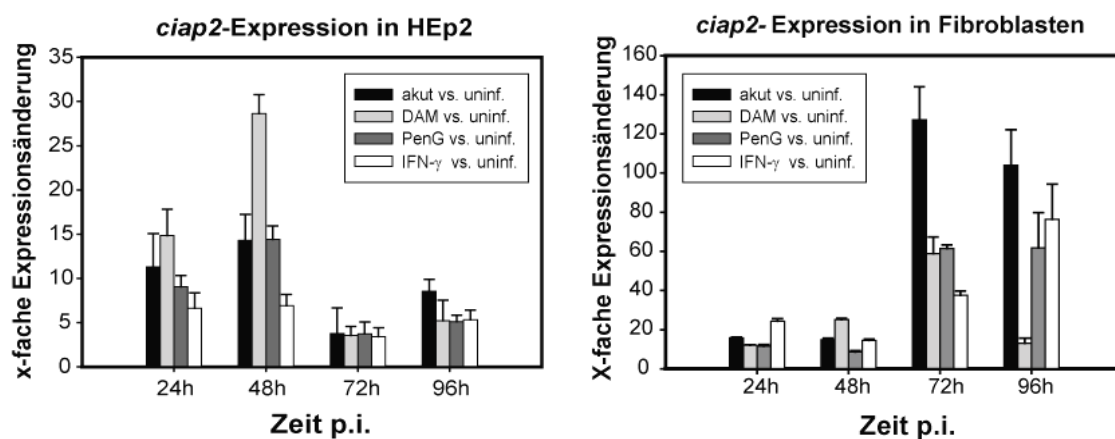
Aufgrund der Ergebnisse aus 3.3.2, dass in akut und persistent infizierten HEp2 und Fibroblasten keine Apoptose induziert wird, wurde die Expression der Gene, die für einige der oben genannten Proteine codieren, im Vergleich zu uninfizierten Zellen untersucht. Gemeinsam für die chlamydiale Infektion, unabhängig davon, ob produktiv oder persistent, war eine Zunahme der Transkriptmenge von *ciap1*, *ciap2* und *bcl-2* in den beiden verwendeten Wirtszelllinien. In den Fibroblasten war zudem noch eine erhöhte Expression von *mcl-1* und *survivin* zu verzeichnen.



**Abb. 30.: Expression verschiedener, für Apoptose-Inhibitoren-codierender Gene zum Zeitpunkt 48 h p.i.** Dargestellt sind die Expressionsänderungen in akut bzw. persistent infizierten Zellen im Vergleich zu uninfizierten Zellen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen mit jeweils Dreifachbestimmung in der RTQ-PCR. Die dazugehörigen Wertetabellen sind im Anhang zu finden (Tabellen 17-20)

Während *ciap1*, *bcl-2*, *mcl-1* und *survivin* nur eine leichte bis moderate Hochregulation aufwiesen, war *ciap2* hingegen in der HEp2-Wirtszelle je nach Infektionsmodell um das 7-30-fache und in den Fibroblasten um das 8-25-fache hochreguliert. Die stärkste Zunahme in der *ciap2*-Transkriptmenge war dabei für das DAM-Modell zu verzeichnen (Abb. 30).

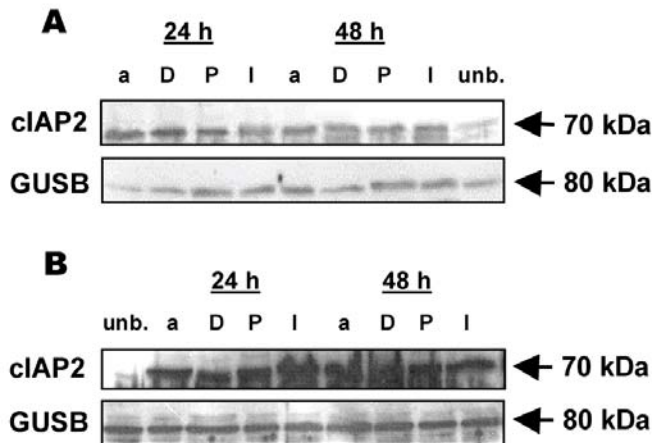
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Expression von *ciap2* anschließend genauer über eine Zeitspanne von 24 h bis 96 h p.i. untersucht (Abb. 31). Dabei zeigten sich in der HEp2-Zelllinie und in den Fibroblasten gegensätzliche Trends. Während in der HEp2-Zelllinie das *ciap2* unabhängig vom Infektionsmodell zu den zwei früheren Zeitpunkten 24 h p.i. und 48 h p.i. um den Faktor 10-25 im Vergleich zu uninfizierten Zellen hochreguliert wurde und dann 72 h und 96 h p.i. bis auf das etwa 5-fache der uninfizierten Zellen zurückging, verhielt es sich in den Fibroblasten gegensätzlich. 24 h und 48 h nach Infektion wurde *ciap2* konstant um das 15-20-fache hochreguliert, zu den zwei späteren Zeitpunkten, die über das Ende des Infektionszyklus der akuten Infektion hinausgehen, stieg die Expression von *ciap2* um das 60-120-fache im Vergleich zu uninfizierten Zellen. Auffällig dabei war, dass die stärkste Zunahme der *ciap2*-Expression im akuten Infektionsmodell zu verzeichnen war.



**Abb. 31: Expression von *ciap2* 24 h-96 h p.i.** Dargestellt sind die Expressionsänderungen in akut bzw. persistent infizierten Zellen im Vergleich zu uninfizierten Zellen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen mit jeweils Dreifachbestimmung in der RTQ-PCR. Die dazugehörigen Wertetabellen sind im Anhang zu finden (Tabellen 21-24).

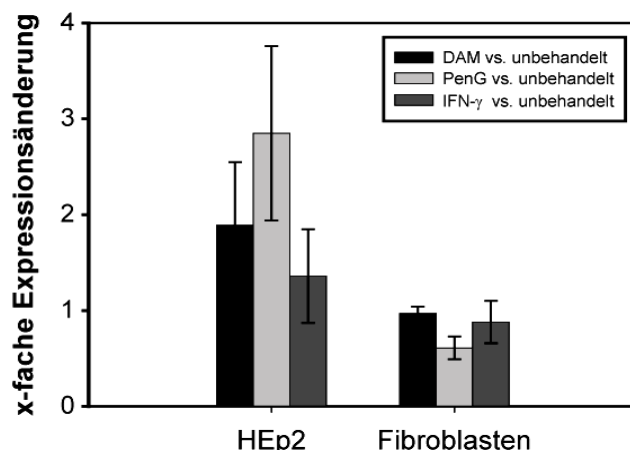
Da eine erhöhte Transkriptmenge aufgrund posttranskriptionaler und posttranslationaler Modulationen nicht automatisch mit einer erhöhten Proteinmenge einhergeht, wurde mittels Western Blotting die Proteinmenge von cIAP2 in akuter und persistenter Infektion

im Vergleich zu uninfizierten Zellen überprüft. Abb. 32 zeigt die cIAP2-Western Blots für HEp2-Zellen und Fibroblasten 24 h und 48 h p.i. Sowohl in der HEp2-Zelllinie als auch in den Fibroblasten war die Menge an cIAP2-Protein im Vergleich zu uninfizierten Zellen erhöht, was sich mit den Ergebnissen der Transkriptionsuntersuchungen deckt.



**Abb. 32: Western Blots der behandelten, infizierten Zellen gegen cIAP2.** Dargestellt sind representative Blots aus drei unabhängigen Infektionsexperimenten zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h p.i.. (A) cIAP-2-Detektion in HEp2-Zellen (B) cIAP-2-Detektion in Fibroblasten. Als Ladekontrolle sind jeweils die entsprechenden Blots gegen das GUSB gezeigt. unb. = unbehandelt, D = DAM, P = Penicillin G, I = IFN- $\gamma$

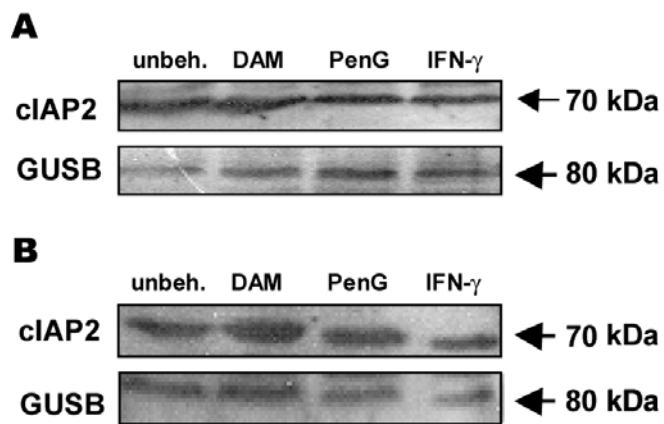
Um auszuschließen, dass die in den Chlamydien-infizierten Zellen festgestellte, erhöhte Transkript- und Proteinmenge von cIAP2 durch die Persistenzinduktoren anstelle der Chlamydieninfektion hervorgerufen wurde, erfolgte die Bestimmung der Transkript- bzw. Proteinmenge von cIAP2 in behandelten, uninfizierten Zellen im Vergleich zu uninfizierten Kontrollzellen mittels RTQ-PCR und Western-Blotting.



**Abb. 33: Expression von *ciap2* nach Zugabe von Persistenzinduktoren.** HEp2 und Fibroblasten wurden für 48 h (bzw. für 72 h im Fall des IFN- $\gamma$ ) mit 150  $\mu$ M DAM, 200 U/ml PenG bzw. 20 ng/ml IFN  $\gamma$  behandelt und die Expression von *ciap2* im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt. Die dazugehörigen Wertetabellen sind im Anhang zu finden (Tabellen 25-26).

Die in Abb. 33 und 34 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass weder die cIAP2-Transkriptmenge noch die Menge an Protein durch die Gabe an Persistenzinduktoren

signifikant beeinflusst wird und somit die Persistenzinduktoren selbst keinen Einfluss auf die *ciap2*/cIAP2-Expression haben.



**Abb. 34: Western Blots der behandelten, uninfizierten Zellen gegen cIAP2.** Dargestellt sind representative Blots aus drei unabhängigen Experimenten zum Zeitpunkt 48 h p.i. (A) cIAP-2-Detektion in HEp2-Zellen (B) cIAP-2-Detektion in Fibroblasten Als Ladekontrolle sind jeweils die entsprechenden Blots gegen das GUSB gezeigt

## 4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der persistente Zustand von *Cp. psittaci* auf molekularer Ebene hinsichtlich zweier Aspekte genauer charakterisiert. Zum einen sollten chlamydiale Genexpressionänderungen untersucht werden, welche zur Entstehung und Aufrechterhaltung des Persistenzstadiums beitragen, während im zweiten Teil der Arbeit die Auswirkung der persistenten Chlamydieninfektion auf das apoptotische Verhalten der Wirtszelle thematisiert wurde. Da im zweiten Teil der Arbeit neben den drei Persistenzmodellen auch die akut infizierte Wirtszellen im Vergleich zu uninfizierten Zellen untersucht wurde, ließ sich zudem zusätzlich das Apoptoseverhalten während der akuten Infektion der Zelle genauer charakterisieren.

Die in dieser Arbeit für die Spezies *Cp. psittaci* erstmalig erhaltenen Daten erlauben einen Vergleich mit den Persistenzcharakteristika der beiden intensiver untersuchten Spezies *C. trachomatis* und *Cp. pneumoniae* und können somit zur Herausarbeitung genereller Persistenzmerkmale der *Chlamydiaceae* beitragen.

### 4.1 Die *Cp.-psittaci*-Persistenz

Bezüglich chlamydialer Persistenzcharakteristika und Genexpressionsänderungen im Persistenzzustand existieren bereits eine Reihe von Arbeiten, die im Wesentlichen aber nur die zwei Spezies *C. trachomatis* und *Cp. pneumoniae* behandeln (Mathews *et al.*, 2001; Byrne *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003; Belland *et al.*, 2003b; Polkinghorne *et al.*, 2006).

Nach der Klassifizierung der Spezies *Cp. pneumoniae* im Jahr 1989 wurden vorwiegend nur noch *C. trachomatis* und *Cp. pneumoniae* bearbeitet, obwohl *Cp. psittaci* ein wesentlich breiteres Wirtsspektrum aufweist und ebenfalls ein humanpathogener Erreger ist, dessen Erkrankungsfälle aber vermutlich statistisch unterrepräsentiert sind. Die *in-vitro*-Arbeiten, die zur Etablierung des Terms „Persistenz“ führten, wurden jedoch ursprünglich mit *Cp. psittaci* durchgeführt (Moulder *et al.*, 1980).

#### 4.1.1. Etablierung der Persistenzmodelle und Kulturbedingungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Persistenzmodelle etabliert. DAM- und IFN- $\gamma$  erzeugen Persistenz, indem sie den Nährstoffpool der Wirtszelle und somit die Verfügbarkeit der Nährstoffe für die Chlamydien verringern. Das Penicillin G hingegen wirkt direkt auf die Chlamydien.



Ein Großteil der bisher publizierten Arbeiten und Daten zur chlamydialen Persistenz beschränkt sich auf das IFN- $\gamma$ -Modell, was keine Aussage darüber zulässt, ob die beobachteten Effekte IFN- $\gamma$ -spezifisch sind oder charakteristisch für die chlamydiale Persistenz im Allgemeinen. Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Persistenzmodelle angewendet, um genauer herausstellen zu können, welche Veränderungen spezifisch für die chlamydiale Persistenz im Allgemeinen sind und davon die variablen, Persistenzinduktor- basierenden Veränderungen abgrenzen zu können.

Bei den drei verwendeten Persistenz-Modellen handelt es sich zwar nur um *in-vitro*-Modelle, jedoch hat jeder der drei verwendeten Persistenzinduktoren einen *in-vivo*-Bezug. Das DAM-Modell basiert auf dem Entzug von Eisen. Eisen ist ein essentieller Bestandteil für das Wachstum und die Vermehrung fast aller Mikroorganismen. Als generelle Verteidigungsstrategie gegen pathogene Erreger haben höhere Eukaryoten daher effektive Wege gefunden, die frei zugängliche Eisenmenge in allen Geweben gering zu halten. Zelluläre und extrazelluläre Eisen-Binde-Proteine wie z. B. Transferrine und Lactoferrine fangen das für Pathogene verfügbare Eisen weg, was somit zu einer Hemmung des bakteriellen Wachstums führt. So konnte bereits 1989 gezeigt werden, dass DAM die Replikation von *Legionella pneumophila* in Monocyten inhibiert (Byrd und Horwitz, 1989). Die genaue Wirkungsweise von Eisen-Chelatoren wie dem DAM bei der Entstehung der chlamydialen Persistenz ist noch nicht geklärt, jedoch wird diskutiert, ob sich die Wirkung der Eisenchelatoren auf Proteine richtet, welche Eisen als Cofaktoren benötigen. So wurden z. B. 2001 in einer Studie von Raulston 19 chlamydiale Proteine gefunden, welche durch einen Entzug von Eisen mittels Desferal-Behandlung reprimiert wurden. Diese Proteine wurden jedoch nicht näher charakterisiert.

Für Malaria-Infektionen wurde in *in-vivo*- und *in-vitro*-Modellen gezeigt, dass die Infektion durch Eisenchelatoren wie z. B. DFX (Deferoxamin) inhibiert werden kann, und dass dieser Effekt wahrscheinlich durch die Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase der Plasmodien zustande kommt (Lytton *et al.*, 1994). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass der Entzug von Eisen mit einem proportionalen Verlust der Aktivität der *Herpes Simplex*-Virus 2- oder *E.-coli*-Ribonukleotid-Reduktase einhergeht (Atta *et al.*, 1993). Ribonukleotid-Reduktasen katalysieren die Umwandlung von Ribonukleotid-Diphosphaten in Desoxyribonukleotid-Triphosphate und liefern somit die Bausteine für die Synthese der DNA.

Die Sequenzierung der ersten chlamydialen Genome ergab, dass Chlamydien über eine Ribonukleotid-Reduktase der Klasse Ia verfügen, welche aus zwei Homodimeren, zum

einen aus dem R1-Protein ( $\alpha 1$ ) und zum anderen aus dem R2-Protein ( $\beta 2$ ) bestehend, aufgebaut ist (Roshick *et al.*, 2000). Das  $\beta 2$ -Homodimer verfügt dabei über ein dinukleares Eisenzentrum (Jordan and Reichard, 1998). Ein Eisenmangel könnte somit auch die Aktivität der chlamydialen Ribonukleotid-Reduktase verringern und dadurch den für die Chlamydien verfügbaren dNTP-Pool, was bei suboptimalen Konzentrationen des Eisenchelators zur Persistenz der Chlamydien anstelle ihrer Eliminierung führen könnte.

Das Penicillin-G-Modell reflektiert die *in vivo* durch unzureichende Antibiotika-Konzentrationen ausgelöste, chlamydiale Persistenz. Zwar stellt das Penicillin G kein Mittel der Wahl dar, um Chlamydieninfektionen zu therapieren, jedoch konnte in einer Studie gezeigt werden, dass suboptimale Konzentrationen jener Antibiotika, die zur Chlamydientherapie eingesetzt werden wie z. B. Ciprofloxacin, Erythromycin, Doxycyclin oder Rifampin, ebenso persistente Formen hervorrufen (Gieffers *et al.*, 2004). Somit hat die Antibiotika-induzierte Persistenz in Zellkulturmodellen eine *in-vivo*-Relevanz. Warum das Penicillin jedoch einen Einfluss auf die Vermehrung der chlamydialen RBs besitzt ist nicht bekannt, da in Chlamydien bisher kein Peptidoglykan nachgewiesen werden konnte, dessen Synthese durch Penicillin gehemmt wird. Jedoch codiert das chlamydiale Genom für Penicillin-Binde-Proteine, welche das eigentliche Angriffsziel des Penicillins darstellen. Ob diese chlamydialen Penicillin-Binde-Proteine aber tatsächlich die Transpeptidierungsreaktion während der Peptidoglykan-Synthese oder vielleicht eine andere Reaktion katalysieren (Moulder *et al.*, 1993), ist weiterhin unbekannt. Die morphologischen Änderungen, die eine Penicillin-Behandlung bei Chlamydien auslöst, sind jedoch vergleichbar mit denen, die in Bakterien mit Peptidoglykan-Zellwand gefunden werden. In *Neisseria meningitidis* z. B. führt die Gabe vergleichbarer Penicillin-G-Konzentrationen ebenfalls zur Ausbildung vergrößerter Zellen mit abnormer Morphologie und inkompletter Septierung (Neirinck *et al.*, 1981).

Im Vergleich zum Penicillin G ist die Wirkungsweise des IFN- $\gamma$  in der Erzeugung der chlamydialen Persistenz relativ gut charakterisiert. *In-vivo*-Studien zum Einfluss des IFN- $\gamma$  während der Chlamydieninfektion beziehen sich dabei vorwiegend auf Mausmodelle. In IFN- $\gamma$ -Knock-Out-Mäusen (bzw. IFN- $\gamma$ -Rezeptor-Knock-Out-Mäusen) beispielsweise, welche mit *C. muridarum* oder *C. trachomatis* D infiziert wurden, ist das Immunsystem nicht in der Lage, die Chlamydieninfektion zu lokalisieren und zu beseitigen (Wang *et al.*, 1999, Ito und Lyons, 1999). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass in *C.-muridarum*-

infizierten Mäusen, welche mit einem anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper behandelt wurden, die Beseitigung der Infektion länger dauerte als in den Kontrolltieren (Rank *et al.*, 1992). Auch durch die Gabe von rekombinantem, murinem IFN- $\gamma$  konnte die Anzahl der Chlamydien in Lunge, Leber und Milz infizierter Mäusen herabgesetzt werden (Zhong *et al.*, 1988).

Innerhalb der Familie *Chlamydiaceae* bestehen jedoch Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber der IFN- $\gamma$ -Behandlung (Morrison, 2000), die auf dem Vorhandensein/Nichtvorhandensein von Tryptophan-Biosynthese-Genen beruht. Die Tryptophan (*trp*)-Biosynthese-Gene sind in einer Region des Chlamydiengenoms codiert, die „Plasticity Zone“ (PZ) genannt wird (Read *et al.*, 2000). Der Aufbau dieser „Plasticity Zone“ ist dabei zwischen den Spezies und z. T. auch Serovaren verschieden. *C. muridarum*, *Cp. pneumoniae* und *Cp. abortus* verfügen über keine *trp*-Synthese-Gene. Die Sequenzierung des *Cp. psittaci*-Genoms (G. Myers, TIGR, 2004-2006) zeigte ebenfalls, dass *Cp. psittaci* über keine *trp*-Synthese-Gene verfügt. *C. trachomatis* hingegen besitzt drei *trp*-Synthese-Gene in der „Plasticity Zone“, *trpA*, *trpB* und *trpR*, die für die Tryptophansynthese-Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  sowie einen Repressor codieren. Zwischen okularen und genitalen *C. trachomatis*-Serovaren existieren jedoch Unterschiede bezüglich der Resistenz gegenüber IFN- $\gamma$ , dessen Ursache Deletionsmutationen im *trpA* okulärer Stämme sind (Fehlner-Gardiner *et al.*, 2002). Ein beinahe vollständiges Set an *trp*-Synthese-Genen findet man dagegen bei *Cp. caviae*. Das *Cp. caviae*-Genom codiert für alle Gene, die zur *trp*-Synthese benötigt werden bis auf die Anthranilat-Synthase (*trpE/G*), welche die erste Reaktion während der *trp*-Synthese katalysiert. Dadurch ist *Cp. caviae* weitestgehend resistent gegenüber der IFN- $\gamma$ -Behandlung (Morrison 2000, Wood *et al.*, 2004)

Für die Etablierung des in dieser Arbeit verwendeten *in-vitro*-IFN- $\gamma$  Persistenzmodells im Falle des *Cp. psittaci* Stamms DC15 war eine Vorinkubation der Wirtszellen mit der entsprechenden IFN- $\gamma$ -Konzentration 24 h vor der Infektion notwendig, wie es auch schon für den *Cp. psittaci*-Referenz-Stamm 6BC beschrieben ist (Byrne *et al.*, 1986). IFN- $\gamma$  aktiviert die Expression der IDO in der Wirtszelle, welche den Abbau des Tryptophans vermittelt und somit zum Tryptophanmangel, der Voraussetzung für die Persistenzentstehung, beiträgt. Da der Lebenszyklus von *Cp. psittaci* DC15 mit 48 h relativ schnell abläuft, erwies es sich also als notwendig, dass bereits bei Infektion geringere Tryptophanmengen in der Wirtszelle vorlagen. Für Spezies mit einem längeren Lebenszyklus wie z. B. *Cp. pneumoniae* hingegen bzw. Spezies, welche sensitiver auf IFN- $\gamma$  reagieren, ist eine solche Vorinkubation der Wirtszelle mit IFN- $\gamma$  nicht notwendig.

