

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

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors AP-1 für eine *Chlamydia pneumoniae* Infektion

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor rer. hum. biol.
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Christiane Radzimski, geb. Jugert
aus Nordhausen

betreut von
Prof. Dr. med. Jan Rupp

Lübeck 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jan Rupp

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Jürgen Luhm

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2011

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 20.07.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	iv
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Chlamydien	3
2.1.1 Taxonomie	4
2.1.2 Chlamydien-assoziierte Krankheiten	5
2.1.3 Entwicklungszyklus	7
2.1.4 Chlamydia Protease-like Activity Factor (CPAF)	9
2.1.5 Morphologie und Eigenschaften	9
2.1.6 Persistenz	11
2.1.7 Chlamydieninfektion von Monozyten	12
2.1.8 Chlamydien regulieren Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle .	12
2.2 Der Transkriptionsfaktor AP-1	13
2.2.1 Aufbau von AP-1	14
2.2.2 Regulation der AP-1 Aktivität	16
2.2.3 Biologische Bedeutung von AP-1	18
2.3 Zielsetzung	21
3 Materialien	23
3.1 Zelllinien	23
3.2 Laborgeräte	23
3.3 Labor- und Verbrauchsmaterialien	25
3.4 Chemikalien	26
3.5 Medien und Medienzusätze	28
3.6 Kits	29
3.7 Antikörper	29
3.7.1 Antikörper für Western Blot	29
3.7.2 Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen	30
3.8 Primer	30
3.9 Zellkulturmedien	31
3.10 Puffer und Lösungen	31
3.11 Software	33
4 Methoden	34
4.1 Zellkultur	34
4.1.1 Anzucht von HEp-2 Zellen	34
4.1.2 Anzucht von HEK293 T-REx Zellen und Induktion der CPAF- Expression	35

4.1.3	Isolierung von Monozyten aus Buffy Coat	35
4.1.4	Einfrieren einer Zellkultur	36
4.2	Zellzahlbestimmung	36
4.3	Infektionsbiologische Methoden	37
4.3.1	Herstellung eines Infektionsstocks von <i>Cpn</i>	37
4.3.2	Infektion von HEp-2 Zellen mit <i>Cpn</i>	38
4.3.3	Infektion von Monozyten mit <i>Cpn</i>	38
4.3.4	Berechnung des Chlamydien-Gehalts	39
4.3.5	Wiederanzucht	39
4.4	Direkter Immunfluoreszenztest	40
4.5	Indirekter Immunfluoreszenztest	41
4.6	Bestimmung der Zellvitalität	41
4.7	MTT-Assay	42
4.8	Vorbereitungen für EM-Aufnahmen	42
4.9	Proteinbiochemische Methoden	43
4.9.1	Probenaufarbeitung	43
4.9.2	Degradations Assay	43
4.9.3	SDS-PAGE	44
4.9.4	Western Blot	45
4.10	Herstellung von Kernextrakten	47
4.11	EMSA - electrophoretic mobility shift assay	48
4.11.1	Herstellung einer AP-1 Sonde	48
4.11.2	Radioaktive Markierung der Kernproteine	49
4.11.3	Gelelektrophorese von DNA-Protein-Komplexen in nativen PAA-Gelen	50
4.12	Messung des ATP-Gehalts	50
4.13	Molekularbiologische Methoden	51
4.13.1	RNA-Isolation	51
4.13.2	Reverse Transkriptase-PCR	51
4.13.3	Real-time PCR	53
4.13.4	Transiente Transfektion	53
4.13.5	In vitro Transkription/Translation (IVTT)	54
4.13.6	Transformation von <i>E.coli</i> Zellen	55
4.13.7	Isolation von Plasmid-DNA	56
4.13.8	Bestimmung der DNA-Konzentration	56
4.14	Statistik	57
5	Ergebnisse	58
5.1	AP-1 Proteine werden in der frühen Phase der akuten <i>C. pneumoniae</i> Infektion hochreguliert	58

5.2	AP-1 Proteine sind in der mittleren Phase der Infektion nicht reguliert	62
5.3	AP-1 Proteine sind in der späten Phase der akuten <i>C. pneumoniae</i> Infektion unterschiedlich reguliert	64
5.4	Auswirkungen von AP-1 Inhibitoren auf die akute <i>C. pneumoniae</i> Infektion	66
5.4.1	Ermittlung der idealen Tanshinone IIA Konzentration	66
5.4.2	Verminderte AP-1 Bindungsaktivität durch Tanshinone IIA	68
5.4.3	Veränderte Morphologie der <i>C. pneumoniae</i> Einschlusskörperchen durch AP-1 Inhibition	70
5.4.4	Wiederanzucht von <i>C. pneumoniae</i> nach Tanshinone IIA Inkubation nicht möglich	74
5.4.5	Reversibilität der Tanshinone IIA induzierten Persistenz	75
5.4.6	Verminderter ATP-Gehalt in Tanshinone IIA behandelten Zellen	78
5.4.7	Einfluss von Tanshinone IIA auf die mRNA-Expression von Glut1	79
5.5	Analyse der AP-1 Regulation in Zytoplasma- und Kernproteinfraktionen	80
5.6	Abbau von AP-1 Proteinen	83
5.7	AP-1 Proteine werden durch die chlamydiale Protease CPAF degradiert	85
5.8	CPAF Induktion in stabil transfizierten HEK293 Zellen	86
5.9	Eine c-Jun Überexpression hat keine Auswirkung auf die Morphologie und die Wiederanzucht von <i>C. pneumoniae</i>	88
5.10	Regulation von AP-1 Proteinen in <i>C. pneumoniae</i> infizierten Monozyten	90
6	Diskussion	95
6.1	AP-1 reguliert für <i>C. pneumoniae</i> relevante zelluläre Prozesse	95
6.2	Rolle von AP-1 im Verlauf der akuten <i>C. pneumoniae</i> Infektion	96
6.3	AP-1 Proteine - neu identifizierte Targets von CPAF	100
6.4	Auswirkungen einer AP-1 Blockierung auf die Entwicklung von <i>C. pneumoniae</i>	102
6.4.1	Auswirkungen der AP-1 Inhibition auf die Morphologie von <i>C. pneumoniae</i>	104
6.4.2	Auswirkungen der AP-1 Inhibition auf den Energiehaushalt	104
6.5	Regulation von AP-1 Proteinen in <i>C. pneumoniae</i> infizierten Monozyten	107
	Literaturverzeichnis	125
	Abbildungsverzeichnis	127
	A Danksagung	128
	B Publikationen	130
	C Kongressbeiträge	130
	D Lebenslauf	131
	E Erklärung	133

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
AB	Antibiotika
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American type culture collection
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bZIP	basische Leucin-Zipper
CIITA	Class II transactivator
cDNA	Komplementäre DNA
COMC	Chlamydial outer membrane complex
CPAF	Chlamydia Protease-like Activity Factor
<i>Cpn</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
Ct	Cycle of Threshold
DG	Deckgläschen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
Egr-1	Early growth response-1
EK	Elementarkörperchen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunoabsorbent Assay
EM	Elektronenmikroskopie
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälber Serum
FZ	Forschungszentrum
h	Stunde (hour)
HEp-2	humane epitheliale Zellen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanosulfonsäure
hpi	hours past infection
HRP	Horseradish peroxidase

IFN γ	Interferon gamma
IFT	Immunfluoreszenztest
IFU	Inclusion forming unit
IL	Interleukin
IVTT	In vitro Transkription Translation
JNK	c-Jun-N-terminale-Kinase
kDa	kiloDalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBq	Mega-Becquerel
MEM	Minimal Essential Medium
MHC	Major histocompatibility complex
MOMP	Major outer membrane protein
mRNA	Messenger-RNA
NDGA	Nordihydroguaiaretic acid
NEAA	Nichtessentielle Aminosäuren
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RK	Retikularkörperchen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Chain Reaction
SAPK	Stress activated protein kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRF	Serum response factor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TLR	Toll-like-Rezeptor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRE	TPA response element
U	Unit-Einheit
u.a.	unter anderem
USF-1	upstream stimulatory factor
VSMC	Vascular smooth muscle cell

1 Zusammenfassung

Chlamydia pneumoniae (*Cpn*) ist ein bedeutendes humanpathogenes Bakterium, das sich durch seine obligat intrazelluläre Lebensweise und den biphasischen Entwicklungszyklus auszeichnet. Da Chlamydien einen unvollständigen Energiestoffwechsel haben und ATP über einen ADP/ATP Austausch von ihrer Wirtszelle beziehen, gehören sie zu den Energieparasiten. Zudem sichern Chlamydien durch Induktion der Proliferation und Inhibition apoptotischer Signalwege in der infizierten Zelle ihr eigenes Überleben.

AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor der Wirtszelle, der eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Zellproliferation, der Apoptose und des Energiehaushalts hat und somit genau die Prozesse steuert, in die *Cpn* eingreift. Die Zusammensetzung des dimeren Proteins AP-1 kann sich ändern, wodurch maßgeblich die unterschiedlichen Funktionen von AP-1 bedingt sind. Das Ziel dieser Arbeit war die Klärung, ob AP-1 durch *Cpn* reguliert wird und welche Funktionen dieser Transkriptionsfaktor in infizierten Wirtszellen hat.

Im Zuge der Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es in der frühen Phase der Infektion (4 hpi) sowohl durch lebende als auch inaktivierte *Cpn* zu einer erhöhten Expression von AP-1 in epithelialen HEP-2 Zellen kommt. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die AP-1 Bindungsaktivität durch die *Cpn*-Infektion verstärkt ist, womit bestätigt wurde, dass AP-1 in der frühen Phase der Infektion im Kern aktiv ist und an die Promotorsequenz bindet.

In der späten Phase der Infektion (48 und 72 hpi) wurden erhöhte Mengen der Proteine c-Jun und c-Fos detektiert, die zusammen einen sehr starken heterodimeren Transaktivator bilden können. Zudem wurde durch den Nachweis von phosphoryliertem c-Jun gezeigt, dass in infizierten Zellen die aktivierte Form vorliegt. Im Gegensatz dazu waren die AP-1 Proteine JunB, JunD, FosB und ATF-2 im Vergleich zu den Kontrollzellen herunterreguliert. In der späten Phase der Infektion wurde außerdem eine erhöhte mRNA-Menge des Glucosetransporters Glut1 nachgewiesen, das zu den AP-1 kontrollierten Proteinen zählt. Auf diese Weise könnte sichergestellt werden, dass die Zelle genügend Glucose aufnehmen kann und für die Entwicklung der Chla-

mydrien genügend ATP zur Verfügung steht.

Um zu klären welche Bedeutung die Hochregulation von AP-1 während einer *Cpn*-Infektion hat, wurde mit Hilfe des Inhibitors Tanshinone IIA die Bindung von AP-1 an die Konsensussequenz innerhalb der Promotoregion blockiert. Das Resultat der AP-1 Inhibition war, dass *Cpn* nur sehr kleine Einschlusskörperchen ausbilden konnte, die Menge an Glut1 nicht mehr erhöht und der ATP-Gehalt wesentlich verringert war. In dieser Arbeit wurde zudem erstmals gezeigt, dass die Inhibition von AP-1 zur Persistenz der Infektion führte, da alle Merkmale der Persistenz nachweisbar waren. Dazu zählt zum einen die veränderte Morphologie, d.h. es waren kleine Einschlüsse, in denen keine Redifferenzierung der Retikularkörperchen zu infektiösen Elementarkörperchen stattfand, nachweisbar. Zum anderen wurde gezeigt das eine Wiederanzucht aus Zellen, bei denen AP-1 inhibiert wurde, nicht möglich ist. Ein weiteres Persistenzmerkmal, welches bei der AP-1 Inhibition gezeigt werden konnte, ist die Reversibilität, d.h. dass das Entfernen des Induktors die Persistenz aufhebt.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls entdeckt, dass AP-1 ein Zielprotein von CPAF ist. Wie genau dieses chlamydiale Effektorprotein den Transkriptionsfaktor degradiert ist noch nicht hinreichend aufgeklärt.

Des Weiteren wurden infizierten Monozyten auf eine AP-1 Regulation untersucht. Es hat sich herausgestellt, dass in Monozyten, in denen der Erreger im Gegensatz zu den Epithelzellen persistiert, alle nachgewiesenen AP-1 Proteine verstärkt detektierbar waren.

Somit lässt sich schlussfolgern, dass AP-1 bei einer *Cpn*-Infektion eine wesentliche Rolle einnimmt, da zum einen eine starke Regulation nachgewiesen werden konnte und zum anderen durch Inhibition von AP-1 die Persistenz von *Cpn* induziert wurde. Auch bei der natürlichen Persistenz von *Cpn* in Monozyten ist dieser Transkriptionsfaktor hochreguliert, wobei die spezifische funktionelle Relevanz in diesem Zelltyp noch unklar ist.

Die Erkenntnisse über die Einflüsse von AP-1 auf eine *Cpn*-Infektion können in Zukunft bei der Erforschung von therapeutischen Maßnahmen von Bedeutung sein. Hierzu sind jedoch noch weitere Untersuchungen der vom Zelltyp abhängigen Funktion von AP-1, insbesondere die Rolle bei der Apoptose, nötig.

2 Einleitung

2.1 Chlamydien

Chlamydien sind gramnegative, obligat intrazelluläre Bakterien, die sich durch einen speziellen Entwicklungszyklus auszeichnen. Ein erster Nachweis von Chlamydien wurde im Jahr 1907 von Stanislaus von Prowazek und Ludwig Halberstaedter erbracht. Sie konnten in den Zellen der Konjunktivalabstriche von Patienten mit Trachom charakteristische, mit Giemsa-Lösung anfärbbare Einschlusskörperchen nachweisen. Sir Samuel Phillips Bedson beschrieb bereits 1934 die morphologischen Veränderungen von Chlamydien während des Entwicklungszykluses bei einer typischen Chlamydien-assoziierten Erkrankung, der Psittakose (Papageienkrankheit). Jedoch nahm er an, dass es sich dabei um einen Virus, den sog. „psittacosis virus“, handelt [21]. Aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer rein intrazellulären Vermehrung wurden Chlamydien bis in die 1960er Jahre hinein den Viren zugerechnet. Diese Hypothese wurde widerlegt als gezeigt wurde, dass sowohl bakterielle RNA als auch DNA und Zellwandstrukturen vorhanden sind. Zudem wurde entdeckt, dass Chlamydien in der Lage sind sich binär zu teilen, Ribosomen besitzen und gegenüber Antibiotika empfindlich sind. 1966 wurden sie schließlich als eigene Ordnung *Chlamydiales* den Bakterien zugerechnet ([114],[154]). Sie sind weltweit verbreitet und können eine Reihe unterschiedlichster Krankheiten hervorrufen. Chlamydien verursachen Infektionen des Auges, der Lunge und des Genitaltraktes. Sie werden aber auch mit chronischen Erkrankungen wie z.B. koronaren Herzerkrankungen, Arteriosklerose oder Asthma in Verbindung gebracht. Die Aufklärung ihrer pathogenen Eigenschaften ist daher von großem Interesse. *Chlamydia pneumoniae* wurden 1965 erstmals aus dem Konjunktivalabstrich eines Kindes aus Taiwan isoliert und später als TW-183 bezeichnet [99]. 1983 wurde das erste respiratorische Isolat (AR-39) von einem Universitätsstudenten aus Seattle mit einer akuten respiratorischen Infektion isoliert. Die Bezeichnung „TWAR“ leitet sich aus diesen beiden Isolaten ab und wurde bis 1989 verwendet, dann aber ersetzt durch *Chlamydia pneumoniae* [67]. Zu den wichtigsten tierpathogenen Erregern gehören *Chlamydia abortus*, *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pecorum*. Sie sind für Pneumonien, Fehlgeburten und Unfruchtbarkeit bei Rindern und Schafen verantwortlich

([89],[134]) und verursachen somit jedes Jahr einen erheblichen wirtschaftlichen Schaden.

2.1.1 Taxonomie

Chlamydien gehören zur Ordnung der *Chlamydiales*, die die Familien *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae* umfaßt. Im Gegensatz zu den *Chlamydiaceae* leben die Vertreter der *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae* als Symbionten in Amöben ([7],[59],[78]). Die Abbildung 1 zeigt die Taxonomie der Ordnung *Chlamydiales*, wobei für die einzelnen Spezies der Familie *Chlamydiaceae* auch typische Wirtsorganismen angegeben sind.

Durch phylogenetische Analysen der 16S und 23S rRNA wurden die verwandtschaftlichen Beziehungen aufgeklärt und führten zu einer überarbeiteten Taxonomie [48]. Die bekannten human- und tierpathogenen Arten gehören zur Familie der *Chlamydiaceae*, die in die Gattungen *Chlamydophila* und *Chlamydia* unterteilt werden. Die neue Taxonomie konnte sich bisher noch nicht durchsetzen, weshalb in der Literatur weiterhin für die Spezies *Chlamydophila pneumoniae* und *Chlamydophila psittaci* parallel auch die Namen *Chlamydia pneumoniae* bzw. *Chlamydia psittaci* existieren. In dieser Arbeit wurde durchgehend die Bezeichnung *Chlamydia pneumoniae* verwendet.

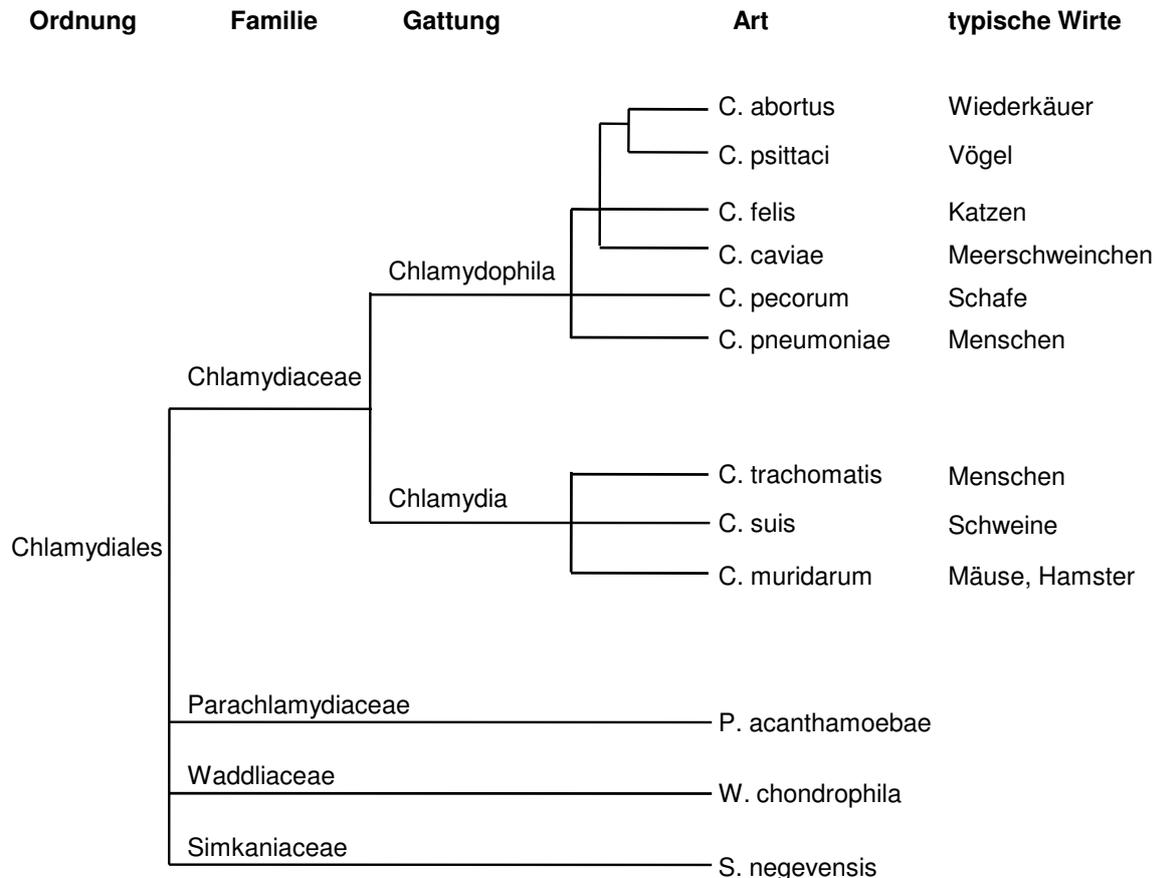


Abb. 1: Taxonomie der Chlamydiales (nach Bush und Evert [31]). Schematische Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse unter den einzelnen Spezies sowie der typischen Wirtsorganismen. Die Länge der Linien entspricht nicht der phylogenetischen Distanz zueinander.

2.1.2 Chlamydien-assoziierte Krankheiten

Chlamydien sind weltweit verbreitet und kommen sowohl als humanpathogene wie auch als tierpathogene Erreger vor. Die derzeit wichtigsten humanpathogenen Arten sind *Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia trachomatis*. Auch *Chlamydia psittaci* ist als humanpathogener Erreger beschrieben, wobei diese Art vorrangig Vögel und andere Säugetiere infiziert [22].

2.1.2.1 *Chlamydia pneumoniae* *C. pneumoniae* ist ein wichtiges humanpathogenes Bakterium, das akute und chronische Infektionen des respiratorischen Trakts

verursacht. Da sowohl obere als auch untere Atemwege betroffen sein können, äußert sich die Infektion in verschiedenen Krankheitsbildern wie Pharyngitis, Sinusitis, Bronchitis und Pneumonie ([66] [35]). Dies erklärt sich aus der Fähigkeit des Erregers, Epithelien des Respirationstraktes zu infizieren [83]. Die Mehrheit der Infektionen verläuft überwiegend asymptomatisch, wobei die Erstinfektion im Jugendalter erfolgt. Bis zu einem Alter von 20 Jahren sind fast 70% aller Erwachsenen seropositiv für *C. pneumoniae* [97]. Infektionen mit tödlichem Ausgang werden nur selten beobachtet. Sie treten vorwiegend bei Immunsupprimierten und älteren Patienten auf. Des Weiteren wird *C. pneumoniae* in Verbindung mit Asthma bronchiale und der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) – den beiden häufigsten chronischen Atemwegserkrankungen des Menschen – gebracht. In sehr seltenen Fällen wurde eine Endokarditis, Myokarditis, Meningoradikulitis, Erythema nodosum oder reaktive Arthritis durch *C. pneumoniae* verursacht. Ob *C. pneumoniae* bei Arteriosklerose und koronarer Herzkrankheit eine Rolle spielt, wird immer noch kontrovers diskutiert. Einige Autoren sind der Meinung, dass die chronische Infektion mit *C. pneumoniae* zum Fortschreiten der Arteriosklerose und der koronaren Herzkrankheit beiträgt ([34],[140]).

2.1.2.2 *Chlamydia trachomatis* Bei *C. trachomatis* werden verschiedene Serovare unterschieden, die unterschiedliche Erkrankungen auslösen. Die Serovare A-C verursachen das Trachom ([29],[30]). Dies ist eine Entzündung der Bindehaut und der Hornhaut des Auges, die vor allem in Entwicklungsländern die häufigste infektiöse Erblindungsursache darstellt [61]. Infektionen mit den Serovaren D-K sind weltweit die häufigste Ursache für sexuell übertragbare Krankheiten [164]. Viele dieser Infektionen verlaufen zunächst asymptomatisch und bleiben daher unbehandelt. Dies kann zu chronischen Verlaufsformen führen mit gravierenden Folgen wie Tubenverschlüssen und stellt den häufigsten Grund ungewollter Kinderlosigkeit aufgrund einer Infektion bedingten Infertilität der Frauen dar ([53],[166],[158]). Die Serovare L1-L3 infiziert das lymphatische Gewebe der Anogenitalregion und kann so das Lymphogranuloma venereum (LGV) verursachen [168]. LGV kommt weltweit vor und ist überwiegend in Ost- und Westafrika, Südostasien, Südamerika und der Karibik endemisch. Die

Krankheit wird zu den klassischen Geschlechtskrankheiten gezählt, da die Übertragung sexuell erfolgt. Bei LGV handelt es sich um eine chronisch verlaufende Infektion bei der es zu schmerzhaften Schwellungen der Lymphknoten kommt.

2.1.3 Entwicklungszyklus

Allen Spezies der Familie der *Chlamydiaceae* ist der einzigartige biphasische Entwicklungszyklus gemein, der schematisch in Abbildung 2 skizziert ist.

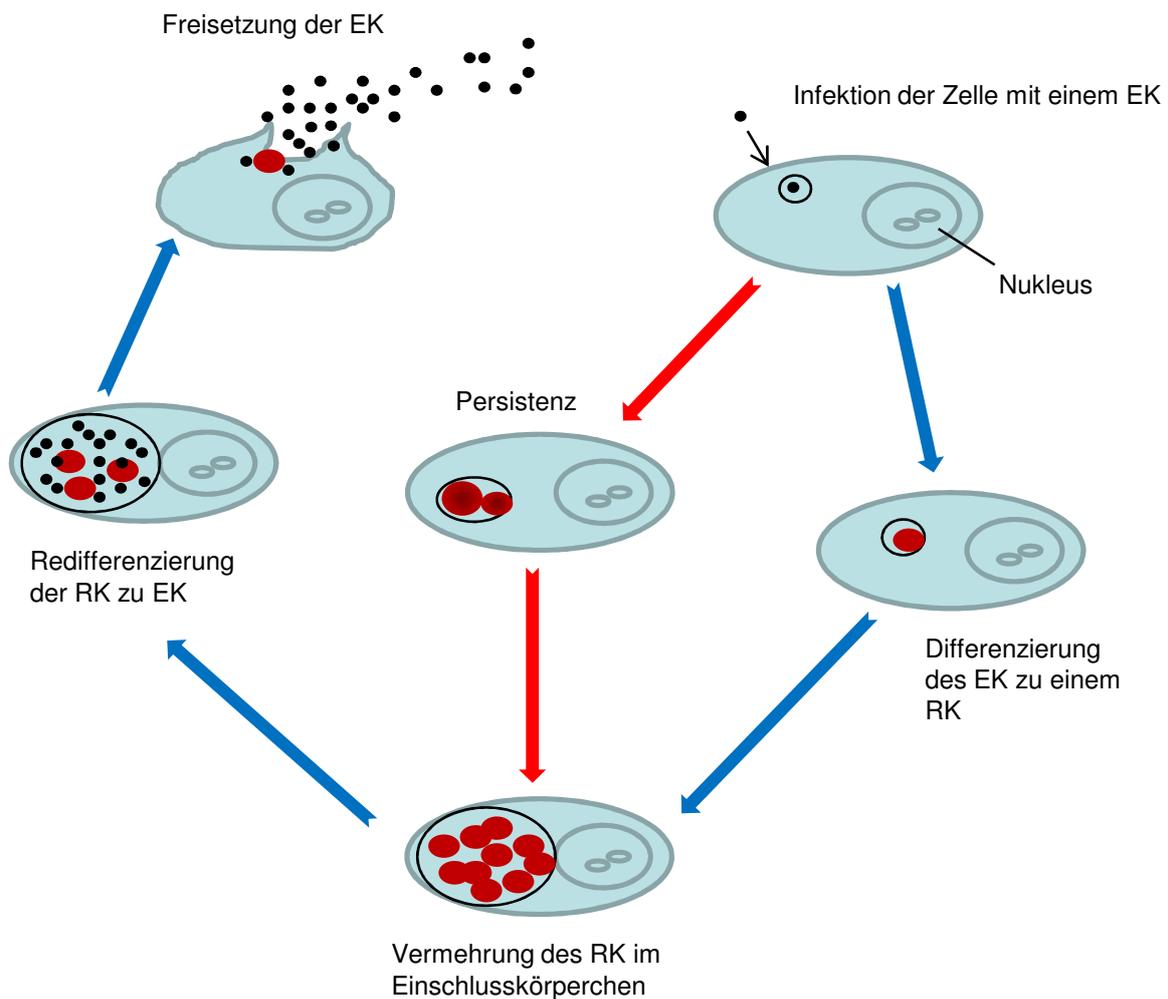


Abb. 2: Biphasischer Entwicklungszyklus von Chlamydien Die Zyklusdauer beträgt bei *C. pneumoniae* 72-96 Stunden. Der mit blauen Pfeilen dargestellte Zyklus beschreibt den Ablauf einer akuten Infektion. Die Infektion kann aber auch in einen persistenten Zustand übergehen (rote Pfeile) und von der Persistenz in den akuten Infektionszyklus wieder eintreten. Die Elementarkörperchen (EK) sind in Schwarz und die Retikularkörperchen (RK) in Rot dargestellt.

Der Zyklus beginnt mit der Infektion der Wirtszelle mit einem sog. Elementarkörperchen (EK), das eine Größe von ca. $0,3\ \mu\text{m}$ hat und metabolisch inaktiv ist ([2],[115]). Die EK sind für die Verbreitung der Infektion verantwortlich. Nur sie können außerhalb der Zelle überleben und werden durch Phagozytose und/oder Rezeptorvermittelter Endozytose aufgenommen. Die Aufnahme erfolgt über Clathrin- oder Caveolin- vermittelte Wege oder auch über sog. *lipid rafts* ([155],[174]). Nach der Adhäsion an die Wirtszelle werden über ein chlamydiales Typ-III-Sekretionssystem verschiedene Effektorproteine zur Modulation der Wirtszelle eingeschleust. Eines dieser Proteine ist „Tarp“ [38] was „translocated actin-recruiting phosphoprotein“ bedeutet. Dieses Protein wird nach der Translokation an seinen Tyrosinresten phosphoryliert, wodurch es zur Rekrutierung von Aktin kommt. Darauf folgt eine Aktin-Reorganisation in der Wirtszelle und es kommt zur bakteriellen Aufnahme ([36],[84]). Ein weiteres wichtiges chlamydiales Effektorprotein ist CPAF, das im nächsten Abschnitt näher beschrieben wird.

Anfangs besitzen die EK noch ihre charakteristische Größe und eine kondensierte DNA. Bereits wenige Stunden nach der Infektion dekontensiert die DNA und es findet eine Größenzunahme statt [175]. Dabei modifizieren die Bakterien die Membran des sie umgebenden vesikulären Kompartiments, der Inklusion. Sie verhindern so die Fusion mit Lysosomen [144]. Gleichzeitig stellen sie die Zufuhr von notwendigen Bausteinen wie Sphingolipide durch Interaktion mit dem Golgi-Apparat sicher ([69],[75]). Andere Metabolite werden zur Komplettierung des unvollständigen Krebs-Zyklus über Transporter aufgenommen ([70],[162]). Die EK differenzieren sich in der Inklusion zu Retikularkörperchen (RK), die eine Größe von $0,8 - 1,5\ \mu\text{m}$ haben. Diese sind nicht infektiös aber metabolisch aktiv und stellen die sich replizierende Form dar, die sich am Ende des Zyklus wieder zu EK redifferenzieren. Je nach Chlamydienspezies beginnt 20 bis 48 h nach der Infektion die Redifferenzierung zu den infektiösen EK. Nach der Lyse der Wirtszellen werden die EK freigesetzt und können neue Zellen infizieren [81]. Neben der Zellyse beschrieben Hybiske und Stephens einen weiteren Mechanismus zur Freisetzung der EK [81]. Sie konnten beobachten, dass die gesamte Inklusion aus der Wirtszelle in den extrazellulären Raum abgesondert werden kann. Dieser Mechanismus wurde von ihnen als „Extrusion“ bezeichnet. Die Wirtszelle bleibt

nach dem Abschnüren der Inklusion intakt.

2.1.4 Chlamydia Protease-like Activity Factor (CPAF)

Zum Schutz vor der zellulären Immunantwort der Wirtszelle sekretieren Chlamydien eine Protease, die u.a. die Transkriptionsfaktoren USF-1 und RFX5 abbaut ([182],[74]). Durch die Degradation von USF-1 verhindern sie die Expression von CIITA. Dieses Protein ist wiederum essentiell für die Expression von MHC-Klasse-II-Proteinen [183], d.h. die Antigenpräsentation der infizierten Wirtszelle ist beeinträchtigt. Die Protease ähnliche Aktivität ist auf das chlamydiale Protein CPAF (Chlamydia Protease-like Activity Factor) zurückzuführen. Durch die Degradation des Transkriptionsfaktors RFX5 wird die Expression von MHC-Klasse-I-Proteinen inhibiert ([184], [182]). Neben diesen beiden Transkriptionsfaktoren sind noch weitere zelluläre Proteine als Target von CPAF beschrieben. Zhong et al. konnten die Proteaseaktivität von CPAF im Zytosol der Wirtszelle nachweisen. In *C. trachomatis* ist die für CPAF kodierende Sequenz identifiziert. Sie kodiert ein Protein, das in der Inklusion synthetisiert und kurz darauf in zwei Untereinheiten prozessiert wird. Deshalb werden beim Nachweis von CPAF im Westernblot hauptsächlich zwei Fragmente, CPAFn (29 kDa) und CPAFc (35 kDa), detektiert. Dong et al. konnten zeigen, dass für die Proteaseaktivität beide CPAF-Fragmente miteinander interagieren müssen [42].

2.1.5 Morphologie und Eigenschaften

Chlamydien weisen eine den gramnegativen Bakterien ähnliche Zellwand auf. Sie besitzen eine innere und eine äußere Membran, welche unter anderem LPS und verschiedene Oberflächenproteine (outer membrane proteins, OMPs) enthält ([161],[49]). Das chlamydiale LPS unterscheidet sich vom LPS der Enterobakterien durch seine relativ schwache endotoxische Aktivität ([28],[71]). Erstaunlicherweise konnte bei Chlamydien bisher noch kein Peptidoglykan nachgewiesen werden ([62],[73]), obwohl die genomischen Anlagen dafür vorhanden sind. In der äußeren Zellmembran macht das Major Outer Membrane Protein (MOMP), ein 40 kDa Protein, mit einem Anteil von 61% den Hauptbestandteil der chlamydialen Außenmembrankomplexe (Chlamydial outer membrane complex - COMC) aus [33]. Neben MOMP sind die Proteine OmcA und

OmcB ebenfalls Bestandteil des COMCs [50]. Beide Proteine sind wie MOMP auch cysteinreich und über Disulfidbrücken miteinander vernetzt. Durch die so entstehende Vernetzung wird eine sehr stabile Struktur gebildet, die den EK ihre Rigidität und osmotische Stabilität verleiht [49]. Extrachromosomale DNA (Plasmide) findet man bei allen Chlamydien-Arten [163]. Die Genomgröße beträgt für *C. pneumoniae* ca. 1,2 Mio. Basenpaare und ist unter den Bakterien eines der kleinsten Genome [133]. Die geringe Größe ist vor allem durch das intrazelluläre bzw. parasitäre Wachstum zu erklären. Charakteristisch für Chlamydien ist außerdem ihr defekter Energiestoffwechsel. Sie sind aufgrund der fehlenden Eigensynthese von Nukleotiden, z.B. ATP, obligat auf den Metabolismus von eukaryontischen Zellen als Nukleotidquelle angewiesen und werden aus diesem Grund als Energieparasiten bezeichnet [176]. Im Genom ist das Gen für das ubiquitäre Enzym Phosphoribosylpyrophosphat-Synthase, welches eine zentrale Rolle im Nukleotidstoffwechsel von Pro- und Eukaryoten besitzt, nicht vorhanden. Chlamydien können demnach ihre eigene RNA- bzw. DNA-Synthese nur durch die Aufnahme von Nukleotiden aus dem Cytosol der Wirtszelle bewerkstelligen. Durch den Besitz eines ADP/ATP-Transporters sind Chlamydien in der Lage, ATP im direkten Gegentausch mit endogenem ADP zu importieren und damit den cytosolischen ATP-Pool der eukaryotischen Wirtszelle auszubeuten [82]. Es wird angenommen, dass ihre eigene ATP-Synthese nicht zum Überleben ausreicht. Genomanalysen haben gezeigt, dass auch Gene, die für Enzyme der Glykolyse und des Elektronentransportsystems kodieren, im chlamydialen Genom vorhanden sind.

Eine weitere Besonderheit von Chlamydien ist, dass sie die Apoptose, den programmierten Zelltod, der Wirtszelle verzögern können ([130],[68]). Fan et al. zeigten, dass es in Chlamydien infizierten Zellen, die mit verschiedenen Apoptose induzierenden Reagenzien (z.B. Staurosporin und TNF- α) behandelt wurden, zu einer verzögerten Apoptose der Wirtszelle kommt [52]. Andere Studien zeigen, dass die proapoptotischen „BH3-only“ Proteine während einer *C. pneumoniae* Infektion abgebaut werden ([55],[56]). Es gibt jedoch auch Studien, die zeigen, dass in einigen Fällen durch eine Chlamydien Infektion Apoptose induziert werden kann ([63],[118]). Ob Apoptose induziert oder inhibiert wird, hängt ganz entscheidend davon ab, zu welchem Zeitpunkt des chlamydialen Entwicklungszyklus die Zellen ein Apoptose induzierendes

Signal erhalten und wie hoch die Infektionsdosis mit Chlamydien ist. Wenn die Zellen in der frühen Phase der Infektion ein Apoptose auslösendes Agens erhalten, so sind die Chlamydien in der Lage die Apoptose zu verzögern. Erhalten sie dieses Signal erst in der späten Phase des chlamydialen Entwicklungszyklus führt dies allerdings zur Apoptose der Wirtszelle. Des Weiteren hängt die Fähigkeit die Apoptose der Wirtszellen zu verzögern davon ab, welche Chlamydienart die Infektion verursacht bzw. welcher Zelltyp betroffen ist [111].

2.1.6 Persistenz

Alternativ zu dem beschriebenen Zyklus kann die Infektion auch in einem Persistenzstadium verharren, was zu chronischen Infektionen führen kann, wobei angenommen wird, dass die Erreger monate- oder jahrelang in der Wirtszelle verweilen. Persistenz kann durch verschiedene Bedingungen induziert werden und führt zu chlamydialen Lebensformen mit stark veränderter Morphologie. In vitro Studien zeigten, dass zum Beispiel durch Behandlung der Zellen mit IFN- γ ([20],[120]), durch Eisenentzug ([132],[126]) aber auch durch bestimmte Antibiotika ([45],[64]) Persistenz induziert werden kann. Bei der Behandlung der Zellen mit IFN- γ wird die Aktivität des Enzyms Indol-Amino 2,3-Dioxygenase (IDO) erhöht. Dadurch kommt es zu einem schnellen Abbau von L-Tryptophan, was zu einem Mangel an dieser Aminosäure führt [108]. Da Chlamydien L-Tryptophan nicht selbst synthetisieren können, führt der Mangel dieser Aminosäure zur Persistenz. In allen Fällen der Persistenz bilden sich atypische Formen der Einschlüsse, d.h. die Inklusionen sind wesentlich kleiner. Da nur einige wenige Replikationszyklen durchlaufen werden, sind nur wenige Retikularkörperchen (RK) nachweisbar. Die RK werden größer als im replikativen Zyklus, jedoch das gesamte Einschlusskörperchen ist sehr viel kleiner in der Persistenz. Eine Redifferenzierung zu Elementarkörperchen findet nicht statt, so dass eine direkte Anzucht von persistierenden Chlamydien nicht möglich ist. Chlamydien können auf unbestimmte Zeit in der persistenten Lebensform verbleiben. Nach Wegfall der Persistenz-Stimuli (z.B. durch das Entfernen von IFN- γ oder die Zufuhr von L-Tryptophan) können sie den Persistenzzustand verlassen und wieder in den replikativen Entwicklungszyklus eintreten [77]. Im Zustand der Persistenz sind Chlamydien unempfindlich gegenüber

Antibiotika und ihr Metabolismus ist auf das Nötigste beschränkt. Interessanterweise wird die Wirtszellfunktion während der Infektion kaum gestört, was das stumme und chronische Krankheitsbild erklärt. Unklar ist ob die persistierende Form der Infektion eine bedeutende Rolle in der Pathogenese bestimmter chronischer Krankheiten beim Menschen, wie beispielsweise Atherosklerose, Asthma und Arthritis spielt.

2.1.7 Chlamydieninfektion von Monozyten

Vermutlich sind Monozyten für die Verbreitung von Chlamydien im menschlichen Organismus verantwortlich. Der Erreger kann in Monozyten persistieren weshalb diese Wirtszellen als Vektoren von Chlamydien angesehen werden. Airene et al. zeigten durch Elektronenmikroskopie, dass *C. pneumoniae* in Monozyten nur sehr kleine aberrante Einschlüsse aufweist und nur wenige abnormale RK beinhaltet [5]. Es konnte auch gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* in den infizierten Monozyten metabolisch aktiv ist. Im Lungenepithel tritt *C. pneumoniae* mit Alveolarmakrophagen und in den Kapillaren mit zirkulierende Monozyten bzw. PBMC in Kontakt [138]. Die Zellen nehmen die Erreger auf und verteilen sie so mit dem Blutstrom systemisch im gesamten Körper. Granulozyten gelten ebenfalls als Reservoir für *C. pneumoniae* und sind an der Disseminierung beteiligt [65]. Die persistente Infektion dieser Zellen und die systemische Verbreitung gelten als wesentlicher Faktoren für die Auslösung chronischer Krankheitsverläufe. Die Monozyten haften sich z.B. an Gefäßwänden fest und differenzieren sich zu Gewebsmakrophagen. Die Ansiedlung kann jedoch auch in Gelenken, glatten Muskelzellen und andern Geweben stattfinden [24]. Die Gewebsmakrophagen können hier über längere Zeit überleben, wodurch Reaktive Arthritis, Endokarditis und koronare Herzkrankheit bedingt sein können. Diskutiert wird die Beteiligung der Chlamydien tragenden Monozyten bzw. Makrophagen am atherosklerotischen Entzündungsprozess, da durch sie *C. pneumoniae* in die entstehenden atherosklerotischen Plaques gelangt ([34],[98],[100],[104]).

2.1.8 Chlamydien regulieren Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle

Chlamydien sichern ihr eigenes Überleben, indem sie in zelluläre Regulationsmechanismen ihrer Wirtszelle eingreifen. Die von den Chlamydien ins Zytoplasma sezern-

nierte Protease CPAF degradiert die Transkriptionsfaktoren RFX5 und USF-1 und reguliert so die MHC-I und -II vermittelte Antigenpräsentation herab ([182], [51],[74]). Des Weiteren wurde in vitro gezeigt, dass die Infektion von Endothelzellen oder glatten Muskelzellen durch *C. pneumoniae* zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt. Dies wiederum bewirkt die Freisetzung von inflammatorischen und prokoagulatorischen Mediatoren. NF- κ B ist in der Lage proinflammatorische Zytokine, wie IL-6, IL-8 und das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) zu aktivieren.

