

Aus der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Jan Rupp

***Chlamydia trachomatis* –
Infektion und Entzündung
unter dem Einfluss des Mikromilieus
im weiblichen Genitaltrakt**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Larissa Felicitas Schuchardt
aus Frankfurt am Main

Lübeck 2021

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Daniel Beyer

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 31.03.2021

Promotionskommission der Sektion Medizin

1 Inhaltsverzeichnis

2	Abkürzungsverzeichnis	3
3	Zusammenfassung	5
4	Einleitung	7
4.1	Grundlagen zum Pathogen	7
4.1.1	Allgemeines zu <i>C. trachomatis</i>	7
4.1.2	Klinik und Komplikationen der Chlamydieninfektion	10
4.2	Verschiedene Versuchsansätze in der Chlamydienforschung	11
4.2.1	Unterschiedliche Infektionsmodelle im Vergleich	11
4.2.2	Beschreibung der Immunreaktion in herkömmlichen Modellen	12
4.2.3	Beschreibung der Stoffwechseladaptation in herkömmlichen Modellen	13
4.3	Modifikationen herkömmlicher Modelle: ex vivo-Infektionsversuche in Primärzellen	14
4.4	Modifikationen herkömmlicher Modelle: variierende Sauerstoffkonzentrationen	15
4.5	Modifikationen herkömmlicher Modelle: der Einfluss von Sexualhormonen	16
4.5.1	Der Einfluss von Estradiol auf die Chlamydieninfektion	16
4.5.2	Der Einfluss von Progesteron auf die Chlamydieninfektion	18
4.6	Eigene Fragestellung	19
5	Material	21
5.1	Geräte	21
5.2	Verbrauchsmaterialien	22
5.3	Chemikalien und Reagenzien	22
5.4	Medien, Puffer und Lösungen	24
5.5	Zelllinien	25
5.6	Enzyme und Kits	25
5.7	Software	26
6	Methoden	27
6.1	Zellkultur der Karzinomzelllinien (HeLa/HEp-2)	27
6.1.1	Zellkultur von Dauerkulturzellen	27
6.1.2	Bestimmung der Zellzahl	27
6.1.3	Konservierung und Auftauen von Dauerkulturzelllinien	27
6.2	Gewinnung und Zellkultur primärer epithelialer Eileiterzellen (FT-Zellen)	28
6.2.1	Tubenpräparation und Isolation primärer epithelialer Eileiterzellen	28
6.2.2	Kultur und Wachstum primärer epithelialer Eileiterzellen	29
6.3	Infektionsbiologische Methoden	29
6.3.1	Herstellung eines <i>C. trachomatis</i> Serovar D-Infektionsstocks	29
6.3.2	Infektion von Karzinomzelllinien	30
6.3.3	Infektion von humanen primären epithelialen Eileiterzellen	30

6.3.4 Zellkultur und Infektion unter Zugabe von Sexualhormonen	31
6.3.5 Bestimmung infektiöser <i>C. trachomatis</i> mithilfe der Reinfektionsraten	31
6.4 Analyse mittels Färbungen und Auszählung	32
6.4.1 Direkter Immunfluoreszenztest von Chlamydien und Bestimmung der Infektionsrate .	32
6.4.2 Indirekter Immunfluoreszenztest und Quantifizierung infektiöser Chlamydien	32
6.5 Proteinbiochemische Auswertung mittels Western Blot	33
6.5.1 Probengewinnung für die Western Blot-Analyse.....	33
6.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Blotverfahren	33
6.6 Molekularbiologische Analysemethoden.....	34
6.6.1 RNA-Isolation und reverse Transkription	34
6.6.2 RT-PCR	35
6.7 Auswertung und statistische Datenanalyse	35
7 Ergebnisse	36
7.1 Ablauf der Chlamydieninfektion in HeLa- und FT-Zellen im Vergleich	36
7.1.1 Zellkultur und Chlamydieninfektion unter Normoxie und Hypoxie	36
7.1.2 Analyse der Entzündungsreaktion der Zellen unter Normoxie und Hypoxie.....	41
7.1.3 Vergleich der Zellmodelle hinsichtlich des Stoffwechsels unter Normoxie/Hypoxie	45
7.2 Der Einfluss von Estradiol auf HeLa- und FT-Zellen im Vergleich	46
7.2.2 Proinflammatorische Reaktion der Zellen auf Infektion nach Estradiolstimulation	48
7.2.3 Der Zellstoffwechsel unter dem Einfluss von Estradiol.....	50
7.2.3 Der Einfluss von Progesteron auf die Infektion mit <i>C. trachomatis</i>	51
8 Diskussion	52
8.1 Herausforderungen bei der Arbeit mit humanen primären Eileiterzellen.....	52
8.2 Hypoxie beeinflusst den chlamydialen Lebenszyklus	55
8.3 HeLa- und FT-Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Entzündungsreaktion	56
8.4 Metabolische Unterschiede beider Zellmodelle	59
8.5 Die Beeinflussung der Infektionsrate durch Estradiol.....	61
8.6 Infektiosität, Entzündungsparameter und Wirtszellmetabolismus unter E2-Stimulation	63
8.7 Estradiol induziert IL-1β in humanen Eileiterzellen	65
8.8 Bedeutung und Ausblick	66
9 Literaturverzeichnis	70
10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	85
11 Anhang	86
11.1 Danksagung.....	86
11.2 Lebenslauf.....	87
11.3 Ethikvotum	88
11.4 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge.....	88

2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<i>CtrD</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar D
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMPA	Depot-Medroxyprogesteronacetat
E2	β-Estradiol
EB	elementary body/Elementarkörperchen
ER α/β	estrogen receptor α/β, Östrogenrezeptor α/β
ERK1/2	extracellular signal regulated kinase, p44/42
et al.	et alia
etc.	et cetera
FGT	female genital tract, weiblicher Genitaltrakt
FKS	Fetales Kälberserum
FT-Zellen	fallopian tube cells, primäre Eileiterzellen
GLUT1	Glukose-Transporter 1
h	Stunden
HeLa	Henrietta Lacks-Zellen, humane Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms
HEp-2	Human Epidermoid cancer cell, humane Epithelzelllinie eines Larynxkarzinoms
HIF-1α	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 alpha
Hox	Hypoxie (hier in der Regel definiert als 2% O ₂)
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Horse radish peroxidase
HSP (60)	Heat shock protein (60)
HSV-2	Herpes simplex Virus Typ 2
IFN-γ	Interferon gamma
Inc	Inclusion membrane protein
IFU	Inclusion forming unit
IPAM	Inclusion protein acting on microtubuli
IL	Interleukin
LDHA	Laktat-Dehydrogenase A
LPS	Lipopolysaccharid

MAPK	Mitogen activated protein kinase
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger ribonucleic acid, messenger-Ribonukleinsäure
NFκB	Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B-cells
Nox	Normoxie (hier i.d.R. definiert als 20% O ₂)
ns	nicht signifikant
O₂	Sauerstoff
P4	Progesteron (Pregn-4-en-3,20-dion)
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pERK1/2	phosphorylierte extracellular signal regulated kinase, pp44/42
p.i.	post infectionem (Angabe in Stunden nach der Infektion)
PID	pelvic inflammatory disease
PKC	Proteinkinase C
PRR	Pattern recognition receptor
RB	reticulate body, Retikularkörperchen
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rRNA	ribosomal ribonucleic acid, ribosomale Ribonukleinsäure
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler
<i>Spp.</i>	Species
STD	sexually transmitted disease, sexuell übertragbare Krankheit
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFI	tubal factor infertility, eileiterbedingte Infertilität
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor

3 Zusammenfassung

Die Infektion mit *C. trachomatis* ist die weltweit häufigste sexuell übertragbare bakterielle Erkrankung. Folgen wie die chronische Entzündung des kleinen Beckens (pelvic inflammatory disease, PID) oder Infertilität durch vernarbtes Eileitergewebe (tubal factor infertility, TFI) sind möglich. Infektions-Zellmodelle sollen neue Erkenntnisse über den Verlauf der Infektion hervorbringen und langfristig die Grundlage für neue Präventions- und Therapieansätze bilden.

Für diese Modelle werden häufig Karzinomzelllinien verwendet, die hinsichtlich ihrer Handhabbarkeit viele Vorteile bieten. Diese Zellen sind jedoch genetisch modifiziert, was Ergebnisse beeinflussen kann. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, Primärzellen aus weiblichen Eileitern (fallopian tube-/FT-Zellen) zu verwenden und diese als Infektionsmodell zu charakterisieren. Hierfür wurden FT-Zellen isoliert, kultiviert und infiziert. Anschließend wurde das Modell hinsichtlich verschiedener Parameter wie Infektionsraten und Wirtszellreaktion mit dem HeLa-Karzinomzellmodell verglichen. Es zeigte sich, dass das Primärzellmodell trotz einer hohen Variabilität der Ergebnisse als gutes Modell für die Chlamydieninfektion dienen kann.

Weiterhin wurden die Einflüsse physiologisch im weiblichen Genitaltrakt (female genital tract, FGT) vorkommender Stimuli wie eine niedrige O₂-Konzentration (Hypoxie) oder Sexualhormone auf die Chlamydieninfektion im Zellmodell untersucht. So ist der chlamydiale Lebenszyklus durch den Wechsel zweier Erscheinungsformen, der infektiösen Elementarkörperchen (elementary body, EB) und der eher stoffwechselaktiven Retikularkörperchen (reticular body, RB) gekennzeichnet. Innerhalb des intrazellulären Einschlusses differenzieren sich binnen der Zyklusdauer von 48 h EBs zu RBs und anschließend wieder zu EBs.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die in vivo niedrigere O₂-Konzentration im FGT in beiden Zellmodellen die Differenzierung von RBs in EBs verzögert, was in einer verminderten Infektiosität der Einschlüsse resultiert. Das Sexualhormon Estradiol führt nur in HeLa-Zellen und nicht in Primärzellen zu einer gesteigerten Infektionsrate. In HeLa-Zellen zeigt sich jedoch kein Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL (Interleukin)-1 β , IL-6 und IL-8. Im Primärzellmodell wird durch die Behandlung mit Estradiol IL-1 β

induziert. Ein Einfluss von Progesteron konnte in unseren Versuchen nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend ergeben die gewonnenen Daten, dass sich die Infektion mit *C. trachomatis* im HeLa- und im FT-Zellmodell untersuchen und charakterisieren lässt. In beiden Infektionsmodellen können unterschiedliche Stimuli die Infektionsrate, den chlamydialen Lebenszyklus und die Reaktion der Wirtszelle beeinflussen. Wir stellen daher die Hypothese auf, dass die physiologischen Einflüsse im FGT auch die in vivo-Infektion und den klinischen Verlauf verändern können.

4 Einleitung

4.1 Grundlagen zum Pathogen

4.1.1 Allgemeines zu *C. trachomatis*

Chlamydia trachomatis ist ein obligat intrazellulär lebendes, gramnegatives Bakterium aus der Familie der Chlamydiaceae, Gattung *Chlamydia*. Dieses Pathogen ist weltweit verbreitet und kann sowohl Menschen als auch Tiere befallen. Derzeit sind 18 verschiedene Serotypen humanpathogener *C. trachomatis* bekannt, die unterschiedlichste Krankheitsbilder hervorrufen können. Infektion mit den Serotypen A-C verursachen das Trachom, eine chronische Bindehautentzündung. Die Serotypen D-K werden sexuell übertragen und sorgen für schwere Entzündungen des weiblichen Genitaltraktes, die sogar zu Infertilität führen können. Die Serotypen L1-L3 sind Erreger des Lymphogranuloma venereum, einer hauptsächlich in Entwicklungsländern vorkommenden, ulzerierenden Geschlechtskrankheit.

Neben der Gattung *Chlamydia*, die neben *C. trachomatis* noch *C. muridarum* und *C. suis* umfasst, existiert innerhalb der Familie Chlamydiaceae noch die Gattung *Chlamydophila*. Zu dieser zählen unter anderen weitere humanpathogene Arten wie *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. pecorum*.

All diese Species weisen denselben einzigartigen, biphasischen Lebenszyklus auf (**Abb. 4.1**). In diesem finden sich zwei Formen des Mikroorganismus: der infektiöse, gegen Umwelteinflüsse resistenter Elementarkörper (elementary body, EB), sowie der metabolisch aktivere, teilungsfähige, jedoch nicht infektiöse Retikularkörper (reticulate body, RB). Ein Lebenszyklus dauert unter normalen Bedingungen circa 48 - 72 Stunden und beginnt mit der Adhäsion der EBs an die Zellmembran der zukünftigen Wirtszelle, möglicherweise an eine Untereinheit des Östrogenrezeptor-Komplexes^{1,2}. Anschließend werden chlamydiale Proteine über ein Typ-III-Sekretionssystem in die Zelle abgegeben und verursachen eine Endozytose der EBs und die Bildung einer Einschlussvakuole. In dieser differenzieren EBs zu den deutlich größeren RBs, welche sich mithilfe binärer Zellteilung vermehren. Dies führt zu einer Größenreduktion der RBs, wodurch die Rücktransformation in EBs ausgelöst wird³. Die Wirtszelle wird dann entweder lysiert oder

der Einschluss mit der Wirtszellmembran fusioniert, wodurch EBs freigesetzt werden, um aufs Neue Zellen zu infizieren^{4,5}.

Neben Retikular- und Elementarkörperchen wird allerdings noch eine weitere, morphologisch abweichende Form beschrieben, die oft als „aberrante RBs“ (aRBs) oder auch als „persistente Form“ bezeichnet wird. Der Übergang in diese erfolgt, wenn aufgrund widriger Umgebungsbedingungen RBs nicht zu EBs redifferenzieren können. Als aberrante Form können sie längere Zeit überdauern, bevor sie bei günstigeren äußeren Einflussbedingungen erneut zu EBs werden und der Lebenszyklus fortgesetzt wird. Morphologisch ähnelt diese Form stark vergrößerten, jedoch keine Zellteilung betreibenden RBs^{6,7}. Aberrante Chlamydien wurden bisher hauptsächlich *in vitro* beschrieben; eine Korrelation mit der klinischen Persistenz der Infektion wird vermutet⁸.

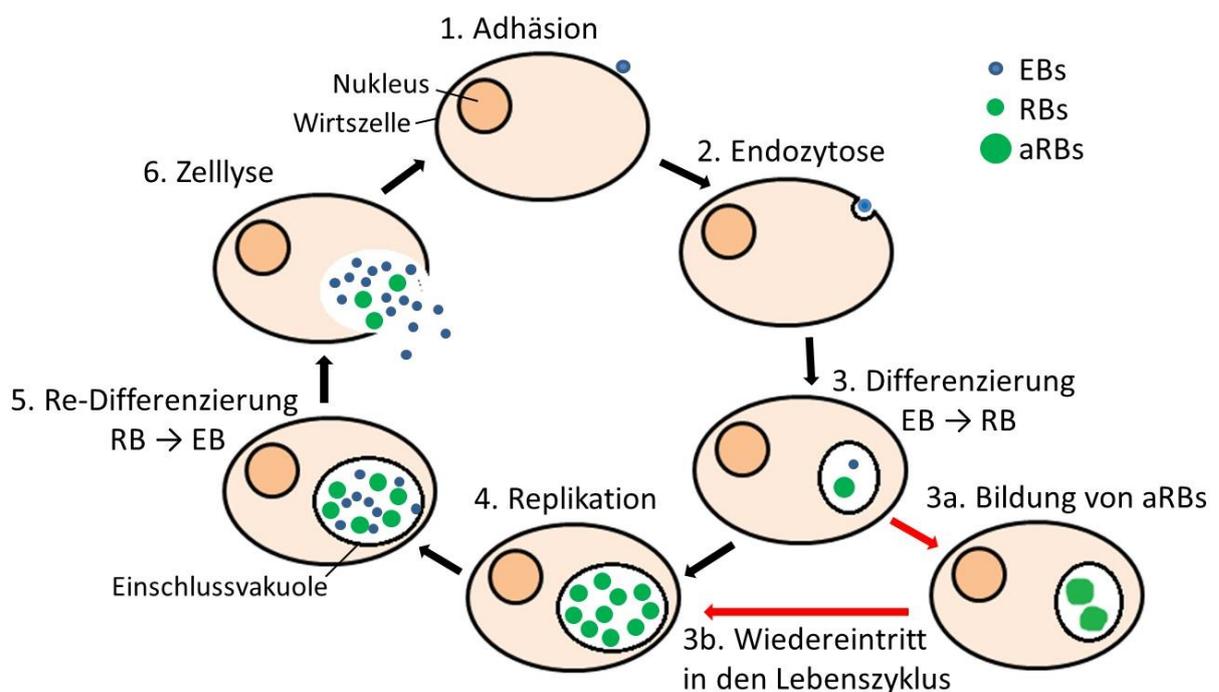


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *Chlamydia* spp.

Der infektiöse Elementarkörper (EB) adhärirt an die Wirtszellmembran (1) und wird internalisiert (2). In der neu gebildeten Einschlussvakuole differenzieren EBs zu den metabolisch aktiveren Retikularkörpern (RBs, 3), die sich mittels binärer Zellteilung vermehren (4). Nach 24 – 48 h kommt es zur Re-Differenzierung zu EBs (5), welche über Lyse der Wirtszelle (6) oder Fusionierung von Vakuole und Wirtszellmembran (nicht dargestellt) freigesetzt werden und 48 – 72 h nach der primären Infektion erneut Zellen infizieren können (1). Der Übergang in die aberrante Form (aRBs, 3a) und der anschließende Wiedereintritt in den Entwicklungszyklus bei günstigeren Umgebungsbedingungen (3b) werden im Zellmodell beschrieben, die klinische Relevanz ist unklar.

Bekannte Auslöser für die Umwandlung in die aberrierende Form sind Interferon gamma (IFN- γ)^{9,10}, das in der Immunantwort des Menschen eine große Rolle spielt, einige Antibiotika^{11–13} sowie ein Mangel an Eisen^{14,15} in der Mikroumgebung. Für das Auftreten persistenter Chlamydien in vivo gibt es Anhaltspunkte, dies ist jedoch Gegenstand aktueller Forschungen, ebenso wie ein möglicher Zusammenhang mit der aberrierenden Form in vitro^{16–18}.

Für eine produktive Infektion sind Chlamydien auf die Zufuhr von Nährstoffen aus der Wirtszelle angewiesen, da sie nur über einen Teil der zur ATP-Gewinnung notwendigen Enzyme verfügen. Chlamydiale Einschlüsse enthalten Glykogen als Energiereserve, das teils über die Vakuolenmembran aufgenommen wird und teils aus Vorstufen wie importierter phosphorylierter Glukose neu synthetisiert wird¹⁹. Darüber hinaus gehen die unterschiedlichen Phasen im chlamydialen Lebenszyklus auch mit unterschiedlicher Stoffwechselaktivität von EBs und RBs einher²⁰. So galten EBs lange Zeit als stoffwechsellinaktiv. Es wurde jedoch inzwischen gezeigt, dass sie unter bestimmten Bedingungen zur Energiegewinnung aus Wirtszellsubstraten imstande sind. EBs nehmen vor allem Glucose-6-Phosphat auf und generieren mithilfe des aeroben Glukosekatabolismus Energie für die Umwandlung in RBs. Diese wiederum nehmen direkt ATP aus der Wirtszelle auf und nutzen es als Energiequelle für Proteinsynthese und Nährstofftransport, was einer effizienten Replikation dient^{20,21}. Neben Kohlenhydraten werden weitere Stoffwechselprodukte wie Aminosäuren²², Nukleotide²³ und Fette^{24,25} durch die Vakuolenmembran aufgenommen und von dem Pathogen metabolisiert.

Jedoch sind Chlamydien nicht nur in der Lage, Substrate aus der Zelle aufzunehmen, sondern können zelleigene Mechanismen auch zu ihren Gunsten beeinflussen. Beispielsweise modifizieren von *C. trachomatis* sezernierte Effektorproteine wie IPAM (inclusion protein acting on MTs) intrazelluläre Mikrotubuli und Actin²⁶, was zu einer Stabilisierung der Vakuolenmembran und Umstrukturierung zelleigener Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat führt^{27–29}. Dies dient möglicherweise der erleichterten Aufnahme von Nährstoffen für die Energiegewinnung zur Replikation und somit der produktiven Infektion.

Ein weiterer Mechanismus, mit dem Chlamydien ihre Wirtszelle manipulieren, ist die Verhinderung der intrinsischen Apoptose. Dies wird unter anderem durch Proteine in der

Einschlussmembran (inclusion membrane proteins, Incs) bedingt, bei deren Fehlen physiologische Apoptosemechanismen in der Wirtszelle observiert werden können³⁰. Die Hemmung zelleigener DNA-Reparaturmechanismen durch microRNA kann eine Rolle spielen³¹. Durch eine Chlamydieninfektion wird darüber hinaus der TNF-Rezeptor internalisiert; konsekutiv werden TNF-vermittelte apoptotische Signalwege blockiert³². Die für die intrinsische Apoptose wichtige Freisetzung von Cytochrom c in das Wirtszellzytoplasma wird verhindert³³. Auch wurde eine durch die Infektion bedingte Hochregulation antiapoptotischer Proteine der Wirtszelle beschrieben³⁴. Die Beeinflussung der zellulären Apoptosemechanismen ist wichtig für das Pathogen, damit der Entwicklungszyklus nicht vorzeitig terminiert und die Replikation dadurch eingeschränkt wird.