Für die Studien zur chlamydialen Persistenz wurden zwei verschiedene Zelllinien ausgewählt, zum einen die HEp2-Zelllinie und zum anderen synoviale Fibroblasten. Ein Großteil der existierenden Studien, welche die chlamydiale Genexpression im Persistenzstadium betreffen, wurde in der HEp2-Zelllinie durchgeführt, die sehr gut mit Chlamydien infizierbar ist. Die Verwendung der HEp2-Zelllinie ermöglicht somit die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen anderer Arbeiten. Die HEp2-Zelllinie sollte ursprünglich einem epidermoiden Larynx-Karzinom entstammen, doch anschließende Tests, basierend auf Isoenzym-Analyse, Marker-Chromosom-Analyse und DNA-Fingerprints zeigten, dass sich die jetzige HEp2-Zelllinie aus einer Kontamination mit HeLa-Zellen etablierte und somit auch Papovavirus (Papillomavirus)-Sequenzen im Genom integriert hat. Der karzinogene Ursprung dieser Zelllinie macht sie jedoch weniger geeignet für die Studien bezüglich des Einflusses der persistenten *Cp.-psittaci*-Infektion auf die Wirtszellapoptose. Durch die im Genom integrierten Papillomavirus-Sequenzen kann das apoptotische Verhalten der Wirtszelle verändert sein, da Papillomaviren für Proteine mit antiapoptotischer Funktion wie z. B. E6 oder E7 codieren (Thomas *et al.*, 1996; Kamradt *et al.*, 2000, Yuan *et al.*, 2005). Aufgrund dessen wurden v. a. für den zweiten Teil der Arbeit die Persistenzmodelle auch für eine primäre Zelllinie, die synovialen Fibroblasten, etabliert, deren Apoptoseverhalten die *in-vivo*-Situation eher repräsentieren dürfte. Desweiteren ermöglicht die Verwendung einer zweiten Zelllinie eine Aussage darüber, ob die erhaltenen Ergebnisse wirtszellspezifischer oder persistenzspezifischer Natur sind.

Der in dieser Arbeit untersuchte Zeitraum betrug im Wesentlichen bis 48 h p.i., für einige Experimente auch bis 96 h p.i., obwohl die Persistenz als „Langzeitbeziehung“ zwischen Chlamydien und Wirtszellen definiert ist (Beatty *et al.*, 1993b). Allerdings war 96 h p.i. schon mikroskopisch ein zunehmender Zelltod (auch in uninfizierten Zellen) zu verzeichnen. Um dies zu umgehen, hätten die infizierten Zellen gesplittet und in neue Kulturgefäße umgesetzt werden müssen, dadurch hätte sich die persistente, nicht-produktive Infektion aber zunehmend ausgedünnt und der Einfluss der persistenten Chlamydien wäre nicht mehr zum Tragen gekommen.

Während der Etablierung der Persistenzmodelle wurde der FKS-Gehalt des Mediums von 10 % auf 5 % reduziert, nachdem ausgeschlossen werden konnte, dass die geringere FKS-Konzentration Auswirkungen auf das Zellwachstum hat. Durch die Zugabe einer

geringeren Serummenge ist die Konzentration an Nährstoffen und Eisen-beladenen Proteinen im Medium niedriger und begünstigt somit die Persistenzausbildung. Die Chlamydieninfektionen (mit Ausnahme der Infektionen zur Anzucht und Stammkonservierung) erfolgten ohne Zusatz von Cycloheximid oder Serum-freiem Medium zur Zellkultur. Eine Kultivierung unter Zugabe von Cycloheximid oder Verwendung von Serum-freiem Medium führt zur Hemmung der Proteinsynthese der Wirtszelle und aufgrund der höheren Nährstoffversorgung der Chlamydien somit zu ihrer besseren Vermehrung und wird darum häufig angewendet. Speziell für die Untersuchungen der Interaktion der Chlamydien mit der Wirtszelle war aber ein unbeeinflusster Ablauf des zellulären Stoffwechsels notwendig.

#### **4.1.2. Die chlamydiale Genexpression während Persistenzetablierung und-aufrechterhaltung**

Hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens während des Untersuchungszeitraumes lassen sich die untersuchten 31 chlamydialen Gene im Wesentlichen in drei Gruppen untergliedern:

- Gene, welche ein persistenzspezifisches Expressionsmuster aufweisen
- Gene mit übereinstimmendem Expressionsmuster in DAM- und IFN- $\gamma$ -Modell sowie
- Gene, die ein Modell-spezifisches Expressionsverhalten zeigen.

Die Daten des 12 h-Untersuchungszeitpunktes wurden bei dieser Eingruppierung nicht berücksichtigt, da zu diesem Zeitpunkt nur wenige Gene bereits eine differentielle Expression im Vergleich zur akuten Infektion aufwiesen bzw. eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den Modellen bestand, die zu den späteren Zeitpunkten z. T. nicht aufrechterhalten blieb.

Auffällig war jedoch, dass zum 12 h p.i.-Untersuchungszeitpunkt fast alle Gene, welche zu diesem Zeitpunkt ein differentielles Expressionsverhalten zeigten, hochreguliert waren, jedoch nur um Faktoren zwischen 2 und 11. Dies lässt sich möglicherweise damit erklären, dass die Persistenz-erzeugenden Effekte von DAM, Penicillin G und IFN- $\gamma$  zu diesem Zeitpunkt noch nicht komplett zum Tragen gekommen waren bzw. dass diese Hochregulation eine anfängliche Reaktion auf die Behandlung mit den jeweiligen Persistenzinduktoren darstellt.

#### 4.1.2.1 Persistenz-spezifische Expressionsmuster

Sechs der 31 untersuchten Gene verhielten sich hinsichtlich ihres Expressionsmusters in allen drei Persistenzmodellen identisch und zeigten ab 24 h p.i. eine konstante Herunterregulation. Dabei handelt es sich um die Gene *omcA*, *omcB* und *pomp 91B*, welche für Membranproteine codieren, des weiteren *ftsW*, *ctcB* und *ctcC*, deren Proteinprodukte eine Rolle in der Zellteilung und RB-EB-Umwandlung spielen sowie *yphC*, welches für eine GTPase codiert.

Das chlamydiale *ftsW* codiert für ein Septum-Peptidoglykan-Biosynthese-Protein, welches Homologe in beinahe allen Bakterien mit Peptidoglykan-Zellwand wie z. B. *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* oder *Coxiella burnetii* besitzt. Das *E. coli*-FtsW beispielsweise spielt eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des FtsZ-Ringes während der Zellteilung und ist in die Rekrutierung des Penicillin-Binde-Proteins PBP3 involviert, welches das Peptidoglykan-Crosslinking katalysiert (Mercer und Weiss, 2002). Die Inaktivierung des FtsW und der damit einhergehende Verlust seiner spezifischen Funktion führen zu einem Zellteilungsblock von *E. coli* und zur Ausbildung vergrößerter, aberranter Strukturen (Boyle *et al.*, 1997; Khattar *et al.*, 1997) wie es auch im Falle der chlamydialen Persistenz zu sehen ist (Abb. 6, 7 und 8). Die Zellteilung der meisten Bakterien ist das Ergebnis des Zusammenspiels eines Komplexes von sieben bzw. mehr konservierten Proteinen, wie z. B. FtsW, FtsK, FtsN, FtsL/DivIC, FtsQ/DivIB, ZipA und FtsA (Errington *et al.*, 2003). Chlamydien dagegen scheinen nicht über diese komplette Proteinausstattung zu verfügen. So findet sich z. B. kein *ftsZ*-Gen in ihren Genomen, jedoch verfügen sie über Orthologe von *ftsK* und *ftsW* (Stephens, 1994). Wie die Zellteilung der chlamydialen RBs abläuft, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht bekannt.

Die Herunterregulierung des *ftsW* in allen drei Persistenzmodellen ab 24 h p.i. lässt sich mit der aberranten, vergrößerten Morphologie der chlamydialen RBs bzw. ABs assoziieren. In einer Studie von Byrne und Kollegen (2001) wurde gezeigt, dass Gene, deren Proteinprodukte in die DNA-Replikation involviert sind, im IFN- $\gamma$ -Persistenzmodell weiterhin unverändert exprimiert werden, wohingegen *ftsK* und *ftsW* herunterreguliert sind. In der chlamydialen Persistenz findet also weiterhin DNA-Replikation statt und es kommt zur Vermehrung der Erbinformation, diesem steht aber keine Verteilung des bakteriellen Genoms auf eine neue Zelle entgegen, was zu der vergrößerten, „aufgeblähten“ Morphologie der RBs führen könnte.

Die beiden Gene *ctcB* und *ctcC* codieren für die Sensor-Histidin-Kinase und den Response-Regulator des einzigen bisher gefundenen Zwei-Komponenten-Systems in Chlamydien (Koo and Stephens, 2003). Zwei-Komponenten-Systeme stellen Signaltransduktionssysteme dar, die es einem Organismus ermöglichen, auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren, sich anzupassen und somit sein Überleben unter den veränderten Bedingungen zu sichern. Mittels Zwei-Komponenten-Systemen kann auf Veränderungen in der Verfügbarkeit von Nährstoffen oder Änderungen im Energiemetabolismus reagiert werden. Sie spielen eine Rolle bei der Regulierung der Virulenz oder auch bei komplexeren Entwicklungsprozessen wie z. B. Sporulation oder Fruchtkörperbildung. Die Funktionsweise eines Zwei-Komponenten-Systems wurde erstmalig für das NR-System von *E. coli* aufgeklärt, einem System, welches die Genexpression unter veränderten Stickstoffkonzentrationen kontrolliert (Ninfa und Magasanik, 1986). Weitere Beispiele für Zwei-Komponenten-Systeme sind das EnvZ/OmpR, welches die Osmoregulation in *E. coli* kontrolliert, VirA/VirG, welches die Virulenz von *Agrobacterium tumefaciens* steuert oder auch NtrB/NtrC, welches die Aufnahme von Stickstoff in einer Vielzahl von Bakterien steuert. Die Sensor-Histidin-Kinase autophosphoryliert auf ein spezifisches Signal hin und überträgt diese Phosphorylgruppe auf den Response-Regulator, der anschließend die Transkription von Zielgenen initiieren oder hemmen kann (Parkinson und Kofoid, 1992).

Die Sequenz-Analyse des chlamydialen Zwei-Komponenten-Systems zeigte, dass CtcB eine PAS-Domäne besitzt, über welches der Energielevel der Zelle gemessen wird, sowie eine Phosphorylierungs-Seite für die Autophosphorylierung des CtcB (Koo and Stephens, 2003). Der Response-Regulator CtcC stellt ein  $\sigma^{54}$ -Aktivator-Homolog dar und verfügt über eine konservierte Receiver- und ATPase-Domäne sowie eine Phosphorylierungs-Seite (Koo and Stephens, 2003).

Chlamydien wechseln in ihrem Lebenszyklus zwischen zwei verschiedenen Entwicklungsformen (EB und RB), wovon jede genau an ihre spezifische Nische angepasst ist. In früheren Studien konnte schon gezeigt werden, dass Energie-Level und Redox-Status zwei wichtige Determinanten für die chlamydiale Entwicklung darstellen (Kaul und Wenman, 1986; Hackstadt *et al.*, 1985; Bavoil *et al.*, 1984). Die RB-EB-Differenzierung könnte somit durch ein Zwei-Komponenten-System reguliert werden. CtcB und CtcC könnten ein Set „später“ Gene oder spezifische Transkriptionsfaktoren aktivieren, die für die Umwandlung der RBs in EBs notwendig sind (Koo and Stephens, 2003). Da im Stadium der Persistenz der Lebenszyklus aber auf der Stufe der RBs verharret und keine

infektiösen EBs gebildet werden, scheint die in allen drei Persistenzmodellen beobachtete Herunterregulierung von *ctcB* und *ctcC* ein Merkmal für das Persistenzstadium von *Cp. psittaci* DC15 zu sein, unabhängig davon, welches Persistenzmodell angewendet wurde.

Bei *omcA* und *omcB* handelt es sich um solche Gene, die besonders zu späteren Zeitpunkten des Entwicklungszyklus verstärkt exprimiert werden (Belland *et al.*, 2003a) und deren Proteinprodukte vorwiegend in den EBs gefunden werden. *OmcA* und *omcB* codieren für Membranproteine, die am strukturellen Aufbau der äußeren Chlamydien-Membran beteiligt sind. *OmcA* und *OmcB* interagieren mit MOMP über die Ausbildung von Disulfidbrücken und bilden mit diesem den Outer Membrane Complex (OMC). Für das *OmcB* wurde kürzlich außerdem beschrieben, dass es als Glykosaminoglykan-abhängiges Adhäsins bei der Bindung an die Wirtszelle fungiert und somit eine Rolle bei der Anheftung der EBs spielt (Fadel und Eley, 2007). Beide Gene sind ab 24 h p.i. in allen drei Persistenzmodellen herunterreguliert, teilweise bis um den Faktor 100 im IFN- $\gamma$ -Modell zum 48 h p.i.-Zeitpunkt (Abb. 11). Unter Verwendung der Fibroblasten als Wirtszelle zeigt sich sogar eine Herunterregulation des *omcA* im DAM-Modell um den Faktor 1000 (Tabellen 15 und 16, Anhang). Die Herunterregulation von chlamydialen Genen, welche wie *omcA* und *omcB* spät im Entwicklungszyklus exprimiert werden und vermutlich eine vorherrschende Rolle im EB spielen, ist ein häufiges Merkmal der Persistenz bei verschiedenen Chlamydienspezies und wird als „late gene shut-down-hypothesis“ bezeichnet. Diese Herunterregulation „später“ Gene während der Persistenz ist vermutlich eine Konsequenz des vorliegenden RB-EB-Differenzierungsblocks. Wie im vorherigen Abschnitt schon erwähnt, könnte dieser „late gene shut-down“ mit der Herunterregulierung von *ctcB* und *ctcC* zusammenhängen, wenn das von diesen beiden Genen codierte Zwei-Komponenten-System die Expression der „späten“ Gene tatsächlich reguliert.

Zwei weitere Beispiele für klassische „späte“ Gene sind das *hctA* und das *hctB*, welche für die DNA-Binde-Proteine Hc-1 und Hc-2 codieren. *HctA* und *hctB* weisen spät im Entwicklungszyklus, einhergehend mit der RB-EB-Differenzierung und der Chromosomenkondensation, ihren Expressionspeak auf (Belland *et al.*, 2003a). Hc-1 und Hc-2 sind in der Chromosomenkondensation involviert (Brickman *et al.*, 19993; Hackstadt *et al.*, 1991; Perara *et al.*, 1992) und zeigen Aminosäure-Ähnlichkeit mit dem eukaryotischen Histon H1. Während das Hc-1 innerhalb der *Chlamydiaceae* konserviert ist, hat das Hc-2 je nach Spezies ein variables Molekulargewicht. Die Überexpression von



*hctA* in *E. coli* führt zu einer Chromatinstruktur, die vergleichbar derer in EBs ist sowie zu einer Herunterregulation transkriptioneller und translationeller Prozesse und der *E. coli*-Replikation (Barry *et al.*, 1992; Barry *et al.*, 1993). Die metabolisch inaktiven EBs der Chlamydien verfügen über einen charakteristischen „Kern“ kondensierten Chromatins. Nach der Aufnahme in die Wirtszelle lockert sich die Chromatinstruktur, Transkription und Translation werden initiiert und die Umwandlung in RBs erfolgt. *HctA* zeigt zwar zum Untersuchungszeitpunkt 36 h p.i. keine differentielle Regulation im Penicillin-G- und IFN- $\gamma$ -Modell und genügt somit nicht den Kriterien dieser Gruppe, jedoch findet sich 24 h und 48 h p.i. eine Herunterregulation in allen drei Modellen, die speziell im IFN- $\gamma$ -Modell 48 h p.i. mit einer Abnahme der Transkriptmenge um den Faktor 100 relativ deutlich ausfällt (Tabelle 6). Da aufgrund des RB-EB-Differenzierungsblocks in der Persistenz die Kondensation des Chromatins im Rahmen der EB-Entstehung nicht notwendig ist, scheint eine Herunterregulierung in der Transkriptmenge des *hctA* plausibel, unabhängig davon, welcher Persistenzinduktor verwendet wird. Daher wurden die Daten an dieser Stelle diskutiert.

Das chlamydiale *yphC* codiert für eine GTPase der Era/TrmE-GTP-Binde-Protein-Familie und wird in die EngA-Subfamilie eingruppiert. Die physiologische Rolle, welche YphC in den Chlamydien spielt, ist bisher noch nicht geklärt. Mitglieder dieser GTPase-Superfamilie sind wichtige Bestandteile vieler Signalwege, bei denen Konformationsänderungen, die mit GTP-Bindung und -Hydrolyse assoziiert sind, eine wichtige Rolle spielen, wie z. B. in Zellteilung, Zellzyklus, Signalübertragung, Translation oder hormonellen Signalwegen (Bourne *et al.*, 1991).

Genomstudien haben gezeigt, dass Bakterien über 11 konservierte GTPasen verfügen.

Die Mitglieder der EngA-Familie findet man nur innerhalb des Reiches *Bacteria* sowie einer Anzahl von Parasiten wie z. B. *Plasmodium* oder *Eimeria*, nicht aber in Hefe, anderen Pilzen oder aber dem Menschen. Studien in *E. coli*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Bacillus subtilis* lassen vermuten, dass GTP-Binde-Proteine der Era/Obg-Familie wichtig für das bakterielle Wachstum im Zusammenhang mit Chromosomenreplikation, Zellteilung und -differenzierung sind (Mehr *et al.*, 2000; Dassain *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2001; Hwang, J. & Inouye, M., 2001). So codiert das *B.-subtilis-yphC* für ein EngA-Homolog, welches essentiell für das Überleben ist, wie in Knock-out-Studien gezeigt wurde (Hwang and Inoye, 2001). Interessanterweise zeigen *B.-subtilis-yphC*-Knock-Out-Mutanten eine Zunahme in der Zelllänge sowie eine abnorme Zellform (Hwang and Inoye,

2001), welche auch bei den persistenten Chlamydien zu finden ist. Die Herunterregulation von *yphC* scheint also ein persistenzspezifisches Merkmal für *Cp. psittaci* darzustellen auch wenn dies noch nicht mit einer konkreten Auswirkung auf die Chlamydien assoziiert werden kann.

Die Vermutung, dass die Herunterregulation der hier diskutierten Gene ein spezifisches Charakteristikum für die *Cp.-psittaci*-DC15-Persistenz *per se* ist, verstärkt sich aufgrund der Ergebnisse, die unter Verwendung der zweiten Wirtszelllinie gewonnen wurden. Alle sechs diskutierten Gene zeigen in den Fibroblasten-Persistenzmodellen dasselbe Expressionsmuster wie unter Verwendung der HEp2-Zelllinie, sind also herunterreguliert (Tabellen 13-16, Anhang). Der Grad der Herunterregulation der einzelnen Gene differiert dabei allerdings zwischen den beiden Wirtszelllinien. So fällt die Herunterregulation von *omcA*, *omcB*, *ctcB* und *ctcC* im Fibroblasten-DAM-Modell vergleichsweise stärker aus als im HEp2-DAM-Modell und die IFN- $\gamma$ -Behandlung führt hier nicht zu den signifikantesten Expressionsänderungen wie unter Verwendung der HEp2-Wirtszelllinie beobachtet, jedoch ist die konstante Herunterregulation von *omcA*, *omcB*, *ctcC*, *ctcB*, *ftsW* und *yphC* auch unter Verwendung der synovialen Fibroblasten zu verzeichnen. Die Beobachtung, dass die IFN- $\gamma$ -abhängigen Expressionsänderungen weniger stark ausfallen wie unter Verwendung der HEp2-Zelllinie könnte damit zusammenhängen, dass dieIDO-Expression und die damit verbundene Tryptophanlimitierung erst 36 h p.i. in den Fibroblasten ihren Peak findet. Somit könnten gravierende IFN- $\gamma$ -assoziierte, chlamydiale Genexpressionsänderungen erst etwas zeitlich verzögert auftreten.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass eine Herunterregulierung spezifischer Gene, welche für Membranproteine, ein Zellteilungsprotein, die Proteine eines Zwei-Komponenten-Systems sowie für eine GTPase codieren, charakteristisch für das Persistenzstadium von *Cp. psittaci* DC15 sind.

Die Expression der Gene der drei chlamydialen Sigma-Faktoren, welche in dieser Studie ebenfalls untersucht wurde, lässt keine eindeutige Aussage darüber zu, ob die Transkription der oben diskutierten sechs „persistenzspezifischen“ Gene durch einen spezifischen Sigma-Faktor reguliert wird. Im Wesentlichen zeigen die drei Sigma-Faktor-codierenden Gene keine signifikant veränderte Expression in den Persistenzmodellen, jedoch ist auffällig, dass das *rpsD*, welches für den Sigma-Faktor 28 codiert, zu 24 h und 48 h p.i. in allen drei Modellen herunterreguliert ist, speziell jedoch im IFN- $\gamma$ -Modell (Abb. 14).

Das *rpsD* könnte somit möglicherweise doch für den Sigma-Faktor codieren, welcher in die Transkription von *omcA*, *omcB*, *ftsW*, *ctcB*, *ctcC* und *yphC* involviert ist, v. a. weil diese sechs Gene ihre stärkste Herunterregulation ebenfalls im IFN- $\gamma$ -Modell zeigen.

