

Adhärenz- und Invasionsverhalten von C.trachomatis-Isolaten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität
Jena

von Neitah Prietzel-Meyer
geboren am 03.09.1970 in Burgstädt

Gutachter

1. Prof. Dr. E. Straube, Prodekan der Medizinischen Fakultät der FSU Jena
2. Prof. Dr. J. Strobel, Direktor der Universitäts-Augenklinik der FSU Jena
3. Prof. Dr. U. B. Hoyme, Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Erfurt

Tag der öffentlichen Verteidigung: 3. Dezember 2001

Danksagung

Für die Auswahl und Erteilung des Themas für diese Arbeit sowie für die große Unterstützung bei der Auswertung und der schriftlichen Gestaltung gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Straube.

Weiterhin bedanke ich mich für die Unterstützung, die mir durch alle Mitarbeiter des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena zuteil wurde. Besonders danke ich Fr. Rosemarie Seidel und Frl. Bettina Meinung für ihre Hilfe bei der Arbeit mit Zelllinienmodellen. Herrn Dr. Hartmann danke ich für seine konstruktiven Vorschläge und praktischen Hinweise bei der Erstellung und Verbesserung der Versuchsabläufe. Bei Herrn Dr. Rödel bedanke ich mich für seine wertvolle Unterstützung bei der Arbeit mit Primärkulturen. Ebenso danke ich allen anderen unerwähnten Mitarbeitern des Institutes für die kollegiale Organisation der Nutzung der Laborapparaturen.

Ein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Institutes für Versuchstierkunde Jena–Beutenberg für die Unterstützung bei der Materialgewinnung und Präparation.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für die wertvolle moralische Unterstützung.

Meinem Mann, Erik Meyer, danke ich für seine Hilfe bei allen informationstechnischen Problemen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
2	Allgemeine Virulenzmerkmale von Mikroorganismen	2
2.1	Motilität von Mikroorganismen	2
2.2	Adhärenz gramnegativer Bakterien	3
2.3	Invasion und intrazelluläres Überleben	3
3	Chlamydia trachomatis	5
3.1	Geschichte	5
3.2	Biologie	5
3.2.1	Klassifikation	5
3.2.2	Entwicklungszyklus und Morphologie	6
3.2.3	Zellhülle	7
3.2.4	Genom und Metabolismus	7
3.3	Wechselwirkung mit Wirtszellen	8
3.3.1	Adhärenz und Zelleintritt	8
3.3.2	Intrazelluläres Überleben und Wachstum	10
3.3.3	Immunantwort des Wirts und Impfung	11
3.4	Klinische Relevanz	12
3.4.1	Genitale Infektionen	12
3.4.2	Neonatale Infektionen	13
3.4.3	Okuläre und pulmonale Infektionen des Erwachsenen	13
3.4.4	Lymphogranuloma venereum	14
3.5	Diagnose	14
3.5.1	Kultur-Techniken	14
3.5.2	Nichtkultur-Techniken	15
3.5.3	Der „goldene Standard“	17
3.6	Behandlung und Prognose	17
4	Problemstellung	19

5	Materialien und Methoden	20
5.1	Chlamydienisolate	20
5.2	Methoden	21
5.2.1	Adhärenzversuche an kultivierten Laborzellen	21
5.2.2	Adhärenzversuche an Laborzelllinien in Suspension	27
5.2.3	Invasion in Laborzelllinien	30
5.2.4	Adhärenz und Invasion bei humanen Endometriumkulturen	31
5.2.5	Adhärenzversuche an murinen Genitalzellen	37
5.2.6	Invasion in murine Genitalzellkulturen	41
6	Ergebnisse	45
6.1	Einleitung	45
6.2	Vergleich der Chlamydienadhärenz an Zellen im Gewebsverband und artifiziell suspendierten Zellen	46
6.3	Einschätzung der Adhärenz der Chlamydien an Zielzellen als Vi- rulenzfaktor	46
6.4	Beurteilung des Verhaltens des Isolates E ₄₃₄	47
6.5	Selektive Betrachtung der Versuche mit murinen Genitalzellen	48
7	Diskussion	50
7.1	Ist eine Verwendung von suspendierten Zellen im Rahmen eines Adhärenzmodells möglich?	50
7.2	Ist die Adhärenzfähigkeit ein Maß für die Virulenz der untersuch- ten Chlamydienisolate?	53
7.3	Zeigt das Isolat E ₄₃₄ eine größere Virulenz als die anderen Ver- gleichsisolate?	55
8	Zusammenfassung	58
A	Tabellen	60
A.1	Adhärenz an Zelllinien	60
A.1.1	McCoy-Zellen	60
A.1.2	HeLa-Zellen	62
A.2	Invasion in Laborzelllinien	65
A.2.1	McCoy-Zellen	65
A.2.2	HeLa-Zellen	66
A.3	Adhärenz an Endometriumkulturen	67
A.4	Invasion in Endometriumkulturen	68
A.5	Adhärenz an murinen Genitalzellen	71
A.6	Invasion in murinen Genitalzellkulturen	73

B Diagramme	75
B.1 Adhärenz an Zelllinien	75
B.2 Invasion in Zelllinien	76
B.3 Adhärenz an Endometriumkulturen	77
B.4 Invasion in Endometriumkulturen	77
Literaturverzeichnis	78

Abkürzungen

a	Verhältnis von durchschnittlich gebundenen Chlamydien pro Zelle und relativer Einsaat $a = \frac{d_c}{r} * 100\%$
c_{1-4}	Einzelbestimmungen des IFU-Chlamydientiters/ml der entsprechenden Zellart
c_E	absolut eingesetzter Chlamydientiter bezogen auf die Invasion mit Zentrifugation bei McCoy-Zellen
c_{McCoy}	Chlamydientiter in IFU _{mz} /ml durch Invasion mit Zentrifugation bei McCoy-Zellen
c_{mz}	Chlamydientiter in IFU _{mz} /ml durch Invasion mit Zentrifugation bei der entsprechenden Zellart
c_{oz}	Chlamydientiter in IFU _{oz} /ml durch Invasion ohne Zentrifugation bei der entsprechenden Zellart
d_c	Durchschnitt der ausgezählten gebundenen Chlamydien (EK) pro Zelle
d_e	Durchschnitt der ausgezählten Einschlüsse pro Vertiefung bzw. Deckglas
<i>DEAE-</i>	Diethylaminoethyl-
<i>DFA</i>	Direct Fluorescent Antibody (Direkt Fluorescein-markierter Antikörper)
<i>DMEM</i>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Eagles Medium modifiziert nach Dulbecco)
<i>DMFO</i>	Dimethylformamid
<i>DMSO</i>	Dimethylsulfoxid
<i>E</i>	Chlamydieneinschlüsse
e	Chlamydientiter in EK/ml
e_E	eingesetzter Chlamydientiter in EK
<i>EK</i>	Elementarkörperchen
F	Verhältnis der eingesetzten einschlußbildenden Einheiten (Invasion mit Zentrifugation in McCoy-Zellen) in Relation zur Zellzahl $F = \frac{c_E}{z}$
<i>FITC</i>	Fluoresceinisothiocyanat
<i>FKS</i>	Fetales Kälberserum
<i>FSU</i>	Friedrich-Schiller-Universität
<i>HBSS</i>	Hank's Balanced Salt Solution (Hanks ausgewogene Salzlösung)
<i>HEPES</i>	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
<i>IFA</i>	Indirect Fluorescent Antibody (Indirekt Fluorescein-markierter Antikörper)

<i>IFU</i>	Inclusion Forming Unit (Einschlußkörper-bildende Einheit)
<i>IFU_{mz}</i>	IFU-Titer bestimmt durch Inokulation mit Zentrifugation
<i>IFU_{oz}</i>	IFU-Titer bestimmt durch Inokulation ohne Zentrifugation
<i>KBR</i>	Komplementbindungsreaktion
<i>LCR</i>	Ligase Chain Reaction
<i>LGV</i>	Lymphogranuloma venereum
<i>LPS</i>	Lipopolysaccharid
<i>MAC</i>	Membrane Attack Complex (Lytischer Komplex der Komplementkaskade)
<i>MEM</i>	Eagle's Minimum Essential Medium (Eagles minimales essentielles Medium)
<i>MF</i>	Mikrofilament
<i>MOMP</i>	Major Outer Membrane Protein (Hauptprotein der äußeren Membran)
<i>MT</i>	Mikrotubuli
<i>MTT</i>	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (=Thiazolylblau)
<i>NGU</i>	Nicht-Gonokokken-Urethritis
<i>OMP</i>	Outer Membrane Protein (äußeres Membranprotein)
<i>p.i.</i>	post infectionem
<i>PBS</i>	Phosphate Buffered Saline
<i>PCR</i>	Polymerase Chain Reaction
<i>PID</i>	Pelvic Inflammatory Disease (Chronische Adnexitis)
<i>PLT</i>	Psittacose-Lymphogranuloma-Trachoma
<i>p_t</i>	Prozent der einschlußbildenden Chlamydien der angegebenen Zellart in Relation zum IFU-Titer bei McCoy-Zellen $p_t = \frac{c_{mz}}{c_{McCoy}} * 100\%$
<i>p_z</i>	Prozent der einschlußpositiven Zellen an der Gesamtzellzahl pro Vertiefung $p_z = \frac{d_c}{z} * 100\%$
<i>r</i>	Einsaat Chlamydien pro Zelle $r = \frac{c_E}{z}$
<i>RK</i>	Retikularkörperchen
<i>SCID</i>	Severe Combined Immunodeficiency
<i>SDS</i>	Sodiumdodecylsulfat
<i>STD</i>	Sexually Transmitted Disease (Sexuell übertragene Infektion)
<i>TB</i>	Trypanblau (Vitalfärbung)
<i>TRIC</i>	Trachom und Inclusion Conjunctivitis (Einschlußkonjunktivitis)
<i>w</i>	Einschlußpositive Zellen der Vertiefung multipliziert mit $\frac{1}{F}$ (s.o.) $w = \frac{p_z}{F}$
<i>y</i>	Anteil der durch Inkubation ohne Zentrifugation invasionsfähigen Chlamydien am IFU _{mz} -Titer bei McCoy-Zellen $y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}} * 100\%$
<i>z</i>	Zellzahl des Deckglases, der Vertiefung bzw. der Suspension

Abbildungsverzeichnis

3.1	Adhärente E ₁₇₃₃ -Chlamydien an suspendierten McCoy-Zellen . . .	8
3.2	Serovarverteilung urogenitaler Infekte von C.trachomatis	13
3.3	D _{ICCAL8} -Einschlüsse in Endometriumzellen	15
3.4	LGV ₂ -Einschlüsse in adhärennten McCoy-Zellen 17h p.i.	16
5.1	Objektometer	26
5.2	Chlamydienelementarkörper in der Dottersacksuspension	27
5.3	Epitheliale Endometriumzelle	34
5.4	Epitheliale Endometriumzellen im Verband	35
5.5	Endometriale Epithelzellen	36
5.6	Endometriale Stromazellen	37
5.7	Fibroblasten des endometrialen Stromas	38
5.8	Epitheloide Endometriumzellen mit E ₄₃₄ -Einschlüssen	38
5.9	Fibroblasten mit E ₄₃₄ -Einschlüssen	39
5.10	LGV ₂ -Adhärenz an Endometriumzellen	39
5.11	Adhärente Chlamydien an vaginalen Schollen	41
5.12	E ₁₇₃₃ -Einschlüsse in murinen Genitalzellen	44
6.1	Atypische Chlamydieneinschlüsse	48
6.2	Chlamydieneinschlüsse (F ₁₇₃₅) in murinen Genitalzellen	49
7.1	Adhärente E ₁₇₃₃ -Chlamydien an suspendierten HeLa-Zellen . . .	51
7.2	McCoy-Zellkultur mit Adhärenz von E ₁₇₃₃ -Chlamydien	52
7.3	Adhärente E ₄₃₄ -Chlamydien an humanen Endometriumzellen . . .	54
7.4	D _{ICCAL8} -Einschlüsse in humanen Fibroblasten	57
B.1	Adhärenz mit Zentrifugation an Zelllinienkulturen	75
B.2	Adhärenz ohne Zentrifugation an Zelllinienkulturen	76
B.3	Invasion in Zelllinienkulturen	76
B.4	Adhärenz an Endometriumkulturen	77
B.5	Invasion in Endometriumkulturen	77

Tabellenverzeichnis

3.1	C.trachomatis: Beziehung Serovar-Krankheit/Syndrom	6
5.1	Charge, Passage und Q der Chlamydienisolate	20
A.1	LGV ₂ -Adhärenz an McCoy-Zellschicht	60
A.2	LGV ₂ -Adhärenz an McCoy-Zellen in Suspension	60
A.3	D _{ICCAL8} -Adhärenz an McCoy-Zellschicht	60
A.4	D _{ICCAL8} -Adhärenz an McCoy-Zellen in Suspension	61
A.5	E ₄₃₄ -Adhärenz an McCoy-Zellschicht	61
A.6	E ₄₃₄ -Adhärenz an McCoy-Zellen in Suspension	61
A.7	E ₁₇₃₃ -Adhärenz an McCoy-Zellschicht	61
A.8	E ₁₇₃₃ -Adhärenz an McCoy-Zellen in Suspension	61
A.9	F ₁₇₃₅ -Adhärenz an McCoy-Zellschicht	62
A.10	F ₁₇₃₅ -Adhärenz an McCoy-Zellen in Suspension	62
A.11	F ₁₇₃₀ -Adhärenz an McCoy-Zellschicht	62
A.12	F ₁₇₃₀ -Adhärenz an McCoy-Zellen in Suspension	62
A.13	LGV ₂ -Adhärenz an HeLa-Zellschicht	62
A.14	LGV ₂ -Adhärenz an HeLa-Zellen in Suspension	63
A.15	D _{ICCAL8} -Adhärenz an HeLa-Zellschicht	63
A.16	D _{ICCAL8} -Adhärenz an HeLa-Zellen in Suspension	63
A.17	E ₄₃₄ -Adhärenz an HeLa-Zellschicht	63
A.18	E ₄₃₄ -Adhärenz an HeLa-Zellen in Suspension	63
A.19	E ₁₇₃₃ -Adhärenz an HeLa-Zellschicht	64
A.20	E ₁₇₃₃ -Adhärenz an HeLa-Zellen in Suspension	64
A.21	F ₁₇₃₅ -Adhärenz an HeLa-Zellschicht	64
A.22	F ₁₇₃₅ -Adhärenz an HeLa-Zellen in Suspension	64
A.23	F ₁₇₃₀ -Adhärenz an HeLa-Zellschicht	64
A.24	F ₁₇₃₀ -Adhärenz an HeLa-Zellen in Suspension	65
A.25	IFU-Titerbestimmung mit Zentrifugation bei McCoy-Zellen	65
A.26	LGV ₂ -Invasion in adhärenen McCoy-Zellen	65
A.27	D _{ICCAL8} -Invasion in adhärenen McCoy-Zellen	65
A.28	E ₄₃₄ -Invasion in adhärenen McCoy-Zellen	65
A.29	E ₁₇₃₃ -Invasion in adhärenen McCoy-Zellen	66
A.30	F ₁₇₃₅ -Invasion in adhärenen McCoy-Zellen	66

A.31 F ₁₇₃₀ -Invasion in adhärenen McCoy-Zellen	66
A.32 IFU-Titerbestimmung mit Zentrifugation bei HeLa-Zellen	66
A.33 LGV ₂ -Invasion in adhärenen HeLa-Zellen	66
A.34 D _{ICCAL8} -Invasion in adhärenen HeLa-Zellen	66
A.35 E ₄₃₄ -Invasion in adhärenen HeLa-Zellen	67
A.36 E ₁₇₃₃ -Invasion in adhärenen HeLa-Zellen	67
A.37 F ₁₇₃₅ -Invasion in adhärenen HeLa-Zellen	67
A.38 F ₁₇₃₀ -Invasion in adhärenen HeLa-Zellen	67
A.39 LGV ₂ -Adhärenz an Endometriumkulturen	67
A.40 D _{ICCAL8} -Adhärenz an Endometriumkulturen	67
A.41 E ₄₃₄ -Adhärenz an Endometriumkulturen	68
A.42 E ₁₇₃₃ -Adhärenz an Endometriumkulturen	68
A.43 F ₁₇₃₅ -Adhärenz an Endometriumkulturen	68
A.44 F ₁₇₃₀ -Adhärenz an Endometriumkulturen	68
A.45 LGV ₂ -Invasion mit Zentrifugation in Endometriumkulturen	68
A.46 LGV ₂ -Statische Invasion in Endometriumkulturen	69
A.47 D _{ICCAL8} -Zentrifugationsassistierte Invasion in Endometriumkul- turen	69
A.48 D _{ICCAL8} -Invasion ohne Zentrifugation in Endometriumkulturen	69
A.49 E ₄₃₄ -Invasion mit Zentrifugation in Endometriumkulturen	69
A.50 E ₄₃₄ -Invasion ohne Zentrifugation in Endometriumkulturen	69
A.51 E ₁₇₃₃ -Invasion mit Zentrifugation in Endometriumkulturen	70
A.52 E ₁₇₃₃ -Invasion ohne Zentrifugation in Endometriumkulturen	70
A.53 F ₁₇₃₅ -Invasion mit Zentrifugation in Endometriumkulturen	70
A.54 F ₁₇₃₅ -Invasion ohne Zentrifugation in Endometriumkulturen	70
A.55 F ₁₇₃₀ -Invasion mit Zentrifugation in Endometriumkulturen	70
A.56 F ₁₇₃₀ -Invasion ohne Zentrifugation in Endometriumkulturen	71
A.57 LGV ₂ -Adhärenz an Vaginalzellen 10/95 (SCID-Mäuse)	71
A.58 LGV ₂ -Adhärenz an Vaginalzellen 10/95 (BALB C-Mäuse)	71
A.59 D _{ICCAL8} -Adhärenz an Vaginalzellen 10/95 (SCID-Mäuse)	71
A.60 D _{ICCAL8} -Adhärenz an Vaginalzellen 10/95 (BALB C-Mäuse)	71
A.61 Abhängigkeit der Adhäsionsfähigkeit des D-Stammes von der Zell- vitalität bei Vaginalzellen (BALB/C-Mäuse)	72
A.62 E ₄₃₄ -Adhärenz an Vaginalzellen 01/96 (BALB C-Mäuse) im Ver- gleich zu LGV ₂	72
A.63 E ₄₃₄ -Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (BALB C-Mäuse)	72
A.64 E ₄₃₄ -Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (SCID-Mäuse)	72
A.65 E ₁₇₃₃ -Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (BALB C-Mäuse)	72
A.66 E ₁₇₃₃ -Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (SCID-Mäuse)	72
A.67 F ₁₇₃₅ -Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (BALB C-Mäuse)	73
A.68 F ₁₇₃₅ -Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (SCID-Mäuse)	73
A.69 F ₁₇₃₀ -Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (BALB-Mäuse)	73
A.70 F ₁₇₃₀ -Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (SCID-Mäuse)	73

A.71 LGV ₂ -Invasion mit Zentrifugation in murinen Genitalzellkulturen	73
A.72 LGV ₂ -Invasion ohne Zentrifugation in murinen Genitalzellkulturen	73
A.73 D _{ICCAL8} -Invasion mit Zentrifugation in murinen Genitalzellkulturen	74
A.74 E ₄₃₄ -Invasion mit Zentrifugation in murinen Genitalzellkulturen .	74
A.75 E ₁₇₃₃ -Invasion mit Zentrifugation in murinen Genitalzellkulturen .	74
A.76 F ₁₇₃₅ -Invasion mit Zentrifugation in murinen Genitalzellkulturen .	74
A.77 F ₁₇₃₀ -Invasion mit Zentrifugation in murinen Genitalzellkulturen .	74

Kapitel 1

Einführung

Weltweit spielt die Gattung *Chlamydia* als Infektionserreger eine immer größere Rolle. Chlamydien werden momentan für mehr als die Hälfte der sexuell übertragenen Krankheiten verantwortlich gemacht (Piot et al., 1994). Die Isolationsraten in besonders stark urbanisierten Regionen werden mit bis zu 22% der sexuell aktiven Frauen angegeben (Friesen, 1988). Damit steigt das Risiko für Folgeerkrankungen von Neugeborenen. In Entwicklungsländern ist das Trachom, eine ebenfalls von *C.trachomatis* verursachte Infektion der Bindehaut, als häufigste Ursache von Blindheit gefürchtet. Im Rahmen ihres einzigartigen Entwicklungszyklusses sind zwei unterschiedlich angepasste Lebensformen existent. Der extrazelluläre Elementarkörper ist widerstandsfähig, während die intrazellulären Retikularkörper relativ empfindliche Formen darstellen. Die ausschließlich intrazelluläre Vermehrung führt zu einer Kolonisierung der Wirtszellen. Dabei füllt die sich mit Chlamydien (Retikularkörper) anreichernde Vakuole den plasmatischen Raum aus und ummantelt den Nukleus. Diesem Erscheinungsbild verdanken die Chlamydien ihren Namen (*chlamys* griechisch für über die Schulter hängender Mantel). Die zunehmende Füllung dieser Vakuole führt zur Ruptur der Wirtszelle und neue infektiöse Partikel (Elementarkörper) werden freigesetzt.

Persistenz und Ausmaß der Infektion hängen zum Teil von der Adhärenz und der nachfolgenden Invasion der Chlamydien bei den entsprechenden Zielzellen ab. An der Identifizierung der Anheftungsstrukturen der Chlamydien und der Rezeptoren an der Wirtszelle wird gearbeitet, wobei momentan noch keine eindeutigen Erkenntnisse veröffentlicht worden sind. Genauso wenig ist es heute klar, warum bestimmte Stämme epidemiologisch eine größere Rolle spielen als andere. Deshalb wurden in vorangegangenen Inokulationsversuchen an der Friedrich-Schiller-Universität am Tiermodell Maus verschiedene *C.trachomatis*-Isolate getestet. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede, die durch quantitative Untersuchungen der in-vitro-Adhärenz- und Invasionsfähigkeit an permanenten epithelialen Zellen, humanen Endometriumzellen sowie murinen Epithelzellen des Genitalbereiches in dieser Studie verifiziert werden sollen.

Kapitel 2

Allgemeine Virulenzmerkmale von Mikroorganismen

Virulenz ist definiert als die Fähigkeit eines Mikroorganismus, eine Infektion zu verursachen. Als Virulenzfaktor gelten Produkte oder Strategien des Organismus, die zur Virulenz beitragen. Virulenzfaktoren sind immer direkt mit dem Infektionsgeschehen assoziiert. Sie können in zwei Gruppen klassifiziert werden. Einerseits in Faktoren, die zu einer Kolonisation und Invasion der Erreger führen, andererseits in solche, die eine Schädigung des Wirts bzw. der Wirtszelle zur Folge haben (z.B. Exotoxine) (Salyers und Whitt, 1994).

2.1 Motilität von Mikroorganismen

Motilität ist besonders an Eintrittsorten mit stetigem Flüssigkeitsstrom von Bedeutung und von großem Nutzen beim Durchwandern von Schleimschichten im Gastrointestinaltrakt (Proteus). Dennoch ist sie nicht für alle pathogenen Keime essentiell.

Auch die Art der Motilität der Erreger ist entscheidend. Flagellenmotilität hat ihr Optimum im niedrigen Viskositätsbereich und ist daher innerhalb des menschlichen Organismus von minderer Bedeutung. Lediglich die schraubenförmige Bewegung der Spirochäten spielt bei höherer Viskosität und auf Zelloberflächen eine Rolle. Intrazelluläre Bewegungen erfolgen durch Interaktion mit dem Zytoskelett. Insgesamt bleibt zu beachten, daß Motilität ein Wechselspiel zwischen Erreger und Wirt darstellt, wobei die Motilität der Wirtszelle selbst (Mykobakterien) bzw. deren Oberflächenbeschaffenheit ein nicht unerheblicher Faktor ist (Salyers und Whitt, 1994).

2.2 Adhärenz gramnegativer Bakterien

Nachdem Erreger die Wirtszelloberfläche erreicht haben, ist der erste Schritt auf dem Weg zur Kolonisation des Wirts die Adhärenz. Das ist besonders wichtig an Oberflächen mit Flüssigkeitsstrom, z.B. im gesamten Gastrointestinaltrakt und im Bereich der Harnwege. Nur wenn ein bindungsfähiger Ort (Adhäsionsrezeptor) vorhanden ist, wird der Erreger in der Lage sein, an diesem Ort zu verharren. Die Brownsche Bewegung kann Partikel sowohl in Richtung der Zelle, aber auch entgegen bewegen, wenn dies nicht durch eine suffiziente Verbindung zwischen Mikroorganismus und Wirt verhindert wird. Bei den gramnegativen Bakterien gibt es zwei Arten von Adhärenz an Wirtszellen, die durch Fimbrien bzw. Pili vermittelte und die Adhärenz durch Adhäsine.

Der Rezeptor auf der Seite des Wirtes wird meist durch einen Zuckerrest eines Glykolipids oder Glykoproteins gebildet. Diese Moleküle können über intrazelluläre Signaltransduktion die Endozytose des Bakteriums veranlassen. Die Häufigkeitsverteilung dieser Rezeptorstrukturen entscheidet über den Prädilektionsort der Infektion.

Pili und Fimbrien unterliegen einer ständigen Regeneration als Folge von Umwelteinflüssen und der Abwehrreaktion des Wirtes. Der Sinn einer fimbrienvermittelten Adhärenz besteht möglicherweise einerseits in einer Vermeidung der elektrostatischen Abstoßung durch eine Näherung der Zellmembranen. Andererseits kann sie als erste Kontaktfindung verstanden werden, der eine festere Verbindung durch membranständige Adhäsine folgt.

Afimbriale Adhäsine (wie im Fall der Chlamydien) erzeugen eine feste Bindung zwischen Bakterium und Wirtszelle.

2.3 Invasion und intrazelluläres Überleben

Einige Bakterien haben Mechanismen entwickelt, mit denen sie auch Zellen besiedeln können, die nicht zur Phagozytose befähigt sind. Die Anbindung löst in der Folge eine Veränderung des Zytoskeletts aus. Letztere führt zu einer Internalisierung des Bakteriums. Ähnlich wie bei den phagozytierenden Zellen kommt es dabei zur Ausbildung von Pseudopodien durch De- bzw. Repolymerisation von Actinfilamenten. Ein Teil der Bakterien ist in der Lage, nach der Internalisierung die Vesikelmembran zu zerstören und ins Zytoplasma der Wirtszellen überzutreten. Die Ursache liegt meist in einem bakteriellen membranständigen Protein, das Lipide der Wirtszellmembran zu degradieren vermag. Der Vorteil gegenüber dem intravesikulären Wachstum liegt im Schutz vor der Verdauung in den Vesikeln und vor Exozytose der Vesikel. Die Bewegung im Zytoplasma erfolgt durch Interaktion mit dem Zytoskelett.

Ein intrazelluläres, intravesikuläres Wachstum der Bakterien kann wie auch im Fall der Chlamydien durch eine Verhinderung der Fusion der Endosomen mit

den Lysosomen der Wirtszellen möglich werden.

Die dritte Möglichkeit besteht in der Beeinträchtigung der Effektivität der lysosomalen Enzyme, nachdem die Fusion stattgefunden hat. Hierzu gehört die Produktion von Enzymen, z.B. Katalase und Superoxid-Dismutase, die toxische Formen des Sauerstoffs entgiften können. Mitunter können Bestandteile der Zellwand primär resistent gegen lysosomale Proteasen und Lysozyme sein. Einzig wirksame Abwehrreaktionen der Makroorganismen resultieren dann aus aktivierten Makrophagen und toxischen T-Zellen (Salyers und Whitt, 1994).

Kapitel 3

Chlamydia trachomatis

3.1 Geschichte

In den Jahren 1929/1930 wurden die ersten Organismen dieser Gattung im Zusammenhang mit der Psittacose bei Mensch und Vogel isoliert (Bedson et al., 1930). Im gleichen Zeitraum entdeckte man den Erreger des Lymphogranuloma-venereum-Syndroms. Erst in den späten fünfziger Jahren gelang die Isolierung der für das Trachom verantwortlichen Keime in Hühnerembryos (T'ang et al., 1957). Kurz danach wurden die Erreger genitaler Infektionen des Erwachsenen und der Neugeborenen-Einschlußkonjunktivitis entlarvt (Jones et al., 1959). Identische Organismen wurden bei Männern mit NGU (Nicht-Gonokokken-Urethritis) gefunden (Dunlop et al., 1965). Da man diese Organismen nicht weiter unterscheiden konnte, wurden sie „TRIC agents“ genannt. TRIC steht für **T**rachom und **I**nclusion **C**onjunctivitis (Einschlußkonjunktivitis). Sie gehörten wiederum der PLT-Gruppe (**P**sittacose-**L**ymphogranuloma-**T**rachoma) an. Später wurde ihnen der Gattungsname Chlamydia zugeordnet. 1986 beschrieb Grayston eine neue Gruppe von Chlamydien (TWAR-Gruppe) (Grayston et al., 1986), der 1989 der Name C. pneumoniae (Erreger systemischer und respiratorischer Infektionen) zugeordnet wurde.

3.2 Biologie

3.2.1 Klassifikation

Die Gattungen Chlamydia und Chlamydophila gehören zur Familie der Chlamydiaceae, diese wiederum zur Ordnung der Chlamydiales (Everett et al., 1999). Die Gattung Chlamydia umfaßt drei Arten: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum* und *Chlamydia suis*. Zur Gattung Chlamydophila gehören zum Beispiel *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila pecorum* und andere Arten (Everett et al., 1999). Die Art C.trachomatis wird in die Biovare

Trachoma, Lymphogranuloma venereum und Maus eingeteilt (siehe Tabelle 3.1).

Aufgrund unterschiedlicher Strukturen antigener Oberflächenproteine (vor allem des **Major Outer Membrane Proteins** (MOMP)) teilt man Chlamydia trachomatis in verschiedene Serovare ein (Stephens et al., 1982).

Krankheit/Syndrom	Biovar	Häufigste Serovare
Trachom	Trachoma	A, B, Ba, C
Einschlußkonjunktivitis	Trachoma	D, E, F, G, H, I, J, K
Urethritis, Zervizitis, Salpingitis, (Pharyngitis, Otitis media)	Trachoma	D, E, F, G, H, I, J, K
Lymphogranuloma venereum (Syn.: Lymphogranuloma inguinale, Lymphopathia venerea, Morbus Durand–Nicolas–Favre)	Lymphogranuloma venereum	L ₁ , L ₂ , L ₃
Maus–Pneumonien	Maus	MoPn

Tabelle 3.1: C.trachomatis: Beziehung Serovar–Krankheit/Syndrom (Fields und Barnes, 1992)

3.2.2 Entwicklungszyklus und Morphologie

Chlamydien unterliegen einem komplizierten Entwicklungszyklus. Dabei unterscheidet man zwei morphologisch und funktionell differierende Lebensformen. Die Elementarkörper (EK) (300 nm) stellen die kleinere, hauptsächlich extrazelluläre, sporenhähnliche Überlebensform dar und sind gleichzeitig infektiös (Fields und Barnes, 1992). Sie sind metabolisch inaktiv und haben eine widerstandsfähige starre Hülle (Taylor-Robinson und Thomas, 1980). Der größere Retikularkörper (RK) (bis 1 μm) ist die intrazelluläre, stoffwechselaktive Form. Beide Formen sind kugelig bis oval (Kayser und Bienz, 1989). Das infektiöse Partikel (Elementarkörper) adhärirt an der Wirtszelloberfläche und wird danach durch Phago- bzw. Pinozytose aufgenommen. Anschließend durchläuft es eine Phase der Umorganisation und bildet nach ca. 12h den Retikularkörper. Dieser beginnt nun, sich binär zu teilen. Bereits 40h post infectionem (p.i.) sind die meisten RK wieder in EK zurückorganisiert. 48h–72h p.i. platzt die Wirtszelle. Die freigesetzten EK können erneut Zellen infizieren. Der gesamte Entwicklungszyklus beansprucht damit eine Zeit von 2–3 Tagen (Taylor-Robinson und Thomas, 1980). Unter Einfluß von Interferonen (besonders γ) und Tumornekrosefaktor α wird das intrazelluläre Wachstum von Chlamydien gehemmt. Dabei kommt es zur Bildung von abnormen Retikularkörperchen, die persistieren und nicht in Elementarkörperchen zurückgewandelt werden. Es bilden sich besonders große Einschlußkörper, die nachfolgend eine ständige Quelle chlamydialen Materials sein können.

3.2.3 Zellhülle

Die Zellhülle weist Ähnlichkeit mit der Membran gramnegativer Stäbchen auf. Bei gramnegativen Bakterien besteht sie aus einer Zytoplasmamembran und einer äußeren Membran. Dazwischen liegt die Zellwand und ein Spalt, der periplasmatischer Raum genannt wird. In diesem Raum liegt die bei gramnegativen Bakterien nur spärlich vorkommende Muraminsäure. Im Trockengewicht macht die Muraminsäure bei gramnegativen Bakterien im allgemeinen nur 10% der Zellwand aus. Trotz Empfindlichkeit der EK-Synthese gegenüber Penicillin konnte jedoch Muraminsäure in der Zellwand der Chlamydien nicht nachgewiesen werden (Kaysner und Bienz, 1989).

Die äußere Membran besteht aus LPS und äußeren Membranproteinen. Die Rigidität der Membran entsteht durch Disulfidvernetzungen des MOMP, welches einen ca. 60%igen Anteil des Trockengewichtes der äußeren Membran stellt (Caldwell et al., 1981). Die Disulfidbrücken konnten in EK, nicht aber in RK nachgewiesen werden (Newhall und Jones, 1983). Das MOMP enthält gattungs-, art- und serotypspezifische Epitope (Stephens et al., 1982; Zhang et al., 1987). Zysteinreiche Proteine machen einen weiteren großen Bestandteil der äußeren Membran aus. Sie kommen fast nur bei Elementarkörpern vor und existieren bei den okulogenitalen Stämmen in zwei verschiedenen Molekulargewichten von 12 und 59kDa (OMP2, OMP3) (Batteiger et al., 1985).

Das LPS enthält ein gattungsspezifisches Epitop (KDO_p(2–8) KDO_p(2–4) KDO), welches zur Identifizierung genutzt wird. Es besteht aus einer Lipid- und einer Oligo- bzw. Polysaccharidkomponente.

3.2.4 Genom und Metabolismus

Genom: Chlamydien besitzen eines der kleinsten Genome unter den Bakterien ($5 - 10 \cdot 10^5$ Basenpaare (Kingsbury, 1969; Sarov und Becker, 1969; Frutos et al., 1989)). Die Ursache für diese Winzigkeit liegt vermutlich am Mangel des Genoms für Energie produzierende Enzyme (Moulder, 1962). Das Genom der Elementarkörper liegt in hochkondensierter Form vor, dem Nukleoid von Endosporen relativ ähnlich (Costerton et al., 1976). Das genetische Material der Retikularkörperchen ist in einem aufgelockertem Zustand, der dem anderer metabolisch aktiver Bakterien sehr nahe kommt (Fields und Barnes, 1992).