Es wurden Hinweise dafür erbracht, dass Chlamydien über die Triggerung von Transkriptionsfaktoren die Zellen des Bronchialgewebes zu aktivieren vermögen, und diese dann ihrerseits durch Zytokinfreisetzung und Hochregulation von Adhäsionsmolekülen einen zellulären Influx in die Luftwege befördern. Chlamydien induzieren auch die Transkriptionsfaktoren Egr-1 und Ets-1, wodurch es zur Proliferation der infizierten Wirtszelle kommt, da eine gesteigerte Transkription von VEGF und Endothelin ausgelöst wird ([19],[137]). Der Transkriptionsfaktor AP-1 reguliert ebenfalls die Proliferation und Differenzierung der Zelle aber auch die Apoptose und das Zellüberleben. In diese Prozesse greift *C. pneumoniae* ein um den Entwicklungszyklus zu durchlaufen. In Bezug auf eine Infektion mit *C. pneumoniae* wurde AP-1 bisher in keiner vergleichbaren Arbeit charakterisiert.

2.2 Der Transkriptionsfaktor AP-1

AP-1 (Aktivator Protein-1) ist ein Oberbegriff für dimerische Transkriptionsfaktoren, die sich aus Jun-, Fos- oder ATF (activating transcription factor)-Proteinen zusammensetzen. Das aus diesen Untereinheiten bestehende AP-1 Protein bindet an eine spezifische DNA-Sequenz, die AP-1-Bindungsstelle. Der Transkriptionsfaktor AP-1 wurde ursprünglich in Kernextrakten von HeLa-Zellen identifiziert, wo er an eine spezifische DNA-Erkennungssequenz in der Promotorregion des humanen Metallothioneins IIA bindet [102]. Weiterhin ist beschrieben, dass auch verschiedene andere virale und zelluläre Gene (z.B. humane Kollagenase, SV40, Stromelysin und Interleukin-2) diese Erkennungssequenz haben. Die aufgeführten Gene werden durch Phorbolster wie TPA-(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) aktiviert weswegen die spezifische Erkennungssequenz in ihrer Promotorregion auch als TRE (TPA

response element) bezeichnet wird [12]. Weitere Aktivatoren des AP-1 Transkriptionsfaktors sind neben TPA u.a. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Neurotransmitter, UV-Bestrahlung und andere Stresssignale sowie Karzinogene und bakterielle und virale Infektionen [146]. Der Vergleich verschiedener AP-1 Bindungsstellen führt zur Ableitung einer palindromischen Konsensussequenz, die durch AP-1 erkannt wird: 5'-TGAG/CTCA-3' [11]. Die meisten Gene, die für AP-1 Komponenten kodieren, verhalten sich wie „immediate early genes“ [153], d.h. Gene, deren Transkription nach Stimulation schnell aktiviert wird und die unabhängig von der de-novo Proteinsynthese ist [86].

2.2.1 Aufbau von AP-1

Der Einfluss von AP-1 auf das Schicksal der Zelle hängt von der Zusammensetzung aus den einzelnen AP-1 Proteinen ab aber auch von der Zelllinie und von der Art des Zellstimulus. AP-1 ist ein Dimer, das hauptsächlich aus Proteinen aus der Jun-, Fos- und ATF-Proteinfamilie besteht. Die Familie der Jun-Proteine besteht aus c-Jun, JunB und JunD, die der Fos-Familie aus c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2 und die der ATF-Familie aus ATF-2, ATF-3/LRF1 und BH-ATF. Es gibt Homodimere aus Proteinen der Jun- oder ATF-Familie und Heterodimere aus Proteinen der Jun-Familie assoziiert mit Proteinen der ATF- und/oder der Fos-Familie. Die Mitglieder der Fos-Familie bilden keine Homodimere [87]. Die Dimerisierung ist Voraussetzung für die Bindung an die DNA. Abbildung 3 zeigt das Heterodimer aus c-Jun und c-Fos wie es an die Konsensussequenz bindet. Der wichtigste Vertreter der Jun-Proteine ist c-Jun, welches das zelluläre Homolog des im Avian Sarcoma Virus 17 gefundenen v-Jun darstellt ([26],[76]).

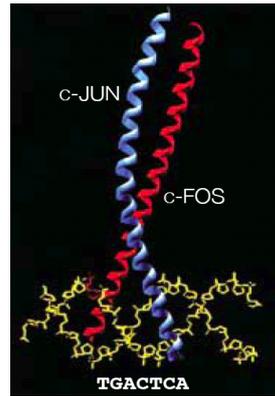


Abb. 3: Beispiel für ein heterodimeres AP-1 Protein und seine Bindungssequenz. Schematische Darstellung eines heterodimeren AP-1 Proteins aus c-Jun und c-Fos, das an die spezifische palindromische Konsensussequenz bindet [72].

Es konnte gezeigt werden, dass Heterodimere aufgrund ihrer höheren Thermostabilität eine größere AP-1 Aktivität haben als Homodimere [150]. Gleichzeitig ist die AP-1 Aktivität, d.h. die Fähigkeit die Transkription zu aktivieren, bei der Vielfalt der möglichen Kombinationen an Heterodimeren, z.T. sehr unterschiedlich [139]. Die Dimerisierung zwischen den verschiedenen AP-1 Proteinen erfolgt hauptsächlich in der sogenannten Leucin-Zipper-Region ([92],[173]). Der Leucin-Zipper ist ein strukturelles Motiv, das eine α -Helix bildet, in der jede siebte Aminosäure die hydrophobe Aminosäure Leucin ist. Diese Anordnung bewirkt die Dimerbildung in Form von „coiled-coiled“-Motiven [13], da die Leucine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen in Verbindung treten. Daneben können auch Salzbrücken zusätzlich das dimere Protein stabilisieren. Neben der Leucin-Zipper-Region haben alle Fos- und Jun-Proteine eine weitere hochkonservierte Region: die basische Region. Sie ist entscheidend für die Bindung an die AP-1 Konsensussequenz [39]. Die beiden beschriebenen Regionen bzw. Domänen führten zu der Bezeichnung bZIP Proteine was für „basische Leucin-Zipper-Proteine“ steht. Für die Transaktivierungsaktivität von AP-1 ist die Transaktivierungsdomäne als dritte hochkonservierte Region zuständig [113]. Diese Domäne liegt im N-terminalen Bereich und besteht aus drei kurzen Regionen, die aus Gruppen von negativ geladenen Aminosäuren zusammengesetzt sind [14]. Das Dimer aus c-Jun und c-Fos besitzt unter den AP-1 Proteinen das stärkste Transaktivierungspotenti-

al. Die Abbildung 4 zeigt schematisch den Aufbau eines AP-1 Proteins aus diesen drei Domänen. Die Mitglieder der Fos-Familie lassen sich nach ihrer Fähigkeit Mäusefibroblasten zu transformieren in zwei Gruppen unterteilen: die transformierenden (c-Fos, Fos-B) und die nicht-transformierenden (Fra-1, Fra-2, Fos-B2) Fos-Proteine [167]. Das AP-1 Protein c-Fos stellt das zelluläre Homolog von v-Fos dar, einem retroviralen Onkogen.

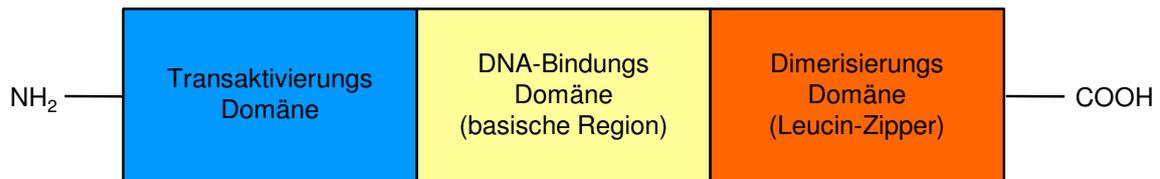


Abb. 4: Schematischer Aufbau von AP-1 Proteinen. AP-1 Proteine besitzen eine N-terminale Transaktivierungsdomäne, eine C-terminale Dimerisierungsdomäne und eine basische DNA-Bindungsdomäne.

2.2.2 Regulation der AP-1 Aktivität

Die AP-1 Aktivität wird durch mehrere unterschiedliche Mechanismen reguliert. Zum einen werden die verschiedenen AP-1 Gene unterschiedlich transkribiert. Dies hängt z.B. von der Art des Zellstimulus ab, der dann im weiteren Verlauf der Signaltransduktion die einzelnen Mitglieder der Jun-, Fos- und ATF-Familien mehr oder minder stark exprimiert. Somit unterscheiden sich die verfügbaren AP-1 Proteine in ihrer Anzahl, was Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Transkriptionsfaktors hat [172]. Zum anderen ist die Regulation der AP-1 Aktivität auch abhängig von der Art des Zellstimulus und von der Zelllinie. So wirkt z.B. c-Jun in Fibroblasten und neuronalen Zellen proapoptotisch [27], [177] aber in Hepatozyten antiapoptotisch [23], [46]. Die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen AP-1 Unterproteine haben unterschiedliche Fähigkeiten, AP-1-abhängige Gene zu transaktivieren. JunB und JunD-Homodimere z.B. sind schwache Transaktivatoren. Die Bildung von Heterodimeren hingegen aus c-Fos mit einem beliebigen Jun-Protein führt zu einem starken Transaktivator. Da in der Promotorregion von c-Jun ebenfalls AP-1-Bindungsstellen identifiziert werden konnten, wird angenommen, dass c-Jun einer Autoregulation un-

terliegt [13]. JunB hat nicht nur ein deutlich schwächeres Potential zur Zelltransformation, es wirkt sogar als negativer Regulator der c-Jun vermittelten Transkriptionsaktivierung entgegen [41]. Die Induktion von c-Fos wird durch das eigene Genprodukt hingegen inhibiert [135] und ist durch weitere spezifische DNA-Erkennungssequenzen von anderen Transkriptionsfaktoren wie z.B. SRF (serum response factor) und CREB (cAMP response element binding protein) abhängig [165]. Ein weiterer Mechanismus der Regulation der AP-1 Aktivität ist die posttranslationale Modifikation bestehender AP-1-Komplexe. Eine sehr verbreitete Form um Proteinaktivität zu modulieren, ist die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung. Sowohl bei c-Jun als auch bei c-Fos sind Phosphorylierungsstellen in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne gefunden worden [129], wodurch die Transaktivierungsaktivität erhöht wird [151]. Durch Phosphorylierung kann ebenfalls die Stabilität eines Proteins und damit seine tatsächlich vorhandene Menge beeinflusst werden. Die Phosphorylierung von c-Jun durch JNK (Jun-N-terminale Kinase) an den Serinen 63 und 73 hat einen stabilisierenden Effekt, da die Ubiquitinierung reduziert wird [116].

Für die Regulation von AP-1 sind die MAPK (Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase) Signaltransduktionswege von entscheidender Bedeutung [86]. Durch die unterschiedlichsten Stimuli kommt es zur Aktivierung von MAPK-Kaskaden und dadurch zur Aktivierung von ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase), p38 und JNK. Einen sehr vereinfachten Überblick dazu gibt die Abbildung 5.

Neben der Phosphorylierung bieten Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eine weitere Möglichkeit der posttranslationalen Regulation von AP-1. Generell haben Protein-Protein-Wechselwirkungen große Bedeutung für die Kontrolle der Aktivität von Transkriptionsfaktoren. AP-1 Proteine können mit einer Reihe von anderen bZIP und nicht-bZIP Proteinen interagieren (Abbildung 6).

Der nukleäre Glucocorticoid-Rezeptor (GR) ist in der Lage an AP-1 Proteine zu binden, so dass entweder die AP-1 Bindung an die DNA verhindert oder mittels Transrepression die Transaktivierungsaktivität des gebundenen Transkriptionsfaktors inhibiert wird ([3],[6],[15]). Auf diese Weise wird z.B. die Aktivierung des Kollagenase-Gens inhibiert [94] und die Expression anderer inflammatorischer Gene unterdrückt [152]. AP-1 kann auch mit NFAT ([105],[131]), MyoD [25] und NF- κ B ([106],[149])

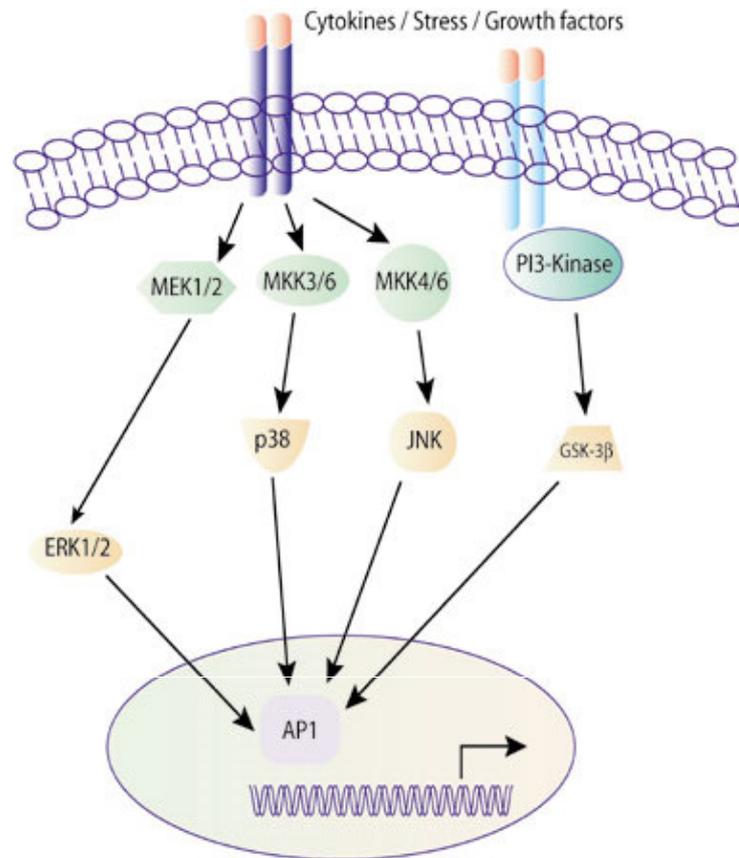


Abb. 5: MAP-Kinase Kaskaden führen zur Aktivierung von AP-1 Proteinen. Verschiedene extrazelluläre Stimuli führen zur Aktivierung der Kinasen ERK1/2, p38 und JNK, die wiederum durch Phosphorylierung verschiedene AP-1 Proteine aktivieren [47].

komplexieren, die ebenfalls Transkriptionsfaktoren sind. Die Transaktivierungsaktivität von AP-1 kann auch durch das Interferon-induzierbare Protein p202 inhibiert werden [110], [37]. Eine weitere Arbeit beschreibt, dass der Komplex aus c-Fos und STAT-1 an der transkriptionellen Aktivierung des Gens der Stickstoffmonoxid-Synthase 2 (NOS2) beteiligt ist [178]. Dies sind nur einige Beispiele für Protein-Protein Interaktionen des Transkriptionsfaktors AP-1. In der Literatur sind noch weitere Interaktionen beschrieben.

2.2.3 Biologische Bedeutung von AP-1

Der Transkriptionsfaktor AP-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellproliferation, Transformation, Differenzierung, Entzündung, Zellmetabolismus, Zell-

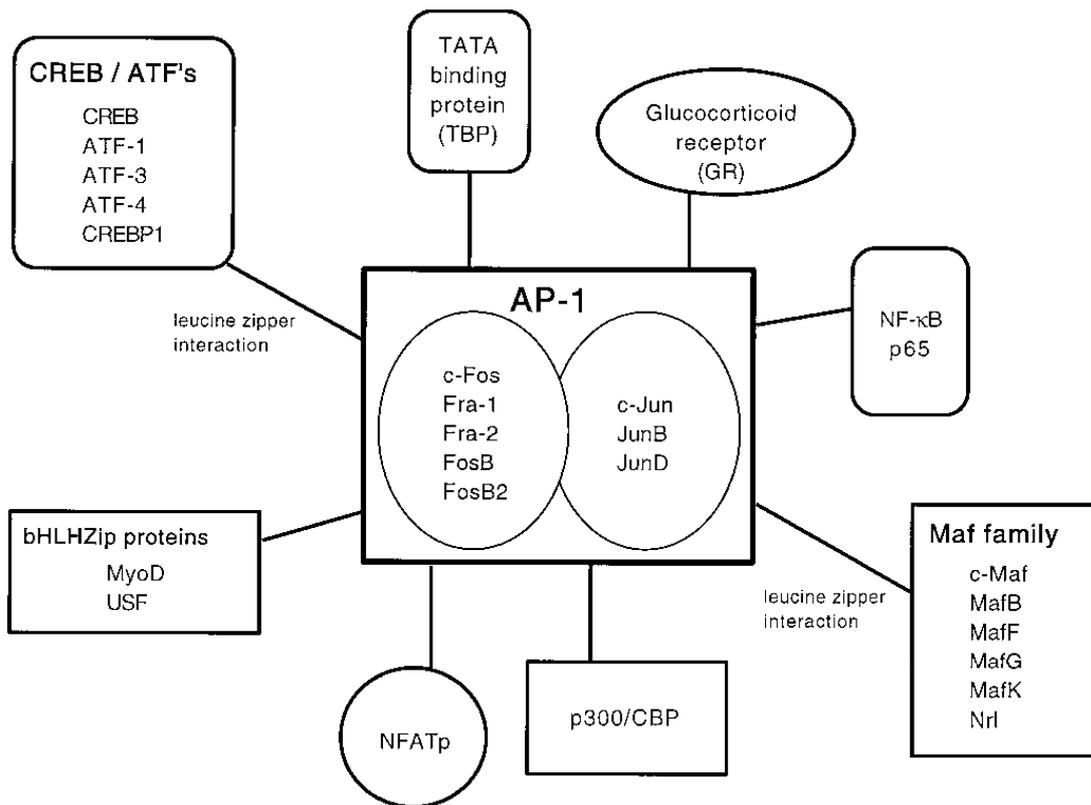


Abb. 6: Protein-Protein Interaktionen zwischen AP-1 und anderen Transkriptionsfaktoren. AP-1 Proteine können auch mit anderen bZIP Transkriptionsfaktoren aus der CREB/ATF und der Maf-Familie über die Leucin-Zipper Domäne dimerisieren. Außerdem können einige AP-1 Proteine auch mit nicht-bZIP Proteinen wie z.B. GR, NF- κ B, NFAT, MyoD und USF interagieren [57].

überleben und Apoptose [13] (Abbildung 7). Die unterschiedlichen biologischen Wirkungen von AP-1 wurden in Untersuchungen von verschiedenen Zelllinien beschrieben. Eine Erklärung für die unterschiedlichen ja sogar kontroversen Wirkungsweisen ist u.a. die Aktivierung von unterschiedlichen Gruppen an Zielgenen durch AP-1 [87]. Dass AP-1 Proteine Einfluss nehmen auf die Proliferation und die Apoptose wurde hauptsächlich für die Proteine aus der Jun-Familie gezeigt. Es wurde nachgewiesen, dass sie die Fähigkeit besitzen die Expression von Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D1, p53, p21^{cip1/waf1}, p19^{ARF} und p16 zu regulieren [145]. Vor allem der Einfluss auf Cyclin D1 wurde mehrfach beschrieben ([16],[147],[148]). Die Bedeutung von AP-1 in der Differenzierung wurde ebenfalls in vielen Zellsystemen nachgewiesen. Es konnte u.a. gezeigt werden, dass die Behandlung von nicht differenzierten F9-Zellen

mit Retinsäure, die nachweislich AP-1-Aktivität induziert, zur Differenzierung dieser Zellen führt. Diese Differenzierung wird charakterisiert durch die Expression zahlreicher Markergene [90], die ihrerseits in ihrem Promotor AP-1 Bindungsstellen tragen [119]. Auch die Differenzierung von Muskelzellen ist von AP-1 abhängig [10].

AP-1 Proteine sind auch bei der Regulation von Genen, die den Metabolismus der Zelle regulieren, involviert. So wurde z.B. entdeckt, dass das Gen für den Glucose-transporter 1 (Glut-1) eine AP-1 Bindestelle in seinem Promotor besitzt ([93],[141]). Hinsichtlich der Bedeutung von AP-1 bei der Apoptose haben Shaulian und Karin einen Übersichtsartikel verfasst, der einen guten Überblick verschafft über die Beteiligung von AP-1 sowohl am Überleben als auch am Tod einer Zelle [146]. Ameyar et al. haben die Rolle von AP-1 in der Apoptose ebenfalls kontrovers diskutiert [8]. Eine weitere sehr gute Zusammenfassung über die verschiedenen biologischen Wirkungsweisen von AP-1 gibt Hess et al. [72].

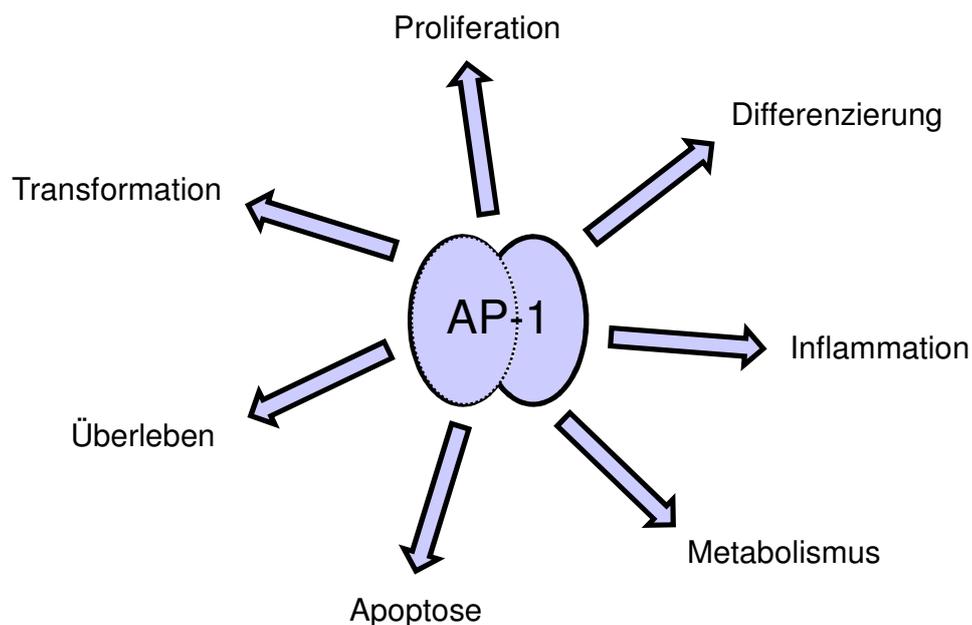


Abb. 7: Biologische Wirkungsweisen von AP-1. Der Transkriptionsfaktor AP-1 nimmt Einfluss auf eine Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse.

2.3 Zielsetzung

Chlamydien nehmen starken Einfluss auf ihre Wirtszelle um den eigenen Entwicklungszyklus und somit ihre Vermehrung zu sichern. Durch Infektionen mit *Cpn* werden Signalkaskaden aktiviert ([95],[96],[136],[142]), so dass es zur Aktivierung verschiedener Zielproteine kommt.

Der Transkriptionsfaktor AP-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Differenzierung, der Proliferation, des Zellüberlebens und der Apoptose. Da *Cpn* während des Entwicklungszyklus auf diese zellulären Prozesse Einfluss nimmt, war es das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob durch eine Infektion mit *Cpn* der Transkriptionsfaktor AP-1 der Wirtszelle reguliert wird. Die Familie der AP-1 Transkriptionsfaktoren ist maßgeblich an der Regulation einer Vielzahl von Genen beteiligt, die eine entscheidende physiologische und pathophysiologische Funktion ausüben. Die Bedeutung der einzelnen AP-1 Proteine für das Schicksal von Zellen wurde in zahlreichen Forschungsarbeiten verdeutlicht, im Bezug auf eine Infektion mit *Cpn* wurde AP-1 jedoch nicht charakterisiert. Aus diesen Gründen ist dieser Transkriptionsfaktor von großem Interesse. Dieser Arbeit lagen folgende Zielsetzungen zu Grunde:

1. Es sollte der Einfluss einer *Cpn*-Infektion auf verschiedene AP-1 Proteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Entwicklungszyklus untersucht werden.
2. Da die Regulation von AP-1 zelltypspezifisch ist, sollte die Untersuchung bei zwei verschiedenen Zelllinien erfolgen. Zum einen sollten epithelialen HEp-2 Zellen untersucht werden, in denen die akute Infektion abläuft und zum anderen Monozyten, in denen *Cpn* persistiert.
3. Außerdem war es Ziel dieser Arbeit die Auswirkung einer AP-1 Modulation der Wirtszelle auf die Chlamydieninfektion zu untersuchen. Dafür sollte einerseits AP-1 mittels spezifischer Inhibitoren blockiert werden und andererseits durch Transfektion das AP-1 Protein c-Jun überexprimiert werden.
4. Durch die Modulation sollte die funktionelle Relevanz von AP-1 bei einer Infektion mit *Cpn* näher untersucht werden.

5. Ein weiterer Zielansatz dieser Arbeit war es zu prüfen, ob eine Interaktion zwischen AP-1 und CPAF auftritt und diese gegebenenfalls zu charakterisieren. CPAF ist eine chlamydiale Protease, die viele Wirtsproteine, darunter auch Transkriptionsfaktoren, als Target hat.

3 Materialien

3.1 Zelllinien

HEp-2: Humane Epithelzellen vom Typ 2 sind immortalisierte Plattenepithelzellen eines Larynxkarzinoms (ATCC CCL-23) [1].

HEK293 T-REx: Human Embryonic Kidney-Zellen sind menschliche embryonale Nierenzellen, die stabil das Tetrazyklin Repressor Protein exprimieren. In der Arbeitsgruppe von Prof. Georg Häcker wurde aus diesen Zellen eine neue Zelllinie hergestellt, die das Flag-3x Gyrase CPAF-Konstrukt stabil ins Genom integriert hat (Klon 6). Diese Zelllinie wurde für die vorliegende Arbeit freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Monozyten: Die Monozyten wurden aus Buffy Coats, die wir dankenswerter Weise von der Blutspendezentrale der Universität zu Lübeck erhalten haben, isoliert. Bei der Verarbeitung einer Vollblutspende zu Erythrozytenkonzentraten und gefrorenen Frischplasmaprodukten entstehen die Buffy-Coats als Nebenprodukt und bestehen überwiegend aus Leukozyten und Thrombozyten.

3.2 Laborgeräte

Analysenwaage K 800	August Sauter, Ebingen
Blotapparatur Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, München
<i>Brutschränke:</i>	
Typ: BB 6220	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
IG 150	Jouan GmbH, Unterhaching
Electrophoresis Power Supply EPS 3500 XL	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophoresekammer: Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Elektrophoresekammer	von Keutz-Labortechnik, Reiskirchen

Eraser	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt
Geltrockner Model583	Bio-Rad Laboratories, München
Infinite M200	Tecan, Crailsheim
Kamera: AxioCam HRc	Carl Zeiss MikroImaging, Göttingen
LightCycler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Liquid Scintillation Counter: WALLAC 1409	Wallac, Turku, Finnland
Magnetrührer, Typ RMO	Gerhardt GmbH, Königswinter
<i>Mikroskope:</i>	
Axioskop 2, 25, 40 (Fluoreszenz)	Carl Zeiss MikroImaging, Göttingen
Axiovert 25 (Fluoreszenz)	Carl Zeiss MikroImaging, Göttingen
Standard 20 (Durchlicht)	Carl Zeiss MikroImaging, Göttingen
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen
Phosphoimager Fuji BAS-1000	Fuji, Tokio, Japan
Pipettierhilfe accu-jet pro	Brand, Wertheim
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad, München
PTC-100™	MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA
Programmable Thermal Controller	
<i>Sicherheitswerkbänke:</i>	
Antares	Biohit, Rosbach
SterilGard Hood Class II A/B3	Baker Company, Sanford, ME, USA
SmartSpec™ Plus Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories, München
Taumelschüttler: Polymax 1040	Heidolph Instruments, Kehlheim
Thermostat 3401	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH, Wertheim
Vortex REAX 2000	Heidolph Instruments, Kehlheim
VXR basic IKA-Vibrax® (Vibrationsmischer)	IKA® Werke GmbH, Staufen
X-RAY Cassette IEC 60406 (30 x 40 cm)	rego X-Ray GmbH, Augsburg
<i>Zentrifugen:</i>	
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg

Megafuge 2-OR	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Universal 30F	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Rotina 38R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

3.3 Labor- und Verbrauchsmaterialien

Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, St. Gilles, UK
Blotpapier	Schleicher, Schuell, Dassel
Deckgläser, 10 mm Durchmesser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Fotofilm-Kassette: BAS cassette 2040	Fujifilm, Düsseldorf
Gelkämme: Mini Protean 3 (1,0 mm)	Bio-Rad Laboratories, München
Glasplatten: Mini Protean 3 (1,0 mm)	Bio-Rad Laboratories, München
Glasschrot	Karl Hecht Assistent, Sondheim
Glaswolle reinst, silanisiert	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Kryoröhrchen: Nalgene [®] Cryoware [™]	Nunc [™] Brand Products, Rochester, NY, USA
LightCycler [®] Capillaries (20 μ l)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>Multiwell-Platten</i>	
6-, 12-, 24-Well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Well-Platten	Nunc [™] , Roskilde, Dänemark
Neubauer-Zählkammer	Hassa, Lübeck
Nitrocellulosemembran: Protran	Whatman GmbH, Dassel
Nunc Thermanox Plastic Coverslips	Nunc [™] Brand Products, Rochester, NY, USA
Objektträger, 76 x 26 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
<i>Pipetten</i>	
Eppendorf Reference 10, 100, 1000 μ l	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research 10, 100, 1000 μ l	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen: Fill Tip 10, 100, 1000 μ l	Sarstedt, Nümbrecht
Prot/Elec Tips, Gel loader tips	Bio-Rad Laboratories, München

Röhrchen (10, 15, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter, 0,2 μ m	Whatman GmbH, Dassel
Thermanox [®] Plastic Coverslips	Nunc [™] Brand Products, Rochester, NY, USA
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
trUView Cuvettes	Bio-Rad Laboratories, München
Zellkulturflaschen (550 ml) Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	BD Biosciences Pharmingen [™] , Heidelberg

3.4 Chemikalien

Acrylamid-Bis (40%) Solution, 19:1	Bio-Rad Laboratories, München
Amphotericin B	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Anhydrotetracycline	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Blasticidin S HCl	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg
complete, Mini, Proteasen-Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Coumermycin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fixans nach Monte-Grazia-Dei (Monti)	zur Verfügung gestellt von PD Dr. med. Matthias Klinger
Essigsäure	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethidium homodimer-2	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

gamma-[³² P]ATP (spez. Akt. 3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
Gentamicin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
HEPES Buffer Solution (1 M)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Imagen Chlamydia Kit	OXOID, Cambridgeshire, UK
Immobilon Western HRP Substrate	Millipore, Billerica, MA, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kalibrierpuffer: pH 6,865	WTW, Weilheim
Kodak X-Ray developer LX 24	Kodak, Stuttgart-Wangen
Kodak X-Ray fixer AL 4	Kodak, Stuttgart-Wangen
Lactacystin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
LB Broth	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Methanol	Merck, Darmstadt
MTT (Thiazolyl blue)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
PBS, pH 7,2	Nährmedienlabor, Inst. für Med. Mikrobiologie und Hygiene
PMSF	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
Protein A beads from <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rotiphorese [®] Gel 40 (19:1)	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
Rotiszint [®] eco plus	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe

Saccharose	Merck, Darmstadt
Salmon Sperm DNA (10 mg/ml)	Gibco-BRL, Eggenstein
Salzsäure (25%)	Merck, Darmstadt
SDS (Sodiumdodecylsulfate)	Merck, Darmstadt
Sephadex G-25 DNA grade	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
SYTO 16	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
T4 Polynukleotide Kinase, 3'-phosphatase free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tanshinone IIA	Marligen Biosciences, Rockville, MD, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma, Steinheim
Titriplex III (EDTA)	Merck, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl)-aminomethane	Bio-Rad Laboratories, München
Triton X-100	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trockenmilchpulver	Fluka BioChemika, Steinheim
Trypan blue solution (0,4%)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
TurboFect™ <i>in vitro</i> Transfection Reagent	Fermentas, St. Leon-Rot
Tween®20	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Zeocin™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.5 Medien und Medienzusätze

Cycloheximide	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
DMEM high Glucose	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
L-Glutamin (10 mg/ml)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
LSM 1077 (Lymphozytenseparationsmedium)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

MEM(E) ohne L-Gln	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RPMI-1640 ohne L-Gln	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Tetrazyklin freies FKS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

3.6 Kits

IMAGEN™ Chlamydia	Oxoid, Cambridge, UK
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
NucleoSpin® RNA II	Macherey Nagel, Düren
peqGOLD Fastfilter Plasmid Midi Kit	Peqlab, Erlangen
Phospho Works™ Luminometric ATP Assay Kit	ABD Bioquest, Sunnyvale, CA, USA
TNT®T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega, Madison, USA
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

3.7 Antikörper

3.7.1 Antikörper für Western Blot

Alle angegebenen Primär-Antikörper wurden für den Western Blot 1:1000 verdünnt bis auf β -Aktin und CPAF, die 1:2000 verdünnt wurden. Die Sekundär-Antikörper wurden jeweils 1:4000 verdünnt.

Primär-Antikörper:

ATF-2	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
β -Aktin	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
c-Fos	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
c-Jun	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
CPAF	aus dem Institut für Biochemie, Universität Lübeck
FosB	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
JunB	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

JunD	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Phospho-ATF-2 (Thr71)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Phospho-c-Jun (Ser73)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Sekundär-Antikörper:

Anti-Mouse IgG, HRP-linked	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

3.7.2 Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

Mouse Anti-Chlamydien-LPS, Primärantikörper	Prof. H. Brade, FZ Borstel
Rabbit Anti-Mouse IgG, FITC-gekoppelt	DakoCytomation GmbH, Hamburg
Goat Anti-Rabbit IgG, Alexa 568-gekoppelt	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

3.8 Primer

Alle Primer wurden über die Firma TIB-MOLBIOL in Berlin bezogen und den Angaben des Herstellers entsprechend mit Aqua dest. auf eine Konzentration von 100 pmol/ μ l verdünnt.

Primer	Sequenz 5' > 3'	Primerlänge (bp)
<i>für Real Time RT-PCR:</i>		
Glut-1 for	ggttgtgccatactcatgacc	21
Glut-1 rev	cagataggacatccagggtagc	22
18S for	tcaagaacgaaagtccggagg	20
18S rev	ggacatctaaggcatcaca	20
<i>für Herstellung der AP-1 Sonde:</i>		
AP-1 for	gtgtgatgactcaggtttg	19
AP-1 rev	caaacctgagtcacacac	19

3.9 Zellkulturmedien

Anzuchtmedium für HEp-2 Zellen - Dauerkultur: 500 ml DMEM high Glucose komplettiert mit 50 ml (10%) FKS, 1 ml Gentamicin und 16,6 ml HEPES-Puffer

Anzuchtmedium für HEp-2 Zellen - Versuchsansatz: 500 ml RPMI 1640 komplettiert mit 50 ml (10%) FKS, 5 ml L-Glutamin, 5 ml NEAA, 1 ml Gentamicin (Endkonz.: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und 4 ml Amphotericin B (Endkonz.: 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Infektionsmedium für HEp-2 Zellen mit *Chlamydia pneumoniae* CWL029: 500 ml MEM-E komplettiert mit 5 ml L-Glutamin, 5 ml NEAA, 1 ml Gentamicin (Endkonz.: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 4 ml Amphotericin B (Endkonz.: 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und 500 μl Cycloheximide (Endkonz.: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Anzuchtmedium für HEK293 T-REx Zellen: 500 ml DMEM high Glucose komplettiert mit 50 ml (10%) Tetrazyklin freiem FKS, 0,5 ml Blastidin (Endkonz.: 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und 1,75 ml Zeocin (Endkonz.: 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Anzuchtmedium für Monozyten: 500 ml RPMI 1640 komplettiert mit 50 ml (10%) FKS; 5 ml HEPES-Puffer (1 M), 5 ml L-Glutamin und 3 ml sterilfiltriertes β -Mercaptoethanol (25 mM)

3.10 Puffer und Lösungen

PBS: 80 g NaCl; 2 g KCl; 11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; ad 1 l mit Aqua dest.; pH 7,2

SPG-Puffer: 75 g Saccharose; 2,47 g Na_2HPO_4 ; 0,36 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; 0,72 g L-Glutamin; ad 1 l mit Aqua dest.; pH 7,3

Lysis-Puffer I: 3,94 g Tris; 40 ml Glycerol (100%); 8 g SDS; 20 ml DTT (1 M); wenige Krümel Bromphenolblau; ad 200 ml Aqua dest.; pH 7,8 (Der Lysispuffer I wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Er wurde verwendet für die Herstellung von Ganzzellextrakten für die Untersuchungen im Western Blot und wurde als SDS-Ladepuffer den Zytoplasma- und Kernextrakten zugefügt, wenn diese im Western Blot analysiert werden sollten.)

Lysis-Puffer II: 20 mM HEPES-Puffer; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 10% Glycerol; ad 100 ml Aqua dest.; pH 7,5 (Auch der Lysispuffer II wird aliquotiert und bei -20°C gelagert. Er wurde verwendet für die Herstellung von Zellextrakten für den Degradations Assay.)

Puffer für die Kernextraktion:

Puffer A: 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,9); 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA und 0,1 mM EGTA; kurz vor Durchführung des Versuches 1 mM DTT und 0,5 mM PMSF zufügen

Puffer C: 20 mM HEPES-Puffer (pH 7,9); 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA und 1 mM EGTA; kurz vor Durchführung des Versuches 0,5 mM PMSF zufügen

Puffer für EMSA:

TBE-Puffer (10-fach konzentriert): 109 g Tris; 55,6 g Borsäure; 4,65 g Titriplex III (EDTA); ad 1 l mit Aqua dest.

DNA-Ladepuffer: 2,5 ml TBE-Puffer (10-fach konzentriert); 22,5 ml Bromphenolblau in 50% Glycerol (2,5 mg/ml)

PAA-Gel 5% native: 6,25 ml PAA(40%); 1,5 ml TBE-Puffer (10-fach konzentriert); 1,43 ml 87% Glycerol; 40,6 ml Aqua dest.; 500 μ l 10% APS; 100 μ l TEMED

Binding Buffer für EMSA-Ansatz: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,5 mM DTT; 0,5 mM Tiriplex III (EDTA); 1 mM MgCl₂; 4% Glycerol

Competitor: 5 μ l Oligonukleotid a; 5 μ l Oligonukleotid b; 5 μ l MgCl₂ (1 M); 5 μ l Phosphorylation buffer (10-fach konzentriert); 10 μ l Aqua dest. (Den Ansatz auf 95 °C für 3 min erhitzen, dann langsam abkühlen lassen und in Aliquots bei -20 °C einfrieren.)

Puffer für die SDS-PAGE:

Elektrophoresepuffer (5-fach konzentriert): 15 g Tris; 72 g Glycin; 5 g SDS; ad 1 l Aqua dest.; pH 8,3 (vor Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. verdünnen)

Sammelgelpuffer: 30 g Tris; ad 500 ml Aqua dest.; pH 6,8

Sammelgel (5%): 3,08 ml Aqua dest.; 1,25 ml Sammelgelpuffer; 625 μ l Acrylamid-Bis (40%) Solution; 50 μ l von 10%igem SDS; 25 μ l von 10%igem APS und 5 μ l TEMED

Trenngelpuffer: 90,5 g Tris; ad 500 ml Aqua dest.; pH 8,8

Trenngel (12%): 4,08 ml Aqua dest.; 2,5 ml Trenngelpuffer; 3 ml Acrylamid-Bis (40%) Solution; 100 μ l von 10%igem SDS; 50 μ l von 10%igem APS und 5 μ l TEMED

Puffer für die Westernblot-Analyse:

Blotpuffer: 3 g Tris; 14,4 g Glycin; 200 ml Methanol; ad 1 l Aqua dest.

TBS-Puffer (10-fach konzentriert): 24,2 g Tris; 80 g NaCl; ad 1 l Aqua dest.;
pH 7,6 (vor Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnen)

T-TBS-Puffer: 100 ml TBS-Puffer (10-fach konzentriert); 1 ml Tween-20; ad 1 l Aqua
dest.

Blocking-Lösung (5%): 5 g Trockenmilchpulver; 100 ml T-TBS (vor Gebrauch mind.
eine Stunde auf dem Magnetrührer gut durchmischen)

Entwicklerlösung: 100 ml Kodak X-Ray developer LX 24 gemischt mit 200 ml Lei-
tungswasser

Fixiererlösung: 200 ml Kodak X-Ray fixer AL 4 gemischt mit 700 ml Leitungswasser

Stripping-Puffer: 5 g Glycin; 100 ml Aqua dest.; pH 2,5

Puffer für den MTT-Assay:

MTT-Lösung: 50 mg MTT; 10 ml PBS (Lösung steril filtrieren)

Fixierlösung: 19,88 ml DMSO; 120 μ l Essigsäure; 2 g SDS

3.11 Software

Adobe [®] Photoshop [®] 6.0	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Axio Vision Rel. 4.5	Carl Zeiss MikroImaging, Göttingen
BAS Reader	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Strau- benhardt
JabRef 2.4.2	http://jabref.sourceforge.net
LightCycler Data Analysis	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Microsoft [®] Office, Version 2007	Microsoft Cooperation, Mountain View, CA, USA
TeXnicCenter 1.0 RC1	http://www.texniccenter.org

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Anzucht von HEp-2 Zellen

Die humane epitheliale Zelllinie HEp-2 wurde in DMEM-Medium (PAA, Deutschland) mit 10% FKS bei 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturflaschen (175 cm² Flaschen) kultiviert. Die Zelllinie wurde regelmäßig auf Mycoplasmenkontamination untersucht. Vor Beginn wurden alle benötigten Medien und Medienzusätze auf Raumtemperatur gebracht. Für das Umsetzen der Zellen wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen um abgestorbene Zellen, Zelltrümmer und Reste verbrauchten Mediums zu entfernen. Durch Inkubation von 4 ml Trypsin/EDTA für 5 min bei 37°C wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst. Die enzymatische Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von 4 ml Kulturmedium gestoppt. Trypsin ist eine Serinprotease, die Arginin und Lysin spaltet. EDTA komplexiert zweiwertige Kationen wie Ca²⁺ und Mg²⁺, die Membranproteine stabilisieren. Durch Zugabe von Medium, das 10% FKS enthält, wurde das Trypsin sofort durch Bindung des cytotoxischen EDTAs inaktiviert. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und in neue Kulturflaschen ausgesät bzw. für die Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer verwendet. Für das Ansetzen der HEp-2 Zellen für Versuche wurden die Zellen in RPMI-Medium für Versuchsansätze (Abschnitt 3.9 auf Seite 31) aufgenommen und entsprechend des geplanten Versuchs auf 6-, 12-, oder 24-Well Platten verteilt.