#### 4.1.2.2 DAM-und IFN- $\gamma$ -spezifische Expressionsmuster

Eine weitere Beobachtung, die sich aus den Expressionsstudien bezüglich ausgewählter chlamydialer Gene während der Persistenzetablierung ergab, bezieht sich auf die Ähnlichkeiten im Genexpressionsmuster des DAM- und IFN- $\gamma$ -Persistenzmodells. Es zeigte sich eine größere Übereinstimmung zwischen den Expressions-Daten des DAM- und IFN- $\gamma$ -Persistenz-Modells als zwischen dem Penicillin-G-Modell und den beiden anderen Modellen. So wiesen für das DAM- und IFN- $\gamma$ -Modell ca. 20 % der untersuchten Gene (mit Einberechnung der „persistenzspezifischen“ Gene ca. 40 %) eine vergleichbare Expression während des Untersuchungszeitraumes auf.

Diese größere Ähnlichkeit zwischen DAM- und IFN- $\gamma$ -Modell könnte ihre Ursache in der unterschiedlichen Wirkungsweise der drei verschiedenen Persistenzinduktoren haben. Die Gabe von DAM und IFN- $\gamma$  erzeugt einen Nährstoffmangel (Mangel an Eisen bzw. Mangel an Tryptophan) in der Wirtszelle, was somit auch die Nährstoffversorgung der Chlamydien betrifft, wie genauer in 4.1.1 diskutiert. Eisen und Tryptophan werden jedoch als Cofaktor vieler Enzyme bzw. als Baustein für die Proteinbiosynthese benötigt. Zudem ist eine Rolle des IFN- $\gamma$  in der Limitierung der Eisenkonzentration während der Chlamydieninfektion beschrieben (Igiertseme *et al.*, 1998). Das Penicillin G hingegen wirkt direkt auf die Chlamydien und könnte dabei vermutlich inhibitorisch in die Kompartimentierung im Rahmen der Zellteilung eingreifen, obwohl Peptidoglykan bei Chlamydien bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Diese unterschiedlichen Wirkungsweisen von DAM und IFN- $\gamma$  auf der einen Seite und Penicillin G auf der anderen Seite könnten sich somit in dem hier beobachteten Expressionsprofil niederschlagen.

Die größere Ähnlichkeit des chlamydialen Expressionsmusters zwischen DAM- und IFN- $\gamma$ -Modell deckt sich schließlich auch mit den morphologischen Beobachtungen der persistenten Formen. Auch hier ähneln sich die morphologischen Strukturen DAM- und IFN- $\gamma$ -behandelter Chlamydien weitestgehend im Vergleich zu Penicillin-G-behandelten Chlamydien (Abb. 6, 7 und 8). Die im DAM- und IFN- $\gamma$ -Modell auftretenden aberranten RBs sind ca. 2-3-mal kleiner als die des Penicillin-G-Persistenzmodells und von weniger „aufgeblähter“ Struktur.

Dass diese drei verschiedenen Persistenzinduktoren auch unterschiedliche Effekte auf die Expression von Wirtszellgenen haben bzw. größere Ähnlichkeiten hinsichtlich der Expressionsmuster zwischen zwei Modellen bestehen, wurde in einer Studie von Peters und Kollegen gezeigt (2003). In „Langzeit-Persistenzkulturen“, die bis zu 7 Tage p.i. aufrechterhalten wurden, zeigten sich ab Tag 4 zwei verschiedene Typen der Wirtszellantwort. Einer vorwiegenden Herunterregulierung der untersuchten Gene wie z. B. *CTGF*, *Egr1*, *ETV-4* oder *IL-8* im Penicillin-G- und IFN- $\gamma$ -Modell stand eine Aktivierung im DAM-Modell gegenüber (Peters *et al.*, 2003).

#### **4.1.2.3 Modell-spezifische Expressionsmuster**

Neben den festgestellten Gemeinsamkeiten im Expressionsmuster, die entweder zwischen allen drei Modellen oder aber auch zwischen DAM- und IFN- $\gamma$ -Modell bestanden, zeigten ca. 60 % der untersuchten Gene ein unterschiedliches Expressionsverhalten sowohl in den verschiedenen Modellen als auch zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb eines Modells.

Die Änderungen der mRNA-Expression dieser Gene ist vermutlich eine spezifische Reaktion auf den jeweiligen Persistenzstimulus und stellt eine Antwort auf die dadurch hervorgerufenen Umgebungsveränderungen der Chlamydien dar. Es ist also davon auszugehen, dass das Expressionsverhalten dieser Gene nicht charakteristisch für die *Cp.-psittaci*-Persistenz im Allgemeinen ist.

#### **4.1.2.4 Vergleich des Expressionsverhaltens ausgewählter *Cp.-psittaci*-Gene mit der Expression von *C.-trachomatis*- und *Cp.-pneumoniae*-Homologen während der Persistenz**

Neben dem verwendeten Persistenzinduktor, der Zelllinie und dem Untersuchungszeitraum stellt die Chlamydienart selbst und z. T. auch deren Serovariante eine Variable in der Untersuchung der chlamydialen Persistenz dar. Die zunehmende Verfügbarkeit chlamydialer Genom-Sequenzen erlaubt die Untersuchung der molekularen Mechanismen wie z. B. Gen- oder Protein-Expressionsänderungen, die mit der Persistenzentwicklung einhergehen und ermöglicht es dadurch, die Reaktion der verschiedenen Chlamydienarten auf die experimentelle Induktion von Persistenz zu vergleichen. Somit lassen sich die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit Daten zur Persistenz von *Cp. pneumoniae* und *C. trachomatis* vergleichen und erlauben eine noch präzisere Aussage über persistenzspezifische Genexpressionsmuster.

Zwei der am häufigsten untersuchten Gene bzw. Proteine innerhalb von Persistenzstudien sind das *groEL* (HSP60) sowie das *ompA* (MOMP). Im Falle des *ompA* zeigen sich je nach verwendeter Spezies Unterschiede im Expressionsverhalten. Während für *C. trachomatis* in einem Glucose-Mangel-, Monozyten- sowie IFN- $\gamma$ -Persistenzmodell eine Herunterregulierung beschrieben wird (Ilfte-Lee and McClarty, 2000; Gérard *et al.*, 2001; Belland *et al.*, 2003), zeigt sich bei *Cp. pneumoniae* hingegen ein Trend zur Hochregulation des *ompA* (Hogan *et al.*, 2003; Slepkin *et al.*, 2001). Die Expression des *Cp.-psittaci*-DC15- *ompA* ähnelt hierbei eher den *C. trachomatis*-Daten. Zwar sind für DAM- und Penicillin-G-Modell im Wesentlichen keine Expressionsänderungen zu verzeichnen, im IFN- $\gamma$ -Modell jedoch zeigte sich eine leichte Herunterregulierung von *ompA* zu den Zeitpunkten 36 h und 48 h p.i. (Abb. 11). Die unterschiedliche Expression des *ompA* in den verschiedenen Spezies könnte mit einer unterschiedlichen funktionellen Rolle des MOMP in den einzelnen Spezies assoziiert sein. In *Cp. pneumoniae* scheint das MOMP im Gegensatz zu *C. trachomatis* weniger von struktureller Bedeutung zu sein, sondern vielmehr eine größere Rolle als Porin zu spielen (Hogan *et al.*, 2004). Desweiteren stellt das *Cp.-pneumoniae*-MOMP im Gegensatz zu den *C.-trachomatis* und *Cp.-psittaci*-Homologen nicht das immundominante Antigen dar, welches während der Infektion erkannt wird (Campbell *et al.*, 1990). Diese unterschiedlichen Rollen des MOMP in den verschiedenen Spezies könnten sich also im Expressionsverhalten während des Persistenzstadiums widerspiegeln. Die Herunterregulierung des immundominanten *ompA*/MOMP im Falle der meisten *C.-trachomatis*-Studien und auch im IFN- $\gamma$ -Modell der *Cp.-psittaci*-DC15-Persistenz könnte möglicherweise die Entwicklung einer protektiven Immunität im Zuge der Persistenz verhindern (Beatty *et al.*, 1993). Im Zusammenhang mit dieser *ompA*/MOMP-Herunterregulierung wird ein gleichbleibender bzw. erhöhter Level des *groEL-1*/HSP60 während der Persistenz diskutiert, was die Schädigungen des Wirtsgewebes durch eine anhaltende Immunreaktion bzw. durch Kreuzreaktionen mit dem humanen HSP60 oder dem HSP60 anderer Pathogene fördern würde. Tatsächlich ist in den meisten *C.-trachomatis*- und *Cp.-pneumoniae*-Persistenzstudien das *groEL-1* vorwiegend unverändert bzw. hochreguliert (Nicholson and Stephens, 2002; Mathews *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003; Slepkin *et al.*, 2003). Für das *Cp.-psittaci-groEL-1* zeigen sich mit Ausnahme des IFN- $\gamma$ -Modells ebenfalls keine Veränderungen im Expressionsverhalten bzw. im Penicillin-G-Modell ist eine leichte Hochregulation festzustellen (Abb. 12), was sich also z. T. mit den Daten der *C.-trachomatis*- und *Cp.- pneumoniae*-Studien deckt.

Die Herunterregulierung sogenannter „später“ Gene, z. B. *omcA*, *omcB* oder *hctA*, wie in den drei *Cp.-psittaci*-Persistenzmodellen gezeigt, ist ein häufiges Merkmal der Persistenz in Chlamydienspezies und reflektiert vermutlich die geblockte RB-EB-Umwandlung. So ist das *omcB* in *C. trachomatis*-Stämmen, welche mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Cevenini *et al.*, 1988; Slepkin *et al.*, 2003), IFN- $\gamma$  (Beatty *et al.*, 1993; Beatty *et al.*, 1995) oder Hitzeschock (Kahane und Friedman, 1992) behandelt wurden entweder merklich herunterreguliert oder seine Expression ist sogar nicht mehr nachweisbar. Jedoch existieren auch Studien für *Cp. pneumoniae*, in denen eine solche Herunterregulierung des *omcB* nicht festgestellt werden konnte (Hogan *et al.*, 2003; Mathews *et al.*, 2001; Slepkin *et al.*, 2003). Dies könnte eventuell wieder mit unterschiedlichen Rollen zusammenhängen, die das *omcB*/CRP in den verschiedenen Spezies spielt wie es auch für das *ompA*/MOMP diskutiert wird. Für zwei weitere späte Gene, das *hctA* und *hctB*, die für Histon-ähnliche DNA-Bindeproteine codieren, scheint eine Herunterregulierung charakteristischer in den bisher untersuchten Spezies zu sein (Nicholson and Stephens, 2002; Jones *et al.*, 2003; Belland *et al.*, 2003b). Für die *Cp.-psittaci*-Persistenzmodelle zeigt sich ein ebensolcher Trend zur Herunterregulierung des *hctA* ab 24 h p.i., der zwar nicht konstant aufrechterhalten bleibt, aber speziell 48 h p.i wieder festzustellen ist. Besonders im IFN- $\gamma$ -Modell zeigt sich hierbei eine Herunterregulierung um mehr als den Faktor 100 und deckt sich somit mit den Ergebnissen anderer Studien.

Die morphologischen Beobachtungen, dass aberrante chlamydiale RBs nicht mehr zur Zellteilung in der Lage sind, decken sich mit den Ergebnissen aus Expressionsstudien bezüglich zweier Zellteilungsprotein-codierender Gene, dem *ftsW* und dem *ftsK*. *C.-trachomatis*- und *Cp.-pneumoniae*-Studien unter Verwendung von IFN- $\gamma$  als Persistenzinduktor zeigen eine Herunterregulierung des *ftsW* und *ftsK* (Gérard *et al.*, 2001; Byrne *et al.*, 2001) bzw. des *ftsW* alleine (Belland *et al.*, 2003b). Auch in Proben des Synovialgewebes von Patienten mit *C.-trachomatis*-assoziiierter RA konnte keine *ftsW*- und *ftsK*-Expression mehr detektiert werden. Die Daten dieser Studien zeigen wieder eine Übereinstimmung mit den Daten aus den drei *Cp.-psittaci*-Persistenzmodellen dieser Arbeit, in denen das *ftsW* ab 24 h p.i. herunterreguliert ist (Abb. 13). Diese übereinstimmenden Ergebnisse aus verschiedenen *in-vitro*-Persistenzmodellen, einem *in-vivo*-Modell und unter Verwendung verschiedener Spezies lassen vermuten, dass die Herunterregulierung von *ftsW* und/oder *ftsK* charakteristisch für die chlamydiale Persistenz im Allgemeinen ist.

Zwei Gene, deren Expression bisher erst in sehr wenigen Persistenzstudien untersucht wurde, deren vermutete Rolle bei der RB-EB-Differenzierung aber von großer Bedeutung für den chlamydialen Entwicklungszyklus und ebenso die Persistenzentstehung sein könnte, sind das *ctcB* und das *ctcC*, die für das chlamydiale Zwei-Komponenten-System codieren. In einer Studie zur Regulation von Signaltransduktions-assoziierten Genen während der *Cp.-pneumoniae*-Persistenz wird die Herunterregulierung von *ctcB* und *ctcC* nach IFN- $\gamma$ -Behandlung beschrieben (Polkinghorne *et al.*, 2006), was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. Jedoch zeigte sich in der Microarray-Studie von Belland und Kollegen (2003b) keine differentielle Regulierung von *ctcB* und *ctcC* im *C.-trachomatis*-IFN- $\gamma$ -Modell. Zwar sind noch nicht genügend Daten bezüglich der Expression von *ctcB* und *ctcC* während der Persistenz vorhanden, jedoch deuten die obigen drei Studien eventuell auf ein Spezies-spezifisches Expressionsverhalten hin. Einen weiteren Punkt könnte die Sensitivität der verschiedenen Detektionsmethoden darstellen. Im Vergleich zur Real-time-PCR ist die Microarray-Technik weniger sensitiv und weniger starke Expressionsänderungen könnten somit nicht erfasst werden.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass bezüglich der Untersuchung der Genexpressionsänderungen während der chlamydialen Persistenz eine Reihe von Variablen bestehen, die einen Einfluss auf die jeweiligen Ergebnisse haben wie z. B. Persistenzmodell, Wirtszelllinie, Untersuchungszeitraum, Chlamydienspezies oder auch verwendete MOI. Jede dieser Variablen kann ein spezifisches Expressionsmuster hervorrufen, was dann die Vergleichbarkeit mit anderen Modellen erschwert. Wie der Vergleich des Expressionsverhaltens ausgewählter Gene zwischen den drei Spezies *C. trachomatis*, *Cp. pneumoniae* und *Cp. psittaci* in diesem Abschnitt zeigt, existieren Spezies-spezifische Charakteristika. Daher ist es schwierig, ein Expressionsmuster auszumachen, welches eine chlamydiale Persistenz im Allgemeinen charakterisiert und es ist vermutlich sinnvoller, von Spezies-spezifischen Persistenzmerkmalen zu sprechen. Die Expression einiger weniger Gene, wie z. B. *ftsW* bzw. *ftsK*, *hctA* und *hctB*, könnten jedoch charakteristisch für die Persistenz der *Chlamydiaceae* allgemein sein, dazu müssten allerdings noch weitere Chlamydien-Spezies untersucht werden.

## 4.2 Der Einfluss der persistenten *Cp.-psittaci*-Infektion auf die Wirtszellapoptose

Unter Apoptose versteht man ein konserviertes, strikt reguliertes, genetisches und biochemisches Programm des Zelltodes, welches eine entscheidende Rolle während der Entwicklung und Gewebemöostase multizellulärer Organismen spielt. Im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod erfolgt während der Apoptose die Entfernung geschädigter oder nicht mehr benötigter Zellen ohne dabei eine Entzündungsreaktion auszulösen, indem apoptotische Zellen bzw. apoptotische Körperchen durch Phagozyten aufgenommen werden.

Neben ihrer Funktion in der Ontogenese zur Ausbildung von Gewebs- und Organstrukturen oder später in der Kontrolle der Zellzahl und Eliminierung maligner oder nichtfunktioneller Zellen, spielt die Apoptose auch eine wichtige Rolle in der Eliminierung von Infektionserregern. Eine Reihe von Erregern ist allerdings in der Lage, die Apoptose der Wirtszelle zu modulieren und somit ihre Vermehrung und ihr Überleben im Organismus zu sichern. Bakterielle Pathogene lösen dabei vorwiegend eine proapoptotische Zellantwort aus. *Helicobacter pylori* (Cho *et al.*, 2003), *Staphylococcus aureus* (Hofer *et al.*, 1996) oder *Listeria monocytogenes* (Carrero *et al.*, 2004) produzieren beispielsweise Toxine, welche die Wirtszellmembranen angreifen und Apoptose stimulieren. *Shigella* (Cherla *et al.*, 2003) und *Salmonella* (Hersh *et al.*, 1999) sekretieren Effektorproteine über ein Typ III-Sekretionssystem direkt ins Wirtszellzytoplasma, wo diese Caspase-1 binden und aktivieren. Eine Inhibition der Wirtszellapoptose durch bakterielle Pathogene ist dagegen eher selten. Das obligat intrazelluläre Bakterium *Rickettsia rickettsii* ist beispielsweise in der Lage, Apoptose über NF- $\kappa$ B-vermittelte Prozesse zu inhibieren (Clifton *et al.*, 2005).

Für Chlamydien hingegen ist sowohl die Fähigkeit beschrieben, Apoptose zu stimulieren (Ojcius *et al.*, 1998; Perfettini *et al.*, 2002a; Ying *et al.*, 2006) als auch zu inhibieren (Fan *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 2001). Die Umstände, unter denen Chlamydien Apoptose induzieren oder inhibieren, scheinen dabei einen entwicklungsspezifischen Hintergrund zu haben und davon abzuhängen, in welchem Stadium des Entwicklungszyklus sich die Chlamydien befinden bzw. ob sie einen produktiven Infektionszyklus oder ein Persistenzstadium durchlaufen.



#### **4.2.1 Die akute und persistente *Cp.-psittaci*-Infektion stimuliert keine Wirtszellapoptose und ist in der Lage, die induzierte Apoptose zu hemmen**

Die Untersuchungen bezüglich des Einflusses von *Cp. psittaci* auf die Wirtszellapoptose im Rahmen dieser Arbeit ergaben zunächst, dass die akute *Cp.-psittaci*-Infektion keine Wirtszellapoptose induziert, weder in der HEP-2-Zelllinie noch in den synovialen Fibroblasten, was durch drei verschiedene Apoptose-Detektionsmethoden gezeigt wurde (Abb. 21-23 und 25). Dieses Ergebnis war z. T. erstaunlich, da frühere Studien bezüglich des *Cp.-psittaci*-Einflusses auf die Wirtszellapoptose im Wesentlichen über proapoptotische Eigenschaften berichten (Gibellini *et al.*, 1998; Ojcius *et al.*, 1998; Perfettini *et al.*, 2002). Eine Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Verwendung des damaligen „guinea pig inclusion conjunctivitis (GPIC)“ Serovars in den Arbeiten von Ojcius und Kollegen sowie Perfettini und Kollegen sein, der heute die eigene Spezies *Cp. caviae* darstellt. Desweiteren bestehen generell kontroverse Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Chlamydieninfektion auf die Wirtszellapoptose. Allein für *Cp. caviae* existieren drei Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen, die von 10-15 % Zelltod (Greene *et al.*, 2004) über 50-60 % Zelltod (Ojcius *et al.*, 1998) bis hin zu 80 % Zelltod (Perfettini *et al.*, 2002) der infizierten Zellen reichen. Unterschiedliche Apoptose-Detektions-Methoden können dabei die Ergebnisse beeinflusst haben. Die direkte morphologische Beurteilung der Wirtszellen durch Hoechst- oder TUNEL-Färbung wird dabei z. B. als eine der Methoden betrachtet, die eine klare Aussage zum Apoptoseverhalten ermöglicht und auch die Unterscheidung zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen in Kombination mit einer Chlamydien-spezifischen Färbung erlaubt. Daher ist es wichtig, die Apoptosebestimmung mit mehreren Tests durchzuführen, um eine akkurate Beurteilung des Apoptoseverhaltens der Wirtszelle zu gewährleisten und Apoptose von Nekrose zu unterscheiden.

Eine Studie von Greene und Mitarbeitern (2004) jedoch bestätigt die in dieser Arbeit für die akute *Cp.-psittaci*-Infektion erhaltenen Ergebnisse und zeigt ebenfalls keine signifikant gesteigerte Apoptoserate in Wirtszellen, die mit dem Referenzstamm *Cp. psittaci* 6BC infiziert waren.

Die Untersuchungen zum Einfluss persistenter Chlamydien auf die Wirtszellapoptose ergaben ebenfalls keine proapoptotischen Eigenschaften der Chlamydien in allen drei Persistenzmodellen (Abb. 21-23 und 25). Dies stellt hingegen ein erwartetes Ergebnis dar, da für das Überdauern der persistenten Chlamydien in den Wirtszellen eine Apoptosestimulation kontraproduktiv wäre.

Um zu verhindern, dass die Ergebnisse aus der akuten und persistenten Infektion durch einen möglichen Einfluss der Persistenzinduktoren auf die Wirtszellapoptose verfälscht werden, wurde der Effekt der Persistenzinduktoren alleine untersucht. DAM- und IFN- $\gamma$ -Modell erzeugen einen Nährstoffmangel, der auch die Nährstoffversorgung der Wirtszelle betrifft, und somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass allein die Behandlung mit den Persistenzinduktoren eine Apoptose der Wirtszellen auslöst, zumal für IFN- $\gamma$  eine proapoptische Wirkung beschrieben ist (Selleri *et al.*, 1995; Trubiani *et al.*, 1994). Im DNA-Fragmentations-Assay sowie im TUNEL-Assay zeigte sich kein Einfluss der DAM- und Penicillin-G-Behandlung auf die Wirtszelle (Abb. 24). Für die IFN- $\gamma$ -Behandlung hingegen war mit beiden Detektionsmethoden eine leichte Induktion der Wirtszellapoptose festzustellen, die, wie sich im TUNEL-Assay zeigte, jedoch durch die Chlamydieninfektion teilweise wieder aufgehoben werden konnte (Abb. 25). So konnte im IFN- $\gamma$ -Persistenzmodell ein Rückgang der Apoptoserate um ca. 9 % im Vergleich zu IFN- $\gamma$ -behandelten uninfizierten Zellen festgestellt werden, allerdings nur in der HEp-2-Zelllinie und nicht in der primären Zelllinie. Für die Fibroblasten hingegen zeigte sich (wie auch für die HEp-2-Zelllinie) im DNA-Fragmentations-Assay, dass die Chlamydieninfektion im IFN- $\gamma$ -Persistenzmodell die apoptotischen Effekte des IFN- $\gamma$  aufhebt (Abb. 21). Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass sich die primäre Zelllinie sensitiver gegenüber Apoptosestimuli verhielt. Die Prozentzahlen apoptotischer Zellen sind im TUNEL-Assay der akuten Infektion und der Persistenzmodelle im Vergleich zur immortalen HEp2-Zelllinie erhöht, jedoch nicht signifikant im Vergleich zu uninfizierten, unbehandelten Fibroblasten.