Die Trachoma- und LGV-Biophage von *C. trachomatis* und *C. psittaci*-Stämme besitzen ein 7–7.5 kb Plasmid unbekannter Funktion (Lovett et al., 1980). Bei *C. pneumoniae* ist ein solches Plasmid nicht vorhanden (Campbell et al., 1987). Die MOMP-Gene vieler LGV- und Trachoma-Stämme waren bereits in den 80er Jahren kloniert und sequenziert worden (Stephens et al., 1985; Stephens et al., 1987). Auch Enzyme, die für die Herstellung des LPS notwendig sind, wurden in diesem Zeitraum kloniert (Nano und Caldwell, 1985). Mittlerweile sind die Genome von *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* und *C. psittaci* vollständig sequenziert.

Metabolismus: Als Energieparasiten produzieren Chlamydien kein ATP (Moulder, 1962). Sie erhalten ATP durch Wirtstransfer (Fields und Barnes, 1992), wie die erhöhte Anzahl von Mitochondrien um die Einschlußkörper in der Wirtszelle belegt (Matsumoto, 1981). Chlamydien sind nicht in der Lage, Zytochrome und andere Verbindungen der Atemkette zu erzeugen. Als Energie freisetzende Prozesse spielen daher nur Beipässe wie die Glykolyse (Ormsbee und Weiss, 1963) und der Pentosephosphat-Stoffwechsel (Moulder et al., 1965) eine Rolle.

Chlamydien scheinen fähig zu sein, ihre eigene RNA- und Proteinsynthese ohne die Anwesenheit einer Wirtszelle durchzuführen (Alexander, 1968), denn sie besitzen Ribosomen und eine RNA-Polymerase (Sarav und Becker, 1971). Als Aminosäurenquelle zieht man den Wirtspool in Betracht, aber Chlamydien sind auch in der Lage, einige wenige Aminosäuren (z.B. Arginin) aus verschiedenen Vorstufen herzustellen (Treuhaft und Moulder, 1968). Gereinigte RK zeigen eine geringe in vitro-Proteinsynthese (Hatch et al., 1985). Für die RNA-Synthese werden ebenfalls vom Wirtspool Nukleotide abgezogen (Hatch, 1975).

C.trachomatis (nicht aber C.pneumoniae und C. psittaci) ist zur Glykogenproduktion befähigt (Fields und Barnes, 1992). Daher sind Glykogeneinlagerungen in C.trachomatis-Einschlüssen mit Jodfärbungen nachweisbar.

3.3 Wechselwirkung mit Wirtszellen

3.3.1 Adhärenz und Zelleintritt

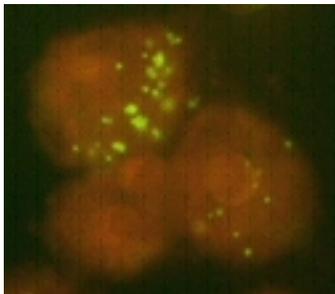


Abbildung 3.1: Adhärenz Chlamydien (E₁₇₃₃) an suspendierten McCoy-Zellen, 2290fache Vergrößerung, Immunfluoreszenz

C.trachomatis ist in der Lage, in nicht phagozytierende Wirtszellen einzudringen. Je nach Zellart gibt es zwei unterschiedliche Eintrittsmechanismen. Rezeptorvermittelte Endozytose und rezeptorunabhängige Phagozytose werden beschrieben (Söderlund und Kihlström, 1983). Für polarisierte Epithelzellen spielt wahrscheinlich die rezeptorvermittelte Endozytose unter Ausbildung von *clathrin coated pits* (mit Clathrin ummantelte Einsenkungen in die Zelle) eine entscheidende Rolle. Bei nicht polarisierten Zellen erfolgt die Chlamydienaufnahme nicht mittels *clathrin coated pits* (Wyrick et al., 1989).

Der Rezeptor an der Wirtszelle wurde bisher noch nicht identifiziert. Bei den LGV-Stämmen könnte es sich um Proteine bzw. Glycoproteine handeln, weil

die Adhärenz dieser Stämme durch eine Trypsinvorbehandlung der Zellen eingeschränkt werden kann (Byrne und Moulder, 1978). Dieses Phänomen ist für die Trachoma-Stämme nicht nachweisbar (Lee, 1981).

Ebenso wie es verschiedene Eintrittsarten der Chlamydien in die Wirtszelle gibt, existieren wahrscheinlich auch mehrere Mechanismen der Anbindung der Chlamydien an die Zielzelle. Das wäre eine sinnvolle Interpretation der sehr widersprüchlichen Ergebnisse auf der Suche nach der Adhäsionsstruktur.

Die chlamydiale Adhärenz zur Zelle kann durch Zugabe von Heparin bzw. Heparansulfat beeinflusst werden. Niedrige Dosen Heparansulfat können die Anbindungsrate von *C. trachomatis* an Säugetierzellen um 50% steigern. Höhere Wirkstoffkonzentrationen inhibieren den Eintritt. Bei dem LGV-Biovar gibt es dieses Muster nicht, der Eintritt wird in jedem Fall inhibiert. Es besteht eine völlige Unabhängigkeit der Adhärenzeinschränkung durch Heparansulfatzugabe von der Adhärenzsteigerung durch Diethylaminoethyl(DEAE)-Dextran-Vorbehandlung der Zellen. Dieses Phänomen, nur für das Trachoma-Biovar beschrieben (Stephens, 1994; Chen und Stephens, 1994), deutet an, daß es für dieses Biovar auch einen Heparin-unempfindlichen Adhärenzmechanismus geben muß. In Untersuchungen, die sich speziell mit dem Serovar B befaßten, wurde gezeigt, daß die Infektiösität dieses Serovars weniger durch Heparitinase und Heparansulfat beeinflussbar ist (Chen und Stephens, 1994). Neuere Untersuchungen haben in dieser Hinsicht interessante Aufschlüsse gebracht. Su und Kollegen zeigten, daß eine Heparitinase-Behandlung von HeLa-Zellen bzw. ein exogener Heparansulfatzusatz zu HeLa-Zellen eine Anbindung sowohl von ganzen Elementarkörpern als auch isolierten MOMP-Genprodukten verhindern kann (Su et al., 1996). Sie interpretieren diese Ergebnisse so, daß es sich bei den Zellrezeptoren um Heparansulfat handelt, welches das MOMP bindet. Auch Berlau und Kollegen konnten zeigen, daß glykosilierte Bestandteile des MOMP bei der Anbindung an humanen Wirtszellen beteiligt sind (Berlau et al., 1997). Andere Autoren demonstrierten jedoch, daß polyklonale Antikörper gegen das MOMP die Infektiösität neutralisieren, nicht aber Adhärenz und Penetration der Organismen einschränken können (Caldwell und Perry, 1982; Fan und Stevens, 1997). Weitere Untersuchungen mit HeLa-Zellen haben angedeutet, daß das OMP2 von *C. psittaci* Interaktionen mit den HeLa-Zellen zeigt. OMP2 kommt nur bei der infektiösen Form der Chlamydien (EK) vor und bindet die HeLa-Zelle auch in isolierter Form (Ting et al., 1995).

Zusätzlich zu spezifischen Rezeptor-Ligand-Verbindungen gibt es ladungsabhängige Interaktionen. DEAE-Dextran-Vorbehandlung der Zellen (also eine Einbringung von positiv geladenen Molekülen) verstärkt die Anbindung und Invasion von Trachoma-Stämmen, nicht aber von *C. psittaci* und den LGV-Stämmen (Kuo et al., 1973).

Zusammenfassend kann man sagen, daß diese erwähnten Versuche an Laborzelllinien durchgeführt wurden und daher für den Vergleich mit den natürlichen Zielzellen von möglicherweise untergeordneter Bedeutung sind. Es bedarf also hier

neuer Ideen zum Versuchsaufbau und vor allem der Einbeziehung von Primärkulturen in die Untersuchungen der Mechanismen. Auch die bestehenden Unterschiede zwischen LGV- und Trachoma-Stämmen sollten näher beleuchtet werden, da vielleicht darin ein Schlüssel zu neuen wertvollen Erkenntnissen liegen kann.

3.3.2 Intrazelluläres Überleben und Wachstum

Das intrazelluläre Überleben der Chlamydien ist nur durch die Verhinderung der Fusion von Phagosomen und Lysosomen möglich. Wenn Lysosomen mit den Phagosomen verschmelzen, dann werden Chlamydien inaktiviert (Yong et al., 1987).

Nach dem Eintritt in die Eukaryontenzelle verschmelzen zunächst die C.trachomatis-enthaltenden Vesikel untereinander. C.psittaci-Einschlüsse fusionieren untereinander und mit C.trachomatis-Einschlüssen nicht. Bei C.trachomatis ergibt sich dadurch eine erhöhte Rekombinationsmöglichkeit durch Förderung der OMP-Antigenvarianz (Fields und Barnes, 1992). Im Gegensatz dazu zeigt C.psittaci-OMP kaum innerartliche Varianz (Zhao et al., 1993), so daß aus der Vesikelfusion kein Selektionsvorteil resultieren würde.

Schramm und Wyrick zeigten, daß die vesikuläre Fusion des LGV-Biovars durch Zerstörung des Mikrotubuli (MT)- und Mikrofilament (MF)-Systems stark beeinflusst wird (Schramm und Wyrick, 1995). Ein Serovar E-Isolat blieb in der gleichen Studie durch MT-Sprengung unbeeinflusst und reagierte auf die Zerstörung des MF-Systems mit Reduktion der Anzahl reifer Einschlüsse. Letzteres kann Folge des beeinträchtigten Eintritts in die Zelle oder einer gestörten vesikulären Fusion sein.

Der Modus der Verhinderung der Fusion Phagosom-Lysosom ist bis heute ungeklärt. Eine Vorbehandlung von C.psittaci mit Antikörpern fördert die Fusion, was für eine Beteiligung eines an der Oberfläche exponierten Bestandteiles spricht (Friis, 1972; Wyrick et al., 1978). Lysosomen verschmelzen mit Phagosomen, die hitze-inaktivierte C.psittaci enthalten. UV-inaktivierte Organismen enthaltende Vesikel fusionieren nicht zum Phagolysosom, woraus man auf ein hitzelabiles Protein als Steuerelement schloß (Eisenberg und Wyrick, 1981; Eisenberg et al., 1983). Isolierte EK-Membranen verhindern die Fusion (Levy und Moulder, 1982), während gereinigte RK dies nicht tun (Brownridge und Wyrick, 1979). Mit den Vesikelmembranen assoziieren sich drei Annexine (III, IV, V) (Byrne und Faubion, 1982). Annexine sind eine Familie von eukaryontischen Zellproteinen, die membrangebunden Vesikelinteraktionen steuern. Annexin I, welches wahrscheinlich die lysosomale Fusion steuert, wurde nicht in Verbindung mit C.trachomatis-Einschlüssen beobachtet (Stephens, 1994).

3.3.3 Immunantwort des Wirts und Impfung

Immunantwort: Als erster Abwehrmechanismus für bakterielle Infektionen gilt die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten und in zweiter Instanz durch Makrophagen. Im weiteren Verlauf der Abwehr kommen spezifische Mechanismen zur Wirkung.

Wegen des obligaten Zellparasitismus und der intrazellulären Natur der Chlamydien ist wahrscheinlich vor allem die zelluläre Immunantwort gefordert. In Tiermodellen werden naive Mäuse durch einen kompetenten T-Zelltransfer vor einer *C. trachomatis*-Infektion geschützt (Brunham et al., 1985).

Zusätzlich führt die humane Infektion zur Bildung von lokalen und systemischen Antikörpern. In vitro wird die Infektiosität von *C. trachomatis* durch Antikörper (z.B. gegen das MOMP) neutralisiert. Die Adhärenz und Invasion ist dabei unbeeinflusst (Caldwell und Perry, 1982). Lokale Antikörper vom Typ IgA können den Prozeß der Infektion behindern (Brunham et al., 1983). Außerdem kann man auch durch lokale Applikation von Antikörpern bei naiven Mäusen eine Prävention der Chlamydieninfektionen erreichen (Williams et al., 1984). Es besteht die Möglichkeit, daß Antikörper im Rahmen der opsonierten Phagozytose bei der Eradikation der Chlamydien eine Rolle spielen.

Insgesamt vertritt man aber die Auffassung, daß die humorale Abwehr zwar eine Rolle in der Eingrenzung der Infektion spielen kann, eine Ausräumung der Infektionsherde aber Resultat der zellulären Abwehr ist (Fields und Barnes, 1992).

Auch Interferone sind wirksam gegen Chlamydien. Obwohl Chlamydien in ihrem Zyklus gegenüber α -, β - und γ -Interferon empfindlich sind (Czarniecki et al., 1986), scheint das gamma-Interferon eine entscheidende Rolle zu spielen (Rothermel et al., 1983; Byrne und Kreuger, 1983). Rödel und Kollegen haben gezeigt, daß fibroblastenähnliche Synovialzellen nach Chlamydieninfektion β -Interferon produzieren (Rödel et al., 1998a). In zwei anderen Studien wurde demonstriert, daß Interleukin 6 sowohl durch glatte Muskelzellen nach Infektion mit *C. pneumoniae* (Rödel et al., 2000) als auch durch Synovialzellen nach Infektion mit *C. trachomatis* (Rödel et al., 1998b) synthetisiert wird. Interleukin 6 kann möglicherweise T-Zellen zur Produktion von γ -Interferon stimulieren (Rödel et al., 1998b).

Impfungen und hypersensitive Immunreaktion: Einfache stattgehabte Infektionen oder Impfungen produzieren zum Teil Kurzzeit-Immunität, während in anderen Fällen eine vorangegangene Exposition eine schwerere Zweitinfektion verursachen kann. Die erzeugte Immunität ist serovarspezifisch (Taylor-Robinson und Thomas, 1980). Die Reinfektion spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Trachoms. Durch die hypersensitive Immunantwort kommt es zum Vernarben der Hornhaut und damit zur zunehmenden Blindheit. Die gleiche Pathogenese gilt für die Infertilität durch rezidivierende Salpingitiden mit resultierender narbiger Blockade der Eileiter. Diese verzögerte Hypersensitivitätsreaktion

behindert die Entwicklung von verlässlichen Vakzinen.

Im Gegensatz zu Lebendimpfstoffen konnte bei der Verwendung von inaktivierten Impfstoffen (UV-Bestrahlung oder Formalinbehandlung) eine derartige Reaktion nicht nachgewiesen werden. Als Ursache wurde ein 57-kDa Protein erkannt (Morrison et al., 1989). Impfstoffe ohne dieses Protein könnten eine Perspektive im Sinne der Erzeugung der ausschließlich protektiven Immunität bedeuten.

Man vermutet, ohne sicheren Beweis jedoch, daß die zelluläre Immunreaktion für diese Hypersensitivität verantwortlich gemacht werden muß. Auch die reaktive Arthritis nach genitalen Chlamydieninfektionen ist mit einer antigen-spezifischen T-Zellanreicherung verbunden (Sieper et al., 1993). Lokalen oder systemischen Antikörpern wird eher eine Bedeutung im Aufbau einer Immunität gegenüber Reinfektion zugeordnet (Schachter, 1988).

Das γ -Interferon könnte ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese durch die Verhinderung der RK-Proliferation spielen. Das simultane Bersten der Wirtszellen wird beeinträchtigt und abnorme RK persistieren in den Phagosomen (Shemer und Sarov, 1985). Diese Zellen bilden dann eine ständige Quelle von Chlamydien, wenn sie durch Natürliche Killerzellen oder Lymphotoxine lysiert werden (Schachter, 1988).

3.4 Klinische Relevanz

3.4.1 Genitale Infektionen

Erreger genitaler Infektionen sind die Serotypen D–K. Bei Männern kann *C. trachomatis* Urethritiden, Infektionen des Hodens und Nebenhodens (Mulcahy et al., 1987) sowie der Prostata verursachen (Weidner et al., 1988).

Bei Frauen sind Zervix-Infektionen am häufigsten, wobei urethrale und rektale Beteiligungen möglich sind. Häufig sind diese Infektionen asymptomatisch, aber zeitweise auch mit mucopurulentem Ausfluß verbunden. Das besondere Problem im Einschränken der Ausbreitung in einer sexuell aktiven Population ist der hohe asymptomatische Trägerstatus (Frauen 3/4, Männer 1/3). Folgen einer zervikalen Infektion können Bartholinitis, Endometritis, Salpingitis und Perihepatitis sein. Die Erkrankungen des oberen Genitaltraktes sind in der chronischen Form als sogenannte *Pelvic Inflammatory Disease (PID)* Ursache der Tubenblockade (Folgen: Infertilität und extrauterine Schwangerschaft). Eine stattgehabte genitale Chlamydieninfektion beim Mann hat keinen Einfluß auf die Spermatogenese (Eggert-Kruse et al., 1990), kann aber selten eine narbige Strikture des Samenleiters zur Folge haben. Eine andere Komplikation bei männlichen und weiblichen Individuen ist das Reiter-Syndrom. Dies ist eine Erkrankung des rheumatischen Formenkreises, die sich, unklar in der Ätiologie, an urogenitale Infektionen anschließt und nachfolgend Bindehautentzündungen und vor allem reaktive Arthro-

pathien erzeugt (Taylor-Robinson und Thomas, 1980).

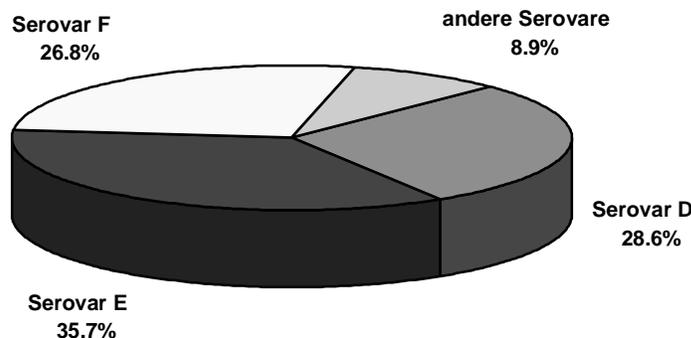


Abbildung 3.2: Serovarverteilung urogenitaler Infekte von *C.trachomatis* (Näher und Petzoldt, 1991)

Die quantitative Serovarverteilung in Deutschland ist in Abbildung 3.2 dargestellt (Näher und Petzoldt, 1991). Der niedrige Anteil des Stammes F am infizierten Pol ist möglicherweise mit der geringgradigeren Ausprägung von Symptomen bei Infektion mit diesem Stamm verbunden. Dies wurde belegt, indem man einige Stämme im Hinblick auf objektive Laborresultate (Anzahl der Einschlüsse) bzw. klinische Manifestationen (Menge des eitrigen Ausflusses) verglich, wobei sich F in allen Merkmalen als deutlich schwächer erwies (Woworski et al., 1994).

3.4.2 Neonatale Infektionen

Schachter und seine Kollegen zeigten, daß 4.7% aller Schwangeren positive Zervikalkulturen auf Chlamydien hatten (Schachter et al., 1986). 18% der Neugeborenen dieser Mütter mit urogenitaler Chlamydien-Infektion aquirieren die Chlamydien-Einschlußkonjunktivitis, und bei 16% der exponierten Neugeborenen wurde eine Chlamydien-Pneumonie diagnostiziert (Schachter et al., 1986). Die Infektionen sind nicht auf diese Organe beschränkt, sondern Nasopharynx, Rektum, Vagina und Mittelohr können auch betroffen sein. Solche Infektionen verlaufen häufig subklinisch.

3.4.3 Okuläre und pulmonale Infektionen des Erwachsenen

Das Trachom ist endemisch in Entwicklungsländern und wird hauptsächlich durch die Serotypen A, B, Ba und C verursacht. Zunächst ist nur das kubische Plattenepithel der Konjunktiven betroffen. Aus der einfachen Konjunktivitis kann sich eine chronische folliculäre Keratokonjunktivitis mit nachfolgender Pannusbildung entwickeln. Wiederholte Exposition und Infektion führt zur fortschreitenden Vernarbung der Hornhaut mit zunehmender Zerstörung der Cornea und

resultierender Blindheit. Die unkomplizierte Konjunktivitis ist selbstlimitierend, mündet nicht in eine Sichtbeeinträchtigung. Sie ist sehr häufig in der sexuell aktiven Population mit genitaler Infektion (Garland et al., 1995).

3.4.4 Lymphogranuloma venereum

Die LGV-Infektion ist eine sexuell übertragene, häufig chronische Krankheit, die eher in tropischen Gebieten zu beobachten ist. Sie verläuft in drei Stadien (Peterson und Clad, 1995):

- **Primärläsion:** herpetiforme Primärläsion im Urogenitaltrakt
- **Inguinalsyndrom:** regionale Lymphadenitis und systemische Erkrankung
- **Tertiärstadium:** Strikturen der Lymphwege, genitale Elephantiasis.

3.5 Diagnose

3.5.1 Kultur-Techniken

Isolierung

Kultur in Hühnerembryos und Tieren: Bis in die 70iger Jahre hinein wurden Chlamydien in Labortieren (Storz, 1971) und Hühnerembryos (T'ang et al., 1957) kultiviert.

Zellkultur: McCoy- und HeLa-Zellen werden neben weiteren Zelllinien erfolgreich zur Kultivierung von *C.trachomatis* genutzt. Die Serotypen D-K besitzen ein engeres Wirtsspektrum, möglicherweise als Ausdruck der deutlich negativeren Oberflächenladung (Lovett et al., 1980). Methoden wie DEAE-Dextran- und Zytochalin-B-Behandlung der Zellen werden zur Erhöhung der Ausbeute eingesetzt, haben aber den Nachteil, daß sie eine Vorbehandlung der Zellen voraussetzen. Zentrifugation mit hohen Geschwindigkeiten und Einsatz von Zykloheximid (ein Hemmstoff der Eukaryontenproteinsynthese) können simultan die *C.trachomatis*-Invasion steigern.

Identifizierung

C.trachomatis-Einschlüsse sind ungefärbt im Lichtmikroskop zu erkennen. Durch Einsatz von FITC(Fluoresceinisothiocyanat)-markierten monoklonalen Antikörpern, Iod (Glykogenfärbung) oder Giemsa-Farbstoff werden Einschlüsse besser hervorgehoben.

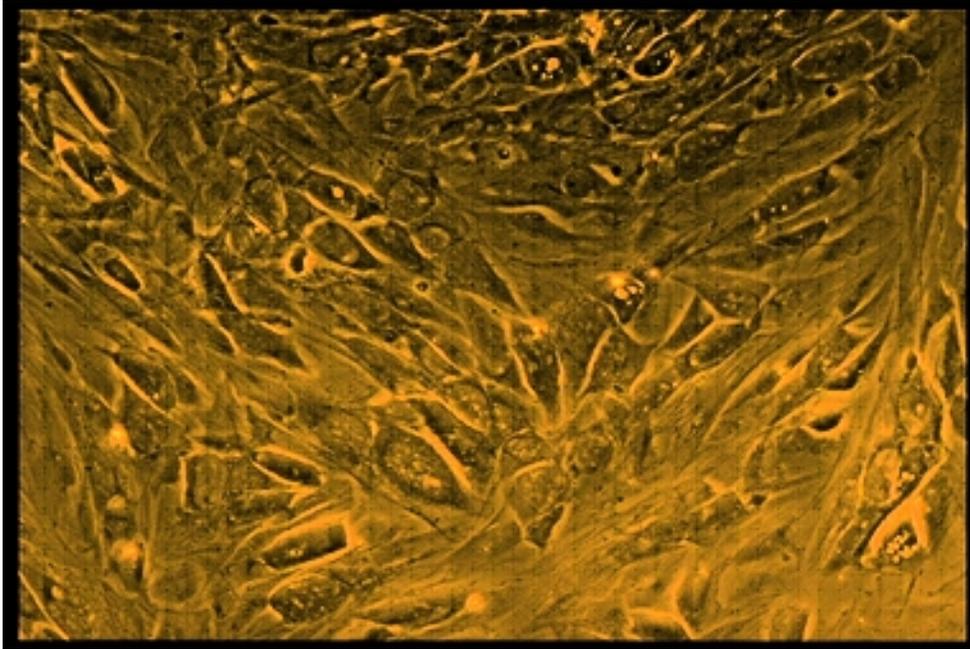


Abbildung 3.3: Chlamydieninclusionen ($D_{IC-CAL-8}$) in humanen primären Endometriumkulturzellen, 390fache Vergrößerung, Phasenkontrast

3.5.2 Nichtkultur-Techniken

Immunfluoreszenzfärbung

Kommerziell erhältliche Färbungen sind in der Regel Antikörper, die das MOMP oder das LPS der Chlamydien erkennen. Die am häufigsten verwendeten Immunglobuline sind direkt FITC-markiert (z.B. Syva MicroTrak[®]). 15 verschiedene Serotypen von *C. trachomatis* wurden auf der Basis antigenetischer Heterogenität hauptsächlich im MOMP gefunden (Wang und Grayston, 1971; Wang et al., 1985). Monoklonale Antikörper gegen gattungs-, art-, gruppen- und serotypspezifische Epitope des MOMP wurden entwickelt (Ma et al., 1987; Stephens et al., 1988). LPS-Antikörper sind gattungsspezifisch. Die Sensitivität/Spezifität liegt zwischen 70–100%/87–99% für Männer und 68–100%/82–100% für Frauen (Taylor-Robinson und Thomas, 1991; Taylor-Robinson, 1991).

Berlau und Kollegen haben die Methode der in-situ-DNA-Hybridisierung getestet und damit sehr gute Ergebnisse bei dem Nachweis chlamydialer Infektionen im Synovia-Bereich im Vergleich zu der direkten Immunfluoreszenzfärbung erzielt (Berlau et al., 1998).

Enzymimmunoassays

EIAs erkennen suspendierte chlamydiale Antigene. Nach Denaturierung der Probe werden die Antigene an einer Matrix oder spezifischen Antikörpern zum Haf-

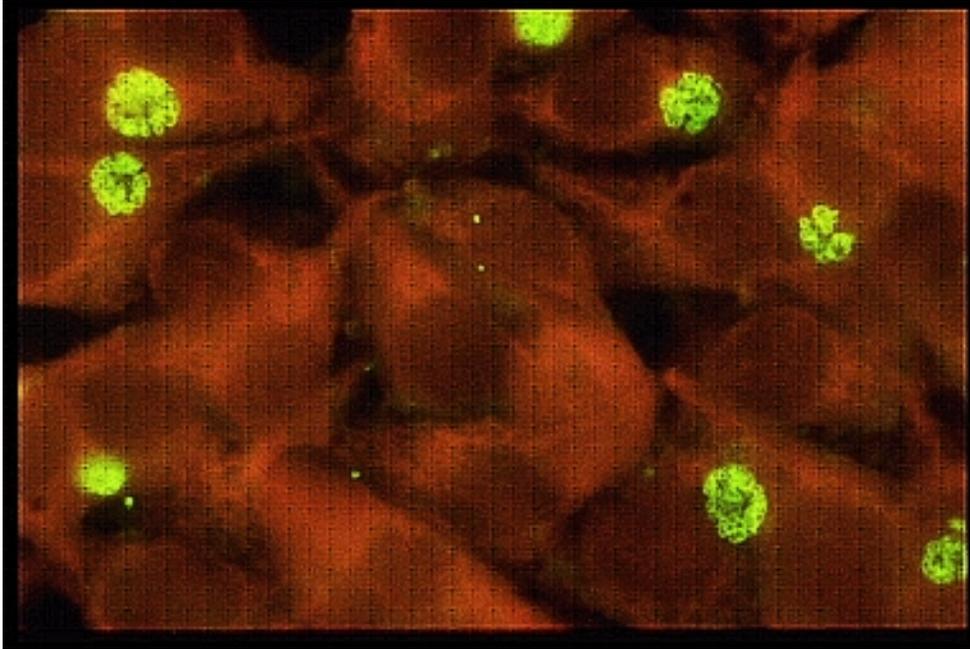


Abbildung 3.4: Chlamydieneinschlüsse (LGV₂) in McCoy-Zellayer-Kulturen 17h p.i., statische Inokulation, 2290fache Vergrößerung, Immunfluoreszenz

ten gebracht. Anschließend wird ein enzymmarkierter monoklonaler Antikörper (spezifisch für das nachzuweisende chlamydiale Antigen) appliziert. Nach gründlicher Spülung können die monoklonalen Antikörper dann photometrisch anhand des Substratsatzes nachgewiesen werden. Die Sensitivität/Spezifität liegt zwischen 62–97%/92–100% für Männer und 64–98%/89–100% für Frauen (Taylor-Robinson und Thomas, 1991; Taylor-Robinson, 1991). Je nach Referenzmethode ergeben sich unterschiedliche Werte für Sensitivität und Spezifität.

PCR/LCR

PCR: Zum vermutlichen Genom werden zwei Oligonukleotide zugefügt, die zu den beiden Enden des erregerspezifischen Genabschnittes passen und diese hybridisieren können. Der dazwischenliegende DNA-Anteil wird nach Zusatz von Nukleotiden und einer ebenfalls zugegebenen DNA-Polymerase kopiert. Die Oligonukleotide fungieren als Primer. Die neuen und alten Stränge werden durch zyklisches Erhitzen (Verwendung einer thermostabilen Polymerase) voneinander getrennt, und durch Abkühlen wird ein erneuter Reaktionsablauf stimuliert. Im Verlauf kann dadurch eine Megaamplifikation des nachzuweisenden Genoms erreicht werden.

Die meisten Systeme für *C.trachomatis* haben das kryptische Plasmid als Ziel-DNA, obwohl auch verschiedene Kits MOMP-Sequenzen nutzen. Die Sensitivitäten liegen bei über 90%. Eine Ausnahme besteht in der Rate für zervikale

Abstriche. Hier werden deutlich niedrigere Werte erreicht (64%) (Bauwens et al., 1993). Man vermutet, daß dieses Abstrichmaterial für die PCR inhibitorisch wirkende Stoffe enthält (Schachter, 1994). Das ist ein entscheidendes Plus für die LCR, bei der solche Inhibitoren nicht bekannt sind.

LCR: Für die LCR müssen vier Oligopeptide als Primer, eine thermostabile Ligase und Polymerase zugesetzt werden (Chernesky et al., 1994). Die LCR zeigt auch für zervikale Proben eine gute Sensitivität (Moncada et al., 1994). Sie wird als Nachweis für Chlamydien sowohl für zervikale Abstriche als auch für Urinsedimente empfohlen. Die Sensitivität für männliche und weibliche Probanden liegt zwischen 90–95%, die Spezifität bei 99.5% (Schachter, 1994).

3.5.3 Der „goldene Standard“

Nach der Entwicklung der Zellkulturmodelle wurde die Kultivierung von Chlamydien als „goldener Standard“ betrachtet. Aufkommende Nicht-Kulturtechniken (im besonderen die PCR) zeigten zunehmend, daß die Sensitivität der Zellkultur <100% ist. Selbst in hochspezialisierten Laboratorien wurde ein Maximum von 75–90% nicht überschritten. Daraufhin schuf man den sogenannten „erweiterten goldenen Standard“, der eine Bestätigung der kulturnegativen Proben durch eine Nicht-Kulturtechnik fordert. Leider treten bei allen Nicht-Kulturtechniken falsch-positive Ergebnisse auf. Dies ist auch ein besonderes Problem bei verschiedenen serologischen Testverfahren, die in der Regel zwar hohe Sensitivitäten aber unbefriedigende Spezifitäten erzielen (Oehme et al., 1996). Daher wird der erweiterte Standard zunächst weiter seine Gültigkeit behalten.

3.6 Behandlung und Prognose

Antibiotika der ersten Wahl sind Tetracyclin und Doxycyclin. Bei Kontraindikation gegenüber Tetracyclin (z.B. während der Schwangerschaft und im Kindesalter) kann mit Erythromycin substituiert werden (Fields und Barnes, 1992). Resistenzen gegenüber Tetracyclin und Erythromycin wurden bereits beobachtet (Jones et al., 1990; Mourad et al., 1980). Trotz der guten Empfindlichkeit der Chlamydien gegenüber Doxycyclin in vitro gibt es klinisch auch hier eine Erregerpersistenz (ca. 5%) (Jones, 1991). Unter den neueren Antibiotika wurden gute Ergebnisse mit Azithromycin erzielt. Mit der einmaligen Applikation von 1g Azithromycin konnten die gleichen Ergebnisse wie bei einer 7tägigen Doxycyclin-Gabe erreicht werden (Lassus, 1990; Weber und Johnson, 1995). Azithromycin könnte also gerade im Hinblick auf die Problematik der Kooperation urogenital betroffener Patienten segensreich sein.

Der Erfolg der Therapie ist nicht nur von der Wahl des richtigen Antibiotikums abhängig. Die Problematik der Kooperationsbereitschaft und die Partner-

behandlung sind nicht weniger wichtige Aspekte. Die steigende Promiskuität in stark urbanisierten Regionen und die häufig asymptomatische Erregerpersistenz erschweren ein zielgerichtetes Vorgehen. Dabei kommt es zur unbemerkten fortschreitenden Schädigung der Genitalorgane, die dann beim Behandlungsbeginn eventuell schon irreversibel ist.

Kapitel 4

Problemstellung

Bis zum heutigen Tage ist wenig über die Adhärenz- und Invasionsunterschiede von verschiedenen okulogenitalen *C.trachomatis*-Stämmen bekannt. Es gibt kein ideales Untersuchungsmedium. Zellkulturen vernachlässigen den Einfluß des Immunsystems des Wirtes, bei Tiermodellen verhalten sich Isolate von Patienten unter Umständen anders.

1995 wurde im Institut für Versuchstierkunde Jena 8–12 Wochen alten, geschlechtsreifen, weiblichen SCID (**S**evere **C**ombined **I**mmunodeficiency)–Mäusen vom genetischen Hintergrund BALB/C Progesteron injiziert. Nach dieser Vorbereitung inokulierte man diesen Mäusen insgesamt 19 *C.trachomatis*-Isolate intravaginal. Aus Zeit- und technischen Gründen jedoch mußte die Progesteronapplikation auf SCID-Mäuse beschränkt werden. Tiefe Vaginalabstriche dieser Mäuse wurden für die folgenden 5 Wochen in der Zellkultur auf vitale Chlamydien untersucht. Bei einem Isolat (E_{434}) resultierte eine besonders signifikante, stark verlängerte Ausscheidung vitaler Chlamydien (Zellkultur in 5 aus 6 Mäusen für maximal 24 Tage mit mehr als 100 Einschlüssen pro Deckglas). Zu einer zweiten Gruppe gehörten das Isolat D_{ICCAL8} , das positive Abstriche bis zum dritten Tag erzeugte, und das Isolat E_{1733} , das bis zum 7. Tag Einschlüsse in der Zellkultur produzierte. Bei einer dritten Gruppe von Isolaten (z.B. F_{1730}) gab es es keine Ausscheidung infektiöser Partikel.