Ansatz	Zellzahl/Well	Volumen/Well	Multiwell-Platte
Anzucht HEp-2 Zellen	$1,2 \times 10^6$	2 ml	6-Well
Anzucht HEK293 Zellen	5×10^5	2 ml	6-Well
Anzucht Monozyten	2×10^6	1,5 ml	12-Well
Infektion HEp-2 Zellen	$1,2 \times 10^6$	3 ml	6-Well

Ansatz	Zellzahl/Well	Volumen/Well	Multiwell-Platte
IFT	$1,2 \times 10^6$	3 ml	6-Well
Wiederanzucht	3×10^5	1 ml	24-Well
EM	3×10^5	1 ml	24-Well

4.1.2 Anzucht von HEK293 T-REx Zellen und Induktion der CPAF-Expression

In dieser Zelllinie (siehe 3.1) kann die CPAF-Expression durch die Zugabe von Anhydrotetrazyklin induziert werden, da das CPAF-Gen einer tetrazyklinabhängigen Genregulation unterliegt (Tet-on-System). Die HEK293 T-REx Zellen (Flag-3x Gyrase CPAF Klon6) wurden in 6-Well Platten so eingesät, dass sie eine Konfluenz von 60-70% hatten. Am nächsten Tag wurde durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin die CPAF-Genexpression eingeleitet. Die verwendete Endkonzentration von Anhydrotetrazyklin war 5 ng/ml. Zusätzlich wurde Coumermycin in der Endkonzentration von 1 μ M zugesetzt, was die Dimerisierung zweier CPAF-Proteine zu einer funktionsfähigen Protease bewirkte. Sowohl die Kultivierungsbedingungen als auch das Umsetzen der Zellen entsprach den Angaben für die HEp-2 Zellen (siehe 4.1.1). Nach 12 Stunden wurden die Zellen vom Boden der Wells abgeschabt, in ein 10 ml Röhrchen überführt, zentrifugiert (2 000 rpm, 5 min, RT) und das Pellet in 300 μ l Lysispuffer I aufgenommen. Welche Auswirkung die CPAF-Induktion auf die AP-1 Proteine dieser Zelllinie hatte, wurde im Western Blot untersucht.

4.1.3 Isolierung von Monozyten aus Buffy Coat

PBMC-Zellen (peripheral blood mononuclear cells) wurden aus einem Buffy Coat isoliert. Die Zellen wurden anhand ihrer spezifischen Dichte von den anderen Bestandteilen getrennt. Der Inhalt des Buffy Coats wurde mit PBS 1:6 verdünnt. Die Trennung erfolgte über das Lymphozyten Separationsmedium LSM 1077. Davon wurden je 15 ml in mehreren 50 ml Röhrchen vorgelegt und dann 30 ml des PBS verdünnten

Bluts vorsichtig überschichtet. Durch Zentrifugation (2200 rpm, 30 min, RT) wurden die Bestandteile der Dichte nach aufgetrennt und es bildete sich eine weißliche Interphase zwischen dem Separationsmedium und dem Serum. Beim Zentrifugieren musste darauf geachtet werden, dass ohne Bremse zentrifugiert wurde, damit es nicht zu Verwirbelungen der gebildeten Phasen kam. Die Erythrozyten und Granulozyten setzten sich als Pellet am Boden des Röhrchens ab. Die Interphase enthielt die PBMCs und wurde mit einer sterilen Transferpipette abpipettiert und in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit PBS mehrmals durch Zentrifugationsschritte (1500 rpm, 10 min, RT) gewaschen. Um die Monozyten von den Lymphozyten zu trennen, wurden die PBMCs in große Zellkulturflaschen (175 cm²) überführt und 50 ml Medium zugefügt. Während einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C setzten sich die Monozyten am Flaschenboden ab und die Lymphozyten verblieben im Medium überstand. Durch vorsichtiges Abkippen des Mediums wurden die Monozyten von den restlichen Zellen getrennt. Die adhärenzten Monozyten wurden vorsichtig mit einem Zellschaber vom Boden gelöst, in frischem Medium aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (siehe 4.2) und entsprechend des geplanten Versuchs auf 12-Well Platten verteilt.

4.1.4 Einfrieren einer Zellkultur

Das Kulturmedium der einzufrierenden Zelllinie wurde mit 10% DMSO versetzt und steril filtriert. Das Zellpellet von einer großen, konfluent bewachsenen Zellkulturflasche (175 cm²) wurde mit diesem Medium resuspendiert und auf zwei Kryoröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden sofort auf Eis gestellt und schrittweise weiter abgekühlt bis auf -80 °C. Anschließend wurden die Zellen im flüssigen Stickstoff gelagert. Monozyten konnten nicht auf diese Weise eingefroren werden, sondern wurden für jeden Versuch frisch aus einem Buffy Coat isoliert.

4.2 Zellzahlbestimmung

Zum Auszählen der Zellen wurden diese mit PBS 1:5 vorverdünnt. Mit dem Farbstoff Trypanblau wurde die Zellsuspension in einer 1:2 Mischung nochmals verdünnt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der nur bei toten Zellen durch die Zellmembran

in das Zytosol diffundieren kann und sie so blau färbt. Bei der Zellzahlbestimmung wiesen die intakten Zellen hingegen keine Färbung auf und wurden im Lichtmikroskop bei zehnfacher Vergrößerung gezählt. Das Auszählen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer mit einer Tiefe von 0,1 mm, wobei alle vier Großquadrate ausgezählt wurden. Da Trypanblau zytotoxisch wirkte, musste die Zellzahlbestimmung sofort nach dem Ansetzen der Verdünnung erfolgen. Aus der Anzahl lebender Zellen und dem Verdünnungsverhältnis wurde dann die Zellzahl pro ml Suspension wie folgt ermittelt:

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

4.3 Infektionsbiologische Methoden

Zur Infektion von HEp-2 Zellen und Monozyten wurde ausschließlich der *Chlamydia pneumoniae* (*Cpn*) Stamm CWL029 (ATCC VR1310) verwendet.

4.3.1 Herstellung eines Infektionsstocks von *Cpn*

Für die Herstellung des *Cpn*-Infektionsstocks wurden HEp-2 Zellen in mehreren 6-Well Platten ausgesät (1×10^6 Zellen pro Well) und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden Chlamydien aus der laufenden Kultur auf den konfluenten Zellrasen zentrifugiert (45 min, 3200 rpm, 30 °C). Die infizierten Zellen wurden nach 72 h Kultur vom Boden der Zellkulturplatten mit einem Zellschaber abgelöst und in einem 50 ml Röhrchen mit Glaskügelchen auf einem Vortexer für 5 min zerschlagen. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 1000 rpm um Zelltrümmer zu sedimentieren. Die Chlamydien verblieben bei dieser geringen Zentrifugalkraft im Überstand. Dieser chlamydienhaltige Überstand wurde in neue Röhrchen überführt und gegeneinander exakt austariert. In einer Ultrazentrifuge (20 000 rpm, 1 h, 4 °C) wurden die chlamydialen Elementarkörperchen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem Sucrose-Phosphat-Glutamat-Puffer (SPG-Puffer, pH 7,3) resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Der Chlamydiengehalt des Stocks wurde quantifiziert durch Infektion von HEp-2 Zellen, die auf Deckgläschen gewachsen sind. Bei der Infektion wurde

eine 1:2 Verdünnungsreihe in 24-Well Platten angelegt. Durch Färbung der Chlamydien Einschlüsse mit einem Chlamydien spezifischen Antikörper (DAKO) konnte die Menge der inclusion forming units (IFUs) bestimmt werden (siehe 4.3.4).

4.3.2 Infektion von HEp-2 Zellen mit *Cpn*

Zur Infektion von HEp-2 Zellen mit dem *Cpn* Stamm CWL029 wurde das Anzuchtmedium abpipettiert und durch Infektionsmedium, das 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximid enthielt, ersetzt. Das Volumen an Infektionsmedium betrug 3 ml pro Well einer 6-Well-Platte. Durch das Cycloheximid wird die Proteinbiosynthese in Eukaryonten gehemmt, wodurch den Chlamydien die Infektion erleichtert wird. Für die Gewährleistung einer gleichmäßigen Infektionsrate bei verschiedenen Experimenten, erfolgte die Infektion aus dem selbst angefertigten Stock. Die Infektion für Experimente erfolgte mit einer hohen Dosis (ca. 15-30 IFUs pro Zelle) und mit einer geringen Dosis (ca. 5-10 IFUs pro Zelle). Durch die hohe Dosis waren 90 - 100% der Zellen infiziert durch die geringe Dosis nur 40 - 50%. Der Stock enthielt eine bestimmte ausgezählte IFU-Anzahl und wurde dem Infektionsmedium direkt zugesetzt, das dann auf die Wells mit den HEp-2 Zellen verteilt wurde, so dass die gewünschte Infektionsdosis erreicht wurde. Die Platten wurden anschließend zentrifugiert (45 min, 3200 rpm, 30 °C) und danach zur weiteren Kultur bei 37 °C inkubiert. Bei jedem Experiment wurde eine extra 6-Well Platte mit Deckgläschen angesetzt, auf dem die Zellen adhärten und die für einen direkten IFT (Immunfluoreszenztest) zur Kontrolle der Infektion dienten. Für die Infektion mit Hitze inaktivierten *Cpn* wurde eine definierte Menge des ausgezählten *Cpn*-Stocks mit 2 ml Infektionsmedium verdünnt und die Suspension in ein 15 ml Röhrchen gegeben. Die *Cpn*-Suspension wurde für 30 min in siedendem Wasser abgekocht. Anschließend wurden die Lösung auf Eis abgekühlt und der so erhaltene Stock von Hitze inaktivierten *Cpn* aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Dieser Stock wurde auf die gleiche Weise für die Versuchsansätze eingesetzt wie der Stock lebender *Cpn*.

4.3.3 Infektion von Monozyten mit *Cpn*

Die frisch isolierten Monozyten wurden entsprechend des geplanten Versuchs auf 12-Well Platten verteilt (ca. 2×10^6 Zellen/Well in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml/

Well). Am Tag der Isolation fand auch die Infektion statt. Dafür wurde ebenfalls der Stock lebender bzw. Hitze inaktivierter *Cpn* verwendet um eine gleichmäßige Infektionsrate unter den verschiedenen Experimenten zu gewährleisten. Der *Cpn*-Stock wurde direkt ins Well zu den Monozyten pipettiert. Die Infektion erfolgte ebenfalls mit einer hohen Dosis (ca. 10 IFUs pro Zelle) und mit einer geringen Dosis (ca. 4 IFUs pro Zelle). Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Chlamydien mit den noch in Suspension befindlichen Monozyten vermischt und so in Kontakt gebracht. Eine Zentrifugation der Platten wurde nicht vorgenommen um eine Aktivierung der Monozyten zu vermeiden. Um sicher zu stellen, dass die Infektion erfolgreich war, wurden Cytospins angefertigt und die infizierten Monozyten im direkten IFT angefärbt.

4.3.4 Berechnung des Chlamydien-Gehalts

Zur Berechnung des Chlamydien-Gehalts wurden die Einschlüsse von *Chlamydia pneumoniae* (auch als Inclusion bezeichnet) pro Gesichtsfeld ausgezählt. Dafür wurden ein oder mehrere Wells der Verdünnungsreihe ausgesucht, in denen dies problemlos möglich war. Für das Auszählen von den IFUs wurde das 40er Objektiv des Mikroskops Axiovert 25 genutzt. Um eine Berechnung zu ermöglichen, wurde zunächst die Größe eines Gesichtsfeldes im Mikroskop bestimmt. Sie beträgt für das 40er Objektiv $0,139 \text{ mm}^2$. Aus der angesetzten 1:2 Verdünnungsreihe war das Volumen des eingesetzten Chlamydienstocks pro Well bekannt. Durch Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors konnte man den Gehalt der IFUs pro Gesichtsfeld in einem Mikroliter berechnen. Um den IFU-Gehalt pro Milliliter zu bestimmen, musste noch die Fläche eines 24-Wells von 200 mm^2 berücksichtigt werden.

4.3.5 Wiederanzucht

Die Versuche der Wiederanzucht von *Chlamydia pneumoniae* wurden in 24-Well Platten durchgeführt, in denen am Vortag HEp-2 Zellen ausgesät wurden (3×10^5 Zellen pro Well). Für die Infektion wurde am nächsten Tag das Anzuchtmedium von dem HEp-2 Monolayer abpipettiert und gegen Infektionsmedium mit $1 \mu\text{g/ml}$ Cycloheximid getauscht, wobei 1 ml in jedes Well pipettiert wird. Die infizierten Zellen, von

denen getestet werden sollte, ob eine Wiederanzucht möglich ist, wurden im Medium vom Boden der 6-Well-Platte abgeschabt und in ein 10 ml Röhrchen mit Glasperlen überführt. Die Zellen wurden durch 5-minütiges Vortexen auf dem Vibrationsmischer zertrümmert und die Chlamydien freigesetzt. Von dieser Suspension wurden 250 μ l entnommen, in das erste Well der vorbereiteten 24-Well Platte einpipettiert und gut durchmischt. Aus diesem Well wurden wiederum 250 μ l entnommen und in das zweite Well übertragen. Auf diese Weise wird eine Verdünnungsreihe angelegt über 6 oder 12 Wells, wobei die Verdünnungsschritte 1:5 betragen. Im Anschluss wurden die Chlamydien nach den üblichen Bedingungen auf die Zellen aufzentrifugiert. Nach 48 h Entwicklungsdauer der Chlamydien, wurden die Zellen mit Methanol fixiert und nach dem indirektem Immunfluoreszenztest gefärbt (4.5). Durch Auszählung der IFUs und Berechnung des Chlamydien-Gehaltes wurde die Wiederanzuchtrate bestimmt.

4.4 Direkter Immunfluoreszenztest

Das Medium in den Wells der infizierten Zellen wurde abpipettiert und die Deckgläschen wurden 48 hpi (hours past infection) mit Methanol für 10 min bei -20°C fixiert. Das Methanol wurde wieder abpipettiert und die fixierten Zellen an der Luft getrocknet. Die Deckgläser wurden für die Färbung mit der Zellseite nach oben in eine neue Zellkulturplatte überführt. Die Zellschicht wurde mit ca. 10 μ l IMAGENTM Chlamydia Reagenz (FITC-konjugierter monoklonaler Antikörper gegen Chlamydien-LPS, Oxoid), das vor Gebrauch 1:2 mit Evansblue verdünnt wurde, bedeckt. Der Antikörper wurde bei 37°C abgedunkelt in einer feuchten Kammer für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser mit PBS gewaschen und auf einen Objektträger mit der Zellseite nach unten in einen Tropfen Mounting Fluid (IMAGENTM Chlamydia Kit von Oxoid) gelegt. Das Deckgläschen wurde mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert. Am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop) erfolgte die Bestimmung der Infektionsrate. Die gefärbten Präparate konnten bei 4°C im Dunkeln für mehrere Wochen gelagert werden.

4.5 Indirekter Immunfluoreszenztest

Der indirekte IFT wurde in 24-Well Platten durchgeführt. Die Fixierung der Zellen entsprach der beim direkten IFT. Unter Verwendung von Combitips wurden pro Well 300 μl des 1:50 mit PBS verdünnten Primärantikörpers pipettiert (der Primärantikörper wurde freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Professor H. Brade, FZ Borstel). Dieser Antikörper ist ein anti-Chlamydien-LPS-AK aus der Maus. Er wurde für 45-60 min im 37°C Brutschrank inkubiert. Der Primärantikörper wurde daraufhin abpipettiert und für eine nochmalige Nutzung bei 4°C im Dunkeln gelagert. NaN_3 Zugabe sorgte für längere Haltbarkeit. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die noch feuchten Zellen wurden mit 300 μl pro Well des 1:250 mit PBS verdünnten Sekundärantikörpers unter den gleichen Bedingungen im Dunkeln inkubiert. Der Sekundärantikörper (FITC-konjugierter anti-mouse-AK, DAKO) wurde nach der Inkubation verworfen und die Zellen nochmals zweimal mit PBS gewaschen. Am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop) erfolgte die Bestimmung der Infektionsrate.

4.6 Bestimmung der Zellvitalität

Die zu färbenden HEp-2 Zellen (auf DG) wurden mit PBS gewaschen. Für die Markierung der lebenden Zellen wurde SYTO 16 green fluorescent nucleic acid stain (1 mM gelöst in DMSO, Molecular Probes) verwendet. Der Farbstoff für das Anfärben der toten Zellen war Ethidium homodimer-2 (1 mM gelöst in DMSO). Dieser Fluoreszenzfarbstoff wurde von Zellen mit intakter Zytoplasmamembran nicht aufgenommen, drang jedoch in tote Zellen schnell ein. Somit wiesen lebende Zellen eine Grünfluoreszenz und tote Zellen eine Rotfluoreszenz auf. Von den beiden Farbstoffen wurde je 1 μl auf 200 μl PBS gegeben. Die DG mussten gut bedeckt sein und die Farbstoffe für 1 h bei 37°C inkubieren. Nach der Färbung wurden die DG mit PBS gewaschen und mit 1%iger Paraformaldehyd-Lösung für 15 min bei RT fixiert. Die quantitative Bestimmung lebender und toter Zellen erfolgte durch Auszählung von jeweils zehn zufällig ausgewählten Bildausschnitten des entsprechenden DG, aus denen der Mittelwert berechnet wurde.

4.7 MTT-Assay

Der MTT-Test ist ein Zytotoxizitäts-Test, bei dem die Zellen *in vitro* mit dem namensgebenden Farbstoff, einem gelben Tetrazoliumsalz, behandelt werden. Er dient dazu die Lebensfähigkeit beziehungsweise den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe zu messen. Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan, was fotometrisch detektiert wird. Der Test wurde in transparenten 96-Well Platten durchgeführt. Es wurden 25×10^3 HEp-2 Zellen pro Well eingesät in einem Gesamtvolumen von $100 \mu\text{l}$. Am nächsten Tag wurde dem Medium die zu testende Substanz (Tanshinone IIA) in einer Verdünnungsreihe zugefügt, wobei jede Verdünnungsstufe in einer 4-fach Bestimmung angesetzt wird. Eine Negativkontrolle mit unbehandelten Zellen wird immer mitgeführt. Der AP-1 Inhibitor Tanshinone IIA wurde für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde jedem Well $10 \mu\text{l}$ der MTT-Lösung zugefügt und für 4 h bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wurden in metabolisch aktiven Zellen der wasserlösliche Farbstoff reduziert zum blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten kurz zentrifugiert (1500 UpM , 2 min, RT) und der Überstand abpipettiert. Die wasserunlöslichen Salze wurden mit einem Reagenz bestehend aus DMSO, Essigsäure und SDS aufgelöst (5 min schüttelnd inkubieren) um dann die Absorption der Lösung bei 595 nm zu quantifizieren.

4.8 Vorbereitungen für EM-Aufnahmen

Die Ansätze für die EM-Aufnahmen wurden als Dreifachbestimmung angesetzt. Dafür wurde in einer 24-Well Platte je ein Thermanox Plastic Coverslip pro Well gegeben. Nach Auszählung der HEp-2 Zellsuspension wurden ca. 3×10^5 Zellen in jedes Well zugefügt, die über Nacht an der Thermanox-Plättchen adhären. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit *C. pneumoniae*. Das Medium der infizierten Zellen wurde 48 hpi verworfen und die Zellen mit 1 ml pro Well des speziellen Fixans Monti fixiert, das 5% Glutaraldehyd enthält. Die Platte wurde mit Alufolie umwickelt, so dass die Zellen abgedunkelt bei 4°C einige Wochen gelagert werden konnten. Die weiteren

Arbeitsschritte sowie die Aufnahmen der EM-Bilder wurden dankenswerter Weise von Mitarbeitern des Instituts für Anatomie der Universität Lübeck unter der Leitung von PD Dr. med. Matthias Klinger durchgeführt [170].

4.9 Proteinbiochemische Methoden

4.9.1 Probenaufarbeitung

Die Probengewinnung erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion. Untersucht wurden Proben aus der frühen Phase des Entwicklungszyklus von *Cpn* (4 hpi), der mittleren Phase (24 hpi) und der späten Phase (48 und 72 hpi). Das Medium der zu erntenden HEp-2 Zellen wurde abpipettiert. Die Zellen wurden daraufhin sofort unter Zugabe von 300 μ l Lysispuffer I pro Well lysiert und das Lysat in Eppendorfgläser pipettiert und schnell auf Eis gestellt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -25°C . Bei der Ernte der infizierten Monozyten wurden die teils adhärenen Zellen vorsichtig mit einem Gummispatel vom Boden der Wells gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Eppendorfglas pipettiert und zentrifugiert (2000 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 μ l Lysispuffer I aufgenommen und bis zur Analyse im Western Blot bei -25°C gelagert. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden alle Proben 5 min bei 95°C denaturiert.

Für die Herstellung von Proteinextrakten für den Degradations Assay wurde der Lysispuffer II verwendet, bei dem die Funktionalität der Proteine erhalten blieb. Das Medium der zu erntenden HEp-2 Zellen wurde abpipettiert und der Zellrasen mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in PBS vorsichtig abgeschabt und in ein Eppendorfglas überführt und zentrifugiert (2000 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 μ l Lysispuffer II resuspendiert. Die Extrakte wurden bei 4°C für maximal eine Woche gelagert.

4.9.2 Degradations Assay

Für den Degradations Assay wurden Proteinextrakte aus *c-Jun* transfizierten, *Cpn* infizierten und nicht infizierten HEp-2 Zellen verwendet. Des Weiteren wurde das radioaktiv markierte *c-Jun* aus der IVTT (siehe Abschnitt 4.13.5) für diesen Assay genutzt. Die Proteinextrakte der *c-Jun* transfizierten Zellen wurden mit Extrakten

aus *Cpn* infizierten Zellen (hergestellt 48 hpi) zusammen für 1 h im 37°C Wasserbad inkubiert. Als Kontrollansatz wurden Extrakte aus nicht infizierten Zellen mit dem c-Jun Extrakt ebenfalls für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde den Ansätzen SDS-Probenpuffer (= Lysispuffer I) zugefügt und die Proteinproben für 5 min bei 95°C denaturiert. Bei Verwendung des radioaktiv markierten c-Jun aus der IVTT wurde ebenso vorgegangen. Bei einigen Ansätzen wurde dem Proteinextrakt aus *Cpn* infizierten Zellen zuvor ein Antikörper gegen CPAF zugefügt und für 2 h bei RT schwenkend inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz Protein A beads zugefügt, an die sich die in der Suspension befindlichen Antikörper mit ihren gebundenen Antigenen über ihre Fc-Regionen binden. Die Protein A beads inkubierten über Nacht und wurden anschließend kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und für den Degradations Assay weiter verwendet. Der gleiche Ansatz wurde auch mit einem Antikörper gegen Chlamydien-LPS (von Prof. Brade - FZ Borstel) durchgeführt. Alle Ansätze aus dem Degradation Assay wurden durch eine SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt. Im weiteren Verlauf wurden die Ansätze, bei denen radioaktives c-Jun verwendet wurde, im Phosphoimager ausgewertet und die anderen Ansätze im Western Blot analysiert.

4.9.3 SDS-PAGE

Die verschiedenen Proteine eines zu untersuchenden Lysates mussten als erstes elektrophoretisch getrennt werden. Die Trennung erfolgte durch eine SDS-PAGE (Sodium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach der Molekularmasse der Proteine. Durch das SDS wurde die Eigenladung der Proteine so verändert, dass sie eine gleichmäßige negative Ladung erhielten. Das Erhitzen der Proben auf 95°C und das im Probenpuffer enthaltene DTT löste die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine auf, so dass nur noch gestreckte Monomere vorlagen. Durch die gleichmäßig negative Ladung wanderten die Proteine zur Anode und trennen sich im Gel der Größe nach auf. Die selbst gegossenen SDS-Polyacrylamid-Minigele unterteilten sich in Sammelgel (5% Acrylamid) und Trenngel (12% Acrylamid). Das Trenngel besaß eine Stärke von 1,0 mm. Die radikalische Polymerisation wurde durch den Zusatz von TEMED und APS eingeleitet. Unmittelbar nach dem Gießen wurde das Trenngel mit

Aqua dest. überschichtet, um unter Luftabschluss eine gleichmäßige Polymerisation und eine exakte Grenzschicht zu erhalten. Die Polymerisation war nach etwa 30 min abgeschlossen. Nach Entfernen des Wassers mit einem Filterpapier wurde das 5%ige Sammelgel gegossen. Sofort nach dem Gießen wurde ein 15er Kamm in das Sammelgel eingesetzt und die Kanten des Gels mit Agarose abgedichtet. Nach ca. 30 min war das Gel auspolymerisiert und der Kamm konnte entfernt werden. Die Gele wurden in die Vertikalelektrophorese-Kammer eingespannt und mit 500 ml Elektrophoresepuffer überschichtet. Nach 5-minütiger Denaturierung im Heizblock bei 95 °C und anschließendem kurzen Vortexen wurden 30 µl jeder Proben mit speziellen Gelloader Tips (Prot/Elect Tips, Bio-Rad) auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurden 7 µl des Markers (Prestained Protein Marker, Broad Range von New England Biolabs; Molekulargewichtsbereich: 7-175 kDa) eingesetzt. Die Proteine durchliefen zunächst das Sammelgel für 15 min bei 70 V. Mit dem Erreichen des Trenngels wurde auf 200 V erhöht und die Proteine für 55 min der Größe nach getrennt.

4.9.4 Western Blot

Der Western Blot ist eine immunologische Methode, da der Nachweis von einem spezifischen Protein mit Hilfe von Antikörpern durchgeführt wird. Der eigentliche Blot ist nur der Teil, bei dem die Proteine aus einem Gel auf eine spezielle Membran (PVDF oder Nitrocellulose) transferiert werden. Die sich anschließenden Arbeitsschritte (Immundetektion, Visualisierung und Stripping) werden ebenfalls in diesem Abschnitt beschrieben.

4.9.4.1 Blotten Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine sind im Gel immunologischen Analysen schwer zugänglich. Daher wurden die Proteine nach der SDS-PAGE unter Beibehaltung des vorhandenen Bandenmusters aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran elektrophoretischen transferiert. In dieser Arbeit wurde dafür der Wet-Blot verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel vom Sammelgel abgetrennt. Die Blotkassetten werden ausgehend von der schwarzen Seite (negative Elektrode - Kathode) in folgender Reihenfolge beladen: Schaumstoffschwamm, Blotpapier, Trenngel, Membran, Blotpapier, Schaumstoffschwamm. Es wurde darauf

geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Membran und Gel befinden. Die Blotapparatur wurde in die Blotkammer eingesetzt und mit 4 °C kaltem Blotpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 75 V für 90 min, wobei die Apparatur durch Eisblocks ständig gekühlt wurde. Nach dem Blotten wurden die unspezifischen Proteinbindestellen für eine Stunde abgeblockt. Dafür wurde eine 5%ige Lösung aus Trockenmilchpulver verwendet (angesetzt mit T-TBS Puffer) und die Blots damit auf einem Taumelschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Membranen zweimal für je 15 min mit T-TBS Puffer gewaschen.

4.9.4.2 Immundetektion Der Primärantikörper wurde mit der 5%igen Blocklösung verdünnt und bei 4 °C schüttelnd über Nacht inkubiert wobei er an das nachzuweisende Protein auf der Nitrocellulose Membran bindet. Am nächsten Tag wurden die Membranen zweimal für je 15 min mit T-TBS Puffer gewaschen. Darauf folgte eine einstündige Inkubation des Sekundärantikörpers, der zuvor im Verhältnis 1:4000 genauso verdünnt wurde wie der Primärantikörper. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler. Es musste darauf geachtet werden, dass der Sekundär-AK gegen Immunglobuline der Spezies gerichtet ist, aus der der Primär-AK stammt (ein anti-rabbit Sekundärantikörper bindet nur an einen rabbit-AK). Die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper sind gekoppelt mit dem Enzym HRP (horseradish peroxidase), das bei der späteren Visualisierung von Bedeutung ist. Nach der Inkubation des Sekundär-AKs wurden die Blots nochmals gewaschen.

4.9.4.3 Visualisierung Mit Hilfe eines ECL-Kits wurden die spezifisch markierten Proteinbanden visualisiert. Das Peroxidasesubstrat Luminol und das Cosubstrat Wasserstoffperoxid wurden durch Mischung gleicher Volumina zusammengebracht, die Membran damit bedeckt und für 5 min inkubiert. Die Substratlösung wurde anschließend durch ein Filterpapier entfernt. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid katalysiert die Peroxidase HRP die Oxidation von Luminol. Ein aktives Intermediat wurde gebildet, welches unter Lichtemission zerfiel. Die Chemolumineszenz trat nur im Bereich der gebundenen Immunkomplexe auf und wurde durch Exposition auf ECL-Filmen in einer Autoradiographiekassette detektiert (wenige Sekunden bis

Minuten). Nach der Belichtung wurden die Proteinbanden in einer Entwicklerlösung sichtbar gemacht und in einer Fixierlösung nach Erreichen der gewünschten Intensität fixiert.

4.9.4.4 Stripping Für den Nachweis, dass von allen Proben gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurden die gebundenen Primär- und Sekundär-Antikörper von der Blotmembran gelöst. Nach zweimaligem Waschen mit T-TBS Puffer wurden die Membranen dafür mit sauren Glycin-Puffer (pH 2,5), der auf 4°C gekühlt war, schüttelnd inkubiert. Mit diesem Strippingpuffer wurden die Membranen dreimal für je 5 min gewaschen, wobei die gebundenen Antikörper gelöst wurden. Nach dem Ablösen wurde die Membranen nochmals zweimal für je 15 min mit T-TBS Puffer gewaschen und anschließend mit 5%iger Blocklösung inkubiert. Darauf folgten die Arbeitsschritte, die unter den Abschnitten 4.9.4.2 und 4.9.4.3 beschrieben wurden, wobei als Primärantikörper ein rabbit-anti- β -Aktin Antikörper verwendet wurde. Der Nachweis von β -Aktin sollte zeigen, dass jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

4.10 Herstellung von Kernextrakten

Da AP-1 als Transkriptionsfaktor hauptsächlich im Kern lokalisiert ist, wurden die Proteine aus dem Zellkern extrahiert. Um die Kernfraktion von der Zytoplasmafraktion zu trennen, wurden die Zellen, nachdem sie mehrmals mit kaltem PBS gewaschen wurden, in einem milden Lysispuffer (Puffer A) aufgenommen, der die Zellmembran zerstört. Durch Zentrifugation (5 min, 2100 rpm, 4°C) wurden die Zellorganellen pelletiert und von der zytoplasmatischen Fraktion im Überstand getrennt. Das Pellet, das die Zellkerne enthält wurde in einem hypertonen Puffer aufgenommen (Puffer C), durch Zugabe eines Magnetkügelchens für 1 h bei 4°C mechanisch aufgeschlossen und die Kernproteine in den Überstand freigesetzt. Durch Zentrifugation (15 min, 11.000 g, 4°C) wurden die Membranreste von den Kernproteinen getrennt, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und für weitere Untersuchungen bei -80°C gelagert. Für die Untersuchung der Proteine aus Zytoplasma- und Kernextrakten wurden die jeweiligen Überstände mit SDS-Probenpuffer versetzt (= Lysispuffer I).

4.11 EMSA - electrophoretic mobility shift assay

Um die Bindungsaktivität von AP-1 Proteinen zu bestimmen, wurden die Kernextrakte im „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) analysiert. Im Gegensatz zu den stark denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen im Western Blot-Verfahren, die nur eine Aussage über den totalen Gehalt des untersuchten Proteins erlauben, wurden bei EMSA-Experimenten Gele unter nativen Pufferbedingungen verwendet. Die vor dem Gellauf durchgeführten Bindungsreaktionen von Proteinextrakten mit spezifischen, doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden erlauben die Bindung der nativ in ihrer Struktur enthaltenen Proteine an spezifische DNA-Abschnitte. Im Gel werden anschließend die durch die Bindung entstandenen Protein-DNA-Komplexe in Abhängigkeit von Masse und Größe aufgetrennt, was zu einem charakteristischen Bandenmuster führt. Die 19 bp langen Sequenzen der DNA-Oligonukleotide enthalten die Konsensussequenz von AP-1-Bindungsstellen.

4.11.1 Herstellung einer AP-1 Sonde

Die Oligonukleotide, die die Konsensussequenz der AP-1 Bindungsstelle enthalten, wurden mit einer T4 Polynukleotid-Kinase in Gegenwart von γ - ^{32}P ATP (Hartmann Analytic GmbH) radioaktiv markiert. Die T4 Polynukleotid-Kinase katalysierte den Transfer des ATP-Phosphats an das 5'-Hydroxylende der DNA. Der Reaktionsansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 20 μl durchgeführt und wie folgt pipettiert:

- 14 μl Aqua dest.
- 2 μl Phosphorylation buffer (10-fach konzentriert)
- 1 μl Oligonukleotid a (20 pmol)
- 1 μl T4 Polynukleotid-Kinase (10 U)
- 2 μl γ - ^{32}P ATP (0,74 MBq)

Als Reaktionspuffer diente der mit der T4-Polynukleotidkinase gelieferte Puffer. Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, worauf eine 5 minütige Inkubation bei 95 °C folgte. Daraufhin wurden dem Ansatz 1 μl MgCl_2 (2 mM) und 2 μl des Oligonukleotids b zugefügt. Während der Ansatz langsam abkühl-

te hybridisierten die Oligonukleotide a und b und bildeten so die radioaktiv markierte Sonde. Am nächsten Tag wurde die Sonde über eine Sephadex-Säule gereinigt um die radioaktiv markierten Oligonukleotide von ungebundenem γ - ^{32}P ATP abzutrennen. Dafür wurde eine Spritze mit silanisierter Glaswolle abgedichtet und in ein 10 ml Röhrchen gestellt. Die Spritze wurde mit einem 25%igem Sephadexgel luftblasenfrei befüllt und für 3 min bei 1200 UpM zentrifugiert. Zu dem 20 μl Reaktionsansatz wurden 80 μl Aqua dest. pipettiert und auf die Sephadexsäule gegeben. Daraufhin wurde ein Eppendorfgefäß unter die Spritze gestellt und die fertige Sonde für 3 min bei 1200 UpM in dieses abzentrifugiert. Von der fertigen Sonde wurde 1 μl mit 2 ml Szintillationslösung (Rotiszint[®]eco plus) gemischt und die Aktivität im Liquid Scintillation Counter gemessen.

4.11.2 Radioaktive Markierung der Kernproteine

In einem weiteren Reaktionsansatz wurden die aus infizierten HEp-2 Zellen oder Monozyten isolierten Kernproteine mit der radioaktiv markierten Sonde, die die AP-1 Bindungsstelle enthielt, zusammengebracht. Dieser EMSA-Ansatz wurde ebenfalls in einem Gesamtvolumen von 20 μl durchgeführt:

- 6 μl Aqua dest.
- 5 μl Kernextrakt (ca. 5 μg)
- 5 μl Binding-Buffer
- 3 μl Salmon Sperm DNA (300 ng)
- 1 μl radioaktiv markierte Sonde (ca. 35 000 CPM)

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Salmon Sperm DNA wurde zugesetzt, um unspezifische Bindungen anderer Kernproteine an die AP-1 Sonde zu verhindern. Der EMSA-Ansatz wurde z.T. durch die Zugabe eines Competitors ergänzt. Der Competitor ist ebenfalls eine AP-1 Sonde, die allerdings nicht radioaktiv markiert wurde. Er wurde in dreifach höherer Konzentration eingesetzt und vor Zugabe der radioaktiv markierten Sonde 1 h bei RT inkubiert. In dieser Zeit banden alle AP-1 Proteine an den Competitor und die später zugefügte radioaktive Sonde

fand keine Bindungspartner mehr und lief ungebunden durch das Gel (markiert als freie Sonde). Da Ansätze ohne und mit Competitor auf einem Gel gemeinsam liefen, ließ sich auf diese Weise die spezifische AP-1 Bande von unspezifischen Banden unterscheiden.

4.11.3 Gelelektrophorese von DNA-Protein-Komplexen in nativen PAA-Gelen

Die DNA-Protein-Komplexe (u.a. Komplexe aus radioaktiver Sonde und AP-1 Proteinen) wurden in einem nativen 5%igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Zuvor wurde dem 20 μl EMSA-Ansatz 2 μl Ladepuffer zugefügt und der gesamte Ansatz wurde in die Taschen des auspolymerisierten Gels pipettiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 200 V für ca. 2,5 h. Danach wurde das Gel auf 3 Lagen Filterpapier gelegt und mit Folie bedeckt um anschließend in einem Geltrockner für 1,5 h bei 80°C zu trocknen. Für 24 Stunden wurde eine [³²P]sensitive Imager-Platte dem getrockneten Gel exponiert. Die Imager-Platte wurde wiederum in dem Phosphorimager Fuji BAS-1000 eingelesen und mit der Software BAS Reader die Intensität der Radioaktivität angezeigt. Je stärker das Signal (Intensität der Schwärzung) desto mehr DNA-Protein-Komplexe sind in der jeweiligen Probe vorhanden. Die Intensität des Signals entsprach der AP-1 Bindungsaktivität.

4.12 Messung des ATP-Gehalts

Für die Messung des ATP-Gehalts von *Cpn* infizierten Zellen wurde das Kit PhosphoWorks™ Luminometric ATP Assay (ABD Bioquest) verwendet. Der Assay wurde in weißen 96-Well Platten durchgeführt. Er ist extrem sensitiv, weshalb nur 5 000 Zellen pro Well eingesät wurden und über Nacht inkubiert wurden. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 100 μl . Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit *Cpn* und die anschließende Zugabe des AP-1 Inhibitors Tanshinone IIA. Direkt im Anschluss, sechs und zwölf Stunden nach der Infektion bzw. Tanshinone IIA Gabe, wurde die Messung gestartet. Dafür wurden aus jedem Well 50 μl Medium entnommen und mit 50 μl der ATP-Lösung ersetzt. Die ATP-Lösung wurde den Angaben des Herstellers entsprechend angesetzt und in gebrauchsfertige Portionen aliquotiert um so mehrmaliges

Auftauen zu vermeiden. Beim Arbeiten wurde darauf geachtet, alle Bestandteile des Kits lichtgeschützt aufzubewahren und die Arbeitsschritte abgedunkelt zu erledigen. Nach dem Zufügen der ATP-Lösung wurde die Platte deshalb mit Alufolie umwickelt und für 15 min auf einem Schüttler inkubiert. Der Nachweis von ATP mit Hilfe der Biolumineszenz ist eine bewährte Methode. Bei der Biolumineszenz wurde durch das Enzym Luciferase eine ATP verbrauchende Oxidation von Luciferin katalysiert wobei Licht emittiert wurde. Die Lichterzeugung war stöchiometrisch mit dem ATP-Umsatz verknüpft, d.h. je mehr Licht detektiert wurde, umso mehr ATP war vorhanden. Dieses Licht wurde in einem Detektor (Luminometer) mit sehr großer Empfindlichkeit gemessen. Damit gelang es, ATP auch in sehr niedrigen Konzentrationen quantitativ nachzuweisen. In dem verwendeten ATP Assay Kit kam die Luciferase aus dem amerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (firefly) zum Einsatz.

4.13 Molekularbiologische Methoden

4.13.1 RNA-Isolation

Mittels des Kits NucleoSpin[®] RNA II von Macherey Nagel erfolgte die RNA-Isolierung aus HEp-2 Zellen. Dazu wurden die Zellen aus einem 6-Well zunächst in 350 μ l Lysispuffer lysiert. Vor Gebrauch musste β -Mercaptoethanol im Verhältnis 1:100 dem Lysispuffer RA1, der Bestandteil des Kits ist, zugefügt werden. Die RNA war bis zu einem Jahr haltbar, da sie bei -70 °C gelagert wurde. Die Isolation der RNA aus dem Lysat beruhte auf der Bindung der RNA an einer Silikatsäule. Die Bindung ist reversibel und hängt vom pH-Wert und der umgebenen Salzkonzentration ab. Über verschiedene Waschschriffe und einem DNase-Verdau wurde die RNA nach Herstellerangaben isoliert. Am Ende der Extraktion wurde sie mit 60 μ l RNase freiem Wasser durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min von der Säule eluiert. Direkt nach der Isolation wurde die Reverse Transkription angeschlossen.

4.13.2 Reverse Transkriptase-PCR

Da die RNA nicht direkt als Template in die PCR eingesetzt werden konnte, musste zunächst die RNA in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies erfolgte durch RNA-abhängige DNA-Polymerasen, sogenannte reverse Transkripta-

sen. Der Reaktionsansatz, der ein Gesamtvolumen von 20 μl hatte, wurde in 0,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert:

Reagenzien	Volumen/Ansatz	Endkonzentration
5xReaktionspuffer	4,0 μl	1 x
dNTP Mix	2,0 μl	1 mM
Random Primer	2,0 μl	0,04 U/ μl
RNase Inhibitor	0,5 μl	50 U
Reverse Transkriptase	0,5 μl	20 U
RNase freies, steriles Wasser	6,0 μl	–
RNA Probe	5,0 μl	$\approx 1 \mu\text{g}$
Gesamtvolumen	20 μl	

Die reverse Transkription wurde im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Vorgang	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]
Hybridisierung	25	10
Transkription in cDNA	50	60
Inaktivierung des Enzyms	85	5
Kühlung	4	∞

Nach Beendigung des Programms wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.13.3 Real-time PCR

Bei dieser Methode handelt es sich um eine quantitative PCR, bei der aus der Menge an amplifiziertem Produkt auf die Menge der eingesetzten RNA-Matrize geschlossen werden kann. So konnte eine Aussage über die Transkriptionshäufigkeit bestimmter Gene getroffen werden. Die Real-time PCR wurde in einem Thermocycler für LightCycler Kapillaren durchgeführt. Dort wurden die PCR-Produkte direkt während ihrer Entstehung erfasst. Während der PCR wird der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green in die DNA eingebaut. In dieser Arbeit wurde das Gen *glut-1* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion *Cpn* untersucht, wobei das Gen für die 18S rRNA als unreguliertes Referenzgen (housekeeping gene) diente. Da durch Hypoxie (2% Sauerstoff) Glut1 induziert wird, wurde ein Kontrollansatz, in dem HEp-2 Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, für dieses Experiment mitgeführt. Für die Real-time PCR wurden 2 μ l der cDNA aus der RT-PCR als Template eingesetzt. Der Ansatz setzte sich im Ganzen wie folgt zusammen:

LightCycler [®] FastStart Reaction Mix SYBR Green	2,0 μ l
MgCl ₂	0,8 μ l
Forward-Primer (20 pmol/ μ l)	1,5 μ l
Reverse-Primer (20 pmol/ μ l)	1,5 μ l
c-DNA Probe	2,0 μ l
Aqua dest.	12,2 μ l

Dem LightCycler[®] FastStart Reaction Mix SYBR Green wurde dem Protokoll entsprechend vor der Verwendung 10 μ l LightCycler[®] FastStart Enzyme zugesetzt, welche die Taq DNA Polymerase beinhaltet. Als Negativkontrolle wurde dem Ansatz anstatt der c-DNA Probe lediglich Wasser zugefügt. Die Durchführung und Auswertung der Real-time PCR erfolgte mit dem Programm LightCycler Data Analysis.