Der dritte wichtige Manipulationsmechanismus ist die Beeinflussung der Immunreaktion des Wirtes. Physiologischerweise werden im Rahmen der angeborenen Immunantwort chlamydiale Antigene wie LPS und HSP60 von PRRs (Pattern recognition receptors) der Wirtszelle, insbesondere TLR2 und TLR4 (Toll-like receptors 2 und 4), erkannt. Die infizierten Epithelzellen setzen daraufhin proinflammatorische Zytokine frei, die Leukozyten rekrutieren, die die Infektion bekämpfen. Wichtig für die PRR- und TLR-vermittelten intrazellulären Kaskaden ist der Transkriptionsfaktor NFκB³⁵. Eine Untereinheit davon kann selektiv von chlamydialen Proteasen gespalten werden, wodurch die Chlamydieninfektion die Signalkaskade beeinflusst³⁶. Ebenfalls wird mit der adaptiven Immunantwort des Wirtes interferiert. So wird im Rahmen der Infektion die Expression von MHC-I und MHC-II herunterreguliert, die für die T-Zell-vermittelte Immunantwort wichtig ist^{37,38}.

Dies sind beispielhafte Mechanismen, die eine Manipulation der Wirtszelle durch Chlamydien aufzeigen. Die zahlreichen Interaktionen des Pathogens mit seiner Wirtszelle sind sehr komplex und bisher nicht vollständig verstanden^{39,40}.

4.1.2 Klinik und Komplikationen der Chlamydieninfektion

Die Infektion mit *Chlamydia trachomatis* ist die häufigste sexuell übertragbare bakterielle Infektion weltweit. Im Jahr 2016 wurden alleine in den USA mehr als 1,6 Millionen Fälle gemeldet, was fast 500 Fällen pro 100.000 Einwohner entspricht. Die Tendenz ist dabei deutlich steigend – im Jahr 2000 wurden noch 251,4 Fälle auf 100.000 Einwohner gemeldet⁴¹. Das Risiko einer Frau, sich bis zum Alter von 44 Jahren mindestens einmal mit

Chlamydien infiziert zu haben, beträgt 42,9%⁴². Als Risikogruppe gelten hierbei vor allem junge Frauen unter 25 Jahren mit mehr als einem Sexualpartner. Auch Zugehörigkeit zu einer ethnischen Minderheit, Rauchen und niedriger Bildungsstandard werden als Risikofaktoren genannt⁴³⁻⁴⁵. Ebenso korrelieren Koinfektionen mit *N. gonorrhoeae* oder HPV sowie die bakterielle Vaginose mit dem Auftreten einer Chlamydieninfektion⁴⁶. Viele dieser Studien wurden jedoch in Zentren für Familienplanung oder in Beratungsstellen für STDs durchgeführt, sodass die Ergebnisse möglicherweise nicht repräsentativ für andere Populationen sind.

Chlamydien infizieren bei Primärinfektion des unteren Genitaltraktes in erster Linie epitheliale Zellen. Dies äußert sich bei Frauen oft in Form einer Urethritis, Cervicitis oder Endometritis. Die Ausbreitung der Infektion in den oberen Genitaltrakt führt bei Frauen zur Salpingitis und kann sich zur so genannten pelvic inflammatory disease (PID) ausweiten, einer entzündlichen Erkrankung des kleinen Beckens⁴⁷. Bei Männern beginnt die Infektion oft als Urethritis und erweitert sich ohne Behandlung zur Prostatitis oder Epididymitis.

Problematisch ist, dass 50% – 70% aller Infektionen asymptomatisch verlaufen⁴⁸. Die unbemerkte und daher unbehandelte Infektion kann schwerwiegende Komplikationen verursachen, da die chronische Entzündung bei der PID über die Aktivierung immunologischer Prozesse zu einem Gewebeumbau und zur Fibrosierung führt. Dies kann eine Vernarbung und letztlich den Verschluss der Eileiter zur Folge haben⁴⁹. Klinisch äußert sich dies in eileiterbedingter Unfruchtbarkeit oder im Auftreten von ektopen Schwangerschaften, die im Extremfall tödlich enden können.

Welche Rolle das Mikromilieu des FGT für die Pathogenese dieser Komplikationen einnimmt, ist noch unklar. Mithilfe von Infektionsmodellen, die dies berücksichtigen, könnten neue Erkenntnisse über den Krankheitsverlauf nach Chlamydieninfektion gewonnen werden.

4.2 Verschiedene Versuchsansätze in der Chlamydienforschung

4.2.1 Unterschiedliche Infektionsmodelle im Vergleich

Studien, die sich mit dem Infektionsverlauf von *C. trachomatis* befassen, werden meist im Zellmodell (in vitro) oder im Tiermodell (in vivo) durchgeführt. Unter den Tiermodellen lassen sich besonders die Infektion von Mäusen mit *C. muridarum* und die Infektion von

Schweinen mit *C. suis* hervorheben, da diese beiden Chlamydien-species wie auch *C. trachomatis* zum selben Genus *Chlamydia* gehören und die Infektion verglichen mit anderen Tiermodellen einen ähnlichen Ablauf wie die Infektion im Menschen zeigt. Jedoch müssen Ergebnisse aus derlei Studien trotzdem mit Vorsicht betrachtet werden, da es einige wichtige Unterschiede gibt⁵⁰: die *C. muridarum*-Infektion in der Maus terminiert sich beispielsweise innerhalb von 4 Wochen selbst und führt zur partialen oder vollständigen Immunität gegenüber Reinfektionen, die Infektion im Menschen hingegen erfordert in der Regel antibiotische Behandlung und kann wiederholt auftreten. Auch hinsichtlich Immunreaktion und intrazellulären Signalkaskaden finden sich Unterschiede⁵¹. Auf der anderen Seite lässt sich die Dynamik der Infektion unter der ablaufenden Immunantwort im Tiermodell besser beurteilen als im Zellmodell. Zellmodelle haben dafür den Vorteil der einfachen Handhabung, der Verfügbarkeit und der Reproduzierbarkeit; jedoch auch den Nachteil, dass es sich bei den herkömmlichen Zelllinien wie HeLa- und HEp-2 um immortalisierte Karzinomzelllinien handelt. Diese weisen hinsichtlich Genexpression und Stoffwechsel Unterschiede zu normalen Zellen auf. Als Beispiel lassen sich die fehlende Stimulation durch Wachstumsfaktoren oder der veränderte Zellmetabolismus anführen⁵². Daher lassen sich auch aus Zellmodellen nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die in vivo-Situation im Menschen ziehen. Ex vivo-Modelle mit Primärzellen aus Geweben des FGT bieten in dieser Hinsicht einen guten Kompromiss, da sie die biologische Variabilität verschiedener Spenderinnen abbilden und die Speciesbarriere nicht einkalkuliert werden muss, und somit einige der Nachteile der beiden zuvor genannten Modelle vermieden werden.

4.2.2 Beschreibung der Immunreaktion in herkömmlichen Modellen

Bei der Infektion der Epithelzellen werden Chlamydien, wie auch andere bakterielle Pathogene, über so genannte PAMPs (pathogen associated molecule patterns) erkannt. Dies geschieht mithilfe von PRRs, wobei unter diesen der TLR2 bei der Chlamydieninfektion im Vordergrund steht⁵³. Die weitere Induktion der Immunantwort erfolgt unter anderem über den MAP (mitogen activated protein)-Kinase-Signalweg. MAP-Kinasen sind in allen eukaryotischen Zellen vorhanden und steuern wichtige Zellfunktionen wie Proliferation, Apoptose und Genexpression. Die MAP-Kinase ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase, p44/42) wird vor allem von extrazellulären Stimuli sowie Pathogenen beeinflusst und spielt eine große Rolle bei Infektion durch *C.*

trachomatis. Sowohl Phosphorylierung als auch Kinaseaktivität von ERK1/2 steigen in mit Chlamydien infizierten Zellen signifikant an. Dies passiert jedoch nicht, wenn die chlamydiale Proteinsynthese gehemmt wird, was eine Beeinflussung durch das Pathogen nahelegt⁵⁴.

Für die Immunantwort ist ERK1/2 ebenfalls relevant, da bei Aktivierung IL-8 vermehrt exprimiert wird⁵⁵. Dieses Zytokin hat eine chemotaktische Funktion und ist an der Immunabwehr nach Chlamydieninfektion beteiligt. Inhibierung von IL-8 hemmt die Invasion von neutrophilen Granulozyten, allerdings auch die durch diese vermittelte Gewebeschädigung^{56,57}. Für die optimale Induktion von IL-8 sind jedoch auch andere intrazelluläre Signalkaskaden wichtig^{58,59}.

Weitere Zytokine, die an der proinflammatorischen Antwort nach Infektion beteiligt sind, sind IL-1 α und IL-1 β aus der IL-1-Familie sowie IL-6^{60,61}. IL-1 β fördert zusätzlich die Expression von IL-6 und IL-8 über Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38^{61,62}, was die Bedeutung dieser Signalwege in der proinflammatorischen Reaktion unterstreicht. Zytokine fördern die Entzündungsreaktion und beeinflussen somit den klinischen Krankheitsverlauf.

Klinisch konnte gezeigt werden, dass die Serumspiegel von IL-1 β mit Chlamydieninfektion und Komplikationen wie tubarer ektoper Schwangerschaft korrelieren⁶³. In Eileitern mit ektoper Schwangerschaft wurde verglichen mit gesunden Eileitern ebenfalls signifikant mehr IL-6 und IL-8 exprimiert⁶⁴.

4.2.3 Beschreibung der Stoffwechseladaptation in herkömmlichen Modellen

Wenn Zellen mit *C. trachomatis* infiziert werden, führt dies nicht nur zu einer Entzündungsreaktion der Zelle, sondern auch zu Veränderungen im Zellstoffwechsel als zelleigener Anpassungsreaktion⁶⁵. Zwei der Schlüsselenzyme hierfür sind der membranständige Glukosetransporter 1 (GLUT1) und die Laktatdehydrogenase A (LDHA). Die Verfügbarkeit von Glukose in der Wirtszelle, die unter anderem über den GLUT1 in die Zelle transportiert wird, ist der limitierende Faktor für die Rate der Energiegewinnung. Nach Infektion mit *C. trachomatis* konnte daher eine vermehrte Induktion von GLUT1 nachgewiesen werden⁶⁶. In *C. psittaci*-infizierten HeLa-Zellen war dies insbesondere in der stark stoffwechselaktiven Phase des chlamydialen Lebenszyklus der Fall⁶⁷. Als weiterer bekannter Stimulus für die Induktion von GLUT1 gelten geringe O₂-Konzentrationen^{68,69}.

Auch LDHA wird durch Hypoxie induziert. Pyruvat als Substrat dieses Enzyms kann bei fehlendem Sauerstoff nicht mehr in den Mitochondrien oxidiert werden, fällt vermehrt an und wird durch die LDH anaerob zu Laktat abgebaut⁶⁹. Vor allem für Tumorzellen ist diese Energiegewinnung aus der anaeroben Glykolyse kennzeichnend (Warburg-Effekt)^{52,70}. Stoffwechselveränderungen im Sinne des Warburg-Effektes werden allerdings trotz ausreichender O₂-Versorgung auch bei der *C. trachomatis*-Infektion beobachtet, da erhöhte Level von Pyruvat, Glutamat und Laktat nachgewiesen werden konnten⁷¹. Insgesamt zeigt sich also, dass sich der Metabolismus der Wirtszellen der Chlamydieninfektion anpasst, um den gesteigerten Bedarf an Substraten zu decken.

4.3 Modifikationen herkömmlicher Modelle: ex vivo-Infektionsversuche in Primärzellen

Ein ex vivo-Modell mit primären humanen Eileiter-Epithelzellen fand bereits Anwendung in der Erforschung der Genese des serösen Ovarialkarzinoms^{72,73}. Für Infektionsversuche mit *C. trachomatis* wird ein leicht modifiziertes Protokoll verwendet. In Vorversuchen zeigen sich nach Infektion in der Rasterelektronenmikroskopie (REM) morphologisch geschwollene, teils lysierte Zellen, in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) können Einschlüsse mit EBs und RBs dargestellt werden⁷⁴. Mittels Immunfluoreszenz konnten ein Verlust der Polarität und eine Schädigung des Epithelzellverbandes gezeigt werden⁷⁵. Ebenfalls gelang mittels TEM und Immunfluoreszenz die Darstellung von aberranten RBs in endozervikalen epithelialen Primärzellen nach Behandlung mit IFN- γ oder Ampicillin, die beide auch in HeLa-Zellen die aberrante Form induzieren können⁷⁶. Hinsichtlich der proinflammatorischen Reaktion auf die Infektion spielt IL-1 β in primären FT-Zellen eine tragende Rolle bei der Initiierung der entzündlichen Reaktion und der Gewebeschädigung⁶¹. In endozervikalen Epithelzellen wird ebenfalls IL-1 β induziert⁷⁷. Auch die p38-vermittelte Induktion von IL-8 durch IL-1 β konnte nachgewiesen werden⁶¹. Primärzellen aus Endometrium und Endozervix zeigten noch bis zu 96 h nach Infektion einen signifikanten Anstieg von IL-6⁷⁸. Zervixzellen von *C. trachomatis*-positiven Frauen mit Fertilitätsproblemen zeigten eine stärkere Induktion von IL-1 β und IL-6 als bei infizierten, aber fertilen Frauen⁷⁹.

Dies zeigt, dass sich viele Charakteristika der Chlamydieninfektion in Karzinomzelllinien auch in Primärzellen wiederfinden. Darüber hinaus können diese mehr Informationen liefern, wo herkömmliche Zellmodelle wie HeLa oder HEP-2 aufgrund veränderter intrazellulärer Mechanismen an ihre Grenzen stoßen. Primärzellen haben jedoch auch

Nachteile, allen voran die eingeschränkte Verfügbarkeit sowie die kurze Lebensdauer^{80,81}. In vielen Versuchen wird außerdem beschrieben, dass das Ausmaß der Zytokinexpression bei unterschiedlichen Versuchspersonen stark variiert⁷⁸. Auch ist in Primärzellen oft eine deutlich höhere Infektionsdosis notwendig, um eine ähnliche Infektionsrate hervorzurufen wie in HeLa-Zellen^{76,82,83}.

4.4 Modifikationen herkömmlicher Modelle: variierende Sauerstoffkonzentrationen

Die Sauerstoffkonzentrationen im weiblichen Genitaltrakt sind durchschnittlich deutlich niedriger als in der Umgebungsluft, bewegen sich nämlich zwischen 0,5% in der Vagina⁸⁴ und 5,5% in der Cervix⁸⁵. Darüber hinaus variieren sie im Rahmen von sexueller Aktivität⁸⁴ und weiblichem Zyklus⁸⁶. Im Rahmen der Entzündung sind sie zusätzlich erniedrigt. Aus diesem Grund ist es wichtig, den Einfluss von Hypoxie, also niedrigen Sauerstoffkonzentrationen zwischen 0,5% und 5,5%, im Gegensatz zur Normoxie von ca. 20% O₂ in der Umgebungsluft, auf die Chlamydieninfektion zu untersuchen.

Es wird berichtet, dass *C. pneumoniae* unter 4% Hypoxie ein gesteigertes Wachstum zeigt, *C. trachomatis* jedoch nicht⁸⁷. Beide Chlamydien-Spp. weisen dann vergrößerte Einschlüsse auf⁸⁷. Das gesteigerte Wachstum von *C. pneumoniae* wird durch den Glukosekatabolismus der Wirtszelle vermittelt⁸⁸. Auch die metabolische Aktivität von *C. trachomatis* wird durch veränderte Sauerstoffbedingungen beeinflusst. In EBs und RBs wird die de-novo-Proteinsynthese bei 10% und noch mehr bei 2,5% O₂ in der Umgebung gesteigert, geht unter anaeroben Bedingungen jedoch verloren²⁰.

Das Verhalten unter der ablaufenden Immunantwort ändert sich ebenfalls je nach umgebender Sauerstoffkonzentration. IFN- γ als wichtiger Bestandteil der körpereigenen Immunabwehr induziert bei 20% O₂ die Bildung aberranter RBs, was mit einem Herunterfahren des chlamydialen Stoffwechsels und möglicher klinischer Persistenz einhergeht. In Hypoxie unter 3% O₂ hingegen wird das Wachstum von *C. trachomatis* nicht gehemmt und das Pathogen bleibt infektiös⁸⁹. Wenn die normoxischen und durch IFN- γ morphologisch aberranten RBs in eine hypoxische Umgebung transferiert werden, wird der Wachstumszyklus wieder aufgenommen und aberrante RBs wieder zu infektiösen EBs reaktiviert⁸⁹. Hinsichtlich der Entzündungsreaktion zeigen Zellkulturen mit IFN- γ -behandelten und durch Hypoxie reaktivierten Chlamydien niedrigere Spiegel der phosphorylierten MAP-Kinase pERK1/2 sowie der Interleukine 6 und 8 als die IFN- γ -

induzierten aberranten RBs aus normoxischen Bedingungen. Die Immunantwort ist unter Hypoxie trotz Reaktivierung also abgeschwächt⁹⁰.

Darüber hinaus wird nicht nur das Verhalten gegenüber der körpereigenen Immunabwehr, sondern auch das Ansprechen auf antibiotische Behandlung durch die O₂-Konzentration beeinflusst. So zeigen Chlamydien ein geringeres Ansprechen auf zwei Erstlinientherapeutika, Azithromycin und Doxycyclin, wenn sie unter Hypoxie kultiviert werden. Dieser Effekt ist möglicherweise durch die Laktatproduktion der anaeroben Glykolyse mit konsekutiv erniedrigtem pH-Wert im Mikromilieu oder durch Veränderungen des Energiestoffwechsels verursacht⁹¹.

Zum Verhalten von Primärzellen unter Hypoxie gibt es bislang nur wenige Erkenntnisse. Die Bildung aberranter RBs durch IFN- γ sowie die Reaktivierung durch Transfer der Zellen in eine sauerstoffarme Umgebung konnte auch in menschlichen Eileiterzellen gezeigt werden⁸⁹.

Hinsichtlich des Glukosestoffwechsels wurde beschrieben, dass in distalen Bereichen menschlicher Eileiter mehr GLUT1 nachweisbar ist, dieser Transporter also auch in vivo bei geringer Verfügbarkeit von Sauerstoff exprimiert wird⁹².

Über den Einfluss von Hypoxie auf den chlamydialen Wachstumszyklus und die Entzündungsreaktion in Primärzellen ohne IFN- γ -Vorbehandlung ist jedoch aktuell nicht viel bekannt.

4.5 Modifikationen herkömmlicher Modelle: der Einfluss von Sexualhormonen

Das Mikromilieu des FGT unterliegt hormonellen Einflüssen, insbesondere durch Östrogene und Gestagene. So ist es naheliegend, dass auch die Chlamydieninfektion durch diese beeinflusst wird. Im Folgenden soll die bisherige Datenlage zur Auswirkung von Estradiol (E2) und Progesteron (P4) als deren wichtigste Vertreter zusammengefasst werden.