Um zu testen, ob Chlamydien-infizierte Zellen auch resistent gegenüber induzierter Apoptose sind, wurden die akut und persistent infizierten Wirtszellen für 4 h mit 1  $\mu$ M des Proteinkinase-Inhibitors Staurosporin behandelt. Sowohl in akut als auch in persistent infizierten Zellen wurde trotz Apoptosestimulus keine signifikante Wirtszellapoptose induziert (Abb. 26 und 27). Dieses Ergebnis deckt sich mit Daten für produktive *C. trachomatis*- und *Cp. pneumoniae*-Infektionen (Xiao *et al.*, 2004; Rajalingam *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2001) und auch für *Cp. psittaci*, *Cp. caviae* und *C. muridarum* konnte bereits die Fähigkeit zur Inhibition der Staurosporin-induzierten Apoptose gezeigt werden (Zhong *et al.*, 2006). Für persistente Infektionen wurde ebenso für das IFN- $\gamma$ -Modell einer *C. trachomatis*-Infektion die Fähigkeit zur Inhibierung induzierter Apoptose festgestellt (Dean and Powers, 2001). Zusätzlich konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass *C. trachomatis*-infizierte Makrophagen, welche ein natürliches Persistenzmodell

darstellen, die Apoptose uninfizierter T-Zellen stimulieren (Jendro *et al.*, 2000). Dies legt die Vermutung nahe, dass Chlamydien auch durch eine Reduktion der T-Zell-Überwachung und somit der Hemmung der dadurch ausgelösten Wirtszell-Apoptose persistieren können. Die Fähigkeit, induzierte Apoptose zu hemmen, könnte somit also ein generelles Charakteristikum persistenter Chlamydien darstellen, um ihr dauerhaftes Überleben in der Wirtszelle zu sichern.

#### **4.2.2 Die Chlamydieninfektion führt zu einer verminderten Proliferation der Wirtszelle**

Da für die akute und persistente *Cp.-psittaci*-Infektion keine Tendenz zur Apoptosestimulierung gefunden wurde, dies einen Apoptose-unabhängigen Zelltod wie z. B. Nekrose als Reaktion auf die Infektion jedoch nicht ausschließt, wurde die Proliferationsfähigkeit der Wirtszellen als Maß ihrer Vitalität untersucht. Der dabei angewendete MTT-Assay weist über die Umwandlung eines Tetrazoliumsals in einen Formazanfarbstoff die Aktivität mitochondrialer Reduktasen nach, was direkt die Anzahl lebender Zellen reflektieren soll (Mosman, 1983).

Wie auch bei den Apoptose-Assays wurde zunächst der Einfluss der Persistenzinduktoren auf die Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich für beide Zelllinien ein Rückgang der Zellproliferationsrate für die Behandlung mit DAM und IFN- $\gamma$ , die im Falle der Fibroblasten wesentlich deutlicher ausfiel als für die HEp2-Zelllinie und nur noch ca. 60 % der Proliferationsfähigkeit unbehandelter Zellen betrug (Abb. 28). Eisenchelatoren wie das DAM können die Zellproliferationsrate durch eine reversible Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase, eines Enzym, welches in die DNA-Synthese involviert ist, inhibieren. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Gabe von Deferoxamin die S-Phase lymphoider und leukämischer Zellen durch die Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase reversibel inhibiert (Oblender und Carpentieri, 1991). Auch für das IFN- $\gamma$  konnten schon antiproliferative Effekte gezeigt werden, welche auf einer Modulation der Cdk2/Cyclin E-Aktivierung sowie Hemmung von E2F-1 beruhen, was einen Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus inhibiert (Amrani *et al.*, 2003). Für das Penicillin-G-Modell zeigte sich überraschenderweise sogar eine Steigerung der Proliferationsrate in der HEp2-Zelllinie, die Proliferationsrate der Fibroblasten ist hingegen gegenüber unbehandelten Zellen unverändert. Da der menschliche Organismus weder D-Aminosäuren noch Acetylmuraminsäure aufweist, deren Vernetzung mittels PBPs den Angriffspunkt des

Penicillin G darstellt und somit keine Toxizität für die Zelllinien durch Penicillin-G-Gabe besteht, war zu erwarten, dass die Proliferationsrate der Zellen nicht sinkt.

Nach Infektion mit *Cp. psittaci* zeigte sich sowohl in der akuten als auch in der persistenten Infektion ein signifikanter Einfluss der Chlamydien auf die Proliferationsrate der Wirtszellen (Abb. 29). In der akut infizierten HEP2-Zelllinie war ein Rückgang der Proliferationsrate um 14 % im Vergleich zu uninfizierten Zellen zu verzeichnen. In den Persistenzmodellen, nach Ausschluss des Persistenzinduktor-Effektes, zeigte sich ein Rückgang der Proliferationsrate zwischen 33 und 43 %, der den Chlamydien zuzuordnen war. Für die Fibroblasten hingegen war der Einfluss der akuten Infektion auf die Zellproliferation am stärksten und betrug 32 %, wohingegen es in den Persistenzmodellen zu einem Rückgang zwischen 15 und 22 % kam. Sowohl die produktiven als auch die persistenten Chlamydien führen also zu verringerten Zell-Proliferationsraten, was als Maß für einen Zelltod angesehen wird (Mosman, 1983). Da mittels des MTT-Tests jedoch die Aktivität der mitochondrialen Reduktasen gemessen wird, deren verringerte Aktivität nicht zwangsläufig zum Zelltod führen muss sondern beispielsweise auch nur zum Proliferationsstopp, kann somit nicht eindeutig gesagt werden, dass *Cp. psittaci* nekrotischen Zelltod auslöst, jedoch führt die Infektion zweifellos zu einem Rückgang der Aktivität mitochondrialer Reduktasen. Im Rahmen der Atmungskette werden die energiereichen Zwischenprodukte aus dem Zitronensäurezyklus, NADH und FADH<sub>2</sub> durch O<sub>2</sub> reoxidiert, d. h. Elektronen werden von NADH oder FADH<sub>2</sub> auf den Sauerstoff übertragen, der dadurch und durch die Aufnahme von 2 Protonen zu H<sub>2</sub>O reduziert wird. Die dabei frei werdende Energie treibt die Bildung energiereicher ATPs aus ADP und P<sub>i</sub> an. Durch eine teilweise Hemmung der Enzymaktivität der mitochondrialen Reduktasen würde die Zelle also mit weniger ATP aus der Atmungskette versorgt, was zu dem beobachteten Proliferationsstopp führen könnte. Chlamydien sind z. T. auf eine ATP-Versorgung durch ihre Wirtszelle angewiesen und verfügen über ADP/ATP Translokasen, somit könnten geringere ATP-Level der Wirtszelle ebenso einen Einfluss auf ihr Wachstum haben. Das Wirtszell-ATP stellt eine Energiequelle für den chlamydialen Metabolismus dar, in dessen Verlauf dann während der Glykolyse ebenfalls ATP gebildet werden kann. In der ersten Phase der akuten Infektion sind die Chlamydien also auf eine ATP-Versorgung durch die Wirtszelle angewiesen, können aber später auf selbstsynthetisiertes ATP zurückgreifen (Gérard *et al.*, 2002). Da der MTT-Test gegen Ende des akuten Entwicklungszyklus durchgeführt wurde, sollten die produktiven Chlamydien von der verringerten ATP-Produktion der Wirtszelle nicht unbedingt betroffen

sein. Für persistente Chlamydien konnte gezeigt werden, dass ihre metabolische Aktivität geringer ist als in produktiven, sich teilenden Chlamydien (Gérard *et al.*, 2002). Sie beziehen ihr ATP somit hauptsächlich von der Wirtszelle, jedoch sollten die persistenten Chlamydien aufgrund ihrer geringeren metabolischen Aktivität auch nicht gravierend von geringeren ATP-Leveln der Wirtszelle betroffen sein. Ein Rückgang der Proliferationsfähigkeit der Zelle muss also nicht zwangsläufig von letaler Konsequenz für die Zelle und die intrazellulären Chlamydien sein. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass der festgestellte Rückgang der Zell-Proliferationsrate einen nekrotischen Zelltod infolge der Chlamydieninfektion als Ursache hat.

#### **4.2.3 *Cp.-psittaci*-infizierte Zellen zeigen eine Hochregulation des Inhibitor of Apoptosis 2 (cIAP2)**

Pathogene, welche die Apoptose ihrer Wirtszellen inhibieren können, um somit ihr Überleben und ihre Vermehrung zu sichern, codieren entweder für Proteine mit antiapoptotischer Funktion oder aber sind in der Lage, sich der antiapoptotischen Maschinerie der Wirtszelle zu bedienen.

Bekanntere Beispiele für virale antiapoptotische Proteine sind z. B. das CrmA des Cowpox-Virus, welches Caspase-1 und Caspase-8 inhibiert (Zhou *et al.*, 1997), die E6- und E7-Proteine von Papillomaviren (Yuan *et al.*, 2005) oder aber das Myxomavirus-codierte SERP2 (Petit *et al.*, 1996) bzw. p35 und IAPs aus Baculovirus (Zhou *et al.*, 1998; Hawkins *et al.*, 1996), welche ebenfalls als Caspase-Inhibitoren fungieren.

Das humane Genom selbst codiert ebenfalls für eine Reihe von Proteinen mit antiapoptotischer Funktion wie z. B. den antiapoptotischen Mitgliedern der BCL-2-Familie (BCL-X<sub>L</sub>, BCL-w, BCL-2 u. a.) oder aber den Mitgliedern der IAP (Inhibitor of Apoptosis)-Familie (XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, MLIAP, NAIP, Survivin und BRUCE), welche Homologe der Baculovirus-IAPs darstellen. Mitglieder der humanen IAP-Familie können Caspase-3, -7 und/oder -9 binden und somit Apoptose inhibieren. BCL-2 und BCL-X<sub>L</sub> binden den C-terminalen Part von Apaf-1 und verhindern somit dessen Interaktion mit Caspase-9.

Das chlamydiale Genom codiert für zwei Proteine, welche einen Einfluss auf die Wirtszellapoptose haben können. Für das CADD (Chlamydia protein associating with death domains) konnte gezeigt werden, dass es nach Transfektion in Säugerzelllinien mit den Todesdomänen von Rezeptoren der TNF-Familie, wie TNFR1, Fas, DR4 und DR5 interagiert und dadurch Apoptose induziert (Stenner-Liewen *et al.*, 2002). In infizierten

Epithelzellen kolokalisiert das CADD mit Fas in der Nähe des Einschlusskörpers, jedoch konnten in diesem System keine Anzeichen für Apoptose gefunden werden. Somit steht nicht eindeutig fest, welche Rolle CADD in der Apoptosemodulation *in vivo* spielt. Beim chlamydialen CPAF (chlamydial protease/proteasome-like activity factor) handelt es sich um ein sekretiertes Protein mit proteolytischer Aktivität, welches die humanen Transkriptionsfaktoren RFX5 und USF-1 degradiert und somit die Expression von MHC-Molekülen herabsetzt (Zhong *et al.*, 2001). Außerdem ist eine Funktion des CPAF bei der Degradierung proapoptotischer BH3-only-Proteine wie z. B. Puma beschrieben, was eine Inhibition der Wirtszell-Apoptose zur Folge hat (Pirbhai *et al.*, 2006).

Für die Transkriptmenge von CADD und CPAF während der Persistenz sind keine auffälligen Änderungen in dieser Arbeit festgestellt worden. Speziell zwischen der Beobachtung, dass die persistente Infektion keine Wirtszellapoptose hervorruft und den Expressionsdaten des antiapoptotischen *cpaf* lässt sich kein Zusammenhang herstellen. Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten einer anderen Arbeit, in der die *cpaf*-Expression während der Persistenz untersucht wurde und ebenfalls keine Expressionsänderungen festgestellt werden konnten (Heuer *et al.*, 2003). Deshalb wurde die Expression zehn ausgewählter humaner Gene, das *bcl-2* und *mcl-1* sowie die Mitglieder der IAP-Familie, welche für antiapoptotische Proteine codieren untersucht, um eine mögliche Erklärung für das Apoptoseverhalten der Wirtszelle während der persistenten und auch akuten Infektion zu finden. Die Expression von *bcl-2* und *mcl-1*, welches für ein BCL-2-ähnliches Protein codiert, ist in der akuten Infektion sowie in den drei Persistenzmodellen leicht hochreguliert. Speziell in den Fibroblasten zeigt sich eine Zunahme der *mcl-1*-Transkriptmenge um das 5-10-fache je nach Infektionsmodell. Für die acht Gene der Inhibitor-of-Apoptosis-Familie zeigen sich verschiedene Expressionsmuster für die unterschiedlichen Infektionsmodelle und auch Zelllinien. So ist z. B. das *livin* im DAM-Modell sowohl in Fibroblasten als auch in der HEp2-Zelllinie merklich hochreguliert, in den anderen Modellen jedoch kaum bzw. nicht differentiell reguliert (Abb. 30). Übereinstimmende Ergebnisse bezüglich der Expression zeigten sich jedoch für die zwei Gene *ciap1* und *ciap2*, welche für das Inhibitor-of-Apoptosis-Protein 1 bzw. 2 codieren.

Diese beiden Gene sind unabhängig von Infektionsmodell und Zelllinie im Vergleich zu uninfizierten Kontroll-Zellen hochreguliert, wobei die Transkriptzunahme für das *ciap2* deutlich stärker ausfällt (Abb. 30). Aufgrund dieser Tendenz wurde die Expression des *ciap2* in der Wirtszelle genauer während unterschiedlicher Zeitpunkte von 24 h bis 96 h p.i. untersucht. Dabei zeigten sich für die HEp2-Zelllinie und die Fibroblasten trotz

konstanter Hochregulierung während des Untersuchungszeitraumes zwei gegensätzliche Tendenzen. Während in der HEp2-Zelllinie nach einer anfänglich stärkeren Expression ab 72 h p.i. die Transkriptmenge wieder auf das 2,5- bis 5-fache der uninfizierten Zellen sank (Abb. 31), war in den Fibroblasten das Gegenteil der Fall. Zu den anfänglichen Untersuchungszeitpunkten 24 h und 48 h p.i. betrug die Expression zunächst das ca. 15-20-fache der uninfizierten Zellen, nahm aber anschließend ab 72 h p.i. merklich auf das 40- bis 120-fache zu (Abb. 30). Dies betraf in HEp2 und Fibroblasten sowohl die akute als auch persistente Infektion. Während also das *ciap2* in der HEp2-Zelllinie nach einer Phase der verstärkten Expression zu späteren Zeitpunkten der Persistenz auf einem basalen Level hochreguliert blieb, war in der späteren Phase der Persistenz in den Fibroblasten eine Verstärkung der *ciap-2*-Expression zu verzeichnen. Die Ergebnisse der primären Zelllinie sollten die *in-vivo*-Situation besser widerspiegeln als die der Krebszelllinie. Nach Ausbildung der Persistenz *in vivo* und einer anfänglichen Phase der *ciap-2*-Hochregulierung könnte somit im späteren Verlauf der Persistenz eine mögliche Wirtszellapoptose als Reaktion auf den Erreger durch eine deutlich gesteigerte *ciap2*-Transkriptmenge verhindert werden. Erstaunlich sind die Ergebnisse der akuten Infektion. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes von 24 h bis 96 h p.i. zeigten sich identische *ciap-2*-Expressionsmuster wie in den Persistenzmodellen und z. T. war sogar eine stärkere Hochregulierung des *ciap2* zu verzeichnen. Dies zeigt, dass die akute *Cp.-psittaci*-DC15- Infektion auch in den weiteren Runden des Entwicklungszyklus ihre Fähigkeit zur *ciap-2*-Hochregulierung und einer damit eventuell verbundenen antiapoptotischen Fähigkeit beibehält. Die verstärkte *ciap-2*-Expression infolge der akuten und persistenten Chlamydieninfektion ließ sich auf auf translationaler Ebene bestätigen. Im Vergleich zu uninfizierten Zellen war die Menge an gebildetem cIAP-2-Protein in infizierten Zellen erhöht. (Abb. 32).

Für die akute *Cp.-pneumoniae*-Infektion konnte bereits gezeigt werden, dass in den ersten 7 h der Infektion die *ciap2*/cIAP2-Expression der Wirtszelle zunimmt und diese Expression NF- $\kappa$ B-vermittelt ist (Wahl *et al.*, 2003). Eine verstärkte Expression von *ciap2*/cIAP2 in einem *Cp.-pneumoniae*-DAM-Persistenzmodell, welche NF- $\kappa$ B-vermittelt war, bestätigte sich auch in einer aktuellen Studie von Paland und Kollegen (2006). Eine differentielle Expression von XIAP wurde wie auch in dieser Arbeit hingegen nicht festgestellt. Die Hochregulation von *ciap2*/cIAP2 ohne einhergehende signifikante Hochregulierung von cIAP1 und XIAP konnte auch in einem akuten *C.-trachomatis*-Infektionsmodell gezeigt werden (Rajalingam *et al.*, 2006). Interessanterweise waren

cIAP1 und XIAP aber notwendig für die Apoptoseinhibition in infizierten Zellen, da sie zusammen mit cIAP2 in einem Komplex agierten, in welchem jeder der Partner die Stabilität der anderen IAPs sicherte (Rajalingam *et al.*, 2006).

Das cIAP2 zeigt *in vivo* die höchste Expression in Leber und Thymus und inhibiert speziell die Caspasen-3 und -7 (Liston *et al.*, 2003). Die Funktion der IAPs geht aber über die reine Caspase-Inhibierung hinaus. So spielen IAPs eine Rolle in Signaltransduktionswegen und für cIAP1 und cIAP2 konnte eine Beteiligung an der Ausbildung von TNFR1- und TNFR2-Komplexen gezeigt werden, welche in der Inhibierung von Caspasen und der Aktivierung von NF- $\kappa$ B involviert sind (Lee und Collins, 2001). Diese NF- $\kappa$ B-Aktivierung kann ihrerseits wieder verschiedene antiapoptotische Gene, u. a. auch das *ciap1*, *ciap2* und *xiap* aktivieren, was einer positiven Rückkopplung entspricht (Lee und Collins, 2001). Die antiapoptotische Aktivität, welche durch die persistenten und auch produktiven *Cp. psittaci* hervorgerufen wird, könnte somit unabhängig vom Persistenzstimulus auf denselben komplexen Mechanismen basieren, welche auf einer Hochregulation von cIAP2 und der eventuellen Interaktion mit andern Mitgliedern der IAP-Familie beruhen. Diese Fähigkeit, die Wirtszellapoptose zu modulieren, kann die Entstehung einer persistenten Infektion bzw. die Etablierung einer Langzeitbeziehung mit der Wirtszelle begünstigen und möglicherweise eine Voraussetzung für die Ausbildung einer chronischen Erkrankung darstellen.



## 5. Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine gesteigerte Expression von *ciap2*/cIAP2 in *Cp.-psittaci*-infizierten Wirtszellen, welche keine Anzeichen von Apoptose zeigen, festgestellt werden. Der Aktivierungsmechanismus von cIAP2 in diesen akut und persistent infizierten Wirtszellen ebenso wie die Auswirkung, die diese cIAP2-Hochregulation auf die zellulären Prozesse hat, sind jedoch noch unklar. Als Aktivator für cIAP2 gilt der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. In weiterführenden Experimenten könnte beispielsweise mittels Electromobility Shift Assay (EMSA) oder Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) überprüft werden, ob NF- $\kappa$ B in akut und persistent infizierten Zellen tatsächlich an den Promotor von cIAP2 bindet und dessen Expression auslöst.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob in *Cp.-psittaci*-infizierten Zellen eine Komplexbildung zwischen verschiedenen IAPs stattfindet, wie es für die *C.-trachomatis*-Infektion bereits beschrieben wurde und ob die Überexpression von cIAP2 bzw. der IAP-Komplex, sofern gebildet, zu einer Inhibition der IAP-Target-Caspasen führt.

Ein Silencing der *ciap2*-Expression mittels siRNA-Technologie und anschließender Infektion bzw. Persistenzbehandlung könnte schließlich zeigen, ob eine gesteigerte cIAP2-Expression wirklich dazu führt, dass infolge der Infektion keine Apoptose ausgelöst wird.

Bezüglich der chlamydialen Expressionsänderungen im Persistenzstadium von *Cp. psittaci* würde eine „Langzeitstudie“ über den Untersuchungszeitraum dieser Arbeit hinaus, einen Vergleich mit dem hier gezeigten persistenzspezifischen-Expressionsmuster erlauben und dies somit bestätigen oder modifizieren. Auch wäre ein *in-vivo*-angelehntes Modell, wie z. B. die Infektion von Monozyten, was ein natürliches Persistenzsystem darstellt, hilfreich bei der weiteren Charakterisierung persistenzspezifischer Expressionsmuster.