4.13.4 Transiente Transfektion

Die Zellen wurden in 24-Well oder 6-Well Platten bis zu einer Konfluenz von 60-70% am Tag der Transfektion kultiviert und unter Einsatz von TurboFect[™] (Fermentas)

nach den Angaben des Herstellers mit dem Plasmid pcDNA3-c-Jun transfiziert. Dafür wurde pro Well einer 6-Well Platte folgender Ansatz zupipettiert:

Medium (RPMI, ohne FKS, ohne AB)	500 μ l
TurboFect™ <i>in vitro</i> Transfection Reagent	5 μ l
c-Jun Plasmid	2 μ g

Um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen, wurde nach Zugabe des Transfektionsansatzes die Platte leicht geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen im 37°C-Inkubator kultiviert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit *Cpn* infiziert. Ebenfalls 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für die Herstellung eines c-Jun haltigen Proteinextrakts für den Degradations Assay geerntet.

4.13.5 In vitro Transkription/Translation (IVTT)

Für die In vitro Transkription/Translation (IVTT) wurde das TNT®T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) auf Basis von Retikulozytenlysat verwendet. Das mit diesem Kit in vitro transkribierte und translatierte c-Jun wurde während der Proteinsynthese mit ³⁵S-Methionin (Amersham) radioaktiv markiert. Der 25 μ l-Ansatz für die IVTT wurde wie folgt pipettiert:

c-Jun Plasmid	2,5 μ l (ca. 1 μ g)
Retikulozyten-Lysat	12,5 μ l
Aqua dest.	9,0 μ l
(³⁵ S)-Methionin	1,0 μ l

Der Ansatz wurde für 90 min bei 30°C inkubiert. In dieser Zeit läuft die IVTT ab und das radioaktiv markierte Protein c-Jun entsteht. Um zu überprüfen, ob die IVTT erfolgreich war, wurde ein 12%iges SDS-Gel gegossen und 1 μ l vom IVTT-Ansatz mit Wasser und Ladepuffer versetzt und im Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel getrocknet und anschließend über Nacht auf einer Imager-Platte inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte in einem Imager eingelesen und auf das Vorhandensein einer distinkten radioaktiven Proteinbande untersucht. Sofern

diese vorhanden war, galt die IVTT als erfolgreich und der Ansatz wurde für den Degradations Assay weiter verwendet.

4.13.6 Transformation von *E. coli* Zellen

Die chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen wurden freundlicher Weise von Beate Jonas aus der Arbeitsgruppe von Prof. Knobloch zur Verfügung gestellt. Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen diente der Amplifikation des c-Jun- und des Kontrollplasmids. Beide Plasmide wurden freundlicher Weise von Prof. Dubiel aus Berlin zur Verfügung gestellt. Bei dem für die Transformation genutzten Stamm handelte es sich um *E. coli* TOP10. Die kompetenten Zellen dieses Stamms wurden schnell aufgetaut und sofort auf Eis gestellt. 100 μ l der kompetente Zellen wurden mit 1 μ l Plasmid-DNA (0,1 bis 1 μ g DNA) gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 50 Sekunden auf 43 °C erhitzt und nach Zugabe von 250 μ l SOC-Medium für weitere 60 Minuten bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

SOC-Medium (pH 7,0):

20,0 g/l Trypton

5,0 g/l Hefeextrakt

0,6 g/l NaCl

0,5 g/l KCl

20 mM Glukose

20 mM MgCl₂

Der Ansatz wurde danach auf selektiven LB-Agarplatten, die 100, μ g/ml Ampicillin zur Selektion enthielten, ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Eine Bakterienkolonie wurde steril entnommen und in 5 ml LB-Flüssigmedium in ein Reagenzglas überführt und schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde nach ca. 8 Stunden Inkubation eine Hauptkultur angelegt. Dafür wurden von der Vorkultur 1 ml steril entnommen und zu 100 ml flüssigem LB-Medium in einem Rundkolben gegeben, der ebenfalls das Selektionsantibiotikum Ampicillin enthielt. Die Hauptkultur wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln

inkubiert.

4.13.7 Isolation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA wurden die Reagenzien des peq-GOLD Fastfilter Plasmid Midi Kits (Peqlab) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Kit erlaubte den Einsatz von bis zu 100 ml Flüssigmedium und dient somit der Isolierung größerer Plasmidmengen. Von der Übernachtskultur wurden 75 ml in Reaktionsgefäße überführt und für 1 Minute bei 5000 x g abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde sorgfältig resuspendiert und lysiert wodurch es zur Freisetzung der Plasmid-DNA kam. Anschließend wurde das Lysat gefiltert und so von gefällten Proteinen und chromosomaler DNA befreit. Das geklärte Lysat wurde auf eine äquilibrierte Säule pipettiert. Bei diesem Schritt band die Plasmid-DNA an die Säule und wurde in weiteren Schritten mehrmals gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit sterilem Wasser von der Säule eluiert. Durch Zufügen von Isopropanol wurde die Plasmid-DNA aus dem Eluat gefällt und die Lösung anschließend für 30 min bei 15 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 15 000 x g und RT. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet für 10 min bei RT getrocknet um das Ethanol restlos zu entfernen. Das getrocknete DNA-Pellet wurde mit sterilem deionisiertem Wasser gelöst. Die Konzentration der im Wasser gelösten Plasmid-DNA wurde bestimmt und die DNA bei -20 °C aufbewahrt.

4.13.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration wässriger DNA-Lösungen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Ein Absorptionswert (A_{260}) von 1,0 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für doppelsträngige DNA. Der Quotient aus $A_{260/280}$ lieferte eine Aussage über die Reinheit der DNA-Lösung. Bei reinen Nukleinsäurepräparationen liegt der Wert des Quotienten bei ca. 1,8. Die Konzentration berechnet sich wie folgt:

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g}/\text{ml}) = \text{Absorption } 260 \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Plasmid-DNA wurde 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und die Konzentration in UV-durchlässigen Plastikkuvetten photometrisch am SmartSpec Plus Spektrophotometer gemessen.

4.14 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Student's t-Tests in Excel durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + Standardabweichung dargestellt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant (\star) angesehen. Es wurde ein zweiseitiger Test durchgeführt mit Stichproben unterschiedlicher Varianz (heteroskedastisch).

5 Ergebnisse

5.1 AP-1 Proteine werden in der frühen Phase der akuten *C. pneumoniae* Infektion hochreguliert

Chlamydia pneumoniae (*Cpn*) ist ein Bakterium, das durch seine obligat intrazelluläre Lebensweise starken Einfluss auf seine Wirtszelle nimmt. Es wurde u.a. gezeigt, dass Transkriptionsfaktoren in ihrer Expression durch die Infektion mit *Cpn* verändert sind. In der vorliegenden Arbeit wurde der Transkriptionsfaktor AP-1 in *Cpn* infizierten epithelialen HEP-2 Zellen und Monozyten untersucht. In der epithelialen Zelllinie durchläuft *Cpn* einen replikativen Infektionszyklus. Die Zellen wurden in verschiedenen Stadien des Entwicklungszyklus geerntet und diversen Untersuchungsmethoden unterzogen. Es fanden Untersuchungen in der frühen Phase der Infektion (4, 6 bzw. 8 hpi), in der mittleren Phase (24 hpi) und in der späten Phase der Infektion (48 und 72 hpi) statt. Ein kompletter Zyklus von *Cpn* dauert ca. 72 Stunden. Die Untersuchungen wurden auf eine Auswahl an bestimmten AP-1 Proteinen beschränkt. Aus jeder Familie wurden die wichtigsten und in der Literatur am häufigsten beschriebenen Proteine für die Analyse ausgewählt. Aus der Familie der Jun-Proteine wurden alle Vertreter untersucht (c-Jun, JunB und JunD) und aus der Familie der Fos-Proteine wurden c-Fos und FosB untersucht. ATF-2 wurde als einziger Vertreter aus der ATF-Familie analysiert. Außerdem wurden die phosphorylierten Formen der Proteine c-Jun und ATF-2 untersucht, da bei diesen Proteinen eine Phosphorylierung ein Marker der Aktivierung ist. In der frühen Phase der Infektion mit *Cpn* (4 hpi) kam es in den untersuchten Gesamtzell-Proteinextrakten zu einer Hochregulation der untersuchten AP-1 Proteine (siehe Abbildung 8). Im Western Blot wurde eine besonders starke Hochregulation von ATF-2 nachgewiesen. JunB wies jedoch keine Veränderungen durch die Infektion zu diesem Zeitpunkt auf. Auch durch Hitze inaktivierte Chlamydien kam es zu einer Zunahme des AP-1 Signals im Western Blot, woraus zu schließen ist, dass der Effekt nicht an die Vitalität von Chlamydien gebunden ist. Der zusätzliche Nachweis von β -Aktin von gestrippten Blots zeigt, dass von jeder Probe gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

Von den Proteinen c-Jun und ATF-2 wurden die phosphorylierten Formen unter-

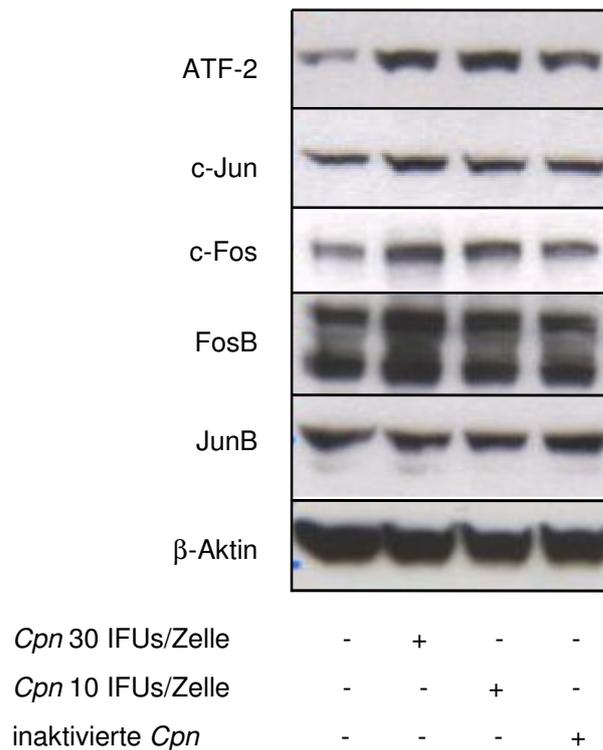


Abb. 8: In der frühen Phase der *Cpn*-Infektion werden AP-1 Proteine induziert. $1,2 \times 10^6$ HEP-2 Zellen wurden sowohl mit einer hohen und einer niedrigen Dosis an lebenden als auch mit Hitze inaktivierten *Cpn* infiziert. Die Dosis an Hitze inaktivierten entsprach dabei der hohen Dosis lebender *Cpn*. Zur Kontrolle wurden nicht infizierte Zellen mitgeführt. Zum Zeitpunkt 4 hpi wurden Ganzzelleextrakte für die Untersuchung im Western Blot hergestellt. Die Proteine ATF-2, c-Jun, c-Fos und FosB konnten in infizierten Zellen in erhöhten Mengen nachgewiesen werden. Lediglich das Protein JunB wies keine Veränderungen durch die Infektion mit *Cpn* zu diesem Zeitpunkt auf. Eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde durch die Detektion von β -Aktin nachgewiesen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, $n=3$.

sucht. Auch sie waren in der frühen Phase der Infektion hochreguliert (siehe Abbildung 9). Die Phosphorylierungen sind ein Marker der Aktivierung dieser Proteine, die die Expression AP-1 kontrollierten Gene in Gang setzen und somit von besonderem Interesse sind.

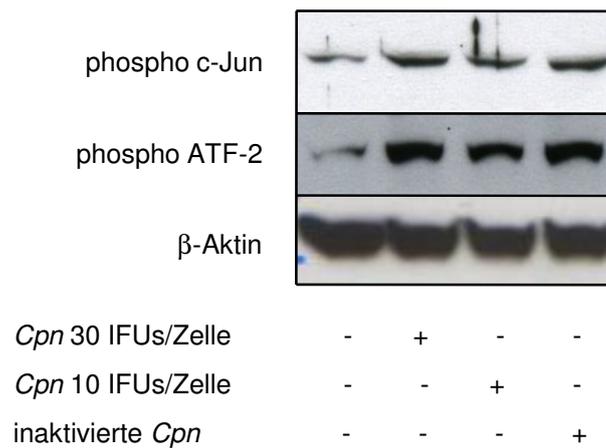


Abb. 9: Aktivierung von AP-1 Proteinen in der frühen Phase einer *Cpn*-Infektion (4 hpi). Die phosphorylierten Formen von c-Jun und ATF-2 stellen die aktivierten Formen dar und wurden im Western Blot 4 hpi mittels spezifischer Antikörper in Ganzzellextrakten nachgewiesen. Durch die Infektion mit lebenden und inaktivierten *Cpn* waren diese Proteine 4 hpi verstärkt exprimiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, n=3.

Um zu zeigen, dass die induzierten AP-1 Proteine transkriptionell aktiv sind, wurde im EMSA (electrophoretic mobility shift assay) die AP-1 Bindungsaktivität in der frühen Phase nach der Infektion gemessen. Bei einer hohen Dosis an vitalen *Chlamydia pneumoniae* lag ein deutlich stärkeres AP-1 Signal als in der Mediumkontrolle vor (siehe Abbildung 10). Ein starkes AP-1 Signal erkennt man anhand der intensiven Schwärzung, die durch die radioaktiv markierte Sonde verursacht wird. Die Infektion der Zellen mit abgetöteten Chlamydien führte ebenfalls zu einem sehr starken AP-1 Signal 4 hpi. Die Infektionsdosis der Hitze inaktivierten Chlamydien entsprach dabei der hohen Dosis an lebenden Chlamydien (30 IFUs/Zelle). Die Proben bei denen der Competitor mit den Kernproteinen vorinkubiert wurde, wiesen keine spezifischen AP-1 Signale mehr auf, da durch den Competitor (unmarkierte Sonde) die AP-1 Proteine bereits gebunden wurden. Unspezifische Banden traten jedoch auch in den Proben auf, die den Competitor enthielten. Auf diese Weise konnte das spezifische AP-1 Signal eindeutig zugeordnet und von unspezifischen Signalen unterschieden werden.

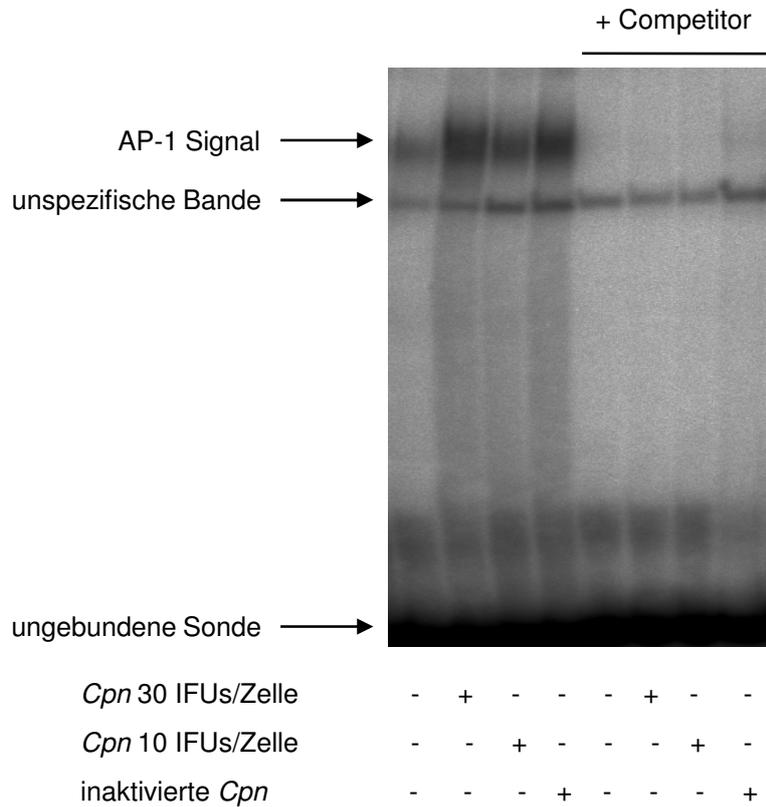


Abb. 10: Erhöhte AP-1 Bindungsaktivität durch *Cpn*-Infektion 4 hpi. Gel-Shift-Analyse aus Kernextrakten von HEp-2 Zellen, die mit einer hohen Dosis, einer niedrigen Dosis und mit Hitze inaktivierten *Cpn* infiziert waren. Durch Zugabe einer ^{32}P -radioaktiv markierten Sonde, die die AP-1 Bindungssequenz beinhaltete, entstanden Komplexe aus AP-1 Proteinen und Sonde. Diese Komplexe wurden in 5%igen Polyacrylamidgelen getrennt von ungebundener Sonde und unspezifischen Komplexen und durch Autoradiographie nachgewiesen. Das spezifische AP-1 Signal wurde durch Verwendung eines Competitors verdeutlicht. Der Competitor ist eine unmarkierte AP-1 Sonde. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, $n=3$.

5.2 AP-1 Proteine sind in der mittleren Phase der Infektion nicht reguliert

Nach einer Infektionsdauer von 24 Stunden führte eine Infektion mit *Cpn* zu keiner Veränderung der AP-1 Proteine im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (Abbildung 11). Auch durch die Inkubation von Hitze inaktivierten *Cpn* war keine Veränderung zur Negativkontrolle detektierbar.

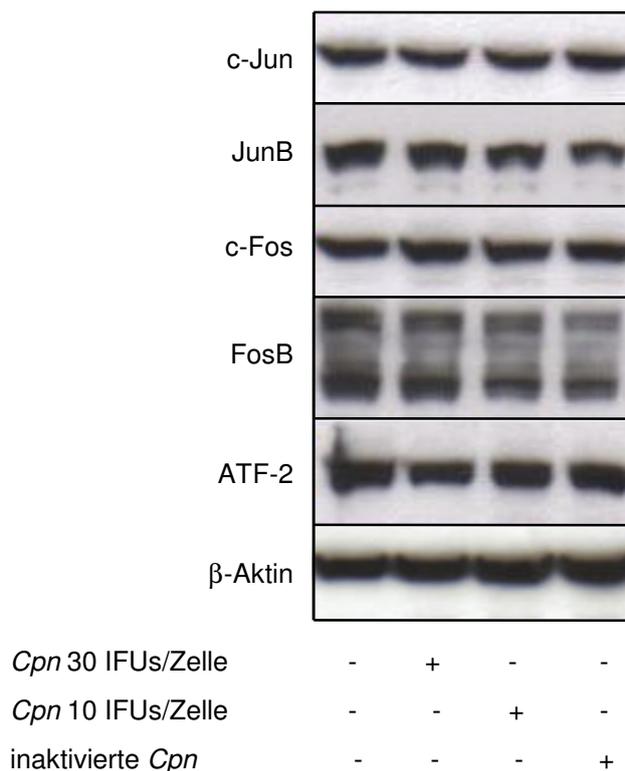


Abb. 11: Nachweis der Expression von AP-1 Proteinen zeigt in der mittleren Phase der Infektion (24 hpi) keine Änderung durch die *Cpn*-Infektion. HEp-2 Zellen wurden sowohl mit einer hohen und einer niedrigen Dosis an lebenden als auch mit Hitze inaktivierten *Cpn* infiziert. Die Dosis an Hitze inaktivierten entsprach dabei der hohen Dosis lebender *Cpn*. Zur Kontrolle wurden nicht infizierte Zellen mitgeführt. Zum Zeitpunkt 24 hpi wurden Ganzzellextrakte für die Untersuchung im Western Blot hergestellt. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, n=3.

Zur Analyse der AP-1 Bindungsaktivität wurden auch zu diesem Zeitpunkt des replikativen Entwicklungszyklus von *Cpn* (24 hpi) die Kernproteine aus den infizierten Zellen isoliert und im EMSA analysiert. Wie schon die Ergebnisse aus dem Western Blot vermuten ließen, war auch hier keine Veränderung durch die Infektion erkennbar.

Die AP-1 Bindungsaktivität war zu diesem Zeitpunkt durch die Infektion unverändert, da die Intensität der Schwärzung bei allen untersuchten Proben gleich stark war. Das AP-1 Signal ließ sich eindeutig zuordnen durch den Vergleich mit den Proben, bei denen der Competitor zugefügt wurde (siehe Abbildung 12). Nach einer Infektionsdauer von 24 Stunden waren die Einschlusskörperchen von *Cpn* noch sehr klein, da erst wenige Replikationszyklen durchlaufen wurden.

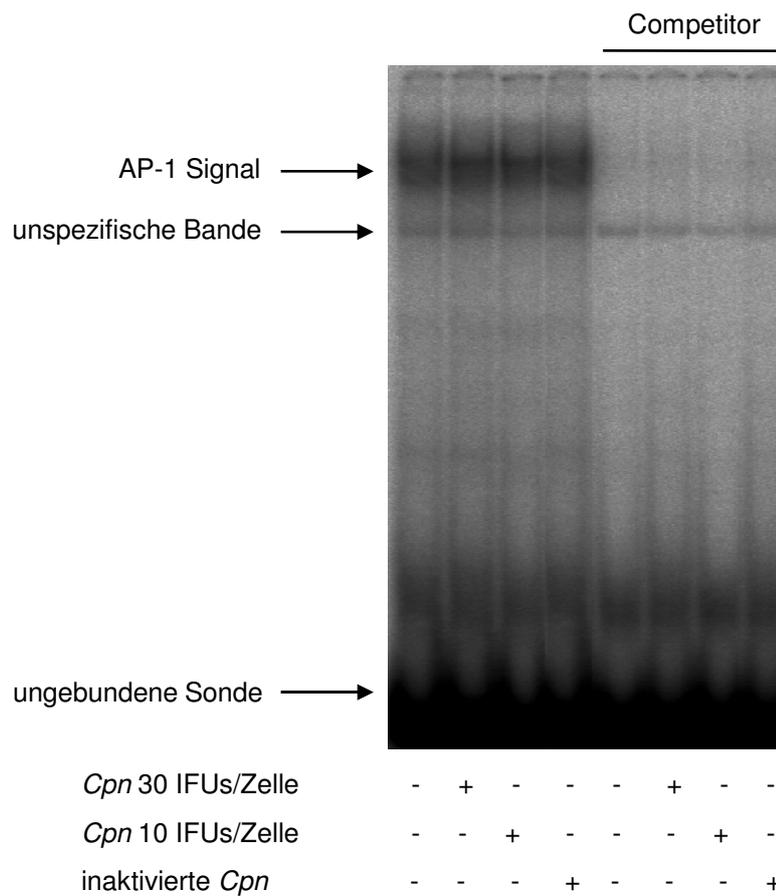


Abb. 12: Die AP-1 Bindungsaktivität ist 24 hpi unverändert. Gel-Shift-Analyse aus Kernextrakten von HEp-2 Zellen, die mit einer hohen Dosis, einer niedrigen Dosis und mit Hitze inaktivierten *Cpn* infiziert waren. Durch Zugabe einer ^{32}P -radioaktiv markierten Sonde, die die AP-1 Bindungssequenz beinhaltet, entstanden Komplexe aus AP-1 Proteinen und der Sonde. Diese Komplexe wurden in 5%igen Polyacrylamidgelen von ungebundener Sonde und unspezifischen Komplexen abgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen. Das spezifische AP-1 Signal wurde durch Verwendung eines Competitors, der eine nicht radioaktive Sonde darstellt, verdeutlicht. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, $n=2$.

5.3 AP-1 Proteine sind in der späten Phase der akuten *C. pneumoniae* Infektion unterschiedlich reguliert

Auch in der späten Phase des Entwicklungszyklus (48 und 72 hpi) wurden Proteinextrakte aus Gesamtzelllysaten im Western Blot untersucht. Zu diesen Zeitpunkten waren die Proteine JunB, JunD, FosB, ATF-2 und phospho-ATF-2 durch die Infektion herunterreguliert. Besonders eindeutig war dies am Protein ATF-2 zu sehen (Abbildung 13), wobei hier auch eine dosisabhängige Regulation zu erkennen war.

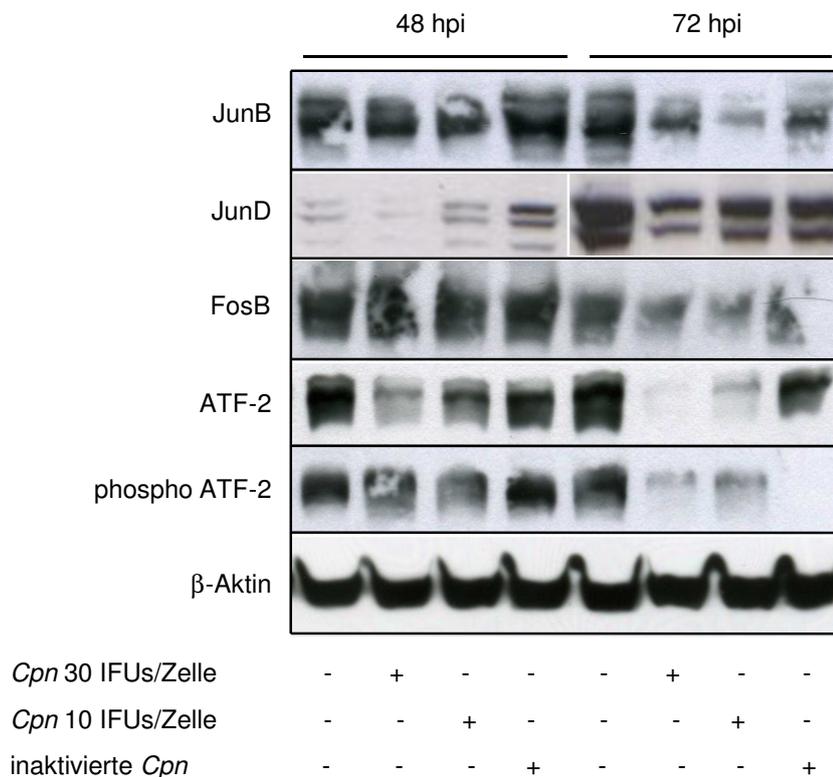


Abb. 13: Verminderte Expression einiger AP-1 Proteine in der späten Phase der Infektion (48 und 72 hpi). Durch die Infektion mit *Cpn* wurden die hier mittels spezifischer Antikörper nachgewiesenen AP-1 Proteine (JunB, JunD, FosB, ATF-2 und phospho-ATF-2) zu den späten Zeitpunkten nach der Infektion (48 und 72 hpi) herunterreguliert. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, n=2.

Bei ATF-2 war zu beiden Zeitpunkten eine infektionsbedingte Abnahme der Proteinmenge detektierbar. Die Runterregulation der phosphorylierten Form von ATF-2 war erst zum Zeitpunkt 72 hpi eindeutig nachweisbar. Die Proteine JunB, JunD und FosB wiesen 48 hpi noch keine stark veränderte Expression durch die Infektion auf,

72 hpi war jedoch eine deutliche Abnahme in der Proteinmenge bei den infizierten Zellen zu beobachten.

Im Gegensatz dazu waren die Proteine c-Jun, phospho-c-Jun und c-Fos in der späten Phase der Infektion hochreguliert. Es war erkennbar, dass es nur durch lebende Chlamydien zu einer Hochregulation dieser Proteine kommt (Abbildung 14). Zellen die nicht infiziert wurden und jene die mit abgetöteten *Cpn* inkubiert wurden, zeigten keine erhöhten Mengen dieser AP-1 Proteine. Der beobachtete Effekt trat nur bei Zellen auf, die mit lebenden Chlamydien infiziert wurden und bei denen eine akute Infektion dieses Erregers im IFT nachgewiesen wurde. Das Protein c-Jun wurde zu diesem Zeitpunkt des Entwicklungszyklus stark phosphoryliert, da große Mengen der phosphorylierten Form detektiert wurden. Nur diese Form ist tatsächlich an der Aktivierung AP-1 regulierter Gene beteiligt.

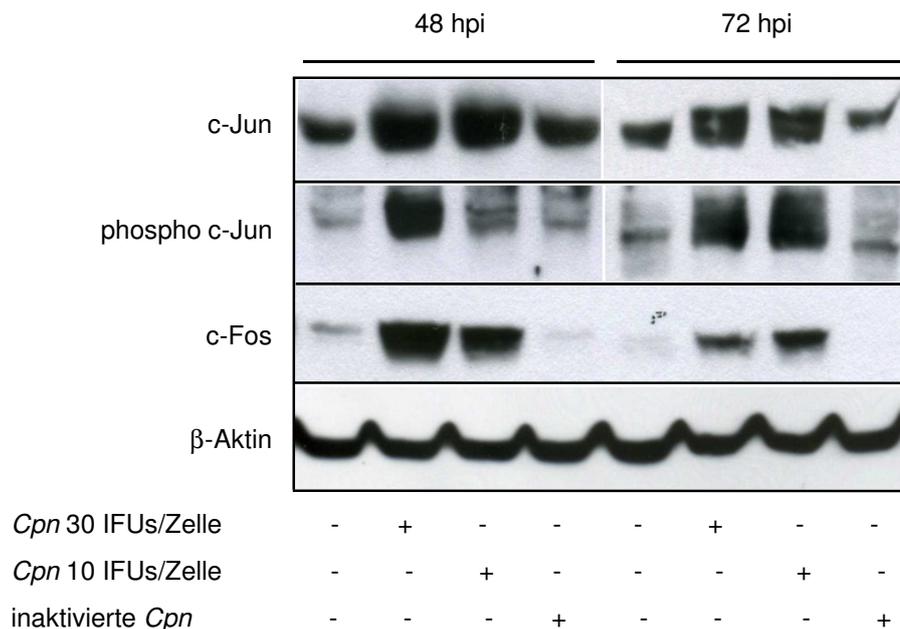


Abb. 14: Verstärkte Expression einiger AP-1 Proteine in der späten Phase der Infektion (48 und 72 hpi). Durch Infektion mit *Cpn* waren die AP-1 Proteine c-Jun, phospho-c-Jun und c-Fos in erhöhter Menge nachweisbar. Die Inkubation von Hitze abgetöteten *Cpn* führte hingegen nicht zu einer erhöhten Proteinexpression zu diesem Zeitpunkt. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, n=3.

5.4 Auswirkungen von AP-1 Inhibitoren auf die akute *C. pneumoniae* Infektion

C-Jun und c-Fos sind wichtige Regulatoren der Differenzierung, der Proliferation und der Apoptose. Da *C. pneumoniae* diese zellulären Prozesse beeinflussen kann und nachgewiesen wurde, dass c-Jun und c-Fos bei einer *C. pneumoniae* Infektion hochreguliert werden, wurde durch Blockierung dieser Proteine untersucht welchen Einfluss AP-1 auf den chlamydialen Entwicklungszyklus nimmt. Für die Blockierung wurde der AP-1 Inhibitor Tanshinone IIA eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass Tanshinone IIA, das ein Extrakt aus den Wurzeln von *Salvia miltiorrhiza Bunge* ist, die Bildung des Komplexes zwischen AP-1 und DNA inhibiert [122].

5.4.1 Ermittlung der idealen Tanshinone IIA Konzentration

Um auszuschließen, dass Tanshinone IIA toxisch für die Zelle ist, wurde die Vitalität der Zellen mittels einer Live-Dead-Färbung untersucht, die 24, 48 und 72 Stunden nachdem der Inhibitor zugefügt wurde, angefertigt wurde. Durch den Farbstoff SYTO 16, der zellpermeabel ist, wurden lebende Zellen angefärbt, die sich im Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszierend darstellen. Um die lebenden Zellen von den toten unterscheiden zu können, wurde zudem der Farbstoff Ethidium homodimer-2 verwendet, der tote Zellen im Fluoreszenzmikroskop rot fluoreszieren lässt. Wie die Abbildung 15 zeigt, waren zu allen untersuchten Zeitpunkten nach der Behandlung mit Tanshinone IIA 99% der Zellen intakt, da sie eine grüne Fluoreszenz aufwiesen. Der AP-1 Inhibitor hat demnach in der eingesetzten Konzentration von 25 μM keine toxische Wirkung auf HEp-2 Zellen.

Des Weiteren wurde ein MTT-Assay durchgeführt mit dem AP-1 Inhibitor Tanshinone IIA. Es wurden verschiedene Konzentrationen des Inhibitors getestet um so einen Konzentrationsbereich zu ermitteln, in denen Tanshinone IIA einsetzbar ist ohne zytotoxisch zu wirken bzw. um zu wissen welche Konzentrationen toxisch sind. In der Abbildung 16 sind die eingesetzten Konzentrationen gegen die gemessenen Absorptionswerte aufgetragen.

Die eingesetzte Konzentration von 25 μM hatte einen Absorptionswert von 0,2

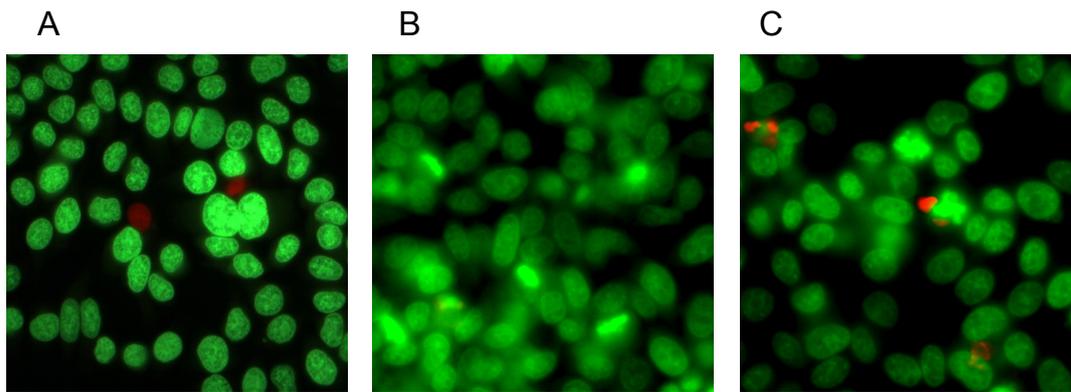


Abb. 15: Live-Dead-Färbung von Tanshinone IIA behandelten Zellen. Anfertigung der Färbung (A) 24 Stunden, (B) 48 Stunden und (C) 72 Stunden nach der Behandlung mit Tanshinone IIA ($25 \mu\text{M}$). Lebende Zellen fluoreszierten in Grün durch den Farbstoff SYTO 16 und tote Zellen fluoreszierten in Rot durch die DNA interkalierende Substanz Ethidium homodimer-2. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, $n=2$.

und lag somit in einem Bereich der den Absorptionswerten geringerer Tanshinone IIA Konzentrationen bzw. der Negativkontrolle entsprach. Eine höhere Konzentration an Tanshinone IIA wirkte sich zytotoxisch aus und konnte deshalb nicht verwendet werden.

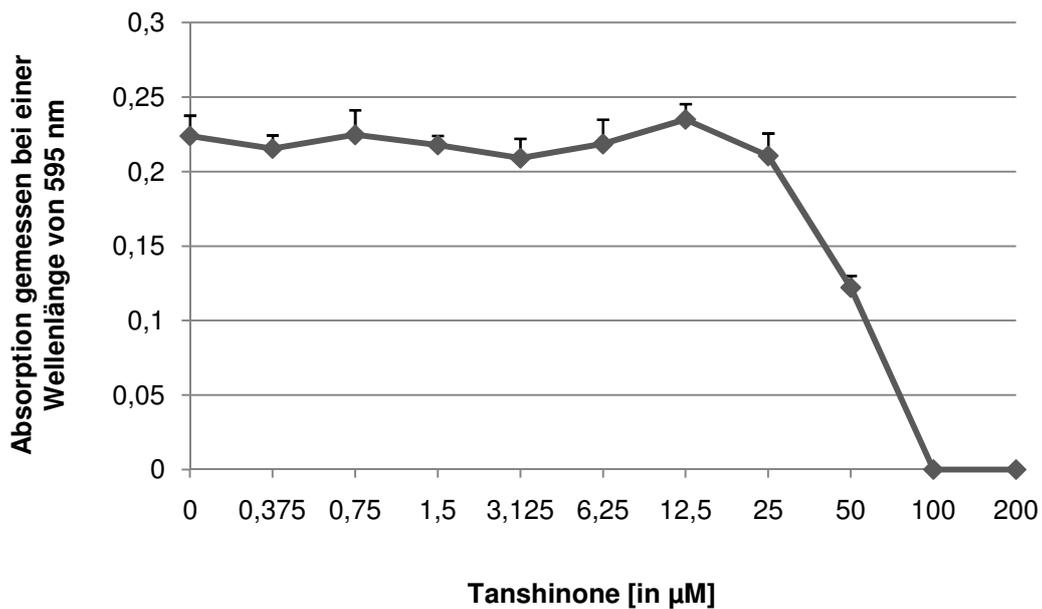


Abb. 16: Laut MTT-Assay ist die verwendete Tanshinone IIA Konzentration von $25\mu\text{M}$ nicht toxisch. Im MTT-Assay wurde der AP-1 Inhibitor Tanshinone IIA auf seine Zytotoxizität getestet. Es wurden die eingesetzten Konzentrationen gegen die bei 595 nm gemessene Absorption aufgetragen. Die in den Experimenten eingesetzte Konzentration von $25\mu\text{M}$ entsprach einer Absorption von ca. 0,2. Wie der MTT-Assay durchgeführt wurde ist unter 4.7 beschrieben. In dem Assay wurde jeder Wert in einer Vierfachbestimmung ermittelt.

5.4.2 Verminderte AP-1 Bindungsaktivität durch Tanshinone IIA

Um zu untersuchen, ob das durch die *Cpn*-Infektion verstärkte AP-1 Signal mit dem Inhibitor Tanshinone IIA geblockt werden kann, wurde die Bindungsaktivität von AP-1 in infizierten HEP-2 Zellen im EMSA ermittelt. Den Zellen wurde direkt nach der Infektion der Inhibitor zugefügt. Um zu kontrollieren, dass Tanshinone IIA die AP-1 Bindung an die DNA verhindern, ist der EMSA die Methode der Wahl. Wie Abbildung 17 zeigt, ist bei der Behandlung der Zellen mit Tanshinone IIA ein deutlich schwächeres AP-1 Signal vorhanden. Auch in den nicht infizierten Kontrollzellen und in Zellen die mit Hitze inaktivierten *Cpn* inkubiert wurden, konnte eine Abnahme der AP-1 Bindungsaktivität nach Inkubation von Tanshinone IIA gemessen werden. Tanshinone IIA inhibiert demnach 4 hpi die Bindung von AP-1 Proteinen an ihre DNA-Bindungssequenz sowohl in infizierten als auch nicht infizierten Zellen.

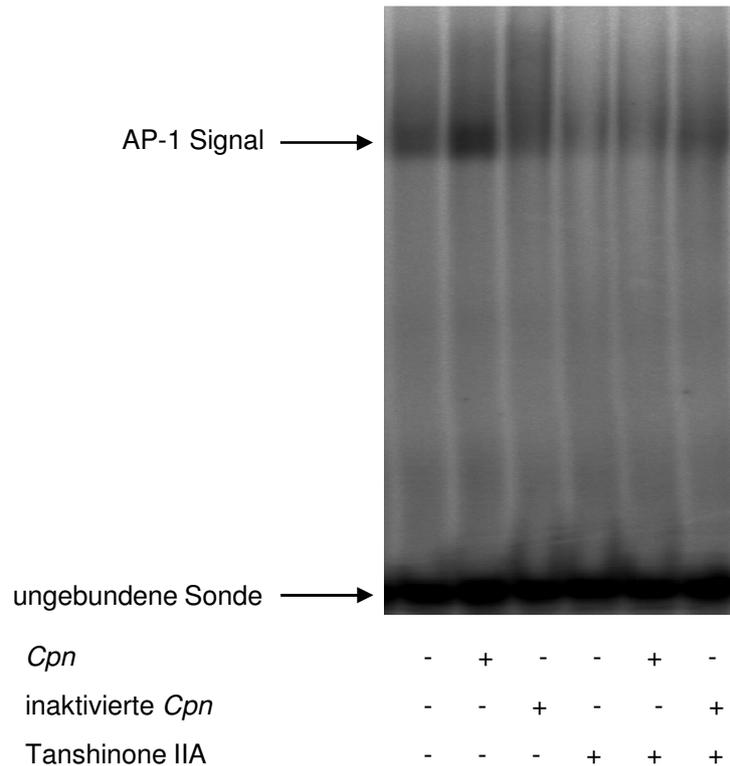


Abb. 17: Tanshinone IIA inhibiert die AP-1 Bindungsaktivität. Die frühe Hochregulation der AP-1 Bindungsaktivität (4 hpi) ließ sich durch zusätzliche Inkubation des AP-1 Inhibitors Tanshinone IIA unterbinden. Das AP-1 Signal ist durch den AP-1 Inhibitor in allen Ansätzen verringert. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, n=2.

Weiterhin wurde untersucht, ob Tanshinone IIA auch einen Einfluss auf die AP-1 Proteinmengen hat. Deshalb wurden zusätzlich Western Blots von infizierten Zellen und Kontrollzellen angefertigt mit und ohne Inkubation von Tanshinone IIA. Wie in Abbildung 18 zu sehen, war 4 hpi die Proteinmenge an c-Jun durch Tanshinone IIA verringert. Noch deutlicher war dieser Effekt bei der phosphorylierten Form von c-Jun. Auf die Proteinmengen von c-Fos und ATF-2 hatte der AP-1 Inhibitor jedoch kaum einen Einfluss.

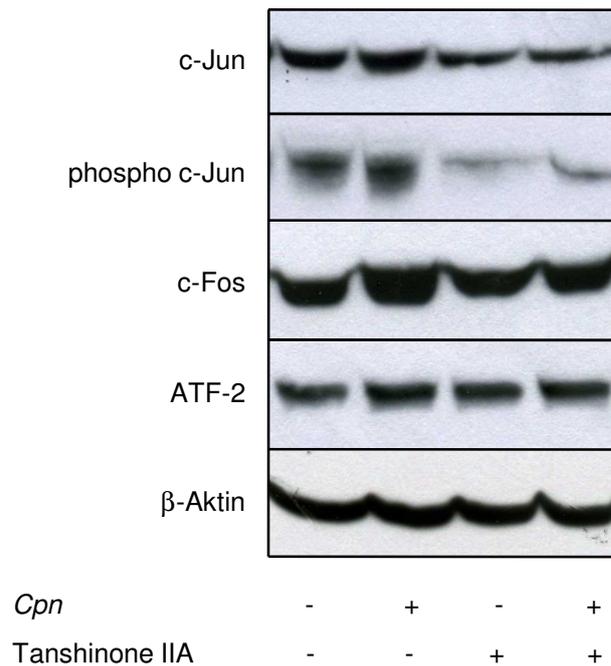


Abb. 18: Auswirkungen von Tanshinone IIA auf die Expression von AP-1 Proteinen. HEp-2 Zellen, die mit einer hohen Dosis an *Cpn* infiziert waren, wurden in einem parallelen Ansatz mit dem AP-1 Inhibitor Tanshinone IIA behandelt. Negativkontrollen von nicht infizierten Zellen wurden jeweils mitgeführt. 4 hpi wurden Ganzzellextrakte geerntet und im Western Blot mittels spezifischer Antikörper gegen c-Jun, phospho-c-Jun, c-Fos und ATF-2 analysiert. Durch Tanshinone IIA waren die Proteine c-Jun und phospho-c-Jun in verminderter Menge nachweisbar. Dieser Effekt war jedoch nicht bei den Proteinen c-Fos und ATF-2 detektierbar. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines Experimentes, n=1.