4.5.1 Der Einfluss von Estradiol auf die Chlamydieninfektion

Es wird oft beschrieben, dass in Zellmodellen das Östrogen Estradiol zu einer Verstärkung der Infektion mit gesteigerter Adhäsion an die Wirtszellmembran und zahlenmäßig mehr Einschlüssen führt^{83,93,94}. Möglicherweise ist dies durch Adhäsion an die Protein-Disulfid-Isomerase vermittelt, ein Protein, das zur Stabilisierung des Östrogenrezeptorkomplexes beiträgt¹. Auch wird das Protein Clathrin, das zelluläre Endozytose vermittelt und somit

die Bildung von intrazellulären EB-haltigen Vakuolen ermöglicht, von E2 beeinflusst⁹⁵. Eine Blockade der Östrogenrezeptoren ER α und ER β durch Antikörper führt zu einer Verminderung der Infektiosität von Chlamydien⁹⁶. Auch in endometrialen Primärzellen führt die Behandlung mit E2 zu einer Zunahme der chlamydialen Adhäsion an Wirtszellen^{83,97}. Primäre Zellen aus dem Genitaltrakt von weiblichen Schweinen zeigten sich empfänglicher für die Infektion mit *C. suis*, wenn sie in der östrogendominanten Phase und nicht in der progesterondominanten Phase des Zyklus entnommen wurden⁹⁸. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Versuche mit anderen Pathogenen. So stieg die virale Replikation in mit dem Herpes simplex-Virus Typ 2 (HSV-2) infizierten endometrialen und zervikalen Primärzellen an, wenn diese mit E2 behandelt wurden, und fiel ab, wenn sie mit P4 kultiviert wurden⁹⁹. Die in vivo-Chlamydieninfektion von weiblichen Meerschweinchen nach Vorbehandlung mit Estradiol führte verglichen mit nicht vorbehandelten Tieren zu einer Ausdehnung der Infektion und mehr infizierten Zellen des Genitaltraktes¹⁰⁰. Es gibt Hinweise, dass die Einnahme von östrogenhaltigen oralen Kontrazeptiva mit einem erhöhten Risiko für Chlamydieninfektion korreliert^{101,102}. Jedoch weisen auch einige Studien in andere Richtungen. Im Rattenmodell führte die E2-Vorbehandlung zu signifikant verringerter Immunantwort und weniger infizierten Zellen¹⁰³. Ein Zellmodell zeigte unter E2-Einfluss morphologisch aberrante RBs, die in der Genanalyse ein ähnliches Muster aufwiesen wie bei der Induktion dieses Phänotyps durch IFN- γ und daher möglicherweise wieder mit klinischer Persistenz in Verbindung stehen. Hinsichtlich des Stoffwechsels gab es ebenfalls Ähnlichkeiten¹⁰⁴. Auch die Entzündungsreaktion nach Chlamydieninfektion kann durch Estradiol beeinflusst werden. Es wird beschrieben, dass unterschiedliche Estradiolspiegel in *C. trachomatis*-positiven Frauen mit unterschiedlichen Zytokinexpressionsmustern assoziiert sind¹⁰⁵. Bei Frauen mit Fertilitätsproblemen korrelieren hohe β -Estradiol-Spiegel im Serum mit hohen Konzentrationen von IFN- γ und IL-6¹⁰⁶. An diesem Effekt sind möglicherweise Stromazellen des FGT beteiligt, da in einer Co-Kultur von Stromazellen mit Epithelzellen erhöhte Spiegel von IL-6 und IL-8 sowie eine verstärkte Phosphorylierung von ERK durch E2-Behandlung beschrieben werden⁹⁶. Auch die über dendritische Zellen und CD4-positive T-Zellen vermittelte Immunantwort wird im Zellmodell durch E2 signifikant beeinflusst¹⁰⁷. Primäre Zellen der Ektozervix zeigten nach LPS-Behandlung und E2-Stimulation höhere Zytokinspiegel als nach LPS-Behandlung ohne E2-Stimulation¹⁰⁸. Aber

auch unabhängig von der Chlamydieninfektion werden immunologische Vorgänge in Primärzellen durch hormonelle Einflüsse reguliert. In humanen, nicht infizierten FT-Zellen stieg die Expression von IL-8, wenn diese mit E2¹⁰⁹ bzw. mit estradiolhaltiger Follikelflüssigkeit^{110,111} behandelt wurden. Dies konnte ebenfalls in porcinen Primärzellen reproduziert werden¹¹². Es ist beschrieben, dass proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β die Steroidhormonrezeptorbesetzung in vitro modifizieren können, was die Dynamik der Chlamydieninfektion unter dem Einfluss von Hormonen möglicherweise ebenfalls verändert¹¹³.

Es ist bisher nicht viel darüber bekannt, auf welchen Signalwegen die unterschiedlichen Estradiol-vermittelten Effekte zustande kommen. Eine Möglichkeit ist die Aktivierung von Östrogenrezeptoren (ERs), wobei nicht alle verwendeten Zelllinien über ERs verfügen. So exprimieren HeLa-Zellen häufig nicht den gut erforschten ER α , sondern eher ER β ¹¹⁴. Eine andere Möglichkeit sind nicht rezeptorvermittelte Signalwege, wie beispielsweise der Wnt-Signalweg¹¹⁵. Er wird dennoch über E2 und P4 reguliert, beispielsweise im Rahmen des weiblichen Zyklus¹¹⁶. Inhibition von Wnt resultiert in einer Hemmung der produktiven Chlamydieninfektion, zusätzlich konnten aberrante RBs nachgewiesen werden¹¹⁷. Des Weiteren ist Wnt möglicherweise an der chlamydienbedingten Gewebeschädigung beteiligt⁷⁵. Auch die Proteinkinase C (PKC) wird in ER-negativen Zellen durch E2-Stimulation moduliert¹¹⁸ und beeinflusst möglicherweise die Chlamydieninfektion¹¹⁹.

4.5.2 Der Einfluss von Progesteron auf die Chlamydieninfektion

Häufig wird beschrieben, dass Progesteron (P4) gegenteilige Effekte zu Estradiol hat oder dessen Wirkung antagonisiert. So wird die durch E2 bedingte Verstärkung der Infektivität und Produktivität der Chlamydieninfektion im Co-Kultur-Zellmodell durch die Zugabe von P4 aufgehoben¹²⁰. Gleiches gilt für die Adhäsion an endometriale Primärzellen^{83,97}. Auch P4 alleine führt verglichen mit der E2-Behandlung zu einer Abschwächung der Infektion^{120,121}, jedoch nicht verglichen mit hormonfreien Kulturen¹²⁰.

Mit Progesteron vorbehandelte Zellen zeigen erhöhte Genexpression zahlreicher Immunmediatoren¹²¹. In einer Analyse des Transkriptoms P4-vorbehandelter Chlamydien konnte ebenfalls eine teilweise Antagonisierung von E2-Signalwegen gezeigt werden. Darüber hinaus wird unter P4 der katabole Kohlenhydrat-Stoffwechsel verstärkt, wobei der Grund dafür bislang unklar ist¹⁰⁴.

Im Tiermodell mit Ratten verlief die Infektion stärker, wenn die Ratten mit P4 vorbehandelt wurden¹⁰³. Bei Menschen, die zur Verhütung Depot-Medroxyprogesteronacetat (DMPA) verwendeten, wurde ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Chlamydieninfektionen gefunden^{101,122}. DMPA und Progesteron üben jedoch stark unterschiedliche Wirkungen auf die Transkriptionsprofile genitaler Primärzellen aus, sodass die Wirkung von DMPA nicht mit der von Progesteron gleichzusetzen ist¹²³. Auch gibt es Hinweise, dass DMPA und Progesteron Einfluss auf Immunfunktionen nehmen, sodass ein eventuell erhöhtes Risiko möglicherweise darüber und nicht über die direkte Progesteronwirkung vermittelt wird^{124,125}.

4.6 Eigene Fragestellung

50% - 70% aller *C. trachomatis*-Infektionen im weiblichen Genitaltrakt verlaufen asymptomatisch¹⁰⁴. Klinische Komplikationen sind oft schwerwiegend. Mithilfe der Infektion von Zellmodellen wird daher versucht, Erkenntnisse über den Ablauf der Infektion und die Reaktion der Wirtszelle zu gewinnen.

Die häufig verwendete HeLa-Karzinomzelllinie kann aufgrund genetischer Modifikation Ergebnisse aus diesem Zellmodell beeinflussen. Ein Ziel dieser Arbeit ist daher die Verwendung von primären Zellen aus humanen Eileitern und deren Etablierung und Charakterisierung als Infektionsmodell. Die Vergleichbarkeit mit dem HeLa-Zellmodell wird überprüft, um mögliche Unterschiede der beiden Modelle aufzuzeigen.

Wir nehmen an, dass das Mikromilieu des FGT ebenfalls imstande ist, die Chlamydieninfektion zu beeinflussen. So sind die Sauerstoffkonzentrationen des FGT physiologisch niedriger als in der Raumluft. Die weiblichen Sexualhormone Estradiol und Progesteron wirken zyklisch auf den weiblichen Genitaltrakt ein. Daher untersucht diese Arbeit als zweites Ziel Zellkultur und Infektion in hypoxischer Umgebung sowie unter hormoneller Stimulation im HeLa- und Primärzellmodell.

Für den Vergleich der beiden Infektions-Zellmodelle und die Auswirkungen von Hypoxie und Hormonen werden verschiedene Aspekte der Infektion ausgewertet: Zum einen werden Proliferation und Lebenszyklus der Chlamydien untersucht. Zum anderen werden Wirtsfaktoren wie die Immunantwort über die MAP-Kinase ERK1/2 und für den Infektionsverlauf wichtige Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und IL-8 erforscht. Auch eine mögliche Beeinflussung der metabolischen Aktivität der Wirtszelle soll analysiert werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse können zu einem besseren Verständnis für den Verlauf der *C. trachomatis*-Infektion führen. Möglicherweise bieten sie Ansatzpunkte für die Erforschung unterschiedlicher klinischer Verläufe und könnten somit langfristig das Risiko für TFI oder PID senken.

5 Material

5.1 Geräte

Blotapparatur Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Brutschränke (37 °C, 5% CO ₂)	
Forma Series II 3131	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Typ: BB 6220	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Brutschränke (37 °C, 5% CO ₂ , N ₂ -Regulation, O ₂ -Sensor)	
Forma Series II 3141	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hypoxiekammer THC08 124	Toepffer Lab Systems, Göppingen
Elektrophoresekammer Mini-Protean Tetra	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizblock PCH-2	Grants-Instruments Ltd, Shepreth, GB
Imagingsystem Fusion FX7	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
Kritischer Punkt-Trockner	Plano GmbH, Wetzlar
LightCycler 1.0	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnetrührer	RMO Gerhardt GmbH, Königswinter
Mikroskope	
Axioskop 2, 25, 40	Carl Zeiss Mikrolmaging, Göttingen
Axiovert 25	Carl Zeiss Mikrolmaging, Göttingen
BZ-9000	Keyence, Osaka, Japan
Transmissionselektronenmikroskop JOEL 1011	JOEL Ltd., Tokyo, Japan
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen
Pipettierhilfe accu-jet	Brand GmbH, Wertheim
PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Präzisionswaage KB	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommen
Sicherheitswerkbänke	
EN 12469	Clean Air Technik B.V., Woerden, NL
SterilGard Hood Class IIA/B3	Baker Company, Stanford, ME, USA
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH, Schwalbach
Thermocycler C1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortex Schüttler REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH, Schwalbach
Zentrifugen	

Centrifuge 5417R
 Megafuge 2.0 R
 Multifuge 3 S-R

Eppendorf AG, Hamburg
 Heraeus Instruments GmbH, Hanau
 Heraeus Instruments GmbH, Hanau

5.2 Verbrauchsmaterialien

6-, 24-Wellplatte

Blotpapier

Deckgläser, Ø10 mm

Gelkämme: Mini Protean 3 (1,0 mm)

Glasplatten: Mini Protean 3 (1,0 mm)

LightCycler Kapillaren (20 µl)

Neubauer-Zählkammer

Objekträger (76 x 26 mm)

Pipetten Eppendorf Reference 10, 100, 1000 µl

Pipettenspitzen Biosphere filter tips 10, 100, 1000 µl

Pipettenspitzen, Prot/Elec tips 1-200 µl

Precellys-Keramik-Kit 1,4/2,8 mm

Reaktionsgefäße (0,5/1,5 ml)

Falcon Röhrchen (12, 15, 50 ml)

Skalpell: Feather Disposable Scalpel No.11

Skalpell: Feather Disposable Scalpel No.21

Transferpipetten (5, 10, 25 ml)

Zellkulturflaschen Cellstar Filter Top (175 cm²)

Zellkulturschalen (d = 10 cm)

Zellschaber

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Schleicher & Schuell, Dassel

Menzel-Gläser, Braunschweig

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Hassa Laborbedarf, Lübeck

Menzel-Gläser, Braunschweig

Eppendorf AG, Hamburg

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan

Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

TPP Techno Plastic Products AG,
 Trasadingen, Schweiz

5.3 Chemikalien und Reagenzien

1,4-Dithiothreitol (DTT)

Acrylamid-Bis (40%) Lösung, 19:1

Ammoniumpersulfat (APS)

Araldit

Azur II

Bambanker-Kryokonservierungsmittel

Bromphenolblau

BSA (Bovines Serum Albumin)

Calciumchlorid (CaCl₂)

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Wako Chemicals GmbH, Neuss

Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Merck KGaA, Darmstadt

Cycloheximid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylarsinsäure-Natriumsalz	Merck KGaA, Darmstadt
β -Estradiol BioReagent powder	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Ethanol, absolut	Merck KGaA, Darmstadt
FKS (Fetales Kälberserum)	GE Healthcare, Fairfield, CT, USA
Glutaraldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
HRP-Substrat Super Signal West Femto	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Immunfluoreszenz-Antikörper	
Anti-Chlamydien-LPS, Maus polyklonal, Verdünnung 1:50	Prof. H. Brade, FZ Borstel
Anti-Kaninchen IgG, FITC konjugiert, Ziege polyklonal, Verdünnung 1:100	Invitrogen, Darmstadt
Anti-Maus IgG, FITC konjugiert, Kaninchen polyklonal, Verdünnung 1:250	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
Kontrastierlösung	Laurylab, Saint-Fonds Cedex, Frankreich
Leitkleber EM (Kohlenstoff-Zement)	Plano GmbH, Wetzlar
L-Glutamin (10 mg/ ml)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methylenblau	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
di-Natriumtetraborat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd 10%	Merck KGaA, Darmstadt
PCR Nukleotid Mix (dNTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Ipswich, USA
Progesterone BioReagent powder	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Propylenoxid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Trockenmilchpulver	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Trypsin/ EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Tween-20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Western Blot-Antikörper	
Anti-human- β -Aktin, Kaninchen, polyklonal, Verdünnung 1:2000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-human-pERK1/2, Kaninchen, polyklonal, Verdünnung 1:1000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-Kaninchen IgG, HRP konjugiert, Ziege, polyklonal, Verdünnung 1:4000	Cell Signaling Technology, USA

5.4 Medien, Puffer und Lösungen

Die verwendeten Medien und Medienzusätze stammen, sofern nicht anders angegeben, von der Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe.

Blockpuffer (5%)	5 g Trockenmilchpulver, 100 ml T-TBS-Puffer
Blotpuffer	3 g Tris, 14,4 g Glycin, 200 ml Methanol, ad 1 l destilliertes Wasser
Cycloheximid (Stammlösung)	1 g Cycloheximid, ad 1 ml destilliertes Wasser
Dauerkulturmedium	DMEM mit Glucose (4,5 g/ l) und L-Glutamin, 10% FKS, 20 μ g/ ml Gentamycin, 33,2 mM HEPES-Puffer
Elektrophoresepuffer (5x)	15 g Tris, 72 g Glycin, 5 g SDS, ad 1 l destilliertes Wasser, pH 8,3
Infektionsmedium	RPMI 1640 ohne L-Glutamin, 5% FKS, 0,1 mg/ ml L-Glutamin, 1x NEAA
Isolationsmedium	MEM, 1,4 mg/ ml Pronase, 0,1 mg/ ml DNase Lysispuffer 3,94 g Tris-HCL, 40 ml Glycerol, 8 g SDS, 20 ml DTT (1 M), Bromphenolblau, ad 200 ml destilliertes Wasser, pH 7,2

Monti's Fixanz	156 ml Natrium-Kacodylat-Puffer 0,1 M, 25 ml Glutaraldehyd 25%, 19 ml Paraformaldehyd 10%, 3 ml CaCl ₂ -Lösung 3%, ad 312 ml destilliertes Wasser, pH 3,75
Natrium-Kacodylat-Puffer (0,2 M)	42,80 g Dimethylarsinsäure-Natriumsalz, 68,46 g Saccharose, ad 1 l destilliertes Wasser
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na ₂ HPO ₄ 12×H ₂ O, 2 g KH ₂ PO ₄ , ad 1 l destilliertes Wasser, pH 7,2
Sammelgel (4%)	3,2 ml H ₂ O, 1,25 ml Sammelgelpuffer, 0,5 ml Acrylamid, 50 µl 10% SDS-Lösung, 5 µl TEMED, 25 µl 10% APS-Lösung
Sammelgelpuffer	30 g Tris, ad 500 ml destilliertes Wasser, pH 6,8
TBS-Puffer (10 ×)	24,2 g Tris, 80 g NaCl, ad 1 l destilliertes Wasser, pH 7,6
Trenngel (10%)	2,45 ml H ₂ O, 1,25 ml Trenngelpuffer, 1,25 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 50 µl 10% SDS-Lösung, 2,5 µl TEMED, 10% APS-Lösung
Trenngelpuffer	90,5 g Tris, ad 500 ml destilliertes Wasser, pH 8,8
T-TBS-Puffer	100 ml TBS (10×), 1 ml Tween-20, ad 1 l destilliertes Wasser
USG-Zellkulturmedium	50:50 DMEM/HAM's F12, 1% Penicillin/Streptomycin, 2% Ultrosor G (Pall Corporation, NY, USA)

5.5 Zelllinien

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Dauerkulturzelllinien

Name	Ursprung	Nummer	Vertrieb
HEp-2	Epidermoides Larynx-karzinom	CCL-23	ATCC, Manassas, USA
HeLa-229	Epitheloides Cervix-karzinom	ACC 57	DSMZ, Braunschweig

5.6 Enzyme und Kits

DNase	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
IMAGEN Chlamydia Kit	Oxford, Cambridgeshire, Großbritannien
Mykoplasmen-Test, Venor GeM	Minerva Biolab, Berlin

NucleoSpin RNA II	Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Primer für die cDNA Synthese (Random Hexamer Primer p(dN))	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Primer für die quantitative RT-PCR	TIB MOLBIO, Berlin
Pronase	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Reverse Transkriptase, RevertAid Premium	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase-Inhibitor, RiboLock	Fermentas, St. Leon-Rot
Sensi Mix Capillary Kit	Bioline GmbH, Luckenwalde

Tab. 2: Primersequenzen für die quantitative RT-PCR

Primerpaar	Spezies	Sequenz 5` > 3`
18S rRNA	Human	Forward TCAAGAACGAAAGTCGGAGG Reverse GGACATCTAAGGGCATCACA
IL-1 β	Human	Forward TCCCAGCCCTTTTGTGTA Reverse TTAGAACCAAATGTGGCCGTG
IL-6	Human	Forward CCTCCAAAGATGGCTGAAA Reverse CAGGGGTGGTTATTGCATCT
IL-8	Human	Forward CCAGGAAGAAACCACCGGA Reverse GAAATCAGGAAGGCTGCCAAG

Die Verdünnung erfolgte nach Herstellerangaben mit RNase-freiem Wasser in eine Arbeitskonzentration von 20 μ M.

5.7 Software

AxioVision Rel. 4.5	Carl Zeiss Mikrolmaging, Göttingen
Bio1D	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
BZ Analyzer Software	Keyence, Osaka, Japan
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Image J	National Institutes of Health, USA
LightCycler Data Analysis	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Microsoft Office 2007	Microsoft Cooperation, Redmond, USA

6 Methoden

6.1 Zellkultur der Karzinomzelllinien (HeLa/HEp-2)

6.1.1 Zellkultur von Dauerkulturzellen

Bei den verwendeten Dauerkulturzellen handelt es sich um adhärente epitheliale Karzinomzelllinien. Für die Kultivierung wurden 175 mm²-Zellkulturflaschen mit je 25 ml Dauerkulturmedium verwendet, die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂. Alle 3 - 4 Tage wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (1x) von der Zellkulturflasche gelöst und im Verhältnis 1:8 bis 1:10 in 25 ml Dauerkulturmedium auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Mykoplasmen-Kontamination auszuschließen, wurde bei jeder Teilung ein Aliquot der zu teilenden Zellen entnommen und mithilfe des Venor GeM Mycoplasmen-Kits auf Mykoplasmen getestet.

6.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Suspension wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Hierfür wurden 90 µl Trypanblau mit 10 µl der Zellsuspension vermischt und 10 µl der 1:10 verdünnten Zellen in eine 0,1 mm tiefe Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die lebenden (weißen) Zellen wurden in jedem Großquadrat ausgezählt und die Zellzahl pro ml mithilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \cdot \text{Volumen} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}}$$

6.1.3 Konservierung und Auftauen von Dauerkulturzelllinien

Die Zellen einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche wurden mit Trypsin/ EDTA (1x) von der Zellkulturflasche gelöst, in 8 ml Dauerkulturmedium aufgenommen und bei 700 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml Bambanker-Kryokonservierungsmittel aufgenommen und bei -80 °C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Anzucht von eingefrorenen Zellen wurden diese aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt. Direkt nach dem Auftauen wurden die Zellen mit 10 ml Dauerkulturmedium versetzt und für 5 min bei 700 x g zentrifugiert, bevor das Pellet in 25 ml Dauerkulturmedium aufgenommen wurde und die

Zellen über Nacht in einem Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ adhärirten. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit Dauerkulturmedium.

6.2 Gewinnung und Zellkultur primärer epithelialer Eileiterzellen (FT-Zellen)

6.2.1 Tubenpräparation und Isolation primärer epithelialer Eileiterzellen

Humane Eileiter wurden nach der Sektion in mit 50 ml gekühltem Infektionsmedium gefüllte Falconröhrchen gegeben. Direkt im Anschluss erfolgte die Präparation. Um ein Austrocknen des Präparates zu vermeiden, wurden die vollständigen Eileiter in eine Petrischale (Durchmesser d = 10 cm) mit 25 ml Infektionsmedium gegeben. Das den Eileiter umgebende Bindegewebe sowie alle durch die Sektion kauterisierten Bereiche wurden vorsichtig entfernt und verworfen. Die Eileiter wurden longitudinal eröffnet und in kleine Stücke mit einer Kantenlänge von ca. 0,5 x 0,5 cm geschnitten. Diese wurden zur Isolation der epithelialen Zellen in 6 Well-Platten mit je 5 ml Isolationsmedium überführt. Bei Erhalt von zwei Eileitern derselben Patientin wurden diese aufgrund der Annahme identischer Umgebungsbedingungen wie ein Eileiter behandelt und die präparierten Stücke gemeinsam inkubiert und isoliert.