Diese Studie verfolgt zum einen den Zweck, diese genannten und zwei weitere Chlamydienisolate (F_{1735} und LGV_2) auf ihr Adhärenz- und Invasionsverhalten zu untersuchen. Dabei interessieren folgende Fragen: Zeigt das Isolat E_{434} besonders große Adhärenzen und Invasionen bei den Experimenten mit Zelllinien, Abstrichzellen aus dem Genitaltrakt der Maus, humanen Endometriumkulturen und murinen Genitalzellkulturen? Ist eine Verwendung von artifiziell suspendierten Zellen für Adhärenzuntersuchungen möglich? Gibt es einen direkten quantitativen Zusammenhang zwischen Adhärenz und Invasion der Chlamydien–das heißt, ist die Adhärenz ein Maß für die Virulenz der untersuchten Isolate?

Kapitel 5

Materialien und Methoden

5.1 Chlamydienisolate

Die Chlamydien suspensionen sind der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena entnommen. LGV₂ und D_{ICCAL8} sind Isolate, die zu Kontrollzwecken schon lange in Laboratorien gehalten werden. Sie wurden vom Institute of Ophtalmology, London übernommen. Die Isolate E₄₃₄, E₁₇₃₃, F₁₇₃₅ und F₁₇₃₀ sind Patienten isolate, die man im Rahmen der diagnostischen Arbeit des Labors gewonnen hat. Durch mehrfaches Passagieren wurden hoch-titrige Chlamydien suspensionen erzeugt, die für wissenschaftliche Verwendungen Voraussetzung sind. Nach Stammvermehrung und Ernte werden diese Chlamydien isolate in sinnvollen Aliquots bei -80°C aufbewahrt und bei Einsatz aufgetaut. Charge und Passagenanzahl der verwendeten Chlamydien sind in Tabelle 5.1 angegeben. Die unter Q aufgeführten Werte entsprechen den Quotienten aus Elementarkörperkonzentration pro ml (e) und c_{McCoy} ($Q = \frac{EK}{c_{McCoy}}$) und geben Aufschluß über die Präparationsqualität der Chlamydien suspension. In der Literatur sind bei den LGV-Stämmen Q-Werte zwischen 2 und 3 typisch, während bei dem Stamm D Werte zwischen 100 und 1678 möglich sind (Davis und Wyrick, 1997).

Chlamydienisolat	Charge	Passage	Q
LGV ₂ 434B	16.01.95	10	150
D _{ICCAL8}	11.08.94	> 40	223
E ₄₃₄	20.07.95	12	83
E ₁₇₃₃	18.01.95	4	44
F ₁₇₃₅	21.01.95	4	110
F ₁₇₃₀	04.01.95	5	133

Tabelle 5.1: Charge, Passage und Q der Chlamydienisolate

5.2 Methoden

5.2.1 Adhärenzversuche an kultivierten Laborzellen

McCoy–Zellen

Um den Ursprung der McCoy–Zellen gab es lange Debatten. Zuerst hielt man sie für menschliche Synovialzellen. Aber als man eine murine Zellkontamination feststellte, wurde diese Aussage schon zweifelhafter. Offensichtlich sind zwei Sublinien existent, McCoy A entspricht der menschlichen Kultur, McCoy B ist murinen Ursprungs und trägt Chromosomenmarker, die charakteristisch für L–Zellen (murine Fibroblasten) sind.

Junge Zellen tragen häufig Zellausläufer, für ältere Zellen sind Gigantenzellen und vereinzelt Synzytien typisch. Es sind immer scharf abgegrenzte, klare, regelmäßige Zellen (Hay et al., 1988).

HeLa–Zellen

HeLa–Zellen sind zervikale Tumorzellen, benannt nach ihrem Ursprung (Henriette Lang). Die HeLa–Zelle war die erste aneuploide Epithelzelllinie humanen Ursprungs, die dauerhaft als Kultur gehalten wurde. 1951 wurden Zellen des Zervixkarzinoms der 31jährigen Henriette Lang entnommen, und man stellte daraus eine Primärkultur her. Untersuchungen der Präparate ergaben die Diagnose eines Adenokarzinoms (Hay et al., 1988).

Herstellung der Zellkultur

Voraussetzung: Bei Zelllinien (HeLa– und McCoy–Zellen) ist die Quelle der Zellen meist kein Problem, gerade in Laboratorien, in denen mit Chlamydien gearbeitet wird, sind in jedem Fall McCoy–Zellen vorhanden. Die in Kryogenröhrchen tiefgekühlt (flüssiger Stickstoff) aufbewahrten Zellen werden im Wasserbad auf Raumtemperatur gebracht. Bei Erreichen der Raumtemperatur müssen sofort 5ml Kulturmedium eingeträufelt werden. Damit wird das toxische Frostschutzmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) ausgewaschen, da es mit Temperaturanstieg zunehmend in seiner Toxizität aktiviert wird. Anschließend wird diese Lösung bei 300*g/min für ca. 7min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Sediment wird in 25ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)–Kulturmedium (von Gibco[®], mit L–Glutamin)+10% FKS (Fetales Kälberserum von Gibco[®], durch Hitze inaktiviert) aufgenommen und in einer großen Kulturflasche (75cm² von Greiner[®], unbeschichtet) im Brutkasten aufbewahrt. Nach 72–96h ist eine konfluente Zellschicht vorhanden. Das Kulturmedium wird entfernt, die Kulturflasche zweimalig mit Ca²⁺– und Mg²⁺–freien PBS (Phosphate Buffered Saline) gespült, um alle vorhandenen Ca²⁺– und Mg²⁺–Ionen zu entfernen. Das dient der Erleichterung der Trypsinierung, denn Trypsin wirkt durch

einen Ca^{2+} -Ionenentzug und bewirkt dadurch ein Ablösen der Zellen aus dem Zellverband und von der Unterfläche.

Herstellung einer Trypsinstammlösung: In 100ml PBS werden 5g Glukose und 10g Trypsin durch 15minütiges Magnetrühren gelöst. Dann wird für 10min bei 3000*g/min zentrifugiert, der Überstand durch eine Glasfritte sterilfiltriert und in 0,5ml-Portionen abgefüllt und bei -20°C eingefroren.

Trypsinierung: Nach dem Auftauen werden der bei -20°C gelagerten Trypsinstammlösung (0,5ml) 20ml PBS zugegeben. 5ml dieser Lösung reichen aus, um damit den Boden einer großen Kulturflasche zu benetzen. Die Einwirkungszeit sollte etwa 5min nicht überschreiten, durch leichtes Schütteln kann der Prozeß beschleunigt werden. Die Trypsin-PBS-Lösung wird entfernt, wenn kleine Zellballen beginnen sich abzulösen. Nach Zugabe von ca. 25ml Kulturmedium mit 10% FKS kann man die Kulturflasche kräftig schütteln, um das Lösen der Zellen zu begünstigen.

Zellzählung: Die Zählung der Zellen erfolgt in einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde die Kammer gefüllt und zwei diagonal liegende Großquadrate ausgezählt. Deren Durchschnitt wird gebildet und mit 10 000 multipliziert, um die Zellkonzentration pro ml zu erhalten.

Einsatz: Soll eine Einstellung von 200 000 Zellen pro ml erfolgen, muß eine dem Zählergebnis angepaßte Verdünnung mit Kulturmedium angeschlossen werden. Nach Verteilung von jeweils 1ml dieser Zellsuspension in die Kulturröhrchen mit Deckgläschen (13mm Durchmesser, Greiner[®]) wurden diese 24h im Brutschrank (37°C , 5% CO_2) inkubiert. Nach dieser Zeit ist eine konfluente Zellkultur mit ca. $1 * 10^6$ Zellen entstanden. Die Zellschicht wird zweimal kräftig gespült (z.B. mit PBS), um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Danach gibt man 0,5ml Kulturmedium für die nachfolgende Inokulation zu.

Aufbereitung der Chlamydiensuspension:

Aliquotierung: Um gleiche Bedingungen für alle Versuche zu schaffen, wird eine Aliquotierung der bei ca. -80°C gelagerten Chlamydienlösungen vorgenommen. Grund dafür ist die extreme Empfindlichkeit der Chlamydien gegenüber häufigem Einfrieren und Auftauen. Der aktuelle Titer sinkt durch jedes erneute Auftauen um etwa ein Drittel, wobei dieser Faktor je nach Zügigkeit und Sanftheit des Verfahren sowie stammabhängig schwankt. Um diesen unsicheren Faktor zu beseitigen, wird eine Aliquotierung der Suspension in $10 * 100\mu\text{l}$ vorgenommen, und alle Röhrchen wurden wieder eingefroren. Für jeden nachfolgenden Versuch wird ein neues Röhrchen verwendet, um eine gleiche Anzahl an Einfrier- und Auftauschritten zu garantieren.

Reinigung: Nach dem Auftauen wird die Chlamydiensuspension vor der Beimpfung der Zellkultur zügig mit Kulturmedium verdünnt (3:1). Diese Suspension wird für 7min bei 300*g/min zentrifugiert. Der Zentrifugationsschritt dient der Sedimentierung von McCoy-Zelldebris und chlamydialen Verklumpungen. Der Überstand wird danach sofort zur Beimpfung bzw. zur Titerbestimmung benutzt.

Inokulationsmethoden

Inokulation ohne Zentrifugation: Nach Applikation einer definierten Chlamydienmenge auf die Zellkultur (siehe Tabellen A.1–A.24 im Anhang A) erfolgt die Inkubation für 3.5h bei 37°C und 5%CO₂. Das Inokulationsmedium wird in der Menge bei 0,5ml konstant gehalten, um eine konzentrationsbedingte Schwankung der Adhärenzergebnisse zu umgehen.

Inokulation mit Zentrifugation: Diese Inokulation wird bei 4000*g/min und 35°C für 60min durchgeführt. Eine Auswertung findet bei dieser Art der Inokulation sofort im Anschluß statt.

Spülung, Fixierung und Färbung

Spülung: Nach der Inokulation ist es nötig, die ungebundenen Elementarkörperchen von der Zellschicht zu entfernen. Das wird durch 3maliges Spülen mit 1ml PBS und vorsichtiges Absaugen mit Pipetten erreicht.

Fixierung: Die Fixierung erfolgt mit Methanol direkt in den Kulturröhrchen. Die Einwirkungszeit beträgt konstant 10min. Der Fixierung wird ein erneutes Spülen mit PBS angeschlossen, um eine Austrocknung des Präparates zu verhindern. Das Deckgläschen wird aus dem Kulturröhrchen entfernt und mit Entellan auf einem Objektträger (Zellschicht nach oben gekehrt) befestigt.

Färbung: Gefärbt wird dann mit einem FITC-markierten, monoklonalen Antikörper von Syva[®]. Davon verteilt man 10µl sorgfältig über das Deckgläschen und inkubiert bei 37°C und 5% CO₂ für 30min. Anschließend spült man mit PBS, läßt das Präparat leicht antrocknen, appliziert einen Tropfen Einbettungsmedium von Syva[®] und verschließt das Präparat mit einem Deckglas.

Lichtmikroskopische Auswertung der Präparate

Auszählung: Die lichtoptische Betrachtung der Präparate erfolgt unter dem Axioskop (mit Einrichtung für Immunfluoreszenzmikroskopie von Carl Zeiss[®], 100er Objektiv). Dabei werden die gebundenen Chlamydien pro Zelle für mindestens 40 Zellen pro Präparat ausgezählt. Die genauesten Ergebnisse ergibt das 100er Objektiv mit Immersionsöl. Auch die Zellzahl pro Deckglas muß ermittelt

werden, da trotz gleicher Einsaat und Entwicklungszeit erhebliche Schwankungen in dieser Hinsicht auftreten. Die Zellzahlen werden in 10 Blickfeldern ausgezählt und gemittelt.

Berechnung: Aus den 40 ausgezählten Zellen wird der Durchschnitt der gebundenen Chlamydien pro Zelle berechnet.

Zur weiteren Berechnung benötigt man die Elementarkörperkonzentration und die Zellzahl. Dadurch kann man die Einsaat der Elementarkörper pro Zelle berechnen.

$$\text{Einsaat} = \frac{\text{absolute Elementarkörperkonzentration}}{\text{Gesamtzellzahl}} \quad (5.1)$$

Das arithmetische Mittel der ausgezählten gebundenen Chlamydien pro Zelle wird in Bezug auf die durchschnittliche Einsaat der Chlamydien pro Zelle gesetzt und in Prozent angegeben.

$$\% \text{Prozent gebundene EK} = \frac{\text{Durschnitt gebundene EK pro Zelle}}{\text{Einsaat}} * 100 \quad (5.2)$$

Die Tabellen [A.1–A.24](#) zeigen hierzu Teil- und Endergebnisse.

Gleichung zur Berechnung der Zellzahl: Die Berechnung der Zellzahlen erfolgt unter Berücksichtigung des arithmetischen Mittels von 10 ausgezählten Objektfeldern (100er Objektiv). Mit Hilfe der Objektivfaktoren für das Axioskop von Zeiss[®] kann der Durchschnitt des Blickfeldes in die Zellzahl pro Deckglas umgerechnet werden (siehe Gleichung [5.3](#)). Zur Erläuterung der Berechnung der Objektivfaktoren für das Axioskop (= Vergrößerungsfaktoren für die einzelnen Objektive) siehe Seite [25](#).

$$\text{Zellzahl/Deckglas} = \text{Zellzahldurchschnitt/Sehfeld} * \text{Objektivfaktor} \quad (5.3)$$

Anhand der Elementarkörperkonzentration (deren Ermittlung im Detail weiter unten im Text erläutert wird) und der errechneten Zellzahl pro Deckgläschen kann die Einsaat der Elementarkörper pro Zelle ermittelt werden. Indem man die tatsächlich gebundenen Chlamydien auf die Einsaat bezieht, kann man den prozentualen Anteil der gebundenen von allen eingesetzten Chlamydien berechnen. Dieser prozentuale Anteil wurde dann als Bezugswert für die Vergleiche der einzelnen Chlamydienisolate genutzt.

Ermittlung der Elementarkörperkonzentration: Zur Elementarkörperauszählung müssen zunächst Titrationsstufen der schon gereinigten Chlamydien-suspension (siehe Seite [23](#)) nach folgendem Schema angelegt werden:

- $10\mu\text{l}$ der gereinigten Chlamydiensuspension + 5ml PBS = Stufe 1
- $100\mu\text{l}$ von Stufe 1 + 0,4ml PBS = Stufe 2
- $100\mu\text{l}$ von Stufe 2 + 0,4ml PBS = Stufe 3
- $100\mu\text{l}$ von Stufe 3 + 0,4ml PBS = Stufe 4
- $100\mu\text{l}$ von Stufe 4 + 0,4ml PBS = Stufe 5

Daraus ergeben sich für die nachfolgende Berechnung der Elementarkörperkonzentration folgende Verdünnungsfaktoren:

- Stufe 1: 500
- Stufe 2: 2 500
- Stufe 3: 12 500
- Stufe 4: 62 500
- Stufe 5: 312 500

Auszählung: Es ist sehr schwierig, Elementarkörpersuspensionen auszuzählen, da die Elementarkörper schlecht am Objektträger haften bleiben. Die Haftung wird unterstützt, indem die Elementarkörperlösung mit einer keimfreien Dottersack-PBS-Lösung untermischt wird. Dazu wurde zunächst eine Dottersack-PBS-Lösung (1:5) hergestellt. $10\mu\text{l}$ wurden sowohl dieser Lösung als auch der entsprechenden Stufe der Verdünnung der Chlamydiensuspension entnommen. Diese $20\mu\text{l}$ wurden in einem Eppendorfröhrchen durch Pipettieren gemischt und auf einen Objektträger aufgetragen und dieser zum Trocknen abgelegt. Eine Methanolfixierung erfolgt für mindestens 5min. Danach wird das Präparat zur Färbung mit DFA-Farbstoff (Syva MikroTrak[®]) für mindestens 15min inkubiert. Nach gründlicher Spülung, um ungebundene Farbstoffreste zu entfernen, wird das Präparat mit Eindeckmedium versehen und einem Deckgläschen belegt. Für die Auszählung ist wichtig, daß die Ausbreitungsfläche einer Deckgläschenoberfläche entspricht, um mit den gleichen Objektivfaktoren arbeiten zu können. 10 Blickfelder werden ausgezählt und das arithmetische Mittel gebildet. Dieser Durchschnitt wird mit dem Objektivfaktor, dem Verdünnungsfaktor (siehe Seite 25) und N multipliziert. N entspricht dem Faktor, der die eingesetzte Menge (meist $10\mu\text{l}$, daher $N=100$) auf 1ml hochrechnet.

Die Anzahl der gebundenen EK wird in Prozent von der Einsaat (EK pro Zelle) in den Tabellen des Anhanges A angegeben.

Bestimmung der Vergrößerungsfaktoren des verwendeten Mikroskopes: Zur Bestimmung der Blickfeldfläche gibt es Objektometer, mit denen man mittels einer Skala für ein jeweils definiertes Objektiv den Durchmesser des

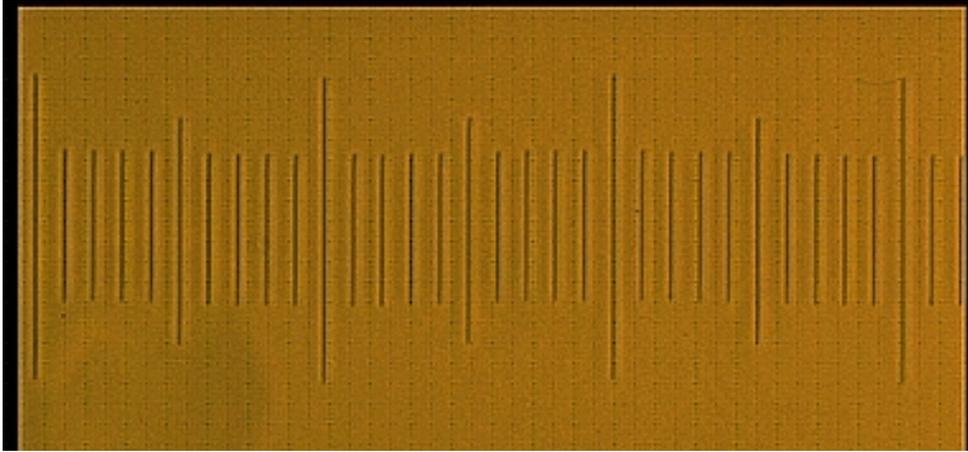


Abbildung 5.1: Objektometer, 390fache Vergrößerung

Blickfeldes ablesen kann (siehe Abbildung 5.1). Der Skalenwert wird in seiner realen Größe (eine große Skaleneinheit entspricht $100\mu\text{m}$) mittels der Formel

$$A = \frac{\pi}{4} * \text{objektivspezifischer Skalenwert}^2 \quad (5.4)$$

in den Oberflächeninhalt der Blickfläche umgerechnet. Der Blickfeldflächeninhalt wird dann ins Verhältnis zur Fläche des Deckgläschens gesetzt. Dieses Verhältnis wird durch die entsprechenden Objektivfaktoren für das Axioskop ausgedrückt:

- 20er Objektiv: 175
- 40er Objektiv: 677
- 100er Objektiv: 8055

Die angegebenen Faktoren beziehen sich nur auf das Axioskop von Carl Zeiss®. Ein Beispiel zur Berechnung der Objektivfaktoren ist zum besseren Verständnis im Abschnitt 5.2.4 (Berechnung der Objektivfaktoren des Mikroskopes IX 70 von Olympus, Seite 33) dargestellt.

Formel zur Berechnung der Elementarkörperkonzentration:

$$\text{EK/ml} = N * \text{EK/Sehfeld} * \text{Objektivfaktor} * \text{Verdünnungsfaktor} \quad (5.5)$$

Bei den EK-Konzentrationsbestimmungen liegen sinnvolle Titrationsstufen bei den Stufen 2–4. Typische Elementarkörper in einer Dottersacksuspension sind in der Abbildung 5.2 zu sehen.

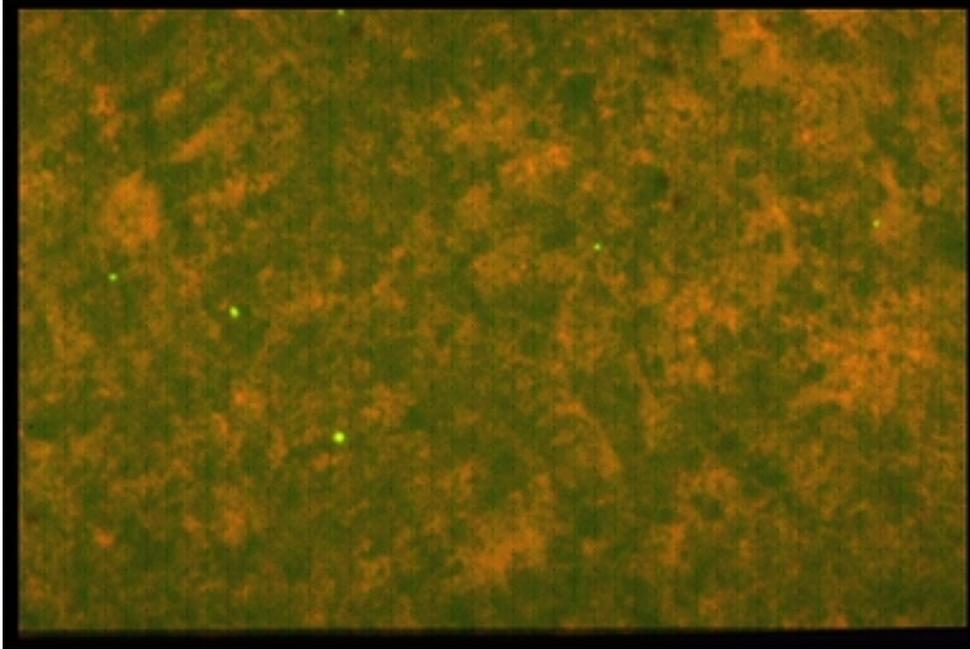


Abbildung 5.2: Chlamydienelementarkörper in der Dottersacksuspension, 2290fache Vergrößerung

Zusammenfassung: Mit der Elementarkörperkonzentration und der Zellzahl kann die Einsaat der EK pro Zelle berechnet werden. Das arithmetische Mittel der ausgezählten gebundenen Chlamydien pro Zelle wird gebildet. Diese Größen werden in die Gleichungen 5.1 und 5.2 eingesetzt. Die Ergebnisse sind in den den Tabellen A.1–A.24 angegeben.

5.2.2 Adhärenzversuche an Laborzelllinien in Suspension

Herstellung der Zellsuspension

Das eigentliche Problem liegt darin, die Zellen so ungeschädigt wie möglich in Suspension zu bringen. Zunächst kann man Zellen gut durch eine Trypsinierung vom Untergrund und aus dem Zellverband lösen. Im weiteren Verlauf muß dafür gesorgt werden, daß die Zellen nicht readhärieren können. Nach Sedimentierung (300*g/min, 7min) und Resuspension in Kulturmedium + 10%FKS werden die gelösten Zellen in unbeschichteten Gefäßen (Zentrifugationsröhrchen von Greiner®) aufbewahrt. Die unbeschichtete Oberfläche erschwert die Adhärenz der Zellen. Leider hat das auch den Nachteil, daß sich dadurch für die Zellen nur suboptimale Bedingungen generieren lassen. In dieser Suspension werden die Zellen ca. 4 Stunden im Inkubationsschrank aufbewahrt, damit sie sich von der Trypsinierung, die bekannterweise die Oberflächenproteine zerstört, erholen können. Auffällig ist, daß zwar die Ablösung der Zellen mit Trypsin hervorragend funk-

tioniert, aber die Vereinzelnung einiges zu wünschen übrig läßt. Nach 4 Stunden jedoch sind kaum noch Zellklumpen vorhanden. Das ist aber mit einer Einbuße von ca. 1% der Zellen in der Trypanblaufärbung verbunden. Eine unakzeptable Alternative zur Trypsinierung besteht in der mechanischen Ablösung der Zellen. Dabei wird ein höherer Prozentsatz der Zellen zerstört.

Eine Einstellung der Einsaat (Zelllinien) zwischen 50 000 und 200 000/ml erweist sich als ideal. Kriterium ist dabei die Zelldichte auf dem Filter unter dem Mikroskop. Nur bestimmte Zelldichten sind optimal beurteilbar.

Inokulation: Die Inokulation mit den verschiedenen Chlamydienisolaten erfolgt in einer 1ml umfassenden Zellsuspension jeweils definierter Zelldichte. In den Tabellen [A.1–A.24](#) sind die Titer (EK-Konzentration) der Einsaat der einzelnen Chlamydienisolate und die entsprechende Zellzahl zu finden. Die Inokulation erfolgt durch:

- Inkubation (37°C, 5%CO₂) für 3.5h
- Inkubation mit Zentrifugation (4000*g/min, 37°C) für 1h

An die Arten der Inkubation schließt sich die Filtration an.

Filtration: Grund für den Einschub einer Filtration ist das Ziel, eine Trennung der Zellen von ungebundenen Chlamydien zu erreichen, um die Auswertung vor der zufälligen Überlagerung von nicht adhärennten Chlamydien zu bewahren. Eigene frühere Erfahrungen mit humanem Zervikalabstrichmaterial (Trennungsversuch durch Spülung und Zentrifugation) waren enttäuschend. Ungebundene Chlamydien überlagerten den gesamten Objektträger, so daß eine Entscheidung über eine echte Adhärenz unmöglich war.

Das Ziel ist eine Filtration, bei der nicht das Filtrat, sondern das Retentat weiterverwendet werden kann. Die Filterapparatur muß zu öffnen sein (schraubbarer Filter von Satorius, 13mm Durchmesser), der eingelegte Membranfilter sollte entfernbar sein und idealerweise gleich mit Durchlicht bzw. Aufficht *mikroskopierbar* sein. Da das Präparat mit einem Fluoreszenz-Farbstoff (FITC) gefärbt werden soll, darf der Filter keine Eigenimmunfluoreszenz im gewählten Bereich (Anregung 490nm, Emission 520nm) besitzen.

Die Porengröße der verwendeten Membranfilter (Nuclepore[®], Polycarbonatfilter von Costar, 13mm Durchmesser) beträgt 5µm. Einerseits sollten die Poren so groß wie möglich sein, um die ungebundenen Chlamydien so unbehindert wie möglich passieren zu lassen. Zum anderen zeigt sich aber, daß McCoy- und HeLa-Zellen schon bei Porengrößen von 8–10µm durch den Filter wandern können und damit der Auswertung verloren gehen. Die Passage der Chlamydien variiert mit der Zelldichte. Große Zelldichten erschweren den Durchtritt durch Verstopfung der Membranporen. Für McCoy- und HeLa-Zellen liegt das Optimum bei etwa

150 000 Zellen und das Maximum bei 200 000 Zellen. Für die Epithelien (Platten- und Zylinderepithel) sollten Zellzahlen von ca. 50 000 nicht überschritten werden. Nach der Inokulation wird die Suspension zunächst mit niedrigen Geschwindigkeiten zentrifugiert ($200 \cdot g$ /min für 5min). Dieses Verfahren sedimentiert alle zellulären Bestandteile und separiert die leichteren Partikel wie ungebundene Chlamydien im Überstand. Dadurch wird eine gewisse grobe Vortrennung erreicht, die allerdings nicht befriedigt. Es schließt sich die Filtration an.

Das Sediment wird in eine 2cm^3 -Spritze aufgenommen und sofort durch den Filter gepreßt. Anschließend wird mit 30ml DMEM-Kulturmedium nachgespült, um freiliegende Chlamydien zur Passage durch die Membranporen zu zwingen. Lösungen wie Ca^{2+} -freies und Mg^{2+} -freies PBS können nicht als Spülflüssigkeit eingesetzt werden, da sie die Adhärenz der Chlamydien negativ beeinflussen können. Andere Ionen wie Zink und Magnesium spielen in der Chlamydien-Adhärenz auch eine gewisse Rolle (Sugarman und Agbor, 1987). Um dieser Komplexizität gerecht zu werden, wird DMEM-Kulturmedium verwendet. Die gesamte Spülflüssigkeit wird schrittweise mit einer 10cm^3 -Einmalspritze durch den Filter gepreßt, wobei darauf zu achten ist, daß die Filterapparatur nach allen Ebenen gereinigt wird. Die Zellen werden daher gut verteilt und verklumpen nicht im Zentrum des Filters. Damit wird die Separation in allen Filterarealen verbessert. Eine durch einen Adapter (Plastik-Schlauch) ausgestattete 10cm^3 -Einmalspritze wird an den Abfluß der Filterapparatur angesetzt und erzeugt durch Sog eine totale Entleerung der im Filter zurückgebliebenen Spülflüssigkeit zwischen den drei Pumpvorgängen. Diese kombinierte Druck- und Sogwirkung erhöht die Spülwirkung bei gleichzeitiger Einsparung der Spülflüssigkeit.

Anschließend wird ca. 1ml Methanol durch den Filter gegeben. Die Fixierung sollte in einer feuchten Kammer erfolgen, um ein Austrocknen des Filters zu vermeiden. Nach 10min Einwirkungszeit wird der Filter mit ca. 2ml PBS gespült, um eine kontinuierliche Anfeuchtung der Membran zu erhalten.

Die Filterapparatur wird geöffnet, die Membran vorsichtig entnommen und auf einen Objektträger appliziert. Mit gleichmäßig verteilten $20\mu\text{l}$ der Lösung aus FITC-markierten, monoklonalen Antikörpern färbt man den möglichst faltenfrei auf den Objektträger gelagerten Filter. Nach einer 15–20minütigen Inkubation werden die Membran und der Objektträger jeweils einzeln gespült. Der Farbstoff dringt nach übermaximaler Inkubation in das Filtermaterial (Polycarbonat) ein und verleiht dem Präparat eine wäßrig grünliche Färbung. Dadurch wird die Einschätzung erschwert. Die angegebene Zeit sollte also wirklich eingehalten werden. Nach der Spülung wird der Filter erneut auf den Objektträger gelegt und mit einem Deckgläschen verschlossen.

Auszählung und Berechnung

Hier wird wie bei den Versuchen mit adhärennten McCoy- und HeLa-Zellen verfahren (siehe Seite 27).

5.2.3 Invasion in Laborzelllinien

Die Invasionsversuche verfolgen den Zweck, die Invasionsfähigkeit der einzelnen Chlamydienisolate bei der Inokulation ohne Zentrifugation (IFU_{oz}) und mit Zentrifugation (IFU_{mz}) zu ermitteln.

Invasion bei der Inokulation mit Zentrifugation

Diese Versuche beginnen wieder mit der Anlage einer Titration der Chlamydien-suspensionen nach dem bekannten Schema (siehe Abschnitt 5.2.1). Von der jeweils sinnvollen Stufe werden je $200\mu\text{l}$ in ein Deckglasröhrchen gegeben und nachfolgend wird mit $4000\text{g}/\text{min}$ zentrifugiert. Danach werden die Deckglasröhrchen mit SF3-Medium (von Cytogen[®]) mit Actidion ($1\mu\text{l}/\text{ml}$) versehen und für 48h bei 37°C und $5\%\text{CO}_2$ aufbewahrt. Die Auszählung erfolgt nach Färbung mit den monoklonalen FITC-markierten Antikörpern (Syva[®]) gegen das MOMP-Antigen von *C.trachomatis*. Die Einschlüsse in 10 Blickfeldern werden gezählt, das arithmetische Mittel gebildet (E). Danach wird mit dem Axioskop- und dem Verdünnungsfaktor (siehe Seiten 25 und 26) multipliziert. N beträgt 5, da die eingesetzte Menge Chlamydien-suspension $200\mu\text{l}$ entsprach.

Letzten Endes berechnet sich der IFU_{mz} -Titer wie folgt:

$$IFU_{mz}/\text{ml} = N * E/\text{Sehfeld} * \text{Objektivfaktor} * \text{Verdünnungsfaktor} \quad (5.6)$$

Bei den IFU_{mz} -Titer-Bestimmungen liegen sinnvolle Titrationen bei den Stufen 2-4.

Invasion bei Inokulation ohne Zentrifugation

Bei allen Schritten wird verfahren wie bei den IFU_{mz} -Titer-Bestimmungen bis auf die Inokulation und die Chlamydienkonzentration. Nach gründlichem Spülen der Zellschicht mit PBS erfolgt die Inokulation in 1ml SF3-Kulturmedium (enthält Actidion ($1\mu\text{g}/\text{ml}$)) mit $10\mu\text{l}$ der gereinigten Chlamydien-suspension (zur Titerkonzentration/ml siehe Tabellen A.25-A.38). Das Anlegen einer Titrationsreihe erweist sich nicht als sinnvoll, da bei den niedrigen Invasionsraten selbst die Präparate der 1. Verdünnungsstufe im Blickfeld des 20er Objektivs nicht mehr auszählbar sind. Eine Auszählung des gesamten Deckglases wäre bei der Masse der Versuche zeitaufwendig und fehlerbehaftet. Bei der Berechnung der IFU_{oz} -Titer waren daher die Objektivfaktoren für das Axioskop und ein Faktor von 100 ($100 * 10\mu\text{l}=1\text{ml}$) zu beachten. Endziel ist es, den prozentualen Anteil der Chlamydien pro ml anzugeben, der in der Lage ist, in die Zellen durch Inokulation ohne Zentrifugation einzudringen. Diese Prozentzahl entspricht dem Anteil der durch Inokulation ohne Zentrifugation errungenen Einschlüsse bei Einsatz eines Titers, der mit Zentrifugation 100% der McCoy-Zellen infizieren würde. Für alle Inokulationsarten ist der Bezugstiter immer der Invasionstiter bei McCoy-Zellen mit Zentrifugation für den jeweiligen Stamm.

Formel zur Berechnung der IFU-Titer_{oz}:

$$\text{IFU}_{\text{oz}}/\text{ml} = 100 * E/\text{Sehfeld} * \text{Objektivfaktor} \quad (5.7)$$

5.2.4 Adhärenz und Invasion bei humanen Endometriumkulturen

Herkunft des Materials

Als Materialquelle dienten ca. 1cm*2cm*0.5cm große Endometriumstreifen, die unter sterilen Bedingungen im Operationssaal I der Universitätsfrauenklinik der FSU Jena entnommen wurden. Dies geschieht im Rahmen einer therapeutischen Uterusextirpation (Karzinome ausgeschlossen). Dabei wird darauf geachtet, daß das Alter der Patientinnen <50 Jahre ist, da sich menopausale Endometrien durch ihre deutlich kleinere Regenerationsfähigkeit schlechter zur Kultivierung eignen.