5.4.3 Veränderte Morphologie der *C. pneumoniae* Einschlusskörperchen durch AP-1 Inhibition

Die Auswirkungen der AP-1 Inhibition auf das chlamydiale Wachstum wurde zunächst anhand der Morphologie der Einschlusskörperchen im IFT überprüft. Die infizierten Zellen, die mit dem Inhibitor Tanshinone IIA behandelt wurden, hatten zum Zeitpunkt 48 hpi wesentlich kleinere Einschlusskörperchen als die Zellen, in denen ohne den Inhibitor der normale replikative Entwicklungszyklus ablaufen konnte (Abbildung 19).

Bei den Versuchen wurde Tanshinone IIA den Zellen direkt nach der Infektion zugegeben. In einem weiteren Versuchsansatz sollte untersucht werden, ob die AP-1

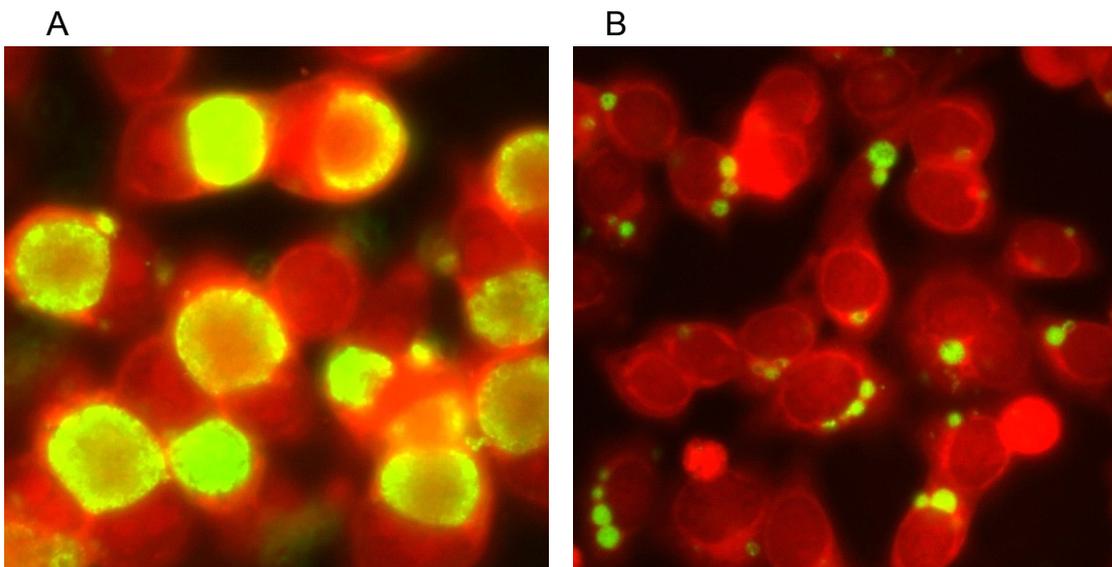


Abb. 19: *C. pneumoniae* Einschlüsse in HEp-2 Zellen 48 hpi. (A) In der späten Phase der Infektion (48 hpi) mit *C. pneumoniae* waren in HEp-2 Zellen im direkten IFT sehr große Einschlusskörperchen anfärbbar (FITC-konjugierter monoklonaler Antikörper gegen Chlamydien-LPS, Oxoid). Dies ist eine typische Abbildung einer akuten *Cpn*-Infektion. (B) Durch die zusätzliche Inkubation des AP-1 Inhibitors Tanshinone IIA wurden wesentlich kleinere Einschlüsse gebildet, was Merkmal einer persistierenden Infektion ist. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, n=4.

Inhibition mittels Tanshinone IIA auch zu einem späteren Zeitpunkt des Entwicklungszyklus einen Einfluss auf die Morphologie der Einschlusskörperchen hat. Damit sollte überprüft werden, in welchem Stadium der Infektion eine AP-1 Inhibition am bedeutendsten für das chlamydiale Wachstum ist. Dazu wurde nach der Infektion Tanshinone IIA zu verschiedenen Zeitpunkten zugegeben (direkt nach der Infektion, 6 hpi, 12 hpi und 24 hpi). Zur Kontrolle wurde ein Negativansatz mitgeführt, bei dem die infizierten Zellen nicht mit Tanshinone IIA behandelt wurden (Abbildung 20). Die Zellen aus allen Ansätzen wurden 48 hpi mit Methanol fixiert und die chlamydialen Einschlüsse im direkten IFT angefärbt. Es ist zu erkennen, dass unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe von Tanshinone IIA, die Größe der Einschlusskörperchen in behandelten Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen immer stark verringert ist.

Da kleine Inklusionen Anzeichen für Persistenz sind, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von den Tanshinone IIA behandelten Zellen gemacht. Damit soll-

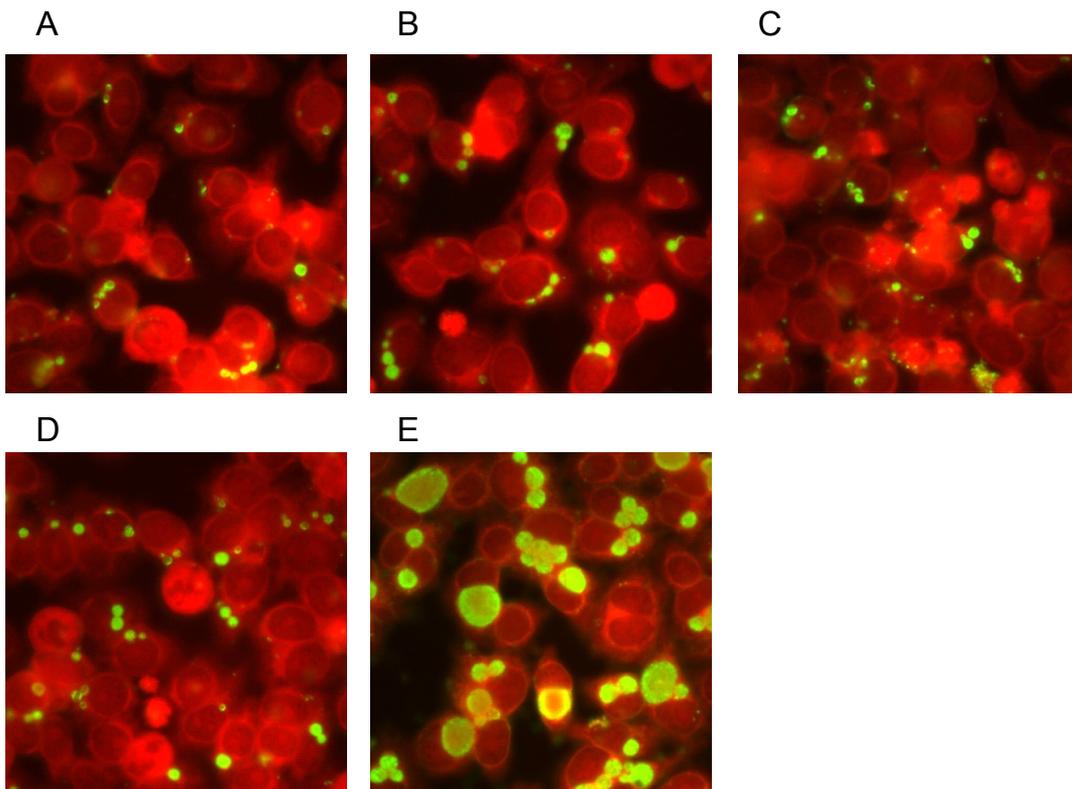


Abb. 20: Zugabe von Tanshinone IIA zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion mit *C. pneumoniae* führt immer zur Ausbildung sehr kleiner Einschlusskörperchen. Den infizierten HEP-2 Zellen wurde zu unterschiedlichen Zeiten nach der Infektion der AP-1 Inhibitor Tanshinone IIA zugegeben. (A) Zugabe von Tanshinone IIA direkt nach Infektion (B) Zugabe 6 hpi (C) Zugabe 12 hpi (D) Zugabe 24 hpi (E) keine Zugabe von Tanshinone IIA. Die Zellen aus allen Ansätzen wurden 48 hpi mit Methanol fixiert und die chlamydialen Einschlüsse mittels des FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpers gegen Chlamydien-LPS (Oxoid) angefärbt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, n=2.

ten die typischen Merkmale einer persistenten Infektion überprüft werden. Zu diesen Merkmalen zählen vergrößerte Retikularkörperchen und das Fehlen von Elementarkörperchen. Die EM-Bilder zeigten, dass sich ohne den Inhibitor 48 hpi ein sehr großer Einschluss gebildet hatte, der sowohl schon redifferenzierte EK als auch RK enthielt (siehe Abbildung 21). Die EK stellen sich aufgrund ihrer hohen Elektronendichte als kleine schwarze Punkte dar, während die RK etwas größer und heller sind. In der Zelle, die mit Tanshinone IIA behandelt wurde, war das Einschlusskörperchen wesentlich kleiner und es wies keine EK auf. Es waren nur RK vorhanden, die im Vergleich zu

den RK der nicht behandelten Kontrollzellen wesentlich größer waren.

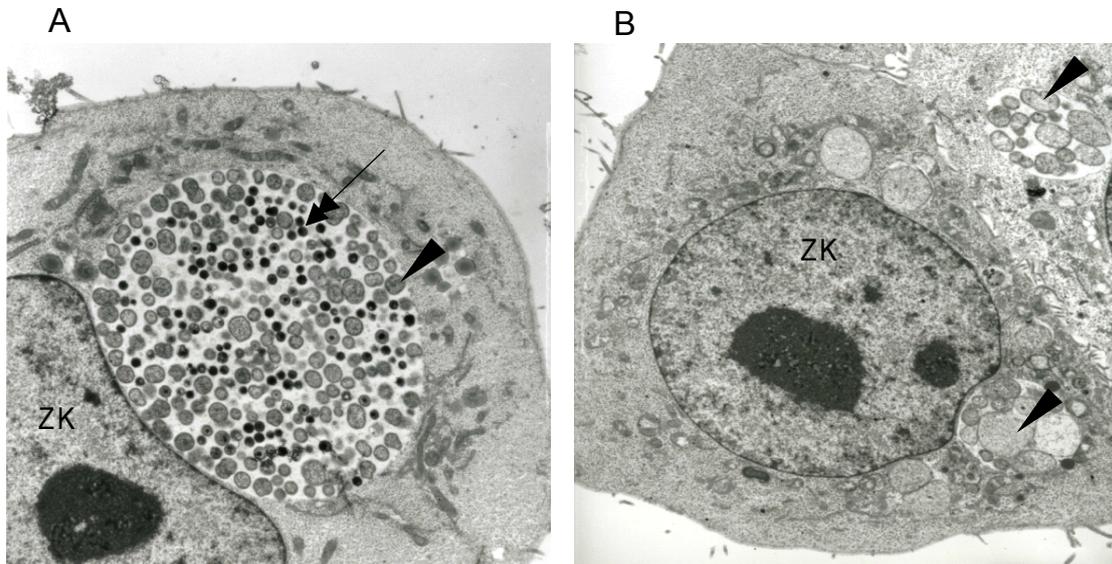


Abb. 21: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Cpn* infizierten HEp-2 Zellen. (A) In der späten Phase der Infektion (48 hpi) mit *C. pneumoniae* waren in HEp-2 Zellen sehr große Einschlusskörperchen nachweisbar. Es sind bereits redifferenzierte Elementarkörperchen (EK) erkennbar. Dies ist eine typische EM-Aufnahme einer akuten Infektion. (B) Durch die zusätzliche Inkubation des AP-1 Inhibitors Tanshinone IIA wurden wesentlich kleinere Einschlüsse gebildet, die große Retikularkörperchen (RK) enthalten aber keine EK. Dies sind Merkmale einer persistierenden Infektion ist. EM-Aufnahmen wurden nur einmal angefertigt zu Proben, die parallel im direkten IFT angefärbt und auf Persistenzinduktion geprüft wurden. ZK=Zellkern; Doppelpfeilköpfe deuten auf EK, einfache Pfeilköpfe deuten auf RK.

Um die Hypothese, dass die Inhibition von AP-1 einen Einfluss auf das Wachstum von *Cpn* hat, zu stärken, wurde ein weiterer AP-1 Inhibitor untersucht. Es handelte sich hierbei um Nordihydroguaiaretic acid (NDGA). Für HL60 Zellen ist beschrieben, dass NDGA die de novo Synthese von c-Jun mRNA inhibiert [121]. In den Experimenten mit NDGA zeigte sich, dass nach der Inkubation die Einschlusskörperchen 48 hpi wie bei Tanshinone IIA auch nicht auf ihre normale Größe heranwachsen konnten und kleine Persistenz-ähnliche Formen annahmen (Abbildung 22). Da NDGA allerdings nicht so spezifisch wirkt, wurden hauptsächlich Versuche mit Tanshinone IIA durchgeführt.

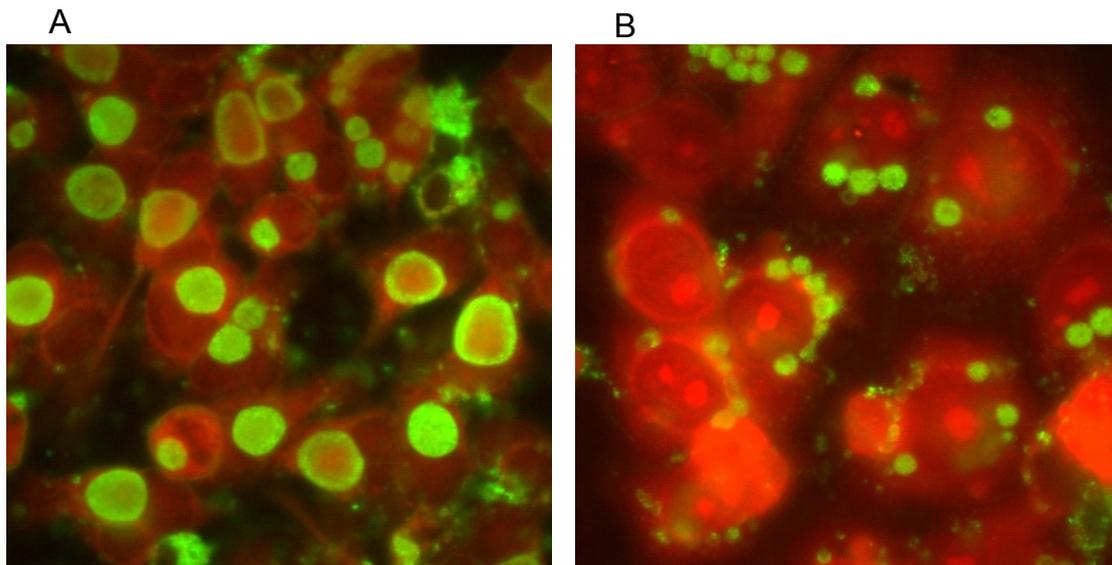


Abb. 22: *C. pneumoniae* Einschlüsse in HEp-2 Zellen 48 hpi ohne und mit Inkubation von NDGA. (A) In der späten Phase der Infektion (48 hpi) mit *C. pneumoniae* waren in HEp-2 Zellen im direkten IFT sehr große Einschlusskörperchen anfärbbar (FITC-konjugierter monoklonaler Antikörper gegen Chlamydien-LPS, Oxoid). Dies ist eine typische Abbildung einer akuten *Cpn*-Infektion. (B) Durch die zusätzliche Inkubation des AP-1 Inhibitors NDGA wurden wesentlich kleinere Einschlüsse gebildet, was Anhalt für eine persistierende Infektion sein kann. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, n=3.

5.4.4 Wiederanzucht von *C. pneumoniae* nach Tanshinone IIA Inkubation nicht möglich

Ein weiteres wichtiges Merkmal persistierender Chlamydien ist, dass sie sich nicht anzüchten lassen, da die Redifferenzierung der Retikularkörperchen zu den infektiösen Elementarkörperchen in der Persistenz nicht stattfindet. Um zu testen, ob die Behandlung mit Tanshinone IIA zu einer Persistenz von *Cpn* führt, aus der *Cpn* nicht kultivierbar ist, wurden Wiederanzuchtversuche durchgeführt. Die Experimente ließen eindeutig erkennen, dass eine Anzucht aus Tanshinone IIA behandelten Zellen 48 und 72 hpi nicht möglich ist (Abbildung 23), was ein weiteres Indiz für Persistenz ist. Die Chlamydien aus den unbehandelten Zellen ließen sich im Gegensatz dazu sehr gut wieder auf neuen Zellen kultivieren. Die Inhibition des Transkriptionsfaktors AP-1 hat demnach einen Einfluss auf das Wachstum bzw. die Morphologie von *Cpn*.

Da Wiederanzuchtversuche starken interexperimentellen Schwankungen unterlie-

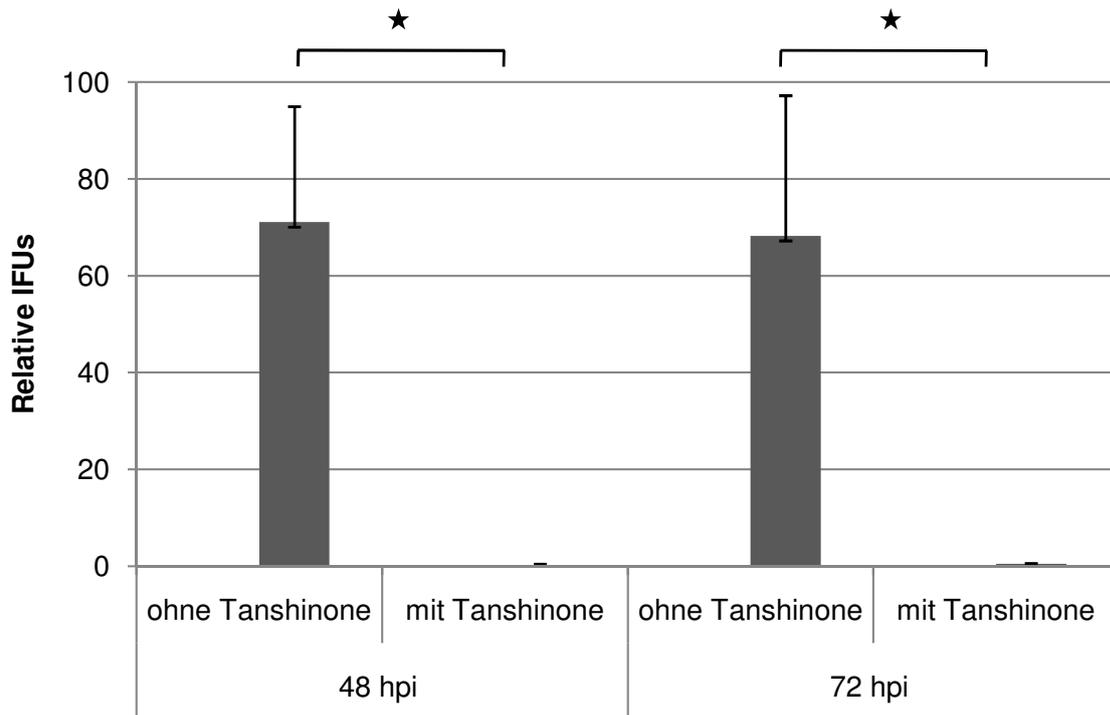


Abb. 23: Versuch der Wiederanzucht von *Cpn* aus Tanshinone IIA behandelten Zellen. Dargestellt sind die relativen IFUs in HEp-2 Zellen 48 und 72 Stunden nach Infektion mit *Cpn* mit und ohne Inkubation des AP-1 Inhibitor Tanshinone IIA. Aus Tanshinone IIA behandelten Zellen war eine Wiederanzucht von *Cpn* im Vergleich zu Kontrollzellen 48 und 72 hpi nicht möglich. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt, $n=3$. Die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen, unabhängigen T-Test bestimmt ($\star = p < 0,05$).

gen, wurden für die Darstellung nicht die absoluten Werte verwendet sondern die relativen IFUs ermittelt. Dafür wurden die absoluten IFUs pro Versuch auf prozentuale Werte umgerechnet wobei der höchste IFU-Wert jedes unabhängigen Versuchs auf 100% gesetzt wurde.

5.4.5 Reversibilität der Tanshinone IIA induzierten Persistenz

Ein weiteres Merkmal der Persistenz von Chlamydien ist die Reversibilität, d.h. durch Entfernen des Persistenzinduktors (z.B. IFN- γ) gehen die Chlamydien wieder in den replikativen Entwicklungszyklus über. Es sollte daher geklärt werden, ob nach Entfernen von Tanshinone IIA *Cpn* wieder mit der Replikation beginnt und das Persistenzstadium verlässt. Wenn Tanshinone IIA nicht entfernt wurde, blieben die Einschlusskörperchen sehr klein (Abbildung 24). Im Gegensatz dazu nahmen die Einschluss-

körperchen in den Zellen, bei denen Tanshinone IIA ausgewaschen wurde, wieder die Größe an, die sie bei einer akuten Infektion durch den replikativen Entwicklungszyklus erreichen. Die durch den AP-1 Inhibitor Tanshinone IIA induzierte Persistenz ist demnach durch Entfernen des Inhibitors aufhebbar.

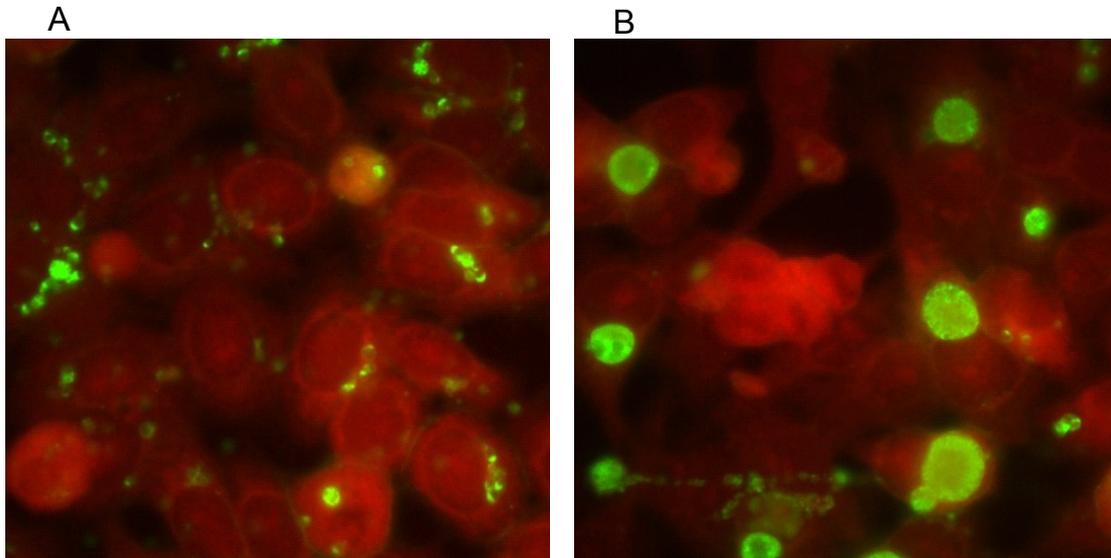


Abb. 24: Aufhebung der Tanshinone IIA induzierten Persistenz. *Cpn* infizierten HEp-2 Zellen wurde direkt nach der Infektion der AP-1 Inhibitor Tanshinone IIA zugegeben. Die chlamydialen Einschlüsse wurden im direkten IFT (siehe 4.4) angefärbt. (A) Wurde der Inhibitor 48 hpi nicht entfernt blieben die Einschlusskörperchen sehr klein. (B) Durch Mediumwechsel 48 hpi wurde der Inhibitor Tanshinone IIA ausgewaschen. Nach einer weiteren Kultivierung von drei Tagen trat *Cpn* wieder in den replikativen Entwicklungszyklus ein und bildete erneut große Einschlusskörperchen. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, n=2.

Daraufhin wurde versucht, aus den Zellen, in denen durch Entfernen des AP-1 Inhibitors Tanshinone IIA *Cpn* wieder in den replikativen Entwicklungszyklus eintrat, erneut *Cpn* aus diesen Zellen auf neuen Zellen anzuzüchten. Dafür wurden Wiederanzuchtexperimente durchgeführt. Die Abbildung 25 zeigt, dass nach dem Entfernen von Tanshinone IIA und einer weiteren Kultivierung von 48 bzw. 72 Stunden eine Wiederanzucht von *Cpn* möglich war.

Die Wiederanzucht, die 48 Stunden nach dem Mediumwechsel durchgeführt wurde, zeigte jeweils eine höhere Anzuchttrate als die, die nach 72 Stunden durchgeführt wurde. Da der absolute IFU-Wert bei allen Experimenten auf 100% relative IFUs

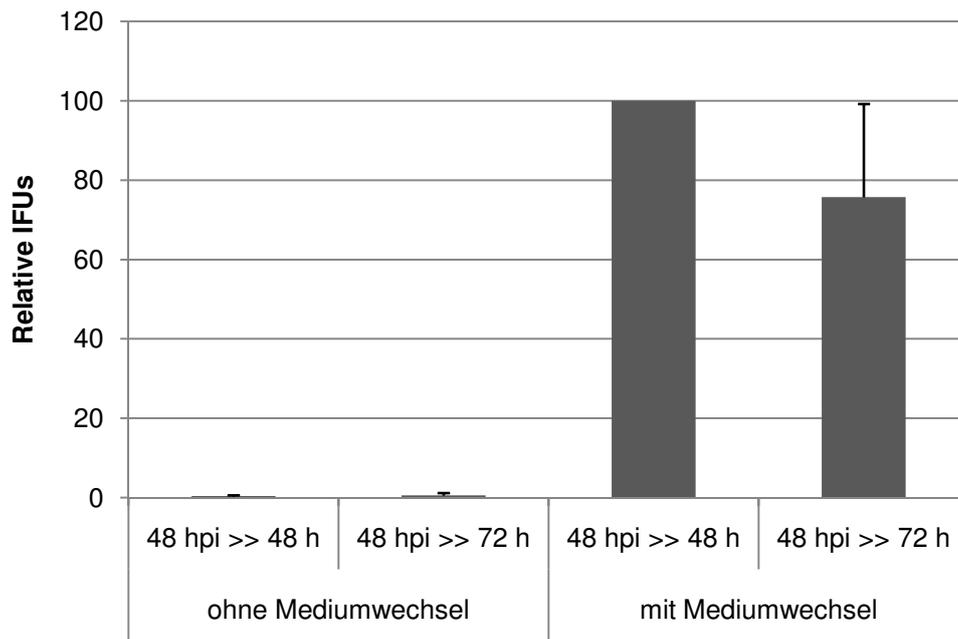


Abb. 25: Wiederanzucht von *Cpn* nach Entfernen des AP-1 Inhibitors durch Mediumwechsel wieder möglich. Dargestellt sind die relativen IFUs in HEp-2 Zellen mit und ohne Mediumwechsel. Wurde das Medium 48 hpi nicht entfernt und der Inhibitor blieb erhalten, so war nach einer weiteren Anzucht von 48 bzw. 72 Stunden eine Wiederanzucht nicht möglich. Durch Mediumwechsel 48 hpi wurde der Inhibitor Tanshinone IIA ausgewaschen. Nach einer weiteren Anzucht von 48 bzw. 72 Stunden war eine Wiederanzucht von *Cpn* nachweisbar. Dargestellt ist das Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten, n=2.

gesetzt wurde, ist zu diesem Zeitpunkt keine Standardabweichung vorhanden.

5.4.6 Verminderter ATP-Gehalt in Tanshinone IIA behandelten Zellen

Chlamydien sind aufgrund der fehlenden Eigensynthese von ATP, obligat auf den Metabolismus ihrer eukaryontischen Wirtszelle angewiesen. Da der Transkriptionsfaktor AP-1 auch ein Gen reguliert, das an der Regulation des Energiehaushalts der Zelle beteiligt ist, wurde zunächst der ATP-Gehalt von Zellen untersucht, die mit dem AP-1 Inhibitor Tanshinone IIA behandelt wurden. In einem ATP-Assay wurde der Gesamtgehalt an ATP in infizierten Zellen und den Zellen die zusätzlich mit Tanshinone IIA behandelt wurden, gemessen. Die Infektion mit *Cpn* führte zu einer gesteigerten ATP-Produktion der Wirtszelle bereits sechs Stunden nach der Infektion. Allerdings konnte nach 12 Stunden kein erhöhter ATP-Gehalt mehr gemessen werden. Zu diesem Zeitpunkt entsprachen die Werte in etwa denen der Kontrollzellen, die nicht infiziert wurden (Abbildung 26). Zudem zeigt das Diagramm, dass infizierte Zellen sowohl bei einer hohen als auch bei einer geringen Infektionsdosis einen erhöhten ATP-Gehalt aufwiesen, wobei eine leichte Dosisabhängigkeit erkennbar ist.

Im Gegensatz dazu war der ATP-Gehalt in Tanshinone IIA behandelten, infizierten Zellen wesentlich geringer im Vergleich zu Kontrollzellen, die weder infiziert noch mit Tanshinone IIA behandelt wurden. Bereits nach sechs Stunden war bei den Tanshinone IIA behandelten Zellen der ATP-Gehalt auf ca. 65% ($\pm 9\%$) des Gehalts der Kontrollzellen abgefallen. Nach weiteren sechs Stunden sank der ATP-Gehalt noch weiter auf ca. 55% ($\pm 5\%$). Die Abnahme war unabhängig von der Infektionsdosis.

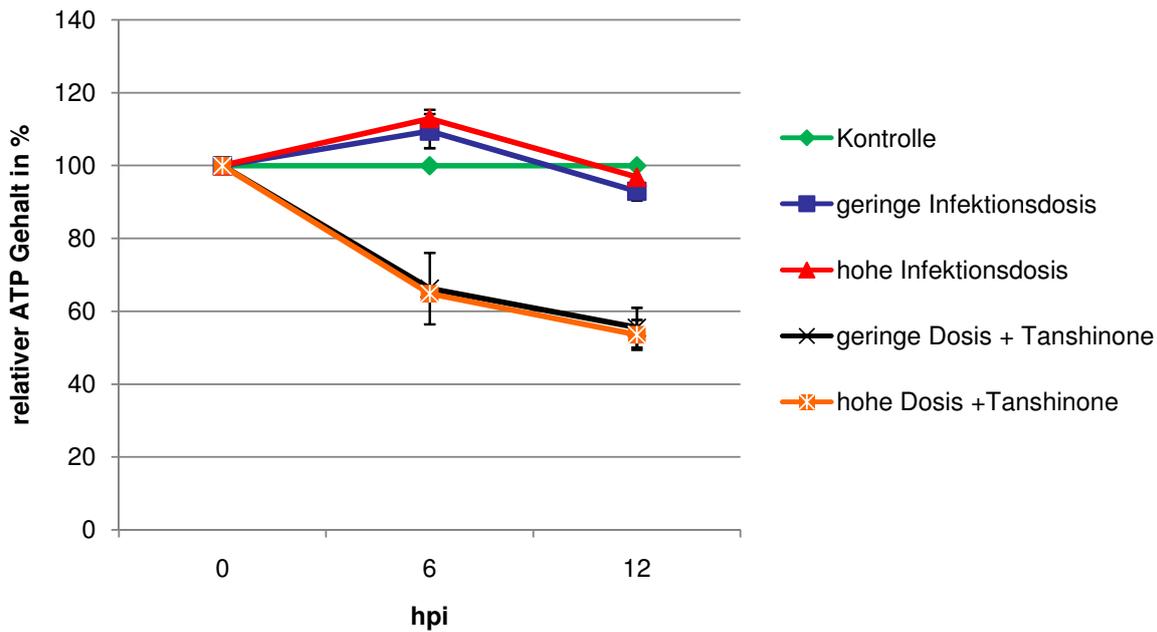


Abb. 26: ATP-Gehalt von Tanshinone IIA behandelten Zellen ist im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich geringer. Dargestellt ist der relative ATP-Gehalt, der gemessen wurde direkt, 6 und 12 Stunden nach der Infektion mit *Cpn*. Infiziert wurde mit zwei verschiedenen Infektionsdosen mit und ohne Inkubation von Tanshinone IIA. Die mit dem Inhibitor behandelten Zellen wiesen einen wesentlich geringeren ATP-Gehalt auf. Infizierte Zellen, die nicht mit dem Inhibitor behandelt wurden, wiesen 6 hpi einen erhöhten ATP-Gehalt auf. Dargestellt ist das Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten, n=2.

5.4.7 Einfluss von Tanshinone IIA auf die mRNA-Expression von Glut1

Das Gen *glut1*, das für den Glucose Transporter 1 (Glut1) codiert, enthält in seiner Promotoregion eine AP-1 Bindestelle. Das Protein Glut1 ist an der Regulation des Energiehaushalts der Zelle beteiligt, da die für die ATP-Produktion benötigte Glucose u.a. über Glut1 in die Zelle transportiert wird. Durch den Nachweis der Glut1 mRNA in einer quantitativen Real-time PCR wurde der Einfluss des AP-1 Inhibitors Tanshinone IIA auf die *glut1* Expression ermittelt. Der Nachweis geschah zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit *Cpn*. Die mRNA-Expression von Glut1 wies 4 hpi bis 24 hpi kaum Veränderungen auf. Zu diesen Zeitpunkten war auch ein Einfluss des AP-1 Inhibitors Tanshinone IIA nicht messbar. Erst 48 hpi war die Glut1 mRNA-Expression in *Cpn* infizierten Zellen um das 5-fache gestiegen, während es bei zusätzlicher Tanshinone IIA Inkubation nicht zu einer Erhöhung kam (Abbildung 27).

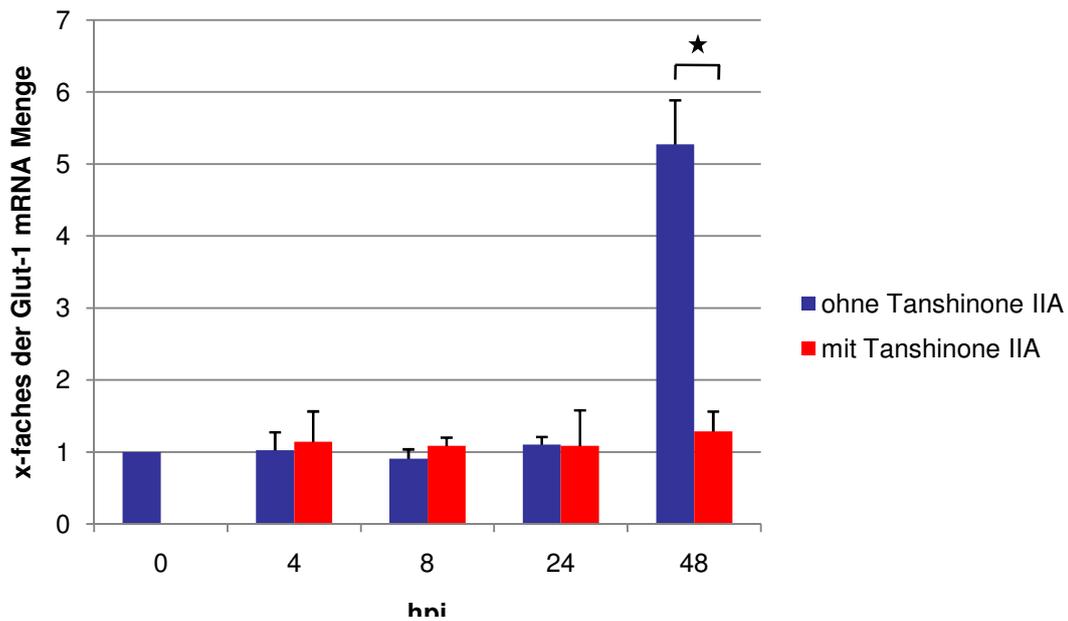


Abb. 27: Einfluss von Tanshinone IIA auf die Glut1 mRNA-Expression in *Cpn* infizierten Zellen. Dargestellt ist die Glut1 mRNA Menge, die durch Real-time PCR zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion mit *Cpn* ermittelt wurde. In der frühen Phase (4 und 8 hpi) und in der mittleren Phase des Entwicklungszyklus (24 hpi) unterschieden sich Tanshinone IIA behandelte Zellen nicht von den unbehandelten Kontrollzellen. 48 hpi war eine 5fach höhere Glut1-Expression in infizierten Zellen messbar. Im Gegensatz dazu war in Zellen, die mit dem AP-1 Inhibitor Tanshinone IIA inkubiert wurden, zu diesem Zeitpunkt keine Erhöhung messbar. Das Diagramm zeigt das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten, $n=3$. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen, unabhängigen T-Test bestimmt ($\star = p < 0,05$).

5.5 Analyse der AP-1 Regulation in Zytoplasma- und Kernproteinfractionen

Die bisherigen Untersuchungen der AP-1 Proteine wurden an Gesamtzellextrakten durchgeführt. Um noch genauere Aussagen über die Lokalisation der AP-1 Proteine treffen zu können, wurden die zytoplasmatischen Proteine von den nukleären Proteinen getrennt. Im Westernblot wurden die AP-1 Proteine c-Jun, c-Fos, JunB, JunD, FosB und ATF-2 in beiden Fraktionen nachgewiesen (Abbildung 28). Dabei wurde sich auf die Zeitpunkte der späten Infektionsphase beschränkt, da hier bei der Analyse der Ganzzellextrakte im Westernblot die stärksten und zudem unterschiedlichsten Regulationen der AP-1 Proteine auftraten. Die AP-1 Proteine wurden hauptsächlich

in der Fraktion der nukleären Proteine nachgewiesen. Lediglich das Protein c-Jun war auch in der Fraktion der zytoplasmatischen Proteine nachweisbar. Erstaunlicher Weise wurde eine generelle Abnahme der Menge an AP-1 Proteinen in der Fraktion der Kernproteine durch die Infektion mit lebenden *Cpn* zu den Zeitpunkten 48 und 72 hpi detektiert. Dieser Effekt ist stark dosisabhängig.

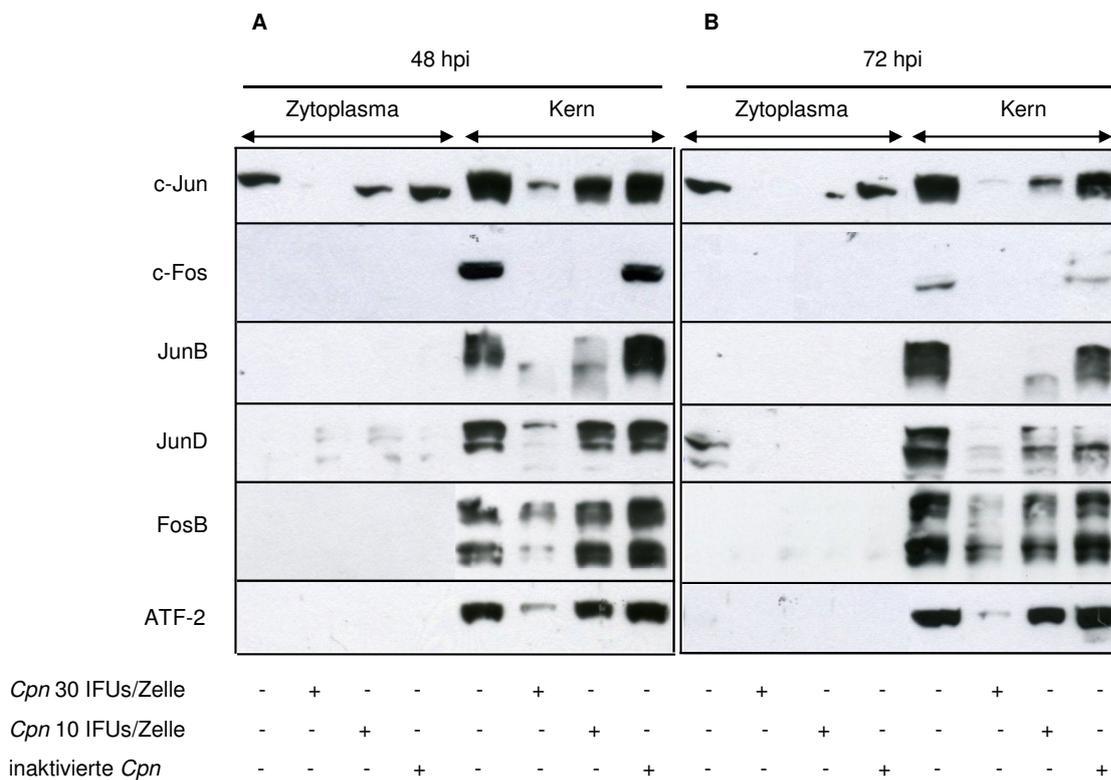


Abb. 28: AP-1 Proteine in Zytoplasma- und Kernextrakten in der späten Phase der Infektion (48 und 72 hpi). In der späten Phase der Infektion (48 und 72 hpi) wurden von HEP-2 Zellen, die mit einer hohen Dosis, einer geringen Dosis und mit inaktivierten *Cpn* infiziert waren, die Zytoplasma- und Kernproteine isoliert um mittels spezifischer Antikörper im Western Blot verschiedene AP-1 Proteine in diesen beiden Proteinfractionen zu untersuchen. Alle AP-1 Proteine waren hauptsächlich in der Kernfraktion nachweisbar. In der zytoplasmatischen Fraktion war nur c-Jun zu diesen Zeitpunkten detektierbar. Alle AP-1 Proteine waren durch die Infektion mit lebenden *Cpn* herunterreguliert. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, n=3.

Die generelle Runterregulation in den Kernextrakten steht im Widerspruch zu der Hochregulation von c-Jun, phospho c-Jun und c-Fos zu diesem Zeitpunkt in den Gesamtzellextrakten (Abbildung 14 auf Seite 65). Für den EMSA wurden auf die gleiche Weise Kernextrakte hergestellt um die AP-1 Bindungsaktivität zu diesen Zeitpunk-

ten zu untersuchen. Durch die Infektion mit *Cpn* kam es 48 und 72 hpi zu einer stark verminderten AP-1 Bindungsaktivität im Vergleich zu nicht infizierten und mit Hitze inaktivierten *Cpn* stimulierten Zellen (Abbildung 29). Nur durch die Infektion mit lebenden Chlamydien wurde das AP-1 Signal drastisch verringert. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Western Blot Ergebnis von den Kernextrakten überein. Um herauszufinden warum es zu solch widersprüchlichen Ergebnissen zwischen einzelnen Zellfraktionen und dem Gesamtzellextrakt kam, wurden Degradations Assays durchgeführt.