Die Inkubation im Isolationsmedium erfolgte über 36-48 h bei 4 °C auf einem Schüttler. Anschließend wurde der Inhalt der 6 Well-Platte in ein Falconröhrchen überführt, mit 5 ml FKS ergänzt, mit Isolationsmedium auf 50 ml aufgefüllt und vorsichtig geschwenkt. Nach Absinken der größeren Gewebestücke wurde das Medium auf zwei 50 ml-Falconröhrchen aufgeteilt und für 10 min bei 700 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium dekantiert und das Zellpellet mit 50 ml USG-Zellkulturmedium gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 25-50 ml Medium aufgenommen und auf sterile Zellkulturflaschen verteilt. Es erfolgte eine Inkubation über 3 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂, um die in der Suspension enthaltenen Fibroblasten an der Zellkulturflasche adhäririeren zu lassen und somit von den epithelialen Eileiterzellen zu trennen. Diese verblieben im Medium, welches abgenommen und mit frischem USG-Zellkulturmedium aufgefüllt wurde. Anschließend wurde das Medium in 175 mm²-Zellkulturflaschen aufgeteilt. Diese wurden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Erstmals nach 24 h und dann alle 48 h wurde das Medium gegen 25 ml frisches USG-Zellkulturmedium ausgetauscht.

6.2.2 Kultur und Wachstum primärer epithelialer Eileiterzellen

Aufgrund der im Vergleich zu Karzinomzelllinien verringerten und je nach Eileiter stark variierenden Proliferationsrate konnte kein fester Zeitpunkt für die Überführung der Zellen auf 6 Well-Platten bestimmt werden. Üblicherweise erfolgte diese, sobald eine Proliferation der fimbrientragenden Epithelzellen und ein sich bildender Zellrasen lichtmikroskopisch nachgewiesen werden konnten (i.d.R. binnen 1-2 Tagen, bei zu geringer Proliferation wurden die Zellen aufgrund der Gefahr der Entdifferenzierung verworfen). Die Eileiterzellen wurden dann mit Trypsin/EDTA (1x) von der Zellkulturflasche gelöst, analog zu HeLa-Zellen mithilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und für die Infektionsexperimente in 6 Well-Platten ausgesät. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte je nach Versuchsaufbau die eventuelle Zugabe von Sexualhormonen in die Wells.

Verwendet wurden ausschließlich anatomisch unauffällige Eileiter von prämenopausalen Frauen. Patientinnen mit akuter Chlamydieninfektion oder aktiver Krebserkrankung zum Zeitpunkt der Eileiterentnahme wurden ausgeschlossen. Insgesamt wurden Eileiter von 41 Patientinnen präpariert. Die Qualität des biologischen Materials variierte jedoch stark, sodass eine erfolgreiche Zellkultur mit anschließender Auswertung nur in 18 Fällen gelang. Problematisch waren häufig eine zu geringe Proliferationsrate oder eine Verkeimung der Kulturen mit bakterieller Überwucherung und Absterben der Zellen.

6.3 Infektionsbiologische Methoden

6.3.1 Herstellung eines *C. trachomatis* Serovar D-Infektionsstocks

Zur Herstellung eines neuen Infektionsstocks wurden aufgereinigte und eingefrorene Chlamydien-Aliquots aus bereits vorhandenen Infektionsstocks verwendet. Zu Beginn wurden 10 mit HEp-2 Zellen konfluent bewachsene 6-Well-Zellkulturplatten mit 4 IFUs/Zelle von *C. trachomatis* in SPG-Puffer infiziert. Die Platten wurden eine Stunde bei 30 °C und 700 x g zentrifugiert und anschließend bei 37 °C und 5% CO₂ bebrütet. Nach 72 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst und je 25 ml der Zellsuspension in ein 50 ml Gefäß mit 5 ml sterilen Glaskügelchen überführt. Anschließend wurden die Zellen auf einem Rüttler durch den mechanischen Stress lysiert, wodurch die Chlamydien in das Medium freigesetzt wurden. Bei erneuter Zentrifugation (5 min, 200 x g, 4 °C) setzte sich ein Pellet mit den Zellresten am Boden ab,

der chlamydienhaltige Überstand wurde entnommen, je 40 ml davon auf 50 ml-Gefäße aufgeteilt und für 99 min bei 15.500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml SPG Puffer homogenisiert, zu je 20 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Die biologische Aktivität wurde in einem Infektionsversuch mit HEp-2-Zellen überprüft und die Anzahl an IFUs/ml bestimmt.

6.3.2 Infektion von Karzinomzelllinien

Am Vortag der Infektion wurden HeLa-Zellen mit einer Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ je 6-Well in Infektionsmedium ausgesät und bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator bebrütet. Nach 24 Stunden erfolgte bei einer angestrebten Konfluenz der Zellen von >70% die Infektion. Hierzu wurde ein 20 µl *C. trachomatis* Serovar D-Aliquot aus dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und im Verhältnis 1:50 mit Infektionsmedium versehen, gut gemischt und $9,6 \times 10^5$ IFUs/ml in das Infektionsmedium in den 6 Well-Platten gegeben. Nach einer einstündigen Zentrifugation bei 700 x g und 30 °C folgte die Bebrütung bei 37 °C und 5% CO₂ im normoxischen oder hypoxischen Inkubator.

6.3.3 Infektion von humanen primären epithelialen Eileiterzellen

Die isolierten epithelialen Eileiterzellen (Abschnitt 6.2.2) wurden bei lichtmikroskopischem Nachweis von proliferierenden Zellen mit Trypsin/EDTA (1x) von der Zellkulturflasche abgelöst, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und mit einer Zellzahl von $1,75 \times 10^5$ Zellen in 6 Well-Platten ausgesät. Die Anzahl und somit der Umfang des Versuchsaufbaus war stets von der Menge gezählter, lebendiger Zellen abhängig, die von Eileiter zu Eileiter variierte. Die Bebrütung der uninfizierten Zellen erfolgte bei 37 °C, 5% CO₂, je nach Versuchsaufbau unter Zugabe von Sexualhormonen. 24 Stunden vor Infektion wurden die Zellen gewaschen und das Medium erneuert. Dies geschah, sobald der Zellrasen größere konfluente Areale aufwies (i.d.R. nach 24 h - 48 h). Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen je nach Versuchsaufbau in den normoxischen oder hypoxischen (2% O₂) Inkubator gegeben. Zur Infektion wurde ein 20 µl *C. trachomatis* Serovar D-Aliquot aus dem -80 °C Gefrierschrank entnommen, im Verhältnis 1:50 mit Infektionsmedium versehen und gut gemischt. Es wurden $3,24 \times 10^7$ IFUs/ml in das Well pipettiert. Anschließend folgte eine Stunde Zentrifugation bei 700 x g und 30 °C, gefolgt von der Bebrütung im normoxischen oder hypoxischen Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂. Die Dauer variierte je nach Experiment (24 oder 48 h).

6.3.4 Zellkultur und Infektion unter Zugabe von Sexualhormonen

Die Herstellung der Lösung aus den pulverförmigen Hormonen erfolgte gemäß der Angaben des Herstellers mit reinem Ethanol. Die Verdünnung auf die gewünschte Konzentration erfolgte schrittweise. Hormonhaltiges Medium enthielt entweder 400 pg/ml Estradiol oder 25 ng/ml Progesteron.

Um der physiologischen Situation möglichst nahe zu kommen, wurden die Sexualhormone stets ab dem Zeitpunkt der Zellaussaat in die zur Infektion bestimmten 6 Well-Platten hinzugegeben. Bei den HeLa-Zellen erfolgte ab diesem Zeitpunkt kein Mediumwechsel mehr. Bei den humanen Eileiterzellen wurde das Medium je nach Wachstumsgeschwindigkeit des Zellrasens durch frisches hormonhaltiges Medium ersetzt (bei langsam wachsenden Zellen vor der Infektion alle 48 h, um eine Minderversorgung mit Nährstoffen zu vermeiden; jedoch stets 24 h vor Infektion und nicht mehr nach erfolgter Infektion, um eine Beeinflussung zu vermeiden).

6.3.5 Bestimmung infektiöser *C. trachomatis* mithilfe der Reinfektionsraten

Um den Einfluss verschiedener Bedingungen auf die Entwicklung und Infektiosität der Chlamydien zu vergleichen, wurden Chlamydien aus dem Experiment erneut kultiviert und die Anzahl der Einschlüsse der Reinfektionen mittels Immunfluoreszenz ausgewertet. Dazu wurden die in den Versuchen verwendeten und infizierten Zellkulturen sorgfältig abgeschabt und innerhalb der Wells mit dem Medium resuspendiert. 2 ml aus jedem Well wurden zusammen mit 1 ml Glaskügelchen für 5 min auf einem mechanischen Rüttler bei 1300 rpm geschüttelt, um die Zellen möglichst gründlich zu lysieren und die Chlamydien aus den Einschlüssen zu extrahieren. 250 µl aus dem chlamydienhaltigen Medium wurden in ein Well einer vorbereiteten konfluent mit HEp-2 Zellen bewachsenen 24-Well-Zellkulturplatte überführt und gut gemischt. Jedes Well wurde zuvor mit 10 µl 0,1 mM Cycloheximid versetzt. Aus dem ersten Well wurden 250 µl entnommen und in das folgende Well pipettiert und gemischt. Auf diese Weise wurde eine 1:5-Verdünnungsreihe mit mindestens sechs unterschiedlichen Konzentrationen erstellt. Anschließend wurde die Zellkulturplatte 1 h bei 700 x g und 30 °C zentrifugiert, für 48 h in einem Inkubator mit 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, das Medium verworfen und die Zellen mit je 1 ml Methanol fixiert. Die Zellkulturplatte wurde bis zur indirekten Immunfluoreszenzfärbung (Abschnitt 6.4.2) bei -20 °C aufbewahrt.

6.4 Analyse mittels Färbungen und Auszählung

6.4.1 Direkter Immunfluoreszenztest von Chlamydien und Bestimmung der Infektionsrate

Um phänotypische Eigenschaften von Chlamydien und Zellen sowie die Infektionsrate zu analysieren, wurde eine direkte Färbung von mit infizierten Zellen bewachsenen Deckgläsern durchgeführt. Es wurde der direkte Immunfluoreszenztest auf Chlamydien-LPS der Firma IMAGEN verwendet. Hierfür wurden die Deckgläser aus der Zellkulturplatte zum entsprechenden Zeitpunkt nach der Infektion entnommen und bis zur Analyse bei -20 °C in Methanol fixiert. Vor der Färbung wurde das Methanol entfernt, die Deckgläser bei 56 °C für 5 min getrocknet und mit 8 µl der 1:1 mit PBS verdünnten Antikörperlösung überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37 °C wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gespült, mit Mounting Fluid bedeckt und mit der bewachsenen Oberfläche auf einem Objektträger fixiert.

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop. Es wurde stets ein Bildausschnitt gewählt, der eine möglichst konfluente Fläche gesund imponierender Zellen erhielt. Diese wurden vollständig gezählt. Anschließend wurden im selben Bildausschnitt Zellen mit chlamydialen Einschlüssen gezählt, sodass mithilfe folgender Formel die Infektionsrate in % bestimmt werden konnte:

$$\text{Infektionsrate [\%]} = \frac{\text{Anzahl einschlusshaltiger Zellen im Bild}}{\text{Anzahl aller Zellen im Bild}} * 100$$

Pro Deckglas wurden 3 solcher Bilder ausgezählt, um einen repräsentativeren Gesamteindruck der Infektionsbedingungen zu erhalten. Die Auszählung erfolgte unverblindet.

6.4.2 Indirekter Immunfluoreszenztest und Quantifizierung infektiöser Chlamydien

Das Methanol wurde von den zu färbenden 24 Well-Platten entfernt, diese wurden zweimal mit PBS gespült. Anschließend wurden 300 µl der primären Antikörperlösung gegen Chlamydien-LPS in jedes Well gegeben und 45 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Der primäre Antikörper wurde entfernt und die Wells erneut zweimal gespült, bevor 300 µl der sekundären Antikörperlösung zugegeben wurden. Nach der weiteren Inkubation wurden die Wells erneut zweimal gewaschen, mit 300 µl PBS überschichtet

und bis zur mikroskopischen Auswertung im Dunkeln und mit Alufolie umwickelt bei 4 °C gelagert.

Für die Auszählung wurde ein Fluoreszenzmikroskop verwendet. Hierzu wurde aus der Verdünnungsreihe ein Well mit einer zählbaren Menge an Einschlüssen (optimalerweise zwischen 10 und 50) gewählt und bei 20-facher Vergrößerung die Einschlüsse pro Gesichtsfeld (0,557 mm²) gezählt. Mithilfe der bekannten eingesetzten Menge an chlamydienhaltiger Suspension sowie der Fläche eines Wells einer 24-Wellplatte (200 mm²) konnte die Anzahl der inclusion forming units (IFUs)/μl nach folgender Formel berechnet werden:

$$IFUs/\mu l = \frac{\text{gezählte Einschlüsse} * 200 \text{ mm}^2}{\text{gezählte Gesichtsfelder} * \text{eingesetzte } \mu l * 0,557 \text{ mm}^2}$$

Da die absoluten Zahlen zwischen den Wiederholungen eines Experiments häufig stark variierten, für die Auswertung jedoch vorwiegend die Unterschiede zwischen den einzelnen Konditionen innerhalb einer Wiederholung relevant waren, wurden die IFUs nicht in der absoluten Zahl, sondern als Prozentangaben der unstimulierten normoxischen Kontrolle (= 100%) angegeben. Die Prozentzahlen der einzelnen Wiederholungen wurden in der Statistik miteinander verglichen und sind in den Graphen der Ergebnisse abgebildet.

6.5 Proteinbiochemische Auswertung mittels Western Blot

6.5.1 Probengewinnung für die Western Blot-Analyse

Von den zu analysierenden Zellkulturen wurde das Medium entfernt. Anschließend wurden 250 μg Western Blot-Lysisbuffer in die Wells gegeben und durch vorsichtiges Abschaben und Auf- und Abpipettieren mit den Zellen homogenisiert. Die dadurch entstandene Suspension wurde bis zur Auswertung in einem Eppendorf-Gefäß bei -20 °C eingefroren.

6.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Blotverfahren

Um die Proteine nach ihrer molekularen Masse aufzutrennen, wurde eine SDS-Gelelektrophorese verwendet. Hierzu wurden ein 10%-iges Trenn- und ein 4%-iges Sammelgel gegossen und in eine vertikale Gelelektrophoresekammer eingespannt, welche mit 1 x Elektrophoresebuffer aufgefüllt wurde. Währenddessen wurden die bei

-20 °C eingefrorenen Proben 5 Minuten lang bei 95 °C denaturiert. Je 20 µl der Proben sowie 7,5 µl Molekulargewichtsmarker wurden in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Bei einer Spannung von 70 V für 15 Minuten und 200 V für 55 Minuten erfolgte die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse innerhalb des Trenngels.

Eine Nitrozellulosemembran wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und in Blotpuffer eingelegt (Nass-Blot-Verfahren). Zur Proteinübertragung wurden Gel und Membran zusammen in eine vertikale Blotkammer eingespannt, diese mit gekühltem Blotpuffer gefüllt und unter dauerhafter Kühlung eine Spannung von 75 V angelegt. Nach 1,5 Stunden wurde die Membran entnommen und für 1 Stunde in einer 5%-igen Trockenmilchlösung sanft auf einem Schüttler bewegt, um unspezifische Proteinbindung zu blockieren. Anschließend wurde der Primärantikörper bei 4 °C über Nacht zusammen mit der Membran inkubiert. Vor Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran je zweimalig mit T-TBS abgespült und für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen. Der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde anschließend bei Raumtemperatur für 1 Stunde zur Membran gegeben, danach wurden die Waschschriffe wiederholt. Mithilfe eines Luminol-haltigen Substrats konnten die Proteine über das Fusion FX7-System detektiert werden. Die densitometrische Quantifizierung der Signalintensität erfolgte mithilfe der Bio1D-Software. Die Proteinmenge wurde auf das Signal von β -Aktin als konstitutiv exprimiertem Haushaltsgen der Zellen der jeweiligen Probe normalisiert.

6.6 Molekularbiologische Analysemethoden

6.6.1 RNA-Isolation und reverse Transkription

Zur Isolation der RNA aus den Zellkulturen wurde das Nucleo Spin RNA II Kit der Firma Macherey Nagel GmbH nach Angaben des Herstellers verwendet. Die isolierte RNA wurde entweder bei -80 °C eingefroren oder im Anschluss direkt in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurden die reverse Transkriptase der Firma Fermentas sowie ein Thermo Light Cycler der Firma BioRad Laboratories verwendet. Die cDNA wurde bis zur Analyse bei -80 °C in Eppendorf-Gefäßen aufbewahrt.

6.6.2 RT-PCR

Zur Auswertung der Geninduktion wurde die quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR) eingesetzt. Hierzu wurden Glaskapillaren der Firma Roche und das SYBR Green Kit SensiMix der Firma Biorline verwendet. Die spezifischen Primersequenzen befinden sich im Abschnitt 5.6. Zur Auswertung der Daten wurde die LightCycler Data Analyzer Software verwendet. Das Ergebnis der stimulierten Probe wird jeweils als „fold change“ bzw. „x-fache Änderung“ gegenüber der unstimulierten Kontrolle dargestellt. Dies berechnet sich folgendermaßen:

$fold\ change = 2^{-(x-y)}$. x entspricht hierbei der stimulierten, y der unstimulierten Probe. Die Auswertung und Angabe der Ergebnisse erfolgt stets normalisiert gegen das Referenzgen 18s-rRNA.

6.7 Auswertung und statistische Datenanalyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism 5.0 Software. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (Mean \pm SD, standard deviation). Wenn nicht anders angegeben, beträgt n = 3. Es wurden stets echte Wiederholungsexperimente (biologische Replikate) durchgeführt, sodass jedes n einer Patientin entspricht. Messwiederholungen wurden nicht durchgeführt.

Aufgrund der geringen Fallzahlen konnten keine Varianzhomogenität und keine Gauß'sche Verteilung nachgewiesen werden, weshalb in der gesamten Arbeit nichtparametrische Verfahren verwendet wurden. Wurden zwei Faktoren analysiert, wurde der Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt, bei mehrfaktoriellen Analysen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Bei diesen wurde im Falle signifikanter Ergebnisse als post-hoc-Test der Dunn's Test verwendet. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ festgelegt, p-Werte von $\leq 0,05$ gelten somit als statistisch signifikant.

7 Ergebnisse

7.1 Ablauf der Chlamydieninfektion in HeLa- und FT-Zellen im Vergleich

Die Infektion von HeLa-Zellen ist ein gut erforschtes Modell für Infektionen mit dem Bakterium *Chlamydia trachomatis*. Um die Nachteile einer Karzinomzelllinie zu vermeiden, untersuchten wir die Infektion von humanen primären Epithelzellen aus menschlichen Eileitern (FT-Zellen). Diese beiden Infektionsmodelle werden nun in mehreren Punkten hinsichtlich des Ablaufes der Chlamydieninfektion und der dadurch entstehenden intrazellulären Prozesse miteinander verglichen.

7.1.1 Zellkultur und Chlamydieninfektion unter Normoxie und Hypoxie

Um das Wachstum und den Einfluss von unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen auf die beiden Zellmodelle und auf die Infektion zu untersuchen, wurden HeLa- und FT-Zellen jeweils entweder bei 20% O₂ (Normoxie) oder 2% O₂ (Hypoxie) kultiviert. Hierunter erfolgte die Infektion mit humanpathogenen *C. trachomatis*. 24 Stunden nach Infektion (post infection/p.i.) wurde die prozentuale Infektionsrate mittels einer Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Bei Infektionsexperimenten mit *C. trachomatis* wird eine Infektionsrate zwischen 20% und 40% angestrebt.

Die durchschnittlich erreichte Infektionsrate in HeLa-Zellen lag unter Normoxie bei 33,9% und unter Hypoxie bei 35,6% (**Abb. 7.1 A**). In FT-Zellen war eine deutlich höhere Menge an IFUs notwendig, um ähnliche Infektionsraten zu erzielen. Diese lagen bei 22,5% unter Normoxie und 24% unter Hypoxie (**Abb. 7.1 B**). Die veränderte Infektionsdosis für Primärzellen ($3,24 \times 10^7$ IFUs/ml in FT-Zellen, $9,6 \times 10^5$ IFUs/ml in HeLa-Zellen) wurde zuvor in einer separaten Versuchsreihe bestimmt (Daten hier nicht gezeigt). Zwischen Normoxie und Hypoxie zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Infektionsrate.