Herstellung der primären Endometriumkulturen

Transport: Nach der Entfernung des entsprechenden Endometriumstreifens aus dem extirpierten Uterus wird dieser in das Transportmedium getaucht und bei 4°C in das Institut für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena befördert. Dort wird die Lagerung unter gleichen Bedingungen bis zur Weiterverarbeitung fortgesetzt. Diese wird zügig an den Transport angeschlossen, mit einer maximalen Verzögerung von 2h. Als Transportmittel wird Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen-freies PBS mit Zusatz von Amphotericin B 2.5µg/ml, Gentamicin 10µg/ml, Vancomycin 25µg/ml verwendet.

Aufbereitung: Die Aufbereitung erfolgt nach einer modifizierten Methode nach Varma (Varma et al., 1982; Satyaswaroop et al., 1979).

Sie beginnt mit der *mechanischen Zerkleinerung* des ca. 1cm*2cm*0.5cm großen Gewebstückes in einer Petrischale steril mit Pinzette und Schere. Ziel ist der Erhalt von 1–2mm großen Stücken, wobei das je nach Konsistenz des Präparates mehr oder weniger einfach zu realisieren ist. Mit dem Alter der Patientin steigt die Konsistenz des endometrialen Gewebes durch zunehmende Fibrosierung, das Gewebe jüngerer Patientinnen ist weich. Je zäher das Gewebe desto schwieriger ist dessen adäquate Zerteilung.

Danach erfolgt ein 3maliges Zentrifugieren in HBSS (**H**anks **B**alanced **S**alt **S**olution) mit 25mM HEPES (N–2–**H**ydroxyethylpiperazin–N'–2–ethansulfonsäure)–Puffer und Antibiotika–/Antimykotika–Zusatz (Amphotericin B 2.5µg/ml, Gentamicin 10µg/ml, Vancomycin 25µg/ml) bei 75*g für 10min. Anschließend wird das Gewebe in einer 0.35%igen Kollagenase Typ II–Lösung (von Seromed®) mit Kulturmedium (DMEM–Medium mit Antibiotika–/Antimykotikazusatz) inkubiert. Die Kollagenaselösung muß die Gewebstückel vollständig bedecken. Die

Einwirkungszeit der Kollagenase sollte 120min nicht überschreiten. Die Inkubation erfolgt bei 35°C und 5%CO₂. Sie vereinzelt Stromazellen, läßt aber die Drüsen als Stränge liegen. Zur Trennung führten Satyaswaroop und Kollegen ein differenzierendes Zentrifugieren bei 57*g für 15s durch (Satyaswaroop et al., 1979). Der Erfolg dieses Schrittes ist leider nicht nachvollziehbar, da diese Zentrifugationsgeschwindigkeit kein Sediment erzeugt. Um den Materialverlust in Grenzen zu halten, wird demzufolge lediglich ein 3maliges Zentrifugieren mit 75*g für 2min angeschlossen. Nach dem 3. Zentrifugationsschritt wird das Sediment in DMEM-Kulturmedium mit L-Glutamin (mit 22.5% inaktiviertem FKS, 25mM HEPES, 4µg Insulin/ml, Amphotericin B 2.5µg/ml, Gentamicin 10µg/ml, Vancomycin 25µg/ml) aufgenommen.

Einsaat: Die Menge des zugegebenen Kulturmediums richtet sich nach der Zellkonzentration und wird quantitativ so gestaltet, daß eine Einstellung von 200 000 freien Zellen pro ml erfolgt. Von dieser Zellsuspension werden in jede Einsenkung einer 24-Titer-Platte (Falcon, Polystyren-beschichtet) 0.5ml gegeben. Nur ein kleiner Prozentsatz der Zellen kommt zur Anheftung und vermehrt sich. Die Anheftung bei Endometrien älterer Patientinnen ist schlechter als bei Endometriem jüngerer Frauen, wobei dieser Fakt durch den Erntezeitpunkt oder durch die prophylaktisch höhere Einsaat bei älteren Uteruspräparaten reguliert werden kann. Obwohl sich eine Vorbehandlung der für die Kultivierung benutzten Gefäße mit Fibronectin als günstig erweist, beweist sich im fortschreitenden Versuchsablauf, daß Polystyren-beschichtete Gefäße ebenso zweckmäßig sind.

Mediumwechsel: Der erste Mediumwechsel mit DMEM-Kulturmedium (mit L-Glutamin, 22.5% inaktiviertem FKS, 25mM HEPES, 4µg Insulin/ml, Amphotericin B 2.5µg/ml, Gentamicin 10µg/ml, Vancomycin 25µg/ml) erfolgt nach 48h, dabei werden auch nicht-adhärente Zellen entfernt. Weitere Wechsel werden verbrauchsorientiert (12-72h Rhythmus, deutlich an der Verfärbung des Kulturmediums zu sehen) gestaltet. Um eine reine Basisversuchsreihe durchzuführen, werden weder Östrogen- noch Progesteronzusätze vorgenommen.

Chlamydieninokulation für die Messung der Invasion: Nach ca. 6 Tagen sind die Zellschichten in den Vertiefungen konfluent und damit bereit zur Beimpfung mit Chlamydien. Hierzu wird die Chlamydien suspension, wie in vorangegangenen Versuchen beschrieben, aufbereitet und gereinigt. Dann wird ein Mediumwechsel vorgenommen (DMEM-Kulturmedium mit L-Glutamin, 22.5% inaktiviertem FKS, 25mM HEPES, 4µg Insulin/ml, Amphotericin B 2.5µg/ml, Gentamicin 10µg/ml, Vancomycin 25µg/ml und zusätzlicher Beimengung von 1µg/ml Actidion). In 0,5ml dieses Mediums wird eine definierte Menge an Chlamydien (siehe Tabellen A.45-A.56) appliziert.

Die Auswertung erfolgt bei beiden Inkubationsarten nach 48h. Spülvorgang,

Fixierung und Färbung entsprechen den für die McCoy- und HeLa-Zellen beschriebenen Vorgängen (siehe Abschnitt 5.2.3, Seite 30).

Mikroskopie

Die Mikroskopie erfolgte unter dem Olympus-Mikroskop IX 70. Da es sich um Polystyren-beschichtete 24-Titer-Platten handelt, müssen die Vertiefungen mit einer inversen Optik beurteilt werden. Hier wird mit den gleichen Wellenlängen wie beim Axioskop von Zeiss gearbeitet. Für dieses Mikroskop ergeben sich bei der Ausmessung und Berechnung (siehe Abschnitt 5.2.1) andere Objektiv-Faktoren:

- 10er Objektiv: 121
- 20er Objektiv: 242
- 40er Objektiv: 969
- 60er Objektiv: 2100

Beispiel für die Berechnung eines Objektivfaktors: Hier ist zum besseren Verständnis die Berechnung des Objektivfaktors für das 20er Objektiv des Olympus-Mikroskopes IX 70 beschrieben. Das in Abbildung 5.1 (Seite 26) dargestellte Objektometer besitzt eine dezimale Skaleneinteilung, eine kleine Skaleneinheit entspricht in der Wirklichkeit $10\mu\text{m}$. Im 20er Objektiv sind über den gesamten Durchmesser des Blickfeldes verteilt 106 kleine Skaleneinheiten zu erkennen (Abbildung 5.1 leuchtet nicht das gesamte Blickfeld aus), das entspricht $1060\mu\text{m}$. Dieser Durchschnitt muß zur Berechnung des Flächeninhaltes des realen Blickfeldes in den Radius umgerechnet werden und demzufolge durch 2 geteilt werden. Dieser Radius von $530\mu\text{m}$ wird in die Gleichung zur Berechnung des Blickfeldflächeninhaltes (Gleichung 5.4, Seite 26) eingesetzt, und man erhält 0.8825mm^2 . Zur Berechnung der Fläche einer Vertiefung einer 24-Titer-Platte wird genauso verfahren. Der Radius beträgt 8.25mm und damit der Flächeninhalt 214mm^2 . Wenn man jetzt das Verhältnis aus beiden berechnet, $214\text{mm}^2 : 0.8825\text{mm}^2$, erhält man 242 – den Faktor für das 20er Objektiv des Olympusmikroskopes IX 70.

Zur Berechnung der Titer der einzelnen Isolate werden die Einschlüsse in 10 Blickfeldern ausgezählt und in die entsprechenden Formeln (5.3, 5.6 und 5.7) eingesetzt. Die Objektivfaktoren für das Axioskop werden dabei durch die Objektivfaktoren für das Olympusmikroskop IX 70 ersetzt.

Die endgültige Angabe der Ergebnisse erfolgt für das jeweilige Chlamydienisolat bezüglich dem Titer mit Zentrifugation bei McCoy-Zellen.

Immunologische Differenzierung der Kulturen

Zur Differenzierung zwischen Fibroblasten bzw. Stromazellen und Epithelzellen wird eine Immunfärbung von Cytokeratinen getestet. Cytokeratine sind Mikrofila-

mente, die nur in Epithelzellen vorkommen. Antikörper gegen diese Cytokeratine weisen Epithelzellen nach.

In dieser Studie werden monoklonale Anti-Pan Cytokeratin (Maus-IgG₁-Iso-
typ, Clone PCK-26)-Antikörper (Sigma[®]) verwendet. Sie reagieren mit verhornenden, nicht verhornenden und einfachen Epithelien humanen Ursprungs und zeigen Kreuzreaktionen mit Cytokeratinen anderer Säugetierarten (z.B. Maus). Es handelt sich um unmarkierte murine Antikörper, die durch einen zweiten, Biotin-konjugierten Antikörper (Sigma[®]) markiert werden. Dieser erkennt spezifisch Fc-Fragmente muriner Immunglobuline.

Beide Antikörper-Lösungen werden in den vom Hersteller vorgeschlagenen Verdünnungen für immunhistologische Färbungen (Cytokeratin-AK 1:300 in PBS und Anti-Maus-Fc-AK 1:400 in PBS) angewendet. Eine Inkubation erfolgt jeweils für 30min bei 37°C. Zwischen den Färbeschritten wird gründlich mit PBS gespült.

Der Biotin-markierte Antikörper wird mit einem R-Phycoerythrin-Konjugat nachgewiesen (Sigma[®]).

Die Immunfärbung der Cytokeratine wird ebenfalls bei Anregung 490nm und Emission 520nm beurteilt. Das macht eine gleichzeitige Beurteilung der Zellart (R-Phycoerythrin) und Einschlüsse (Färbung mit direkt FITC-markierten monoklonalen Antikörpern gegen *C.trachomatis*) möglich.

Leider zeigt die versuchte Immunmarkierung der Cytokeratine trotz korrekter Anwendung keinen Erfolg. Auch mehrfache Versuche an HeLa-Zellen scheitern. Auch die Rücksprache mit dem Hersteller bringt keine Aufklärung über die Fehlerquelle. Die Zellen können nur ungefärbt im Phasenkontrast beurteilt werden.

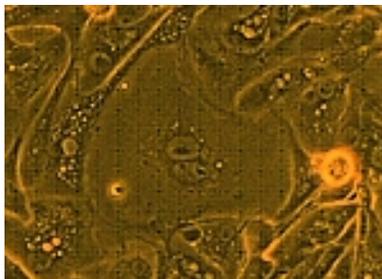


Abbildung 5.3: Kreisrunde endometriale Epithelzelle, 8 Tage nach Einsaat, 390fache Vergrößerung, Phasenkontrast

Charakteristik der Endometriumkulturen

Im Kulturmaterial dominieren 3 verschiedene Zellarten: Stromazellen, endometriale Epithelzellen und Fibroblasten (Varma et al., 1982).

Siegfried und Kollegen geben für Endometriumkulturen einen Zeitraum von 1 bis 2 Monaten an, in welchem epitheliale Endometriumzellen zu beobachten sind (Siegfried et al., 1984). In dieser Studie wird bereits nach 14 Tagen bis 1 Monat ein Überwuchern mit Stromazellen bzw. Fibroblasten beobachtet. Dabei gibt es eine Abhängigkeit von der primären Qualität des Endometriumpräparates. Um einen

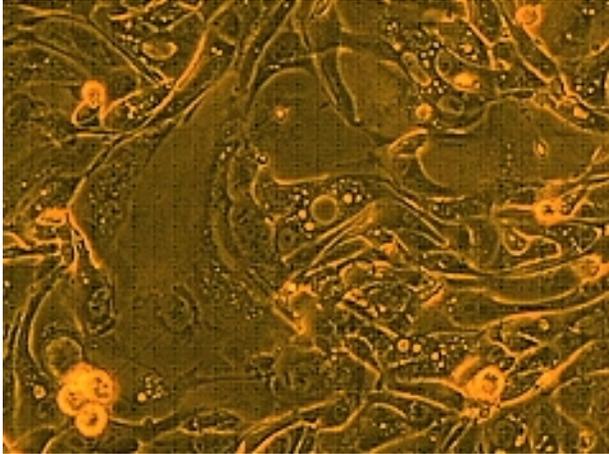


Abbildung 5.4: Endometriale Epithelzellen, 8 Tage nach Einsaat, 390fache Vergrößerung, Phasenkontrast

möglichst hohen Prozentsatz an Epithelzellen zu erhalten, ist eine Untersuchung am 5.–7. Tag nach der Einsaat ratsam.

Eine Charakteristik der Epithelzellen ist, bedingt durch die relative Variation der Gestalt und die nicht geglückte Cytokeratin-Färbung, erschwert. Sie konnten daher nur mit Phasenkontrast beurteilt werden. Die Epithelien siedeln sich in dicht-gepackten Kolonien an. Es ist sehr typisch, daß sie kaum einen interzellulären Spalt lassen (Kirk et al., 1978), siehe auch Abbildung 5.5, Seite 36. Einerseits können sich polygonale und kaulquappenähnlich geschwungene Formen ausprägen und sie ordnen sich wie in Wirbeln an (Varma et al., 1982), vergleiche auch Abbildung 5.5. Andererseits können sie auch einzeln in kreisrunden Formen erscheinen (Centola et al., 1984), vergleiche auch Abbildungen 5.3 (Seite 34) und 5.4. Laut Centola und Kollegen zeigen die Epithelzellen (gewonnen sowohl in der proliferativen als auch in der sekretorischen Phase) einen großen Nukleus mit prominentem Nukleolus (Centola et al., 1984) (vergleiche Abbildung 5.5). Nach 10 Tagen erreichen die Epithelzellen einen Wachstumsstopp, und ab dem 14. Tag beginnen sie unter Ausbildung von Vakuolen zu degenerieren.

Die endometrialen Stromazellen demonstrieren eine polygonale, epitheloide Gestalt. Sie liegen auch sehr dicht und erscheinen wie gepflastert (siehe Abbildung 5.6, Seite 37). Nach 10 Tagen überwuchern sie die Epithelzellen. Sie verlieren ihre epitheloide Gestalt und werden zunehmend langgestreckter.

Die dritte, fibroblastenähnliche Zellart tritt nach langer Erhaltung der Kulturen oder bei bestimmten Endometriiden spontan auf. Varma und Kollegen halten diese Zellen nicht für Abkömmlinge von Stromazellen (Varma et al., 1982). In dieser Studie wurde mehr der Eindruck erweckt, daß sie sich nach langer Zeit aus Stromazellen entdifferenzieren können. Bei älteren Kulturen (>30 Tage) überwuchern sie alles und lassen keine Stroma- bzw. Epithelzellen mehr erkennen. Bei spontanem Auftreten handelt es sich meistens um Endometriiden älterer Frauen (mögliche Nähe zum Klimakterium nicht ausgeschlossen). Sie sind lange, spindel-förmige Zellen im lockeren Zellverband, mit großen intrazellulären Lücken (siehe

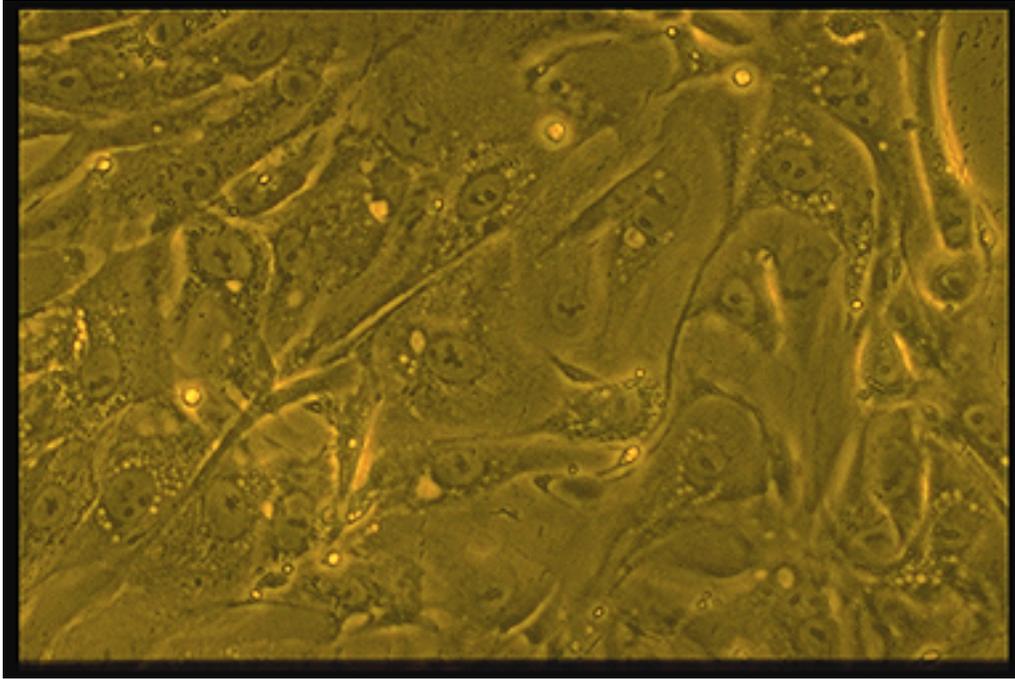


Abbildung 5.5: Endometriale Epithelzellen, Phasenkontrast, 195fache Vergrößerung

Abbildung 5.7, Seite 38).

Die Epithel-/Stromazellverteilung liegt im Schnitt bei ca. 60%/40%. Aber die Chlamydien zeigten auch starke Affinitäten gegenüber den Stromazellen. Die Abbildung 5.8, Seite 38 zeigt Einschlüsse in epitheloiden Zellen und Abbildung 5.9, Seite 39 in lang gestreckten Stromazellen. Die Verwendung einfacher Färbungen, die spezifisch Epithelzellen anfärben (wie z.B. Alkalische Phosphatase, Peroxidase und Gammaglutamyltranspeptidase (Siegfried et al., 1984)), sind für diese Studie nicht sinnvoll, da nur mit einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung die Beziehung zwischen Zellart und Chlamydieneinschlußhäufigkeit untersucht werden hätte können.

Adhärenzversuche an primären Endometriumkulturen

Für die Adhärenzversuche an primären Endometriumkulturen erfolgen zunächst die gleichen Schritte wie für die Versuche der Invasion dieser Zellart.

Inokulation: Quantitative Angaben über die Chlamydientiter sind in den Tabellen A.39–A.44 zu finden.

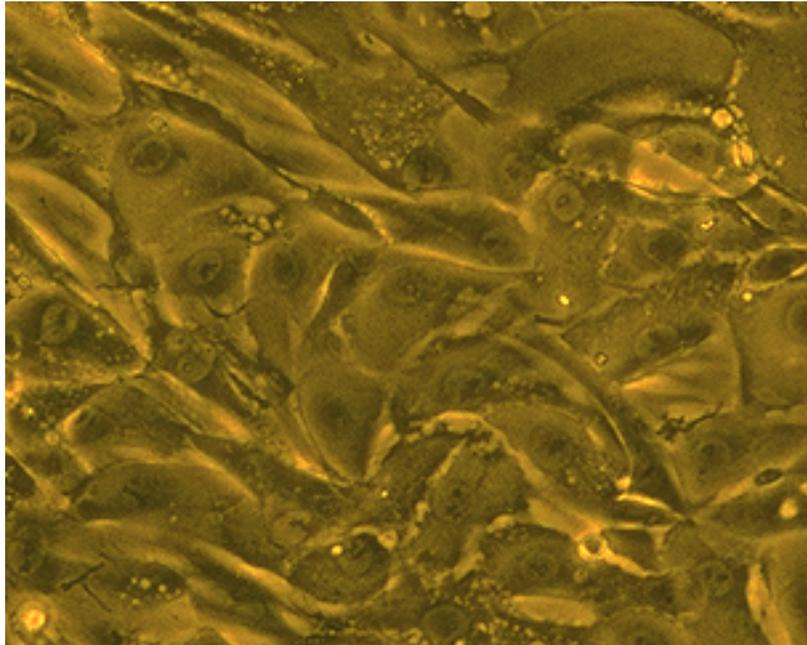


Abbildung 5.6: Endometriale Stromazellen, Phasenkontrast, 196fache Vergrößerung

Auswertung und Berechnung

Die anschließenden Schritte der Auswertung gleichen der für McCoy- und HeLa-Zellen beschriebenen Vorgehensweise. Zur Berechnung der angebundenen Chlamydien in Prozent von der Einsaat werden die Gleichungen 5.1 und 5.2 verwendet. Die Endergebnisse sind in den Tabellen A.39–A.44, Seite 67 zu finden.

5.2.5 Adhärenzversuche an murinen Genitalzellen

Herkunft des Zellmaterials

Genitalzellen werden durch Zervikal- bzw. Vaginalabstriche gewonnen. Für Zervikalabstriche wird normalerweise beim Menschen ein Zytobürstchen in den äußeren Muttermund eingeführt, einmal um 360° gedreht und vorsichtig wieder aus dem Muttermund entfernt. Das ist bei Mäusen wegen der ungünstigeren Größenverhältnisse technisch nicht realisierbar. Daher werden also nur tiefe Vaginalabstriche von den 10–24 Wochen alten BALB/C-Mäusen (gehalten im Institut für Versuchstierkunde Jena/Beutenberg) entnommen.

Es werden in die Untersuchung BALB/C-Mäuse mit und ohne SCID-Defekt einbezogen, da in vorangegangenen Versuchen durch Dr. Oehme (Institut für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena) beide Maustypen intravaginal mit Chlamydien (19 verschiedene Isolate) inokuliert wurden. Ohne Progesteronapplikation konnte bei keinem der Maustypen eine Infektion erzeugt werden. Aus Zeit- und

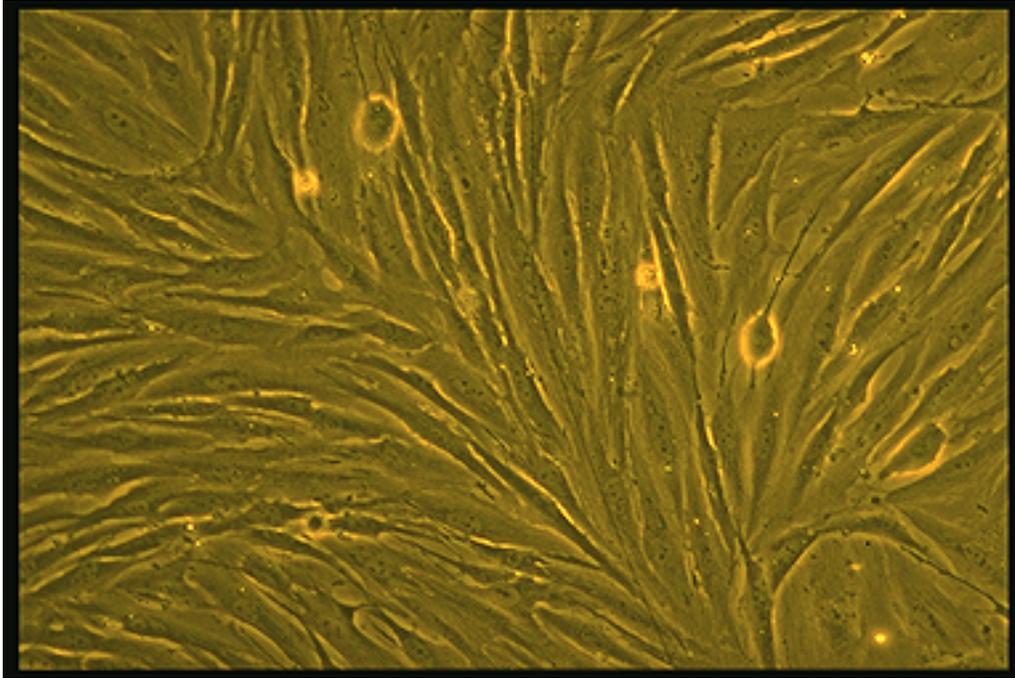


Abbildung 5.7: Fibroblasten des endometrialen Stromas, Phasenkontrast, 195fache Vergrößerung

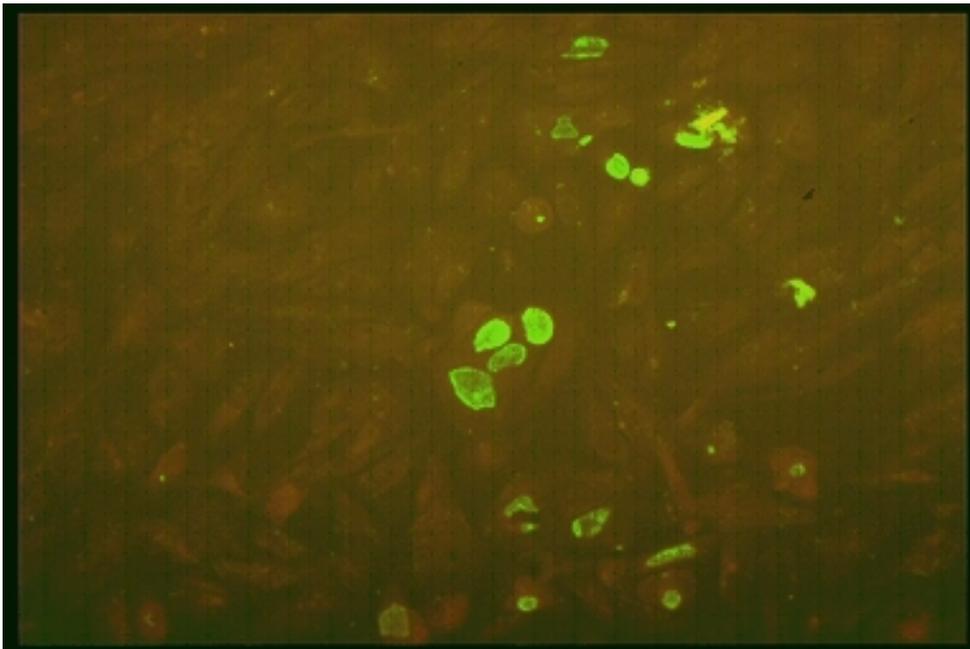


Abbildung 5.8: Epitheloide Endometriumzellen mit E₄₃₄-Einschlüssen, 195fache Vergrößerung, Immunfluoreszenz

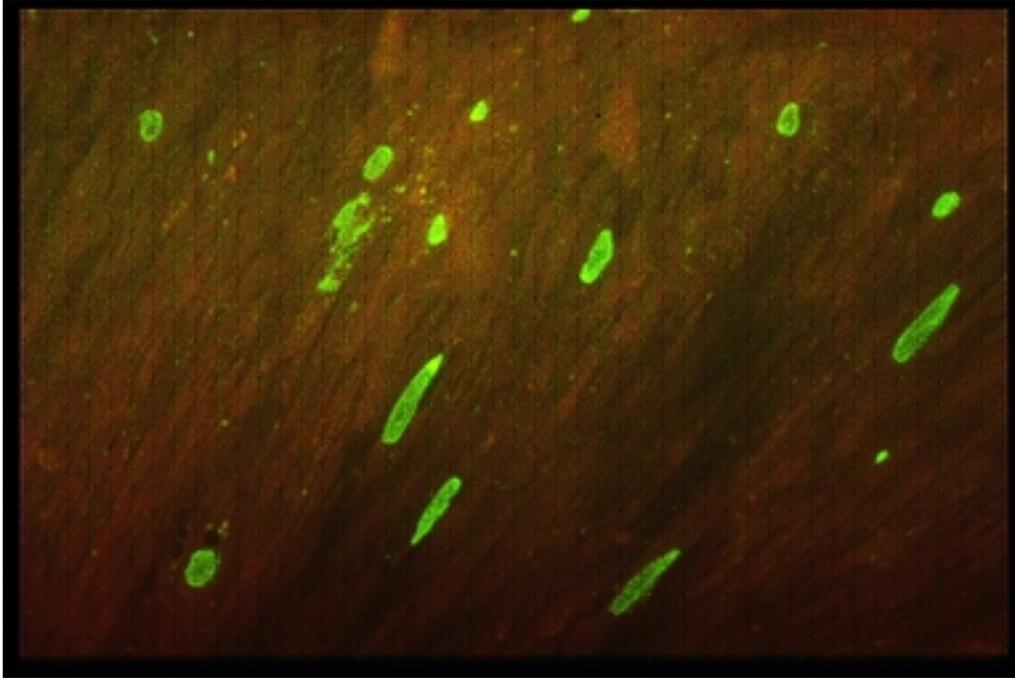


Abbildung 5.9: Fibroblasten mit Einschlüssen von E₄₃₄-Chlamydien, 195fache Vergrößerung, Immunfluoreszenz

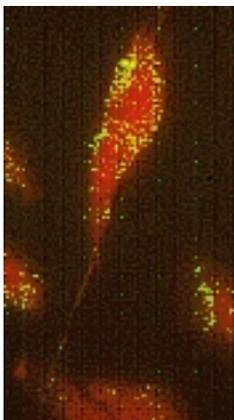


Abbildung 5.10: LGV₂-Adhärenz an Endometriumzellen mit Zentrifugation, 390fache Vergrößerung, Immunfluoreszenz

technischen Gründen jedoch mußte die Progesteronapplikation auf SCID-Mäuse beschränkt werden. Ein Vergleich der Infektiösität der 19 Chlamydienisolate wurde daher nur mit SCID-Mäusen durchgeführt. Diese Studie verfolgt den Zweck, eventuell bestehende Unterschiede im Adhärenz- und Invasionsverhalten der einzelnen Isolate herauszuarbeiten. Die Einbezugnahme der Zellen der BALB/C-Mäuse soll etwaige noch nicht bekannte Effekte bei SCID-Mutationen ausschließen.

Die Wattestäbchen werden nach Abstrichentnahme in mit Transportmittel vorbereitete Zentrifugationsröhrchen eingetaucht und damit das Zellmaterial suspendiert. Die Röhrchen verstaut man in einer Kühlbox für den schnellen Transport ins Mikrobiologische Institut der FSU Jena. Als Transportmittel wird DMEM-Kulturmedium mit Amphotericin B $2.5\mu\text{g/ml}$, Gentamicin $10\mu\text{g/ml}$, Vancomycin $25\mu\text{g/ml}$ verwendet.

Charakteristik der Abstrichzellen

Diese Abstriche werden mit Unterstützung von Frau Dr. Müller, Institut für Pathologie der FSU Jena, ausgewertet. Im Abstrich dominieren größtenteils sogenannte Schollen, d.h. Zellen der oberen Schichten des nichtverhornenden Plattenepithels der Vagina. Sie sind große, polygonale Zellen, die eine leichte Transparenz aufweisen. Zu geringeren Anteilen (ca. 10%) sind auch andere Zellen zu finden, vornehmlich Basal- bzw. Parabasalzellen (untere Schichten des Plattenepithels der Vagina und Ektozervix) und Endozervikalzellen. Bei den Basalzellen handelt es sich im Gegensatz zu den Schollen um kleinere ovale Zellen, deren Plasma dichter erscheint.

Endozervikalzellen sind becherförmig. Mitunter sieht man nur die Nuklei dieser Zellen, da sie sehr empfindlich gegenüber mechanischen Einwirkungen sind. Wegen der ungünstigen Größenverhältnisse bei den Mäusen können keine Endozervikalabstriche gewonnen werden, so daß der Anteil der Endozervikalzellen bei diesen hohen Vaginalabstrichen nicht erhöht werden kann. Wie in der Abbildung 5.11 zu sehen ist, adhärieren die Chlamydien auch an den Schollen.

Die Mäuse waren vor der Abstrichentnahme nicht mit Östrogenen oder Progesteronen behandelt worden.

Inokulation

Hier wird auf die Versuche mit den suspendierten McCoy- und HeLa-Zellen verwiesen. Die Zelleinsaat ist auf Grund der enormen Zellgröße geringer und ideale Werte liegen bei 50 000–100 000.

Filtration, Auswertung und Berechnung

Die anschließenden Schritte (Filtration, Auswertung und Berechnung) gleichen der für die suspendierten McCoy-Zellen beschriebenen Vorgehensweise.

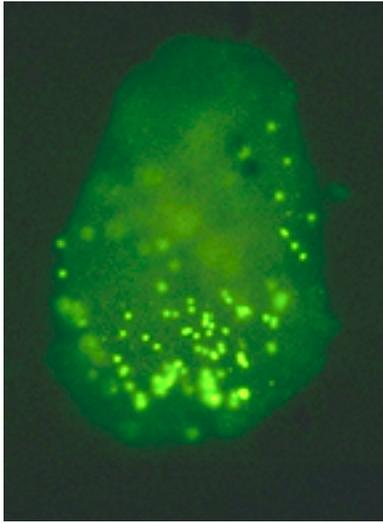


Abbildung 5.11: Adhärenente Chlamydien an vaginalen Schollen, Immunfluoreszenz, 1145fache Vergrößerung

Vitalfärbungen

Vitalfärbungen werden durchgeführt, um die Qualität der Genitalabstriche beurteilen zu können.

Trypanblaufärbung: Der Zellsuspension werden 0.1ml entnommen und mit 0.1ml 0.4%iger Trypanblau-Lösung versetzt. Diese Mischung wird anschließend für 5min bei 37° inkubiert. Nach gründlichem Durchmischen wird der Prozentsatz vitaler Zellen nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\% \text{vitaler Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} * 100 \quad (5.8)$$

MTT-Test: Man verzichtete bei dem MTT-Test in dieser Studie auf die photometrische Auswertung, da man für diese Untersuchung Bezugswerte benötigt, die für genitale Abstrichzellen nicht vorhanden sind.

Zunächst stellt man eine Lösung von 5mg MTT in 1ml PBS her. 10µl davon werden in 100µl der Zellsuspension (30000 Zellen in 100µl) gegeben. Nach einer Einwirkungszeit von 2-4 Stunden wird der Überstand abgezogen. Eine Lösung aus 10ml DMFO (Dimethylformamid), 10ml destilliertem Wasser und 2g SDS (Sodiumdodecylsulfat) wird hergestellt. 100µl dieser Lösung wird zur Zellsuspension gegeben. Anschließend folgt wieder eine Einwirkungszeit von 3 Stunden. Eine Violettfärbung der Suspension weist qualitativ auf vitale Zellen hin.