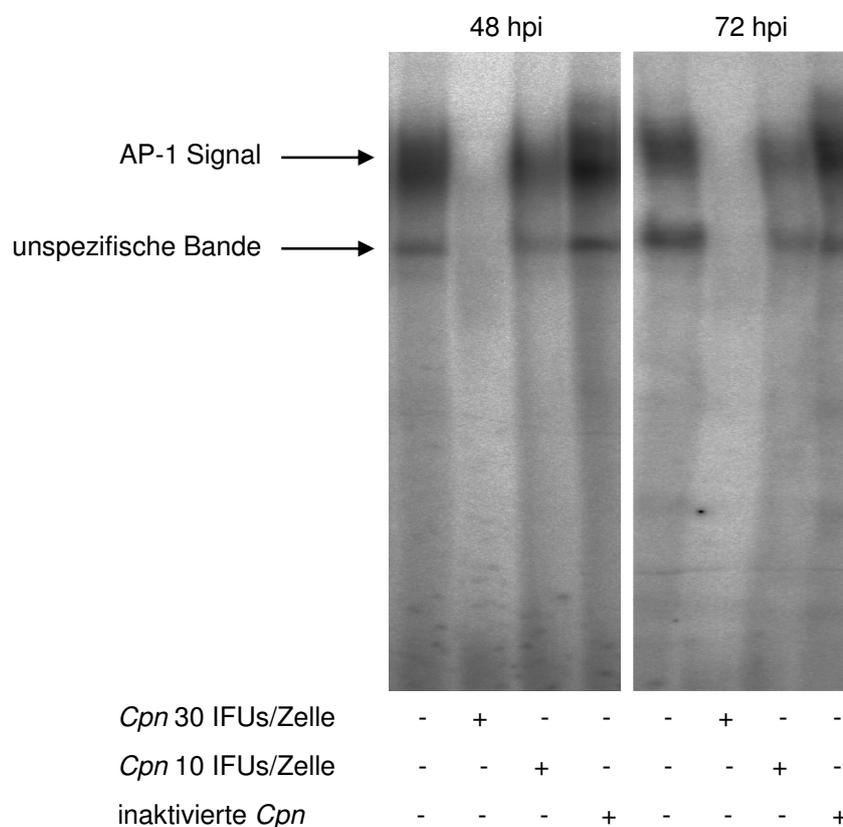


Abb. 29: Verminderte AP-1 Bindungsaktivität durch *Cpn*-Infektion 48 und 72 hpi. Die AP-1 Bindungsaktivität war durch die Infektion mit *Cpn* in der späten Phase des Infektionszyklus stark vermindert im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollzellen. Dieser Effekt wies eine starke Dosisabhängigkeit auf. Hitze abgetötete *Cpn* hatten keinen Einfluss auf die Bindungsaktivität zu diesem Zeitpunkt, da das AP-1 Signal dieselbe Intensität aufwies wie bei nicht infizierten Kontrollzellen. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, n=3.

5.6 Abbau von AP-1 Proteinen

Die unterschiedlichen Resultate aus den Gesamtzellextrakten und den Zytoplasma- und Kernextrakten, veranlassten weitere Experimente um herauszufinden, welche Faktoren für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurden Proteinextrakte aus nicht-infizierten Kontrollzellen mit Extrakten aus *Cpn* infizierten Zellen zusammen inkubiert. Dieses Experiment sollte Aufschluss darüber geben, was in einem zellfreien in vitro Assay mit dem AP-1 Protein c-Jun passiert. In mehreren unabhängigen Experimenten wurden verschiedene Proteinmengen (5-100 μg) miteinander inkubiert (Abb. 30). Wurden nur 5 μg Proteinextrakt aus nicht-infizierten Zellen mit 5 μg Proteinextrakt aus infizierten Zellen zusammen inkubiert, war im Vergleich zu dem Ansatz, bei dem jeweils 5 μg Extrakt der nicht-infizierten Kontrollzellen inkubiert wurden, eine leichte Abnahme der Proteinmenge von c-Jun detektierbar. Erhöhte man die Proteinmengen, so war ein immer stärkerer Abbau von c-Jun erkennbar, der nur stattfand, wenn der Extrakt von infizierten Zellen eingesetzt wurde. Wurden jeweils 100 μg eingesetzt, wurde das Protein c-Jun fast vollständig abgebaut. Es wird vermutet, dass dieser Abbau auf eine Komponente im Extrakt der infizierten Zellen zurückzuführen ist, da kein Abbau in den Kontrollansätzen stattfand.

Aufgrund der unterschiedlichen Methodik zu Herstellung von Ganzzellextrakten bzw. von Zytoplasma- und Kernextrakten wurde vermutet, dass erst bei der Herstellung der Kernextrakte die AP-1 Proteine durch CPAF abgebaut werden. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden erneut Kernextrakte aus Kontrollzellen, aus *Cpn* infizierten und aus mit Hitze inaktivierten *Cpn* behandelten Zellen hergestellt. Dabei wurden die Kernextrakte zum zunächst entsprechend des Protokolls im Methodenteil (4.10) hergestellt. Wie schon in Abbildung 28 gezeigt, weisen Zellen, die mit lebenden *Cpn* infiziert wurden, erheblich geringere Mengen an c-Jun auf. In einem parallelen Ansatz wurde bei jedem Schritt der Extraktion Lactacystin den Extrakten bzw. den gesamten verwendeten Medien zugesetzt. Lactacystin ist ein irreversibler Proteasom Inhibitor, der die chlamydiale Protease CPAF inhibiert und schon mehrfach für diesen Zweck in anderen Forschungsarbeiten verwendet wurde. Durch die Zugabe von

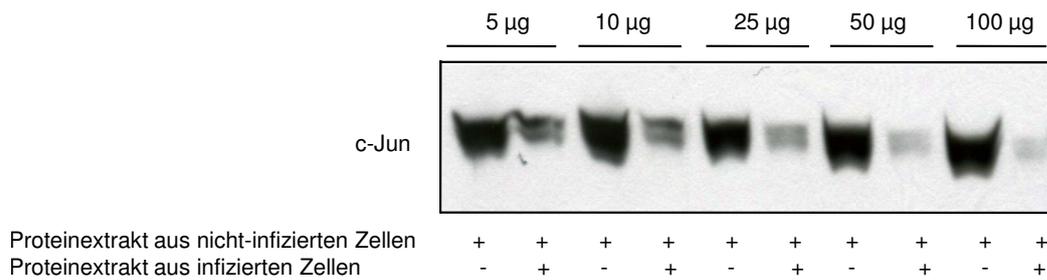


Abb. 30: Kombination von Proteinextrakten aus nicht infizierten Kontrollzellen und Extrakten aus *Cpn* infizierten Zellen führt zum Abbau von c-Jun. Wenn Proteinextrakte aus nicht-infizierten Kontrollzellen mit dem Extrakt aus *Cpn* infizierten Zellen kombiniert wurden, so kam es zu einem Abbau von c-Jun, während in den Kontrollansätzen kein Abbau stattfand. Es wurden verschiedene Proteinmengen zusammen inkubiert. Es ist zu erkennen, dass mit zunehmender Menge der Abbau immer deutlicher zunahm. Bei der Kombination von 100 μg der jeweiligen Extrakte fand ein fast vollständiger Abbau statt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, n=3.

Lactacystin während der Herstellung der Proben, konnte zum Teil der Abbau von c-Jun verhindert werden. Im Vergleich zur Mediumkontrolle war die Menge an c-Jun trotz Lactacystin immer noch geringer (Abbildung 31). Das Experiment zeigt, dass während der Herstellung der Kernextrakte ein erheblicher Anteil des Proteins c-Jun degradiert wird.

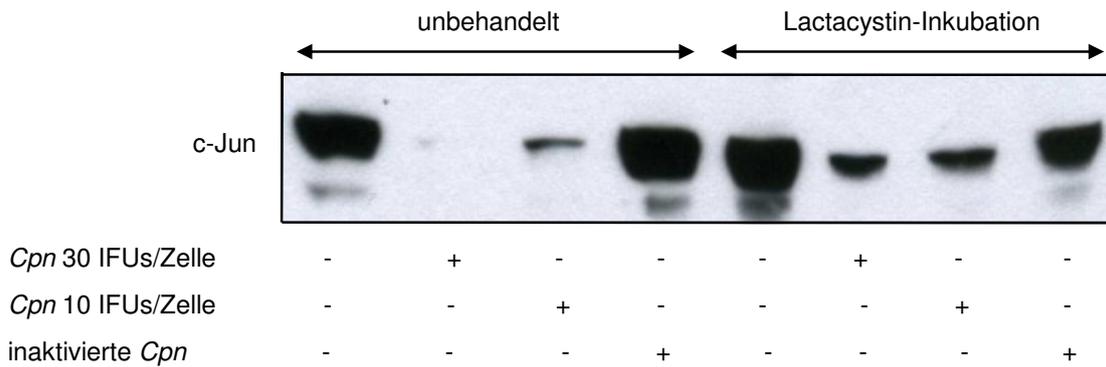


Abb. 31: Lactacystin verhindert den Abbau von c-Jun während der Herstellung von Kernextrakten teilweise. Wie in Abbildung 28 bereits gezeigt, war in der Fraktion der Kernproteine das Protein c-Jun durch die Infektion mit lebenden *Cpn* stark herunterreguliert. Dabei war im Western Blot eine dosisabhängige Regulation ersichtlich. Bei der Herstellung von Kernextrakten in der späten Phase der Infektion (48 hpi) konnte durch die zusätzliche Verwendung des CPAF-Inhibitors Lactacystin der Abbau von c-Jun zum Teil verhindert werden. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, n=2.

5.7 AP-1 Proteine werden durch die chlamydiale Protease CPAF degradiert

Der Abbau von Proteinen wurde im Zusammenhang mit einer Chlamydieninfektion in der Literatur mehrfach beschrieben. Es ist bekannt, dass die chlamydiale Serinprotease CPAF (Chlamydia Protease-like Activity Factor) u.a. die Transkriptionsfaktoren USF-1 und RFX5 abbauen kann. Es sind noch weitere Zielproteine von CPAF entdeckt worden, was darauf hindeutet, dass CPAF ein wichtiger Virulenzfaktor von Chlamydien ist. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob CPAF auch Proteine aus der AP-1 Familie abbauen kann. Dafür wurde das Protein c-Jun in einem in vitro Transcription Translation (IVTT)-Assay radioaktiv mit ^{35}S -Methionin markiert. Es konnte gezeigt werden, dass das c-Jun Signal völlig verschwindet, wenn man radioaktiv markiertes c-Jun mit einem Zellextrakt aus infizierten Zellen inkubiert (Abbildung 32). Außerdem kann man aus dem Versuch ableiten, dass das Protein c-Jun nur vom Extrakt aus infizierten Zellen nicht aber vom Extrakt aus Kontrollzellen abgebaut wurde. Zur Überprüfung ob CPAF für die Degradation verantwortlich ist, wurde der Extrakt

aus infizierten Zellen mit einem CPAF-Antikörper vorinkubiert. Danach wurden dem Ansatz Protein A-Sepharose-Beads zugefügt um so den Antikörper samt seines gebundenen Antigens aus dem Extrakt zu entfernen. Der aufgereinigte Extrakt wurde mit dem radioaktiv markiertem c-Jun inkubiert. Die Abbildung 32 zeigt, dass c-Jun in diesem Ansatz nicht abgebaut wurde. Zur Kontrolle wurde der Ansatz mit einem Antikörper gegen chlamydiales LPS durchgeführt. Da CPAF an diesen Antikörper nicht bindet, kam es bei der Inkubation dieses Extraktes mit c-Jun doch zum Abbau. Der Proteinextrakt aus *Cpn* infizierten Zellen wurden mit 10 μ M Lactacystin vorinkubiert und danach mit dem radioaktiv markiertem c-Jun inkubiert. Ein Abbau von c-Jun fand auch bei diesem Ansatz nicht statt, da Lactacystin den Abbau von c-Jun durch CPAF verhindert hat.

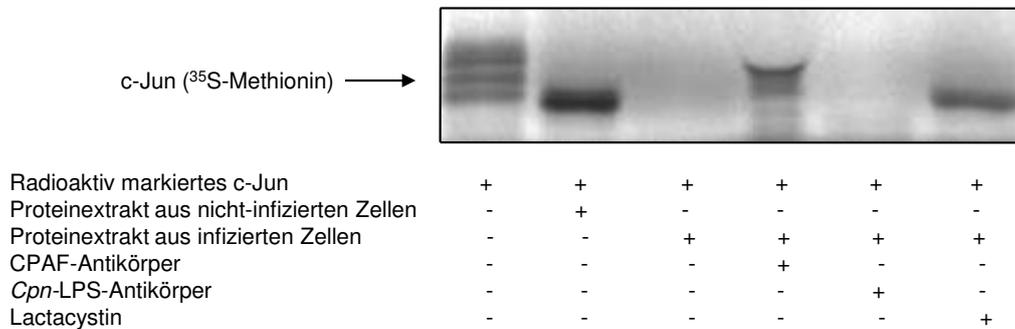


Abb. 32: Degradations Assay. Das in der IVTT radioaktiv markierte c-Jun war der Ausgangspunkt mehrerer Degradationsansätze. Der Assay zeigt, dass das radioaktiv markierte Protein c-Jun durch Inkubation mit einem Extrakt aus *Cpn* infizierten Zellen abgebaut wurde. Der Abbau erfolgte nicht bei Inkubation mit einem Extrakt aus nicht infizierten Kontrollzellen. Dass die chlamydiale Protease CPAF Ursache für den Abbau war, zeigen die weiteren Ansätze des Assays. Die einzelnen Ansätze wurden in einem 12%igen SDS-Gel getrennt und der Nachweis erfolgte durch Autoradiographie. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, n=2.

5.8 CPAF Induktion in stabil transfizierten HEK293 Zellen

In einem weiteren Versuchsansatz wurde getestet, ob nur CPAF für den Abbau verantwortlich ist oder eventuell auch andere chlamydiale Proteine daran beteiligt sind. Dafür wurde ein Ansatz verwendet, in dem keine Infektion stattfindet, sondern in stabil transfizierten HEK293 Zellen die Expression des Proteins CPAF durch Zuga-

be von Anhydrotetrazyklin induziert werden kann. Ein anderes chlamydiales Protein wurde nicht produziert, wodurch gewährleistet wurde, dass man nur die Auswirkung von CPAF untersucht hat. Es konnte gezeigt werden, dass in der unstimulierten Zelllinie HEK293 Klon6 große Mengen der Proteine c-Jun und ATF-2 vorlagen, während c-Fos im unstimulierten Zustand nicht nachweisbar war (Abbildung 33). In den Proben, in denen durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin und Coumermycin die CPAF-Expression induziert wurde, wurden die Proteine c-Jun und ATF-2 abgebaut. Dabei entstanden keine nachweisbaren Spaltprodukte, sondern die Proteine verschwanden vollständig. Anders verhielt es sich mit dem Protein c-Fos, welches durch die induzierte CPAF-Expression induziert wurde. Durch die zusätzliche Inkubation von Lactacystin wurde der Abbau von c-Jun verhindert, jedoch der Abbau von ATF-2 nicht. Auf die Induktion der c-Fos Expression hatte die zusätzliche Gabe von Lactacystin keinen Einfluss.

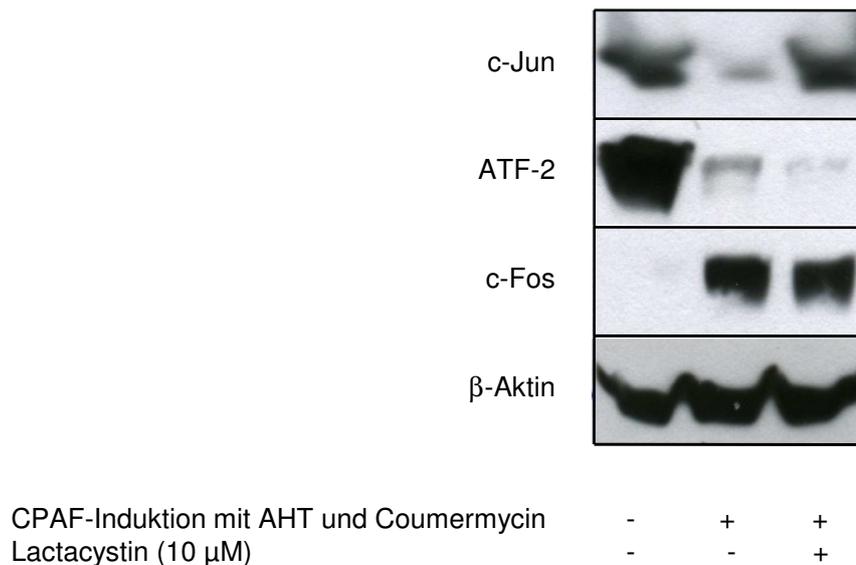


Abb. 33: CPAF Induktion in HEK293 T-REx Zellen führt zum Abbau von c-Jun und ATF-2. In der stabil transfizierten Zelllinie HEK293 T-REx wurde CPAF mittels Anhydrotetrazyklin (AHT) und Coumermycin induziert. Im Western Blot konnte durch Verwendung spezifischer Antikörper der Abbau der Proteine c-Jun und ATF-2 nachgewiesen werden. Lactacystin verhinderte lediglich den Abbau von c-Jun. Das Protein c-Fos konnte in unstimulierten HEK293 T-REx Zellen nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis war im Gegensatz zu den beiden anderen Proteinen erst in den CPAF induzierten Zellen möglich. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments, n=2.

5.9 Eine c-Jun Überexpression hat keine Auswirkung auf die Morphologie und die Wiederanzucht von *C. pneumoniae*

Der durch die chlamydiale Protease CPAF verursachte Abbau von c-Jun warf die Frage auf, welche Auswirkungen eine c-Jun Überexpression auf das Wachstum bzw. die Morphologie von *Cpn* haben würde. Deshalb wurden Transfektionsexperimente durchgeführt, bei denen HEp-2 Zellen transient mit einem c-Jun Plasmid transfiziert wurden, und 24 Stunden danach infiziert wurden. Nach weiteren 48 Stunden Kultivierung wurde die Morphologie der Einschlusskörperchen im IFT untersucht.

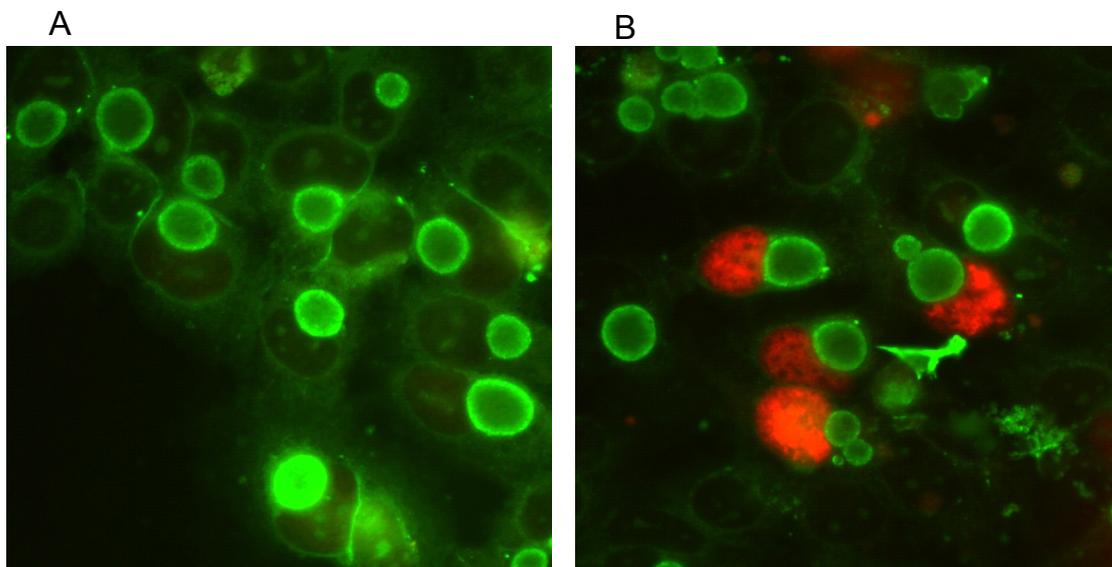


Abb. 34: *C. pneumoniae* Einschlüsse in c-Jun transfizierten HEp-2 Zellen 48 h nach der Infektion. HEp-2 Zellen wurden mit einem c-Jun Plasmid transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion mit *Cpn* infiziert. 48 hpi wurden die Zellen fixiert und das überexprimierte c-Jun Protein in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung (IFT) markiert. Als Primärantikörper wurde dabei der Rabbit anti-c-Jun Antikörper verwendet, der auch im Western Blot eingesetzt wurde (Cell Signaling Technology). Der Sekundärantikörper, ein Anti-Rabbit IgG, war Alexa 568-markiert. Der chlamydiale Einschluss wurde gleichzeitig mitgefärbt. Der Primärantikörper war ein Mouse Anti-Chlamydien-LPS Antikörper und als Sekundärantikörper wurde ein Anti-Mouse IgG verwendet, das FITC-markiert war. (A) Dargestellt ist der Kontrollansatz (Transfektion mit Kontrollplasmid), in dem nur die chlamydialen Einschlüsse gut anfärbbar waren. Das Protein c-Jun war nicht nachweisbar. (B) Dargestellt sind die c-Jun transfizierten Zellen, in denen das Protein c-Jun im Zellkern rot fluoreszierte. Die Größe und die Form der Einschlusskörperchen entsprach denen im Kontrollansatz. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes, n=3.

Es wurden jedoch keine Unterschiede in der Größe oder der Form der Einschluss-

körperchen festgestellt (Abbildung 34).

Da nur der IFT allein nicht aussagekräftig genug ist, ob eine c-Jun Überexpression Einfluss auf die Entwicklung von *Cpn* hat, wurden zusätzlich auch Wiederanzuchterperimente von c-Jun transfizierten und infizierten Zellen gemacht. Damit sollte geprüft werden, ob es evtl. durch die Transfektion zu Unterschieden in der Replikation der Chlamydien kommt. Die Auswertung der Wiederanzuchterperimente ergab jedoch, dass sich die Rate der Wiederanzucht zwischen Zellen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden und Zellen, die mit dem c-Jun Plasmid transfiziert wurden, nicht signifikant unterscheidet (Abbildung 35). Beide Wiederanzuchtraten waren geringer als bei den Kontrollzellen, die nicht transfiziert wurden. Die geringere Anzucht von *Cpn* aus transfizierten Zellen ist vermutlich damit zu erklären, dass jedes Transfektionsereignis einen nicht unerheblichen Zellstress auslöst. Dadurch dass die Wirtszellen gestresst waren, konnten auch die Chlamydien nicht optimal wachsen wodurch es, verglichen mit den Kontrollzellen, in allen transfizierten Zellen zu geringeren Wiederanzuchtraten kam. Eine starke Überexpression von c-Jun in den mit dem c-Jun Plasmid transfizierten Zellen wurde im Western Blot nachgewiesen (Ergebnis nicht gezeigt). Ein spezifischer Effekt der c-Jun Überexpression auf die Wiederanzucht von *Cpn* konnte nicht gezeigt werden.

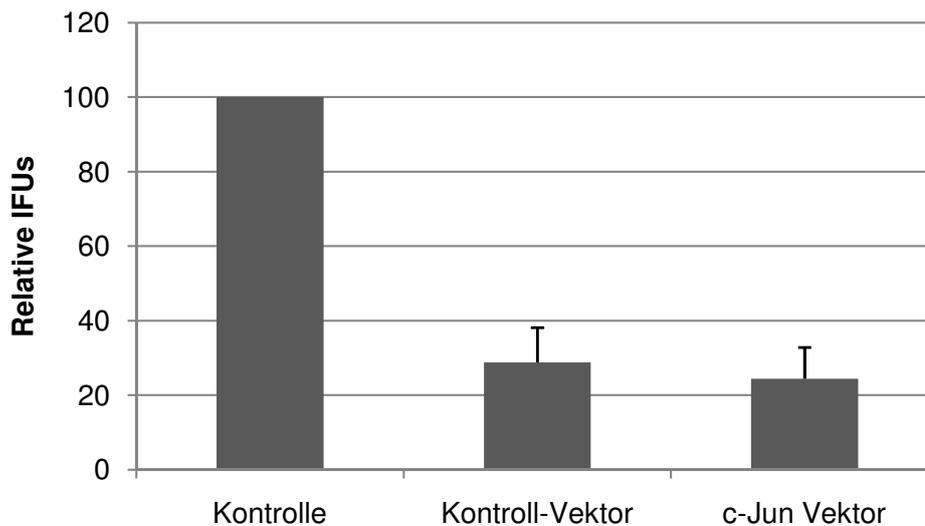


Abb. 35: Wiederanzucht von *Cpn* aus c-Jun transfizierten Zellen. HEp-2 Zellen, die zunächst mit einem c-Jun Vektor bzw. einem Kontroll-Vektor transfiziert wurden, wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit *Cpn* infiziert. Zur Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, die nicht transfiziert wurden. 48 hpi wurden von den drei Ansätzen Wiederanzuchtexperimente durchgeführt. Die Wiederanzuchtrate von *Cpn* (angegeben in relativen IFUs) aus Zellen, die c-Jun überexprimiert hatten, unterschied sich kaum von denen, die mit dem Kontroll-Vektor transfiziert waren. Dargestellt ist das Ergebnis aus vier unabhängigen Experimenten, n=4.

5.10 Regulation von AP-1 Proteinen in *C. pneumoniae* infizierten Monozyten

In Monozyten persistiert *Cpn* auf natürliche Weise und bildet sehr kleine, aberrante Einschlusskörperchen aus (Abbildung 36).

Es wird angenommen, dass *Cpn* Monozyten als Vektoren nutzen, so dass die Chlamydien durch diese Zellen im gesamten Körper verbreitet werden können. Die Besonderheit dabei ist, dass *Cpn* in Monozyten persistiert. Das Monozyten-Persistenzmodell wurde in dieser Arbeit zusätzlich gewählt, um zu untersuchen, ob AP-1 Proteine in einer persistierenden Infektion im Vergleich zu einer akuten Infektion unterschiedlich reguliert sind. Aus diesem Grund wurden in *Cpn* infizierten Monozyten durch Western Blot Analysen der Nachweis an AP-1 Proteinen in Ganzzellextrakten durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass alle nachgewiesenen AP-1 Proteine durch die Infektion mit lebenden *Cpn* 48 und 72 hpi hochreguliert werden (Abbildung 37).

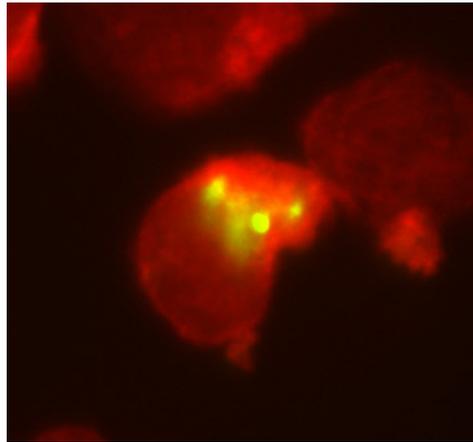


Abb. 36: Persistenz von *Cpn* in einem Monozyten. *Cpn* persistiert auf natürliche Weise in Monozyten und bildet, wie hier dargestellt, nur sehr kleine aberrante Einschlüsse aus. Cytospins von infizierten Monozyten wurden 72 hpi angefertigt, fixiert und im direkten IFT gefärbt. Zur Kontrolle der Monozyteninfektion wurde der IFT bei jedem Experiment mitgeführt.

In den Kontrollzellen waren in geringen Mengen nur die Proteine c-Jun und JunD nachweisbar. Alle anderen AP-1 Proteine waren in unstimulierten Monozyten nicht detektierbar. Die Proteine JunB, JunD und FosB waren durch die geringere Infektionsdosis von 10 IFUs/Zelle sogar noch stärker hochreguliert als durch die hohe Dosis von 30 IFUs/Zelle. Auch durch die Stimulation mit Hitze inaktivierten *Cpn* war eine erhöhte Menge an AP-1 Proteinen im Vergleich zu den Kontrollzellen nachweisbar. Der Effekt der Hochregulation ist also nicht auf lebende Chlamydien beschränkt.

Die AP-1 Bindungsaktivität wurde daraufhin auch in den infizierten Monozyten untersucht. Die Abbildung 38 zeigt, dass 24 hpi die AP-1 Bindungsaktivität durch die *Cpn*-Infektion und durch Hitze inaktivierte *Cpn* im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht ist. Der Nachweis eines AP-1 Signals im EMSA war zu den Zeitpunkten 48 und 72 hpi trotz mehrfacher Wiederholung des Experimentes nicht möglich.

Da gezeigt werden konnte, dass in Epithelzellen das AP-1 Signal durch CPAF herunterreguliert ist, war die Frage, ob auch in Monozyten zum Zeitpunkt 48 und 72 hpi während der Herstellung der Kernextrakte die AP-1 Proteine abgebaut werden. Für die Klärung dieser Frage wurden Ganzzellextrakte von infizierten und nicht-infizierten Monozyten im Western Blot auf CPAF untersucht um zu klären, ob CPAF in infizierten Monozyten vorhanden ist oder nicht. Infizierte HEp-2 Zellen wurden als

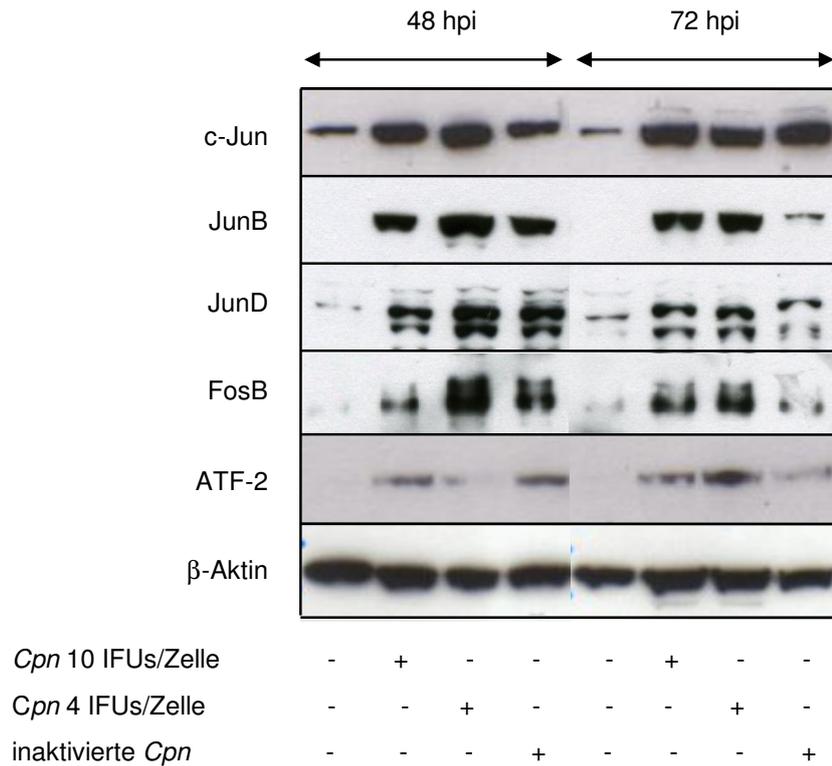


Abb. 37: Erhöhte Expression von AP-1 Proteinen in infizierten Monozyten 48 und 72 hpi. Je 2×10^6 Monozyten wurden sowohl mit einer hohen und einer niedrigen Dosis an lebenden als auch mit Hitze inaktivierten *Cpn* infiziert. Die Dosis an Hitze inaktivierten entsprach dabei der hohen Dosis lebender *Cpn*. Zu den Zeitpunkten 48 und 72 hpi wurden Ganzzellextrakte für die Untersuchung im Western Blot hergestellt. Alle nachgewiesenen AP-1 Proteine konnten in allen stimulierten Zellen in erhöhten Mengen nachgewiesen werden. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, $n=2$.

Positivkontrolle mitgeführt. Es wurde bei beiden Zelllinien zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 hpi die Extrakte geerntet. Die Protease war nur in infizierten HEp-2 Zellen zu den Zeitpunkten 48 und 72 hpi nachweisbar (Abbildung 39). In infizierten Monozyten war CPAF nicht detektierbar. Lediglich eine unspezifische Bande bei einem Molekulargewicht von 50 kDA trat unabhängig von der Zelllinie und vom Infektionsstatus bei allen Proben auf. Das fehlende AP-1 Signal 48 und 72 hpi im EMSA, kann somit bei Monozyten nicht auf die Protease CPAF zurückgeführt werden.

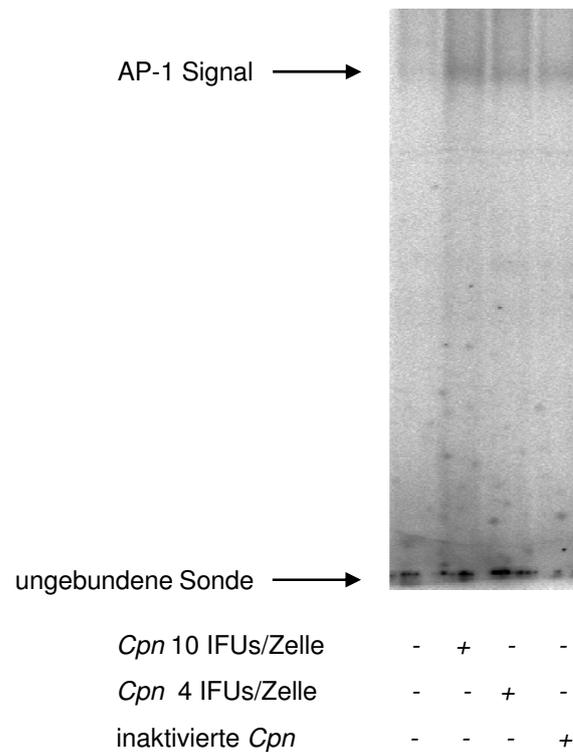


Abb. 38: Nachweis der AP-1 Bindungsaktivität in infizierten Monozyten 24 hpi. Gel-Shift-Analyse aus Kernextrakten von Monozyten, die mit einer hohen Dosis, einer niedrigen Dosis und mit inaktivierten *Cpn* infiziert waren. Durch Zugabe einer ^{32}P -radioaktiv markierten Sonde, die die AP-1 Bindungssequenz beinhaltet, entstanden Komplexe aus AP-1 Proteinen und der Sonde. Diese Komplexe wurden in 5%igen Polyacrylamidgelen getrennt von ungebundener Sonde und unspezifischen Komplexen und durch Autoradiographie nachgewiesen. Die AP-1 Bindungsaktivität nimmt in Monozyten im Vergleich zu Kontrollzellen durch die Infektion mit lebenden und mit Hitze inaktivierten *Cpn* 24 hpi zu. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment, n=2.

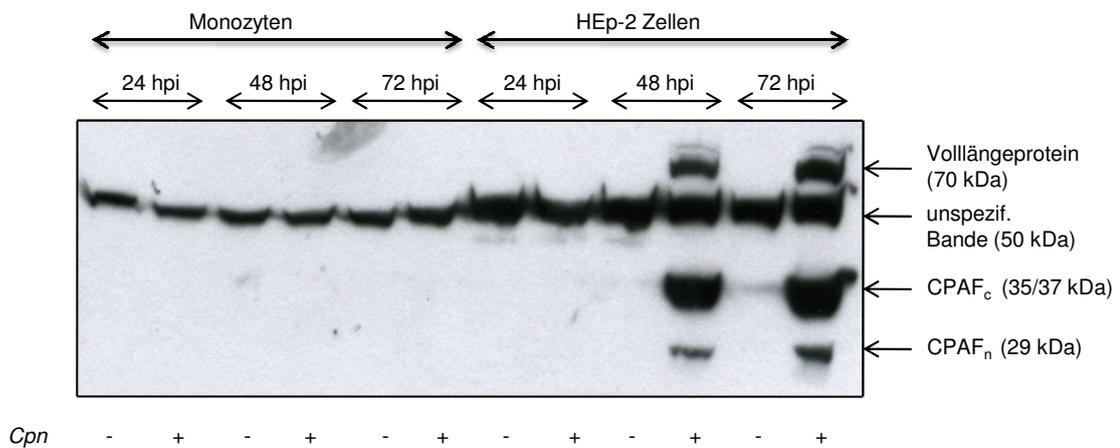


Abb. 39: Kein Nachweis von CPAF in infizierten Monozyten. In Monozyten, in denen *Cpn* persistiert, kann CPAF zu keinem Zeitpunkt nach der Infektion mit *Cpn* nachgewiesen werden. Ein Nachweis der chlamydialen Protease CPAF war nur in infizierten HEp-2 Zellen 48 und 72 hpi im Western Blot möglich. Der verwendete polyklonale Rabbit anti-CPAF-Antikörper detektierte das Volllängeprotein (70 kDa), CPAF_c (35/37 kDa) und CPAF_n (29 kDa). Außerdem wurde eine unspezifische Bande bei einem Molekulargewicht von 50 kDa auch bei nicht-infizierten Zellen detektiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, n=3.

6 Diskussion

6.1 AP-1 reguliert für *C. pneumoniae* relevante zelluläre Prozesse

Zahlreiche Studien haben sich darum bemüht zu klären, wie sich bei Chlamydien spezifische Eigenschaften zur Adaptation an die jeweiligen Wirtsorganismen herausgebildet haben. Um ihre obligat intrazelluläre Lebensweise zu gewährleisten, haben sie Strategien entwickelt ihre Wirtszelle so zu beeinflussen, dass sie ihre besondere Lebensart sichern konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde der Transkriptionsfaktor AP-1 in *Chlamydia pneumoniae* (*Cpn*) infizierten Zellen untersucht. AP-1 ist an der Regulation zahlreicher Gene beteiligt, die Inflammationsprozesse, Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beeinflussen. Da *Cpn* in genau diese Prozesse eingreift, um das intrazelluläre Überleben zu gewährleisten, war AP-1 Untersuchungsschwerpunkt dieser Dissertation. AP-1 ist ein dimeres Protein, das sich aus Proteinen der Jun-, Fos- und ATF- Familie zusammensetzt. Welche zellulären Abläufe von AP-1 reguliert werden, hängt aber nicht nur von der Zusammensetzung des Transkriptionsfaktors ab, sondern auch von der Art des Zellstimulus, dem Differenzierungsstatus der Zelle und von der betroffenen Zelllinie. AP-1 kann z.B. die Proliferation der einen Wirtszelle stimulieren (z.B. Fibroblasten) in anderen aber deren Apoptose induzieren (z.B. neuronale Zellen) [146]. Um zu untersuchen ob AP-1 unterschiedlich reguliert wird in verschiedenen *Cpn* infizierten Zelllinien, wurde einerseits die epitheliale Zelllinie HEp-2, in der der replikative Entwicklungszyklus durchlaufen wird, untersucht. Andererseits wurden Monozyten infiziert, in denen *Cpn* persistiert.

Es ist bekannt, dass unter anderem die Expression des Transkriptionsfaktors Egr-1 durch die Infektion mit *Cpn* erhöht ist [137] und dadurch die Proliferation der Wirtszelle stimuliert wird. In einer Arbeit von Miller et al. wurde gezeigt, dass sowohl der Transkriptionsfaktor NF- κ B als auch AP-1 in humanen vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC - vascular smooth muscle cells) nach einer Infektion mit *Cpn* verstärkt nachweisbar sind [109]. In dieser Studie wurde eine gesteigerte Proliferation der VSMC nach der Infektion nachgewiesen, die auf eine regulatorische Beteiligung von AP-1 und NF- κ B vermuten ließ. Bereits 2 hpi konnten eine erhöhte Bindungsaktivität beider

Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Genauere Untersuchungen zur funktionellen Relevanz der AP-1 Hochregulation wurden nicht unternommen. Diese Studie war bislang die einzige, die den Transkriptionsfaktor AP-1 im Zusammenhang mit einer Chlamydieninfektion untersucht hat.

6.2 Rolle von AP-1 im Verlauf der akuten *C. pneumoniae* Infektion

In der frühen Phase der akuten Infektion (4 hpi) konnte eine Hochregulation der Proteine c-Jun, c-Fos, FosB und ATF-2 im Western Blot nachgewiesen werden. Ebenso konnte eine Phosphorylierung als Marker der Aktivierung von c-Jun und ATF-2 gezeigt werden. Im EMSA wurde eine verstärkte AP-1 Bindungsaktivität zur gleichen Zeit nach der Infektion mit *Cpn* gemessen. Damit wurde gezeigt, dass AP-1 funktionell aktiv im Kern vorlag und an die Promotorsequenz binden konnte. Die Induktion von AP-1 in der frühen Phase einer *Cpn*-Infektion könnte eine Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an einer Immunabwehrreaktion darstellen. Es ist bekannt, dass nach einer Infektion mit *Cpn* proinflammatorische Zytokine induziert werden [180]. Das Zytokin IL-8 ist nach einer Infektion mit *Cpn* in erhöhten Mengen nachweisbar, was eine schnelle transendotheliale Migration von polymorphnukleären Neutrophilen in der Lunge zur Folge hat ([112],[169]). Da das Gen für IL-8 eine AP-1 Bindungsstelle in seinem Promotor hat, unterliegt dieses Zytokin einer AP-1 abhängigen Regulation [171]. In einer anderen Forschungsarbeit von Schmeck et al. wurde nachgewiesen, dass auch nach einer Infektion von BEAS-Zellen mit dem Bakterium *Streptococcus pneumoniae* IL-8 in erhöhten Mengen nachweisbar ist, was ebenfalls auf die Bindung von AP-1 an den IL-8 Promotor erklärt wurde [143].

Es wird vermutet, dass die Bedeutung der frühen AP-1 Hochregulation nicht nur in der Regulation inflammatorischer Prozesse liegt, sondern auch die Proliferation der Zellen beeinflusst wird. Cosenza et al. schilderten in einer Studie, dass c-Jun und c-Fos für die Progression des Zellzyklus benötigt werden [40]. Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass Cyclin D1, ein Regulator des Zellzyklus, einer AP-1 abhängigen Regulation unterliegt [16]. Als weiterführendes Experiment zu der vorliegenden Arbeit könnte untersucht werden, ob Cyclin D1 durch die *Cpn*-Infektion beeinflusst ist und

ob durch Inhibition von AP-1 dieser Effekt negativ reguliert wird.