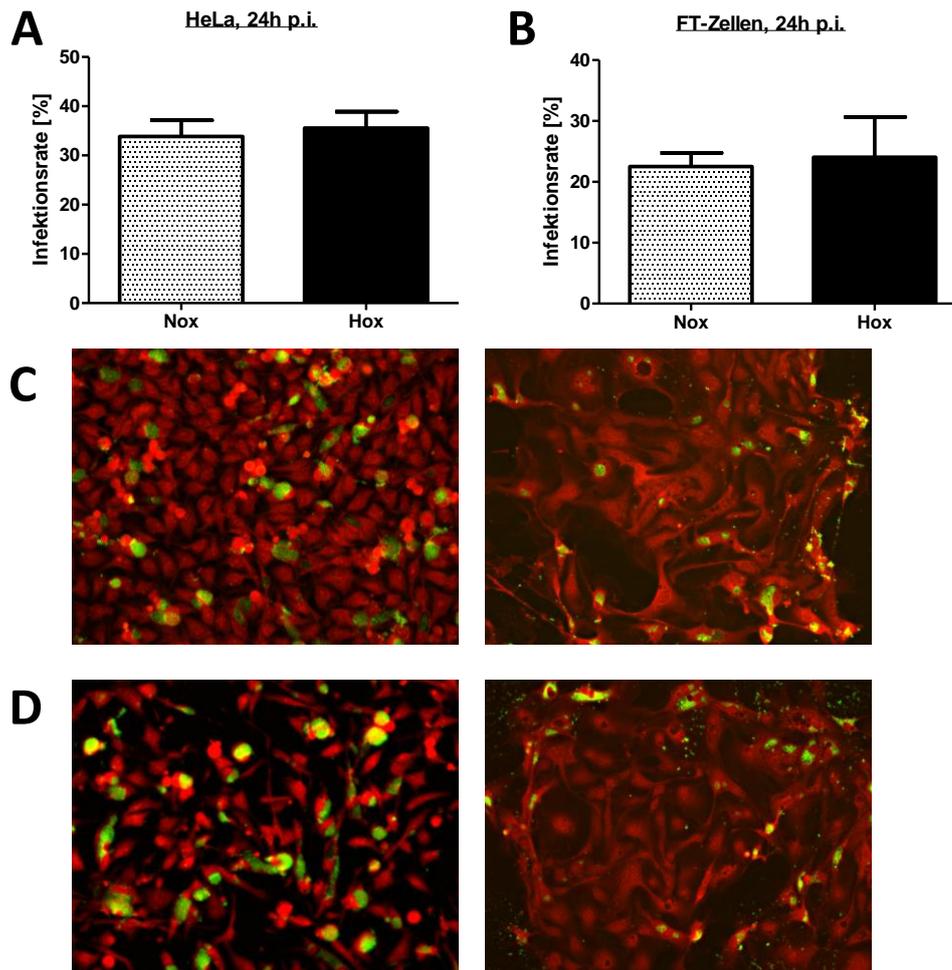


Abb. 7.1: Infektionsraten in HeLa und FT unter Normoxie und Hypoxie

Quantitative Auswertung der Infektionsraten von Chlamydien unter Normoxie und Hypoxie im HeLa- (A) und im FT-Zellmodell (B). Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen (linke Seite) und FT-Zellen (rechte Seite) 24 h p.i. unter Normoxie (C) und Hypoxie (D). rot: Zellen, grün: chlamydiale Einschlüsse. Mean \pm SD, n = 5 (HeLa), n = 3 (FT-Zellen)

Als weiteres Ergebnis fällt die unterschiedliche Morphologie der beiden Zelltypen auf (Abb. 7.1 C, D). HeLa-Zellen zeigen unter Normoxie einen homogenen Zellrasen mit kugeligem Phänotyp der Zellen, unter Hypoxie jedoch ein erschwertes Wachstum mit Lücken im Zellrasen und lang gezogenen Zellausläufern. Eileiterzellen hingegen erscheinen größer und schwerer voneinander abgrenzbar. Lichtmikroskopisch ließen sich vereinzelt vitale fimbrienträgende Zellen mit Bewegung der Fimbrien erkennen.

Unterschiede in Wachstum und Zellkultur fanden sich jedoch nicht nur verglichen mit HeLa-Zellen, sondern auch zwischen unterschiedlichen Tuben. Ein Beispiel hierfür war die stark unterschiedliche Proliferation, die dazu führte, dass einzelne Eileiter aufgrund zu

geringer Zellzahl oder Vitalität nicht verwendet werden konnten. In einigen Fällen zeigte sich eine bakterielle Besiedlung, die eine Überwucherung der Zellkultur nach sich zog. Auch im Ausbreitungsmuster der Zellen scheint es Unterschiede zu geben, sodass sich insgesamt bereits rein optisch eine biologische Variabilität der Eileiter verschiedener Patientinnen konstatieren lässt (**Abb. 7.2**).

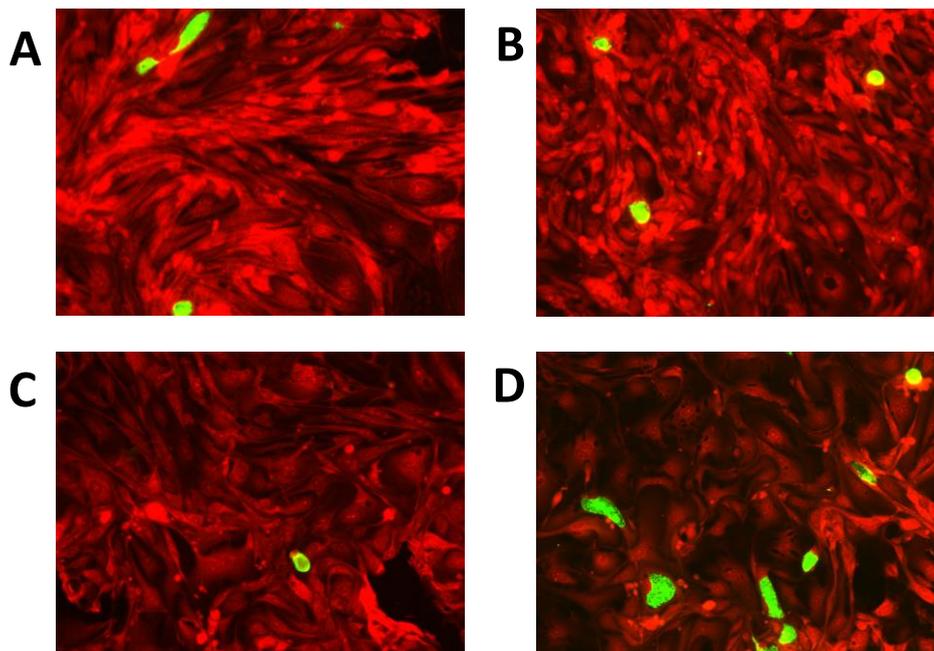


Abb. 7.2: Unterschiede in Morphologie und Wachstum humaner Eileiterzellen
Immunfluoreszenzfärbung von primären FT-Zellen von zwei unterschiedlichen Patientinnen (**A + B** sowie **C + D**) unter Normoxie (**A, C**) und Hypoxie (**B, D**). 24 h p.i., Bildausschnitte exemplarisch gewählt, rot: Zellen, grün: chlamydiale Einschlüsse.

Zusätzlich zur Anzahl infizierter Zellen können noch mehr Informationen über den Ablauf der Chlamydieninfektion gewonnen werden. Wir untersuchten den Entwicklungsstatus der Chlamydien innerhalb der Zellen. Dazu dient die Bestimmung der Reinfektionsraten, bei denen die Einschlüsse in den Zellen mechanisch eröffnet und die freigesetzten Chlamydien benutzt werden, um erneut Zellen zu infizieren. Aus der daraus resultierenden Infektionsrate können Schlüsse gezogen werden, ob die Chlamydien in den primären Einschlüssen vorwiegend als weniger infektiöse, metabolisch aktive Retikularkörper oder eher als infektiösere Elementarkörper vorliegen. Ergänzend wurden elektronenmikroskopische Bilder angefertigt, die ebenfalls Aufschluss über den Entwicklungsstand der Chlamydien geben.

Die Reinfektionsraten von Einschlüssen aus hypoxischen Bedingungen sind 24 h p.i. in HeLa-Zellen signifikant geringer als die aus normoxischen Bedingungen. In FT-Zellen zeigt sich dies nach 24 h ebenfalls als Tendenz. Bekräftigt werden kann dies mithilfe von elektronenmikroskopischen Bildern von HeLa-Zellen, die 24 und 48 Stunden p.i. angefertigt wurden. Unter Normoxie dominieren 24 h p.i. die kleineren EBs (**Abb. 7.3 A**), wohingegen unter Hypoxie mehr von den größeren RBs vorliegen (**Abb. 7.3 B**). In zusätzlich angefertigten Bildern nach 48 Stunden scheint sich der Zustand angeglichen zu haben. Nun dominieren unabhängig von den Sauerstoffbedingungen EBs in den Einschlüssen (**Abb. 7.3 C, D**). Dies wird von den ausgezählten Reinfektionsraten bestätigt. Wenn die Reinfektionsraten aus der Hypoxie in Prozent von den Reinfektionsraten aus der Normoxie (= 100%) angegeben werden, steigen diese von 23,9% 24 h p.i. auf 94,2% 48 h p.i. an (**Abb. 7.3 E**). Die normoxischen und hypoxischen Proben sind nach 48 h also ähnlich infektiös.

In menschlichen Eileiterzellen zeigen sich ähnliche Ergebnisse. Angegeben in % der normoxischen Reinfektionsraten sind 24 h p.i. nur 29,8% der hypoxischen Einschlüsse infektiös, nach 48 h sind Chlamydien aus hypoxischen Proben mindestens ebenso infektiös wie solche aus normoxischen Zellkulturen (**Abb. 7.3 F**).

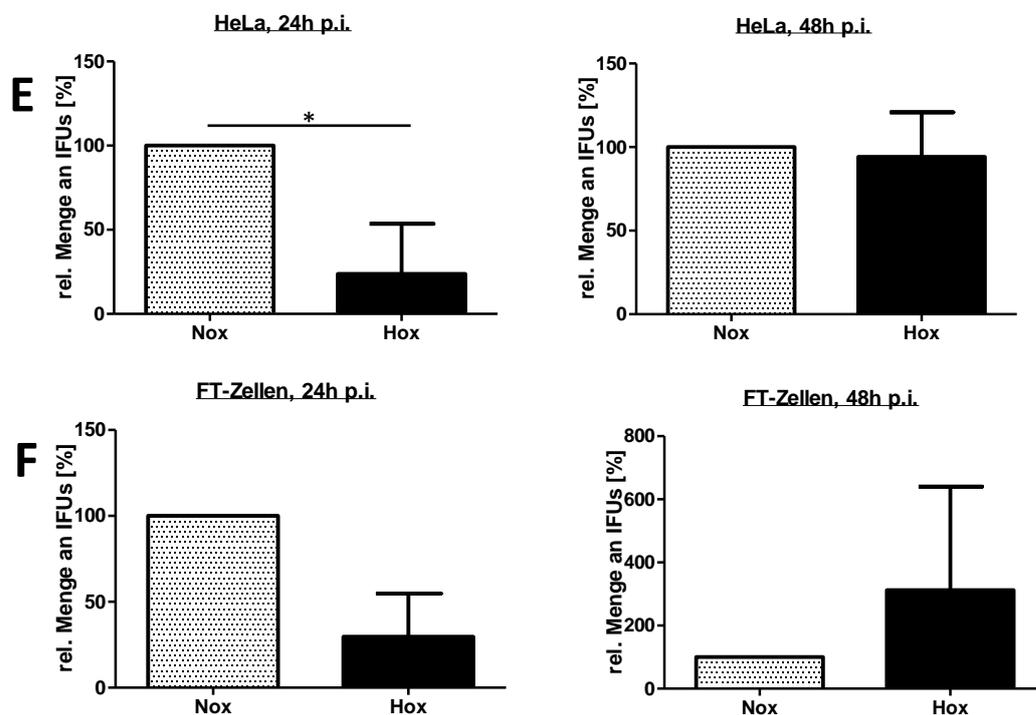
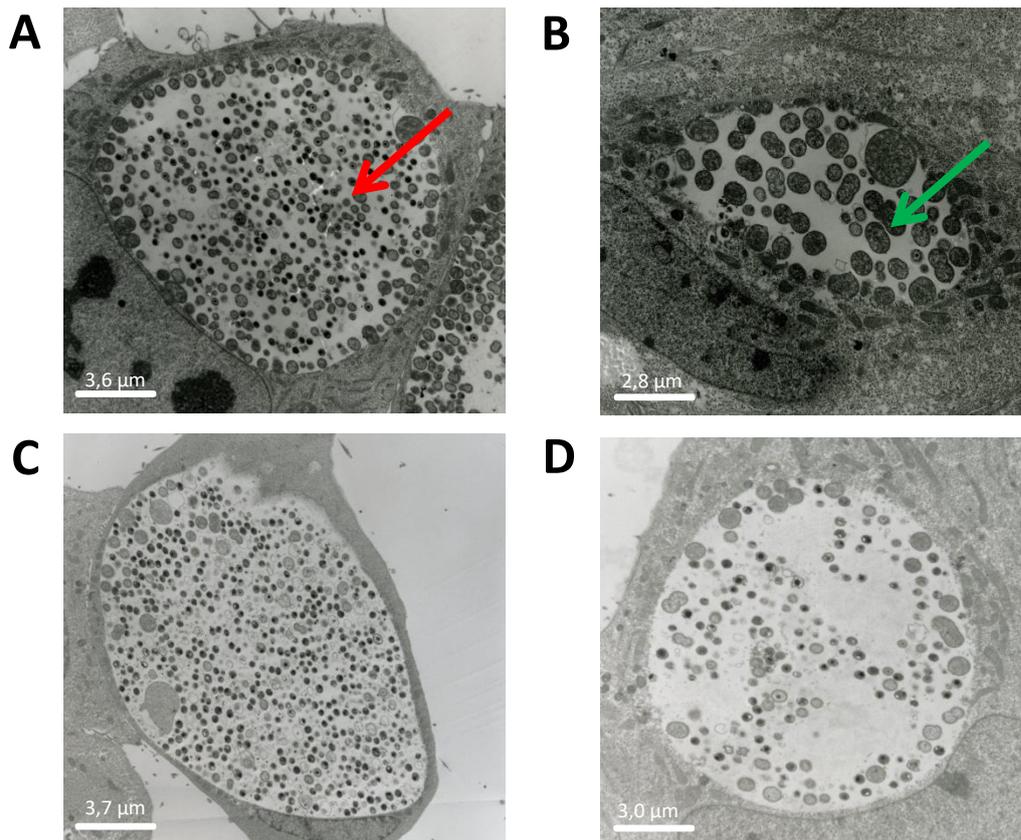


Abb. 7.3: Darstellung der Reinfektionsraten unter Normoxie und Hypoxie

Elektronenmikroskopische (TEM-) Bilder von *C. trachomatis*-Einschlüssen in HeLa-Zellen unter Normoxie (links) und Hypoxie (rechts) 24 h (A, B) und 48 h (C, D) p.i. sowie die quantitative Analyse der Reinfektionsraten in HeLa- (E) und FT- (F)-Zellen nach 24 und 48 Stunden, Ergebnisse aus Hypoxie angegeben in % der Werte aus Normoxie. Roter Pfeil: infektiöser Elementarkörper (EB), grüner Pfeil: weniger infektiöser Retikularkörper (RB). Wilcoxon-Rangsummentest: * $p < 0,05$, Mean \pm SD, $n = 5$ (HeLa, 24 h p.i.), $n = 3$ (übrige)

7.1.2 Analyse der Entzündungsreaktion der Zellen unter Normoxie und Hypoxie

Als Marker für die Immunreaktion auf die pathogene Zellexposition wurde eine Western Blot-Analyse der MAP-Kinase pERK1/2 durchgeführt. Ergänzend wurde die Induktion der proinflammatorischen Interleukine IL-1 β , IL-6 und IL-8 mittels qPCR untersucht. Um eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Immunreaktion machen zu können, wurden Proteinexpression und Zytokinspiegel 24 und 48 Stunden nach Infektion bestimmt.

In HeLa-Zellen fand nach Infektion mit Chlamydien eine vermehrte Phosphorylierung von ERK statt, nachweisbar als infektionsbedingter Anstieg von pERK im Western Blot und in der densitometrischen Analyse (**Abb. 7.4 A, B**). Dies lässt sich als Trend sowohl 24 h als auch 48 h p.i. erkennen.

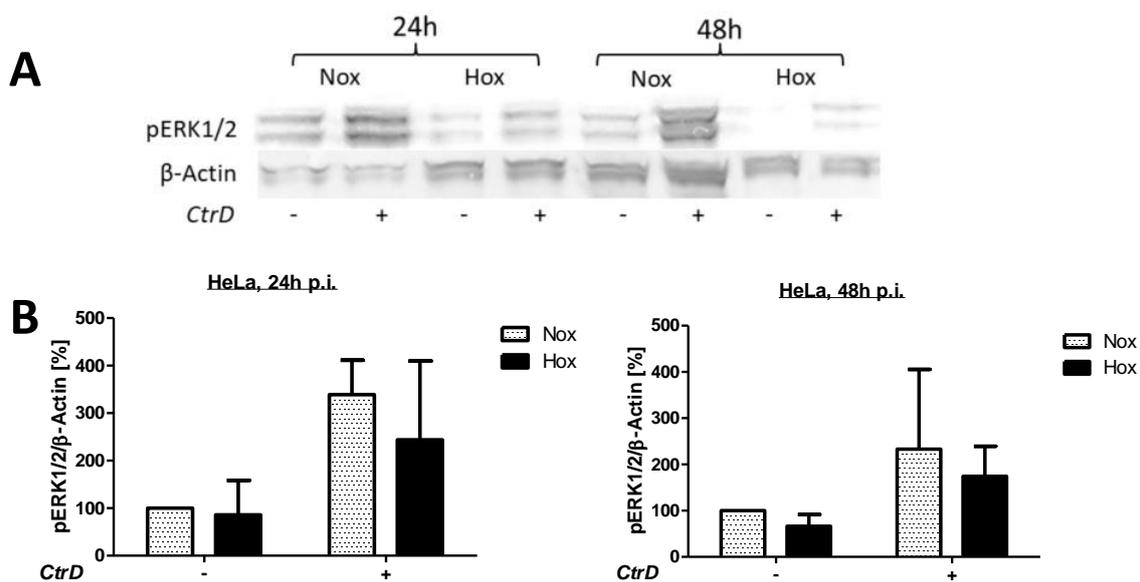


Abb. 7.4: Western Blot-Analyse zur Phosphorylierung von ERK1/2 in HeLa-Zellen

Repräsentativer Western Blot von HeLa-Zellen mit Nachweis der Proteine pERK 1/2 und β -Actin aus unterschiedlichen Zeitpunkten und Sauerstoffkonditionen (**A**) und dazugehörige densitometrische Analyse (**B**). Angabe der Werte in % bezogen auf uninferzierte normoxische Zellen. CtrD: Infektion mit *C. trachomatis* Serovar D, Mean \pm SD, n = 3

Im Eileiterzellmodell konnte densitometrisch kein Anstieg der Phosphorylierung nach Chlamydieninfektion gezeigt werden. Im Western Blot fällt jedoch auf, dass auch in nicht infizierten Zellen ERK in phosphorylierter Form nachzuweisen ist (**Abb. 7.5 A, B**).

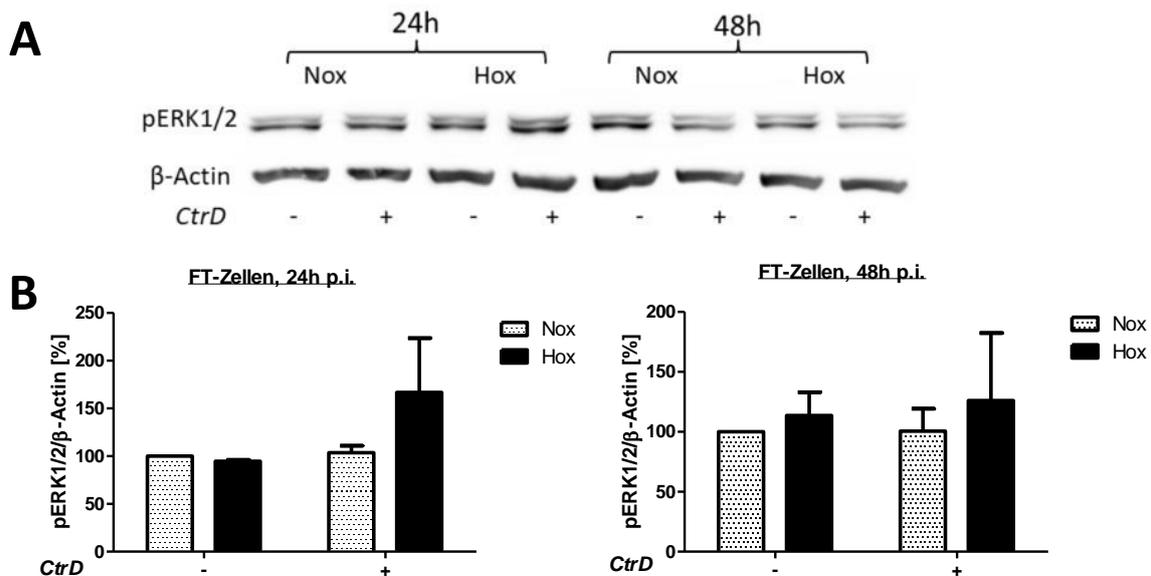


Abb. 7.5: Western Blot-Analyse zur Phosphorylierung von ERK1/2 in FT-Zellen

Repräsentativer Western Blot von FT-Zellen mit Nachweis der Proteine pERK 1/2 und β -Actin zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Sauerstoffkonditionen (A) und dazugehörige densitometrische Analyse (B). Angabe der Werte in Prozent bezogen auf uninferzierte normoxische Zellen. CtrD: Infektion mit *C. trachomatis* Serovar D, Mean \pm SD, n = 3

Um Unterschiede in beiden Zellmodellen hinsichtlich der Zytokinexpression zu untersuchen, wurden die Spiegel von IL-1 β , IL-6 und IL-8 24 und 48 Stunden p.i. bestimmt. In HeLa-Zellen findet sich 24 Stunden nach Chlamydieninfektion ein Anstieg der Interleukine 6 und 8 sowohl unter normoxischen (IL-8) als auch unter hypoxischen (IL-6, IL-8) Bedingungen, der bei IL-6 unter Hypoxie signifikant ist. Ein infektionsbedingter Anstieg zeigt sich bei IL-6 und IL-8 auch nach 48 Stunden (Abb. 7.6 B, C), der bei IL-6 unter Normoxie signifikant ausfällt. Dieser infektionsbedingte Anstieg von IL-6 und IL-8 lässt sich als Trend auch unter den anderen gemessenen Bedingungen erkennen. Im Durchschnitt liegen 48 h p.i. deutlich höhere relative Anstiege vor als nach 24 h.