5.2.6 Invasion in murine Genitalzellkulturen

Herkunft des Materials

Das Material besteht aus dem gesamten Uterus mit Eileitern und Zervix mit angrenzender Vagina. Geschlechtsreife BALB/C-Mäuse (mit und ohne genetischem

SCID-Defekt), gehalten im Labor für Versuchstierkunde Jena-Beutenberg, werden mit CO_2 -Gas eingeschläfert. Eine sofortige Genitaltraktextirpation schließt sich an. Der gesamte Uterusschlauch mit Eileitern und Vaginastumpf wird unter der Lupe zunächst längs durchtrennt und das gesamte Stück in Transportmedium (DMEM-Medium mit Amphotericin B $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$, Gentamicin $10\mu\text{g}/\text{ml}$, Vancomycin $25\mu\text{g}/\text{ml}$) aufbewahrt.

Es folgt der zügige Transport in das Mikrobiologische Institut in einer Kühlbox bei ca. 4°C . Dort wird die weitere mechanische Zerkleinerung der Präparate vorgenommen. Eine Petrischale wird mit ca. 5ml HBSS (mit 25mM HEPES-Puffer, Amphotericin B $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$, Gentamicin $10\mu\text{g}/\text{ml}$, Vancomycin $25\mu\text{g}/\text{ml}$) gefüllt und die Präparate in diesem Medium mit sterilen Instrumenten in 1–2mm große Gewebsbröckel zerlegt. Dieses Vorhaben erweist sich als weitaus schwieriger als bei den humanen Präparaten. Für die weitere Aufbereitung erfolgt die Trennung in Zellen des oberen (Tuben, Uteruscorpus) und unteren (Zervix, Vagina) Genitaltraktes.

Zellen des oberen Genitaltraktes

Für die Endometrium- und Tubenepithelien wird die bereits für humane Endometriumkulturen beschriebene modifizierte Methode nach Varma angewendet. Leider gelingt die Anwendung dieser Methode bei murinen Endometrien nicht. Das Problem ist die mangelnde Adhärenz der Zellen nach Einsaat. Selbst die unterschiedlichen Gefäßformen können keine Verbesserung bringen. Zunächst werden Polystyren-Platten (24 Vertiefungen, von Falcon[®]), später Platten mit Polyäthylen-Beschichtung der gleichen Firma verwendet. Unbeschichtete Mikrotiter-Platten von Greiner werden ebenfalls getestet. Schließlich wird eine Vorbehandlung der Glaseinlage von Kulturröhrchen mit Fibronectin versucht.

Leider kann keine dieser Varianten ein Adhärenzen der genannten Zellen erzeugen. Auch unter Veränderung der prozentualen FKS-Beimengung treten keine Erfolge in dieser Hinsicht auf. Daher muß auf die Verwendung der Zellen des oberen Genitaltraktes verzichtet werden. Für die Durchführung der Invasionsversuche mit murinen Genitalzellen werden deshalb nur kultivierte Zellen des unteren Genitaltraktes benutzt.

Zellen des unteren Genitaltraktes

Aufbereitung: Bis zum Stadium der Zerkleinerung der Präparate deckt sich die Aufbereitung dieser Zellen mit jener der humanen Endometrien. Ziel ist eine Partikelgröße von ca. 1mm^3 . Der sich anschließende 3malige Spülvorgang ist identisch. Nach dem 3. Zentrifugationsschritt werden die Gewebsbröckel, die aus der gesamten Wand mit Epithel und Muskelschichten bestehen, in Kulturmedium (D-Val MEM-Medium von Gibco[®] mit 20% inaktiviertem FKS, 25mM HEPES, $4\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin, Amphotericin B $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$, Gentamicin $10\mu\text{g}/\text{ml}$, Vancomycin

25 μ g/ml) aufgenommen. Durch mehrfaches Pipettieren wird eine gute Verteilung der Gewebsbröckel erreicht. Das weitere Verfahren ergibt sich aus der sogenannten Explantattechnik nach Vesterinen (Vesterinen et al., 1980). Der Zusatz von D-Val MEM-Medium fördert eine Selektivierung von Epithelien (besonders der Plattenepithelien), da nur diese Zellen D-Valin durch Besitz einer entsprechenden Konvertase verwenden können. Fibroblasten besitzen die Konvertase nicht und können daher kein L-Valin (eine essentielle Aminosäure) herstellen. Dadurch wird die Proliferation der Konvertase-defizienten Zellen gehemmt. Eine überdimensionale Erhöhung des FKS-Einsatzes relativiert diese Hemmung, daher kann man die Menge des FKS nicht beliebig steigern.

Einsaat: Es sollten mindestens 5 solcher Explantate pro Vertiefung mit 0,5ml Kulturmedium eingesät werden (Vesterinen et al., 1980). Polystyren-beschichtete Platten von Falcon erwiesen sich als zweckmäßig.

Mediumwechsel: Der erste Mediumwechsel findet nach 48h statt, beim 2. Mediumwechsel erfolgte eine Umstellung auf DMEM-Kulturmedium mit L-Glutamin (Zusatz von 25mM HEPES, 22.5% inaktiviertem FKS, 4 μ g Insulin/ml, Amphotericin B 2.5 μ g/ml, Gentamicin 10 μ g/ml, Vancomycin 25 μ g/ml). Die Umstellung des Mediums wird wegen der erwiesenen Hemmwirkung des D-Val MEM-Mediums auf die chlamydiale Vermehrung (Mardh, 1981) durchgeführt. Weitere Wechsel erfolgen in 48h-Intervallen.

Charakteristik der murinen Genitalzellkulturen: Bei dem primären Material handelt es sich um den Vaginastumpf, die Ektozervix und den endozervikalen Kanal. Trotz der Selektionierung der Epithelien aus diesem Bereich durch die Verwendung des D-Valin-Mediums können sich einige wenige Fibroblasten anheften und vermehren. Es kann wegen des technischen Aufwandes nicht zwischen Plattenepithelien oder Endozervikalzellen unterschieden werden. Plattenepithelien überwiegen mit großer Wahrscheinlichkeit in der Kultur, denn sie können D-Valin besser verwerten (Vesterinen et al., 1980) und dominieren mengenmäßig im Urpräparat. Es handelt sich um recht regelmäßige, polygonale Zellen, die einen dichten Zellrasen bilden (siehe Abbildung 6.5, Seite 49).

Inokulation: Die Einsaat der Chlamydien bleibt von der Menge her im Vergleich zu den humanen Zellen unverändert, jedoch sind die Zellzahlen deutlich geringer, so daß ein höheres Einsaatverhältnis resultierte. Zellzahlen liegen im Schnitt bei ca. 2000. Man kann in diesem Fall nicht von einer konfluenten Zellschicht sprechen. Leider ist bei der ausgesprochen geringen Zellausbeute und der niedrigen Proliferationstendenz ein Erreichen einer kompletten Zellschicht unmöglich. Die genauen Angaben der Einsaat sind den Tabellen A.71–A.77 zu entnehmen.

Mikroskopie: Die mikroskopische Auswertung erfolgt mit Hilfe des Mikroskopes IX 70 von Olympus (siehe Aufnahme 5.12). Dabei müssen die Zellzahlen und die Einschlüsse pro Vertiefung vollständig ausgezählt werden.

Berechnung: Die Berechnung der Zellzahl und der Zahl der Einschlüsse entfällt, da eine komplette Auszählung der Vertiefung erfolgt. Aus der Zahl der Einschlüsse und der Zellzahl wird der prozentuale Anteil der Einschlüsse bezüglich der Zellzahl ermittelt. Eine gleiche Einsaat von IFU pro Zelle kann technisch nicht realisiert werden, daher muß für den Vergleich der einzelnen Stämme ein weiterer Faktor in Betracht gezogen werden. Dieser Faktor F ergibt sich aus dem IFU_{mz} -Titer für McCoy-Zellen und der Zellzahl. Die prozentualen Einschlüsse pro Zellzahl werden dann durch diesen Faktor geteilt. Die endgültige Angabe w entspricht dem Prozentsatz der einschlußpositiven Zellen bei einer Einsaat IFU_{mz} für McCoy-Zellen:Zelle von 1:1.

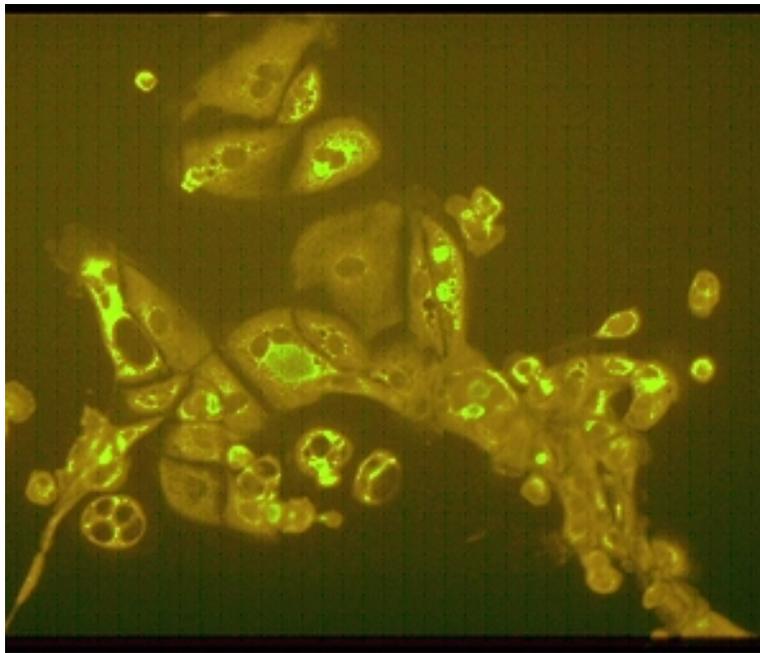


Abbildung 5.12: Murine Genitalzellkultur (BALB/C) mit chlamydialen Einschlüssen (E_{1733}), 390fache Vergrößerung, Immunfluoreszenz

Kapitel 6

Ergebnisse

6.1 Einleitung

Alle Teil- und Endergebnisse sind im Anhang, Abschnitt [A.1.1](#) im einzelnen parallel zur Gliederung des Kapitels Methoden aufgelistet. Graphische Darstellungen dazu sind im Anhang, Abschnitt [B.1](#) zu finden.

Als Signifikanztest (Hypothesentest) zur Darstellung quantitativer Unterschiede wird der Mann-Whitney-Test verwendet. Er ist ein verteilungsunabhängiger Test für 2 unabhängige Stichproben mit metrischen oder ordinalen Daten ([Clarke und Cooke, 1998](#)). Resultate mit $p \leq 0.05$ werden als signifikant definiert.

Für den Vergleich der Adhärenz der Chlamydien an adhärenenten und suspendierten Zellen sowie für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Adhärenz und Invasion der Erreger wurde die Spearmansche Korrelationsanalyse verwendet. Die Korrelationsanalyse ist ein geeignetes Instrumentarium, um eine qualitative Aussage über das Vorhandensein und die Stärke von Abhängigkeiten zu gewinnen ([Hartung und Elpelt, 1992](#)). Die Spearmansche Rangkorrelationsanalyse erwies sich für diese Studie als sinnvoll, da sie für stetige Daten, die nicht normalverteilt sein müssen, anwendbar ist. Zur Berechnung des Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten werden den Variablen der Zahlenreihen Ränge zugeordnet, die dann für jeweils zwei Zahlenreihen verglichen werden. Als jeweils eine Zahlenreihe werden die Mittelwerte der 6 Chlamydienisolate für eine bestimmte Zell- und Versuchsart aufgefaßt. Damit kann z.B. eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit getroffen werden, daß sich ein Isolat, welches eine höhere Adhärenz als ein anderes Vergleichsisolat bei McCoy-Zellen zeigt, auch durch eine höhere Invasion (gleiche Inkubationsart und Zellart) auszeichnen kann.

6.2 Vergleich der Chlamydienadhärenz an Zellen im Gewebsverband und artifiziell suspendierten Zellen

Zu dieser Analyse werden die Adhärenzversuche an McCoy- und HeLa-Zellen im Gewebsverband und an suspendierten Zellen betrachtet.

Bei dem Vergleich der Versuche an McCoy-Zellen fällt auf, daß die Anbindung der Chlamydien bei adhärennten und suspendierten Zellen quantitativ und zum Teil qualitativ sehr unterschiedlich ausfallen. Das bestätigt auch die Korrelationsanalyse nach Spearman mit 0.14 für Adhärenzversuche mit Zentrifugation. Bei Versuchen zur Ermittlung der Adhärenz an adhärennten und suspendierten McCoy-Zellen ohne Zentrifugation kann man einen qualitativen Zusammenhang schon eher erkennen. Das bestätigt auch der deutlich höhere Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient mit 0.91.

Bei den HeLa-Zellen kann man sowohl bei der Adhärenz mit Zentrifugation als auch bei der Adhärenz ohne Zentrifugation nähere Zusammenhänge zeigen. Für die Adhärenz mit Zentrifugation ergibt sich ein Koeffizient von 0.83. Die Versuche zur Ermittlung der Adhärenz ohne Zentrifugation zeigen eine Korrelation bei adhärennten und suspendierten Zellen von 0.91. Insgesamt ist jedoch zu beachten, daß die Zusammenhänge qualitativer Natur sind und die Adhärenzen an suspendierten Zellen für beide Zellarten grundsätzlich deutlich niedriger ausfallen ($p \leq 0.05$).

6.3 Einschätzung der Adhärenz der Chlamydien an Zielzellen als Virulenzfaktor

Zur Betrachtung inwieweit sich eine hohe Adhärenz in eine entsprechende Invasion in Zielzellen auswirkt, werden Adhärenz- und Invasionsergebnisse quantitativ mit dem Mann-Whitney-Test analysiert und qualitativ (Vergleich der Stämme untereinander) erneut mit der Spearmanschen Rangkorrelationsanalyse untersucht. Letztere wird für alle gewählten Zielzellen separat geführt.

Quantitativ zeigt sich, daß die Adhärenz ohne Zentrifugation für alle Stämme an McCoy-Zellen kleiner als an den Endometriumkulturen ist ($p \leq 0.05$). Der Vergleich mit den Versuchen an HeLa-Zellen bringt bedingt durch die statistische Streuung keine signifikanten Unterschiede mit Ausnahme des Stammes F₁₇₃₅, bei dem die Adhärenz an HeLa-Zellen signifikant größer als an McCoy-Zellen ist ($p \leq 0.05$). Die durch Inkubation ohne Zentrifugation erzeugten Invasionen an HeLa-Zellen liegen jedoch signifikant unter denen an McCoy-Zellen ($p \leq 0.05$, Ausnahme F₁₇₃₅ und F₁₇₃₀). Die Invasionen ohne Zentrifugation in Endometriumkulturen sind ohne Ausnahme signifikant kleiner als in McCoy-Zellen ($p \leq 0.05$).

Wenn man qualitativ das Verhalten der einzelnen Isolate untereinander vergleicht, zeigt sich grundsätzlich bei allen getesteten Zellarten, daß sich ein Zusammenhang der Adhärenz und Invasion ohne Zentrifugation für jeweils eine Zellart herstellen läßt. Das heißt, wenn ein Isolat eine größere Adhärenz als ein anderes Isolat zeigt, dann kann auch eine größere Invasion des ersten Isolates im Vergleich zum zweiten Isolat beobachtet werden. Einzige Ausnahme sind die murinen Genitalzellen, bei denen keine Invasion ohne Zentrifugation der Chlamydien zu beobachten war. Die größte Korrelation kann bei den Versuchen mit HeLa-Zellen gezeigt werden, bei denen sich ein Koeffizient von 0.83 ergibt.

Bei der Analyse des Zusammenhanges zwischen der Adhärenz und Invasion an bzw. in McCoy-Zellen ohne Zentrifugation wird ein geringerer Koeffizient von 0.6 ermittelt. Der Korrelationskoeffizient für die gleiche Analyse bei Endometriumzellkulturen beträgt 0.71. Insgesamt wird deutlich, daß nur ein bestimmter Anteil der adhärennten Chlamydien eine entsprechende Invasion ohne Zentrifugation in die jeweilige Zellart hervorruft. Hierbei fällt jedoch auf, daß der Zusammenhang der Adhärenz und Invasion ohne Zentrifugation bei HeLa-Zellen als modifizierte Epithelzellen größer als bei McCoy-Zellen (Fibroblasten) ist. Bei Endometriumkulturen (Mischkultur) wird eine Mittelposition demonstriert.

Quantitative Untersuchungen der Inkubationsversuche mit Zentrifugation zeigen in der Mehrzahl größere Adhärenzen der Isolate LGV₂, D_{ICCAL8}, E₁₇₃₃ und F₁₇₃₅ an McCoy-Zellen als an HeLa- und Endometriumzellen ($p \leq 0.05$, Ausnahme: LGV₂ und E₁₇₃₃, Vergleiche für McCoy- versus HeLa-Zellen sind insignifikant). Für die Isolate E₄₃₄ und F₁₇₃₀ sind die Adhärenzen mit Zentrifugation an McCoy-Zellen deutlich kleiner als an HeLa- und Endometriumzellen ($p \leq 0.05$). Überraschenderweise zeigen sich jedoch einheitlich für alle Isolate größere Invasionen der Chlamydien in McCoy-Zellen ($p \leq 0.05$).

Für die Versuche der Adhärenz und Invasion der einzelnen Chlamydienisolate mit Zentrifugation ist qualitativ kein Zusammenhang zu finden. Die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman ergibt für den Vergleich der Adhärenz und Invasion mit Zentrifugation bei HeLa-Zellen einen Wert von -0.2. Die Analyse für McCoy-Zellen mit den gleichen Kriterien zeigt eine Korrelation von -0.57, während bei Endometriumkulturen der Zusammenhang mit 0.54 quantifiziert werden kann. Bei murinen Genitalzellen ergibt der Vergleich einen Koeffizienten von -0.42.

6.4 Beurteilung des Verhaltens des Isolates E₄₃₄

Grundlegend zeigt das Isolat E₄₃₄ sowohl bei den Zelllinien als auch bei den humanen Endometriumkulturen eine größere Adhärenz ohne Zentrifugation als alle anderen okulogenitalen Isolate ($p \leq 0.05$ für HeLa- und McCoy-Zellen). Als ein besonders herausragendes Ergebnis demonstriert das Isolat E₄₃₄ mit 69.82% die höchste Adhärenz an HeLa-Zellen mit Zentrifugation—deutlich höher als die des Isolates LGV₂ ($p \leq 0.05$). Auch bei der Adhärenz an humanen Endometriumkul-

turzellen mit Zentrifugation zeigt das Isolat E_{434} die höchste Adhärenz ($p \leq 0.05$). Die Versuche der Adhärenz an McCoy-Zellen mit Zentrifugation zeigen, daß das zweite E-Vergleichsisolat E_{1733} und LGV_2 größere Adhärenzen als E_{434} ($p \leq 0.05$) aufweisen.

Bei dem Vergleich der Invasionen wird bei McCoy- und Endometriumzellen deutlich, daß das Isolat E_{434} größere Invasionen ohne Zentrifugation als alle anderen okulogenitalen Isolate aufweisen kann ($p \leq 0.05$, einzige Ausnahme D_{ICCAL8} bei Endometriumzellen $p=0.06$). Bei den HeLa-Zellen kommt es wegen der statistischen Streuung der Werte leider nicht zu solchen signifikanten Aussagen, lediglich F_{1735} zeigt deutlich kleinere Invasionen ohne Zentrifugation ($p \leq 0.05$). Bei den murinen Genitalzellen wird keine quantifizierbare Invasion ohne Zentrifugation durch die okulogenitalen Isolate erreicht. Grundlegend stehen die Ergebnisse der Invasion ohne Zentrifugation im Einklang mit den Werten der Adhärenz der Chlamydien ohne Zentrifugation und bestätigen damit den Zusammenhang, der schon im Abschnitt 6.3 beschrieben wurde.

Bei der Invasion durch Inokulation mit Zentrifugation zeigt sich das Isolat E_{434} nicht als invasionsstärkstes okulogenitales Isolat, sondern wird sowohl bei HeLa-Zellen als auch bei Endometriumzellen durch das Isolat D_{ICCAL8} übertroffen ($p \leq 0.05$). Eine erhöhte Adhärenz der E_{434} -Chlamydien mit Zentrifugation kann sich also bei diesen Zellarten nicht in eine gesteigerte Invasion auswirken.

6.5 Selektive Betrachtung der Versuche mit murinen Genitalzellen

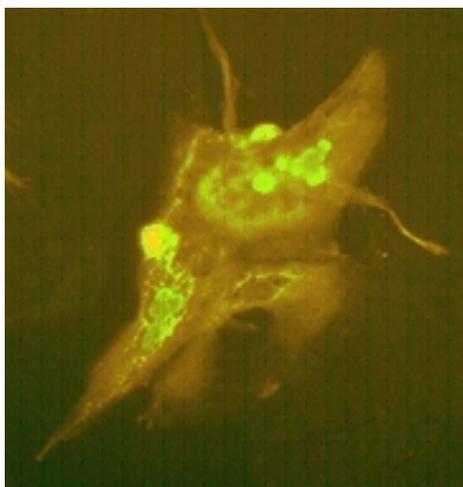


Abbildung 6.1: Atypische, nicht konfluierte Chlamydieneinschlüsse (E_{434}) in murinen Genitalzellen (BALB/C), 48h p.i., 390fache Vergrößerung

Bei den Inkubationen sowohl mit als auch ohne Zentrifugation an murinen Genitalzellen zeigen sich statistisch sehr streuende Adhärenzen. Eine mögliche Begründung ergibt sich aus den Vitalfärbungen mit Trypanblau. Für die Zellen

der SCID-Mäuse werden höhere vitale Anteile (50–75%) erreicht, die Werte für die BALB/C-Zellen ohne SCID-Defekt können eine Spanne von 29.5–64% (4 Abstriche) nicht überschreiten. Aufgrund der geringen Zellausbeute bei jedem Abstrich können nicht alle Versuche simultan durchgeführt werden, so daß also für die Adhärenzversuche der einzelnen Chlamydienisolate ganz unterschiedliche Voraussetzungen bestehen.

Deutlich ist jedoch die bessere Fähigkeit der LGV₂-Chlamydien im Vergleich zu den okulogenitalen Stämmen, an den Genitalzellen ohne Zentrifugation anzubinden ($p \leq 0.05$). Als einziges signifikantes Ergebnis in Bezug auf das Isolat E₄₃₄ werden höhere Adhärenzwerte bei den Versuchen sowohl mit als auch ohne Zentrifugation gegenüber dem Isolat F₁₇₃₅ erzeugt ($p \leq 0.05$).

Aufgrund der starken statistischen Streuung der Adhärenz- und Invasionswerte bei murinen Zellen wurde auf die Angabe der Mittelwerte sowie auf deren graphische Darstellung verzichtet.

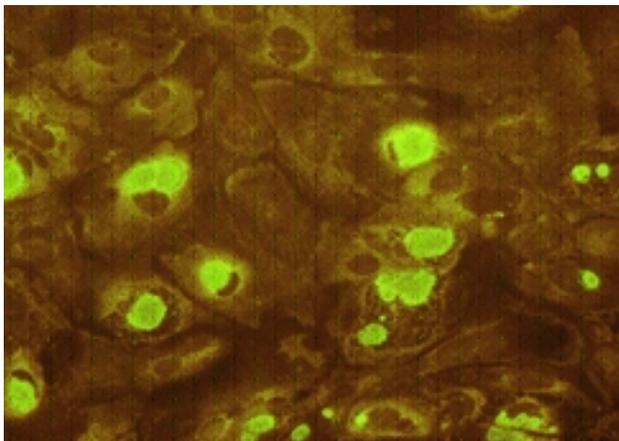


Abbildung 6.2: Murine Genitalzellkultur (BALB/C) mit *C. trachomatis* F₁₇₃₅-Einschlüssen, 390fache Vergrößerung, Immunfluoreszenz

In dieser Studie können die Trachoma-Isolate Einschlüsse bei murinen Genitalzellkulturen (Vaginalzellkulturen) nur durch Inokulation mit Zentrifugation erzeugt werden. Die Einschlüsse sind klein, mehrere Einschlüsse demonstrieren eine gestörte Vesikelfusion.

LGV₂ erreicht eine deutliche Invasion auch ohne Zentrifugation bei Zellkulturen beider Maustypen.

Einschlüsse der Trachoma-Isolate entstehen aber nur bei einem größeren Infektionstiter. Eine Chlamydien suspension, die bei Inokulation mit Zentrifugation 100% McCoy-Zellen infizieren würde, kann nur bei etwa 1/10000 der Zellen Einschlüsse erzeugen. Die Unterschiede zwischen den Werten der Invasion der einzelnen okulogenitalen Stämme sind insignifikant ($p > 0.05$). LGV₂ zeigt jedoch signifikant höhere Invasionen als alle anderen getesteten Isolate ($p \leq 0.05$).

Kapitel 7

Diskussion

7.1 Ist eine Verwendung von suspendierten Zellen im Rahmen eines Adhärenzmodells möglich?

Die Adhärenzen der einzelnen Chlamydienisolate an adhärenenten McCoy- und HeLa-Zellen sind, wie im Abschnitt Ergebnisse erläutert, deutlich höher als an artifiziell suspendierten McCoy- und HeLa-Zellen. Dies könnte bedeuten, daß durch die Suspendierung (Trypsinbehandlung und ständiges Schütteln zur Verhinderung der Wiederanheftung) primär adhärenenter Zellen Veränderungen geschaffen werden, die eine Abnahme der Adhärenz der Chlamydien zu diesen Zellen hervorruft. Die Zellen werden durch eine Ablösung von der Unterlage und von zellulären Nachbarn der Kontakte beraubt, die sie möglicherweise für eine Aufrechterhaltung und Optimierung aller vitalen Vorgänge brauchen. Denkbar wäre, daß auch die Exposition entsprechender Rezeptoren von solchen Voraussetzungen abhängen könnte. In dieser Studie ist die Rolle der Trypsinbehandlung nur in Verbindung mit allen zusätzlichen Maßnahmen der Suspendierung einschätzbar. Auch andere Autoren konnten einen Abfall der Chlamydienanbindung nach Trypsinbehandlung der Zellen beobachten (Byrne und Moulder, 1978). Dieses Ergebnis war jedoch auf Chlamydien der LGV-Stämme beschränkt und spricht dafür, daß es sich bei den Wirtszellrezeptoren um Proteine oder Glykoproteine handeln könnte. Die Trachom-Stämme zeigen bei Lee (Lee, 1981) und in dieser Studie keine so deutliche Einschränkung der Adhärenz an trypsinierten Zellen. Möglicherweise besitzen Stämme des Biovars Trachom, wie Schachter schon vorschlug, einen spezielleren Anbindungsmechanismus (Schachter, 1988).

Andererseits sind quantitative Unterschiede zu einem beträchtlichen Teil auf den gezwungenermaßen unterschiedlichen Versuchsablauf zurückzuführen. Die Separation der ungebundenen Chlamydien ist bei Verwendung der suspendierten Zellen besser, daher die zufällige Überlagerung durch gestreute Chlamydien na-

hezu auszuschließen (Abb. 7.1). Jedoch könnte das sehr traumatische Spülen vorhandene Bindungen wieder lösen. Bei der Verwendung von adhärenenten Zellen ist diese Trennung auch durch gründliches Spülen nur suboptimal, wie die Ansammlungen von Chlamydienhaufen in den Zellzwischenräumen in Abbildung 7.2 zeigen. Möglicherweise gibt es eine unspezifische Bindung der Chlamydien zur Deckglasoberfläche. Davis und Wyrick jedoch können dies nicht bestätigen. Bei ihnen kam es nicht zu einer nennenswerten Anbindung der Elementarkörper zum Untergrund (Davis und Wyrick, 1997).

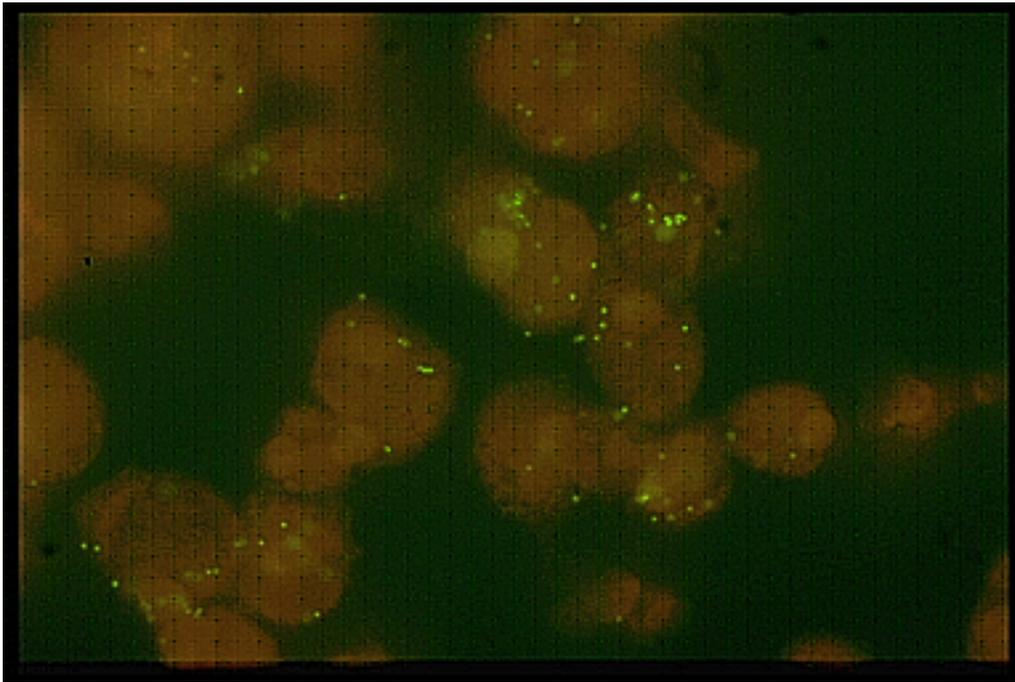


Abbildung 7.1: Adhärenente E_{1733} -Chlamydien an suspendierten HeLa-Zellen bei Inokulation mit Zentrifugation auf Nuclepore-Filter, 2290fache Vergrößerung, Immunfluoreszenz

Andererseits können aber nach dem Ablösen der Zelle von ihrer Unterfläche Bindungsplätze an der Vorder- und Rückseite der Zelle besetzt werden. Deutlich erkennbar ist das bei höheren Vergrößerungen des Mikroskopes. Angebundene Chlamydien sind dann in verschiedenen Fokusebenen zu finden.

Quantitative Unterschiede der Adhärenz der Chlamydien an adhärenenten und suspendierten Zellen können in der Summe sowohl aus Veränderungen der Zelloberfläche als auch aus unterschiedlichen Versuchsabläufen resultieren.

Die Korrelationsanalyse der Adhärenzen der einzelnen Chlamydienisolate zeigt, daß eine gute Korrelation zwischen der Adhärenz ohne Zentrifugation bei adhärenenten und suspendierten Zellinienzellen besteht. Die Anbindung bei der In-

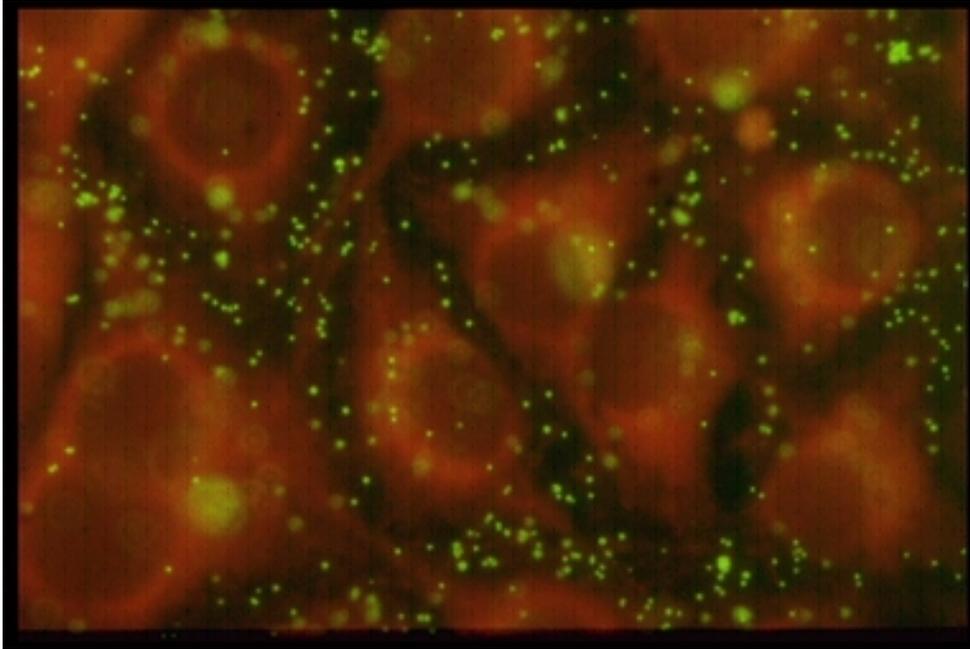


Abbildung 7.2: McCoy-Zellkultur mit Adhärenz von E_{1733} -Chlamydien, 2290fache Vergrößerung, Immunfluoreszenz

okulation der Chlamydien mit Zentrifugation bei kultivierten und suspendierten HeLa-Zellen korreliert deutlicher als bei McCoy-Zellen.

Dieses interessante Ergebnis könnte damit erklärt werden, daß außer spezifischen Rezeptor-Ligand-Verbindungen, ladungsabhängige und hydrophobische Interaktionen bestehen (Schachter, 1988). Es ist möglich, daß letztgenannte Verbindungen besonders leicht durch äußere Einflüsse (wie z.B. der in dieser Studie durchgeführte Spülvorgang) zerstört werden. Wenn diese unspezifischen Interaktionen gehäuft bei McCoy-Zellen und bevorzugt durch Inokulation der Chlamydien mit Zentrifugation zustande kämen, könnte leichter erklärt werden, warum die Anbindung der Chlamydien bei der Inokulation mit Zentrifugation im allgemeinen und im besonderen an kultivierten und suspendierten McCoy-Zellen keine Korrelation zeigt und stark dem statistischen Zufall unterworfen ist.

Zusammenfassung: Insgesamt wird demonstriert, daß neben quantitativen Unterschieden in der Adhärenz bei suspendierten und adhären Zellen auch qualitative Unterschiede (d.h. unterschiedliches Verhalten unterschiedlicher Isolate) existieren, hier ausgeprägter bei den Versuchen der Adhärenz mit Zentrifugation. Somit ist ein Modell mit der Verwendung von artifiziell suspendierten Zellen zur Testung der Adhärenzfähigkeit der Chlamydien für quantitative Aussagen nicht geeignet. Qualitative, zwischen Isolaten vergleichende Aussagen für Adhärenzversuche ohne Zentrifugation sind möglich.