Da durch Hitze inaktivierte *Cpn* auch eine verstärkte AP-1 Bindungsaktivität hervorgerufen wurde, ist zu vermuten, dass dieser Effekt durch chlamydiales LPS oder ein anderes chlamydiales Antigen ausgelöst wurde. Chlamydiales LPS könnte an den TLR-4 binden und dadurch eine Signalkaskade in Gang setzen, die zur Aktivierung von AP-1 führt. In einer Studie von Patel et al. wurde dieser Weg bereits beschrieben [125]. Für die Regulation von AP-1 sind die MAPK Signaltransduktionswege von entscheidender Bedeutung. In Versuchsansätzen, bei denen zur Kontrolle mit *E. coli*-LPS stimuliert wurde, konnte ebenfalls eine erhöhte Menge an AP-1 Proteinen nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt). Dieser Befund zeigt, dass die frühe AP-1 Hochregulation offensichtlich LPS-abhängig ist und nicht spezifisch für lebende Chlamydien ist. Dass LPS für die chlamydiale Infektivität sehr wichtig ist, zeigte eine Studie, bei der ein chlamydialer LPS-Antikörper zu dem Infektionsansatz gegeben wurde und damit eine Infektion mit *Cpn* verhindert wurde [127].

Als einziges der untersuchten Proteine wurde JunB durch die Infektion mit *Cpn* in der frühen Phase (4 hpi) nicht beeinflusst. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass JunB ein negativer Regulator der Zellproliferation in verschiedenen Zelltypen ist ([124],[160]). Generell wird JunB als Antagonist von c-Jun angesehen [146]. Nicht nur in der Proliferation sondern z.B. auch in der Differenzierung von Keratinozyten wurde eine gegensätzliche Funktion von JunB und c-Jun beschrieben [159], wobei c-Jun als positiver und JunB als negativer Regulator der Proliferation gilt [9]. Wenn die Proliferation der Wirtszellen induziert wird, könnte das auch die Wachstumsbedingungen für *Cpn* verbessern. Da durch die Induktion der Proliferation der Apoptose entgegengewirkt wird, könnte sowohl das Überleben der Wirtszelle als auch von *Cpn* gesichert werden. Der Vorteil, der durch die Stimulation der Proliferation für *Cpn* entsteht, liegt darin, dass sich der Erreger selbst verbesserte Wachstums- und Lebensbedingungen schafft und seinen Lebensraum optimiert. Die Beobachtungen dieser Arbeit stützen somit die bekannten Befunde, dass *Cpn* die Apoptose inhibiert und somit das eigene Überleben sichert [32].

Sukhatme et al. konnten zeigen dass c-Fos und Egr-1 (Early growth response-1) oft coreguliert sind und die gleiche Kinetik haben [156], was die nachgewiesene Hoch-

regulation von c-Fos in dieser Arbeit erklären könnte. Ein Nachweis, dass Egr-1 durch eine *Cpn*-Infektion erhöht ist, wurde bereits gezeigt [137]. Hier konnte nachgewiesen werden, dass in der frühen Phase der Infektion sowohl die Egr-1 mRNA als auch die Bindungsaktivität dieses Transkriptionsfaktors hochreguliert waren, wodurch die Proliferation induziert wurde.

Die Untersuchung der AP-1 Proteine in der mittleren Phase des Infektionszyklus (24 hpi) ergab, dass bei keinem der nachgewiesenen AP-1 Proteine ein Unterschied zur Mediumkontrolle detektiert werden konnte. Auch bei der Analyse der AP-1 Bindungsaktivität zu diesem Zeitpunkt wurden keine Unterschiede durch die *Cpn*-Infektion gemessen. Dies könnte bedeuten, dass die initiale Induktion einer Signalkaskade in die Aktivierung von Effektorproteinen gemündet ist, um zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung zu steuern. Die ursprüngliche Induktion ist aber nicht mehr nachweisbar, sondern nur noch ihre Auswirkungen wären jetzt detektierbar.

Die weiteren Analysen der AP-1 Proteine in der späten Phase des Entwicklungszyklus (48 und 72 hpi) wiesen ein erstaunliches Ergebnis auf. Es wurde eine erneute starke Hochregulation der Proteine c-Jun und c-Fos detektiert. Außerdem wurde nachgewiesen, dass c-Jun in seiner aktivierten Form vorlag, da eine deutliche Phosphorylierung dieses Proteins gezeigt werden konnte. Wichtig ist die Erkenntnis, dass nur lebende Chlamydien zu den späten Zeitpunkten diesen Effekt auf die AP-1 Proteine haben, während tote Chlamydien keine Veränderung hervorrufen. Die AP-1 Regulation in der späten Phase scheint ein spezifischer Effekt des intrazellulären Wachstums der Chlamydien zu sein, der einen Gegensatz zu dem unspezifischen Effekt der frühen Phase darstellt. Es wäre denkbar, dass *Cpn* Effektorproteine in das Zytosol der Wirtszelle sezerniert und damit den AP-1 Signalweg direkt oder indirekt beeinflusst. Die nachgewiesene Menge der anderen AP-1 Proteine (ATF-2, JunB, JunD und FosB) ist zu diesem Zeitpunkt durch die Infektion mit *Cpn* verringert. Besonders deutlich ist dieser Effekt am Protein ATF-2 bzw. phospho-ATF-2 zu erkennen. Fuchs et al. publizierten, dass ATF-2 durch N-terminale Phosphorylierung vor Ubiquitinierung und somit vor Abbau geschützt ist [60]. Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass nach der Infektion mit *Cpn* 48 und 72 hpi keine Phosphorylierungen mehr von ATF-2 nachweisbar sind (dosisabhängiger Effekt), wird vermutet, dass das Protein ATF-2

ubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut werden könnte. Die Proteine JunB, JunD und FosB sind im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollzellen hauptsächlich zum Zeitpunkt 72 hpi stark vermindert. Somit ist auch zu diesem späten Zeitpunkt wieder eine gegensätzliche Regulation von c-Jun und JunB wie schon zu dem untersuchten frühen Zeitpunkt nach der Infektion nachgewiesen worden.

Zu Beginn der Arbeit wurde hauptsächlich die AP-1 Bindungsaktivität mit Hilfe des EMSAs (electrophoretic mobility shift assay) untersucht, weshalb erst davon ausgegangen wurde, dass alle AP-1 Proteine in der späten Phase der Infektion mit *Cpn* herunterreguliert sind. In der Untersuchung der isolierten Kernproteine im Western Blot zeigte sich ebenfalls eine deutlich verminderte Menge aller untersuchter AP-1 Proteine bei *Cpn* infizierten Zellen, was auf eine verminderte Proteinexpression der AP-1 Proteine vermuten ließ. Daraufhin wurden durch transiente Transfektion mit einem c-Jun Plasmid in den Zellen eine erhöhte c-Jun Expression induziert. Es wurde angenommen, dass *Cpn* den Transkriptionsfaktor AP-1 herunterreguliert, weil dieser auch als Regulator vieler Apoptose relevanter Gene beschrieben wird. Durch die transiente Transfektion wurde angenommen, in den HEP-2 Zellen Apoptose zu induzieren. Zellen, die c-Jun überexprimierten, wurden im IFT angefärbt um zu untersuchen, ob und wie die Transfektion das Wachstum der Chlamydien beeinflusst. Überraschender Weise wurden keine Unterschiede in der Morphologie der Inklusionen festgestellt. Die Größe der Einschlüsse war in transfizierten Zellen nicht auffallend unterschiedlich im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen bzw. Zellen, die mit einem Kontrollplasmid transfiziert wurden. Auch die Untersuchung, ob in c-Jun transfizierten Zellen Apoptose-relevante Proteine (Bim, Bid, Mcl-1) beeinflusst werden, wurde im Western Blot untersucht, aber keines dieser Proteine war durch die Transfektion verändert (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies führt zu der Annahme das eine c-Jun Überexpression allein nicht zur Induktion von Apoptose in HEP-2 Zellen führt.

Es bleibt zu klären, an welcher Stelle der Signalkaskade *Cpn* eingreift, um in der späten Infektionsphase AP-1 Proteine unterschiedlich zu regulieren. Ein bekanntes Effektorprotein von *Cpn*, das dabei eine Rolle spielen könnte, ist CPAF.

6.3 AP-1 Proteine - neu identifizierte Targets von CPAF

Die chlamydiale Protease CPAF ist Untersuchungsschwerpunkt vieler Forschungsarbeiten gewesen, weshalb mittlerweile viele zelluläre Targetproteine bekannt sind. Es wurde nachgewiesen, dass CPAF in allen Chlamydienspezies vorkommt, was darauf hindeutet, dass es evolutionär konserviert und generell für das intrazelluläre Überleben wichtig ist [44]. Die Transkriptionsfaktoren USF-1 und RFX5 sind identifizierte Targetproteine von CPAF. Ein weiteres Substrat ist Keratin 8, das Bestandteil von Intermediärfilamenten ist, die wiederum an der Ausbildung des Zellgerüsts beteiligt sind. Es ist möglich, dass erst durch die Degradation von Keratin 8 der chlamydiale Einschluss auf seine enorme Größe heranwachsen kann und Zellorganellen verdrängt werden [43]. Auch das MHC kostimulierende Molekül CD1d wird von CPAF abgebaut [88] und erst kürzlich wurde das Protein Nectin-1, ein Adhäsionsmolekül, als Target von CPAF beschrieben [157]. Des Weiteren wurden die proapoptotischen „BH3-only“ Proteine als mögliche Targetproteine von CPAF beschrieben [128]. Auch in der Arbeit von Fischer et al. konnte der Abbau von „BH3-only“ Proteinen in Chlamydien infizierten Zellen nachwiesen werden. Bei dem untersuchten Protein Bim waren jedoch keine Proteinfragmente im Western Blot nachweisbar, was auf einen vollständigen Abbau zurückgeführt wurde [56]. Es wurde angenommen, dass durch die Chlamydieninfektion eine Modifikation von Bim stattfindet, was dann wiederum zum vollständigen Abbau durch das zelluläre Proteasom führt. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden niemals Spaltprodukte beim Abbau detektiert, sondern die untersuchten AP-1 Proteine verschwanden bei Proben, die mit CPAF in Kontakt kamen, vollständig. Warum so viele unterschiedliche Proteine von CPAF erkannt und abgebaut werden können, ist bis heute nicht geklärt.

Chlamydien produzieren von CPAF zunächst eine katalytisch inaktive Vorstufe, die wahrscheinlich durch einen autokatalytischen Prozess die aktiven Formen CPAF_n und CPAF_c hervorbringt. Diese Prozessierung und die intramolekulare Dimerisierung dieser beiden Unterproteine sind für die Bildung des katalytisch aktiven CPAF-Proteins ausschlaggebend. Da ein starker Abbau von AP-1 Proteinen erst bei der Untersuchung von Zelllysaten (Kernextrakte, Kombination von Lysaten im Degrada-

tion Assay) jedoch nicht in Ganzzelllysaten (zutreffend für c-Jun und c-Fos) detektiert wurde, könnte die Aktivierung bzw. die Prozessierung von CPAF erst in den Lysaten induziert werden, jedoch nicht in der intakten Zelle. Dass die AP-1 Proteine ATF-2, JunB, JunD und FosB in der späten Phase des Entwicklungszyklus in den untersuchten Ganzzellextrakten herunterreguliert waren, muss nicht zwingend durch CPAF bedingt sein. CPAF könnte seine volle proteolytische Aktivität erst dann zur Geltung bringen, wenn die Zelle sich in das Stadium der Lyse begibt. Dafür spricht, dass CPAF erst in der späten Phase des Entwicklungszyklus nachweisbar ist. Vielleicht ist der unspezifische Abbau vieler Proteine durch CPAF für die Freisetzung der Elementarkörperchen am Ende des Zyklus von Vorteil. Es gibt bereits Hinweise, dass CPAF die Lyse der Zelle einleiten könnte und so die Freisetzung der infektiösen Formen erleichtert [123].

Die Degradation einiger der aufgeführten Targetproteine von CPAF kann durch Zugabe des Proteasominhibitors Lactacystin verhindert werden ([182],[123]). Jedoch ist die eigentliche Funktion von Lactacystin die irreversible Inhibition des 20S Proteasoms. Die Inhibition kommt durch die kovalente Bindung an das N-terminale Threonin in der katalytischen β -Untereinheit zustande [54]. Wieso es durch Lactacystin zur Inhibition von CPAF kommt ist noch nicht ausreichend geklärt. Huang et al. stellten die Hypothese auf, dass Lactacystin auch kovalent an CPAF bindet und dadurch dessen Aktivität inhibiert [79].

In HEK293 Zellen führt die CPAF Induktion nicht nur zum Abbau von c-Jun und ATF-2 sondern interessanter Weise auch zur Induktion von c-Fos. Dieses Resultat stellt einen Widerspruch zu den Ergebnissen aus den Kernextrakten dar, in denen c-Fos auch abgebaut wurde. Eventuell kann CPAF doch nicht alle AP-1 Proteine abbauen sondern nur einige. Die, die nicht degradiert werden können, werden vermutlich auf anderen Wegen abgebaut, da sie nicht mehr genügend Dimerisierungspartner finden. Warum allerdings c-Fos durch die CPAF Induktion auch induziert wird, konnte in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Es wäre auch möglich, dass dimere Proteine von CPAF nicht abgebaut werden, sondern nur die Einzelproteine. Zu klären wäre wie stabil Dimere im Gegensatz zu Einzelproteinen sind.

Aus den unterschiedlichen Ergebnissen der Untersuchungen von einerseits den

Zytoplasma- und Kernextrakten und andererseits den Ganzzellextrakten wurde geschlossenfolgert, dass AP-1 Proteine während der Herstellung der Zytoplasma- und Kernextrakte abgebaut werden. Bei dieser Methode wurde ein Lysispuffer verwendet, der im Gegensatz zu dem Lysispuffer für die Herstellung der Ganzzellextrakte, sehr mild ist. Die proteolytischen Proteine behalten ihre Aktivität, weshalb PMSF und ein Protease-Inhibitor Cocktail zugesetzt wurden, um einen Abbau zu verhindern. Diese Inhibitoren haben allerdings keine Wirkung auf die chlamydiale Protease CPAF. Lediglich Lactacystin hat eine nachgewiesene inhibitorische Wirkung auf CPAF und wurde deshalb den Ansätzen bei der Herstellung von Kernextrakten zugesetzt. Der Abbau des AP-1 Proteins c-Jun wurde dadurch tatsächlich zum Teil verhindert, was die Vermutung bestätigte, dass der Abbau während der Herstellung der Proben stattfand. Warum dennoch ein Großteil degradiert wurde, ist unklar. Die Ursachen sind aber vermutlich methodisch bedingt. Mögliche Ursachen könnten sein, dass eine zu geringe Konzentration an Lactacystin verwendet wurde oder mit ungünstigen Inkubationszeiten und/oder -temperaturen gearbeitet wurde.

Schlussfolgerung ist, dass Proteinanalysen in der späten Phase des Entwicklungszyklus von *Cpn* schwer möglich sind, da aufgrund der Methodik die Gefahr besteht, dass die zu untersuchenden Proteine während der Aufarbeitung durch die chlamydiale Protease CPAF abgebaut werden. Deshalb sollte zu Beginn einer Untersuchung von Proteinen in Chlamydien infizierten Zellen zunächst in einem Degradations Assay untersucht werden, ob diese von CPAF abgebaut werden. Ist dies der Fall sind die Ergebnisse aus Untersuchungsmethoden wie EMSA und Immunpräzipitation bei Zeitpunkten, zu denen viel CPAF nachweisbar ist, mit Vorsicht zu interpretieren und nur zulässig, wenn ein methodisch bedingter Abbau auszuschließen ist. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse von durchgeführten Immunpräzipitationsanalysen zur Bestimmung von Dimerisierungspartnern von AP-1 Proteinen nicht in dieser Arbeit gezeigt.

6.4 Auswirkungen einer AP-1 Blockierung auf die Entwicklung von *C. pneumoniae*

Da festgestellt wurde, dass die bedeutendsten AP-1 Proteine c-Jun und c-Fos, die einen sehr starken Transaktivator bilden, in der frühen und der späten Phase des

Entwicklungszyklus von *Cpn* hochreguliert sind, wurde nach geeigneten Inhibitoren gesucht um die funktionelle Bedeutung auf indirektem Weg zu beschreiben. Es sind mehrere AP-1 Inhibitoren wie Tanshinone IIA ([85],[91],[122]), NDGA ([121],[101]) und Curcumin ([17],[147]) beschrieben. Letzterer ist auch als Inhibitor für NF- κ B beschrieben ([58],[80]) und wurde deshalb in dieser Arbeit nicht verwendet.

Tanshinone IIA ist als AP-1 Inhibitor gut etabliert [103]. Um die Inhibition von AP-1 zu überprüfen, wurden Tanshinone IIA im EMSA getestet, wobei eine deutlich verminderte AP-1 Bindungsaktivität 4 hpi gemessen wurde.

Als weiterer AP-1 Inhibitor wurde NDGA getestet, da diese Substanz als AP-1 Inhibitor in anderen Forschungsarbeiten eingesetzt wurde [121]. Es zeigte sich, dass auch bei seiner Verwendung, *Cpn* infizierte Zellen kleine Einschlusskörperchen bilden. Ballatori und Wang konnten zeigen, dass NDGA das ATP-Level der Zelle reduziert [18], was eine mögliche Erklärung für die geringe Größe der Inklusion sein könnte. Chlamydien sind Energieparasiten und benötigen das ATP der Wirtszelle. Da der Einfluss von NDGA auf die Zelle jedoch sehr vielfältig ist (z.B. Lipoxygenase Inhibitor [4]) und sich nicht spezifisch auf AP-1 Proteine beschränkt, wurde nur Tanshinone IIA in den weiteren Experimenten für die AP-1 Inhibition eingesetzt.

Nachdem eine verminderte AP-1 Bindungsaktivität nachweisbar war, wurde untersucht, ob der Inhibitor auch Auswirkungen auf die Proteinmengen der AP-1 Proteine hat. Es stellte sich heraus, dass die Expression von c-Jun und phospho-c-Jun durch Tanshinone IIA deutlich verringert ist. Die Proteine c-Fos und ATF-2 waren jedoch nicht beeinträchtigt. Da das Gen für c-Jun in seinem Promotor selbst auch eine AP-1 Bindestelle trägt, kontrolliert das Protein c-Jun seine eigene Expression [11]. Ist also durch Tanshinone IIA die Bindung von c-Jun an die DNA blockiert, so ist auch die Autoregulation blockiert und damit die verminderte Proteinmenge zu erklären. Die Proteine c-Fos und ATF-2 scheinen nicht einer Autoregulation zu unterliegen. In c-Jun transfizierten Zellen ist im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen bzw. solchen, die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden, im Western Blot eine enorme Zunahme an c-Jun detektierbar. Solch eine starke Erhöhung der Proteinmenge konnte in ATF-2 transfizierten Zellen nicht gemessen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

6.4.1 Auswirkungen der AP-1 Inhibition auf die Morphologie von *C. pneumoniae*

Wird Tanshinone IIA nach der Infektion zu den Zellen gegeben, so durchläuft *Cpn* nicht mehr den replikativen Entwicklungszyklus, sondern bildet nur sehr kleine Einschlusskörperchen wie sie auch bei persistierenden Infektionen gefunden werden. Die Tatsache, dass die AP-1 Inhibition die Ausbildung einer „Persistenz-ähnlichen“ Infektion zur Folge hat, stellt einen der wichtigsten Befunde dieser Arbeit dar. Die vier wesentlichen Charakteristika persistierender Infektionen wurden an Tanshinone IIA behandelten Zellen nachgewiesen. Diese Merkmale sind:

- Es sind deutlich kleinere Einschlüsse nachweisbar.
- Die Morphologie der Einschlusskörperchen ist verändert. Die Retikularkörperchen (RK) sind größer und es findet keine Redifferenzierung zu Elementarkörperchen (EK) statt.
- Eine Anzucht aus dem persistierenden Zustand ist nicht möglich, da keine infektiösen EK vorhanden sind.
- Persistenz ist reversibel, d.h. durch die Aufhebung des Persistenzstimulus kommt es zum Wiedereintritt in den replikativen Entwicklungszyklus (RK redifferenzieren zu EK).

Alle diese Persistenzmerkmale waren bei der Behandlung von infizierten HEp-2 Zellen mit Tanshinone IIA erfüllt. Wir postulieren deshalb einen neuen Mechanismus zur Induktion der Persistenz von *Cpn*. Über die Inhibition des Transkriptionsfaktors AP-1 mittels Tanshinone IIA tritt *Cpn* in das Persistenzstadium ein. Daraus ist zu schließen, dass der eukaryontische Transkriptionsfaktor AP-1 für den Ablauf des replikativen Entwicklungszyklus von *Cpn* enorm wichtig ist.

6.4.2 Auswirkungen der AP-1 Inhibition auf den Energiehaushalt

Um die funktionelle Relevanz von AP-1 während des Entwicklungszyklus von *Cpn* zu charakterisieren, wurde die Expression des Glucosetransporters-1 (Glut1), der einer

AP-1 abhängigen Regulation unterliegt, in Chlamydien infizierten Zellen untersucht. Es ist bekannt, dass Chlamydien diesen Rezeptor auf der Zelloberfläche erhöhen. Dies wurde gezeigt von Ojcius et al. [117], die eine Zunahme zum Zeitpunkt 24 hpi nach einer Infektion mit *Chlamydia psittaci* messen konnten. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch in dem hier gewählten Infektionsmodell mit *Chlamydia pneumoniae* die Glut1 Expression gesteigert ist und ob der AP-1 Inhibitor Tanshinone IIA einen Einfluss darauf hat. Die Glut1 mRNA wurde zu den verschiedenen Zeitpunkten des Entwicklungszyklus in einer Real-time PCR gemessen. In der frühen Phase der Infektion sind keine Veränderung der Glut1 Expressionsrate messbar. Der Glut1 mRNA Gehalt nimmt in *Cpn* infizierten Zellen erst 48 hpi um die 5-fache Menge zu. Es könnte sein, dass vorher der Energiebedarf der Zellen trotz Infektion noch nicht gesteigert ist, da die Entwicklung von *Cpn* im Vergleich zu anderen Chlamydien Spezies relativ langsam verläuft. Bei einer Infektion mit *Chlamydia trachomatis*, dessen Entwicklung sehr schnell verläuft, ist das Glut1 mRNA Level schon früher (24 hpi) erhöht (nicht veröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Jan Rupp). Das zu den frühen Zeitpunkten noch keine Erhöhung messbar ist, könnte auch daran liegen, dass die Zellen noch mit Glucose gesättigt sind, so dass der Energiebedarf zunächst ohne externe Zufuhr an Glucose gedeckt werden kann. Ojcius et al. konnten in *C. psittaci* infizierten HeLa-Zellen 24 hpi eine Erhöhung von Glut1 um den Faktor 1,93 messen [117]. Auch diese Chlamydien Spezies durchläuft den Replikationszyklus deutlich schnelleren als *Cpn*.

Bei infizierten Zellen, die zusätzlich mit Tanshinone IIA behandelt wurden, fand zum Zeitpunkt 48 hpi keine Erhöhung der Glut1 Expression statt. Das könnte durch die direkte AP-1 Inhibition erklärt werden. Es könnte aber auch daran liegen, dass die Inklusionen nicht zu ihrer üblichen Größe heranreifen konnte, sondern durch Tanshinone IIA sehr kleine Einschlusskörperchen gebildet wurden (Persistenz). Da Tanshinone IIA direkt nach der Infektion zugegeben wurde, aber der Effekt auf die Glut1 Expression erst 48 h nach der Infektion gemessen werden konnte, ist unklar, ob dies noch direkte Auswirkungen der AP-1 Inhibition sind. Es wäre auch möglich, dass die frühe AP-1 Inhibition dazu führt, dass die Zelle im Zellzyklusarrest verharret, da AP-1 für die Proliferation notwendig ist. Dadurch können auch die Chlamydien ihren Ent-

wicklungszyklus nicht vollständig durchlaufen und sie treten in die Persistenz ein. In der Persistenz laufen andere Signalwege ab, so dass AP-1 nicht mehr beeinflusst wird und deshalb Glut1 nicht hochreguliert wird. Bei persistieren Chlamydien besteht auch nicht mehr ein so großer Bedarf an Glucose, weshalb auch kein Bedarf an der Hochregulation von Glut1 besteht. Es bleibt also unklar, ob tatsächlich Tanshinone IIA spezifisch zu diesem Zeitpunkt noch die Glut1 Expression über die AP-1 Inhibition unterdrückt, oder ob die Tanshinone IIA Inkubation zu Beginn des Entwicklungszyklus andere Wege beeinflusst, die später unspezifische, sekundäre Auswirkung auf die Glut1 Expression haben.

Es wurde getestet, ob die Zugabe von Tanshinone IIA zu einem späteren Zeitpunkt Einfluss auf die Morphologie der Einschlusskörperchen hat. Das Ergebnis war, dass die Einschlüsse immer klein sind, unabhängig von Zeitpunkt zu dem die AP-1 Inhibition erfolgte. Auch nach 24 hpi konnte durch Zugabe von Tanshinone IIA noch immer Persistenz induziert werden. Da eine Beteiligung von AP-1 an der Regulation von Glut1 gezeigt wurde, wird vermutet, dass durch die Inhibition von AP-1 mittels Tanshinone IIA den *Cpn* infizierten Zellen zu wenig Glucose zur Verfügung steht und *Cpn* deshalb in das Stadium der Persistenz eintritt. Wenn zu wenig Glucose vorhanden ist, müsste auch ein Mangel an ATP nachweisbar sein. Um dies zu überprüfen wurde der ATP-Gehalt von *Cpn* infizierten Zellen gemessen, die kurz nach der Infektion mit Tanshinone IIA behandelt wurden. Der ATP-Gehalt dieser Zellen wurde mit dem von *Cpn* infizierten Zellen verglichen, die nicht mit dem Inhibitor behandelt wurden. Als Bezug wurden die Werte der Zellen gewählt, die weder infiziert noch mit Tanshinone IIA behandelt wurden. Dass die eingesetzte Konzentration von Tanshinone IIA nicht toxisch war, wurde in einem MTT-Assay überprüft und zusätzlich mit einer Live-Dead Färbung kontrolliert.

Da kurz nach der Zugabe des Inhibitors Tanshinone IIA zu den infizierten Zellen eine Abnahme des ATP-Gehaltes der Zelle gemessen wurde (6 hpi), muss es recht früh nach der Infektion zu einer Beeinflussung AP-1 kontrollierter enzymatischer Regulationsmechanismen, die mit dem Energiegehalt bzw. dem Metabolismus in Verbindung stehen, kommen. Dies könnten z.B. Enzyme sein, die an der Glykolyse, dem Tricarbonsäurezyklus oder der Endoxidation (Atmungskette) beteiligt sind. Yamaji et

al. konnten zeigen, dass über AP-1 Signalwege eine erhöhte Expression des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) induziert wird [179]. Auch das Enzym Hexokinase hat neben einigen anderen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren auch eine AP-1 Bindungsstelle in seinem Promotor [107]. Beide Enzyme sind für die Glykolyse unentbehrliche Katalysatoren.

Warum allerdings der ATP-Gehalt 12 hpi schon wieder auf dem Niveau der Kontrollzellen ist, bleibt unklar. Eine weitere Arbeit von Yaraei et al. zeigt, dass eine Infektion mit *Cpn* zu einer Erhöhung des ATP-Gehalts in infizierten Mausmakrophagen führt [181]. Yaraei et al. konnten ein erhöhtes ATP-Level 24, 48 und 72 Stunden nach der Infektion messen, wobei zum Zeitpunkt 48 hpi die höchste Menge an ATP im Bezug zu den Kontrollzellen gemessen wurde. Die verwendete Methode war die gleiche, wie in der vorliegenden Arbeit, jedoch wurden die Kits zur Messung von ATP von unterschiedlichen Herstellern bezogen. Zudem unterscheiden sich die untersuchten Zelllinien voneinander. Diese Unterschiede und auch methodische Differenzen in der Handhabung könnten Grund für die verschiedenen zeitlichen ATP-Erhöhungen sein.

6.5 Regulation von AP-1 Proteinen in *C. pneumoniae* infizierten Monozyten

In Monozyten persistieren Chlamydien auf natürliche Weise. Chlamydien nutzen diese Zellen dazu, sich im gesamten Organismus zu verbreiten. Durch die Persistenz werden vermutlich chronische Krankheitsverläufe verursacht. Da durch die Inhibition von AP-1 durch Tanshinone IIA in epithelialen HEp-2 Zellen Persistenz induziert wird, wurden Monozyten mit *Cpn* infiziert, um die dort natürlich entstehende Persistenz mit der Tanshinone IIA induzierten Persistenz im Bezug auf den Transkriptionsfaktor AP-1 zu vergleichen. Es wurde angenommen, dass AP-1 in infizierten Monozyten evtl. auch nur in sehr geringen Mengen nachzuweisen ist, da eine Inhibition von AP-1 in epithelialen Zellen zur Persistenz führte. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in *Cpn* infizierten Monozyten alle untersuchten Proteine des Transkriptionsfaktors AP-1 hochreguliert sind, wobei eine Persistenz morphologisch in den Zellen nachgewiesen wurde. In dieser Zelllinie übernimmt AP-1 möglicherweise andere Funktionen. Dieser

Befund gibt einen Hinweis auf die vielfältigen Funktionsweisen dieses Transkriptionsfaktors und die Abhängigkeit von der Zelllinie. Es ist zu vermuten, dass AP-1 in *Cpn* infizierten HEp-2 Zellen eine andere funktionelle Relevanz hat als in infizierten Monozyten, zumal der Entwicklungszyklus von *Cpn* in diesen beiden Zelllinien höchst unterschiedlich verläuft. Dafür spricht, dass zu den späten Untersuchungszeitpunkten in den *Cpn* infizierten HEp-2 Zellen auch einige AP-1 Proteine in verringerter Menge nachweisbar waren, während alle untersuchten Proteine in Monozyten durch die Infektion hochreguliert waren. Somit wurden Unterschiede in der AP-1 Regulation zwischen den beiden *Cpn* infizierten Zelllinien entdeckt, was u.a. eine Ursache für die unterschiedlichen Entwicklungszyklen darstellt.

Ein weiterer Befund dieser Arbeit ist, dass in Monozyten nach einer *Cpn*-Infektion CPAF zu keiner Zeit nachweisbar ist. Ob CPAF generell im Persistenzstadium (z.B. auch induziert durch IFN- γ) nicht nachweisbar ist, bleibt zu überprüfen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass CPAF nur im Verlauf des replikativen Entwicklungszyklus gebildet wird. Die Untersuchung jeglicher Proteine in einer persistent infizierten Zelllinie ist einfacher, da mit einem proteolytischen Abbau durch CPAF während der Probenaufarbeitung nicht zu rechnen ist.

Weitere Untersuchungen von infizierten Monozyten zeigten, dass im ELISA eine deutliche Zunahme des Zytokins IL-8 im Überstand infizierter Monozyten im Vergleich zu nicht infizierten Zellen gemessen werden (Ergebnis nicht gezeigt). Es wäre möglich das AP-1 in diesem Infektionsmodell hauptsächlich eine immunregulatorische Funktion übernimmt. Da durch die Inkubation von Hitze inaktivierten Chlamydien ebenfalls die Menge an nachweisbaren AP-1 Proteinen zunimmt, ist eine LPS-abhängige Aktivierung von AP-1 möglich. Der Einfluss von Hitze inaktivierte *Cpn* auf die Hochregulation bei den Proteinen JunB, JunD, FosB und ATF-2 lässt zum Zeitpunkt 72 hpi nach, jedoch ist dies nicht der Fall, wenn mit lebenden Bakterien infiziert wurde. Im Zustand der Persistenz sind die Monozyten demnach durch die *Cpn*-Infektion ständig einem Signal ausgesetzt, dass zur AP-1 Stimulation führt. Um auch hier die funktionelle Relevanz näher zu charakterisieren, könnte man in einem weiterführenden Experiment ebenfalls den AP-1 Inhibitor Tanshinone IIA austesten, um dann z.B. mittels Real-time PCR die Expression AP-1 regulierte Gene zu unter-

suchen.

Da eine eindeutige AP-1 Regulation in beiden infizierten Zelllinien zu beobachten war, lässt sich zusammenfassend sagen, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 sowohl in der akuten als auch in der persistenten Infektion von *Cpn* eine wesentliche Rolle einnimmt. Die Bedeutung der AP-1 Regulation für *Cpn* könnte bei einer akuten Infektion in der Regulation der Glucoseaufnahme liegen, da der Glucosetransporter 1 durch AP-1 reguliert wird. Durch die Inhibition von AP-1 wird nachweislich Persistenz induziert, was ebenfalls die umfangreiche Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors für die Entwicklung von *Cpn* aufzeigt. Welche anderen Prozesse neben der Regulation des Energiehaushalts außerdem von AP-1 reguliert werden, muss noch untersucht werden. Da *Cpn* von funktionell aktiven AP-1 abhängig zu sein scheint, wäre dieses Protein möglicherweise ein geeigneter Angriffspunkt für Therapiemaßnahmen. Die Schwierigkeit dabei ist, dass AP-1 ein zelltypspezifischer Regulator ist. Eine Inhibition von AP-1 könnte in der einen Zelllinie das chlamydiale Wachstum eindämmen, in einer anderen Zelllinie aber möglicherweise den gegenteiligen Effekt bewirken.

Die in dieser Arbeit erbrachten Untersuchungen von Monozyten zeigen, dass AP-1 in diesem Zelltyp anders als in HEp-2 Zellen von *Cpn* reguliert wird, weshalb vermutlich andere zelluläre Prozesse beeinflusst werden. Auch hier stehen weitere Untersuchungen der funktionellen Bedeutung noch aus.

Literatur

- [1] <http://www.viomed.com/services/product/hep2.htm>.
- [2] ABDELRAHMAN, Y. M., BELLAND, R. J. The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol Rev* 29, 5 (2005), 949–959.
- [3] ADCOCK, I. M. Glucocorticoid-regulated transcription factors. *Pulm Pharmacol Ther* 14, 3 (2001), 211–219.
- [4] AGARWAL, R., WANG, Z. Y., BIK, D. P., MUKHTAR, H. Nordihydroguaiaretic acid, an inhibitor of lipoxygenase, also inhibits cytochrome P-450-mediated monooxygenase activity in rat epidermal and hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos* 19, 3 (1991), 620–624.
- [5] AIRENNE, S., SURCEL, H. M., ALAKÄRPPÄ, H., LAITINEN, K., PAAVONEN, J., SAIKKU, P., LAURILA, A. Chlamydia pneumoniae infection in human monocytes. *Infect Immun* 67, 3 (1999), 1445–1449.
- [6] ALMAWI, W. Y., MELEMEDJIAN, O. K. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol* 71, 1 (2002), 9–15.
- [7] AMANN, R., SPRINGER, N., SCHÖNHUBER, W., LUDWIG, W., SCHMID, E. N., MÜLLER, K. D., MICHEL, R. Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to Chlamydia spp. *Appl Environ Microbiol* 63, 1 (1997), 115–121.
- [8] AMEYAR, M., WISNIEWSKA, M., WEITZMAN, J. B. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* 85, 8 (2003), 747–752.
- [9] ANDRECHT, S., KOLBUS, A., HARTENSTEIN, B., ANGEL, P., SCHORPP-KISTNER, M. Cell cycle promoting activity of JunB through cyclin A activation. *J Biol Chem* 277, 39 (2002), 35961–35968.
- [10] ANDREUCCI, J. J., GRANT, D., COX, D. M., TOMC, L. K., PRYWES, R., GOLDHAMER, D. J., RODRIGUES, N., BÉDARD, P.-A., MCDERMOTT, J. C. Composition and function of AP-1 transcription complexes during muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 277, 19 (2002), 16426–16432.
- [11] ANGEL, P., HATTORI, K., SMEAL, T., KARIN, M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55, 5 (1988), 875–885.
- [12] ANGEL, P., IMAGAWA, M., CHIU, R., STEIN, B., IMBRA, R. J., RAHMSDORF, H. J., JONAT, C., HERRLICH, P., KARIN, M. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49, 6 (1987), 729–739.

- [13] ANGEL, P., KARIN, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072, 2-3 (1991), 129–157.
- [14] ANGEL, P., SMEAL, T., MEEK, J., KARIN, M. Jun and v-jun contain multiple regions that participate in transcriptional activation in an interdependent manner. *New Biol* 1, 1 (1989), 35–43.
- [15] AYROLDI, E., RICCARDI, C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J* 23, 11 (2009), 3649–3658.
- [16] BAKIRI, L., LALLEMAND, D., BOSSY-WETZEL, E., YANIV, M. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J* 19, 9 (2000), 2056–2068.
- [17] BALASUBRAMANIAN, S., ECKERT, R. L. Curcumin suppresses AP1 transcription factor-dependent differentiation and activates apoptosis in human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 282, 9 (2007), 6707–6715.
- [18] BALLATORI, N., WANG, W. Nordihydroguaiaretic acid depletes ATP and inhibits a swelling-activated, ATP-sensitive taurine channel. *Am J Physiol* 272, 5 Pt 1 (1997), C1429–C1436.
- [19] BEA, F., PUOLAKKAINEN, M. H., McMILLEN, T., HUDSON, F. N., MACKMAN, N., KUO, C. C., CAMPBELL, L. A., ROSENFELD, M. E. Chlamydia pneumoniae induces tissue factor expression in mouse macrophages via activation of Egr-1 and the MEK-ERK1/2 pathway. *Circ Res* 92, 4 (2003), 394–401.
- [20] BEATTY, W. L., BELANGER, T. A., DESAI, A. A., MORRISON, R. P., BYRNE, G. I. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun* 62, 9 (1994), 3705–3711.
- [21] BEDSON, S., BLAND, J. Morphological study of psittacosis virus with description of a developmental cycle. *Brit J Exp Path* 13 (1932), 461–466.
- [22] BEECKMAN, D. S. A., VANROMPAY, D. C. G. Zoonotic Chlamydophila psittaci infections from a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect* 15, 1 (2009), 11–17.
- [23] BEHRENS, A., SIBILIA, M., DAVID, J.-P., MÖHLE-STEINLEIN, U., TRONCHE, F., SCHÜTZ, G., WAGNER, E. F. Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J* 21, 7 (2002), 1782–1790.
- [24] BELLAND, R. J., OUELLETTE, S. P., GIEFFERS, J., BYRNE, G. I. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Cell Microbiol* 6, 2 (2004), 117–127.

- [25] BENGAL, E., RANSONE, L., SCHARFMANN, R., DWARKI, V. J., TAPSCOTT, S. J., WEINTRAUB, H., VERMA, I. M. Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell* 68, 3 (1992), 507–519.
- [26] BOHMANN, D., BOS, T. J., ADMON, A., NISHIMURA, T., VOGT, P. K., TJIAN, R. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* 238, 4832 (1987), 1386–1392.
- [27] BOSSY-WETZEL, E., BAKIRI, L., YANIV, M. Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *EMBO J* 16, 7 (1997), 1695–1709.
- [28] BRADE, L., SCHRAMEK, S., SCHADE, U., BRADE, H. Chemical, biological, and immunochemical properties of the Chlamydia psittaci lipopolysaccharide. *Infect Immun* 54, 2 (1986), 568–574.
- [29] BUJGER, Z., EKERT, M. [Trachoma—an endemic and post-endemic problem]. *Lijec Vjesn* 122, 7-8 (2000), 187–191.
- [30] BURTON, M. J., MABEY, D. C. W. The global burden of trachoma: a review. *PLoS Negl Trop Dis* 3, 10 (2009), e460.
- [31] BUSH, R. M., EVERETT, K. D. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, Pt 1 (2001), 203–220.
- [32] BYRNE, G. I., OJCIUS, D. M. Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2, 10 (2004), 802–808.
- [33] CALDWELL, H. D., KROMHOUT, J., SCHACHTER, J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. *Infect Immun* 31, 3 (1981), 1161–1176.
- [34] CAMPBELL, L. A., KUO, C.-C. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Semin Respir Infect* 18, 1 (2003), 48–54.
- [35] CAMPBELL, L. A., KUO, C.-C. Cultivation and laboratory maintenance of Chlamydia pneumoniae. *Curr Protoc Microbiol Chapter 11* (2009), Unit11B.1.
- [36] CARABEO, R. A., GRIESHABER, S. S., FISCHER, E., HACKSTADT, T. Chlamydia trachomatis induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells. *Infect Immun* 70, 7 (2002), 3793–3803.
- [37] CHOUBEY, D., GUTTERMAN, J. U. The interferon-inducible growth-inhibitory p202 protein: DNA binding properties and identification of a DNA binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* 221, 2 (1996), 396–401.
- [38] CLIFTON, D. R., FIELDS, K. A., GRIESHABER, S. S., DOOLEY, C. A., FISCHER, E. R., MEAD, D. J., CARABEO, R. A., HACKSTADT, T. A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 27 (2004), 10166–10171.

- [39] COHEN, D. R., CURRAN, T. Analysis of dimerization and DNA binding functions in Fos and Jun by domain-swapping: involvement of residues outside the leucine zipper/basic region. *Oncogene* 5, 6 (1990), 929–939.
- [40] COSENZA, S. C., YUMET, G., SOPRANO, D. R., SOPRANO, K. J. Induction of c-fos and c-jun mRNA at the M/G1 border is required for cell cycle progression. *J Cell Biochem* 55, 4 (1994), 503–512.
- [41] DENG, T., KARIN, M. JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev* 7, 3 (1993), 479–490.
- [42] DONG, F., SHARMA, J., XIAO, Y., ZHONG, Y., ZHONG, G. Intramolecular dimerization is required for the chlamydia-secreted protease CPAF to degrade host transcriptional factors. *Infect Immun* 72, 7 (2004), 3869–3875.
- [43] DONG, F., SU, H., HUANG, Y., ZHONG, Y., ZHONG, G. Cleavage of host keratin 8 by a Chlamydia-secreted protease. *Infect Immun* 72, 7 (2004), 3863–3868.
- [44] DONG, F., ZHONG, Y., ARULANANDAM, B., ZHONG, G. Production of a proteolytically active protein, chlamydial protease/proteasome-like activity factor, by five different Chlamydia species. *Infect Immun* 73, 3 (2005), 1868–1872.
- [45] DRESES-WERRINGLOER, U., PADUBRIN, I., JÜRGENS-SAATHOFF, B., HUDSON, A. P., ZEIDLER, H., KÖHLER, L. Persistence of Chlamydia trachomatis is induced by ciprofloxacin and ofloxacin in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 12 (2000), 3288–3297.
- [46] EFERL, R., RICCI, R., KENNER, L., ZENZ, R., DAVID, J.-P., RATH, M., WAGNER, E. F. Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* 112, 2 (2003), 181–192.
- [47] EFERL, R., WAGNER, E. F. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3, 11 (2003), 859–868.
- [48] EVERETT, K. D., BUSH, R. M., ANDERSEN, A. A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 2 (1999), 415–440.
- [49] EVERETT, K. D., HATCH, T. P. Architecture of the cell envelope of Chlamydia psittaci 6BC. *J Bacteriol* 177, 4 (1995), 877–882.
- [50] FADEL, S., ELEY, A. Chlamydia trachomatis OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin. *J Med Microbiol* 56, Pt 1 (2007), 15–22.