Ein anderes Aktivierungsmuster zeigt das Interleukin 1 β , welches 24 h p.i. nicht durch die Infektion, sondern bei niedrigem Sauerstoffgehalt der Umgebung vermehrt induziert wird. Der in CtrD-infizierten Zellen signifikante Anstieg bei Hypoxie zeigt sich unter allen gemessenen Bedingungen als Tendenz (Abb. 7.6 A).

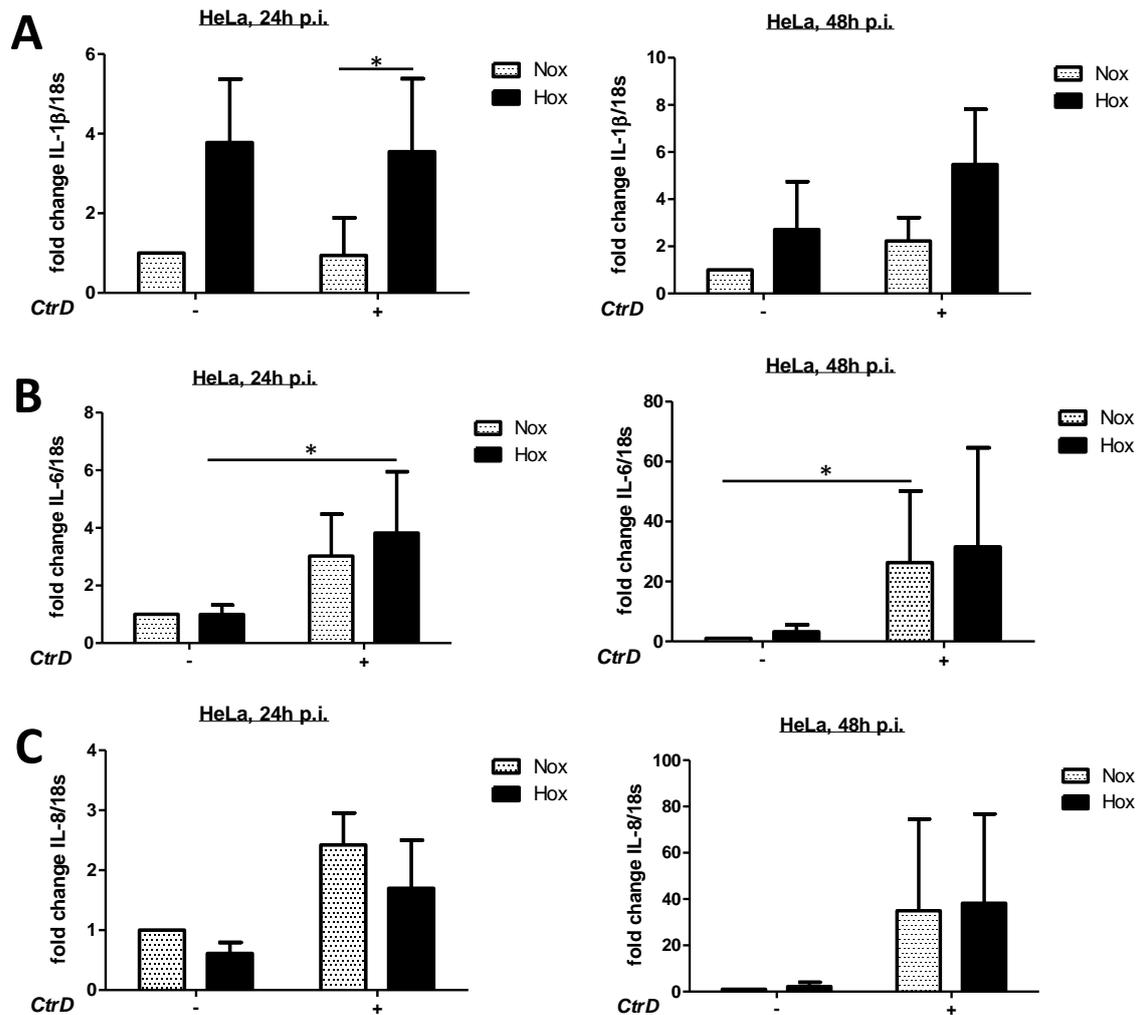


Abb. 7.6: mRNA-Induktion der proinflammatorischen Zytokine in HeLa-Zellen

qPCR-Analyse von IL-1 β (A), IL-6 (B) und IL-8 (C) 24 h und 48 h nach Infektion. Die Ergebnisse sind auf 18s-mRNA normalisiert. IL-1 β wird unter Hypoxie vermehrt induziert, IL-6 und IL-8 nach Chlamydieninfektion. Dunn's Test als post hoc-Test bei Vorliegen eines signifikanten Kruskal-Wallis-Tests: * $p < 0,05$; CtrlD: Infektion mit *C. trachomatis* Serovar D, Mean \pm SD, n = 5 (IL-1 β /IL-6/IL-8 nach 24 h sowie IL-8 nach 48 h), n = 4 (IL-6 nach 48 h), n = 3 (IL-1 β nach 48 h).

Humane Eileiterzellen weisen ein etwas anderes Induktionsmuster als HeLa-Zellen auf. IL-1 β verhält sich konform mit IL-6 und IL-8, wird also durch die Chlamydieninfektion und nicht durch die Hypoxie induziert. 24 h p.i. sind die Zytokinspiegel nach Infektion in hypoxischen Zellen stets etwas niedriger als in normoxischen Bedingungen. Dieser Effekt ist allerdings nicht signifikant und 48 h p.i. weniger deutlich zu erkennen (**Abb. 7.7 A-C**). Die relativen Anstiege sind generell im Vergleich zu HeLa-Zellen nach 48 h niedriger als nach 24 h. Es muss jedoch auch auf die höheren Standardabweichungen hingewiesen werden.

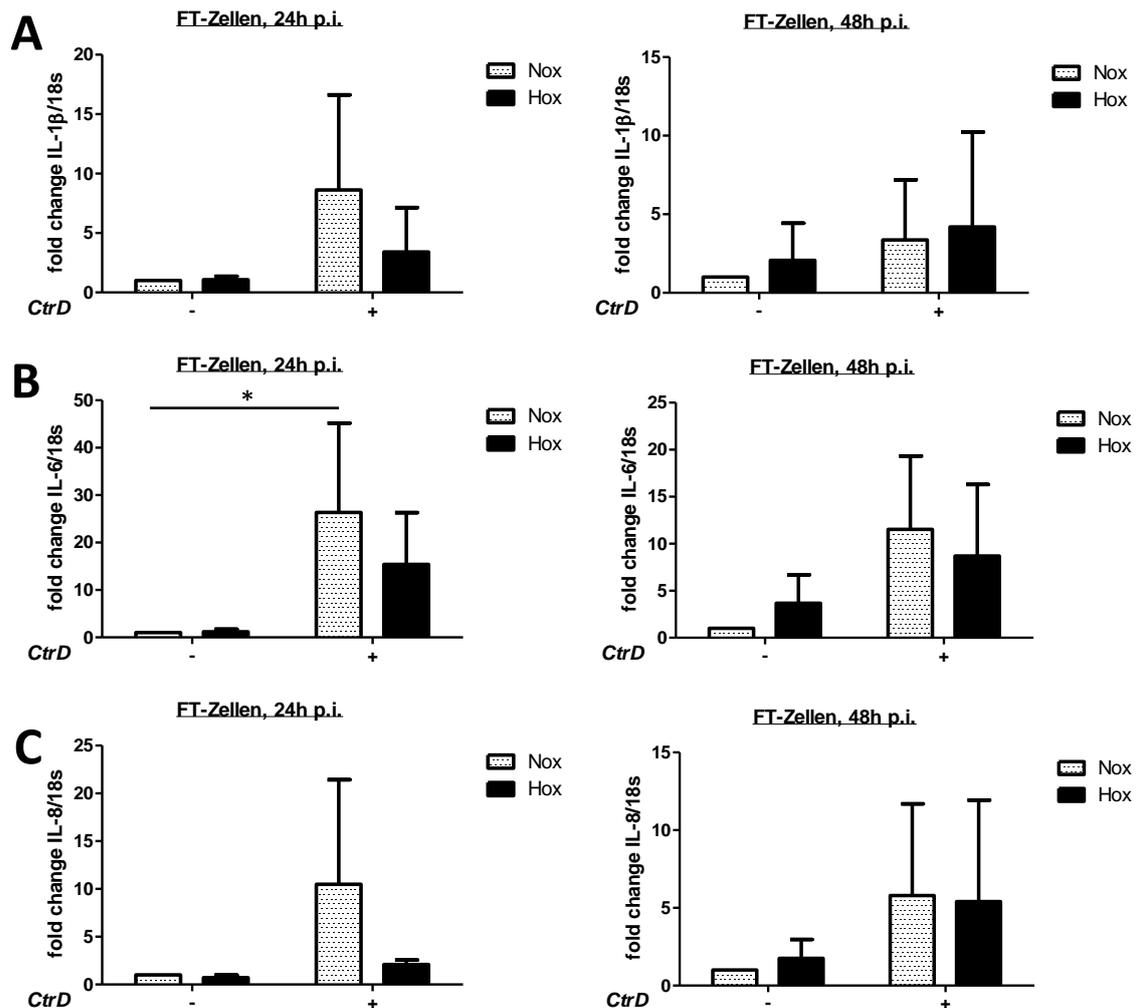


Abb. 7.7: mRNA-Induktion der proinflammatorischen Zytokine in in FT-Zellen

qPCR-Analyse der Interleukine 1 β (A), 6 (B) und 8 (C) 24 h (links) und 48 h (rechts) nach Infektion. Die Ergebnisse sind auf 18s-mRNA normalisiert. Dunn's Test als post hoc-Test bei Vorliegen eines signifikanten Kruskal-Wallis-Tests: * $p < 0,05$; CtrD: Infektion mit *C. trachomatis* Serovar D, Mean \pm SD, n = 3

Es ließ sich also zeigen, dass in HeLa-Zellen für IL-6 und IL-8 der stärkste Stimulus die Infektion ist. Der Sauerstoffgehalt der Umgebung spielt eine untergeordnete, modulierende Rolle. IL-1 β hingegen wird am meisten durch Zellkultur unter Hypoxie beeinflusst. In Eileiterzellen sorgt die Infektion für einen Anstieg der Interleukine unter Normoxie und weniger stark ausgeprägt auch unter Hypoxie. IL-1 β verhält sich hier wie IL-6 und IL-8.

7.1.3 Vergleich der Zellmodelle hinsichtlich des Stoffwechsels unter Normoxie/Hypoxie

Neben dem chlamydialen Wachstumsverhalten und der zellulären inflammatorischen Reaktion sollen die beiden Zellmodelle hinsichtlich ihres Stoffwechsels untersucht und verglichen werden. Dieser wird in herkömmlichen Zellmodellen sowohl durch die Infektion als auch durch wechselnde Sauerstoffkonzentrationen in der Umgebung beeinflusst. Stellvertretend für wichtige zelluläre Stoffwechselwege wurden zwei Schlüsselenzyme der Energiegewinnung mithilfe der qPCR bestimmt: der membranständige Glukosetransporter GLUT1 und die Laktatdehydrogenase A LDHA.

Wie aus Abb. 7.8 ersichtlich, führt in HeLa-Zellen vor allem Hypoxie 24 h p.i. zu einem Anstieg der Schlüsselenzyme. Durch die Infektion wird die Transkription von GLUT1 und LDHA nicht beeinflusst (**Abb. 7.8 A, B**).

In menschlichen Eileiterzellen kann ein anderes Aktivierungsmuster nachgewiesen werden. Der niedrige Sauerstoffgehalt der Umgebung bewirkt in nicht-infizierten Zellen wie bei HeLa-Zellen einen Anstieg von GLUT1. Die Infektion mit *C. trachomatis* induziert jedoch im FT-Modell auch GLUT1 (**Abb. 7.8 C**). LDHA zeigt tendenziell das gleiche Muster wie GLUT1. Es können also auch im Stoffwechsel beider Zellmodelle deutliche Unterschiede gezeigt werden.

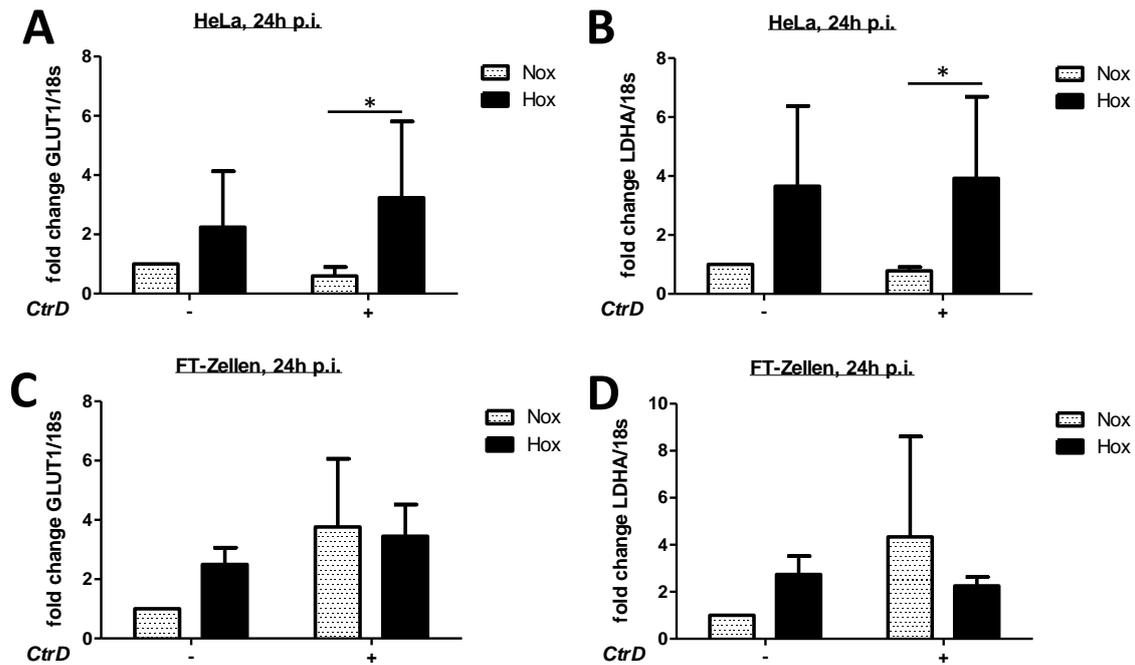


Abb. 7.8: Schlüsselenzyme im Zellstoffwechsel von HeLa- und FT-Zellen

qPCR-Analyse der mRNA der Enzyme GLUT1 und LDHA 24 Stunden p.i. in HeLa (A, B)- und FT (C, D)-Zellen mit Nachweis der Induktion von GLUT1 und LDHA unter Hypoxie in HeLa-Zellen. Dunn's Test als post hoc-Test bei Vorliegen eines signifikanten Kruskal-Wallis-Tests: * $p < 0,05$; CtrD: Infektion mit *C. trachomatis* Serovar D, Mean \pm SD, n = 5 (HeLa), n = 3 (FT-Zellen)

7.2 Der Einfluss von Estradiol auf HeLa- und FT-Zellen im Vergleich

Eine große Rolle im Mikromilieu des weiblichen Genitaltraktes spielen die Sexualhormone, wobei Estradiol (E2) und Progesteron (P4) unter diesen die beiden wichtigsten sind. Daher wurden beide Zellmodelle vor der Infektion mit physiologischen Konzentrationen von entweder E2 oder P4 vorbehandelt. Es wurden erneut Unterschiede in Infektionsraten und Reaktion der Wirtszellen untersucht.

7.2.1 Infektionsraten nach Stimulation mit Estradiol

Wenn HeLa-Zellen mit Estradiol vorbehandelt und anschließend mit *C. trachomatis* infiziert werden, zeigen sich mehr Zellen mit Einschlüssen als in nicht vorbehandelten Zellen, ein Effekt, der unter Normoxie signifikant ist. Die durchschnittlichen Infektionsraten steigen nach Estradiolbehandlung von 34% auf 41% unter Normoxie und von 35,6% auf 43,5% unter Hypoxie, was also unabhängig vom Sauerstoffgehalt der Umgebung zu sein scheint (Abb. 7.9 E). Bei menschlichen Eileiterzellen hingegen, die nach

demselben Versuchsaufbau infiziert wurden, zeigt Estradiol weder unter Normoxie noch unter Hypoxie einen Effekt auf die beobachteten Infektionsraten (**Abb. 7.9 F**).

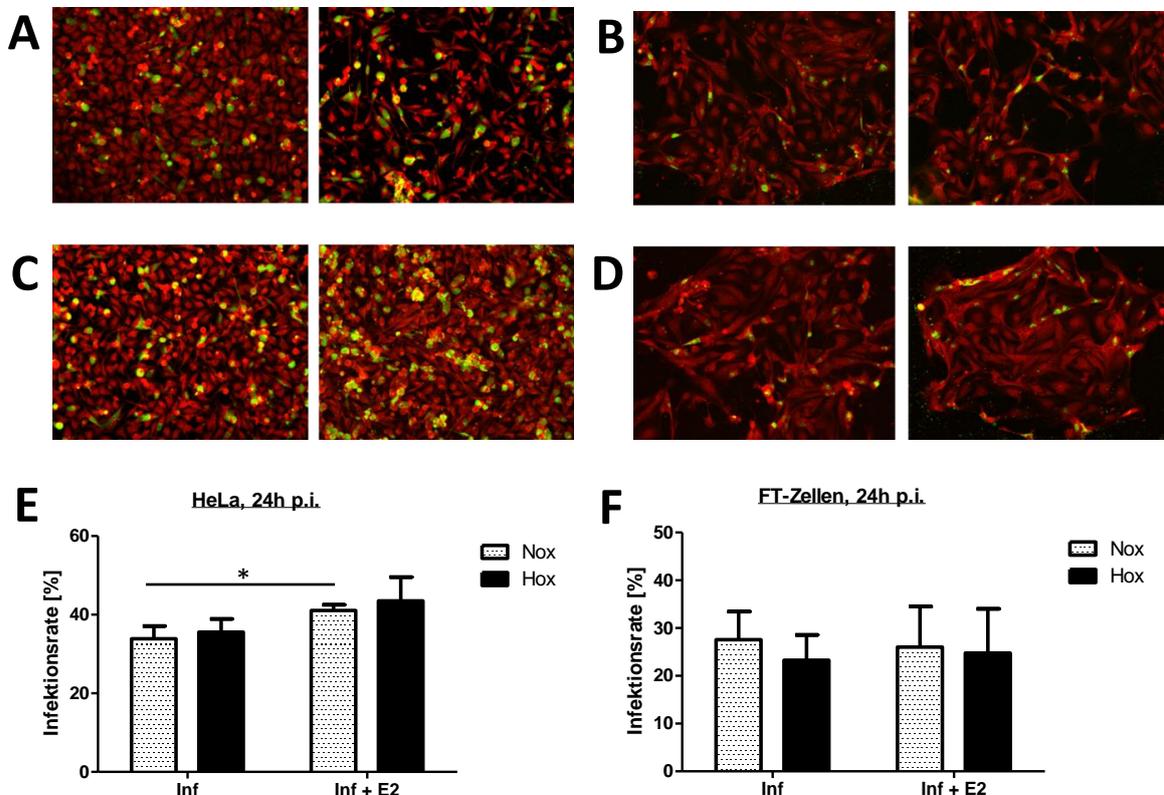


Abb. 7.9: Der Einfluss von Estradiol auf die Infektionsraten in HeLa- und FT-Zellen

C. trachomatis-Infektionsraten in % ohne und mit Estradiolzugabe unter Normoxie (links) und Hypoxie (rechts), gezeigt in repräsentativen Immunofluoreszenzfärbungen von infizierten (Inf) unstimulierten HeLa- (A) und FT- (B) sowie mit E2 stimulierten HeLa- (C) und FT-Zellen (D). In der Auswertung zeigen sich höhere Infektionsraten nach E2-Gabe in normoxischen HeLa- (E), aber nicht in FT-Zellen (F). Dunn's Test als post hoc-Test bei Vorliegen eines signifikanten Kruskal-Wallis-Tests: * $p < 0,05$; 24 h p.i., Mean \pm SD, n = 5 (HeLa), n = 3 (FT)

Aber auch hier kann nicht nur die Infektionsrate, sondern auch die Infektiosität der neu gebildeten Einschlüsse Auskunft über den Infektionsverlauf geben. Hierzu wurden 24 h p.i. erneut die Reinfektionsraten bestimmt. Abb. 7.10 zeigt erneut die in Abschnitt 7.1.1 dargestellte erniedrigte Reinfektionsrate nach 24 h. Diese fällt in HeLa-Zellen signifikant aus, wird jedoch auch in FT-Zellen abgebildet und scheint in beiden Fällen unabhängig vom Estradiolspiegel zu sein. Das Sexualhormon scheint daher in keinem der beiden Zellmodelle Auswirkungen auf die Infektiosität zu haben.