7.2 Ist die Adhärenzfähigkeit ein Maß für die Virulenz der untersuchten Chlamydienisolate?

Im Abschnitt 6.3 war zunächst überraschend, daß trotz der höheren Adhärenzwerte der Chlamydien bei der Inokulation ohne Zentrifugation an Endometriumzellen bzw. der kaum abweichenden Werte an HeLa-Zellen gegenüber McCoy-Zellen, Invasionswerte an beiden erstgenannten Zellarten deutlich niedriger ausfielen. Auch die Werte der Adhärenz und Invasion mit Zentrifugation bestätigten dieses Verhalten.

Kuo hält eine Vorbehandlung der HeLa-Zellen mit DEAE-Dextran für eine wichtige Voraussetzung, um eine signifikante Invasion zu erzielen (Kuo et al., 1972). Dieser Fakt überrascht, da die HeLa-Zellen als transformierte Endozervikalzellen (Hay et al., 1988) den Zielzellen (nichttransformierte Endozervikalzellen und damit schleimbildende Epithelzellen) im Membranaufbau und in der Rezeptorverteilung unter Umständen ähnlicher sein dürften als McCoy-Zellen (= transformierte Mausfibroblasten (Hay et al., 1988)). Eine andere hypothetische Erklärung wäre, daß für spezielle Bindungsorte an Endometriumzellen und HeLa-Zellen bestimmte Wirtsfaktoren eine unabdingbare Voraussetzung sind, damit diese Bindung in vivo zur Internalisierung führt. In vitro könnten aber solche Cofaktoren abwesend sein.

Möglicherweise können viele Passagen auf Laborzellen (McCoy-Zellen) Isolate in ihren spezifischen Eigenschaften verändern, an ihre Laborzellen anpassen. Eine Beziehung der Adhärenzfähigkeit der einzelnen Isolate zur Passagenzahl und Q (Verhältnis EK/IFU, vergleiche Tabelle 5.1, Seite 20) ist für die meisten Isolate jedoch nicht gegeben.

D_{ICCAL8} ist das einzige Isolat, das in dieser Hinsicht auffällig ist. Als typisches Laborisolat hat es viele Passagen (>40) durchlaufen. Die Passagezahl und Q sind deutlich höher als bei E₄₃₄ (siehe Tabelle 5.1). Der Stamm zeigt eine sehr geringe Adhärenz ohne Zentrifugation an allen Zellarten, besonders im Gegensatz zu E₄₃₄. Trotz der hohen Invasion von D_{ICCAL8} mit Zentrifugation bleibt die Invasion ohne Zentrifugation verhältnismäßig gering. Das Isolat E₄₃₄ jedoch zeigte sich als invasiver durch Inokulation ohne Zentrifugation als E₁₇₃₃, F₁₇₃₅ und F₁₇₃₀, die jüngere Passagen ihrer Originalisolate sind.

In Ergänzung dieser Studie könnte man jüngere Passagen des Isolates D_{ICCAL8} (<10) quantitativ auf Invasion ohne Zentrifugation untersuchen. Sollten sich dabei Unterschiede zu den gewonnenen Ergebnissen dieser Studie ergeben, könnte man nach spezifischen Veränderungen von Membrananteilen bei älteren gegenüber jüngeren Passagen anschließen. Solche Untersuchungen könnten bei der Suche nach spezifischen Rezeptoren hilfreich sein.

Moorman et al. beobachteten, daß etwa ein Viertel der Chlamydien, die in McCoy-Zellen eindringen, fähig ist, Zellen der Endometriumkulturen zu infizie-

ren (Werte für Invasion ohne Zentrifugation) (Moorman et al., 1986). In dieser Studie ist dieser Anteil deutlich geringer. Eine mögliche Erklärung könnte sich aus Unterschieden in der Aufarbeitung der Zelllinien und Chlamydienisolate bzw. aus dem variierenden Gehalt an Epithelzellen der primären Endometriumkulturen ergeben.

Laut Moorman besteht eine Resistenz der Endometriumzellen gegenüber den Chlamydien in der Phase der Adhärenz. Bei Provokationsversuchen mit einem E-Isolat (E-UW 5) färbten Moorman et al. zellassozierte Chlamydien sofort nach der Inokulation mit direkter Immunfluoreszenz. Dabei zeigte sich eine Resistenz endometrialer und ektozervikaler Zellen in dieser Phase, für McCoy-Zellen galt dies nicht (Moorman et al., 1986). Man vermutet, daß diese Resistenz mit der Abwesenheit spezifischer Rezeptoren während einer bestimmten Phase des Zellzyklus zu begründen ist. In vitro wurde außerdem deutlich, daß viele in die Zellen eingedrungene Chlamydien in einer bestimmten Phase der Einschlußkörperbildung stehenblieben, wobei dieses Phänomen bei den Endometriumzellen weitaus häufiger war als bei den McCoy-Zellen (Moorman et al., 1986).

Auch in dieser Studie werden einige wenige Zellen nicht durch eine einzige Chlamydie besetzt. Zelluläre Nachbarn aber zeigen durch ihre dichte Besiedlung mit Chlamydien, daß die lokale Verteilung der Chlamydien gewährleistet ist (siehe Abbildung 7.3).

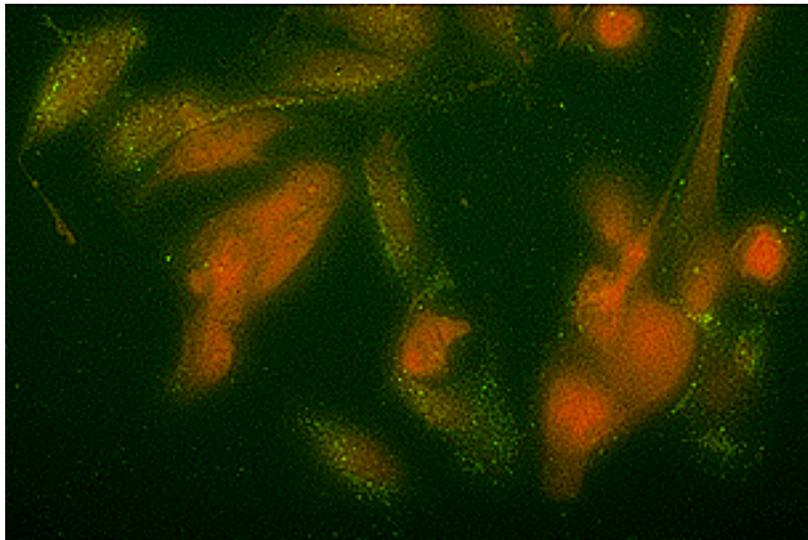


Abbildung 7.3: Adhärenz E₄₃₄-Chlamydien an humanen Endometrien, Immunfluoreszenz, 390fache Vergrößerung

Aber in der Summe steht diese Studie nicht im Einklang mit den Ergebnissen von Moorman et al. Teilweise liegt die Ursache dafür sicher in den unterschiedlichen Inkubationszeiten. Während Moorman et al. ihre Untersuchungen sofort nach der Zugabe der Erreger durchführten, wurde in dieser Studie eine

Zeitperiode von ca. 3.5h gewährt, um die gleichmäßige Verteilung der Chlamydien zu gewährleisten. Vereinzelt zeigt sich zwar eine gewisse Resistenz einiger weniger Endometriumzellen gegenüber der initialen Anbindung der Chlamydien, jedoch demonstrierte der quantitative Vergleich der Adhärenz ohne Zentrifugation bei Endometriumzellen und HeLa-Zellen signifikant höhere Ergebnisse als bei McCoy-Zellen. Die Invasionsergebnisse dazu waren konträr, was vermuten läßt, daß die Aufnahmemechanismen bei Endometriumzellen und HeLa-Zellen eher eine Sättigung erfahren oder wie schon erwähnt, gewisse Co-Faktoren voraussetzen, die in vitro abwesend sind.

Die qualitativen Untersuchungen der Ergebnisse der Adhärenz und Invasion der Chlamydien bei allen getesteten Zellen mit Hilfe der Spearmanschen Rangkorrelationsanalyse zeigen, daß vergleichende Betrachtungen der Isolate bezüglich verschiedener Zellarten unter Umständen durchaus sinnvoll sind. Gerade bei der Analyse der Versuche der Adhärenz und Invasion der einzelnen Isolate ohne Zentrifugation für HeLa-, McCoy- und Endometriumzellen ergeben sich gute Korrelationen. Das heißt, wenn ein Isolat im Verhältnis zu anderen Isolaten bei einer bestimmten Zellart eine größere Adhärenz ohne Zentrifugation zeigt, dann ist auch eine höhere Invasion ohne Zentrifugation für dieses Isolat bei der gleichen Zellart zu erwarten.

Zusammenfassung: Quantitative Betrachtungen führten zu dem Schluß, daß sich die hohen Adhärenzen der Chlamydien aller Isolate bei HeLa- und Endometriumzellen im Vergleich zu McCoy-Zellen nicht in entsprechende Invasionen umsetzen können. Vergleicht man aber die einzelnen Isolate für jeweils eine Zellart, dann kann man eine enge Korrelation zwischen der Adhärenz und der Invasion ohne Zentrifugation herstellen. Die Adhärenz und Invasion der Chlamydien mit Zentrifugation zeigt einen mehr zufälligen Verlauf, was die deutlich niedrigeren Rangkorrelationskoeffizienten unterstreichen.

7.3 Zeigt das Isolat E₄₃₄ eine größere Virulenz als die anderen Vergleichsisolate?

Während das E₄₃₄-Isolat eine deutlich höhere Adhärenz und Invasion ohne Zentrifugation gegenüber den meisten okulogenitalen Isolaten demonstrieren kann, wird die relativ hohe Adhärenz mit Zentrifugation nicht in eine entsprechende Invasion umgesetzt. Das läßt vermuten, daß E₄₃₄-Chlamydien auch an Orten adhären können, die im folgenden keine Aufnahme der Bakterien induzieren. Bei den Chlamydien des Stammes LGV₂ scheint dieses Phänomen weniger eine Rolle zu spielen.

Daß es sich bei den okulogenitalen Stämmen und den LGV-Stämmen vermutlich um jeweils verschiedene Anheftungs- und Eintrittsmechanismen handelt,

wurde schon durch die selektive Verringerung der Adhärenz der LGV-Chlamydien an mit Trypsin behandelten Zellen angedeutet. Darüberhinaus weisen Field und Barnes daraufhin, daß sich das Biovar LGV im Gegensatz zu den okulogenitalen Stämmen auch ohne Zentrifugation als sehr virulent erweist (Fields und Barnes, 1992). Schramm und Wyrick zeigen, daß verschiedene Eintrittswege, die ganz unterschiedliche Anforderungen an die Wirtszelle stellen, existieren (Schramm und Wyrick, 1995). Das Serovar E benötigt intakte Mikrofilamente für den Zelleintritt. LGV₂ ist in seiner Vesikelfusion durch die Zerstörung sowohl des Mikrofilament- als auch des Mikrotubulsystems beeinflussbar, ein primärer Eintritt ist aber unabhängig vom MF- bzw. MT-System.

Im Vergleich mit den anderen okulogenitalen Isolaten wird deutlich, daß das E₄₃₄-Isolat deutlich stärker in der Adhärenz und Invasion bei beiden Inokulationsarten reagiert als die F-Isolate. Leider sind Versuche, die sich mit dem Vergleich des Verhaltens verschiedener okulogenitaler Stämme befassen, in der Literatur nicht aufzufinden. In einer epidemiologischen Studie jedoch wurde gezeigt, daß das F-Serovar in Deutschland im Vergleich zum Serovar E seltener isoliert wird (siehe Abbildung 3.2) (Näher und Petzoldt, 1991). Woworski et al. demonstrierten bei mit dem F-Serovar genital infizierten Frauen abgeschwächte klinische Symptome und eine geringere zervikale Erregerausscheidung, beurteilt an der Anzahl von Einschlüssen in der Zellkultur (Woworski et al., 1994). Das zweite E-Isolat (E₁₇₃₃) kann nur bedingt die gleiche Tendenz aufzeigen. Gerade bei der Adhärenz bei McCoy- und HeLa-Zellen ohne Zentrifugation können keine signifikant größeren Werte im Verhältnis zu einem der beiden F-Isolate (F₁₇₃₀) demonstriert werden. Im Vergleich der Passagezahlen sind für die F- und E-Isolate auch keine besonderen Auffälligkeiten zu entdecken.

Als ein weiteres erstaunliches Ergebnis war aufgefallen, daß das Isolat E₄₃₄ sehr große Unterschiede bei der Adhärenz mit Zentrifugation bezüglich der verschiedenen Zellarten erzielt. Besonders hohe Werte wurden bei der Adhärenz an HeLa-Zellen erreicht. Möglicherweise könnte dieser Fakt Ausdruck einer unterschiedlichen Affinität an Endozervikalzellen und Endometriumzellen sein. Ähnliche regionale Unterschiede werden z.B. für Neisserien beschrieben (Draper et al., 1980).

Zusammenfassung: Das Isolat E₄₃₄ zeigt sowohl bei den Zelllinien als auch bei den humanen Endometriumkulturen größere Adhärenzen ohne Zentrifugation als alle anderen getesteten okulogenitalen Isolate. Bei McCoy- und Endometriumzellen kann E₄₃₄ auch eine größere Invasion ohne Zentrifugation als alle anderen okulogenitalen Isolate aufweisen. Trotz der deutlich höheren Adhärenz mit Zentrifugation erweist sich das Isolat E₄₃₄ bei der Invasion mit Zentrifugation nicht als invasionsstärkstes okulogenitales Isolat, sondern wird sowohl bei HeLa-Zellen als auch bei Endometriumzellen durch das Isolat D_{ICCAL8} übertroffen.

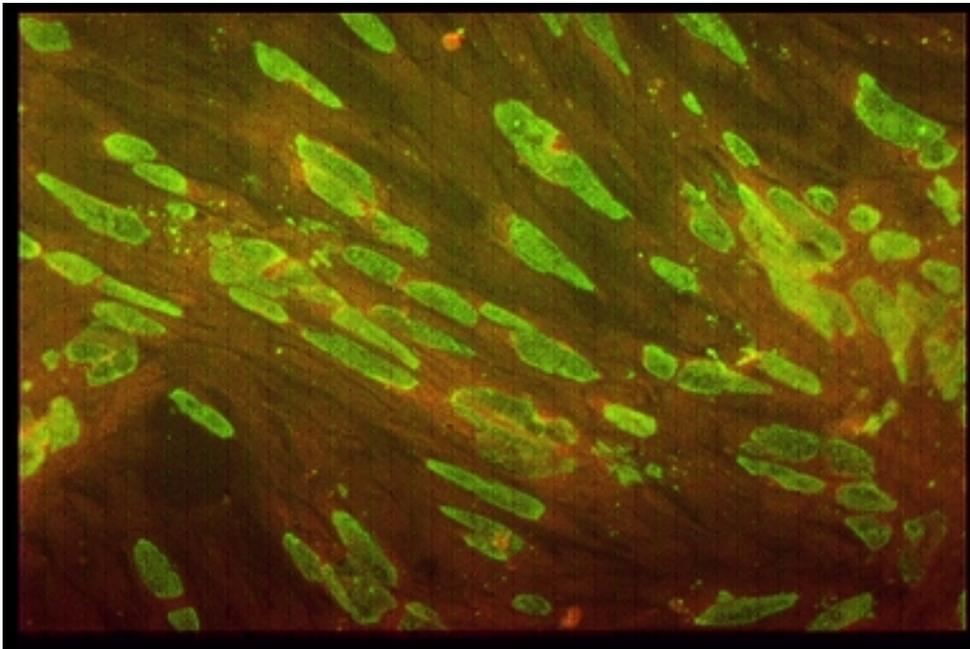


Abbildung 7.4: *DICCAL8*-Einschlüsse in humanen Fibroblasten nach Inokulation mit Zentrifugation, 390fache Vergrößerung, Immunfluoreszenz

Kapitel 8

Zusammenfassung

E₄₃₄ und weitere Vergleichisolate (D_{ICCAL8}, E₁₇₃₃, F₁₇₃₅, F₁₇₃₀ und LGV₂) wurden an unterschiedlichem Zellmaterial (adhärenten und suspendierten McCoy- und HeLa-Zellen, humanen primären Endometriumkulturen, Zellen des unteren Genitaltraktes der Maus) auf ihr quantitatives Adhärenz- und Invasionsverhalten mit unterschiedlichen Infektionsmodellen untersucht. Dabei interessierten folgende Fragen: 1. Zeigt das Isolat E₄₃₄ besonders große Adhärenzen und Invasionen bei den Experimenten mit Zelllinien, Abstrichzellen aus dem Genitaltrakt der Maus, humanen Endometriumkulturen und murinen Genitalzellkulturen? 2. Ist eine Verwendung von artifiziell suspendierten Zellen für Adhärenzmodelluntersuchungen möglich? 3. Gibt es einen direkten quantitativen Zusammenhang zwischen Adhärenz und Invasion der Chlamydien—das heißt, ist die Adhärenz ein Maß der Virulenz kolonisierender Stämme?

1. Das Isolat E₄₃₄ zeigt sowohl bei den Zelllinien als auch bei den humanen Endometriumkulturen eine größere Adhärenz ohne Zentrifugation als alle anderen getesteten okulogenitalen Isolate. Bei McCoy- und Endometriumzellen kann das Isolat E₄₃₄ auch eine größere Invasion ohne Zentrifugation als alle anderen okulogenitalen Stämme aufweisen. Trotz der deutlich höheren Adhärenz mit Zentrifugation beweist sich das Isolat E₄₃₄ bei der Invasion mit Zentrifugation nicht als invasionsstärkstes okulogenitales Isolat, sondern wird sowohl bei HeLa-Zellen als auch bei Endometriumzellen durch das Isolat D_{ICCAL8} übertroffen. Bei den Versuchen an murinen Genitalzellen ergaben sich hinsichtlich des Isolates E₄₃₄ keine auffälligen Ergebnisse, die die erhöhte Infektionsrate der in-vivo-Versuche erklären könnten.

2. Ein Modell mit der Verwendung von artifiziell suspendierten Zellen zur Testung der Adhärenzfähigkeit der Chlamydien ist nur für zwischen Stämmen oder Isolaten vergleichende Aussagen und dabei beschränkt auf Versuche zur Ermittlung der Adhärenz ohne Zentrifugation verwendbar. Quantitativ kommt es dabei zu einer gleichmäßigen Reduktion der Adhärenzwerte der einzelnen Isolate im Vergleich zu Versuchen an Zellen in Kultur. Bei Versuchen der Adhärenz mit Zentrifugation zeigt sich eine ungleichmäßige Reduktion der Adhärenz der

Chlamydien gegenüber adhärennten Zellen. Daher sind für diese Inokulationsart vergleichende Aussagen zwischen verschiedenen Chlamydienstämmen nicht aussagekräftig.

3. Es besteht kein direkter quantitativer Zusammenhang zwischen der Adhärenz und Invasion der Chlamydien bei den getesteten Zellen. Besonders bei den HeLa- und den Endometriumzellen kommt es im Vergleich zu McCoy-Zellen zu vielen Bindungen, die schließlich nicht zu einer Invasion der Chlamydien in jene Zellen führen. Wenn man aber die Untersuchungen auf eine Zellart beschränkt und zu vergleichenden Aussagen zwischen verschiedenen Stämmen oder Isolaten nutzen will, ist das für die Adhärenz und Invasion der Chlamydien ohne Zentrifugation möglich. Ein Isolat, das im Vergleich zu anderen Isolaten eine höhere Adhärenz ohne Zentrifugation zeigt, wird mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine größere Invasion ohne Zentrifugation bei der gleichen Zellart als andere Isolate demonstrieren. Für die Adhärenz und Invasion mit Zentrifugation ist dieser Schluß nicht möglich.

Anhang A

Tabellen

A.1 Adhärenz an Zelllinien

A.1.1 McCoy-Zellen

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	300 000	$1.5 * 10^7$	50	3.09	6%	3.5h Inkubation	
2	765 000	$3 * 10^7$	39	1.88	4.82%	3.5h Inkubation	
3	645 000	$3 * 10^7$	46	2.1	4.57%	3.5h Inkubation	
4	693 000	$3 * 10^7$	43	2.1	4.83%	3.5h Inkubation	5.05%
5	725 000	$3.5 * 10^7$	48	22.48	46.83%	Zentrifugation	
6	708 000	$3.5 * 10^7$	21	8.5	40.47%	Zentrifugation	
7	725 000	$3.5 * 10^7$	48	20.40	42.50%	Zentrifugation	43.27%

Tabelle A.1: LGV₂-Adhärenz an McCoy-Zellschicht

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	200 000	$1.5 * 10^7$	75	0.5	0.67%	3.5h Inkubation	
2	600 000	$4.5 * 10^8$	750	3.97	0.53%	3.5h Inkubation	
3	200 000	$6 * 10^8$	3000	12.7	0.42%	3.5h Inkubation	
4	200 000	$6 * 10^8$	3000	13.925	0.46%	3.5h Inkubation	0.52%
5	200 000	$1.5 * 10^7$	75	1.64	2.19%	Zentrifugation	
6	200 000	$1.5 * 10^7$	75	1.84	2.45%	Zentrifugation	
7	375 000	$3.5 * 10^7$	93	3.75	4.03%	Zentrifugation	
8	375 000	$3.5 * 10^7$	93	3.28	3.5%	Zentrifugation	3.04%

Tabelle A.2: LGV₂-Adhärenz an McCoy-Zellen in Suspension

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	300 000	$4.5 * 10^7$	150	0.70	0.47%	3.5h Inkubation	
2	300 000	$4.5 * 10^7$	150	0.76	0.51%	3.5h Inkubation	
3	300 000	$4.5 * 10^7$	150	0.48	0.32%	3.5h Inkubation	0.43%
4	300 000	$1.5 * 10^7$	50	16.68	33.4%	Zentrifugation	
5	300 000	$1.5 * 10^7$	50	15.38	30.8%	Zentrifugation	
6	300 000	$1.5 * 10^7$	50	16.7	33.4%	Zentrifugation	32.53%

Tabelle A.3: D_{ICCAL8}-Adhärenz an McCoy-Zellschicht

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	240 000	$4.5 * 10^8$	1875	2.75	0.15%	3.5h Inkubation	
2	240 000	$4.5 * 10^8$	1875	2.30	0.12%	3.5h Inkubation	
3	240 000	$9 * 10^8$	3750	6.525	0.17%	3.5h Inkubation	0.15%
4	200 000	$1.5 * 10^7$	75	0.95	1.27%	Zentrifugation	
5	250 000	$1.2 * 10^8$	480	4.975	1.04%	Zentrifugation	
6	250 000	$1.2 * 10^8$	480	3.775	0.78%	Zentrifugation	
7	250 000	$1.2 * 10^8$	480	5.925	1.23%	Zentrifugation	1.08%

Tabelle A.4: D_{ICCAL8} -Adhärenz an McCoy-Zellen in Suspension

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	652 000	$1 * 10^8$	153	2.29	1.50%	3.5h Inkubation	
2	652 000	$1 * 10^8$	153	4.10	2.68%	3.5h Inkubation	
3	650 000	$2.8 * 10^8$	430	16.075	3.74%	3.5h Inkubation	2.64%
4	378 000	$2 * 10^7$	53	19.01	35.86%	Zentrifugation	
5	450 000	$5 * 10^7$	110	40	36.4%	Zentrifugation	
6	450 000	$5 * 10^7$	110	33.78	30.7%	Zentrifugation	34.32%

Tabelle A.5: E_{434} -Adhärenz an McCoy-Zellschicht

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	640 000	$1.6 * 10^8$	250	1.90	0.76%	Inkubation	
2	640 000	$1.6 * 10^8$	250	2.15	0.86%	Inkubation	
3	640 000	$1.6 * 10^8$	250	2.20	0.88%	Inkubation	0.83%
4	700 000	$4 * 10^7$	57	9.55	16.75%	Zentrifugation	
5	700 000	$4 * 10^7$	57	12.10	21.23%	Zentrifugation	
6	700 000	$4 * 10^7$	57	10.1	17.6%	Zentrifugation	18.52%

Tabelle A.6: E_{434} -Adhärenz an McCoy-Zellen in Suspension

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	725 000	$1.3 * 10^8$	179	1.4	0.78%	3.5h Inkubation	
2	709 000	$1.04 * 10^8$	147	1.07	0.73%	3.5h Inkubation	
3	644 000	$1.04 * 10^8$	161	1.1	0.68%	3.5h Inkubation	0.73%
4	644 000	$3.9 * 10^7$	61	26.1	42.78%	Zentrifugation	
5	669 000	$2.6 * 10^7$	39	16.62	42.62%	Zentrifugation	
6	644 000	$3.9 * 10^7$	61	23.55	38.61%	Zentrifugation	
7	644 000	$3.9 * 10^7$	61	23.40	38.36%	Zentrifugation	40.59%

Tabelle A.7: E_{1733} -Adhärenz an McCoy-Zellschicht

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	700 000	$1.95 * 10^8$	279	0.7	0.25%	3.5h Inkubation	
2	640 000	$1.95 * 10^8$	315	0.6	0.2%	3.5h Inkubation	
3	640 000	$1.95 * 10^8$	315	0.63	0.21%	3.5h Inkubation	
4	700 000	$1.95 * 10^8$	279	1.12	0.40%	3.5h Inkubation	0.27%
5	700 000	$5.2 * 10^7$	74	14.88	20.1%	Zentrifugation	
6	700 000	$5.2 * 10^7$	74	15.8	21.35%	Zentrifugation	
7	700 000	$5.2 * 10^7$	74	14.45	19.52%	Zentrifugation	20.32%

Tabelle A.8: E_{1733} -Adhärenz an McCoy-Zellen in Suspension

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	660 000	$5 * 10^8$	758	1.91	0.25%	3.5h Inkubation	
2	660 000	$5 * 10^8$	758	1.70	0.23%	3.5h Inkubation	
3	805 000	$5 * 10^8$	621	1.45	0.23%	3.5h Inkubation	0.24%
4	652 000	$1 * 10^8$	153	26.6	17.38%	Zentrifugation	
5	652 000	$1 * 10^8$	153	24.88	16.26%	Zentrifugation	
6	652 000	$1 * 10^8$	153	23.6	15.42%	Zentrifugation	16.35%

Tabelle A.9: F₁₇₃₅-Adhärenz an McCoy-Zellschicht

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	640 000	$8 * 10^8$	1250	1.88	0.15%	3.5h Inkubation	
2	640 000	$8 * 10^8$	1250	2.05	0.16%	3.5h Inkubation	
3	640 000	$8 * 10^8$	1250	1.90	0.15%	3.5h Inkubation	0.15%
4	700 000	$2 * 10^8$	286	17.75	6.21%	Zentrifugation	
5	700 000	$2 * 10^8$	286	14.65	5.12%	Zentrifugation	
6	700 000	$2 * 10^8$	286	19.72	6.9%	Zentrifugation	6.08%

Tabelle A.10: F₁₇₃₅-Adhärenz an McCoy-Zellen in Suspension

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	676 000	$1.6 * 10^8$	237	1.77	0.74%	3.5h Inkubation	
2	749 000	$1.6 * 10^8$	214	2.82	1.32%	3.5h Inkubation	
3	725 000	$1.6 * 10^8$	221	2.42	1.1%	3.5h Inkubation	
4	724 000	$1.6 * 10^8$	221	1.51	0.68%	3.5h Inkubation	0.96%
5	701 000	$5 * 10^7$	71	18.7	26.34%	Zentrifugation	
6	701 000	$5 * 10^7$	71	18.2	25.63%	Zentrifugation	
7	870 000	$5 * 10^7$	57	16.3	28.6%	Zentrifugation	26.86%

Tabelle A.11: F₁₇₃₀-Adhärenz an McCoy-Zellschicht

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	640 000	$1.6 * 10^8$	250	0.68	0.27%	3.5h Inkubation	
2	640 000	$1.6 * 10^8$	250	0.76	0.30%	3.5h Inkubation	
3	640 000	$1.6 * 10^8$	250	0.71	0.28%	3.5h Inkubation	0.28%
4	700 000	$4 * 10^7$	57	5.12	8.97%	Zentrifugation	
5	700 000	$4 * 10^7$	57	6.35	11.14%	Zentrifugation	
6	700 000	$4 * 10^7$	57	7.8	13.68%	Zentrifugation	11.26%

Tabelle A.12: F₁₇₃₀-Adhärenz an McCoy-Zellen in Suspension

A.1.2 HeLa-Zellen

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	677 000	$3 * 10^7$	44	2.63	5.97%	3.5h Inkubation	
2	160 000	$3.75 * 10^7$	234	9.6	6.2%	3.5h Inkubation	
3	400 000	$1.5 * 10^7$	38	2.25	5.9%	3.5h Inkubation	
4	773 000	$3 * 10^7$	39	2.29	5.87%	3.5h Inkubation	5.98%
5	300 000	$1.5 * 10^7$	50	22.2	44.4%	Zentrifugation	
6	300 000	$1.5 * 10^7$	50	21.2	42.4%	Zentrifugation	
7	729 000	$1.5 * 10^7$	21	9.01	42.9%	Zentrifugation	44.87%

Tabelle A.13: LGV₂-Adhärenz an HeLa-Zellschicht

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	250 000	$7.5 * 10^7$	300	15.8	5.27%	3.5h Inkubation	
2	250 000	$7.5 * 10^7$	300	13.55	4.52%	3.5h Inkubation	
3	250 000	$7.5 * 10^7$	300	17.6	5.86%	3.5h Inkubation	5.22%
4	150 000	$3.75 * 10^7$	250	24.1	9.64%	Zentrifugation	
5	150 000	$3.75 * 10^7$	250	23.75	9.5%	Zentrifugation	
6	150 000	$3.75 * 10^7$	250	23.2	9.2%	Zentrifugation	9.45%

Tabelle A.14: LGV₂-Adhärenz an HeLa-Zellen in Suspension

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	100 000	$1.5 * 10^8$	1500	5.4	0.36%	3.5h Inkubation	
2	100 000	$1.5 * 10^8$	1500	5.3	0.35%	3.5h Inkubation	
3	400 000	$4.5 * 10^7$	112.5	0.58	0.51%	3.5h Inkubation	
4	400 000	$1.5 * 10^7$	112.5	0.82	0.72%	3.5h Inkubation	0.48%
5	160 000	$1.5 * 10^7$	94	19.2	20.42%	Zentrifugation	
6	160 000	$1.5 * 10^7$	94	25.1	26.7%	Zentrifugation	
7	400 000	$1.5 * 10^7$	37.5	8.95	23.87%	Zentrifugation	23.66%

Tabelle A.15: D_{ICCAL8}-Adhärenz an HeLa-Zellschicht

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	250 000	$1.5 * 10^8$	600	2.0	0.33%	3.5h Inkubation	
2	250 000	$1.5 * 10^8$	600	2.2	0.37%	3.5h Inkubation	
3	250 000	$6 * 10^8$	2400	7.45	0.31%	3.5h Inkubation	
4	250 000	$6 * 10^8$	2400	8.25	0.34%	3.5h Inkubation	0.34%
5	150 000	$7.5 * 10^7$	500	14.6	2.9	Zentrifugation	
6	420 000	$2 * 10^7$	48	1.63	3.4%	Zentrifugation	
7	150 000	$7.5 * 10^7$	500	16.9	3.4%	Zentrifugation	3.23%

Tabelle A.16: D_{ICCAL8}-Adhärenz an HeLa-Zellen in Suspension

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	515 000	$2.8 * 10^8$	544	23.9	4.4%	3.5h Inkubation	
2	485 000	$1 * 10^8$	206	4.78	2.3%	3.5h Inkubation	
3	485 000	$2 * 10^8$	412	14.4	3.5%	3.5h Inkubation	3.4%
4	644 000	$2 * 10^7$	31	22.48	72.5%	Zentrifugation	
5	620 000	$2 * 10^7$	32	22.66	70.82%	Zentrifugation	
6	584 000	$2 * 10^7$	34	22.45	66.03%	Zentrifugation	
7	280 000	$4 * 10^7$	143	100	69.93%	Zentrifugation	69.82%

Tabelle A.17: E₄₃₄-Adhärenz an HeLa-Zellschicht

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	840 000	$1.6 * 10^8$	190	1.6	0.84%	3.5h Inkubation	
2	600 000	$1.6 * 10^8$	267	2.65	0.99%	3.5h Inkubation	
3	600 000	$1.6 * 10^8$	267	3.1	1.16%	3.5h Inkubation	1%
4	600 000	$4 * 10^7$	67	14.02	20.92%	Zentrifugation	
5	600 000	$4 * 10^7$	67	15.8	23.58%	Zentrifugation	
6	600 000	$8 * 10^7$	133	27.5	20.68%	Zentrifugation	21.73%

Tabelle A.18: E₄₃₄-Adhärenz an HeLa-Zellen in Suspension

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	724 000	$1.3 * 10^8$	180	3.25	1.8%	3.5h Inkubation	
2	765 000	$1.3 * 10^8$	170	1.47	0.86%	3.5h Inkubation	
3	709 000	$1.3 * 10^8$	183	1.07	0.58%	3.5h Inkubation	
4	532 000	$1.3 * 10^8$	244	1.10	0.45%	3.5h Inkubation	0.81%
3	644 000	$2.6 * 10^7$	40	15.25	38.12%	Zentrifugation	
4	543 000	$2.6 * 10^7$	48	20.28	42.25%	Zentrifugation	
5	628 000	$2.6 * 10^7$	41	16.7	39.68%	Zentrifugation	40.02%

Tabelle A.19: E₁₇₃₃-Adhärenz an HeLa-Zellschicht

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	450 000	$1.3 * 10^8$	289	3.60	1.25%	3.5h Inkubation	
2	420 000	$1.3 * 10^8$	309	0.809	0.26%	3.5h Inkubation	
3	450 000	$1.3 * 10^8$	289	2.47	0.85%	3.5h Inkubation	0.79%
4	450 000	$5.2 * 10^7$	116	12.22	10.53%	Zentrifugation	
5	450 000	$5.2 * 10^7$	116	10.68	9.21%	Zentrifugation	
6	420 000	$2.6 * 10^7$	62	8.33	13.43%	Zentrifugation	11.05%

Tabelle A.20: E₁₇₃₃-Adhärenz an HeLa-Zellen in Suspension

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	368 000	$3 * 10^8$	815	2.17	0.27%	3.5h Inkubation	
2	420 000	$3 * 10^8$	714	2.03	0.28%	3.5h Inkubation	
3	354 000	$3 * 10^8$	847	2.42	0.29%	3.5h Inkubation	0.28%
4	685 000	$1 * 10^8$	146	16.68	11.42%	Zentrifugation	
5	749 000	$1 * 10^8$	133	15.00	11.28%	Zentrifugation	
6	701 000	$1 * 10^8$	143	13.28	9.28%	Zentrifugation	10.66%

Tabelle A.21: F₁₇₃₅-Adhärenz an HeLa-Zellschicht

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	840 000	$8 * 10^8$	952	1.16	0.12%	3.5h Inkubation	
2	600 000	$8 * 10^8$	1333	3.05	0.23%	3.5h Inkubation	
3	600 000	$8 * 10^8$	1333	2.4	0.18%	3.5h Inkubation	0.18%
4	600 000	$2 * 10^8$	333	13.42	4.03%	Zentrifugation	
5	600 000	$2 * 10^8$	333	10.15	3.05%	Zentrifugation	
6	600 000	$2 * 10^8$	333	5.88	1.77%	Zentrifugation	2.95%