## Literaturverzeichnis

- Airenne S, Surcel HM, Alakarppa H, Laitinen K, Paavonen J, Saikku P, Laurila A.** (1999) Chlamydia pneumoniae infection in human monocytes. *Infect Immun.* 67(3):1445-9. Erratum in: *Infect Immun* 1999 Dec;67(12):6716.
- Al-Younes HM, Rudel T, Brinkmann V, Szczepek AJ, Meyer TF.** (2001) Low iron availability modulates the course of Chlamydia pneumoniae infection. *Cell Microbiol.* 3(6):427-37.
- Amrani Y, Tliba O, Choubey D, Huang CD, Krymskaya VP, Eszterhas A, Lazaar AL, Panettieri RA.** (2003) IFN-gamma inhibits human airway smooth muscle cell proliferation by modulating the E2F-1/Rb pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284(6):L1063-71.
- Atta M, Lamarche N, Battioni JP, Massie B, Langelier Y, Mansuy D, Fontecave M.** (1993) Escherichia coli and herpes-simplex-virus ribonucleotide reductase R2 subunit. Compared reactivities of the redox centres. *Biochem J.* 290( Pt 3):807-10.
- Balin BJ, Gerard HC, Arking EJ, Appelt DM, Branigan PJ, Abrams JT, Whittum-Hudson JA, Hudson AP.** (1998). Identification and localization of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 187(1):23-42.
- Barbour AG, Amano K, Hackstadt T, Perry L, Caldwell HD.** (1982) Chlamydia trachomatis has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. *J Bacteriol.* 151(1):420-8.
- Barry, CE, Hayes SF and Hackstadt T.** (1992) Nucleoid condensation in *Escherichia coli* that express a chlamydial histone homolog. *Science.* 256:377-79.
- Barry, CE, Brickman TJ and Hackstadt T.** (1993) Hc1-mediated effects on DNA structure: a potential regulator of chlamydial development. *Mol. Microbiol.* 9:273-283.
- Bavoil PM, Hsia R, Ojcius DM.** (2000) Closing in on Chlamydia and its intracellular bag of tricks. *Microbiology.* 146 (Pt 11):2723-31
- Bavoil P, Ohlin A and Schachter J.** (1984) Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in Chlamydia trachomatis. *Infect. Immun.* 44(2):479-485.
- Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP.** (1993) Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent Chlamydia trachomatis infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(9):3998-4002.
- Beatty WL, Belanger TA, Desai AA, Morrison RP, Byrne GI.** (1994a) Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun.* 62(9):3705-11.
- Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI.** (1994b) Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev.* 58(4):686-99. Review.
- Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI.** (1995) Reactivation of persistent Chlamydia trachomatis infection in cell culture. *Infect Immun.* 63(1):199-205.
- Bedson SP and Bland JOW.** (1932) A morphological study of psittacosis virus with the description of a developmental cycle. *Brit. J. Exptl. Pathol.* 13:461-466.

- Belland RJ, Zhong G, Crane DD, Hogan D, Sturdevant D, Sharma J, Beatty WL, Caldwell HD.** (2003a) Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(14):8478-83.
- Belland RJ, Nelson DE, Virok D, Crane DD, Hogan D, Sturdevant D, Beatty WL, Caldwell HD.** (2003b) Transcriptome analysis of chlamydial growth during IFN-gamma-mediated persistence and reactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(26):15971-6.
- Berger L, Volp K, Mathews S, Speare R, Timms P.** (1999) *Chlamydia pneumoniae* in a free-ranging giant barred frog (*Mixophyes iteratus*) from Australia. *J Clin Microbiol.* 37(7):2378-80.
- Bodetti TJ, Jacobson E, Wan C, Hafner L, Pospischil A, Rose K, Timms P.** (2002). Molecular evidence to support the expansion of the hostrange of *Chlamydia pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. *Syst Appl Microbiol.* 25(1):146-52.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F.** (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* 349(6305):117-27. Review.
- Boyle DS, Khattar MM, Addinall SG, Lutkenhaus J, Donachie WD.** (1997) *FtsW* is an essential cell-division gene in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 24(6):1263-73.
- Bradford MM.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* Bd. 72, 248-54.
- Brickman TJ, Barry CE and Hackstadt T.** (1993) Molecular cloning and expression of *hctB* encoding a strain-variant chlamydial histone-like protein with DNA-binding activity. *J. Bacteriol.* 175:4274-4281.
- Byrd TF and Horwitz MA.** (1989) Interferon-gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. *J. Clin. Invest.* 83:1457-1465
- Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ** (1986) Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect. Immun.* 53:347-351
- Byrne GI, Carlin JM, Merkert TP, Arter DL.** (1989) Long-term effects of gamma interferon on chlamydia-infected host cells: microbicidal activity follows microbistasis. *Infect Immun.* 57(4):1318-20.
- Byrne GI, Ouellette SP, Wang Z, Rao JP, Lu L, Beatty WL, Hudson AP.** (2001) *Chlamydia pneumoniae* expresses genes required for DNA replication but not cytokinesis during persistent infection of HEP-2 cells. *Infect Immun.* 69(9):5423-9.
- Byrne GI, Ojcius DM.** (2004) *Chlamydia* and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2(10):802-8. Review.
- Campbell LA, Kuo CC, Grayston JT.** (1990) Structural and antigenic analysis of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun.* 58(1):93-7.
- Carrero JA, Calderon B, Unanue ER.** (2004) Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule. *J Immunol.* 172(8):4866-74.
- Cates W Jr, Wasserheit JN.** (1991) Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol.* 164(6 Pt 2):1771-81. Review.

- Chanudet E, Zhou Y, Bacon CM, Wotherspoon AC, Muller-Hermelink HK, Adam P, Dong HY, de Jong D, Li Y, Wei R, Gong X, Wu Q, Ranaldi R, Goteri G, Pileri SA, Ye H, Hamoudi RA, Liu H, Radford J, Du MQ.** (2006) Chlamydia psittaci is variably associated with ocular adnexal MALT lymphoma in different geographical regions. *J Pathol.* 209(3):344-51.
- Cherla RP, Lee SY, Tesh VL.** (2003) Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol Lett.* 228(2):159-66. Review.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM.** (1995) FADD, a novel death domain containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis *Cell* 81, 505
- Cho SJ, Kang NS, Park SY, Kim BO, Rhee DK, Pyo S.** (2003) Induction of apoptosis and expression of apoptosis related genes in human epithelial carcinoma cells by Helicobacter pylori VacA toxin. *Toxicon.* 42(6):601-11.
- Chopra I, Storey C, Falla TJ, Pearce JH.** (1998) Antibiotics, peptidoglycan synthesis and genomics: the chlamydial anomaly revisited. *Microbiology.* 144 ( Pt 10):2673-8. Review. No abstract available.
- Clifton DR, Rydkina E, Freeman RS, Sahni SK.** (2005) NF-kappaB activation during Rickettsia rickettsii infection of endothelial cells involves the activation of catalytic IkappaB kinases IKKalpha and IKKbeta and phosphorylation-proteolysis of the inhibitor protein IkappaBalpha. *Infect Immun.* 73(1):155-65.
- Collier L. H.** (1990). Chlamydia. In: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 8th edition. Published Edward Arnold, London, pp 629-646.
- Daubener W, MacKenzie CR.** (1999) IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv Exp Med Biol.* 467:517-24. Review.
- Dean D and Powers VC.**(2001) Persistent Chlamydia trachomatis infections resist apoptotic stimuli. *Infect. Immun.* 69(4):2442-7
- Donachie WD.** (1993) The cell cycle of Escherichia coli. *Annu Rev Microbiol.* 47:199-230. Review.
- Dong F, Pirbhai M, Xiao Y, Zhong Y, Wu Y, Zhong G.** (2005) Degradation of the proapoptotic proteins Bik, Puma, and Bim with Bcl-2 domain 3 homology in Chlamydia trachomatis-infected cells. *Infect Immun.* 73(3):1861-4. Erratum in: *Infect Immun.* 73(7):4459.
- Eissenberg LG, Wyrick PB, Davis CH, Rumpp JW.** (1983) Chlamydia psittaci elementary body envelopes: ingestion and inhibition of phagolysosome fusion. *Infect Immun.* 40(2):741-51.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A and Nagata S.** (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.
- Everett KDE, Bush RM & Andersen AA.** (1999). Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Evol Microbiol* 49, 415 - 440.
- Fadel S, Eley A.** (2007) Chlamydia trachomatis OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin. *J Med Microbiol.* 56(Pt 1):15-22.

- Fan T, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty GA, Nance DM, Greenberg AH, Zhong G.** (1998) Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med.* 187(4):487-96.
- Fehlner-Gardiner C, Roshick C, Carlson JH, Hughes S, Belland RJ, Caldwell HD, McClarty G.** (2002) Molecular basis defining human *Chlamydia trachomatis* tissue tropism. A possible role for tryptophan synthase. *J Biol Chem.* 277(30):26893-903.
- Ferreri AJ, Guidoboni M, Ponzoni M, De Conciliis C, Dell'Oro S, Fleischhauer K, Caggiari L, Lettini AA, Dal Cin E, Ieri R, Freschi M, Villa E, Boiocchi M, Dolcetti R.** (2004) Evidence for an association between *Chlamydia psittaci* and ocular adnexal lymphomas. *J Natl Cancer Inst.* 96(8):586-94.
- Finlay BB and Cossart P.** (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* 276(5313):718-25. Review.
- Fischer SF, Schwarz C, Vier J, Hacker G.** (2001) Characterization of antiapoptotic activities of *Chlamydia pneumoniae* in human cells. *Infect Immun.* 69(11):7121-9.
- Flohr T, Bange FC, von Euch A, Kickenbeck M, Bottger EC.** (1992) Depletion of tryptophan is not involved in expression of tryptophanyl-tRNA synthetase mediated by interferon. *Infect Immun.* 60(10):4418-21.
- Fukushi, H and Hirai K.** (1992) Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:306-308.
- Garrett AJ, Harrison MJ, Manire GP.** (1974) A search for the bacterial mucopeptide component, muramic acid, in *Chlamydia*. *J Gen Microbiol.* 80(1):315-8.
- Gerard HC, Branigan PJ, Schumacher HR Jr, Hudson AP.** (1998) Synovial *Chlamydia trachomatis* in patients with reactive arthritis/Reiter's syndrome are viable but show aberrant gene expression. *J Rheumatol.* 25(4):734-42.
- Gerard HC, Krausse-Opatz B, Wang Z, Rudy D, Rao JP, Zeidler H, Schumacher HR, Whittum-Hudson JA, Kohler L, Hudson AP.** (2001) Expression of *Chlamydia trachomatis* genes encoding products required for DNA synthesis and cell division during active versus persistent infection. *Mol Microbiol.* 41(3):731-41.
- Gerard HC, Freise J, Wang Z, Roberts G, Rudy D, Krauss-Opatz B, Kohler L, Zeidler H, Schumacher HR, Whittum-Hudson JA, Hudson AP.** (2002) *Chlamydia trachomatis* genes whose products are related to energy metabolism are expressed differentially in active vs. persistent infection. *Microbes Infect.* 4(1):13-22.
- Gibellini D, Panaya R, Rumpianesi F.** (1998) Induction of apoptosis by *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* infection in tissue culture cells. *Zentralbl. Bakteriolog.* 288(1):35-43.
- Grayston JT, Wang SP, Kuo CC, Campbell LA.** (1989) Current knowledge on *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 8(3):191-202. Review.
- Greene W, Xiao Y, Huang Y, McClarty G, Zhong G.** (2004) *Chlamydia*-infected cells continue to undergo mitosis and resist induction of apoptosis. *Infect Immun.* 72(1):451-60.
- Hackstadt T, Todd WJ and Caldwell HD.** (1985) Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae? *J. Bacteriol.* 161, 25-31

- Hackstadt T, Baehr W. and Ying Y.** (1991) *Chlamydia trachomatis* developmentally regulated protein is homologous to eukaryotic histone H1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3937-3941.
- Halberstädter L und von Prowazek S.** (1907): Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, Berlin.* 26: 44-47.
- Hammerschlag MR.** (1998) Current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 17(5):305-8.
- Hammerschlag MR, Apfalter P, Boman J, Tondella ML, Gaydos C.** (2005) The role of *Chlamydia pneumoniae* in multiple sclerosis: real or fictitious? *J Infect Dis.* 192(7):1305-7
- Hawkins CJ, Uren AG, Hacker G, Medcalf RL, Vaux DL.** (1996) Inhibition of interleukin 1 beta-converting enzyme-mediated apoptosis of mammalian cells by baculovirus IAP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(24):13786-90.
- Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A.** (1999) The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(5):2396-401.
- Heuer D, Brinkmann V, Meyer TF, Szczepek AJ.** (2003) Expression and translocation of chlamydial protease during acute and persistent infection of the epithelial HEp-2 cells with *Chlamydia (Chlamydia) pneumoniae*. *Cell Microbiol.* 5(5):315-22.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R** (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* 10:413-7.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.** (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026-30.
- Hodinka RL, Davis CH, Choong J, Wyrick PB.** (1988) Ultrastructural study of endocytosis of *Chlamydia trachomatis* by McCoy cells. *Infect Immun.* 56(6):1456-63.
- Hofer MF, Newell K, Duke RC, Schlievert PM, Freed JH, Leung DY.** (1996) Differential effects of staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 on B cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(11):5425-30.
- Hogan RJ, Mathews SA, Kutlin A, Hammerschlag MR, Timms P.** Differential expression of genes encoding membrane proteins between acute and continuous *Chlamydia pneumoniae* infections. *Microb Pathog.* 34(1):11-6.
- Igietseme JU.** (1996) Molecular mechanism of T-cell control of *Chlamydia* in mice: role of nitric oxide in vivo. *Immunology.* 88(1):1-5.
- Igietseme JU, Ananaba GA, Candal DH, Lyn D, Black CM.** (1998) Immune control of Chlamydial growth in the human epithelial cell line RT4 involves multiple mechanisms that include nitric oxide induction, tryptophan catabolism and iron deprivation. *Microbiol Immunol.* 42(9):617-25.
- Iliffe-Lee ER, McClarty G.** (2000) Regulation of carbon metabolism in *Chlamydia trachomatis*. *Mol Microbiol.* Oct;38(1):20-30.
- Ito JI and Lyons JM.** (1999) Role of Gamma Interferon in Controlling Murine Chlamydial Genital Tract Infection. *Infect Immun.* 67(10):5518–5521.

- Jendro, MC, Deutsch T, Korber B, Kohler L, Kuipers JG, Krause-Opatz B, Westermann J, Raum E, Zeidler H.** (2000) Infection of human monocyte-derived macrophages with *Chlamydia trachomatis* induces apoptosis of T cells: a potential mechanism for persistent infection. *Infect. Immun.* 68:6704-6711
- Jones ML, Gaston JS, Pearce JH.** (2001) Induction of abnormal *Chlamydia trachomatis* by exposure to interferon-gamma or amino acid deprivation and comparative antigenic analysis. *Microb Pathog.* 30(5):299-309.
- Jordan A and Reichard P.** (1998) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem.* 67:71-98. Review.
- Kamradt MC, Mohideen N, Krueger E, Walter S, Vaughan AT.** (2000) Inhibition of radiation-induced apoptosis by dexamethasone in cervical carcinoma cell lines depends upon increased HPV E6/E7. *Br J Cancer.* 82(10):1709-16.
- Kanduc D, Mittelmann A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha A, Natale, C, Santacroce R, di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E.** (2002) Cell death: Apoptosis versus necrosis. *International Journal of Ontology* 21:165-170. Review
- Kaul R and Wenman WM** (1986) Cyclic AMP inhibits developmental regulation of *Chlamydia trachomatis* J. *Bacteriol.* 168:722-727.
- Khattar MM, Addinall SG, Stedul KH, Boyle DS, Lutkenhaus J, Donachie WD.** (1997) Two polypeptide products of the *Escherichia coli* cell division gene *ftsW* and a possible role for *FtsW* in *FtsZ* function. *J Bacteriol.* 179(3):784-93.
- Keat AC, Scott JT, Ridgway G, Maini RN, Pegrum GD.** (1997) Sexually acquired reactive arthritis. *Ann Rheum Dis.* 38 Suppl 1:suppl 52-4.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR** (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26(4):239-257, Review
- Kleba BJ, Banta E, Lindquist EA, Stephens RS.** (2001) Recruitment of mammalian cell fibronectin to the surface of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 70(7):3935-8.
- Koehler L, Nettelbreker E, Hudson AP, Ott N, Gerard HC, Branigan PJ, Schumacher HR, Drommer W, Zeidler H.** (2002) Ultrastructural and molecular analyses of the persistence of *Chlamydia trachomatis* (serovar K) in human monocytes. *Microb Pathog.* 22(3):133-42.
- Koo IC and Stephens RS.** (2003) A developmentally regulated two-component signal transduction system in *Chlamydia* J. *Biol. Chem.* 278(19):17314-17319.
- Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT.** (1995) *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev.* 8(4):451-61. Review.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lee LG, Connell CR, Bloch W.**(1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21(16):3761-6.
- Lee R and Collins T.** (2001) Nuclear factor-kappaB and cell survival: IAPs call for support. *Circ Res.* 88(3):262-4.

- Liston P, Fong WG, Korneluk RG.** (2003) The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* 22(53):8568-80. Review
- Lowry DH, Rosebrough NS, Farr AL, Randall RJ.** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K.** (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 4(6):357-62.
- Lytton SD, Mester B, Libman J, Shanzer A, Cabantchik ZI.** (1994) Mode of action of iron (III) chelators as antimalarials: II. Evidence for differential effects on parasite iron-dependent nucleic acid synthesis. *Blood.* 84(3):910-5.
- Matsumoto A and Manire GP.** (1970) Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol.* 101(1):278-85.
- Mathews S, George C, Flegg C, Stenzel D, Timms P.** (2001) Differential expression of ompA, ompB, pyk, nlpD and Cpn0585 genes between normal and interferon-gamma treated cultures of *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Pathog.* 30(6):337-45.
- Mehta SJ, Miller RD, Ramirez JA, Summersgill JT.** (1998) Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* replication in HEP-2 cells by interferon-gamma: role of tryptophan catabolism. *J Infect Dis.* 177(5):1326-31.
- Mercer KL and Weiss DS.** (2002) The *Escherichia coli* cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site. *J. Bacteriol.* 184:904-912
- Meyer KF und Eddie B** (1933). Latente Psittakoseinfektion bei Sittichen. *Zeitschrift für Infektionskrankheiten der Haustiere* 44 ,237-242.
- Molestina RE, Klein JB, Miller RD, Pierce WH, Ramirez JA, Summersgill JT.** (2002) Proteomic analysis of differentially expressed *Chlamydia pneumoniae* genes during persistent infection of HEP-2 cells. *Infect Immun.* 70(6):2976-81.
- Morrison RP.** (2000) Differential sensitivities of *Chlamydia trachomatis* strains to inhibitory effects of gamma interferon. *Infect Immun.* 68(10):6038-40.
- Mosman T.** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63
- Moulder JW.** (1966). The relation of the psittacosis group (chlamydiae) to bacteria and viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 20:107-130.
- Moulder JW.** (1983) Inhibition of onset of overt multiplication of *Chlamydia psittaci* in persistently infected mouse fibroblasts (L cells). *Infect Immun.* 39(2):898-907.
- Moulder JW.** (1991) Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev.* 55(1):143-90. Review.
- Moulder JW.** (1993) Why is *Chlamydia* sensitive to penicillin in the absence of peptidoglycan? *Infect Agents Dis.* 2(2):87-99. Review.
- Moulder JW, Levy NJ, Schulman LP.** (1980) Persistent infection of mouse fibroblasts (L cells) with *Chlamydia psittaci*: evidence for a cryptic chlamydial form. *Infect Immun.* 30(3):874-83.



- Mulder MM, Heddema ER, Pannekoek Y, Faridpooya K, Oud ME, Schilder-Tol E, Saeed P, Pals ST.** (2006) No evidence for an association of ocular adnexal lymphoma with *Chlamydia psittaci* in a cohort of patients from the Netherlands. *Leuk Res.* 30(10):1305-7.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM** (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/apo-1) death inducing signaling complex. *Cell* 85, 817.
- Nanagara R, Li F, Beutler A, Hudson A, Schumacher HR Jr.** (1995) Alteration of *Chlamydia trachomatis* biologic behavior in synovial membranes. Suppression of surface antigen production in reactive arthritis and Reiter's syndrome. *Arthritis Rheum.* 38(10):1410-7.
- Neirinck LG and DeVoe IW.** (1981) Anomalous cellular morphology and growth characteristics of *Neisseria meningitidis* in subminimal inhibitory concentrations of penicillin G. *Antimicrob Agents Chemother.* 19(5):911-6.
- Oblender M and Carpentieri U.** (1991) Growth, ribonucleotide reductase and metals in murine leukemic lymphocytes. *J Cancer Res Clin Oncol.* 117(5):444-8.
- Ojcius DM, Souque P, Perfettini JL, Dautry-Varsat A.** (1998) Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia psittaci*. *J Immunol.* 161(8):4220-6.
- Page LA** (1966) Revision of the family *Chlamydiaceae* Rake (*Rickettsiales*): unification of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns, 1945. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16:223-252.
- Page LA** (1968) Proposal for the recognition of two species in the genus *Chlamydia* Jones, Rake, and Stearns, 1945. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 18:51-66.
- Paland N, Rajalingam K, Machuy N, Szczepek A, Wehrl W, Rudel T.** (2006) NF-kappaB and inhibitor of apoptosis proteins are required for apoptosis resistance of epithelial cells persistently infected with *Chlamydia pneumoniae*. *Cell Microbiol.* 8(10):1643-55.
- Pantoja LG, Miller RD, Ramirez JA, Molestina RE, Summersgill JT.** (2000) Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. *Infect Immun.* 68(11):6478-81.
- Parkinson JS and Kofoed EC** (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26, 71-112.
- Perara E, Ganem D, Engel JN.** (1992) A developmentally regulated chlamydial gene with apparent homology to eukaryotic histone H1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2125-2129.
- Perfettini JL, Reed JC, Israel N, Martinou JC, Dautry-Varsat A, Ojcius DM.** (2002a) Role of Bcl-2 family members in caspase-independent apoptosis during *Chlamydia* infection. *Infect Immun.* 70(1):55-61.
- Perfettini JL, Darville T, Dautry-Varsat A, Rank RG, Ojcius DM.** (2002b) Inhibition of apoptosis by gamma interferon in cells and mice infected with *Chlamydia muridarum* (the mouse pneumonitis strain of *Chlamydia trachomatis*). *Infect Immun.* 70(5):2559-65.
- Peters J, Hess S, Endlich K, Thalmann J, Holzberg D, Kracht M, Schaefer M, Bartling G, Klos A.** Silencing or permanent activation: host-cell responses in models of persistent *Chlamydia pneumoniae* infection. *Cell Microbiol.* 7(8):1099-108.