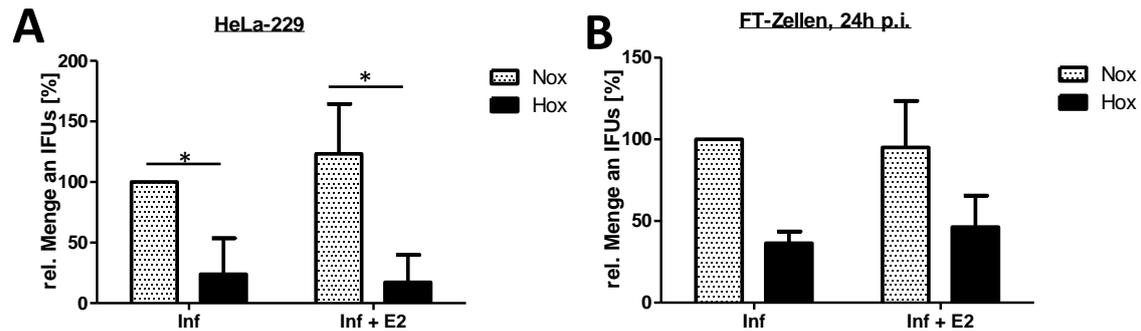


Abb. 7.10: Der Einfluss von Estradiol auf die Infektiosität von *C. trachomatis*

Auszählung der Reinfektionsraten 24 h p.i. in infizierten (Inf) HeLa- (A) und FT- (B) Zellen ohne und mit Estradiol (E2)-Stimulierung, Angabe in Prozent bezogen auf die normoxischen, unstimulierten Proben. Dunn's Test als post hoc-Test bei Vorliegen eines signifikanten Kruskal-Wallis-Tests: * $p < 0,05$; Mean \pm SD, $n = 5$ (HeLa), $n = 3$ (FT)

7.2.2 Proinflammatorische Reaktion der Zellen auf Infektion nach Estradiolstimulation

Um den Einfluss von Estradiol auf intrazelluläre Kaskaden zu untersuchen, wurde wieder exemplarisch eine Western Blot-Analyse der MAP-Kinase pERK1/2 durchgeführt.

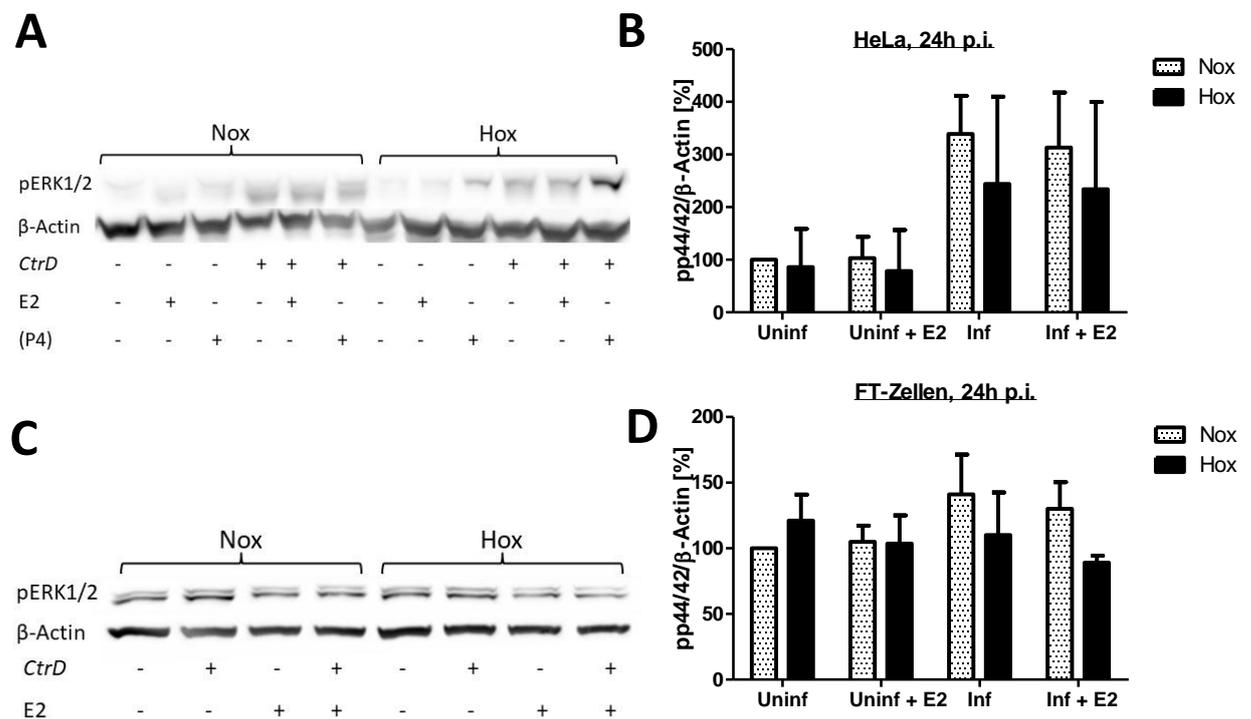


Abb. 7.11: Western Blot-Analyse vom pERK1/2 nach hormoneller Stimulation

Repräsentativer Western Blot in HeLa-Zellen (A) mit den Variablen Infektion (*CtrD*/Inf/Uninf), Estradiol- (E2) und Progesteronstimulation (P4, nicht in der Auswertung enthalten). Korrespondierende densitometrische Auswertung (B). Entsprechender Versuchsaufbau ohne P4 in FT-Zellen (C, D). *CtrD*: Infektion mit *C. trachomatis* Serovar D, Mean \pm SD, $n = 3$

In HeLa-Zellen zeigt sich wie bereits in 7.1.2 beschrieben eine als Trend sichtbare vermehrte Phosphorylierung nach Infektion mit *C. trachomatis* sowohl in E2-vorbehandelten als auch in unbehandelten Zellen (**Abb. 7.11 A, B**). Unter Hypoxie ist dieser Effekt geringer. Estradiol beeinflusst die Phosphorylierung von ERK1/2 weder positiv noch negativ. Auch in Eileiterzellen ist kein Einfluss von Estradiol auf die MAP-Kinase nachweisbar. Hinzuweisen ist allerdings auf die deutlich sichtbaren Proteinbänder der Blot-Analyse auch in unbehandelten Zellen (**Abb. 7.11 C, D**).

Mithilfe der qPCR wurden die Zytokinspiegel von IL-1 β , IL-6 und IL-8 untersucht. Wie zuvor beschrieben, wird in HeLa-Zellen IL-1 β vorwiegend durch den Sauerstoffgehalt der Umgebung beeinflusst und steigt in allen Fällen unter Hypoxie an (**Abb. 7.12 A**). Das Zytokin IL-6 scheint als proinflammatorische Reaktion auf die Chlamydieninfektion vermehrt induziert zu werden (**Abb. 7.12 C**). Das gleiche gilt für IL-8, wobei unter Hypoxie die Zytokininduktion tendenziell abgeschwächt zu sein scheint (**Abb. 7.12 E**). Die Vorbehandlung mit Estradiol scheint die Interleukine nicht oder nur unspezifisch zu beeinflussen.

In menschlichen Eileiterzellen findet sich wiederum ein anderes Induktionsmuster: IL-1 β wird weder durch Infektion noch durch Hypoxie beeinflusst. Estradiol hingegen sorgt für eine Induktion von IL-1 β , die unter Hypoxie signifikant ist (**Abb. 7.12 B**). Dieser Anstieg findet sich als Tendenz auch in IL-8 (**Abb. 7.12 F**), wobei die Infektion wie zuvor beschrieben ebenfalls zu einem Anstieg der untersuchten Zytokine führt. Es ist jedoch auffällig, dass die Daten sehr weit streuen.

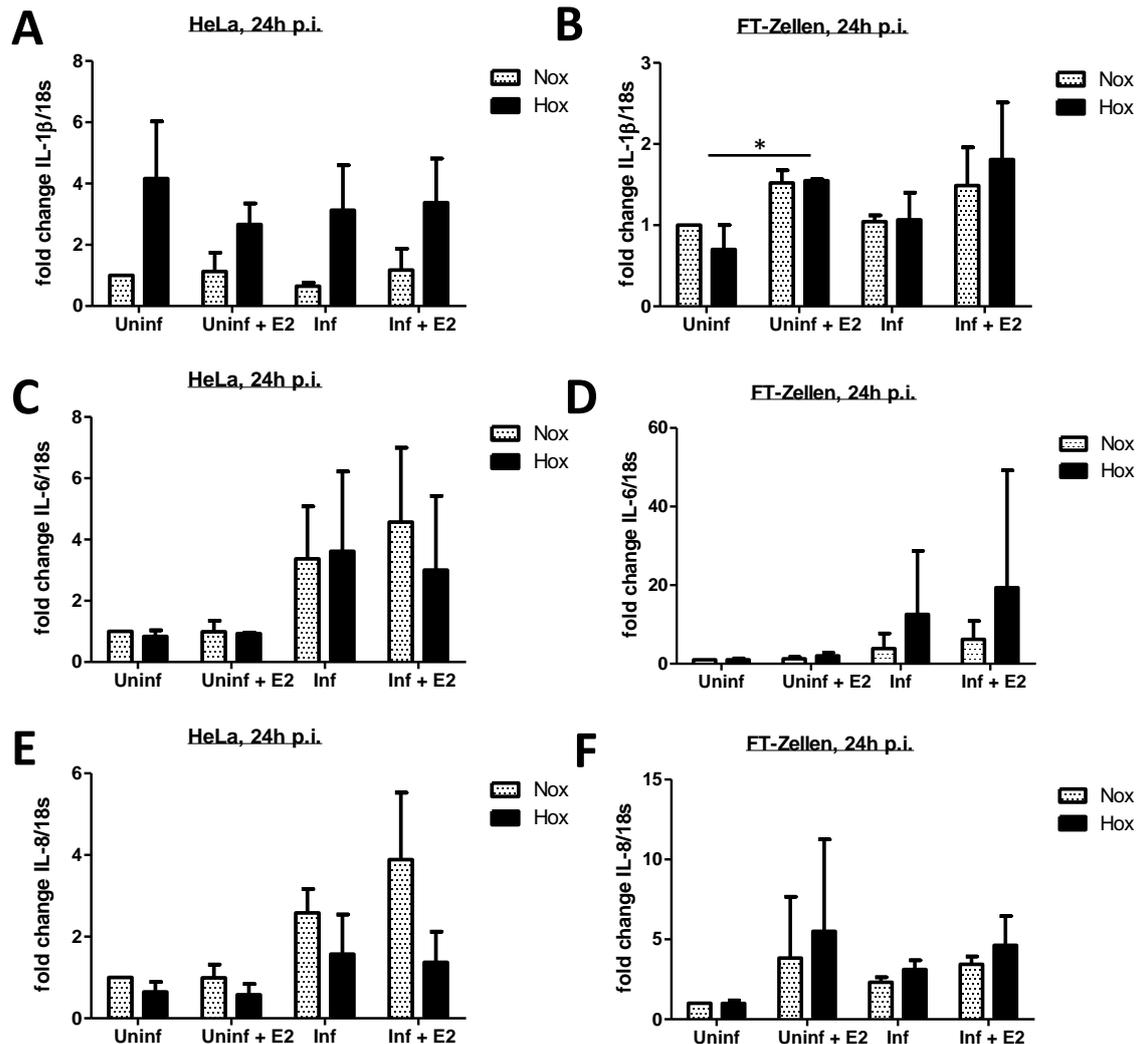


Abb. 7.12: Unterschiede in der Zytokininduktion nach Infektion und E2-Gabe

qPCR-Analysen der Interleukine IL-1 β , IL-6 und IL-8 in infizierten (Inf) und uninfizierten (Uninf) HeLa- (A, C, E) und FT- Zellen (B, D, F). Die Normalisierung erfolgte auf 18s-rRNA. Dunn's Test als post hoc-Test bei Vorliegen eines signifikanten Kruskal-Wallis-Tests: * $p < 0,05$; 24 h p.i., Mean \pm SD, n = 3

7.2.3 Der Zellstoffwechsel unter dem Einfluss von Estradiol

Um einen Einfluss von Estradiol auf den Metabolismus von HeLa- und Eileiterzellen zu untersuchen, wurden GLUT1 und LDHA mittels qPCR bestimmt. Wie bereits in 7.1.3 beschrieben, scheint in HeLa-Zellen Hypoxie der bedeutendste Stimulus für die Induktion von GLUT1 und LDHA zu sein (Abb. 7.13 A, C). Dies bestätigt sich auch hier. Estradiol übt keinen signifikanten Einfluss auf die Induktion beider Enzyme aus.

In Eileiterzellen wird ebenfalls eine nicht signifikante Induktion von GLUT1 und LDHA durch Hypoxie erzeugt. LDHA scheint jedoch auch unspezifisch durch Infektion und Estradiolzugabe beeinflusst zu werden.

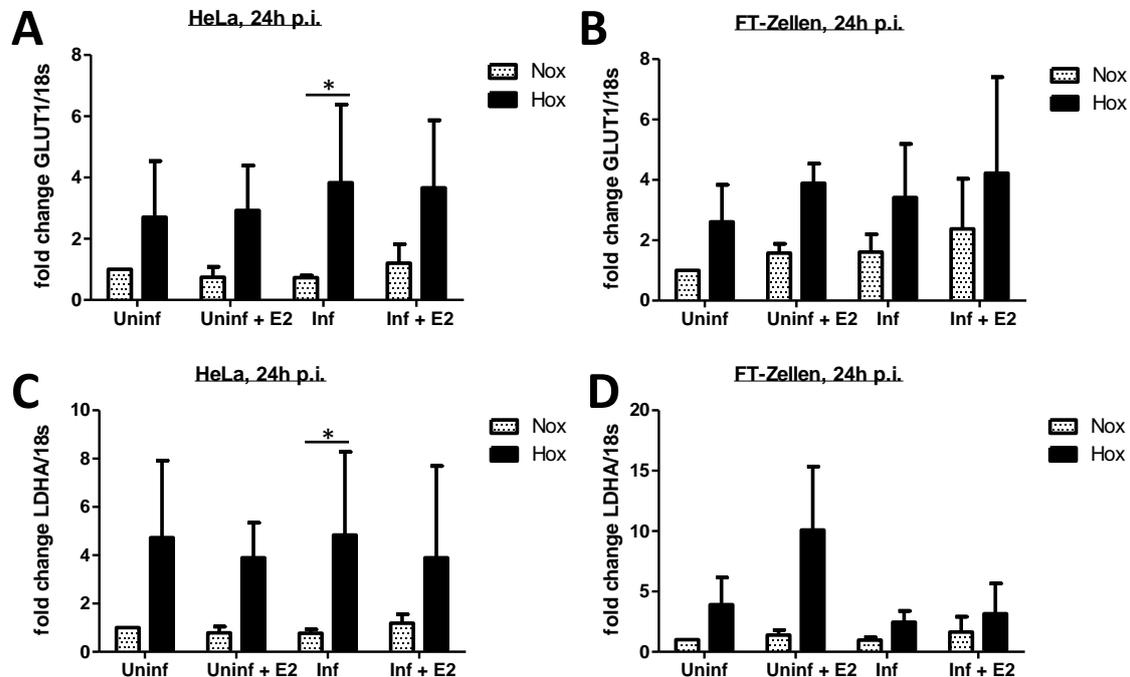


Abb. 7.13: Unterschiede im Zellstoffwechsel nach Infektion und E2-Gabe

qPCR-Analysen der Enzyme GLUT1 und LDHA in infizierten (Inf) und uninfizierten (Uninf) HeLa- (A, C) und FT-Zellen (B, D) ohne und mit Estradiolstimulation (+E2). Dunn's Test als post hoc-Test bei Vorliegen eines signifikanten Kruskal-Wallis-Tests: * $p < 0,05$; 24 h p.i., Mean \pm SD, $n = 5$ (GLUT1 in HeLa), $n = 3$ (übrige)

7.2.3 Der Einfluss von Progesteron auf die Infektion mit *C. trachomatis*

Alle der bisher erwähnten Experimente mit HeLa-Zellen wurden ebenfalls mit physiologischen Konzentrationen des Sexualhormons Progesteron (P4) anstelle von Estradiol durchgeführt. Obwohl die absolute Konzentration von P4 in etwa um den Faktor $10^2 - 10^3$ höher ist als diejenige von Estradiol, scheint Progesteron keinerlei Einfluss auf die Chlamydieninfektion zu haben. Ein weiterer Ansatz war eine dem weiblichen Zyklus entsprechende Kultivierung unter einer Kombination von Progesteron und Estradiol in physiologischen Konzentrationen, die ebenfalls keinen Effekt zeigen konnte. Daher wurde darauf verzichtet, die Ergebnisse hier einzeln darzustellen. Aufgrund fehlender Auswirkungen auf HeLa-Zellen wurden auch keine Experimente mit Progesteron in menschlichen Eileiterzellen durchgeführt.

8 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, ein besseres Verständnis der *C. trachomatis*-Infektion unter Berücksichtigung des physiologischen Mikromilieus des weiblichen Genitaltraktes zu erlangen. Zum einen sollte hierfür das Zellmodell mit primären humanen Eileiterzellen näher charakterisiert werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen aus diesem Modell wurden mit dem etablierten HeLa-Infektionsmodell verglichen. Zum anderen sollte die Infektion unter dem Einfluss von Stimuli aus dem Mikromilieu des FGT näher untersucht werden. In dieser Arbeit wurde hierbei das Augenmerk auf die niedrige Sauerstoffkonzentration und auf das Sexualhormon Estradiol gelegt. Analysiert wurden stets die Infektionsrate und die Infektiosität des Pathogens, die inflammatorische Reaktion der Wirtszelle über die Interleukininduktion und die intrazelluläre MAP-Kinase pERK1/2 sowie der Wirtszellmetabolismus unter der Chlamydieninfektion.

8.1 Herausforderungen bei der Arbeit mit humanen primären Eileiterzellen

In dieser Arbeit wurden das HeLa-Zellmodell und das Primärzellmodell miteinander verglichen. Primärzellen unterscheiden sich jedoch nicht nur in den Auswertungsergebnissen von HeLa-Zellen, es bestehen auch große Unterschiede in der Handhabung.

Wenn FT-Zellen mit derselben Menge an *C. trachomatis*-IFUs infiziert werden wie HeLa-Zellen, ist die resultierende Infektionsrate sehr niedrig und daher kaum auswertbar. Wir entschieden uns daher dafür, die IFU-Zahl um das circa 30-fache zu erhöhen, um vergleichbare Infektionsraten von 20% - 40% zu erzielen und andere Auswertungsmethoden besser miteinander vergleichen zu können. Diese erschwerte Infizierbarkeit ist auch in anderen Studien, die mit genitalen Primärzellen arbeiten, beschrieben^{76,82,83,98}. Wir erklären dies mit einer besser erhaltenen natürlichen Funktion der Primärzellen. Die Proteinstruktur der Zellmembran der beiden verschiedenen Zelltypen weist Unterschiede auf⁷⁶, was die Adhäsion des Pathogens an der Zelle erschweren kann. So werden beispielsweise die TLRs im FGT sehr unterschiedlich exprimiert¹²⁶. Der in der Pathogenese der Chlamydieninfektion wichtige TLR4 findet sich vermehrt in Eileiterzellen, jedoch nicht in ekto- oder endozervikalen Zellen¹²⁷, was zu Differenzen der beiden Zellmodelle führen könnte.