Tabelle A.22: F₁₇₃₅-Adhärenz an HeLa-Zellen in Suspension

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	749 000	$1.6 * 10^8$	214	2.82	1.32%	3.5h Inkubation	
2	870 000	$1.6 * 10^8$	184	1.51	0.82%	3.5h Inkubation	
3	725 000	$1.6 * 10^8$	221	2.42	1.1%	3.5h Inkubation	1.08%
4	708 000	$4 * 10^7$	56	18.95	33.84%	Zentrifugation	
5	693 000	$4 * 10^7$	58	19.62	33.83%	Zentrifugation	
6	773 000	$4 * 10^7$	52	18.40	35.38%	Zentrifugation	34.35%

Tabelle A.23: F₁₇₃₀-Adhärenz an HeLa-Zellschicht

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	840 000	$1.6 * 10^8$	190	0.51	0.27%	3.5h Inkubation	
2	840 000	$1.6 * 10^8$	190	0.36	0.19%	3.5h Inkubation	
3	600 000	$1.6 * 10^8$	267	1.46	0.55%	3.5h Inkubation	0.34%

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_e	$a = \frac{d_e}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
4	600 000	$4 * 10^7$	67	6.88	10.26%	Zentrifugation	
5	600 000	$4 * 10^7$	67	6.45	9.63%	Zentrifugation	
6	600 000	$4 * 10^7$	67	5.88	8.78%	Zentrifugation	9.56%

Tabelle A.24: F₁₇₃₀-Adhärenz an HeLa-Zellen in Suspension

A.2 Invasion in Laborzelllinien

A.2.1 McCoy-Zellen

Stamm	c_1	c_2	c_3	c_4	c_{mz}
LGV ₂ (1)	$1.08 * 10^7$	$9.48 * 10^6$	$9.59 * 10^6$	—	$1 * 10^7$
LGV ₂ (2)	$4.0 * 10^8$	$4.8 * 10^8$	—	—	$4.2 * 10^8$
D	$1.71 * 10^7$	$6.25 * 10^6$	$1.03 * 10^7$	—	$1.12 * 10^7$
E ₄₃₄	$2 * 10^7$	$3.65 * 10^7$	$1.5 * 10^7$	—	$2.4 * 10^7$
E ₁₇₃₃	$7.15 * 10^7$	$5.07 * 10^7$	$5.6 * 10^7$	—	$5.94 * 10^7$
F ₁₇₃₅	$9.8 * 10^7$	$2.34 * 10^7$	$7.64 * 10^7$	$1.66 * 10^8$	$9.1 * 10^7$
F ₁₇₃₀	$1.89 * 10^7$	$1.76 * 10^7$	$1 * 10^7$	$1.18 * 10^7$	$1.5 * 10^7$

Tabelle A.25: IFU-Titerbestimmung mit Zentrifugation bei McCoy-Zellen

Nr.	C_{McCoy}	c_{oz}	$y = \frac{c_{oz}}{C_{McCoy}}$	Mittelwert
1	$1 * 10^7$	$1.3 * 10^6$	13%	
2	$1 * 10^7$	$1.05 * 10^6$	10.5%	
3	$1 * 10^7$	$1.66 * 10^6$	16.6%	
4	$1 * 10^7$	$2.3 * 10^6$	23%	
5	$4.2 * 10^8$	$6.73 * 10^7$	16.02%	
6	$4.2 * 10^8$	$7.24 * 10^7$	17.23%	16.06%

Tabelle A.26: LGV₂-Invasion in adhärennten McCoy-Zellen

Nr.	C_{McCoy}	c_{oz}	$y = \frac{c_{oz}}{C_{McCoy}}$	Mittelwert
1	$1.12 * 10^7$	$2.5 * 10^4$	0.22%	
2	$1.12 * 10^7$	$1.28 * 10^4$	0.11%	
3	$1.12 * 10^7$	$2.62 * 10^4$	0.23%	
4	$1.12 * 10^7$	$1.42 * 10^4$	0.13%	
5	$1.12 * 10^7$	$4 * 10^4$	0.36%	
6	$1.12 * 10^7$	$5.11 * 10^4$	0.46%	0.25%

Tabelle A.27: D_{1CCAL8}-Invasion in adhärennten McCoy-Zellen

Nr.	C_{McCoy}	c_{oz}	$y = \frac{c_{oz}}{C_{McCoy}}$	Mittelwert
1	$2.4 * 10^7$	$2 * 10^5$	0.83%	
2	$2.4 * 10^7$	$6.75 * 10^4$	0.28%	
3	$2.4 * 10^7$	$5.75 * 10^4$	0.24%	
4	$2.4 * 10^7$	$1.13 * 10^5$	0.47%	
5	$2.4 * 10^7$	$2.94 * 10^5$	1.23%	
6	$2.4 * 10^7$	$3.4 * 10^5$	1.42%	0.74%

Tabelle A.28: E₄₃₄-Invasion in adhärennten McCoy-Zellen

Nr.	C_{McCoy}	c_{oz}	$y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}}$	Mittelwert
1	$5.94 * 10^7$	$5.75 * 10^4$	0.1%	
2	$5.94 * 10^7$	$1.28 * 10^5$	0.22%	
3	$5.94 * 10^7$	$1.57 * 10^5$	0.26%	0.19%

Tabelle A.29: E₁₇₃₃-Invasion in adhärennten McCoy-Zellen

Nr.	C_{McCoy}	c_{oz}	$y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}}$	Mittelwert
1	$9.1 * 10^7$	$9.1 * 10^4$	0.1%	
2	$9.1 * 10^7$	$3.97 * 10^4$	0.04%	
3	$9.1 * 10^7$	$1.25 * 10^4$	0.01%	
4	$9.1 * 10^8$	$2.21 * 10^5$	0.24%	0.1%

Tabelle A.30: F₁₇₃₅-Invasion in adhärennten McCoy-Zellen

Nr.	C_{McCoy}	c_{oz}	$y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}}$	Mittelwert
1	$1.5 * 10^7$	$2.5 * 10^3$	0.02%	
2	$1.5 * 10^7$	$6.25 * 10^3$	0.04%	
3	$1.5 * 10^7$	$9.28 * 10^3$	0.06%	
4	$1.5 * 10^7$	$8.75 * 10^3$	0.06%	0.04%

Tabelle A.31: F₁₇₃₀-Invasion in adhärennten McCoy-Zellen

A.2.2 HeLa-Zellen

Stamm	c_1	c_2	c_3	c_4	c_{mz}	$Pt = \frac{c_{mz}}{c_{McCoy}} * 100\%$
LGV ₂	$7.1 * 10^6$	$5.58 * 10^6$	$8.12 * 10^6$	—	$6.93 * 10^6$	69.3%
D	$1.06 * 10^7$	$6.09 * 10^6$	$8.6 * 10^6$	—	$8.43 * 10^6$	75.26%
E ₄₃₄	$4.77 * 10^6$	$5.73 * 10^6$	$8.63 * 10^6$	—	$6.37 * 10^6$	26.54%
E ₁₇₃₃	$3.8 * 10^6$	$7.2 * 10^6$	$1.64 * 10^7$	—	$9.13 * 10^6$	15.37%
F ₁₇₃₅	$7.27 * 10^7$	$1.88 * 10^7$	$3.8 * 10^7$	—	$4.32 * 10^7$	47.47%
F ₁₇₃₀	$6.8 * 10^5$	$6.03 * 10^5$	$3.85 * 10^6$	$2.18 * 10^6$	$1.83 * 10^6$	12.2%

Tabelle A.32: IFU-Titerbestimmung mit Zentrifugation bei HeLa-Zellen

Nr.	C_{McCoy}	c_{oz}	$y = \frac{c_{oz}}{C_{McCoy}}$	Mittelwert
1	$1 * 10^7$	$2.03 * 10^5$	2.03%	
2	$1 * 10^7$	$2.18 * 10^5$	2.18%	
3	$1 * 10^7$	$5.89 * 10^5$	5.89%	
4	$1 * 10^7$	$4.13 * 10^5$	4.19%	3.57%

Tabelle A.33: LGV₂-Invasion in adhärennten HeLa-Zellen

Nr.	C_{McCoy}	c_{oz}	$y = \frac{c_{oz}}{C_{McCoy}}$	Mittelwert
1	$1.12 * 10^7$	$6.25 * 10^3$	0.056%	
2	$1.12 * 10^7$	$5 * 10^3$	0.045%	
3	$1.12 * 10^7$	$1.06 * 10^4$	0.095%	0.065%

Tabelle A.34: D_{1CCAL8}-Invasion in adhärennten HeLa-Zellen

Nr.	C_{McCoy}	c_{oz}	$y = \frac{c_{oz}}{C_{McCoy}}$	Mittelwert
1	$2.4 * 10^7$	$6.25 * 10^3$	0.026%	
2	$2.4 * 10^7$	$5.05 * 10^4$	0.210%	

Nr.	c_{McCoy}	c_{oz}	$y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}}$	Mittelwert
3	$2.4 * 10^7$	$2.76 * 10^4$	0.115%	0.117%

Tabelle A.35: E₄₃₄-Invasion in adhärenenten HeLa-Zellen

Nr.	c_{McCoy}	c_{oz}	$y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}}$	Mittelwert
1	$5.94 * 10^7$	$2.5 * 10^3$	0.004%	
2	$5.94 * 10^7$	$1.9 * 10^4$	0.032%	
3	$5.94 * 10^7$	$1.69 * 10^4$	0.028%	0.021%

Tabelle A.36: E₁₇₃₃-Invasion in adhärenenten HeLa-Zellen

Nr.	c_{McCoy}	c_{oz}	$y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}}$	Mittelwert
1	$9.1 * 10^7$	$7.5 * 10^3$	0.008%	
2	$9.1 * 10^7$	$1.25 * 10^4$	0.014%	
3	$9.1 * 10^7$	$1.95 * 10^4$	0.021%	
4	$9.1 * 10^7$	$1.01 * 10^4$	0.011%	0.014%

Tabelle A.37: F₁₇₃₅-Invasion in adhärenenten HeLa-Zellen

Nr.	c_{McCoy}	c_{oz}	$y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}}$	Mittelwert
1	$1.5 * 10^7$	$7.88 * 10^3$	0.052%	
2	$1.5 * 10^7$	$2.4 * 10^3$	0.016%	
3	$1.5 * 10^7$	$4.16 * 10^3$	0.028%	
4	$1.5 * 10^7$	$2.5 * 10^3$	0.017%	0.028%

Tabelle A.38: F₁₇₃₀-Invasion in adhärenenten HeLa-Zellen

A.3 Adhärenz an Endometriumkulturen

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$y = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	164 000	$3.5 * 10^7$	213	75	35.21%	Zentrifugation	
2	164 000	$3.5 * 10^7$	213	76.2	35.77%	Zentrifugation	
3	164 000	$3.5 * 10^7$	213	63.75	29.93%	Zentrifugation	33.67%
4	164 000	$3.5 * 10^7$	213	24.33	11.42%	Inkubation	
5	164 000	$3.5 * 10^7$	213	23.48	11.02%	Inkubation	
6	164 000	$3.5 * 10^7$	213	25	11.73%	Inkubation	11.39%

Tabelle A.39: LGV₂-Adhärenz an Endometriumkulturen

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$y = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	164 000	$1.6 * 10^7$	98	8.4	8.57%	Zentrifugation	
2	164 000	$1.6 * 10^7$	98	13.8	14.08%	Zentrifugation	
3	164 000	$1.6 * 10^7$	98	7.6	7.75%	Zentrifugation	10.13%
4	164 000	$1.6 * 10^7$	98	2.9	2.84%	Inkubation	
5	164 000	$1.6 * 10^7$	98	2.78	2.96%	Inkubation	
6	164 000	$1.6 * 10^7$	98	2.1	2.14%	Inkubation	2.61%

Tabelle A.40: D_{ICCAL8}-Adhärenz an Endometriumkulturen

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$y = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	164 000	$1.7 * 10^7$	104	55.10	52.98%	Zentrifugation	
2	164 000	$1.7 * 10^7$	104	42.32	40.69%	Zentrifugation	

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$y = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
3	164 000	$1.7 * 10^7$	104	51	49.03%	Zentrifugation	47.57%
4	164 000	$1.7 * 10^7$	104	8.9	8.56%	Inkubation	
5	164 000	$1.7 * 10^7$	104	8.32	8.00%	Inkubation	
6	164 000	$1.7 * 10^7$	104	7.5	7.21%	Inkubation	7.92%

Tabelle A.41: E₄₃₄-Adhärenz an Endometriumkulturen

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$y = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	164 000	$2.6 * 10^7$	159	36.25	22.8%	Zentrifugation	
2	164 000	$2.6 * 10^7$	159	20.70	13.02%	Zentrifugation	
3	164 000	$2.6 * 10^7$	159	27.50	17.30%	Zentrifugation	
4	164 000	$2.6 * 10^7$	159	25	15.72%	Zentrifugation	17.21%
5	164 000	$2.6 * 10^7$	159	4.3	2.7%	Inkubation	
6	164 000	$2.6 * 10^7$	159	4.18	2.63%	Inkubation	
7	164 000	$2.6 * 10^7$	159	5.78	3.64%	Inkubation	3.14%

Tabelle A.42: E₁₇₃₃-Adhärenz an Endometriumkulturen

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$y = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	164 000	$7 * 10^7$	427	33.3	7.8%	Zentrifugation	
2	164 000	$7 * 10^7$	427	35.12	8.22%	Zentrifugation	
3	164 000	$7 * 10^7$	427	40	9.37%	Zentrifugation	8.46%
4	164 000	$7 * 10^7$	427	3.15	0.74%	Inkubation	
5	164 000	$7 * 10^7$	427	2.72	0.64%	Inkubation	
6	164 000	$7 * 10^7$	427	1.95	0.46%	Inkubation	0.61%

Tabelle A.43: F₁₇₃₅-Adhärenz an Endometriumkulturen

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$y = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten	Mittelwert
1	164 000	$1.5 * 10^7$	91	22.1	24.28%	Zentrifugation	
2	164 000	$1.5 * 10^7$	91	18.52	20.35%	Zentrifugation	
3	164 000	$1.5 * 10^7$	91	15	16.48%	Zentrifugation	20.37%
4	164 000	$1.5 * 10^7$	91	2.19	2.41%	Inkubation	
5	164 000	$1.5 * 10^7$	91	2.15	2.63%	Inkubation	
6	164 000	$1.5 * 10^7$	91	1.82	2%	Inkubation	2.34%

Tabelle A.44: F₁₇₃₀-Adhärenz an Endometriumkulturen

A.4 Invasion in Endometriumkulturen

Nr.	d_c	c_{mz}	c_{McCoy}	$Pt = \frac{c_{mz}}{c_{McCoy}}$	Material	Mittelwert
1	27 510	$5.51 * 10^7$	$4.2 * 10^8$	13.12%	Patientin B	
2	24 360	$4.87 * 10^7$	$4.2 * 10^8$	11.6%	Patientin B	
3	37 590	$7.52 * 10^7$	$4.2 * 10^8$	17.9%	Patientin B	
4	26 040	$5.21 * 10^7$	$4.2 * 10^8$	12.40%	Patientin B	
5	43 890	$4.39 * 10^7$	$4.2 * 10^8$	10.46%	Patientin C	
6	65 730	$6.57 * 10^7$	$4.2 * 10^8$	15.64%	Patientin C	
7	44 100	$4.41 * 10^7$	$4.2 * 10^8$	10.5%	Patientin C	
8	42 840	$4.28 * 10^7$	$4.2 * 10^8$	10%	Patientin C	12.7%

Tabelle A.45: LGV₂-Invasion mit Zentrifugation in Endometriumkulturen

Nr.	d_e	c_{oz}	c_{McCoy}	$y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}}$	Material	Mittelwert
1	29 820	$2.98 * 10^7$	$4.2 * 10^8$	7.09%	Patientin C	
2	32 718	$3.27 * 10^7$	$4.2 * 10^8$	7.79%	Patientin C	
3	28 560	$2.86 * 10^7$	$4.2 * 10^8$	6.81%	Patientin C	
4	56 070	$2.8 * 10^7$	$4.2 * 10^8$	6.67%	Patientin C	
5	84 000	$1.68 * 10^6$	$4.2 * 10^8$	4%	Patientin A	6.47%

Tabelle A.46: LGV₂-Statische Invasion in Endometriumkulturen

Nr.	d_e	c_{mz}	c_{McCoy}	$p_t = \frac{c_{mz}}{c_{McCoy}}$	Material	Mittelwert
1	19 110	$9.55 * 10^5$	$1.12 * 10^7$	9.27%	Patientin B	
2	15 750	$7.88 * 10^5$	$1.12 * 10^7$	7.04%	Patientin B	
3	13 020	$6.51 * 10^5$	$1.12 * 10^7$	5.81%	Patientin B	
4	17 430	$8.72 * 10^5$	$1.12 * 10^7$	7.79%	Patientin B	
5	14 070	$1.41 * 10^6$	$1.12 * 10^7$	12.59%	Patientin C	
6	14 280	$1.43 * 10^6$	$1.12 * 10^7$	12.76%	Patientin C	
7	7 140	$7.14 * 10^5$	$1.12 * 10^7$	6.38%	Patientin C	
8	10 500	$1.05 * 10^6$	$1.12 * 10^7$	9.38%	Patientin C	7.72%

Tabelle A.47: D_{ICCAL8}-Zentrifugationsassistierte Invasion in Endometriumkulturen

Nr.	d_e	c_{oz}	c_{McCoy}	$y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}}$	Material	Mittelwert
1	20	$1 * 10^3$	$1.12 * 10^7$	0.009%	Patientin C	
2	50	$3.5 * 10^3$	$1.12 * 10^7$	0.031%	Patientin C	
3	32	$1.6 * 10^3$	$1.12 * 10^7$	0.014%	Patientin C	
4	206	$4.1 * 10^3$	$1.12 * 10^7$	0.037%	Patientin A	
5	445	$8.9 * 10^3$	$1.12 * 10^7$	0.079%	Patientin A	
6	380	$7.59 * 10^3$	$1.12 * 10^7$	0.068%	Patientin A	0.04%

Tabelle A.48: D_{ICCAL8}-Invasion ohne Zentrifugation in Endometriumkulturen

Nr.	d_e	c_{mz}	c_{McCoy}	$p_t = \frac{c_{mz}}{c_{McCoy}}$	Material	Mittelwert
1	12 243	$6.12 * 10^5$	$2.4 * 10^7$	2.55%	Patientin B	
2	8 211	$4.1 * 10^5$	$2.4 * 10^7$	1.71%	Patientin B	
3	17 178	$8.59 * 10^5$	$2.4 * 10^7$	3.58%	Patientin B	
4	7 140	$3.57 * 10^5$	$2.4 * 10^7$	1.48%	Patientin B	
5	2 907	$2.9 * 10^5$	$2.4 * 10^7$	1.21%	Patientin C	
6	4 923	$4.92 * 10^5$	$2.4 * 10^7$	2.05%	Patientin C	
7	7 461	$7.46 * 10^5$	$2.4 * 10^7$	3.11%	Patientin C	
8	2 820	$2.82 * 10^5$	$2.4 * 10^7$	1.18%	Patientin C	2.11%

Tabelle A.49: E₄₃₄-Invasion mit Zentrifugation in Endometriumkulturen

Nr.	d_e	c_{oz}	c_{McCoy}	$y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}}$	Material	Mittelwert
1	586	$2.93 * 10^4$	$2.4 * 10^7$	0.122%	Patientin C	
2	242	$1.2 * 10^4$	$2.4 * 10^7$	0.050%	Patientin C	
3	557	$2.78 * 10^4$	$2.4 * 10^7$	0.116%	Patientin C	
4	411	$8.23 * 10^3$	$2.4 * 10^7$	0.034%	Patientin A	
5	382	$7.65 * 10^3$	$2.4 * 10^7$	0.032%	Patientin A	0.071%

Tabelle A.50: E₄₃₄-Invasion ohne Zentrifugation in Endometriumkulturen

Nr.	d_e	c_{mz}	c_{McCoy}	$p_t = \frac{c_{mz}}{c_{McCoy}}$	Material	Mittelwert
-----	-------	----------	-------------	----------------------------------	----------	------------

Nr.	d_e	c_{mz}	c_{McCoy}	$p_t = \frac{c_{mz}}{c_{McCoy}}$	Material	Mittelwert
1	16 300	$8.19 * 10^5$	$5.94 * 10^7$	1.38%	Patientin B	
2	9 030	$4.69 * 10^5$	$5.94 * 10^7$	0.79%	Patientin B	
3	7770	$3.88 * 10^5$	$5.94 * 10^7$	0.65%	Patientin B	
4	11 970	$5.98 * 10^5$	$5.94 * 10^7$	1.01%	Patientin B	
5	3 585	$3.58 * 10^5$	$5.94 * 10^7$	0.6%	Patientin C	
6	3 169	$3.16 * 10^5$	$5.94 * 10^7$	0.53%	Patientin C	
7	4 845	$1.21 * 10^5$	$5.94 * 10^7$	0.2%	Patientin C	
8	5 136	$1.28 * 10^5$	$5.94 * 10^7$	0.22%	Patientin C	0.67%

Tabelle A.51: E₁₇₃₃-Invasion mit Zentrifugation in Endometriumkulturen

Nr.	d_e	c_{oz}	c_{McCoy}	$y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}}$	Material	Mittelwert
1	195	$9.75 * 10^3$	$5.94 * 10^7$	0.016%	Patientin C	
2	223	$1.1 * 10^4$	$5.94 * 10^7$	0.018%	Patientin C	
3	315	$1.58 * 10^4$	$5.94 * 10^7$	0.027%	Patientin C	
4	317	$6.34 * 10^3$	$5.94 * 10^7$	0.011%	Patientin A	
5	315	$6.29 * 10^3$	$5.94 * 10^7$	0.011%	Patientin A	0.017%

Tabelle A.52: E₁₇₃₃-Invasion ohne Zentrifugation in Endometriumkulturen

Nr.	d_e	c_{mz}	c_{McCoy}	$p_t = \frac{c_{mz}}{c_{McCoy}}$	Material	Mittelwert
1	13 020	$6.51 * 10^5$	$9.1 * 10^7$	0.72%	Patientin B	
2	8 211	$4.1 * 10^5$	$9.1 * 10^7$	0.45%	Patientin B	
3	12 180	$6.1 * 10^5$	$9.1 * 10^7$	0.67%	Patientin B	
4	13 461	$6.73 * 10^5$	$9.1 * 10^7$	0.74%	Patientin B	
5	4 167	$4.16 * 10^5$	$9.1 * 10^7$	0.46%	Patientin C	
6	5 000	$5 * 10^5$	$9.1 * 10^7$	0.55%	Patientin C	
7	2 810	$2.83 * 10^5$	$9.1 * 10^7$	0.31%	Patientin C	0.56%

Tabelle A.53: F₁₇₃₅-Invasion mit Zentrifugation in Endometriumkulturen

Nr.	d_e	c_{oz}	c_{McCoy}	$y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}}$	Material	Mittelwert
1	15	750	$9.1 * 10^7$	0.008%	Patientin C	
2	50	2500	$9.1 * 10^7$	0.027%	Patientin C	
3	25	1250	$9.1 * 10^7$	0.014%	Patientin C	
4	97	1940	$9.1 * 10^7$	0.021%	Patientin A	
5	150	3000	$9.1 * 10^7$	0.033%	Patientin A	0.021%

Tabelle A.54: F₁₇₃₅-Invasion ohne Zentrifugation in Endometriumkulturen

Nr.	d_e	c_{mz}	c_{McCoy}	$p_t = \frac{c_{mz}}{c_{McCoy}}$	Material	Mittelwert
1	2057	$1.02 * 10^5$	$1.5 * 10^7$	0.68%	Patientin B	
2	3727	$1.86 * 10^5$	$1.5 * 10^7$	1.24%	Patientin B	
3	3 993	$2.0 * 10^5$	$1.5 * 10^7$	1.33%	Patientin B	
4	2 565	$1.28 * 10^5$	$1.5 * 10^7$	0.85%	Patientin B	
5	750	$7.5 * 10^4$	$1.5 * 10^7$	0.5%	Patientin C	
6	1 161	$1.16 * 10^5$	$1.5 * 10^7$	0.77%	Patientin C	
7	1 500	$1.5 * 10^5$	$1.5 * 10^7$	1%	Patientin C	0.91%

Tabelle A.55: F₁₇₃₀-Invasion mit Zentrifugation in Endometriumkulturen

Nr.	d_e	c_{oz}	c_{McCoy}	$y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}}$	Material	Mittelwert
1	6	300	$1.5 * 10^7$	0.002%	Patientin C	

Nr.	d_e	c_{oz}	c_{McCoy}	$y = \frac{c_{oz}}{c_{McCoy}}$	Material	Mittelwert
2	5	250	$1.5 * 10^7$	0.0022%	Patientin C	
3	1	50	$1.5 * 10^7$	0.0003%	Patientin C	
4	7	140	$1.5 * 10^7$	0.0009%	Patientin A	
5	7	160	$1.5 * 10^7$	0.0011%	Patientin A	0.001%

Tabelle A.56: F₁₇₃₀-Invasion ohne Zentrifugation in Endometriumkulturen

A.5 Adhärenz an murinen Genitalzellen

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
1	200 000	$3 * 10^8$	1500	4.7	0.31%	3.5h Inkubation
2	56 000	$7.5 * 10^7$	1340	1.07	0.08%	3.5h Inkubation
3	120 000	$3 * 10^7$	250	0.88	0.35%	3.5h Inkubation
4	200 000	$3 * 10^8$	1500	11.1	0.74%	Zentrifugation
5	56 000	$7.5 * 10^7$	1340	3.24	0.24%	Zentrifugation

Tabelle A.57: LGV₂-Adhärenz an Vaginalzellen 10/95 (SCID-Mäuse)

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
1	200 000	$3 * 10^8$	1500	2.2	0.15%	3.5h Inkubation
2	50 000	$3 * 10^8$	6000	7.7	0.13%	3.5h Inkubation
3	50 000	$7.5 * 10^7$	1500	2.2	0.15%	3.5h Inkubation
4	50 000	$1.5 * 10^8$	3000	4.2	0.14%	3.5h Inkubation
5	72 000	$7.5 * 10^7$	1040	1.87	0.18%	3.5h Inkubation
6	90 000	$3 * 10^7$	333	0.82	0.25%	3.5h Inkubation
7	50 000	$3.75 * 10^7$	750	1.7	0.23%	Zentrifugation
8	72 000	$7.5 * 10^7$	1040	7.38	0.71%	Zentrifugation

Tabelle A.58: LGV₂-Adhärenz an Vaginalzellen 10/95 (BALB C-Mäuse)

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
1	50 000	$2.5 * 10^8$	4460	3.07	0.07%	3.5h Inkubation
2	60 000	$2.25 * 10^8$	3750	1.78	0.05%	3.5h Inkubation
3	56 000	$7.5 * 10^7$	1340	1.57	0.12%	Zentrifugation
4	60 000	$7.5 * 10^7$	1250	1.77	0.14%	Zentrifugation

Tabelle A.59: D_{ICCAL8}-Adhärenz an Vaginalzellen 10/95 (SCID-Mäuse)

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
1	50 000	$1.05 * 10^8$	2100	2.3	0.11%	3.5h Inkubation
2	50 000	$3 * 10^8$	6000	14.9	0.25%	3.5h Inkubation
3	50 000	$2.1 * 10^8$	4200	11.3	0.27%	Zentrifugation
5	50 000	$2.1 * 10^8$	4200	8.8	0.21%	Zentrifugation

Tabelle A.60: D_{ICCAL8}-Adhärenz an Vaginalzellen 10/95 (BALB C-Mäuse)

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
1	50 000	$3 * 10^8$	6000	14.9	0.25%	3.5h Inkubation, 4h
2	50 000	$1.05 * 10^8$	2100	2.3	0.11%	3.5h Inkubation, 4h
3	50 000	$2.1 * 10^8$	4200	3.2	0.08%	3.5h Inkubation, 48h
4	36 000	$1.5 * 10^8$	4167	1.3	0.003%	3.5h Inkubation, 144h
5	22 000	$2.5 * 10^8$	11400	0.52	0.005%	3.5h Inkubation, 240h
6	50 000	$2.1 * 10^8$	4200	11.3	0.27%	Zentrifugation, 4h

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
7	50 000	$2.1 * 10^8$	4200	8.8	0.21%	Zentrifugation, 4h
8	50 000	$1.05 * 10^8$	2100	3.8	0.18%	Zentrifugation, 48h
9	22 000	$7.5 * 10^7$	3409	1.7	0.05%	Zentrifugation, 240h

Tabelle A.61: Abhängigkeit der Adhäsionsfähigkeit des D-Stammes von der Zellvitalität bei Vaginalzellen (BALB/C-Mäuse)

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
1	3 000	$4 * 10^7$	13 333	22.08	0.17%	Zentrifugation
2	108 000	$1 * 10^8$	925	1.2	0.13%	Zentrifugation
3	108 000	$2 * 10^8$	1850	0.46	0.02%	Inkubation
4	108 000	$1.5 * 10^8$	1390	2.2	0.16%	Zentrifugation, LGV_2
5	4 000	$3 * 10^7$	7500	10.8	0.14%	Inkubation, LGV_2

Tabelle A.62: E_{434} -Adhärenz an Vaginalzellen 01/96 (BALB C-Mäuse) im Vergleich zu LGV_2

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
1	90 000	$1 * 10^8$	1111	0.76	0.068%	3.5h Inkubation
2	90 000	$1 * 10^8$	1111	0.46	0.041%	3.5h Inkubation
3	90 000	$5 * 10^7$	556	26.32	4.73%	Zentrifugation
4	90 000	$5 * 10^7$	556	14.18	2.55%	Zentrifugation

Tabelle A.63: E_{434} -Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (BALB C-Mäuse)

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
1	120 000	$1 * 10^8$	833	0.88	0.11%	3.5h Inkubation
2	120 000	$1 * 10^8$	833	0.82	0.098%	3.5h Inkubation
3	120 000	$5 * 10^7$	417	22.1	5.3%	Zentrifugation
4	120 000	$5 * 10^7$	417	19.62	4.7%	Zentrifugation

Tabelle A.64: E_{434} -Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (SCID-Mäuse)

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
1	90 000	$1.3 * 10^8$	1444	0.54	0.037%	3.5h Inkubation
2	90 000	$1.3 * 10^8$	1444	1.41	0.098%	3.5h Inkubation
3	90 000	$5.2 * 10^7$	578	27.68	4.79%	Zentrifugation
4	90 000	$5.2 * 10^7$	578	29.82	5.16%	Zentrifugation

Tabelle A.65: E_{1733} -Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (BALB C-Mäuse)

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
1	120 000	$1.3 * 10^8$	1083	1.14	0.1%	3.5h Inkubation
2	120 000	$1.3 * 10^8$	1083	0.92	0.084%	3.5h Inkubation
3	120 000	$5.2 * 10^7$	433	20.12	4.64%	Zentrifugation
4	120 000	$5.2 * 10^7$	433	8.82	2.03%	Zentrifugation

Tabelle A.66: E_{1733} -Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (SCID-Mäuse)

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
1	90 000	$5 * 10^8$	5555	0.75	0.014%	3.5h Inkubation
2	90 000	$5 * 10^8$	5555	0.8	0.014%	3.5h Inkubation

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
3	90 000	$2 * 10^8$	2222	37.5	1.69%	Zentrifugation
4	90 000	$2 * 10^8$	2222	31.3	1.41%	Zentrifugation

Tabelle A.67: F₁₇₃₅-Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (BALB C-Mäuse)

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
1	120 000	$5 * 10^8$	4167	0.77	0.018%	3.5h Inkubation
2	120 000	$5 * 10^8$	4167	1.26	0.03%	3.5h Inkubation
3	120 000	$2 * 10^8$	1667	33.6	2.02%	Zentrifugation
4	120 000	$2 * 10^8$	1667	39.02	2.34%	Zentrifugation

Tabelle A.68: F₁₇₃₅-Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (SCID-Mäuse)

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
1	90 000	$1 * 10^8$	1111	1.12	0.1%	3.5h Inkubation
2	90 000	$1 * 10^8$	1111	0.27	0.024%	3.5h Inkubation
3	90 000	$4 * 10^7$	444	25.35	5.7%	Zentrifugation
4	90 000	$4 * 10^7$	444	29.82	6.7%	Zentrifugation

Tabelle A.69: F₁₇₃₀-Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (BALB-Mäuse)

Nr.	z	e_E	$r = \frac{e_E}{z}$	d_c	$a = \frac{d_c}{r}$	Besonderheiten
1	120 000	$1 * 10^8$	833	0.68	0.082%	3.5h Inkubation
2	120 000	$1 * 10^8$	833	0.6	0.072%	3.5h Inkubation
3	120 000	$4 * 10^7$	333	15.22	4.57%	Zentrifugation
4	120 000	$4 * 10^7$	333	28.42	8.53%	Zentrifugation

Tabelle A.70: F₁₇₃₀-Adhärenz an Vaginalzellen 02/96 (SCID-Mäuse)

A.6 Invasion in murinen Genitalzellkulturen

Nr.	z	c_E	F	d_e	p_z	$w = \frac{p_z}{F}$	Maus
1	1000	$5 * 10^4$	50	180	18%	0.36%	BALB/C
2	770	$5 * 10^4$	64	380	49.35%	0.77%	BALB/C
3	360	$5 * 10^4$	139	230	63.89%	0.46%	SCID
4	1100	$5 * 10^4$	45	700	63.63%	1.41%	SCID

Tabelle A.71: LGV₂-Invasion mit Zentrifugation in murinen Genitalzellkulturen

Nr.	z	c_E	F	d_e	p_z	$w = \frac{p_z}{F}$	Maus
1	300	$1 * 10^5$	333	126	42%	0.13%	BALB/C
2	1700	$1 * 10^5$	59	900	52.94%	0.90%	SCID

Tabelle A.72: LGV₂-Invasion ohne Zentrifugation in murinen Genitalzellkulturen

Nr.	z	c_E	F	d_e	p_z	$w = \frac{p_z}{F}$	Maus
1	1250	$1.12 * 10^5$	90	70	5.6%	0.062%	BALB/C
2	1000	$1.12 * 10^5$	112	57	5.7%	0.051%	BALB/C
3	300	$1.12 * 10^5$	373	60	20%	0.054%	SCID
4	370	$1.12 * 10^5$	303	21	5.67%	0.018%	SCID

Tabelle A.73: D_{ICCAL8}-Invasion mit Zentrifugation in murinen Genitalzellkulturen