- Petit F, Bertagnoli S, Gelfi J, Fassy F, Boucraut-Baralon C, Milon A.** (1996) Characterization of a myxoma virus-encoded serpin-like protein with activity against interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Virol.* 70(9):5860-6.
- Pfaffl MW.** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):1-6.
- Pfefferkorn ER.** (1984) Interferon  $\gamma$  blockst he growth of *Toxoplasma gondii* in cultured fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 31:908-12.
- Pirbhai M, Dong F, Zhong Y, Pan KZ, Zhong G.** (2006) The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *J Biol Chem.* 281(42):31495-501.
- Polkinghorne A, Hogan RJ, Vaughan L, Summersgill JT, Timms P.** (2006) Differential expression of chlamydial signal transduction genes in normal and interferon gamma-induced persistent *Chlamydia pneumoniae* infections. *Microbes Infect.* 8(1):61-72.
- Rahman MU, Hudson AP, Schumacher HR Jr.** (1992) Chlamydia and Reiter's syndrome (reactive arthritis). *Rheum Dis Clin North Am.* 18(1):67-79. Review.
- Rajalingam K, Al-Younes H, Muller A, Meyer TF, Szczepek AJ, Rudel T.** (2001) Epithelial cells infected with *Chlamydia pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*) are resistant to apoptosis. *Infect Immun.* 69(12):7880-8.
- Rajalingam K, Sharma M, Paland N, Hurwitz R, Thieck O, Oswald M, Machuy N, Rudel T.** (2006) IAP-IAP complexes required for apoptosis resistance of *C. trachomatis*-infected cells. *PLoS Pathog.* 2(10):e114.
- Rank RG, Ramsey KH, Pack EA, Williams DM.** (1992) Effect of gamma interferon on resolution of murine chlamydial genital infection. *Infect Immun.* 60:4427-29.
- Raulston JE.** (1997) Response of *Chlamydia trachomatis* serovar E to iron restriction in vitro and evidence for iron-regulated chlamydial proteins. *Infect Immun.* 65(11):4539-47.
- Read TD, Brunham RC, Shen C, Gill SR, Heidelberg JF, White O, Hickey EK, Peterson J, Utterback T, Berry K, Bass S, Linher K, Weidman J, Khouri H, Craven B, Bowman C, Dodson R, Gwinn M, Nelson W, DeBoy R, Kolonay J, McClarty G, Salzberg SL, Eisen J, Fraser CM.** (2000) Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res.* 28(6):1397-406.
- Roblin PM, Kohlhoff S, Malay S, Kutlin A, Riska PF, Hammerschlag MR** (2002). Effect of acute and chronic *C. pneumoniae* infection on apoptosis in A-549 cells. pp 89 - 92 In: *Proceedings of the 10th international symposium on human chlamydial infections*. International Chlamydia Symposium San Francisco ISBN 0-9664383-1-0
- Roshick C, Iliffe-Lee ER, McClarty G.** Cloning and characterization of ribonucleotide reductase from *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem.* 275(48):38111-9.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5463-7.
- Schachter J.** (1989) Pathogenesis of chlamydial infections. *Pathol Immunopathol Res.* 8(3-4):206-20. Review

- Schoier J, Ollinger K, Kvarnstrom M, Soderlund G, Kihlstrom E.** (2001) Chlamydia trachomatis-induced apoptosis occurs in uninfected McCoy cells late in the developmental cycle and is regulated by the intracellular redox state. *Microb Pathog.* 31(4):173-84.
- Skowasch D, Jabs A, Andrie R, Dinkelbach S, Schiele TM, Wernert N, Luderitz B, Bauriedel G.** (2003) Persistence of Chlamydia pneumoniae in degenerative aortic valve stenosis indicated by heat shock protein 60 homologues. *J Heart Valve Dis.* 12(1):68-75.
- Stenner-Liewen F, Liewen H, Zapata JM, Pawlowski K, Godzik A, Reed JC.** (2002) CADD, a Chlamydia protein that interacts with death receptors. *J Biol Chem.* 277(12):9633-6.
- Stephens, R. S.** (1994) Molecular genetics of Chlamydia, p. 377-386. In W. R. Bowie, H. D. Caldwell, M. A. Chernesky, *et al.* (ed.), Chlamydial infections. Societa Editrice Esculapio, Bologna, Italy.
- Su H, Zhang YX, Li R.** (1985). Presence of muramic acid in *Chlamydia trachomatis* proved by liquid chromatography-mass spectrometry. *Kexue Tongbao* 30, 695-99.
- Summersgill JT, Sahney NN, Gaydos CA, Quinn TC, Ramirez JA.** (1995) Inhibition of Chlamydia pneumoniae growth in HEp-2 cells pretreated with gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun.* 63(7):2801-3.
- Takikawa O, Kuroiwa T, Yamazaki F, Kido R.** (1988) Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J Biol Chem.* 263(4):2041-8.
- Thomas M, Matlashewski G, Pim D, Banks L.** (1996) Induction of apoptosis by p53 is independent of its oligomeric state and can be abolished by HPV-18 E6 through ubiquitin mediated degradation. *Oncogene.* 13(2):265-73.
- Thygeson P.** (1963) Epidemiologic Observations of Trachoma in the United States. *Invest Ophthalmol.* 2:482-9.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(9):4350-4.
- Turco J, Thompson HA, Winkler HH.** (1984) Interferon gamma inhibits growth of Coxiella burnetii in mouse fibroblasts. *Infect Immun* 45:781-783
- Wahl C, Maier S, Marre R, Essig A.** (2003) Chlamydia pneumoniae induces the expression of inhibitor of apoptosis 2 (c-IAP2) in a human monocytic cell line by an NF-kappaB-dependent pathway. *Int J Med Microbiol.* 293(5):377-81.
- Wardrop S, Fowler A, O'Callaghan P, Giffard P, Timms P.** (1999) Characterization of the koala biovar of Chlamydia pneumoniae at four gene loci--ompAVD4, ompB, 16S rRNA, groESL spacer region. *Syst Appl Microbiol.* 22(1):22-7.
- Wang Y.** (1999). Etiology of trachoma: a great success in isolating and cultivating Chlamydia trachomatis. *Chinese Medical Journal* 112, 938 - 941.
- Wang S, Fan Y, Brunham RC, Yang X.** (1999) IFN-gamma knockout mice show Th2-associated delayed-type hypersensitivity and the inflammatory cells fail to localize and control chlamydial infection. *Eur J Immunol.* 29(11):3782-92.

- Wood H, Roshick C, McClarty G. (2004)** Tryptophan recycling is responsible for the interferon-gamma resistance of *Chlamydia psittaci* GPIC in indoleamine dioxygenase-expressing host cells. *Mol Microbiol.* 52(3):903-16.
- Wuppermann FN, Hegemann JH, Jantos CA. (2001)** Heparan sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis.* 184(2):181-7.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. (1980)** Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 68:251-306. Review.
- Xiao Y, Zhong Y, Greene W, Dong F, Zhong G. (2004)** *Chlamydia trachomatis* infection inhibits both Bax and Bak activation induced by staurosporine. *Infect Immun.* 72(9):5470-4.
- Xie G, Bonner CA, Jensen RA. (2002)** Dynamic diversity of the tryptophan pathway in chlamydiae: reductive evolution and a novel operon for tryptophan recapture. *Genome Biol.* 3(9):research0051.
- Yaraei K, Campbell LA, Zhu X, Liles WC, Kuo CC, Rosenfeld ME. (2005)** *Chlamydia pneumoniae* augments the oxidized low-density lipoprotein-induced death of mouse macrophages by a caspase-independent pathway. *Infect. Immun.* 73(7):4315-22.
- Yeung MC. (2001)** Accelerated apoptotic DNA laddering protocol. *Biotechniques.* 33(4):734-6.
- Ying S, Fischer SF, Pettengill M, Conte D, Paschen SA, Ojcius DM, Hacker G. (2006)** Characterization of host cell death induced by *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 74(11):6057-66.
- Yuan H, Fu F, Zhuo J, Wang W, Nishitani J, An DS, Chen IS, Liu X. (2005)** Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. *Oncogene.* 24(32):5069-78.
- Zhang L, Douglas AL, Hatch TP. (1998)** Characterization of a *Chlamydia psittaci* DNA binding protein (EUO) synthesized during the early and middle phases of the developmental cycle. *Infect Immun.* 66(3):1167-73.
- Zhong G, Fan P, Ji H, Dong F, Huang Y. (2001)** Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J Exp Med.* 193(8):935-42.
- Zhong GM, Peterson EM, Czarniecki CW, de la Maza LM. (1988)** Recombinant murine gamma interferon inhibits *Chlamydia trachomatis* serovar L1 in vivo. *Infect Immun.* 56(1):283-6.
- Zhong Y, Weininger M, Pirbhai M, Dong F, Zhong G. (2006)** Inhibition of staurosporine-induced activation of the proapoptotic multidomain Bcl-2 proteins Bax and Bak by three invasive chlamydial species. *J Infect.* 53(6):408-14
- Zhou Q, Krebs JF, Snipas SJ, Price A, Alnemri ES, Tomaselli KJ, Salvesen GS. (1998)** Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry.* 37(30):10757-65.
- Zhou Q, Snipas S, Orth K, Muzio M, Dixit VM, Salvesen GS. (1997)** Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem.* 272(12):7797-800.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Genetische Struktur der Ordnung Chlamydiales ( nach Bush R. M., Everett D. E., 2001).....	4
Abb. 2: Chlamydialer Lebenszyklus (modifiziert nach Beatty <i>et al.</i> , 1994).....	5
Abb. 3: Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Pathways der Zelle ( nach Yau P., 2004).....	14
Abb. 4: Apoptoseverhalten während der verschiedenen Stadien des chlamydialen Entwicklungszyklus (aus Byrne and Ojcius, 2004). ....	16
Abb. 5: Reinfektionsassay.....	41
Abb. 6: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von akut und persistent infizierten HEp2-Zellen 48 h p. i. ....	42
Abb. 7: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von akut und persistent infizierten Fibroblasten 48 h p.i. ....	42
Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen akut und persistent infizierter HEp2-Zellen 48 h p.i. ....	43
Abb. 9: Reaktivierung der persistenten Chlamydien nach Abzug der Persistenzinduktoren 24 h p.i. und 48 h p. i. ....	44
Abb. 10: Immunfluoreszenzbilder der persistenten <i>Cp. psittaci</i> -Infektionen 96 h p.i. ....	45
Abb. 11: Expression Membranprotein-codierender Gene 12 h bis 48 h p.i. ....	52
Abb. 12: Expression Stress-Response-Protein-codierender Gene 12 h bis 48 h p.i. ....	53
Abb. 13: Expression von <i>ftsW</i> 12 h bis 48 h p.i.....	53
Abb. 14: Expression der Sigma-Faktor-codierenden Gene 12 h bis 48 h p.i.....	54
Abb. 15: Expression von Typ-III-Sekretions-Genen 12 h bis 48 h p.i. ....	55
Abb. 16: Expression von Signaltransduktions-Genen 12 h bis 48 h p.i. ....	57
Abb. 17: Expression Apoptose-Protein-codierender Gene 12 h bis 48 h p.i. ....	58
Abb. 18: Expression diverser Regulations-assoziiierter Gene 12 h bis 48 h p.i. ....	59
Abb. 19: <i>IDO</i> -Expressionsmuster der HEp2-Zelllinie und der Fibroblasten 12h-48h p.i. in den drei verschiedenen Persistenzmodellen verglichen mit der akuten Infektion. ....	61
Abb. 20: DNA-Fragmentationsassay nach Behandlung mit Persistenzinduktoren.....	62
Abb. 21: DNA-Fragmentationsassay Infektionen. ....	63
Abb. 22: Prozentzahl apoptotischer Kerne in akut bzw. persistent infizierten Wirtszellen.....	63
Abb. 23: Zellmorphologie der akut und persistent infizierten Wirtszellen. ....	64
Abb. 24: Prozentzahl TUNEL-positiver Zellen nach Behandlung mit Persistenzinduktoren.....	65
Abb. 25: Prozentzahl TUNEL-positiver Zellen nach Behandlung mit Persistenzinduktoren und Infektion mit <i>Cp. psittaci</i> DC15. ....	66
Abb. 26: DNA-Fragmentationsassay nach Apoptoseinduktion. ....	67
Abb. 27: Prozentzahl apoptotischer Zellen in akut bzw. persistent infizierten, Staurosporin-behandelten Wirtszellen. ....	68
Abb. 28: Prozentzahl proliferierender Zellen nach Behandlung mit den Persistenzinduktoren. ....	69
Abb. 29: Prozentzahl proliferierender Zellen nach Behandlung mit den Persistenzinduktoren und Infektion mit <i>Cp. psittaci</i> DC15. ....	69
Abb. 30: Expression verschiedener, für Apoptose-Inhibitoren-codierender Gene zum Zeitpunkt 48 h p.i. ....	70

Abb. 31: Expression von *ciap2* 24 h-96 h p.i. .... **71**  
 Abb. 32: Western Blots der behandelten, infizierten Zellen gegen cIAP2. .... **72**  
 Abb. 33: Expression von *ciap2* nach Zugabe von Persistenzinduktoren. .... **72**  
 Abb. 34: Western Blots der behandelten, uninfizierten Zellen gegen cIAP2. .... **73**

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verwendete Puffer, Medien und Lösungen und ihre Zusammensetzung .....	23
Tabelle 2. Für Expressionsuntersuchungen ausgewählte chlamydiale Gene .....	46
Tabelle 3. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener <i>Cp.-psittaci</i> -Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 12 h p.i. (normalisiert gegen <i>16S rRNA</i> ), Wirtszelle HEp2.....	47
Tabelle 4. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener <i>Cp.-psittaci</i> -Gene in dreiverschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 24 h p.i. (normalisiert gegen <i>16S rRNA</i> ), Wirtszelle HEp2.....	48
Tabelle 5. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener <i>Cp.-psittaci</i> -Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 36 h p.i. (normalisiert gegen <i>16S rRNA</i> ), Wirtszelle HEp2.....	49
Tabelle 6. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener <i>Cp.-psittaci</i> -Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 48 h p.i. (normalisiert gegen <i>16S rRNA</i> ), Wirtszelle HEp2.....	50
Tabelle 7. Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer für chlamydiale Gene .....	XIV
Tabelle 8. Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer für humane Gene .....	XVI
Tabelle 9. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener <i>Cp.-psittaci</i> -Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 12 h p.i. (normalisiert gegen <i>gyrA</i> ), Wirtszelle: HEp2.....	XVII
Tabelle 10. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener <i>Cp, psittaci</i> -Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 24 h p.i. (normalisiert gegen <i>gyrA</i> ), Wirtszelle: HEp2.....	XVIII
Tabelle 11. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener <i>Cp.-psittaci</i> -Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 36 h p.i. (normalisiert gegen <i>gyrA</i> ), Wirtszelle: HEp2.....	XIX
Tabelle 12. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener <i>Cp.-psittaci</i> -Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 48 h p.i. (normalisiert gegen <i>gyrA</i> ), Wirtszelle: HEp2.....	XX
Tabelle 13. Expressionsänderungen im mRNA-Level ausgewählter <i>Cp.-psittaci</i> -Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 12 h p.i. (normalisiert gegen <i>16S rRNA</i> ), Wirtszelle: Fibroblasten.....	XXI
Tabelle 14. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener <i>Cp.-psittaci</i> -Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 24 h p.i. (normalisiert gegen <i>16S rRNA</i> ), Wirtszelle: Fibroblasten.....	XXI
Tabelle 15. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener <i>Cp.-psittaci</i> -Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 36 h p. i. (normalisiert gegen <i>16S rRNA</i> ), Wirtszelle: Fibroblasten.....	XXII
Tabelle 16. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener <i>Cp.-psittaci</i> -Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 48 h p.i. (normalisiert gegen <i>16S rRNA</i> ), Wirtszelle: Fibroblasten.....	XXII
Tabelle 17. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener humaner Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion zum Zeitpunkt 48 h p.i. (normalisiert gegen <i>β-Actin</i> ), Wirtszelle: HEp2.....	XXIII

---

Tabelle 18. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener humaner Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion zum Zeitpunkt 48 h p.i. (normalisiert gegen <i>gusB</i> ), Wirtszelle: HEp2 .....	<b>XXIII</b>
Tabelle 19. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener humaner Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion zum Zeitpunkt 48 h p.i. (normalisiert gegen $\beta$ -Actin), Wirtszelle: Fibroblasten .....	<b>XXIV</b>
Tabelle 20. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener humaner Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion zum Zeitpunkt 48 h p.i. (normalisiert gegen <i>gusB</i> ), Wirtszelle: Fibroblasten .....	<b>XXIV</b>
Tabelle 21. Expressionsänderungen im <i>cIAP-2</i> -mRNA-Level in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion (normalisiert gegen $\beta$ -Actin), Wirtszelle: HEp2 .....	<b>XXV</b>
Tabelle 22. Expressionsänderungen im <i>cIAP-2</i> -mRNA-Level in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion (normalisiert gegen <i>gusB</i> ), Wirtszelle: HEp2 .....	<b>XXV</b>
Tabelle 23. Expressionsänderungen im <i>cIAP-2</i> -mRNA-Level in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion (normalisiert gegen $\beta$ -Actin), Wirtszelle: Fibroblasten .....	<b>XXV</b>
Tabelle 24. Expressionsänderungen im <i>cIAP-2</i> -mRNA-Level in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion (normalisiert gegen <i>gusB</i> ), Wirtszelle: Fibroblasten .....	<b>XXVI</b>
Tabelle 25. Expressionsänderungen im <i>cIAP-2</i> -mRNA-Level nach Behandlung mit DAM, PenG und IFN- $\gamma$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen (normalisiert gegen $\beta$ -Actin).....	<b>XXVI</b>
Tabelle 26. Expressionsänderungen im <i>cIAP-2</i> -mRNA-Level nach Behandlung mit DAM, PenG und IFN- $\gamma$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen (normalisiert gegen <i>gusB</i> ).....	<b>XXVI</b>



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich herzlichst allen Menschen danken, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichten und mich dabei unterstützten:

Herrn Prof. Dr. H. P. Saluz danke ich sehr herzlich für die Übernahme der Betreuung der vorliegenden Arbeit, sein Interesse am Fortgang der Forschungsarbeiten sowie für seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. K. Sachse danke ich für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung, bei der er mir viele Freiheiten zur eigenen Gestaltung des Forschungsgebietes gewährte sowie für die stete Unterstützung meiner Arbeit.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Herrn Prof. E. Straube sehr dankbar.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Chlamydien“ sowie der früheren Arbeitsgruppe FG425 des Friedrich-Loeffler-Institutes, speziell Simone Bettermann, Christine Grajatzki und Byrgit Hofmann danke ich für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre. Frau Sabine Scharf und Dr. Evelyn Schubert danke ich für die Einführung in die Chlamydieninfektion.

Frau Sabine Lied und Frau Prof. Elisabeth Liebler-Tenorio möchte ich recht herzlich für ihre Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen danken.

Frau Diplom-Biochemikerin Jana Pieper danke ich besonders für viele hilfreiche fachliche und nicht-fachliche Diskussion, wertvolle Ratschläge und die geduldige Unterstützung bei den FACS-Experimenten.

Den Mitgliedern der Abteilung Zell- und Molekularbiologie des Leibniz-Institutes für Naturstoffforschung und Infektionsbiologie, speziell Herrn Dr. Frank Hänel, möchte ich sehr herzlich für hilfreiche Diskussionen und Tipps danken sowie dafür, dass mir die Tür jederzeit offen stand.

Meinen Eltern, Carola und Werner Göllner, die mich immer in jeder Hinsicht unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle einen besonders herzlichen Dank aussprechen.

All meinen Freunden möchte ich außerdem für hilfreiche fachliche und persönliche Diskussionen danken.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank Tino Schenk für seine Geduld und Unterstützung sowie für viele kleine und große Hilfeleistungen.

Abschließend gebührt mein spezieller Dank der H. Willhelm-Schaumann-Stiftung ohne deren Gewährung eines Stipendiums mir die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur-Quellen angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit noch an keiner anderen Hochschule eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen-Fakultät ist mir bekannt.

Jena, den 10.07.07

Stefanie Göllner

## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Name	Stefanie Göllner
Geburtstag und –ort	0.8.10.1979 in Eisenach
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### SCHULBILDUNG

1986-1990	Grundschule Ettenhausen a. d. Suhl
1990-1991	Grund- und Regelschule Marksuhl
1991-1998	Ernst-Abbe-Gymnasium Eisenach

### STUDIUM

1998-2003	Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abschluss als Diplom-Biologin
2002-2003	Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Naturstoffforschung und Infektionsbiologie (HKI) Jena, Abteilung Zell- und Molekularbiologie (ZMB) unter Betreuung von Prof. H. P. Saluz zum Thema „Akute Myeloische Leukämie bei Kindern: Differentielle Genexpression in <i>PRAME</i> -über und <i>PRAME</i> -unterexprimierenden Patientenproben“

### PROMOTIONSARBEIT

2003-2007	Anfertigung der vorliegenden Promotionsarbeit am Friedrich-Loeffler-Institut in Jena (in Kooperation mit dem ZMB des HKI) unter Betreuung von Prof. H. P. Saluz
-----------	---

Jena, den 10.07.2007

Stefanie Göllner

## Publikationsliste

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen:

**Goellner S, Schubert E, Liebler-Tenorio E, Hotzel H, Saluz HP, Sachse K. (2006)**  
Transcriptional response patterns of *Chlamydophila psittaci* in different in vitro models of persistent infection. *Infect Immun.* 74(8):4801-8.

**Ehricht R, Slickers P, Goellner S, Hotzel H, Sachse K. (2006)**  
Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol Cell Probes.* 20(1):60-3.

Weitere Publikationen:

**Schenk T, Stengel S, Goellner S, Steinbach D, Saluz HP. (2007)** Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies. *Genes Chromosomes Cancer.* 46(9):796-804.

**Goellner S, Steinbach D, Schenk T, Gruhn B, Zintl F, Ramsay E, Saluz HP. (2006)**  
Childhood acute myelogenous leukaemia: association between PRAME, apoptosis- and MDR-related gene expression. *Eur J Cancer.* 42(16):2807-14.