- [51] FAN, P., DONG, F., HUANG, Y., ZHONG, G. Chlamydia pneumoniae secretion of a protease-like activity factor for degrading host cell transcription factors required for [correction of factors is required for] major histocompatibility complex antigen expression. *Infect Immun* 70, 1 (2002), 345–349.
- [52] FAN, T., LU, H., HU, H., SHI, L., MCCLARTY, G. A., NANCE, D. M., GREENBERG, A. H., ZHONG, G. Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med* 187, 4 (1998), 487–496.
- [53] FARO, S. Chlamydia trachomatis infection in women. *J Reprod Med* 30, 3 Suppl (1985), 273–278.
- [54] FENTEANY, G., STANDAERT, R. F., LANE, W. S., CHOI, S., COREY, E. J., SCHREIBER, S. L. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268, 5211 (1995), 726–731.
- [55] FISCHER, S. F., SCHWARZ, C., VIER, J., HÄCKER, G. Characterization of antiapoptotic activities of Chlamydia pneumoniae in human cells. *Infect Immun* 69, 11 (2001), 7121–7129.
- [56] FISCHER, S. F., VIER, J., KIRSCHNEK, S., KLOS, A., HESS, S., YING, S., HÄCKER, G. Chlamydia inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3-only proteins. *J Exp Med* 200, 7 (2004), 905–916.
- [57] FOLETTA, V. C., SEGAL, D. H., COHEN, D. R. Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol* 63, 2 (1998), 139–152.
- [58] FORYST-LUDWIG, A., NEUMANN, M., SCHNEIDER-BRACHERT, W., NAUMANN, M. Curcumin blocks NF-kappaB and the motogenic response in Helicobacter pylori-infected epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 4 (2004), 1065–1072.
- [59] FRITSCH, T. R., HORN, M., WAGNER, M., HERWIG, R. P., SCHLEIFER, K. H., GAUTOM, R. K. Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of Acanthamoeba spp. *Appl Environ Microbiol* 66, 6 (2000), 2613–2619.
- [60] FUCHS, S. Y., TAPPIN, I., RONAI, Z. Stability of the ATF2 transcription factor is regulated by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 275, 17 (2000), 12560–12564.
- [61] GAMBHIR, M., BASÁÑEZ, M.-G., TURNER, F., KUMARESAN, J., GRASSLY, N. C. Trachoma: transmission, infection, and control. *Lancet Infect Dis* 7, 6 (2007), 420–427.
- [62] GHUYSEN, J. M., GOFFIN, C. Lack of cell wall peptidoglycan versus penicillin sensitivity: new insights into the chlamydial anomaly. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 10 (1999), 2339–2344.

- [63] GIBELLINI, D., PANAYA, R., RUMPIANESI, F. Induction of apoptosis by *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* infection in tissue culture cells. *Zentralbl Bakteriol* 288, 1 (1998), 35–43.
- [64] GIEFFERS, J., RUPP, J., GEBERT, A., SOLBACH, W., KLINGER, M. First-choice antibiotics at subinhibitory concentrations induce persistence of *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 4 (2004), 1402–1405.
- [65] GIEFFERS, J., VAN ZANDBERGEN, G., RUPP, J., SAYK, F., KRÜGER, S., EHLERS, S., SOLBACH, W., MAASS, M. Phagocytes transmit *Chlamydia pneumoniae* from the lungs to the vasculature. *Eur Respir J* 23, 4 (2004), 506–510.
- [66] GRAYSTON, J. T., ALDOUS, M. B., EASTON, A., WANG, S. P., KUO, C. C., CAMPBELL, L. A., ALTMAN, J. Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. *J Infect Dis* 168, 5 (1993), 1231–1235.
- [67] GRAYSTONE, J. T., KUO, C.-C., CAMPBELL, L. A., WANG, S.-P. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. Strain TWAR. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39 (1989), 88–90.
- [68] GREENE, W., XIAO, Y., HUANG, Y., MCCLARTY, G., ZHONG, G. *Chlamydia*-infected cells continue to undergo mitosis and resist induction of apoptosis. *Infect Immun* 72, 1 (2004), 451–460.
- [69] HACKSTADT, T., FISCHER, E. R., SCIDMORE, M. A., ROCKEY, D. D., HEINZEN, R. A. Origins and functions of the chlamydial inclusion. *Trends Microbiol* 5, 7 (1997), 288–293.
- [70] HACKSTADT, T., SCIDMORE, M. A., ROCKEY, D. D. Lipid metabolism in *Chlamydia trachomatis*-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11 (1995), 4877–4881.
- [71] HEINE, H., MÜLLER-LOENNIES, S., BRADE, L., LINDNER, B., BRADE, H. Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from *Chlamydia trachomatis* serotypes E and L2 and *Chlamydia psittaci* 6BC. *Eur J Biochem* 270, 3 (2003), 440–450.
- [72] HESS, J., ANGEL, P., SCHORPP-KISTNER, M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117, Pt 25 (2004), 5965–5973.
- [73] HESSE, L., BOSTOCK, J., DEMENTIN, S., BLANOT, D., MENGIN-LECREULX, D., CHOPRA, I. Functional and biochemical analysis of *Chlamydia trachomatis* MurC, an enzyme displaying UDP-N-acetylmuramate:amino acid ligase activity. *J Bacteriol* 185, 22 (2003), 6507–6512.
- [74] HEUER, D., BRINKMANN, V., MEYER, T. F., SZCZEPEK, A. J. Expression and translocation of chlamydial protease during acute and persistent infection

- of the epithelial HEp-2 cells with *Chlamydia pneumoniae*. *Cell Microbiol* 5, 5 (2003), 315–322.
- [75] HEUER, D., LIPINSKI, A. R., MACHUY, N., KARLAS, A., WEHRENS, A., SIEDLER, F., BRINKMANN, V., MEYER, T. F. Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction. *Nature* 457, 7230 (2009), 731–735.
- [76] HILBERG, F., AGUZZI, A., HOWELLS, N., WAGNER, E. F. c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* 365, 6442 (1993), 179–181.
- [77] HOGAN, R. J., MATHEWS, S. A., MUKHOPADHYAY, S., SUMMERSGILL, J. T., TIMMS, P. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun* 72, 4 (2004), 1843–1855.
- [78] HORN, M., WAGNER, M., MÜLLER, K. D., SCHMID, E. N., FRITSCH, T. R., SCHLEIFER, K. H., MICHEL, R. *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology* 146 (Pt 5) (2000), 1231–1239.
- [79] HUANG, Z., FENG, Y., CHEN, D., WU, X., HUANG, S., WANG, X., XIAO, X., LI, W., HUANG, N., GU, L., ZHONG, G., CHAI, J. Structural basis for activation and inhibition of the secreted chlamydia protease CPAF. *Cell Host Microbe* 4, 6 (2008), 529–542.
- [80] HUSSAIN, A. R., AHMED, M., AL-JOMAH, N. A., KHAN, A. S., MANOGARAN, P., SULTANA, M., ABUBAKER, J., PLATANIAS, L. C., AL-KURAYA, K. S., UDDIN, S. Curcumin suppresses constitutive activation of nuclear factor-kappa B and requires functional Bax to induce apoptosis in Burkitt's lymphoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 7, 10 (2008), 3318–3329.
- [81] HYBISKE, K., STEPHENS, R. S. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 27 (2007), 11430–11435.
- [82] ILIFFE-LEE, E. R., MCCLARTY, G. Glucose metabolism in *Chlamydia trachomatis*: the 'energy parasite' hypothesis revisited. *Mol Microbiol* 33, 1 (1999), 177–187.
- [83] JAHN, H. U., KRÜLL, M., WUPPERMANN, F. N., KLUCKEN, A. C., ROSSEAU, S., SEYBOLD, J., HEGEMANN, J. H., JANTOS, C. A., SUTTORP, N. Infection and activation of airway epithelial cells by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 182, 6 (2000), 1678–1687.
- [84] JEWETT, T. J., FISCHER, E. R., MEAD, D. J., HACKSTADT, T. Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 42 (2006), 15599–15604.

- [85] JIN, U.-H., SUH, S.-J., CHANG, H. W., SON, J.-K., LEE, S. H., SON, K.-H., CHANG, Y.-C., KIM, C.-H. Tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* BUNGE inhibits human aortic smooth muscle cell migration and MMP-9 activity through AKT signaling pathway. *J Cell Biochem* 104, 1 (2008), 15–26.
- [86] KARIN, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351, 1336 (1996), 127–134.
- [87] KARIN, M., LIU, Z., ZANDI, E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 2 (1997), 240–246.
- [88] KAWANA, K., QUAYLE, A. J., FICARRA, M., IBANA, J. A., SHEN, L., KAWANA, Y., YANG, H., MARRERO, L., YAVAGAL, S., GREENE, S. J., ZHANG, Y.-X., PYLES, R. B., BLUMBERG, R. S., SCHUST, D. J. CD1d degradation in *Chlamydia trachomatis*-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity. *J Biol Chem* 282, 10 (2007), 7368–7375.
- [89] KERR, K., ENTRICAN, G., MCKEEVER, D., LONGBOTTOM, D. Immunopathology of *Chlamydia abortus* infection in sheep and mice. *Res Vet Sci* 78, 1 (2005), 1–7.
- [90] KITABAYASHI, I., KAWAKAMI, Z., CHIU, R., OZAWA, K., MATSUOKA, T., TOYOSHIMA, S., UMESONO, K., EVANS, R. M., GACHELIN, G., YOKOYAMA, K. Transcriptional regulation of the c-jun gene by retinoic acid and E1A during differentiation of F9 cells. *EMBO J* 11, 1 (1992), 167–175.
- [91] KOGUT, M. H., GENOVESE, K. J., HE, H., KAISER, P. Flagellin and lipopolysaccharide up-regulation of IL-6 and CXCL12 gene expression in chicken heterophils is mediated by ERK1/2-dependent activation of AP-1 and NF-kappaB signaling pathways. *Innate Immun* 14, 4 (2008), 213–222.
- [92] KOUZARIDES, T., ZIFF, E. The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 336, 6200 (1988), 646–651.
- [93] KOZLOVSKY, N., RUDICH, A., POTASHNIK, R., EBINA, Y., MURAKAMI, T., BASHAN, N. Transcriptional activation of the Glut1 gene in response to oxidative stress in L6 myotubes. *J Biol Chem* 272, 52 (1997), 33367–33372.
- [94] KRANE, S. M. Some molecular mechanisms of glucocorticoid action. *Br J Rheumatol* 32 Suppl 2 (1993), 3–5.
- [95] KRÜLL, M., KLUCKEN, A. C., WUPPERMANN, F. N., FUHRMANN, O., MAGERL, C., SEYBOLD, J., HIPPENSTIEL, S., HEGEMANN, J. H., JANTOS, C. A., SUTTORP, N. Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol* 162, 8 (1999), 4834–4841.
- [96] KRÜLL, M., KRAMP, J., PETROV, T., KLUCKEN, A. C., HOCKE, A. C., WALTER, C., SCHMECK, B., SEYBOLD, J., MAASS, M., LUDWIG, S., KUIPERS, J. G., SUTTORP, N., HIPPENSTIEL, S. Differences in cell activation

- by *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* infection in human endothelial cells. *Infect Immun* 72, 11 (2004), 6615–6621.
- [97] KRÜLL, M., MAASS, M., SUTTORP, N., RUPP, J. *Chlamydia pneumoniae*. Mechanisms of target cell infection and activation. *Thromb Haemost* 94, 2 (2005), 319–326.
- [98] KUO, C., CAMPBELL, L. A. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in arterial tissues. *J Infect Dis* 181 Suppl 3 (2000), S432–S436.
- [99] KUO, C. C., JACKSON, L. A., CAMPBELL, L. A., GRAYSTON, J. T. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 8, 4 (1995), 451–461.
- [100] KUO, C. C., SHOR, A., CAMPBELL, L. A., FUKUSHI, H., PATTON, D. L., GRAYSTON, J. T. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis* 167, 4 (1993), 841–849.
- [101] KWON, H., PARK, S., LEE, S., LEE, D. K., YANG, C. H. Determination of binding constant of transcription factor AP-1 and DNA. Application of inhibitors. *Eur J Biochem* 268, 3 (2001), 565–572.
- [102] LEE, W., HASLINGER, A., KARIN, M., TJIAN, R. Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 325, 6102 (1987), 368–372.
- [103] LIN, W.-N., LUO, S.-F., LIN, C.-C., HSIAO, L.-D., YANG, C.-M. Differential involvement of PKC-dependent MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced AP-1 expression in human tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal* 21, 9 (2009), 1385–1395.
- [104] MAASS, M., BARTELS, C., KRÜGER, S., KRAUSE, E., ENGEL, P. M., DALHOFF, K. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis* 140 Suppl 1 (1998), S25–S30.
- [105] MACIÁN, F., LÓPEZ-RODRÍGUEZ, C., RAO, A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20, 19 (2001), 2476–2489.
- [106] MAGGIRWAR, S. B., RAMIREZ, S., TONG, N., GELBARD, H. A., DEWHURST, S. Functional interplay between nuclear factor-kappaB and c-Jun integrated by coactivator p300 determines the survival of nerve growth factor-dependent PC12 cells. *J Neurochem* 74, 2 (2000), 527–539.
- [107] MATHUPALA, S. P., REMPEL, A., PEDERSEN, P. L. Glucose catabolism in cancer cells. Isolation, sequence, and activity of the promoter for type II hexokinase. *J Biol Chem* 270, 28 (1995), 16918–16925.
- [108] MEHTA, S. J., MILLER, R. D., RAMIREZ, J. A., SUMMERSGILL, J. T. Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* replication in HEp-2 cells by interferon-gamma: role of tryptophan catabolism. *J Infect Dis* 177, 5 (1998), 1326–1331.

- [109] MILLER, S. A., SELZMAN, C. H., SHAMES, B. D., BARTON, H. A., JOHNSON, S. M., HARKEN, A. H. Chlamydia pneumoniae activates nuclear factor kappaB and activator protein 1 in human vascular smooth muscle and induces cellular proliferation. *J Surg Res* 90, 1 (2000), 76–81.
- [110] MIN, W., GHOSH, S., LENGYEL, P. The interferon-inducible p202 protein as a modulator of transcription: inhibition of NF-kappa B, c-Fos, and c-Jun activities. *Mol Cell Biol* 16, 1 (1996), 359–368.
- [111] MIYAIRI, I., BYRNE, G. I. Chlamydia and programmed cell death. *Curr Opin Microbiol* 9, 1 (2006), 102–108.
- [112] MOLESTINA, R. E., MILLER, R. D., RAMIREZ, J. A., SUMMERSGILL, J. T. Infection of human endothelial cells with Chlamydia pneumoniae stimulates transendothelial migration of neutrophils and monocytes. *Infect Immun* 67, 3 (1999), 1323–1330.
- [113] MORGAN, I. M., RANSONE, L. J., BOS, T. J., VERMA, I. M., VOGT, P. K. Transformation by Jun: requirement for leucine zipper, basic region and transactivation domain and enhancement by Fos. *Oncogene* 7, 6 (1992), 1119–1125.
- [114] MOULDER, J. W. The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses. *Annu Rev Microbiol* 20 (1966), 107–130.
- [115] MOULDER, J. W. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev* 55, 1 (1991), 143–190.
- [116] MUSTI, A. M., TREIER, M., BOHMANN, D. Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* 275, 5298 (1997), 400–402.
- [117] OJCIUS, D. M., DEGANI, H., MISPELTER, J., DAUTRY-VARSAT, A. Enhancement of ATP levels and glucose metabolism during an infection by Chlamydia. NMR studies of living cells. *J Biol Chem* 273, 12 (1998), 7052–7058.
- [118] OJCIUS, D. M., SOUQUE, P., PERFETTINI, J. L., DAUTRY-VARSAT, A. Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen Chlamydia psittaci. *J Immunol* 161, 8 (1998), 4220–4226.
- [119] OSHIMA, R. G., ABRAMS, L., KULESH, D. Activation of an intron enhancer within the keratin 18 gene by expression of c-fos and c-jun in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells. *Genes Dev* 4, 5 (1990), 835–848.
- [120] PANTOJA, L. G., MILLER, R. D., RAMIREZ, J. A., MOLESTINA, R. E., SUMMERSGILL, J. T. Characterization of Chlamydia pneumoniae persistence in HEp-2 cells treated with gamma interferon. *Infect Immun* 69, 12 (2001), 7927–7932.

- [121] PARK, S., HAHM, E.-R., LEE, D.-K., YANG, C.-H. Inhibition of AP-1 transcription activator induces myc-dependent apoptosis in HL60 cells. *J Cell Biochem* 91, 5 (2004), 973–986.
- [122] PARK, S., SONG, J.-S., LEE, D.-K., YANG, C.-H. Suppression of AP-1 Activity by Tanshinone and Cancer Cell Growth Inhibition. *Bull. Korean Chem. Soc.* 20, 8 (1999), 925–928.
- [123] PASCHEN, S. A., CHRISTIAN, J. G., VIER, J., SCHMIDT, F., WALCH, A., OJCIUS, D. M., HÄCKER, G. Cytotoxicity of Chlamydia is largely reproduced by expression of a single chlamydial protease. *J Cell Biol* 182, 1 (2008), 117–127.
- [124] PASSEGUÉ, E., WAGNER, E. F. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J* 19, 12 (2000), 2969–2979.
- [125] PATEL, D. N., BAILEY, S. R., GRESHAM, J. K., SCHUCHMAN, D. B., SHELLHAMER, J. H., GOLDSTEIN, B. J., FOXWELL, B. M., STEMERMAN, M. B., MARANCHIE, J. K., VALENTE, A. J., MUMMIDI, S., CHANDRASEKAR, B. TLR4-NOX4-AP-1 signaling mediates lipopolysaccharide-induced CXCR6 expression in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 4 (2006), 1113–1120.
- [126] PETERS, J., HESS, S., ENDLICH, K., THALMANN, J., HOLZBERG, D., KRACHT, M., SCHAEFER, M., BARTLING, G., KLOS, A. Silencing or permanent activation: host-cell responses in models of persistent Chlamydia pneumoniae infection. *Cell Microbiol* 7, 8 (2005), 1099–1108.
- [127] PETERSON, E. M., DE LA MAZA, L. M., BRADE, L., BRADE, H. Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of Chlamydia pneumoniae. *Infect Immun* 66, 8 (1998), 3848–3855.
- [128] PIRBHAI, M., DONG, F., ZHONG, Y., PAN, K. Z., ZHONG, G. The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in Chlamydia trachomatis-infected cells. *J Biol Chem* 281, 42 (2006), 31495–31501.
- [129] PULVERER, B. J., KYRIAKIS, J. M., AVRUCH, J., NIKOLAKAKI, E., WOODGETT, J. R. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 6345 (1991), 670–674.
- [130] RAJALINGAM, K., AL-YOUNES, H., MÜLLER, A., MEYER, T. F., SZCZEPEK, A. J., RUDEL, T. Epithelial cells infected with Chlamydia pneumoniae (Chlamydia pneumoniae) are resistant to apoptosis. *Infect Immun* 69, 12 (2001), 7880–7888.
- [131] RAO, A., LUO, C., HOGAN, P. G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15 (1997), 707–747.

- [132] RAULSTON, J. E. Response of *Chlamydia trachomatis* serovar E to iron restriction in vitro and evidence for iron-regulated chlamydial proteins. *Infect Immun* 65, 11 (1997), 4539–4547.
- [133] READ, T. D., BRUNHAM, R. C., SHEN, C., GILL, S. R., HEIDELBERG, J. F., WHITE, O., HICKEY, E. K., PETERSON, J., UTTERBACK, T., BERRY, K., BASS, S., LINHER, K., WEIDMAN, J., KHOURI, H., CRAVEN, B., BOWMAN, C., DODSON, R., GWINN, M., NELSON, W., DEBOY, R., KOLONAY, J., MCCCLARTY, G., SALZBERG, S. L., EISEN, J., FRASER, C. M. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res* 28, 6 (2000), 1397–1406.
- [134] REINHOLD, P., JAEGER, J., LIEBLER-TENORIO, E., BERNDT, A., BACHMANN, R., SCHUBERT, E., MELZER, F., ELSCHNER, M., SACHSE, K. Impact of latent infections with *Chlamydia* species in young cattle. *Vet J* 175, 2 (2008), 202–211.
- [135] ROBINSON-BENION, C., KAMATA, N., HOLT, J. T. Antisense mapping of the c-fos promoter: role of the serum response element. *Antisense Res Dev* 1, 1 (1991), 21–33.
- [136] RUPP, J., BERGER, M., REILING, N., GIEFFERS, J., LINDSCHAU, C., HALLER, H., DALHOFF, K., MAASS, M. Cox-2 inhibition abrogates *Chlamydia pneumoniae*-induced PGE2 and MMP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 3 (2004), 738–744.
- [137] RUPP, J., HELLWIG-BURGEL, T., WOBBE, V., SEITZER, U., BRANDT, E., MAASS, M. *Chlamydia pneumoniae* infection promotes a proliferative phenotype in the vasculature through Egr-1 activation in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9 (2005), 3447–3452.
- [138] RUPP, J., KOCH, M., VAN ZANDBERGEN, G., SOLBACH, W., BRANDT, E., MAASS, M. Transmission of *Chlamydia pneumoniae* infection from blood monocytes to vascular cells in a novel transendothelial migration model. *FEMS Microbiol Lett* 242, 2 (2005), 203–208.
- [139] RYSECK, R. P., BRAVO, R. c-Jun, JunB, and JunD differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of Fos proteins. *Oncogene* 6, 4 (1991), 533–542.
- [140] SAIKKU, P. *Chlamydia pneumoniae* and cardiovascular diseases. *Clin Microbiol Infect* 1 Suppl 1 (1996), S19–S22.
- [141] SANTALUCÍA, T., CHRISTMANN, M., YACCOUB, M. H., BRAND, N. J. Hypertrophic agonists induce the binding of c-Fos to an AP-1 site in cardiac myocytes: implications for the expression of GLUT1. *Cardiovasc Res* 59, 3 (2003), 639–648.

- [142] SASU, S., LAVERDA, D., QURESHI, N., GOLENBOCK, D. T., BEASLEY, D. Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circ Res* 89, 3 (2001), 244–250.
- [143] SCHMECK, B., MOOG, K., ZAHLTEN, J., VAN LAAK, V., N'GUESSAN, P. D., OPITZ, B., ROSSEAU, S., SUTTORP, N., HIPPENSTIEL, S. Streptococcus pneumoniae induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1 -dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. *Respir Res* 7 (2006), 98.
- [144] SCIDMORE, M. A., FISCHER, E. R., HACKSTADT, T. Restricted fusion of Chlamydia trachomatis vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. *Infect Immun* 71, 2 (2003), 973–984.
- [145] SHAULIAN, E., KARIN, M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20, 19 (2001), 2390–2400.
- [146] SHAULIAN, E., KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4, 5 (2002), E131–E136.
- [147] SHEN, F., FAN, X., LIU, B., JIA, X., DU, H., YOU, B., YE, M., HUANG, C., SHI, X. Overexpression of cyclin D1-CDK4 in silica-induced transformed cells is due to activation of ERKs, JNKs/AP-1 pathway. *Toxicol Lett* 160, 3 (2006), 185–195.
- [148] SHEN, Q., URAY, I. P., LI, Y., KRISKO, T. I., STRECKER, T. E., KIM, H.-T., BROWN, P. H. The AP-1 transcription factor regulates breast cancer cell growth via cyclins and E2F factors. *Oncogene* 27, 3 (2008), 366–377.
- [149] SHYU, Y. J., SUAREZ, C. D., HU, C.-D. Visualization of AP-1 NF-kappaB ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1 (2008), 151–156.
- [150] SMEAL, T., ANGEL, P., MEEK, J., KARIN, M. Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes. *Genes Dev* 3, 12B (1989), 2091–2100.
- [151] SMEAL, T., HIBI, M., KARIN, M. Altering the specificity of signal transduction cascades: positive regulation of c-Jun transcriptional activity by protein kinase A. *EMBO J* 13, 24 (1994), 6006–6010.
- [152] SMOAK, K. A., CIDLOWSKI, J. A. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev* 125, 10-11 (2004), 697–706.
- [153] SNG, J. C. G., TANIURA, H., YONEDA, Y. A tale of early response genes. *Biol Pharm Bull* 27, 5 (2004), 606–612.

- [154] STORZ J., P. L. A. Taxonomy of the Chlamydiae: Reasons for Classifying Organisms of the Genus Chlamydia, Family Chlamydiaceae, in a separate order, Chlamydiales ord. nov. *Int J Syst Bacteriology* 21 (1971), 332–334.
- [155] STUART, E. S., WEBLEY, W. C., NORKIN, L. C. Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by Chlamydiae into host cells. *Exp Cell Res* 287, 1 (2003), 67–78.
- [156] SUKHATME, V. P., CAO, X. M., CHANG, L. C., TSAI-MORRIS, C. H., STAMENKOVICH, D., FERREIRA, P. C., COHEN, D. R., EDWARDS, S. A., SHOWS, T. B., CURRAN, T. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 53, 1 (1988), 37–43.
- [157] SUN, J., SCHOBORG, R. V. The host adherens junction molecule nectin-1 is degraded by chlamydial protease-like activity factor (CPAF) in Chlamydia trachomatis-infected genital epithelial cells. *Microbes Infect* 11, 1 (2009), 12–19.
- [158] SWASDIO, K., RUGPAO, S., TANSATHIT, T., UTTAVICHAI, C., JONGUSUK, P., VUTAYAVANICH, T., ORANRATANACHAI, A., PRUTHITADA, N., PEERAKOM, S., ITTIPUNKUL, W., ROWE, P. J., WARD, M. E. The association of Chlamydia trachomatis/gonococcal infection and tubal factor infertility. *J Obstet Gynaecol Res* 22, 4 (1996), 331–340.
- [159] SZABOWSKI, A., MAAS-SZABOWSKI, N., ANDRECHT, S., KOLBUS, A., SCHORPP-KISTNER, M., FUSENIG, N. E., ANGEL, P. c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell* 103, 5 (2000), 745–755.
- [160] SZREMSKA, A. P., KENNER, L., WEISZ, E., OTT, R. G., PASSEGUÉ, E., ARTWOHL, M., FREISSMUTH, M., STOXREITER, R., THEUSSL, H.-C., PARZER, S. B., MORIGGL, R., WAGNER, E. F., SEXL, V. JunB inhibits proliferation and transformation in B-lymphoid cells. *Blood* 102, 12 (2003), 4159–4165.
- [161] TAMURA, A., MATSUMOTO, A., MANIRE, G. P., HIGASHI, N. Electron microscopic observations on the structure of the envelopes of mature elementary bodies and developmental reticulate forms of Chlamydia psittaci. *J Bacteriol* 105, 1 (1971), 355–360.
- [162] TARASKA, T., WARD, D. M., AJIOKA, R. S., WYRICK, P. B., DAVIS-KAPLAN, S. R., DAVIS, C. H., KAPLAN, J. The late chlamydial inclusion membrane is not derived from the endocytic pathway and is relatively deficient in host proteins. *Infect Immun* 64, 9 (1996), 3713–3727.
- [163] THOMAS, N. S., LUSHER, M., STOREY, C. C., CLARKE, I. N. Plasmid diversity in Chlamydia. *Microbiology* 143 (Pt 6) (1997), 1847–1854.

- [164] THOMSON, N. R., HOLDEN, M. T. G., CARDER, C., LENNARD, N., LOCKEY, S. J., MARSH, P., SKIPP, P., O'CONNOR, C. D., GOODHEAD, I., NORBERTZ-CAK, H., HARRIS, B., ORMOND, D., RANCE, R., QUAIL, M. A., PARKHILL, J., STEPHENS, R. S., CLARKE, I. N. Chlamydia trachomatis: genome sequence analysis of lymphogranuloma venereum isolates. *Genome Res* 18, 1 (2008), 161–171.
- [165] TREISMAN, R. Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *EMBO J* 14, 20 (1995), 4905–4913.
- [166] TUFFREY, M., FALDER, P., GALE, J., QUINN, R., TAYLOR-ROBINSON, D. Infertility in mice infected genitally with a human strain of Chlamydia trachomatis. *J Reprod Fertil* 78, 1 (1986), 251–260.
- [167] TULCHINSKY, E. Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histol Histopathol* 15, 3 (2000), 921–928.
- [168] VAN HAL, S. J., HILLMAN, R., STARK, D. J., HARKNESS, J. L., MARRIOTT, D. Lymphogranuloma venereum: an emerging anorectal disease in Australia. *Med J Aust* 187, 5 (2007), 309–310.
- [169] VAN ZANDBERGEN, G., GIEFFERS, J., KOTHE, H., RUPP, J., BOLLINGER, A., AGA, E., KLINGER, M., BRADE, H., DALHOFF, K., MAASS, M., SOLBACH, W., LASKAY, T. Chlamydia pneumoniae multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *J Immunol* 172, 3 (2004), 1768–1776.
- [170] VAN ZANDBERGEN, G., KLINGER, M., MUELLER, A., DANNENBERG, S., GEBERT, A., SOLBACH, W., LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. *J Immunol* 173, 11 (2004), 6521–6525.
- [171] VERHAGEN, A. M., PAKUSCH, M., SILKE, J., VAUX, D. L. TNF and CD95 promote IL-8 gene transactivation via independent elements in colon carcinoma cells. *Cytokine* 15, 2 (2001), 108–112.
- [172] VESELY, P. W., STABER, P. B., HOEFLER, G., KENNER, L. Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutat Res* 682, 1 (2009), 7–12.
- [173] WAGNER, E. F. AP-1—Introductory remarks. *Oncogene* 20, 19 (2001), 2334–2335.
- [174] WEBLEY, W. C., NORKIN, L. C., STUART, E. S. Caveolin-2 associates with intracellular chlamydial inclusions independently of caveolin-1. *BMC Infect Dis* 4 (2004), 23.
- [175] WOLF, K., FISCHER, E., HACKSTADT, T. Ultrastructural analysis of developmental events in Chlamydia pneumoniae-infected cells. *Infect Immun* 68, 4 (2000), 2379–2385.

- [176] WYLIE, J. L., BERRY, J. D., MCCLARTY, G. Chlamydia trachomatis CTP synthetase: molecular characterization and developmental regulation of expression. *Mol Microbiol* 22, 4 (1996), 631–642.
- [177] XIA, Z., DICKENS, M., RAINGEAUD, J., DAVIS, R. J., GREENBERG, M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 5240 (1995), 1326–1331.
- [178] XU, W., COMHAIR, S. A. A., ZHENG, S., CHU, S. C., MARKS-KONCZALIK, J., MOSS, J., HAQUE, S. J., ERZURUM, S. C. STAT-1 and c-Fos interaction in nitric oxide synthase-2 gene activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, 1 (2003), L137–L148.
- [179] YAMAJI, R., FUJITA, K., TAKAHASHI, S., YONEDA, H., NAGAO, K., MASUDA, W., NAITO, M., TSURUO, T., MIYATAKE, K., INUI, H., NAKANO, Y. Hypoxia up-regulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in mouse brain capillary endothelial cells: involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Biochim Biophys Acta* 1593, 2-3 (2003), 269–276.
- [180] YANG, J., HOOPER, W. C., PHILLIPS, D. J., TONDELLA, M. L., TALKINGTON, D. F. Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during Chlamydia pneumoniae infection. *Infect Immun* 71, 2 (2003), 614–620.
- [181] YARAEI, K., CAMPBELL, L. A., ZHU, X., LILES, W. C., KUO, C.-C., ROSENFELD, M. E. Effect of Chlamydia pneumoniae on cellular ATP content in mouse macrophages: role of Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 73, 7 (2005), 4323–4326.
- [182] ZHONG, G., FAN, P., JI, H., DONG, F., HUANG, Y. Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J Exp Med* 193, 8 (2001), 935–942.
- [183] ZHONG, G., FAN, T., LIU, L. Chlamydia inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *J Exp Med* 189, 12 (1999), 1931–1938.
- [184] ZHONG, G., LIU, L., FAN, T., FAN, P., JI, H. Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I expression in chlamydia-infected cells. *J Exp Med* 191, 9 (2000), 1525–1534.

Abbildungsverzeichnis

1	Taxonomie der Chlamydiales	5
2	Entwicklungszyklus von Chlamydien	7
3	Heterodimeres AP-1 Protein	15
4	Schematischer Aufbau von AP-1 Proteinen	16
5	MAP-Kinase Kaskaden führen zur Aktivierung von AP-1 Proteinen	18
6	Protein-Protein Interaktionen zwischen AP-1 und anderen Transkriptionsfaktoren	19
7	Biologische Wirkungsweisen von AP-1	20
8	Erhöhte Expression von AP-1 Proteinen in der frühen Phase einer <i>Cpn</i> -Infektion	59
9	Aktivierung von AP-1 Proteinen in der frühen Phase einer <i>Cpn</i> -Infektion (4 hpi)	60
10	Erhöhte AP-1 Bindungsaktivität durch <i>Cpn</i> -Infektion 4 hpi	61
11	Nachweis der Expression von AP-1 Proteinen zeigt in der mittleren Phase der Infektion (24 hpi) keine Änderung durch die <i>Cpn</i> -Infektion	62
12	Die AP-1 Bindungsaktivität ist 24 hpi unverändert	63
13	Verminderte Expression einiger AP-1 Proteine in der späten Phase der Infektion (48 und 72 hpi)	64
14	Verstärkte Expression einiger AP-1 Proteine in der späten Phase der Infektion (48 und 72 hpi)	65
15	Live-Dead-Färbung von Tanshinone IIA behandelten Zellen	67
16	Laut MTT-Assay ist die verwendete Tanshinone IIA Konzentration von 25 μ M nicht toxisch	68
17	Tanshinone IIA inhibiert die AP-1 Bindungsaktivität	69
18	Auswirkungen von Tanshinone IIA auf die Expression von AP-1 Proteinen	70
19	<i>Cpn</i> Einschlüsse in HEp-2 Zellen 48 hpi	71
20	Zugabe von Tanshinone IIA zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion mit <i>C. pneumoniae</i> führt immer zur Ausbildung sehr kleiner Einschlusskörperchen	72
21	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Cpn</i> infizierten HEp-2 Zellen	73
22	<i>Cpn</i> Einschlüsse in HEp-2 Zellen 48 hpi ohne und mit Inkubation von NDGA	74

23	Versuch der Wiederanzucht von <i>Cpn</i> aus Tanshinone IIA behandelten Zellen	75
24	Aufhebung der Tanshinone IIA induzierten Persistenz	76
25	Wiederanzucht von <i>Cpn</i> nach Entfernen des AP-1 Inhibitors durch Mediumwechsel wieder möglich	77
26	ATP-Gehalt von Tanshinone IIA behandelten Zellen ist im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich geringer	79
27	Einfluss von Tanshinone IIA auf die Glut1 mRNA-Expression in <i>Cpn</i> infizierten Zellen	80
28	AP-1 Proteine in Zytoplasma- und Kernextrakten in der späten Phase der Infektion (48 und 72 hpi)	81
29	Verminderte AP-1 Bindungsaktivität durch <i>Cpn</i> -Infektion 48 und 72 hpi	82
30	Kombination von Proteinextrakten aus nicht infizierten Kontrollzellen und Extrakten aus <i>Cpn</i> infizierten Zellen	84
31	Lactacystin verhindert den Abbau von c-Jun während der Herstellung von Kernextrakten teilweise	85
32	Degradations Assay	86
33	CPAF Induktion in HEK293 T-REx Zellen führt zum Abbau von c-Jun und ATF-2	87
34	<i>C. pneumoniae</i> Einschlüsse in c-Jun transfizierten HEp-2 Zellen 48 h nach der Infektion	88
35	Wiederanzucht von <i>Cpn</i> aus c-Jun transfizierten Zellen	90
36	Persistenz von <i>Cpn</i> in einem Monozyten	91
37	Erhöhte Expression von AP-1 Proteinen in infizierten Monozyten 48 und 72 hpi	92
38	Nachweis der AP-1 Bindungsaktivität in infizierten Monozyten 24 hpi	93
39	Kein Nachweis von CPAF in infizierten Monozyten	94

A Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Prof. Dr. med. Jan Rupp und PD Dr. rer. nat. Ger van Zandbergen für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung meiner Doktorarbeit. Besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. med. Jan Rupp für die Anregungen zur Konzeption der Experimente, der kritischen Durchsicht und hilfreichen Empfehlungen zur Überarbeitung der vorliegenden Dissertation.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Werner Solbach bedanke ich mich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene und die Kritik und Anregungen zu meinen Vorträgen.

Herrn PD. Dr. med. Matthias Klinger danke ich ganz herzlich für die Einführung in die Bedienung des konfokalen Laserscanning Mikroskops und die jederzeit bereitwilligen Hilfestellungen dazu, sowie für die Anfertigungen der elektronenmikroskopischen Bilder.

Für die Unterstützung bei der IVTT bedanke ich mich bei Herrn Dr. Thomas Hellwig-Bürgel und Frau Gabriele Huck.

Dr. Stefan Paschen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Georg Häcker hat mir freundlicherweise die HEK293 T-REx Zellen zur Verfügung gestellt, wofür ich mich herzlich bedanken möchte.

Prof. Dr. Wolfgang Dubiel danke ich sehr für die Bereitstellung des c-Jun Plasmids für meine Transfektionsexperimente.

Ganz besonders großer Dank gilt meinen vielen lieben Kollegen Anke Hellberg, Siegrid Pätzmann, Angela Gravenhorst und Kristin Wischnat, die mich sehr gut in die verschiedenen Methoden eingearbeitet haben. Darüber hinaus standen sie mir während des ganzen Projektes bei den experimentellen Untersuchungen hilfreich zur Seite und sorgten für eine angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte mich auch bei Dr. Kensuke Shima, Dr. Marta Szaszak und Inga Dietz für ihre sehr hilfreichen Diskussionen und Ratschläge herzlich bedanken.

Dr. Beate Jonas und Justina Bimschas danke ich ebenso herzlich für die freundliche Bereitstellung einiger Laborutensilien. Besonders bei Beate möchte ich mich bedanken, die sich sehr oft für meine Probleme Zeit nahm, obwohl sie durch ihre

eigene Promotion sehr vereinnahmt war.

Ein besonders herzliches Dankeschön geht an Julia Barthelmann. Ohne sie wäre ich an so manchem technischen Problem des Programms LaTeX gescheitert.

Meinen Eltern und Geschwistern bin ich sehr dankbar für die stets mitfühlenden Worte und Ermutigung in Zeiten, in denen nicht immer alles so problemlos verlief. Ohne ihre stetige Zuversicht und liebe Unterstützung wäre die Realisierung meiner Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Abschließend möchte ich meinem lieben Ehemann Gregor danken, der meine Tiefpunkte immer am intensivsten zu spüren bekam. Danke, dass Du immer wieder aufmunternde Worte gefunden hast und mir die Zuversicht gabst, dass alles gut wird und wir gemeinsam alles schaffen können!

B Publikationen

- RUPP J, PFLEIDERER L, **JUGERT C**, MOELLER S, KLINGER M, DALHOFF K, SOLBACH W, STENGER S, LASKAY T, VAN ZANDBERGEN G
Chlamydia pneumoniae hides inside apoptotic neutrophils to silently infect and propagate in macrophages. PLoS ONE. 2009 Jun 23;4(6):e6020.
- VAN ZANDBERGEN G*, **RADZIMSKI C***, SZASZAK M, KLINGER M, SOLBACH W, RUPP J
The AP-1 transcription factor modulates persistence of *Chlamydia pneumoniae*.
Manuskript in Vorbereitung (* contributed equally)

C Kongressbeiträge

- 6. Deutscher Chlamydienworkshop (27. – 29. Februar 2008) in Ulm
AP-1 proteins are differentially regulated in Chlamydia pneumoniae infected host cells (Vortrag)
- 12. Minisymposium „Infektion und Immunabwehr“ (07. – 09. März 2008) auf Burg Rothenfels
AP-1 proteins are differentially regulated in Chlamydia pneumoniae infected host cells (Vortrag)
- 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) (21. – 24. September 2008) in Dresden
AP-1 proteins are differentially regulated in Chlamydia pneumoniae infected host cells (Vortrag)
- 7. Deutscher Chlamydienworkshop (04. – 06. Februar 2009) in Lübeck
Downregulation of AP-1 proteins in Chlamydia pneumoniae infected host cells (Poster)
- 13. Minisymposium „Infektion und Immunabwehr“ (12. – 14. März 2009) auf Burg Rothenfels
Downregulation of AP-1 proteins in Chlamydia pneumoniae infected host cells (Vortrag)

D Lebenslauf



Persönliche Daten

Name: Christiane Radzimski, geb. Jugert
Geburtsdatum: 03.11.1981
Geburtsort: Nordhausen
Familienstand: verheiratet mit Gregor Radzimski

Schulbildung

1988 - 1990 Grundsule Petersdorf
1990 - 1992 Adolf Diesterweg Schule (Sprachförderklasse für Englisch)
1992 - 2000 Staatl. Gymnasium Wilhelm von Humboldt in Nordhausen
Abschluss: Abitur (Note: 1,3)

Auslandsaufenthalt

09/2000 - 07/2001 Au-pair-Aufenthalt in England, Besuch des Epping-Forest-College und Erwerb des „First Certificate in English“

Studium

WS 2001 - SS 2006	Studium der Biologie (Diplomstudiengang) an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät
SS 2003	Erwerb des Vordiploms (Note: 1,9)
10/2005 - 09/2006	Diplomarbeit zum Thema: „Untersuchungen zur Rolle von Makrophagen bei der Abwehr verschiedener <i>Salmonella</i> -Serovaren im aviären Zäkum“, angefertigt am Friedrich-Löffler-Institut in Jena, in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Angela Berndt
09/2006	Abschluss mit dem akademischen Grad der Diplom-Biologin (Note: 1,2)

Beruflicher Werdegang

10/2006 - 12/2009	wissenschaftliche Angestellte/Dipl. Biologin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Jan Rupp
seit 05/2010	wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der EUROIMMUN AG in Lübeck

Weiterbildung

3/2007	Strahlenschutzkurs an der Universität zu Lübeck zur Erlangung der Fachkunde im Strahlenschutz im nichtmedizinischen Bereich nach der Strahlenschutzverordnung
--------	---

E Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und habe zuvor keine anderen Promotionsversuche unternommen.

Lübeck, den 24. Juli 2011

Christiane Radzimski