Nr.	z	c_E	F	d_e	p_z	$w = \frac{p_z}{F}$	Maus
1	2400	$2.4 * 10^5$	100	134	5.58%	0.056%	BALB/C
2	1150	$2.4 * 10^5$	209	40	3.48%	0.017%	BALB/C
3	300	$2.4 * 10^5$	800	25	8.33%	0.010%	SCID
4	210	$2.4 * 10^5$	1143	12	3.69%	0.005%	SCID

Tabelle A.74: E₄₃₄-Invasion mit Zentrifugation in murinen Genitalzellkulturen

Nr.	z	c_E	F	d_e	p_z	$w = \frac{p_z}{F}$	Maus
1	250	$5.94 * 10^5$	2376	17	6.80%	0.003%	BALB/C
2	640	$5.94 * 10^5$	928	65	10.16%	0.011%	BALB/C
3	500	$5.94 * 10^5$	1188	367	73.40%	0.062%	BALB/C
4	100	$5.94 * 10^5$	5940	26	26%	0.004%	SCID
5	380	$5.94 * 10^5$	1563	93	24.47%	0.016%	SCID

Tabelle A.75: E₁₇₃₃-Invasion mit Zentrifugation in murinen Genitalzellkulturen

Nr.	z	c_E	F	d_e	p_z	$w = \frac{p_z}{F}$	Maus
1	1200	$9.1 * 10^5$	758	14	1.16%	0.002%	BALB/C
2	1350	$9.1 * 10^5$	674	340	25.18%	0.037%	BALB/C
3	550	$9.1 * 10^5$	1654	78	14.18%	0.009%	SCID
4	170	$9.1 * 10^5$	5353	12	7.05%	0.001%	SCID

Tabelle A.76: F₁₇₃₅-Invasion mit Zentrifugation in murinen Genitalzellkulturen

Nr.	z	c_E	F	d_e	p_z	$w = \frac{p_z}{F}$	Maus
1	850	$1.5 * 10^5$	176	65	6.70%	0.038%	BALB/C
2	450	$1.5 * 10^5$	333	10	2.22%	0.007%	BALB/C
3	820	$1.5 * 10^5$	183	34	4.15%	0.023%	SCID
4	720	$1.5 * 10^5$	208	32	4.44%	0.021%	SCID

Tabelle A.77: F₁₇₃₀-Invasion mit Zentrifugation in murinen Genitalzellkulturen

Anhang B

Diagramme

B.1 Adhärenz an Zelllinien

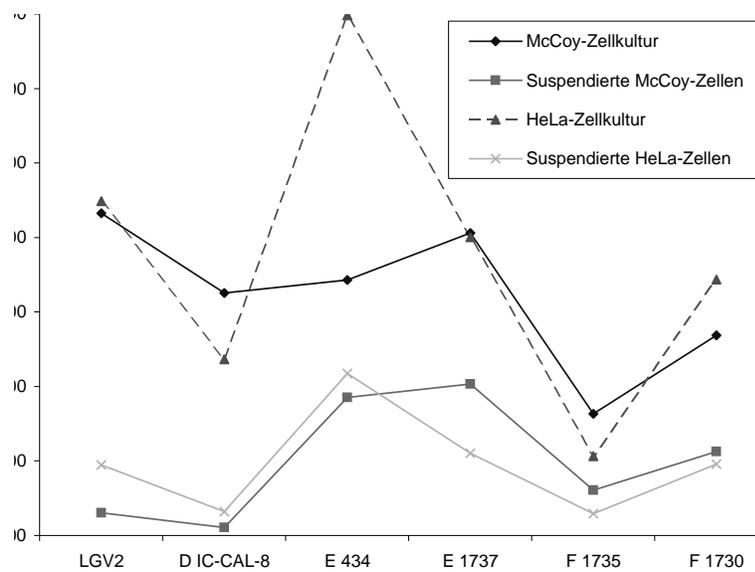


Abbildung B.1: Adhärenz mit Zentrifugation an Zelllinienkulturen

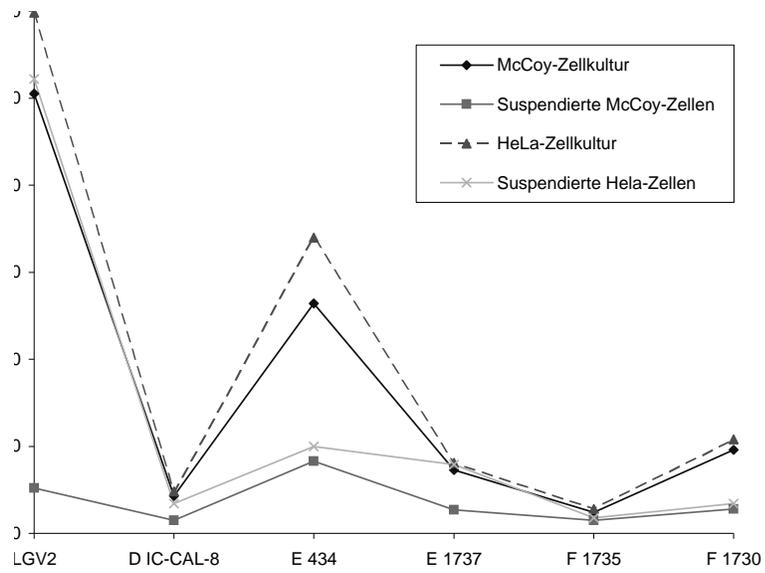


Abbildung B.2: Adhärenz ohne Zentrifugation an Zelllinienkulturen

B.2 Invasion in Zelllinien

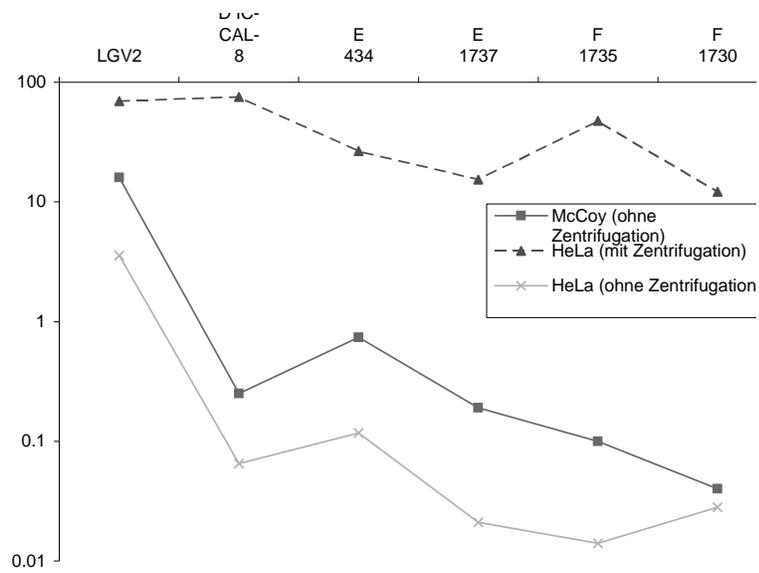


Abbildung B.3: Invasion in Zelllinienkulturen

B.3 Adhärenz an Endometriumkulturen

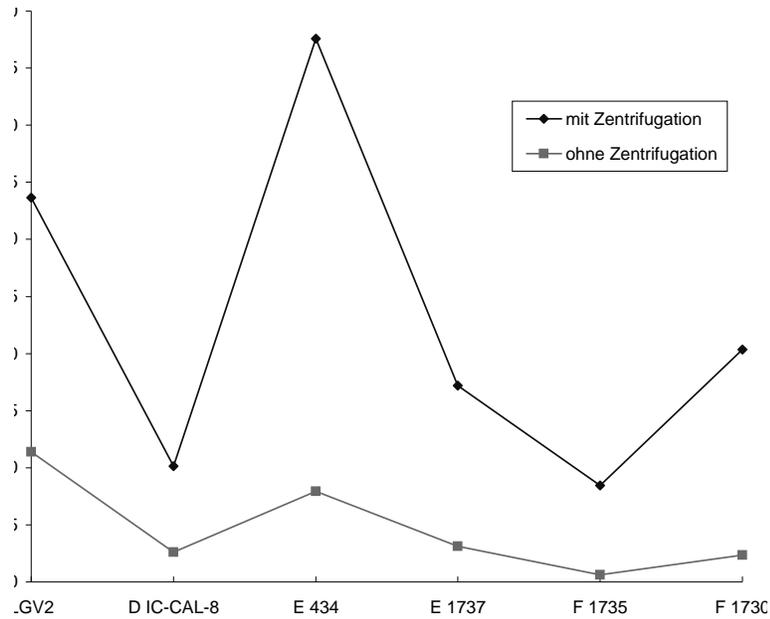


Abbildung B.4: Adhärenz an Endometriumkulturen

B.4 Invasion in Endometriumkulturen

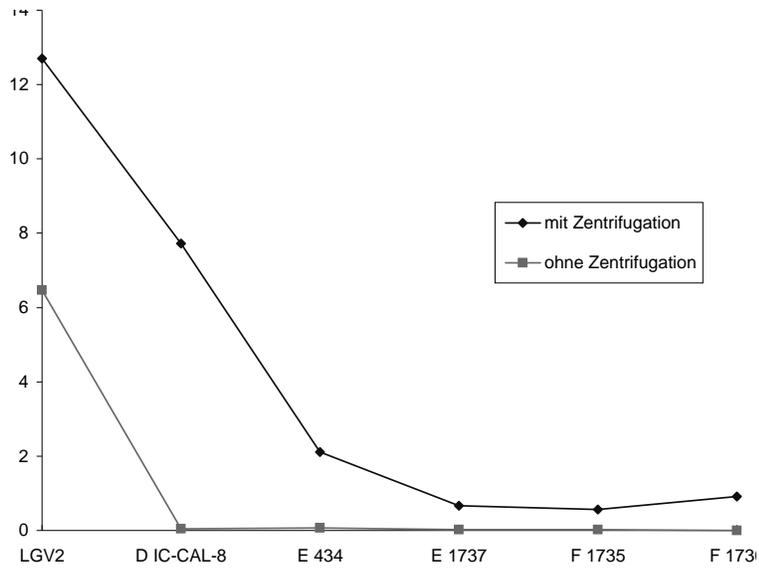


Abbildung B.5: Invasion in Endometriumkulturen

Literaturverzeichnis

- Alexander, J. J. 1968. Separation of protein synthesis in meningopneumonitis agent from that in L cells by differential susceptibility to cycloheximide. *Journal of Bacteriology*, 95:327–332.
- Batteiger, B., Newhall, W., und Jones, R. 1985. Differences in outer membrane proteins of lymphogranuloma venereum and trachoma biovars of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*, 50:488–494.
- Bauwens, J., Clark, A., und Stamm, W. 1993. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* endocervical infections by a commercial polymerase chain reaction assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:3023–3027.
- Bedson, S., Western, G., und Simpson, S. 1930. Observations on the aetiology of psittacosis. *Lancet*, 1:235–236.
- Berlau, J., Junker, U., Groh, A., und Straube, E. 1998. In situ hybridisation and direct fluorescence antibodies for the detection of *Chlamydia trachomatis* in synovial tissue from patients with reactive arthritis. *Journal of Clinical Pathology*, 51:803–806.
- Berlau, J., Ziemer, A., Groh, A., und Straube, E. 1997. Influence of Lectins on the Infectivity of Elementary Bodies of *Chlamydia trachomatis* D IC CAL8 by Synovial Cells. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16:701–703.
- Brownridge, E. und Wyrick, P. 1979. Interaction of *Chlamydia psittaci* reticulate bodies with mouse peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*, 24:697–700.
- Brunham, R., Kuo, C.-C., und Chen, W. 1985. Systemic *Chlamydia trachomatis* infection in mice: a comparison of lymphogranuloma venereum and trachoma biovars. *Infection and Immunity*, 48:78–82.
- Brunham, R., Kuo, C.-C., Cles, L., und Holmes, K. 1983. Correlation of host immune response with quantitative recovery of *Chlamydia trachomatis* from the human endocervix. *Infection and Immunity*, 39:1491–1494.
- Byrne, G. und Faubion, C. 1982. Lymphokine-mediated microblastic mechanisms restrict *Chlamydia psittaci* growth in macrophages. *Journal of Immunology*, 128:469–474.
- Byrne, G. und Kreuger, D. 1983. Lymphokine-mediated inhibition of *Chlamydia* replication in mouse fibroblasts is neutralized by anti-gamma interferon immunoglobulin. *Infection and Immunity*, 42:1152–1158.
- Byrne, G. und Moulder, J. 1978. Parasite-specified phagocytosis of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* by L and HeLa cells. *Infection and Immunity*, 19:598–606.
- Caldwell, H., Kromhout, J., und Schachter, J. 1981. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*, 31:1161–1176.
- Caldwell, H. und Perry, L. 1982. Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to the major outer membrane protein. *Infection and Immunity*, 38:745–754.
- Campbell, L., Kuo, C., und Grayston, J. 1987. Characterization of the new *Chlamydia* agent, TWAR, as a unique organism by restriction endonuclease analysis and DNA-DNA hybridisation. *Journal of Clinical Microbiology*, 25:1911–1916.
- Centola, G., Cisar, M., und Knab, D. 1984. Establishment and morphologic characterization

- of normal human endometrium in vitro. *In Vitro*, 20:451–462.
- Chen, J.-R. und Stephens, R. S. 1994. Trachoma and LGV biovars of *Chlamydia trachomatis* share the same glycosaminoglycan-dependent mechanism for infection of eukaryotic cells. *Molecular Microbiology*, 11:501–507.
- Chernesky, M., Jang, D., Lee, H., Burczak, J., Hu, H., Sellors, J., Tomazic-Allen, S., und Mahony, J. 1994. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections in Men and Women by Testing First-Void Urine by Ligase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 11:2682–2685.
- Clarke, G. und Cooke, D. 1998. *A Basic Course in Statistics*. Arnold, London, New York, Sydney, Auckland.
- Costerton, J., Pffenroth, L., Wilt, J., und Kordova, N. 1976. Ultrastructural studies of the nucleoids of the pleomorphic forms of *Chlamydia psittaci* 6BC: a comparison with bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 22:16–28.
- Czarniecki, C., Peterson, E., und de la Maza, L. 1986. Interferon-induced inhibition of *Chlamydia trachomatis*: dissociation from other biological activities of interferons. In Friedman, R., Merigan, T., und Sreevaksan, T., Herausgeber, *Interferons as cell growth inhibitors and antitumor factors*, Seiten 467–480. Liss, New York.
- Davis, C. und Wyrick, P. 1997. Differences in the Association of *Chlamydia trachomatis* Serovar E and Serovar L2 with Epithelial Cells In Vitro May Reflect Biological Differences In Vivo. *Infection and Immunity*, 65:2914–2924.
- Draper, D., Donegan, E., James, J., Sweet, R., und Brooks, G. 1980. Scanning electron microscopy of attachment of *Neisseria gonorrhoea* colony phenotypes to surfaces of human genital epithelia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 138:818–826.
- Dunlop, E., Al-Hussaini, M., Garland, J., Treharne, J., Harper, I., und Jones, B. 1965. Infection of urethra by TRIC agent in men presenting because of non-specific urethritis. *Lancet*, 1:1025–1028.
- Eggert-Kruse, W., Gerhard, I., H., N., Tilgen, W., und Runnebaum, B. 1990. Chlamydial infection—a female and/or male infertility factor? *Fertility and Sterility*, 53:1037–1044.
- Eissenberg, L. und Wyrick, P. 1981. Inhibition of phagolysosomal fusion is localized *Chlamydia psittaci*-laden vacuoles. *Infection and Immunity*, 32:889–896.
- Eissenberg, L., Wyrick, P., Davies, C., und Rump, J. 1983. *Chlamydia psittaci* elementary body develops: ingestion and inhibition of phagolysosome fusion. *Infection and Immunity*, 40:741–751.
- Everett, K. D., Bush, R. M., und Andersen, A. A. 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49:415–440.
- Fan, J. und Stevens, R. 1997. Antigen Conformation Dependence of *Chlamydia trachomatis* Infectivity Neutralisation. *The Journal of Infectious Diseases*, 176:713–721.
- Fields, P. und Barnes, R. 1992. The Genus *Chlamydia*. In Balows, A. et al., Herausgeber, *The Prokaryotes*, Seiten 3691–3709. Springer Verlag.
- Friesen, A. 1988. Urogenitale Chlamydieninfektionen. *KrankenhausArzt*, 61:281–287.
- Friis, R. 1972. Interaction of L cells and *Chlamydia psittaci*: entry of the parasite and host responses to its development. *Journal of Bacteriology*, 110:706–721.
- Frutos, R., Pages, M., Roizes, G., und Bergoin, M. 1989. Pulse field gel electrophoresis determination of the genome size of obligate intracellular bacteria belonging to the genera *Chlamydia*, *Rickettsiella*, und *Porochlamydia*. *Journal of Bacteriology*, 171:4511–4519.
- Garland, S., Malatt, A., Tabrizi, S., Grando, D., Lees, M., Andrew, J., und Taylor, H. 1995. *Chlamydia trachomatis* conjunctivitis. Prevalence and association with genital tract infection. *Medical Journal of Australia*, 162:363–366.
- Grayston, J., Kuo, C.-C., Wang, S.-P., und Altman, J. 1986. A new *Chlamydia psittaci* strain,

- TWAR, isolated in acute respiratory infections. *New England Journal of Medicine*, 315:161–168.
- Hartung, J. und Elpelt, B. 1992. *Multivariate Statistik*. R. Oldenbourg Verlag, München, Wien.
- Hatch, T., Miceli, M., und Silverman, J. 1985. Synthesis of protein in host-free reticulate bodies of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Bacteriology*, 162:938–943.
- Hatch, T. P. 1975. Utilization of L-cells nucleoside triphosphates by *Chlamydia psittaci* for ribonucleic acid synthesis. *Journal of Bacteriology*, 122:393–400.
- Hay, R., Macy, M., Chen, T., McClintock, P., und Reid, Y. 1988. American Type Culture Collection, Catalogue of Cell Lines and Hybridomas.
- Jones, B., Collier, L., und Smith, C. 1959. Isolation of virus from inclusion blenorrhoea. *Lancet*, 1:902–905.
- Jones, R. 1991. New treatments for *Chlamydia trachomatis*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 164:1789–1793.
- Jones, R., Van der Pol, B., Martin, D., und Shepard, M. 1990. Partial characterization of *Chlamydia trachomatis* isolates resistant to multiple antibiotics. *Journal of Infectious Diseases*, 162:1309–1315.
- Kayser, F. und Bienz, K. 1989. *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kingsbury, D. 1969. Estimate of the genome size of various microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 98:1400–1401.
- Kirk, D., King, R., Heyes, J., Peachey, L., Hirsch, P., und Taylor, R. 1978. Normal human endometrium in cell culture. Separation and characterization of epithelial and stromal components in vitro. *In Vitro*, 14:651–662.
- Kuo, C., Wang, S., und Grayston, J. 1973. Effect of polycations, polyanions and neuraminidase on the infectivity of trachoma-inclusion conjunctivitis and lymphogranuloma venereum organisms in HeLa cells: sialic acid residues as possible receptors for trachoma-inclusion conjunctivitis. *Infection and Immunity*, 8:74–79.
- Kuo, C., Wang, S., Wentworth, B., und Grayston, J. 1972. Primary isolation of TRIC organisms in HeLa 229 cells treated with DEAE-dextran. *Journal of Infectious Diseases*, 125:665–668.
- Lassus, A. 1990. Comparative studies of azithromycin in skin and soft tissue infection and sexually transmitted infections by *Neisseria* and *Chlamydia* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 25:115–121.
- Lee, C. 1981. Interaction between a trachoma strain of *Chlamydia trachomatis* and mouse fibroblasts (McCoy cells) in the absence of centrifugation. *Infection and Immunity*, 31:584–591.
- Levy, N. und Moulder, J. 1982. Attachment of cells walls of *Chlamydia psittaci* to mouse fibroblasts (L cells). *Infection and Immunity*, 37:1059–1065.
- Lovett, M., Kuo, C., Holmes, K., und Falkow, S. 1980. Plasmids of the genus *Chlamydia*. In Nelson, J. und Grassi, C., Herausgeber, *Current chemotherapy and infectious diseases*, Band 2, Seiten 1250–1252. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Ma, J., Chen, K., und Kuo, C. 1987. Identification of conserved regions for species and subspecies specific epitopes on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Microbiological Pathogenesis*, 3:299–307.
- Mardh, P. 1981. Body fluids and constituents of body fluids influencing the formation of chlamydial inclusions in McCoy cell cultures. In *Abstracts of the IVth International Meeting on Sexually Transmitted Diseases*, Seite 82, Heidelberg. International Society for STD Research.
- Matsumoto, A. 1981. Isolation and electron microscopic observations of intracytoplasmic inclusions containing *C. psittaci*. *Journal of Bacteriology*, 145:609–612.
- Moncada, J., Schachter, J., Bolan, J., Whidden, R., und Brooks, D. 1994. Ligase Chain Reaction to detect *Chlamydia trachomatis* in First Catch Urine collected from females. In *Chlamydial Infections-Proceedings of the Eight International Symposium on Human Chlamydial*

- Infections*, Seiten 334–337, Bologna. Societa Editrice Esculapio.
- Moorman, D., Sixbey, J., und Wyrick, P. 1986. Interaction of Chlamydia trachomatis with Human Genital Epithelium in Culture. *Journal of General Microbiology*, 13:1055–1067.
- Morrison, R., Lyng, K., und Caldwell, H. 1989. Chlamydial disease pathogenesis: ocular hypersensitivity elicited by a genus-specific 57-kD protein. *Journal of Experimental Medicine*, 169:663–675.
- Moulder, J. 1962. The biochemistry of intracellular parasitism. *The University of Chicago Press*.
- Moulder, J. W., Grisso, D., und Brubaker, R. 1965. Enzymes of glucose catabolism in a member of the psittacosis group. *Journal of Bacteriology*, 89:810–812.
- Mourad, A., Sweet, R., Sugg, N., und Schachter, J. 1980. Relative resistance to erythromycin in Chlamydia trachomatis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18:696–698.
- Mulcahy, F., Bignell, C., Rajakumar, R., Waugh, M., Hetherington, J., Ewing, R., und Whelan, P. 1987. Prevalence of chlamydial infection in acute epididymoorchitis. *Genitourinary Medicine*, 63:16–18.
- Näher, H. und Petzoldt, D. 1991. Serovar distribution of urogenital C. trachomatis isolates in Germany. *Genitourinary Medicine*, 67:114–116.
- Nano, F. und Caldwell, H. 1985. Expression of chlamydial genus-specific lipopolysaccharide epitope in Escherichia coli. *Science*, 228:742–744.
- Newhall, W. und Jones, R. 1983. Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of Chlamydiae. *Journal of Bacteriology*, 154:998–1001.
- Oehme, A., Groh, A., und Straube, E. 1996. Comparison of Chlamydia Serological Tests with Respect to Antibodies against Chlamydia trachomatis. *Medical Microbiology–Letters*, 5:408–417.
- Ormsbee, R. A. und Weiss, E. 1963. Trachoma agent: Glucose utilization by purified suspensions. *Science*, 142:1077–1078.
- Peterson, E. und Clad, A. 1995. Genitale Chlamydien-Infektionen. *Deutsches Ärzteblatt*, 92(5):277–282.
- Piot, P., Van den Hoek, J. A. R., Van Damme, L., und Laga, M. 1994. Epidemiology and Control of Genital Chlamydial Infection. In *Chlamydial Infections-Proceedings of the Eight International Symposium on Human Chlamydial Infections*, Seiten 7–16, Bologna. Societa Editrice Esculapio.
- Rödel, J., Groh, A., Vogelsang, H., Lehmann, M., Hartmann, M., und Straube, E. 1998a. Beta Interferon Is Produced by Chlamydia trachomatis-Infected Fibroblast-Like Synoviocytes and Inhibits Gamma Interferon-Induced HLA-DR Expression. *Infection and Immunity*, 66:4491–4495.
- Rödel, J., Straube, E., Lungershausen, W., Hartmann, M., und Groh, A. 1998b. Secretion of Cytokines by Human Synoviocytes During in vitro Infection with Chlamydia trachomatis. *The Journal of Rheumatology*, 25:2161–2168.
- Rödel, J., Woytas, M., Groh, A., Schmidt, K.-H., Hartmann, M., Lehmann, M., und Straube, E. 2000. Production of Basic Fibroblast Growth Factor and Interleukin 6 by Human Smooth Muscle Cells following Infection with Chlamydia pneumoniae. *Infection and Immunity*, 68:3635–3641.
- Rothermel, C., Rubin, B., und Murray, H. 1983. Gamma interferon is the factor in lymphokine that activates human macrophages to inhibit intracellular Chlamydia psittaci replication. *Journal of Immunology*, 131:2542–2544.
- Salyers, A. und Whitt, D. 1994. *Bacterial Pathogenesis–A Molecular Approach*. ASM Press, Washington, D.C.
- Sarov, I. und Becker, Y. 1969. Trachoma agent DNA. *Journal of Molecular Biology*, 42:581–589.
- Sarov, I. und Becker, Y. 1971. Deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid polymerase activity in purified elementary bodies: effect of sodium chloride on ribonucleic acid

- transcription. *Journal of Bacteriology*, 107:593–598.
- Satyaswaroop, P., Bressler, R., De La Pena, M., und Gurpide, E. 1979. Isolation and culture of human endometrial glands. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 48:639–641.
- Schachter, J. 1988. The intracellular life of Chlamydia. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 138:109–135.
- Schachter, J. 1994. Diagnosis of Chlamydia trachomatis infection. In *Chlamydial Infections-Proceedings of the Eight International Symposium on Human Chlamydial Infections*, Seiten 293–302, Bologna. Societa Editrice Esculapio.
- Schachter, J., Grossman, M., Sweet, R., Holt, J., C., J., und Bishop, E. 1986. Prospective Study of Perinatal Transmission of Chlamydia trachomatis. *Journal of the American Medical Association*, 255:3374–3377.
- Schramm, N. und Wyrick, P. 1995. Cytoskeletal requirements in Chlamydia trachomatis infection of host cells. *Infection and Immunity*, 63:324–332.
- Shemer, Y. und Sarov, I. 1985. Inhibition of growth of Chlamydia trachomatis by human gamma interferon. *Infection and Immunity*, 48:592–596.
- Siegfried, J., Nelson, K., Martin, J., und Kaufman, D. 1984. Histochemical identification of cultured cells from human endometrium. *In Vitro*, 20:25–32.
- Sieper, J., Braun, J., Wu, P., und Kingsley, G. 1993. T cells are responsible for the enhanced synovial cellular immune response to triggering antigen in reactive arthritis. *Clinical Experimental Immunology*, 91:96–102.
- Söderlund, G. und Kihlström, E. 1983. Effect of methylamine and monodansylcadaverine on the susceptibility of McCoy-cells to Chlamydia trachomatis infections. *Infection and Immunity*, 40:534–541.
- Stephens, R. 1994. Cell Biology of Chlamydia Infection. In *Chlamydial Infections-Proceedings of the Eight International Symposium on Human Chlamydial Infections*, Seiten 377–386, Bologna. Societa Editrice Esculapio.
- Stephens, R., Kuo, C., Newport, G., und Agabian, N. 1985. Molecular cloning and expressing of Chlamydia trachomatis major outer membrane protein antigens in Escherichia coli. *Infection and Immunity*, 47:713–718.
- Stephens, R., Sanchez-Pescador, R., Wagar, E., Inouye, C., und Urdea, M. 1987. Diversity of Chlamydia trachomatis outer membrane protein genes. *Journal of Bacteriology*, 169:3879–3885.
- Stephens, R., Tam, M., Kuo, C., und Novinski, R. 1982. Monoclonal antibodies to Chlamydia trachomatis: antibody specificities and antigen characterization. *Journal of Immunology*, 128:1083–1089.
- Stephens, R., Wagar, E., und Schoolnik, G. 1988. High resolution mapping of serovar-specific and common antigenic determinants of the major outer membrane of Chlamydia trachomatis. *Journal of Experimental Medicine*, 167:817–831.
- Storz, J. 1971. *Chlamydia and Chlamydia-induced diseases*. Charles C. Thomas, Springfield/Il.
- Su, H., Raymond, L., Rockey, D. D., Fischer, E., Hackstadt, T., und Caldwell, H. D. 1996. A recombinant Chlamydia Trachomatis major outer membrane protein binds to heparansulfate receptors on epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:11143–11148.
- Sugarman, B. und Agbor, P. 1987. The Binding of Chlamydia Trachomatis and Zinc to McCoy Cells (mouse fibroblasts). *Infection*, 15:39–43.
- T'ang, F., Chang, H., Huang, Y., und Wang, K. 1957. Studies on the etiology of trachoma with special reference to isolation of the virus in chick embryo. *Chinese Medical Journal*, 75:429–447.
- Taylor-Robinson, D. 1991. Genital chlamydial infections: clinical aspects, diagnosis, treatment and prevention. In Harris, J. und Forster, S., Herausgeber, *Recent advances in sexually transmitted diseases and AIDS*, Seiten 219–262. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Taylor-Robinson, D. und Thomas, B. 1980. The role of Chlamydia trachomatis in genital-tract

- and associated diseases. *Journal of Clinical Pathology*, 33:205–233.
- Taylor-Robinson, D. und Thomas, B. 1991. Laboratory techniques for the diagnosis of Chlamydial infections. *Genitourinary Medicine*, 67:256–266.
- Ting, L., Hsia, R., Haidaris, C., und Bavoil, P. 1995. Interaction of Outer Envelope Proteins of Chlamydia psittaci GPIC with the HeLa Cell Surface. *Infection and Immunity*, 63(9):3600–3608.
- Treuhaft, M. und Moulder, J. 1968. Biosynthesis of arginine in L-cells infected with chlamydiae. *Journal of Bacteriology*, 96:2004–2011.
- Varma, V., Melin, S., Adamec, T., Dorman, B., Siegfried, J., Walton, L., Carney, C., Norton, C., und Kaufman, D. 1982. Monolayer culture of human endometrium: methods of culture and identification of cell types. *In Vitro*, 18:911–918.
- Vesterinen, E., Nedrud, J., Collier, A., Walton, L., und Pagano, G. 1980. Selection and subculture of epithelial cells from human uterine ectocervix. *Cancer Research*, 40:512–518.
- Wang, S. und Grayston, J. 1971. Classification of TRIC and related disorders with microimmunofluorescence. In *Trachoma and related disorders caused by chlamydial agents*, Seiten 305–321. Excerpta medica, Amsterdam.
- Wang, S., Kuo, C., Barnes, R., Stephens, R., und Grayston, J. 1985. Immunotyping of Chlamydia trachomatis with monoclonal antibodies. *Journal of Infectious Diseases*, 152:791–800.
- Weber, J. und Johnson, R. 1995. New treatments for Chlamydia trachomatis Genital Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 20 (Suppl.1):66–71.
- Weidner, W., Schiefer, H., und Krauss, H. 1988. Role of Chlamydia trachomatis and Mycoplasmas in Chronic Prostatitis. A Review. *Urologica Internationalis*, 43:167–173.
- Williams, D. M., Schachter, J., Weiner, M., und Grubbs, B. 1984. Antibody in host defence against mouse pneumonitis agent (murine Chlamydia trachomatis). *Infection and Immunity*, 45:674–678.
- Woworski, K., Stevens, C., Suchland, R., Holmes, K., Eschenbach, D., Pettinger, M., und Stamm, W. 1994. Clinical Manifestations of Genital Infection Due to Chlamydia trachomatis in Women: Differences Related to Serovar. *Clinical Infectious Diseases*, 19:756–760.
- Wyrick, P., Brownridge, E., und Ivins, B. 1978. Interaction of Chlamydia psittaci with mouse peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*, 19:1061–1067.
- Wyrick, P., Choong, J., Davies, C., Knight, S., Royal, M., Maslow, A., und Bagnell, C. R. 1989. Entry of genital Chlamydia trachomatis into polarized human epithelial cells. *Infection and Immunity*, 57:2378–2389.
- Yong, E., Chi, E., und Kuo, C.-C. 1987. Differential antimicrobial activity human mononuclear phagocytes against the human biovars of Chlamydia trachomatis. *Journal of Immunology*, 139:1297–1302.
- Zhang, Y., Stewart, S., Joseph, T., Taylor, H., und Caldwell, H. 1987. Protective monoclonal antibodies recognize epitopes located on the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. *Journal of Immunology*, 138:575–581.
- Zhao, Q., Schachter, J., und Stephens, R. 1993. Lack of allelic polymorphism for the major outer membrane protein gene of the agent of guinea pig inclusion conjunctivitis (Chlamydia psittaci). *Infection and Immunity*, 61:3078–3080.

Lebenslauf

Name: Neitah Prietzel-Meyer
Geburtstag: 03.09.1970 in Burgstädt
Familienstand: verheiratet, ein Kind

Schulausbildung:

September 1977–August 1987 Besuch der Polytechnischen Oberschule in
Karl-Marx-Stadt
Juli 1987 Schulabschluß, Prädikat: „Mit Auszeichnung“
September 1987–August 1989 Besuch der Erweiterten Oberschule in
Karl-Marx-Stadt
Juli 1989 Abitur, Prädikat: „Mit Auszeichnung“

Studium:

September 1990–Mai 1997 Medizinstudium an der FSU Jena
29. April 1997 Staatsexamen, Prädikat „Sehr gut“

Arbeits Erfahrung:

August 1997–Februar 1998 House Officer, Abteilung Chirurgie, Newcastle
General Hospital, England
Februar 1998–August 1998 House Officer, Abteilung Chirurgie/Urologie,
Milton Keynes General Hospital, England
August 1998–Februar 1999 House Officer, Abteilung Innere Medizin, George
Eliot Hospital, Nuneaton, England
Februar 1999–August 1999 Mutterschaftsurlaub
August 1999–Juli 2000 Senior House Officer, Abteilung für Gynäkologie
und Geburtshilfe, Mayday University Hospital,
Croydon, London, England
Seit August 2000 Senior House Officer, Abteilung für Gynäkologie
und Geburtshilfe, St. George's Hospital, Lon-
don, England

Jena, am 17. Dezember 2001

Erklärung

1. Hiermit erkläre ich, daß mir die aktuelle Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der FSU Jena bekannt ist.
2. Ich versichere, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.
3. Prof. Dr. Straube und Dr. Oehme vom Institut für Mikrobiologie der FSU Jena halfen mir bei der Auswahl des Themas und des Materials. Dr. Hartmann (ebenfalls Institut für Mikrobiologie) unterstützte mich bei der Auswertung der Versuche. Mein Mann, Erik Meyer, unterstützte mich bei der statistischen Auswertung der Versuche sowie bei der Herstellung des Manuskriptes.
4. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde durch mich nicht in Anspruch genommen. Ich habe weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen im Zusammenhang mit dieser Dissertation erhalten.
5. Diese Dissertation wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.
6. Diese Abhandlung oder Teile dieser Abhandlung wurden nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, am 17. Dezember 2001