## Anhang

### Tabellen 7-8. Primersequenzen der chlamydialen und humanen Primer

**Tabelle 7. Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer für chlamydiale Gene**

Gen	Protein	Primer Sequenz (5`-3`)	Produktlänge (bp)
<i>16S rRNA</i>		fwd CTTGTACACACCGCCCGTC rev GCCCAACCTAGTCAAACCGTC	201
<i>gyrA</i>	Gyrase A	fwd GCGAAGCATCGTAAATGTGC rev AGCCGAAGTTTCCTTGACCAT	151
<i>groEL</i>	Heat shock factor 60	fwd CAACAGGTAGCAGAATCCGGA rev CTCTTCGCTGATAAGTTGGCAA	201
<i>grpE</i>	Cofactor Hsp 70	fwd CAACAGTTCCTACCCCGATAA rev CCTCATCTGACATCTGTGAGGC	251
<i>dnaK</i>	Heat shock protein 70	fwd CACTCACACGTGCCCACTTT rev GAGCACACCCCTTGAATTG	251
<i>groES</i>	Heat shock factor 10	fwd GTCAGATCAAGCAACGACCCTT rev CGATGGTAAGTTCTTGTCCCG	251
<i>ompA</i>	Major outer membrane protein (MOMP)	fwd GCTACTTGGTGTGACGCCATT rev GAACCACTCAGCGTCTTGCA	201
<i>omcB</i>	Outer membrane protein B	fwd GGATCTGCTATTGCCCG rev CAGAACATTTGTGTCCACCG	217
<i>omcA</i>	Outer membrane protein A	fwd TGCCGTATTGTAGATTGCTGCT rev TGAACCTCCTGGATTGCACTCAG	152
<i>pomp91A</i>	Polymorphic outer membrane protein 91A	fwd AGTCGATGACAATGGCAATGCC rev CGTTCTGGGTTAGGGGAGTAACC	250
<i>pomp91B</i>	Polymorphic outer membrane protein 91B	fwd TACACAATCTAGTCACCCCGGAGC rev TCTAGCTTTAACTCAGCAGTAGA	250
<i>euo</i>	DNA binding protein	fwd AAGGCTTCTAAAACAACCCGG rev GGCTAATAACCCAAGCAGCG	241
<i>cpaf</i>	Chlamydial protease-like activity factor	fwd CGCACCCCTGAGCATCGTTA rev AAGACAAAACCCCGAGCTCCT	151
<i>efp2</i>	Elongation factor P	fwd GATGTGCGAGAACAACAGATGC rev CCCGAAGCTGTATCTCCACG	251
<i>hctA</i>	Histone-like protein 1	fwd ACGTGACTTAGACAAGGCCGA rev ATTTTTGGCTTAGGTGCTGCTT	201
<i>cadd</i>	Death domain receptor protein	fwd GCAATCCACAGCCGTTGTG rev TTGAGCTGCTGCACTAGGGAC	151
<i>ftsW</i>	Cell division membrane	fwd TTGTTCCCTGCGTCGCTATC	151

	protein	rev AAAAGCTATTACGGCTGCGGA	
<i>ctcC</i>	Two-component-system Histidine kinase	fwd GCTGCGAAGAAGTCCTT rev TGTGGCTCCTGTAAAAGCGC	151
<i>ctcB</i>	Two-component-system Response regulator	fwd TCATTTGCAATTCACAAGCTCG rev GCTAGAGTCGCGGTCATTTTC	328
<i>rpoD</i>	Sigma factor (sig A)	fwd TGCGTTGTTTCCATTGTCGT rev GCTCTTGTCCATCCAACGCT	251
<i>rpsD</i>	Sigma factor (sig 28)	fwd ATGCCTTCCCATGTAAAGACCG rev GAACCCAATCCTGCTTCCTTAAA	166
<i>rpoN</i>	Sigma factor (sig 54)	fwd TTTCCATCCTCTGGGCATTG rev GGGAGCAGTGACATTTCTTTGC	151
<i>sctN</i>	Type III secretion protein	fwd AATCCACTTCACGATCGGACC rev GCATCTATCAGCCGATTGCTG	151
<i>incA</i>	Inclusion membrane protein A	fwd CATGTGGAGGAAAGTCGCG rev CCCTGATCTGCCGTTTCTGT	251
<i>pknD</i>	Ser-/Thr- protein kinase	fwd TATGGAGGATCCCTCGAGAGTG rev CAAGAGCGTTTGGCAATGC	131
<i>pkn1</i>	Ser-/Thr-Protein-Kinase	fwd ATAGCCAGAAGCCCCGTACC rev ATGCTCAGGAAGCGAACAGG	151
<i>pp2C</i>	PP2C-Phosphatase	fwd CTTCAGCGCCTCGCGATA rev GAGAGCTGTGGCTATTGCCG	151
<i>pkn5</i>	Ser-/Thr- Protein- Kinase	fwd AAAAACAAGGAAAGGTTCCCCA rev GATGACATGGAATCGTCTGCCT	151
<i>yhbZ</i>	GTP binding Protein (Predicted GTPase)	fwd CGGTAAAGACCTCGTCTTAATCG rev CTAAACGCTCTCCACTTTTAGCAA	151
<i>yphC</i>	GTP binding Protein (Predicted GTPase)	fwd AAGTTGACCCGCTGCTGTTT rev TGCATTTCTTCTCCCTCGT	151
<i>ychF</i>	GTP binding Protein (Predicted GTPase)	fwd CCCTTTTGCACAATTGACCC Rev CGTCTGCAGCTCCCTTAC	151
<i>hflX</i>	GTP binding Protein (Predicted GTPase)	fwd ACCGCTTACAGCAGAGGAAT rev GAGGGAGCAGGTAGCGTGC	151

Tabelle 8. Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer für humane Gene

Gen	Protein	Primer Sequenz (5'-3')	Produktlänge (bp)
<i>β-Act</i>	Beta-Actin	fwd GAAATCGTGCGTGAC rev GGAACCGCTCATTGCCAAT	151
<i>gusB</i>	Glucuronidase B	fwd AAACGATTGCAGGGTTTCACC rev GCGTTTTTGGATCCAGACCCA	151
<i>ciap1</i>	Inhibitor of Apoptosis Protein 1	fwd GCAGACACATGCAGCTCGAA rev CCAACACCTCAAGCCACCAT	151
<i>ciap2</i>	Inhibitor of Apoptosis Protein 2	fwd CACATGCAGCCCGCTTTAA rev GATTCCCAACACCTGAGTCCAC	151
<i>xiap</i>	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein	fwd TCCCCAAATTGCAGATTTATCA rev CATGTGTCTCAGATGGCCTGTC	151
<i>bruce</i>	baculoviral IAP-repeat containing Protein 6	fwd CGGCTGAACCTCCACCTATC rev CAATCGAAGAAGGCACTGGG	152
<i>naip</i>	Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein	fwd CAGCAGAAAGCCTCTGACGAG rev TGTAGCCTTTCTGCATTTTTGC	151
<i>survivin</i>	Baculoviral IAP repeat-containing Protein 5	fwd GCACCTGAAAGCTTCCTCGA rev GCCTCATTCAACCCCTTCC	151
<i>bcl-2</i>	B-cell lymphoma Protein 2	fwd GAGGAGCTCTTCAGGGACGG rev GGTGCCGGTTCAGGTACTCA	151
<i>mcl-1</i>	myeloid cell leukemia protein 1 (BCL2-related)	fwd AACCAAGAAAGCTGCATCGAAC rev GCACATTCCTGATGCCACCT	151
<i>IDO</i>	Indolamin-2,3-Dioxygenase	fwd TGCCACCAGCTCACAGGAA rev CGATTTGCAGATGGTAGCTCC	201
<i>llp-2</i>	Baculoviral IAP repeat-containing Protein 8	fwd TCTATGACTGGCCGCTGACTG rev CCCATAGCAGAAGAAGCACCTC	107
<i>livin</i>	Baculoviral IAP repeat-containing Protein 7	fwd CACTGTGGAGGAGGGCTAGC rev GAGCTCCCTCAAGTGAACGG	151

**Tabellen 9-12. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener *Cp.-psittaci*-Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen (normalisiert gegen *gyrA*), Wirtszelle HEp2**

**Tabelle 9. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener *Cp.-psittaci*-Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 12 h p.i. (normalisiert gegen *gyrA*), Wirtszelle: HEp2**

Gen	Expressionsänderung (x-fach $\pm$ SD) <sup>a</sup>		
	DAM vs. akut	PenG vs. akut	IFN-vs. akut
<i>groEL1</i>	-1,32 $\pm$ 0,04	1,68 $\pm$ 0,30	-1,12 $\pm$ 0,29
<i>grpE</i>	1,44 $\pm$ 0,25	1,58 $\pm$ 0,28	1,14 $\pm$ 0,51
<i>dnak (hsp70)</i>	1,54 $\pm$ 0,17	1,13 $\pm$ 0,20	-2,17 $\pm$ 0,11
<i>groES</i>	-1,06 $\pm$ 0,20	2,77 $\pm$ 0,42	1,26 $\pm$ 0,18
<i>ompA</i>	1,29 $\pm$ 0,41	1,53 $\pm$ 0,17	-1,59 $\pm$ 0,08
<i>omcA</i>	1,55 $\pm$ 0,36	3,60 $\pm$ 0,53	6,88 $\pm$ 0,81
<i>omcB</i>	1,10 $\pm$ 0,19	2,55 $\pm$ 0,35	2,51 $\pm$ 0,10
<i>pomp91A</i>	2,04 $\pm$ 0,07	2,07 $\pm$ 0,40	-1,30 $\pm$ 0,25
<i>pomp91B</i>	-1,54 $\pm$ 0,15	3,11 $\pm$ 0,57	2,91 $\pm$ 0,31
<i>euo</i>	1,30 $\pm$ 0,32	2,61 $\pm$ 0,32	1,77 $\pm$ 0,92
<i>cpaf</i>	1,22 $\pm$ 0,20	2,84 $\pm$ 0,25	1,08 $\pm$ 0,19
<i>efp2</i>	-1,02 $\pm$ 0,24	1,57 $\pm$ 0,13	-1,49 $\pm$ 0,24
<i>hctA</i>	1,38 $\pm$ 0,32	1,08 $\pm$ 0,41	10,11 $\pm$ 2,27
<i>cadd (CT610)</i>	-1,45 $\pm$ 0,24	1,70 $\pm$ 0,13	2,11 $\pm$ 0,87
<i>ftsW</i>	1,30 $\pm$ 0,19	1,02 $\pm$ 0,23	-1,61 $\pm$ 0,07
<i>ctcC</i>	1,01 $\pm$ 0,27	1,27 $\pm$ 0,16	1,22 $\pm$ 0,43
<i>ctcB</i>	-1,15 $\pm$ 0,10	1,51 $\pm$ 0,32	2,86 $\pm$ 0,15
<i>rpoD (sigA)</i>	1,54 $\pm$ 0,17	1,31 $\pm$ 0,14	1,03 $\pm$ 0,37
<i>rpsD (sig28)</i>	-1,33 $\pm$ 0,09	1,09 $\pm$ 0,26	-2,27 $\pm$ 0,06
<i>rpoN (sig 54)</i>	1,71 $\pm$ 0,12	1,84 $\pm$ 0,10	4,00 $\pm$ 0,90
<i>dcrA</i>	-1,35 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,12	1,12 $\pm$ 0,24
<i>sctN</i>	1,11 $\pm$ 0,22	1,26 $\pm$ 0,15	1,53 $\pm$ 0,16
<i>incA</i>	3,04 $\pm$ 0,38	1,49 $\pm$ 0,12	3,43 $\pm$ 0,81
<i>PP2C (CT259)</i>	1,15 $\pm$ 0,22	-1,02 $\pm$ 0,35	-1,14 $\pm$ 0,23
<i>pknD</i>	-1,20 $\pm$ 0,07	1,33 $\pm$ 0,10	-1,69 $\pm$ 0,06
<i>pkn1</i>	1,17 $\pm$ 0,29	1,01 $\pm$ 0,32	6,30 $\pm$ 0,93
<i>pkn5</i>	-1,45 $\pm$ 0,13	-1,09 $\pm$ 0,05	-1,58 $\pm$ 0,10
<i>hflX</i>	-1,12 $\pm$ 0,22	1,53 $\pm$ 0,34	1,13 $\pm$ 0,11
<i>yhbZ</i>	1,16 $\pm$ 0,74	1,19 $\pm$ 0,27	1,02 $\pm$ 0,20
<i>yphC</i>	1,21 $\pm$ 0,10	-1,23 $\pm$ 0,13	-1,79 $\pm$ 0,09
<i>ychF</i>	1,0 $\pm$ 0,33	1,38 $\pm$ 0,24	1,42 $\pm$ 0,33



<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt  
 Rotfärbung indiziert signifikante Hochregulation ( $\geq$  Faktor 2)  
 Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulation ( $\leq$  Faktor 2)

**Tabelle 10. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener *Cp*, *psittaci*-Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 24 h p.i. (normalisiert gegen *gyrA*), Wirtszelle: HEp2**

Gen	Expressionsänderung (x-fach $\pm$ SD) <sup>a</sup>		
	DAM vs. akut	PenG vs. akut	IFN- $\gamma$ vs. akut
<i>groEL1</i>	1,04 $\pm$ 0,25	2,95 $\pm$ 0,36	-2,38 $\pm$ 0,22
<i>grpE</i>	1,09 $\pm$ 0,27	2,51 $\pm$ 0,36	-1,05 $\pm$ 0,26
<i>dnak (hsp70)</i>	4,76 $\pm$ 0,92	-1,52 $\pm$ 0,20	6,67 $\pm$ 1,67
<i>groES</i>	1,19 $\pm$ 0,24	-1,75 $\pm$ 0,28	-1,92 $\pm$ 0,10
<i>ompA</i>	-1,04 $\pm$ 0,27	1,10 $\pm$ 0,31	1,26 $\pm$ 0,17
<i>omcA</i>	10,0 $\pm$ 4,12	6,67 $\pm$ 2,5	25,0 $\pm$ 8,33
<i>omcB</i>	20 $\pm$ 2,46	20,0 $\pm$ 0,39	12,5 $\pm$ 1,39
<i>pomp91A</i>	3,45 $\pm$ 0,75	3,23 $\pm$ 0,59	6,25 $\pm$ 0,99
<i>pomp91B</i>	3,70 $\pm$ 0,85	2,70 $\pm$ 0,43	2,63 $\pm$ 0,19
<i>euo</i>	1,74 $\pm$ 0,20	-1,22 $\pm$ 0,07	1,60 $\pm$ 0,32
<i>cpaf</i>	-1,79 $\pm$ 0,18	-1,43 $\pm$ 0,10	-2,04 $\pm$ 0,23
<i>efp2</i>	1,15 $\pm$ 0,08	-1,09 $\pm$ 0,36	1,63 $\pm$ 0,42
<i>hctA</i>	25,0 $\pm$ 4,59	4,76 $\pm$ 1,54	7,14 $\pm$ 2,79
<i>cadd (CT610)</i>	-1,15 $\pm$ 0,10	1,22 $\pm$ 0,30	2,55 $\pm$ 0,21
<i>ftsW</i>	2,78 $\pm$ 0,65	4,17 $\pm$ 1,67	2,63 $\pm$ 0,36
<i>ctcC</i>	5,56 $\pm$ 1,98	50,0 $\pm$ 12,9	5,56 $\pm$ 0,56
<i>ctcB</i>	3,33 $\pm$ 0,70	5,26 $\pm$ 1,41	4,76 $\pm$ 1,31
<i>rpoD (sigA)</i>	-1,04 $\pm$ 0,19	-1,75 $\pm$ 0,13	1,27 $\pm$ 0,17
<i>rpsD (sig28)</i>	9,09 $\pm$ 3,54	4,17 $\pm$ 1,22	4,0 $\pm$ 1,14
<i>rpoN (sig 54)</i>	3,22 $\pm$ 0,52	-1,09 $\pm$ 0,11	1,77 $\pm$ 0,14
<i>dcrA</i>	1,01 $\pm$ 0,28	-1,45 $\pm$ 0,20	2,5 $\pm$ 0,46
<i>sctN</i>	-1,56 $\pm$ 0,18	-1,28 $\pm$ 0,04	2,78 $\pm$ 0,40
<i>incA</i>	3,34 $\pm$ 0,68	1,65 $\pm$ 0,49	1,17 $\pm$ 0,55
<i>PP2C (CT259)</i>	4,54 $\pm$ 1,10	-1,05 $\pm$ 0,17	-1,25 $\pm$ 0,11
<i>pknD</i>	-1,20 $\pm$ 0,24	-1,26 $\pm$ 0,09	-1,11 $\pm$ 0,23
<i>pkn1</i>	3,03 $\pm$ 0,25	2,94 $\pm$ 0,38	2,44 $\pm$ 0,31
<i>pkn5</i>	-2,38 $\pm$ 0,17	-2,17 $\pm$ 0,24	-1,89 $\pm$ 0,13
<i>hflX</i>	-2,22 $\pm$ 0,10	-1,1 $\pm$ 0,39	-7,33 $\pm$ 2,34
<i>yhbZ</i>	1,89 $\pm$ 0,44	1,60 $\pm$ 0,33	1,28 $\pm$ 0,37
<i>yphC</i>	-17,39 $\pm$ 0,33	-4,20 $\pm$ 0,22	-53,87 $\pm$ 4,29
<i>ychF</i>	-1,33 $\pm$ 0,09	1,46 $\pm$ 0,22	-4,77 $\pm$ 0,28

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung ± Standardabweichung (SD) dargestellt  
 Rotfärbung indiziert signifikante Hochregulation ( $\geq$  Faktor 2)  
 Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulation ( $\leq$  Faktor 2)

**Tabelle 11. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener *Cp.-psittaci*-Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 36 h p.i. (normalisiert gegen *gyrA*), Wirtszelle: HEp2**

Gen	Expressionsänderung (x-fach ± SD) <sup>a</sup>		
	DAM vs. akut	PenG vs. akut	IFN- $\gamma$ vs. akut
<i>groEL1</i>	2,94±0,71	-1,32±0,15	7,69±1,81
<i>grpE</i>	-1,45±0,12	1,85±0,08	4,17±0,83
<i>dnak (hsp70)</i>	3,13±0,69	3,03±0,95	7,69±2,93
<i>groES</i>	0,71±0,34	1,54±0,36	2,94±0,38
<i>ompA</i>	2,86±0,48	0,75±0,21	4,35±1,01
<i>omcA</i>	6,67±1,90	14,29±4,29	9,09±2,42
<i>omcB</i>	10,0±4,44	9,09±1,40	14,29±4,29
<i>pomp91A</i>	5,26±1,56	3,57±0,87	10,0±3,75
<i>pomp91B</i>	4,35±0,5	3,57±1,44	4,17±1,31
<i>euo</i>	1,44±0,20	2,95±0,71	-1,09±0,87
<i>cpaf</i>	3,03±0,86	1,79±0,08	1,23±0,06
<i>efp2</i>	1,52±0,41	1,86±0,32	-1,02±0,23
<i>hctA</i>	3,45±0,82	1,94±0,13	-1,12±0,10
<i>cadd (CT610)</i>	-1,32±0,17	1,43±0,32	1,46±0,22
<i>ftsW</i>	6,67±1,4	2,78±0,34	2,63±0,55
<i>ctcC</i>	10,0±3,75	7,69±1,81	33,34±8,33
<i>ctcB</i>	5,26±0,91	4,0±0,67	5,55±0,79
<i>rpoD (sigA)</i>	-2,32±0,11	1,10±0,31	1,23±0,31
<i>rpsD (sig28)</i>	4,76±1,06	-1,25±0,24	9,09±1,40
<i>rpoN (sig 54)</i>	2,5±0,28	-1,14±0,30	1,12±0,31
<i>dcrA</i>	-1,27±0,04	1,83±0,11	1,20±0,06
<i>sctN</i>	3,13±1,0	-1,44±0,24	-1,25±0,12
<i>incA</i>	1,46±0,22	2,94±0,67	-1,56±0,21
<i>PP2C (CT259)</i>	-2,17±0,12	2,76±0,34	-1,05±0,37
<i>pknD</i>	1,09±0,21	1,91±0,07	1,02±0,43
<i>pkn1</i>	-1,28±0,07	2,62±0,07	-1,03±0,26
<i>pkn5</i>	-1,75±0,09	-1,16±0,23	-2,17±0,18
<i>hflX</i>	1,32±0,33	1,06±0,09	1,17±0,14
<i>yhbZ</i>	3,36±0,25	1,73±0,13	4,7±0,25
<i>yphC</i>	-12,5±2,33	-4,0±1,33	-10,0±1,78
<i>ychF</i>	2,75±0,36	1,49±0,22	2,35±0,56

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt  
 Rotfärbung indiziert signifikante Hochregulation ( $\geq$  Faktor 2)  
 Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulation ( $\leq$  Faktor 2)

**Tabelle 12. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener *Cp.-psittaci*-Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 48 h p.i. (normalisiert gegen *gyrA*), Wirtszelle: HEp2**

Gen	Expressionsänderung (x-fach $\pm$ SD) <sup>a</sup>		
	DAM vs. akut	PenG vs. akut	IFN- $\gamma$ vs. akut
<i>groEL1</i>	-1,43 $\pm$ 0,12	1,70 $\pm$ 0,27	-1,88 $\pm$ 0,29
<i>grpE</i>	-3,23 $\pm$ 0,66	1,72 $\pm$ 0,22	-3,03 $\pm$ 0,76
<i>dnak (hsp70)</i>	-4,76 $\pm$ 2,06	-3,13 $\pm$ 0,625	-4,76 $\pm$ 1,19
<i>groES</i>	-1,11 $\pm$ 0,09	1,96 $\pm$ 0,25	-2,94 $\pm$ 0,44
<i>ompA</i>	-1,69 $\pm$ 0,14	2,47 $\pm$ 0,17	-2,56 $\pm$ 0,20
<i>omcA</i>	-50,0 $\pm$ 16,67	-7,69 $\pm$ 2,93	-33,33 $\pm$ 8,33
<i>omcB</i>	-14,29 $\pm$ 4,29	-7,14 $\pm$ 1,88	-12,5 $\pm$ 3,41
<i>pomp91A</i>	-5,56 $\pm$ 1,20	-2,70 $\pm$ 0,53	-5,26 $\pm$ 1,41
<i>pomp91B</i>	-9,09 $\pm$ 2,84	-4,17 $\pm$ 0,83	-10,0 $\pm$ 2,86
<i>euo</i>	-3,85 $\pm$ 0,98	-5,55 $\pm$ 1,01	-3,85 $\pm$ 0,99
<i>cpaf</i>	-5,26 $\pm$ 2,32	-1,23 $\pm$ 0,11	-2,30 $\pm$ 0,14
<i>efp2</i>	-3,22 $\pm$ 0,79	-5,56 $\pm$ 0,56	-1,16 $\pm$ 0,05
<i>hctA</i>	-33,33 $\pm$ 8,33	-2,22 $\pm$ 0,18	-50,0 $\pm$ 16,67
<i>cadd (CT610)</i>	-3,45 $\pm$ 1,23	-2,63 $\pm$ 0,25	-2,94 $\pm$ 0,71
<i>ftsW</i>	-3,70 $\pm$ 1,48	-2,56 $\pm$ 0,39	-3,85 $\pm$ 1,07
<i>ctcC</i>	-12,5 $\pm$ 5,36	-8,33 $\pm$ 3,79	-14,29 $\pm$ 4,29
<i>ctcB</i>	-3,57 $\pm$ 0,79	-4,55 $\pm$ 1,69	-5,56 $\pm$ 1,39
<i>rpoD (sigA)</i>	-4,17 $\pm$ 1,84	-2,13 $\pm$ 0,10	-4,17 $\pm$ 0,46
<i>rpsD (sig28)</i>	-7,69 $\pm$ 2,43	-2,00 $\pm$ 0,20	-6,67 $\pm$ 2,5
<i>rpoN (sig 54)</i>	-5,88 $\pm$ 2,04	-2,33 $\pm$ 0,15	-4,17 $\pm$ 0,59
<i>dcrA</i>	-5,88 $\pm$ 1,12	-5,26 $\pm$ 2,23	-3,33 $\pm$ 0,48
<i>sctN</i>	-8,33 $\pm$ 3,07	-1,35 $\pm$ 0,06	-4,55 $\pm$ 0,55
<i>incA</i>	-7,14 $\pm$ 1,59	-1,61 $\pm$ 0,21	-1,85 $\pm$ 0,12
<i>PP2C (CT259)</i>	-8,33 $\pm$ 3,07	-1,19 $\pm$ 0,13	-12,5 $\pm$ 4,80
<i>pknD</i>	-1,49 $\pm$ 0,07	-1,47 $\pm$ 0,22	-5,56 $\pm$ 1,98
<i>pkn1</i>	-1,25 $\pm$ 0,11	-1,42 $\pm$ 0,03	-1,04 $\pm$ 0,18
<i>pkn5</i>	-2,70 $\pm$ 0,78	-2,08 $\pm$ 0,12	-2,22 $\pm$ 0,09
<i>hflX</i>	-3,33 $\pm$ 0,29	1,05 $\pm$ 0,33	-7,38 $\pm$ 0,29
<i>yhbZ</i>	-3,09 $\pm$ 0,34	-1,04 $\pm$ 0,22	-3,28 $\pm$ 0,25
<i>yphC</i>	-10,32 $\pm$ 0,18	-2,77 $\pm$ 0,32	-49,35 $\pm$ 4,77
<i>ychF</i>	-1,11 $\pm$ 0,29	1,78 $\pm$ 0,09	-3,39 $\pm$ 0,44

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung ± Standardabweichung (SD) dargestellt  
 Rotfärbung indiziert signifikante Hochregulation ( $\geq$  Faktor 2)  
 Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulation ( $\leq$  Faktor 2)

**Tabellen 13-16. Expressionsänderungen im mRNA-Level ausgewählter *Cp.-psittaci*-Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen, Wirtszelle Fibroblasten**

**Tabelle 13. Expressionsänderungen im mRNA-Level ausgewählter *Cp.-psittaci*-Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 12 h p.i. (normalisiert gegen *16S rRNA*), Wirtszelle: Fibroblasten**

Gen	Expressionsänderung (x-fach ± SD) <sup>a</sup>		
	DAM vs. akut	PenG vs. akut	IFN-γ vs. akut
<i>omcA</i>	1,13±0,23	-1,72±0,07	0,55±0,07
<i>omcB</i>	-1,04±0,077	-3,42±0,65	-166,7±15,3
<i>ftsW</i>	-2,51±0,69	-3,59±0,31	-1,92±0,08
<i>ctcC</i>	-1,08±0,09	2,04±0,55	1,03±0,1
<i>ctcB</i>	-1,30±0,09	-1,59±0,12	1,38±0,22
<i>yphC</i>	-1,73±0,12	-1,02±0,09	-1,11±0,07

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung ± Standardabweichung (SD) dargestellt  
 Rotfärbung indiziert signifikante Hochregulation ( $\geq$  Faktor 2)  
 Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulierung ( $\leq$  Faktor 2)

**Tabelle 14. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener *Cp.-psittaci*-Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 24 h p.i. (normalisiert gegen *16S rRNA*), Wirtszelle: Fibroblasten**

Gen	Expressionsänderung (x-fach ± SD) <sup>a</sup>		
	DAM vs. akut	PenG vs. akut	IFN-γ vs. akut
<i>omcA</i>	-19,23±1,99	-5,2±1,07	1,26±0,77
<i>omcB</i>	-3,33±0,98	-4,1±0,88	-1,92±0,55
<i>ftsW</i>	-1,18±0,07	-1,06±0,06	-1,27±0,03
<i>ctcC</i>	-6,37±0,94	-1,85±0,04	4,23±0,99
<i>ctcB</i>	-5,22±0,74	-2,98±0,33	-2,97±0,38
<i>yphC</i>	-6,25±0,88	-1,75±0,99	-1,65±0,11

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung ± Standardabweichung (SD) dargestellt  
 Rotfärbung indiziert signifikante Hochregulation ( $\geq$  Faktor 2)  
 Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulierung ( $\leq$  Faktor 2)

**Tabelle 15. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener *Cp.-psittaci*-Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 36 h p. i. (normalisiert gegen *16S rRNA*), Wirtszelle: Fibroblasten**

Gen	Expressionsänderung (x-fach ± SD) <sup>a</sup>		
	DAM vs. akut	PenG vs. akut	IFN-γ vs. akut
<i>omcA</i>	-1052,6±166,9	-714,29±17,43	-3,75±0,99
<i>omcB</i>	-83,3±5,9	-13,89±4,55	-3,88±0,73
<i>ftsW</i>	-7,14±1,2	-9,35±1,05	-3,7±0,56
<i>ctcC</i>	-52,63±4,33	-5,38±1,2	-2,4±0,33
<i>ctcB</i>	-22,76±3,98	-6,44±0,73	-2,98±0,37
<i>yphC</i>	-83,3±5,77	-16,67±1,74	-3,06±0,45

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung ± Standardabweichung (SD) dargestellt  
Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulierung (≤ Faktor 2)

**Tabelle 16. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener *Cp.-psittaci*-Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen zum Zeitpunkt 48 h p.i. (normalisiert gegen *16S rRNA*), Wirtszelle: Fibroblasten**

Gen	Expressionsänderung (x-fach ± SD) <sup>a</sup>		
	DAM vs. akut	PenG vs. akut	IFN-γ vs. akut
<i>omcA</i>	-1063,8±196	-1041,67±113,5	-7,14±0,88
<i>omcB</i>	-250,0±16,5	-78,13±0,96	-3,47±0,54
<i>ftsW</i>	-4,83±0,75	-7,81±0,59	-7,25±0,95
<i>ctcC</i>	-106,0±5,88	-11,23±0,73	-2,96±0,33
<i>ctcB</i>	-59,06±4,71	-9,38±0,77	-4,90±0,31
<i>yphC</i>	-76,9±4,38	-6,25±0,35	-2,78±0,25

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung ± Standardabweichung (SD) dargestellt  
Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulierung (≤ Faktor 2)

**Tabellen 17-20. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener humaner Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion im Vergleich zu uninfizierten Zellen**

**Tabelle 17. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener humaner Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion zum Zeitpunkt 48 h p.i. (normalisiert gegen  $\beta$ -Actin), Wirtszelle: HEp2**

Gen	Expressionsänderung (x-fach $\pm$ SD) <sup>a</sup>			
	akut vs. uninf.	DAM vs. uninf.	PenG vs. uninf.	IFN- $\gamma$ vs. uninf.
<i>mcl-1</i>	1,85 $\pm$ 0,48	2,04 $\pm$ 0,78	-1,32 $\pm$ 0,333	1,47 $\pm$ 0,62
<i>ciap1</i>	4,0 $\pm$ 0,58	6,10 $\pm$ 0,3	3,68 $\pm$ 0,6	3,32 $\pm$ 0,70
<i>ciap2</i>	14,32 $\pm$ 2,39	28,64 $\pm$ 2,13	14,42 $\pm$ 1,51	6,91 $\pm$ 1,28
<i>bcl-2</i>	4,81 $\pm$ 1,88	2,35 $\pm$ 0,6	2,69 $\pm$ 0,55	5,15 $\pm$ 1,03
<i>xiap</i>	1,13 $\pm$ 0,27	3,39 $\pm$ 0,3	1,30 $\pm$ 0,12	2,2 $\pm$ 0,21
<i>surviin</i>	1,57 $\pm$ 0,45	2,64 $\pm$ 0,41	1,78 $\pm$ 0,21	-1,72 $\pm$ 0,38
<i>naip</i>	1,55 $\pm$ 0,51	2,25 $\pm$ 0,66	1,43 $\pm$ 0,38	1,65 $\pm$ 0,2
<i>bruce</i>	1,49 $\pm$ 0,11	3,53 $\pm$ 0,46	2,64 $\pm$ 0,54	2,25 $\pm$ 0,40
<i>ilp-2</i>	-2,4 $\pm$ 0,33	3,6 $\pm$ 0,42	-1,67 $\pm$ 0,08	-1,67 $\pm$ 0,04
<i>livin</i>	5,31 $\pm$ 0,77	53,82 $\pm$ 3,6	4,35 $\pm$ 0,65	2,2 $\pm$ 0,52

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt

Rotfärbung indiziert signifikante Hochregulation ( $\geq$  Faktor 2)

Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulation ( $\leq$  Faktor 2)

uninf. = uninfiziert

**Tabelle 18. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener humaner Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion zum Zeitpunkt 48 h p.i. (normalisiert gegen *gusb*), Wirtszelle: HEp2**

Gen	Expressionsänderung (x-fach $\pm$ SD) <sup>a</sup>			
	akut vs. uninf.	DAM vs. uninf.	PenG vs. uninf.	IFN- $\gamma$ vs. uninf.
<i>mcl-1</i>	1,85 $\pm$ 0,12	2,58 $\pm$ 0,18	1,58 $\pm$ 0,33	4,58 $\pm$ 0,96
<i>ciap1</i>	7,36 $\pm$ 2,33	5,24 $\pm$ 1,76	4,24 $\pm$ 0,74	8,46 $\pm$ 2,55
<i>ciap2</i>	26,36 $\pm$ 4,09	24,59 $\pm$ 5,39	20,54 $\pm$ 3,08	17,63 $\pm$ 4,38
<i>bcl-2</i>	11,43 $\pm$ 3,77	2,98 $\pm$ 0,22	5,56 $\pm$ 1,76	16,06 $\pm$ 2,99
<i>xiap</i>	-1,56 $\pm$ 0,03	-1,10 $\pm$ 0,17	2,08 $\pm$ 0,37	1,92 $\pm$ 0,54
<i>surviin</i>	-1,11 $\pm$ 0,32	-1,41 $\pm$ 0,21	-1,52 $\pm$ 0,13	2,0 $\pm$ 0,36
<i>naip</i>	1,39 $\pm$ 0,14	3,84 $\pm$ 0,92	2,01 $\pm$ 0,43	1,18 $\pm$ 0,29
<i>bruce</i>	1,34 $\pm$ 0,33	5,46 $\pm$ 0,71	3,71 $\pm$ 0,66	1,61 $\pm$ 0,33
<i>ilp-2</i>	-1,92 $\pm$ 0,17	2,41 $\pm$ 0,02	-1,47 $\pm$ 0,24	1,01 $\pm$ 0,56
<i>livin</i>	6,69 $\pm$ 0,92	36,0 $\pm$ 5,07	4,63 $\pm$ 0,87	3,73 $\pm$ 0,77

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt

Rotfärbung indiziert signifikante Hochregulation ( $\geq$  Faktor 2)

uninf. = uninfiziert

**Tabelle 19. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener humaner Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion zum Zeitpunkt 48 h p.i. (normalisiert gegen  $\beta$ -Actin), Wirtszelle: Fibroblasten**

Gen	Expressionsänderung (x-fach $\pm$ SD) <sup>a</sup>			
	akut vs. uninfl.	DAM vs. uninfl.	PenG vs. uninfl.	IFN- $\gamma$ vs. uninfl.
<i>mcl-1</i>	10,27 $\pm$ 0,53	9,15 $\pm$ 0,3	4,59 $\pm$ 0,21	10,37 $\pm$ 0,9
<i>ciap1</i>	2,57 $\pm$ 0,34	3,25 $\pm$ 0,08	2,45 $\pm$ 0,1	2,48 $\pm$ 0,29
<i>ciap2</i>	14,93 $\pm$ 0,71	25,11 $\pm$ 0,72	8,63 $\pm$ 0,65	14,52 $\pm$ 2,88
<i>bcl-2</i>	2,68 $\pm$ 0,35	2,66 $\pm$ 0,04	3,72 $\pm$ 0,24	2,58 $\pm$ 0,72
<i>xiap</i>	2,1 $\pm$ 0,14	4,53 $\pm$ 0,058	1,87 $\pm$ 0,21	1,58 $\pm$ 0,54
<i>surviin</i>	4,17 $\pm$ 0,28	2,28 $\pm$ 0,09	4,96 $\pm$ 0,9	7,01 $\pm$ 0,88
<i>naip</i>	-1,75 $\pm$ 0,05	-2,5 $\pm$ 0,02	-2,56 $\pm$ 0,02	1,39 $\pm$ 0,43
<i>bruce</i>	1,08 $\pm$ 0,10	1,09 $\pm$ 0,02	-1,39 $\pm$ 0,08	2,51 $\pm$ 0,25
<i>ilp-2</i>	1,57 $\pm$ 0,55	2,55 $\pm$ 0,45	1,39 $\pm$ 0,19	5,7 $\pm$ 0,43
<i>livin</i>	-1,69 $\pm$ 0,22	18,64 $\pm$ 0,98	2,83 $\pm$ 0,45	5,66 $\pm$ 0,70

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt

Rotfärbung indiziert signifikante Hochregulation ( $\geq$  Faktor 2)

Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulation ( $\leq$  Faktor 2)

uninfl. = uninfliziert

**Tabelle 20. Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener humaner Gene in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion zum Zeitpunkt 48 h p.i. (normalisiert gegen *gusB*), Wirtszelle: Fibroblasten**

Gen	Expressionsänderung (x-fach $\pm$ SD) <sup>a</sup>			
	akut vs. uninfl.	DAM vs. uninfl.	PenG vs. uninfl.	IFN- $\gamma$ vs. uninfl.
<i>mcl-1</i>	5,81 $\pm$ 1,33	2,05 $\pm$ 0,22	1,64 $\pm$ 0,22	3,85 $\pm$ 0,55
<i>ciap1</i>	1,30 $\pm$ 0,34	-1,19 $\pm$ 0,45	1,04 $\pm$ 0,45	1,16 $\pm$ 0,25
<i>ciap2</i>	7,06 $\pm$ 2,09	6,5 $\pm$ 0,99	3,66 $\pm$ 0,78	6,77 $\pm$ 0,98
<i>bcl-2</i>	1,52 $\pm$ 0,38	-1,66 $\pm$ 0,28	1,33 $\pm$ 0,36	-1,04 $\pm$ 0,37
<i>xiap</i>	1,28 $\pm$ 0,34	1,46 $\pm$ 0,34	1,1 $\pm$ 0,26	1,01 $\pm$ 0,29
<i>surviin</i>	2,55 $\pm$ 0,29	-1,35 $\pm$ 0,08	2,93 $\pm$ 0,55	4,5 $\pm$ 0,77
<i>naip</i>	1,22 $\pm$ 0,33	-1,02 $\pm$ 0,12	-1,49 $\pm$ 0,25	1,7 $\pm$ 0,26
<i>bruce</i>	1,45 $\pm$ 0,75	1,03 $\pm$ 0,39	-1,54 $\pm$ 0,16	-1,08 $\pm$ 0,33
<i>ilp-2</i>	-1,16 $\pm$ 0,23	-1,06 $\pm$ 0,55	-1,35 $\pm$ 0,27	3,18 $\pm$ 0,79
<i>livin</i>	-3,03 $\pm$ 0,55	6,87 $\pm$ 0,98	1,34 $\pm$ 0,33	3,16 $\pm$ 0,66

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt

Rotfärbung indiziert signifikante Hochregulation ( $\geq$  Faktor 2)

Grünfärbung indiziert signifikante Herunterregulation ( $\leq$  Faktor 2)

uninfl. = uninfliziert

**Tabellen 21-24. Expressionsänderungen im *cIAP-2*-mRNA-Level in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion im Vergleich zu uninifizierten Zellen**

**Tabelle 21. Expressionsänderungen im *cIAP-2*-mRNA-Level in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion (normalisiert gegen *β-Actin*), Wirtszelle: HEp2**

Zeit p.i.	Expressionsänderung (x-fach ± SD) <sup>a</sup>			
	akut vs. uninf.	DAM vs. uninf.	PenG vs. uninf.	IFN-γ vs. uninf.
24 h	11,31±3,77	14,83±2,99	9,06±1,28	6,63±1,73
48 h	14,32±2,93	28,64±2,13	14,42±1,51	6,92±1,28
72 h	3,76±2,9	3,56±1,03	3,74±1,33	3,4±1,04
96 h	8,57±1,33	5,24±2,3	5,12±0,70	5,34±1,09

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung ± Standardabweichung (SD) dargestellt  
uninf. = uninifiziert

**Tabelle 22. Expressionsänderungen im *cIAP-2*-mRNA-Level in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion (normalisiert gegen *gusB*), Wirtszelle: HEp2**

Zeit p.i.	Expressionsänderung (x-fach ± SD) <sup>a</sup>			
	akut vs. uninf.	DAM vs. uninf.	PenG vs. uninf.	IFN-γ vs. uninf.
24 h	13,93±2,11	6,96±0,99	8,51±1,35	15,56±5,92
48 h	26,36±3,78	24,59±2,76	20,54±3,99	17,63±3,88
72 h	2,49±0,44	3,23±0,15	5,17±2,17	2,94±0,25
96 h	13,27±1,88	2,69±0,21	5,13±2,4	2,77±0,09

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung ± Standardabweichung (SD) dargestellt  
uninf. = uninifiziert

**Tabelle 23. Expressionsänderungen im *cIAP-2*-mRNA-Level in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion (normalisiert gegen *β-Actin*), Wirtszelle: Fibroblasten**

Zeit p.i.	Expressionsänderung (x-fach ± SD) <sup>a</sup>			
	akut vs. uninf.	DAM vs. uninf.	PenG vs. uninf.	IFN-γ vs. uninf.
24 h	15,84±0,23	12,05±0,12	11,61±0,86	24,36±1,31
48 h	14,92±0,71	25,11±0,72	8,63±0,65	14,52±0,63
72 h	127,23±16,78	58,80±8,61	61,41±1,80	37,56±2,21
96 h	103,95±18,22	13,00±2,59	61,86±17,90	76,39±17,93

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung ± Standardabweichung (SD) dargestellt  
uninf. = uninifiziert



**Tabelle 24. Expressionsänderungen im *cIAP-2*-mRNA-Level in drei verschiedenen Persistenzmodellen sowie akuter Infektion (normalisiert gegen *gusB*), Wirtszelle: Fibroblasten**

Zeit p.i.	Expressionsänderung (x-fach $\pm$ SD) <sup>a</sup>			
	akut vs. uninf.	DAM vs. uninf.	PenG vs. uninf.	IFN- $\gamma$ vs. uninf.
24 h	26,90 $\pm$ 4,72	11,23 $\pm$ 0,72	15,03 $\pm$ 2,71	31,78 $\pm$ 2,06
48 h	7,06 $\pm$ 0,33	6,50 $\pm$ 0,33	3,65 $\pm$ 0,77	6,77 $\pm$ 0,98
72 h	91,8 $\pm$ 5,66	34,01 $\pm$ 5,33	48,78 $\pm$ 5,99	47,56 $\pm$ 0,92
96 h	32,05 $\pm$ 6,72	6,69 $\pm$ 0,97	16,36 $\pm$ 2,03	33,47 $\pm$ 6,08

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt  
uninf. = uninfiziert

**Tabellen 25-26. Expressionsänderungen im *cIAP-2*-mRNA-Level nach Behandlung mit DAM, PenG und IFN- $\gamma$  im Vergleich zu unbehandelten Zellen**

**Tabelle 25. Expressionsänderungen im *cIAP-2*-mRNA-Level nach Behandlung mit DAM, PenG und IFN- $\gamma$  im Vergleich zu unbehandelten Zellen (normalisiert gegen  $\beta$ -Actin)**

Zelllinie	Expressionsänderung (x-fach $\pm$ SD) <sup>a</sup>		
	DAM vs. unbeh.	PenG vs. unbeh.	IFN- $\gamma$ vs. unbeh.
HEp2	1,89 $\pm$ 0,66	2,85 $\pm$ 0,91	1,36 $\pm$ 0,49
Fibroblasten	-1,03 $\pm$ 0,07	-1,64 $\pm$ 0,12	-1,14 $\pm$ 0,22

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt  
unbeh. = unbehandelt

**Tabelle 26. Expressionsänderungen im *cIAP-2*-mRNA-Level nach Behandlung mit DAM, PenG und IFN- $\gamma$  im Vergleich zu unbehandelten Zellen (normalisiert gegen *gusB*)**

Zelllinie	Expressionsänderung (x-fach $\pm$ SD) <sup>a</sup>		
	DAM vs. unbeh.	PenG vs. unbeh.	IFN- $\gamma$ vs. unbeh.
HEp2	-1,14 $\pm$ 0,25	1,92 $\pm$ 0,04	1,21 $\pm$ 0,27
Fibroblasten	1,02 $\pm$ 0,13	-1,09 $\pm$ 0,11	1,38 $\pm$ 0,39

<sup>a</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln sind als x-fache Expressionsänderung  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt, unbeh. = unbehandelt