Eine alternative Erklärung sind infektionshemmende Mediatoren oder Proteine, die von den FT-Zellen in das umgebende Medium abgegeben werden. FT-Zellen können Muzine⁸¹ oder Matrix-Metalloproteinasen¹²⁸ sezernieren, die möglicherweise mit infektiösen EBs interferieren. Die Menge der sezernierten Proteine variiert mit dem Zyklus zum Zeitpunkt der Entnahme⁸¹. HeLa-Zellen sind aufgrund ihrer Ursprungsbiologie oder des Verlusts natürlicher Zellfunktionen in dieser Hinsicht möglicherweise eingeschränkt und daher für Pathogene leichter zu infizieren. Eine Analyse der Kulturmedien der beiden Zellmodelle auf die genannten Mediatoren sowie die Untersuchung möglicher Interaktionen von diesen mit der *C. trachomatis*-Infektion könnte hier weitere Erkenntnisse bringen.

Als weiterer Punkt fällt bereits optisch die unterschiedliche Morphologie der beiden Zelltypen auf. Während HeLa-Zellen homogen und rundlich erscheinen, erscheinen FT-Zellen größer und über Zellausläufer vernetzt. Während des Wachstums lassen sich lichtmikroskopisch Inseln erkennen, die im Verlauf eine konfluente Fläche bilden. Außerdem sind vereinzelt Bewegungen von Fimbrien zu erkennen. Dies weist zum einen Vitalität der Zellen nach, zum anderen zeigt es, dass Primärzellen aus mehreren histologischen Subtypen bestehen, die auch in vivo im FGT zu finden sind. Die inselartige Proliferation mit ihren Vernetzungen kann auf eine bessere Interaktion innerhalb des Zellverbundes hinweisen. Möglicherweise trägt dies zu der verringerten Empfänglichkeit gegenüber Chlamydien bei. Hierfür spräche, dass chlamydienhaltige Vakuolen häufig eher im Randbereich der „Inseln“ gefunden werden und nicht gleichmäßig über den Zellrasen verteilt auftreten, wie dies bei HeLa-Zellen der Fall ist.

Diese im Vergleich zu HeLa-Zellen unterschiedliche Morphologie des FT-Zellmodells könnte sowohl die erschwerte Infizierbarkeit als auch weitere Ergebnisse beeinflussen. Wie oben beschrieben zeigten sich lichtmikroskopisch vereinzelt ziliotragende Zellen. Vor allem in diesen kommen die Rezeptoren TLR2 und TLR4 vor^{35,127,130}. TLR2 und TLR4 aktivieren den NFκB-Signalweg, der von der Chlamydieninfektion moduliert wird³⁶. Diese Zellen sind nicht im HeLa-Modell zu finden, was möglicherweise zu Unterschieden in den Ergebnissen beiträgt. Die Rolle der ziliotragenden Zellen und die Verteilung der Rezeptoren könnten daher in weiteren Studien untersucht werden.

Weiterhin zeigen sich nicht nur im Vergleich zu HeLa-Zellen Unterschiede in Wachstum und Zellmorphologie, auch die Tuben unterschiedlicher Patientinnen weichen

voneinander ab. Dies zeigt sich oft schon optisch (vgl. **Abb. 7.1, 7.2, 7.9**, Primärzellen jeweils von unterschiedlichen Patientinnen stammend), spiegelt sich jedoch auch in den ausgewerteten Daten wider: die Streuung der Daten ist in der Regel höher als bei HeLa-Zellen, obwohl der Versuchsaufbau stets identisch ist. In der Literatur werden die größeren Abweichungen der einzelnen Versuche untereinander ebenfalls beschrieben^{78,98}, ebenso wie die variierende Proliferation der Primärzellen und Unterschiede bezüglich vorhandener Immunzellen und sezernierten Proteinen^{80,81,129}. Wir nehmen daher an, dass das FT-Zellmodell die biologische Variabilität der einzelnen Patientinnen abbildet. Dies ist hinsichtlich einer angestrebten Annäherung an eine physiologische Infektionssituation ein Vorteil gegenüber dem etablierten HeLa-Zellmodell. Ursächlich für die Diversität der Eileiter könnten beispielsweise das genetische Spektrum unterschiedlicher Eileiterspenderinnen, frühere Infektionen, entzündliche Erkrankungen oder das Alter der Frau sein. Eine Korrelation zwischen diesen Faktoren, der Kultur der Eileiterzellen und den Ergebnissen wäre vor allem hinsichtlich des klinischen Erkenntnisgewinns und der Etablierung möglicher Marker für variable Infektionsverläufe ein hochinteressanter Ansatzpunkt für weitere Studien mit Primärzellen.

Als letzter Punkt stellt allerdings die eingeschränkte Verfügbarkeit von Primärzellen ein Problem bei der Planung und Auswertung von Versuchen dar. Bei geringer Zellzahl lassen sich oft nicht alle gewünschten Konditionen innerhalb eines Versuchsaufbaus untersuchen. Hinsichtlich der statistischen Auswertung lässt sich bei geringer Stichprobenzahl keine Verteilungsannahme treffen. Deshalb wurden bei der Auswertung nichtparametrische Tests verwendet, die sich durch eine geringere Power auszeichnen als parametrische Tests. Ergebnisse, die bei größerer n-Zahl möglicherweise statistisch signifikant ausfallen würden, sind in dieser Arbeit oft nur als Tendenz darstellbar. Die hier gezeigten Daten ($n \leq 5$) sind daher mit Vorsicht zu interpretieren. Auch die oben genannte Korrelation mit klinischen Daten ist bei geringer Patientinnenzahl nicht durchführbar. Studien mit größerer Fallzahl könnten in vielerlei Hinsicht die hier vorgestellten Ergebnisse ergänzen.

Zusammenfassend unterstreicht diese Arbeit den Stellenwert von Versuchen mit Primärzellen. Das hier vorgestellte Modell ist nicht nur gut als Infektionsmodell für die Infektion mit *C. trachomatis* geeignet, es zeigt auch Unterschiede zum HeLa-Zellmodell

auf, die für den Infektionsverlauf relevant sein können. Zudem ist die Abbildung der biologischen Variabilität innerhalb des Modells bemerkenswert und bietet interessante Ansatzpunkte für weitere Studien, die möglicherweise an der Schnittstelle zwischen in vitro- und in vivo-Forschung zum Verständnis der Pathogenese der Chlamydieninfektion beitragen könnten.

8.2 Hypoxie beeinflusst den chlamydialen Lebenszyklus

Wir stellen die Hypothese auf, dass im FGT physiologisch vorkommende Stimuli wie eine niedrige O₂-Konzentration Einfluss auf die Chlamydieninfektion nehmen. Der Sauerstoffgehalt liegt in verschiedenen Geweben des weiblichen Genitaltraktes in vivo zwischen 0,5% und 5% und ist variabel⁸⁴⁻⁸⁶. Überprüft wurde, ob und auf welche Weise der Verlauf einer Chlamydieninfektion ebenfalls durch Hypoxie beeinflusst wird.

Die erhobenen Daten zeigen, dass sich die Infektionsrate in Zellen des FGT durch unterschiedliche O₂-Konzentrationen nicht ändert (**Abb. 7.1**). Jedoch ist in HeLa- und FT-Zellen die Zahl von infektiösen IFUs, die sich 24 h p.i. in Reinfektionsexperimenten bestimmen lassen, unter Hypoxie erniedrigt (**Abb. 7.3 E, F**).

Da stets dieselbe IFU-Zahl für die Primärinfektion verwendet wurde und die Infektionsrate dieselbe ist, muss der Grund hierfür entweder in einer geringeren Anzahl an Chlamydien in den Einschlüssen oder in einer verringerten Infektiosität der Bakterien liegen. Die TEM-Bilder lassen eine Kombination von beidem vermuten: unter Hypoxie wirken die Einschlüsse leerer, außerdem sind mehr und deutlich vergrößerte RBs zu finden als in zeitgleichen Normoxie-Aufnahmen (**Abb. 7.3 A-D**). Nach 48 h hat sich die relative Menge an IFUs unter Normoxie und Hypoxie angeglichen (**Abb. 7.3 E**) bzw. scheint in FT-Zellen nun tendenziell höher zu sein (**Abb. 7.3 F**). Dies spricht gegen eine Verminderung der absoluten Chlamydienzahl in den Einschlüssen. Wahrscheinlicher ist eine Beeinflussung des chlamydialen Lebenszyklus in der Form, dass in den Einschlüssen mehr RBs und weniger infektiöse EBs zu finden sind, die Redifferenzierung zu EBs im Vergleich zur Normoxie also verzögert eintritt. Dies würde in einer verringerten IFU-Zahl in der Sekundärinfektion resultieren, die wir hier 24 h p.i. zeigen konnten. 48 h p.i., sprich zum Ende des chlamydialen Lebenszyklus hin, hätte sich dieser Unterschied dann wieder ausgeglichen. Es ist zu beachten, dass die Reproduktionszyklen unabhängig vom

Sauerstoff physiologisch nie vollständig synchron ablaufen und eine gewisse Varianz der Ergebnisse daher unvermeidbar ist.

Es wurde beschrieben, dass die chlamydiale Proteinsynthese unter Hypoxie zunimmt²⁰. Darüber hinaus wird die RB-zu-EB-Transformation durch eine Größenreduktion der RBs ausgelöst³. Möglicherweise bedingt die verstärkte Proteinsynthese die in den TEM-Bildern sichtbare Größenzunahme der hypoxischen RBs. Die Schwelle, die für die RB-zu-EB-Transformation überschritten werden muss, wird bei hypoxischen vergrößerten RBs somit erst später erreicht als bei normoxischen, „normal großen“ RBs. Dies bietet eine mögliche Erklärung für unsere Hypothese der hypoxiebedingten Verzögerung der RB-zu-EB-Transformation und die somit verringerte Infektiosität 24 h nach Infektion. Nach 48 h ist diese nicht mehr sichtbar, da die Rücktransformation zu diesem Zeitpunkt nicht mehr durch die Größe der RBs behindert wird und sich eine Verzögerung bei asynchron ablaufenden Zyklen nach zunehmender Zeit nach Infektion immer weniger abbilden lässt. Unterschiede in der Energieversorgung der Zellen unter Hypoxie sind ebenfalls eine mögliche Erklärung für die Wachstumsverzögerung. Diese zeigt sich im Übrigen sowohl in HeLa- als auch in humanen Eileiterzellen.

In einer früheren Studie zeigte sich keine veränderte Infektiosität, wenn die Infektion unter Hypoxie stattfand⁸⁷. Möglicherweise ist die dort verwendete O₂-Konzentration von 4% im Gegensatz zu den hier verwendeten 2% ursächlich, da auch die Proteinsynthese bei abnehmender O₂-Konzentration zunimmt²⁰ und der Effekt dann nicht mehr so deutlich ausgeprägt wäre.

Dass variable Sauerstoffbedingungen Unterschiede in der Infektiosität zur Folge haben können, ist möglicherweise auch für klinische Untersuchungen bedeutsam. Eine unter Hypoxie veränderte Empfindlichkeit gegenüber antibiotisch wirksamen Substanzen wie Azithromycin und Doxycyclin wurde bereits früher beschrieben⁹¹. Zukünftige Studien könnten daher mögliche Korrelationen von Einflussfaktoren auf die O₂-Konzentration im FGT (Zykluszeitpunkt der Infektion, bereits bestehende entzündliche Prozesse) und Chlamydieninfektion und -verlauf in vivo näher untersuchen.

8.3 HeLa- und FT-Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Entzündungsreaktion

Laut derzeitigem Stand der Forschung trägt die aus einer Chlamydieninfektion resultierende Entzündung mehr zu den klinischen Konsequenzen bei als die Schädigung

der Zellen durch das Pathogen, weshalb diese nun näher betrachtet wird^{61,63,64,79}. In HeLa-Zellen ist die inflammatorische Reaktion auf die Chlamydieninfektion bereits in vielerlei Hinsicht erforscht. Zum besseren Verständnis der Pathogenese der *C. trachomatis*-Infektion im Menschen werden nun auch in FT-Zellen Marker der Immunantwort bestimmt und mit den Ergebnissen aus HeLa-Zellen verglichen.

Als wichtiger Bestandteil der intrazellulären inflammatorischen Signalkaskade wurde die Phosphorylierung der intrazellulären MAP-Kinase ERK1/2, die u.a. IL-8 induzieren kann, unter Normoxie und Hypoxie in infizierten und nicht infizierten Zellen analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die Infektion von HeLa-Zellen tendenziell zu einer Hochregulierung von pERK und somit zu einer proinflammatorischen Reaktion der Wirtszelle führt. Unter Hypoxie stellt sich dieser Effekt abgeschwächt dar. Hypoxie alleine beeinflusst die Phosphorylierung von ERK nicht signifikant. Dies zeigt sich in Übereinstimmung mit bisherigen Studien⁵⁴.

In primären FT-Zellen konnte densitometrisch keine Induktion durch Stimuli wie Infektion oder Hypoxie nachgewiesen werden. Jedoch ergab die Blotanalyse eine deutlich sichtbare Proteinbande bereits in normoxischen, unstimulierten Zellen, so dass pERK in Primärzellen bereits über eine hohe basale Aktivierung verfügt und ein eventueller relativer Anstieg daher wahrscheinlich nicht zu sehen wäre (**Abb. 7.5 A**). Eine mögliche Erklärung stellt der durch Entnahme, Bearbeitung und Kultivierung der Zellen ausgeübte Stress dar, der für die vermehrte Phosphorylierung sorgt. Dies wäre eine unphysiologische Ausgangssituation, in der keine weitere Stimulation mehr möglich wäre.

Eine Vermeidung dieser möglichen Stressreaktion wäre generell bei in vitro-Versuchen nicht sicher auszuschließen, da unabhängig von Kultivierung und Infektion die operative Gewebeentnahme als mögliche Stressursache erfolgen muss. Eine Untersuchung bekannter Stressmarker der Zelle, wie beispielsweise proapoptotische Signalwege oder Apoptosemarker, könnte hier sinnvoll sein. Alternativ nimmt pERK in menschlichen Eileiterzellen eine andere Rolle ein als in HeLa-Zellen und ist dauerhaft hochreguliert, um andere, nicht infektionsbedingte Signalwege über diese Kaskade zu vermitteln.

Für eine umfassende Charakterisierung der Immunantwort ist auch die Zytokininduktion wichtig. In HeLa-Zellen führt Chlamydieninfektion zu einer Hochregulierung der proinflammatorischen Interleukine 6 und 8. Dies geschieht in Übereinstimmung mit

bisherigen Literaturangaben^{55,60} und ist auch klinisch mit erhöhter Komplikationsrate assoziiert⁶⁴. Für HeLa-Zellen ist allerdings beschrieben, dass IL-1 β über pERK und die MAP-Kinase p38 die Interleukine 6 und 8 induzieren kann⁶². Da IL-1 β in unseren Versuchen signifikant durch Hypoxie und nicht durch die Infektion beeinflusst wird und IL 6 und 8 vorwiegend nach Infektion erhöht sind, können wir dies nicht bestätigen. Dass Aktivierung von pERK über einen anderen Auslöser zu einer Induktion von IL-6 und IL-8 führt, ist jedoch mit unseren Ergebnissen vereinbar.

Infektionsassoziierte IL-1 β -Induktion konnte bereits in endozervikalen, mit Chlamydien-HSP60 behandelten Primärzellen gezeigt werden⁷⁷. Passend hierzu lässt sich in unseren Versuchen im Primärzellmodell ein Anstieg von IL-1 β , IL-6 und IL-8 nach Chlamydieninfektion beobachten. Tendenziell ist die infektionsbedingte Zytokininduktion in unter Hypoxie kultivierten FT-Zellen nach 24 h p.i. schwächer als unter Normoxie, nach 48 h zeigen sich vergleichbare Ergebnisse. Zu beachten ist aber, dass die Zytokinspiegel relative Anstiege abbilden. Analog zur pERK-Aktivierung ist es also möglich, dass durch die Verarbeitung der Eileiter auch unstimulierte FT-Zellen eine basale Zytokininduktion aufweisen können, die die Beeinflussung durch Stimuli wie Infektion oder Oxygenierung abmildern könnte.

In der Gegenüberstellung beider Zellmodelle zeigen HeLa-Zellen nach 48 h bei fast allen Zytokinen einen deutlich höheren relativen Anstieg als nach 24 h p.i. (bspw. IL-6: ca. 10-fach höher). Dies könnte durch eine größere Anzahl betroffener Zellen durch die Freisetzung infektiöser EBs 48 h p.i. zu erklären sein. HeLa-Zellen weisen außerdem als Karzinomzellen eine hohe Proliferationsrate auf, was sich mit einer lichtmikroskopischen Untersuchung der Konfluenz bestätigen lässt. In Eileiterzellen ist der Effekt jedoch umgekehrt: die relativen Anstiege der Zytokine sind 24 h p.i. stets höher als 48 h nach Infektion. Die höhere Zytokininduktion zum früheren Zeitpunkt kann einerseits auf eine im Vergleich zu HeLa-Zellen besser erhaltene natürliche Reaktionsfähigkeit der Primärzellen hindeuten. Andererseits nimmt die Proliferation von FT-Zellen und möglicherweise auch deren Reaktionsfähigkeit im Laufe der Zeit ab, weshalb der Unterschied der relativen Anstiege im zeitlichen Verlauf auch durch Unterschiede in der absoluten Zellzahl und der Vitalität der beiden Zellmodelle zu erklären sein kann.

IL-1 β wird in Primärzellen nicht durch Hypoxie, sondern tendenziell eher durch die Infektion induziert und unterscheidet sich hierin von HeLa-Zellen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass IL-1 β bei *C. trachomatis*-positiven Frauen mit klinischen Komplikationen wie ektopter Eileiterschwangerschaft assoziiert ist⁶³. Laut unseren Ergebnissen ist die eigentlich für HeLa-Zellen vorbeschriebene Induktion von IL-6 und IL-8 durch IL-1 β über die MAP-Kinasen pERK⁵⁵ und p38⁶² im Primärzellmodell durchaus möglich. Da pERK im Gegensatz zu IL-8 nicht von Infektion und Oxygenierungsstatus beeinflusst wird, wäre hier die Bestimmung von p38 interessant, um die Relevanz dieses Signalwegs in menschlichen Eileiterzellen zu überprüfen.

Die Entzündungsreaktion von FT-Zellen auf die Chlamydieninfektion unter dem Einfluss der Hypoxie wurde bisher noch nicht untersucht. Hier konnte nun gezeigt werden, dass Zytokinspiegel von Primärzellen auch durch variable Oxygenierung moduliert werden, was insofern interessant ist, als dass die O₂-Konzentration im FGT ebenfalls Schwankungen unterliegt. Hinzu kommt die Beeinflussung des chlamydialen Lebenszyklus durch Hypoxie. Hypothetisch könnte daher die Chlamydieninfektion in vivo abhängig von der Sauerstoffversorgung des FGT-Gewebes latenter oder fulminanter verlaufen. Genau wie die gezeigte verstärkte oder abgeschwächte Immunreaktion könnte dies dann in unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbildern resultieren.

Das Primärzellmodell ist laut unseren Erkenntnissen gut geeignet für die Analyse der Chlamydieninfektion. Obwohl FT-Zellen bzw. menschliche Eileiter in vivo eine hypoxische Umgebung gewohnt sind, lassen sich Auswirkungen von Infektion und Hypoxie darstellen. Im Gegensatz zu HeLa-Zellen sind jedoch die intrazellulären Signalkaskaden noch nicht ausreichend charakterisiert und bedürfen weiterer Forschungen.

8.4 Metabolische Unterschiede beider Zellmodelle

Es wurde beschrieben, dass *C. trachomatis* über Mechanismen verfügt, den zellulären Stoffwechsel zu manipulieren. Ob dies speziell für den Glukosestoffwechsel zutrifft, sollte im Primärzellmodell überprüft werden. Wir wählten für die Analyse den membranständigen Glukosetransporter 1 (GLUT1), der laut früheren Untersuchungen durch Hypoxie und durch *C. trachomatis*-Infektion induziert werden und dem Zellstoffwechsel mehr Glukose als wichtigste Energiequelle bereitstellen kann^{66,67}. Da frühere Studien zeigen, dass die Induktion von GLUT1 bei hoher metabolischer Aktivität

des Pathogens circa 24 h p.i. am stärksten ausgeprägt ist⁶⁷, wurde exemplarisch dieser Zeitpunkt für unsere Untersuchungen gewählt.

Wir konnten eine teilweise signifikante Induktion von GLUT1 durch Hypoxie in HeLa-Zellen zeigen (**Abb. 7.8 A**). Interessanterweise nahm entgegen unseren Erwartungen und der Studienlage⁶⁶ die Infektion mit *C. trachomatis* in unseren Untersuchungen keinen Einfluss auf die Induktion. Die Zellen befanden sich bei der hier verwendeten Infektionsrate möglicherweise in einem Zustand ausreichender Energieversorgung, sodass die in der Literatur beschriebene notwendige Mehrversorgung mit Glukose und die dadurch bedingte GLUT1-Induktion erst bei stärkerer Infektion sichtbar wird. Eventuell ist jedoch auch das HeLa-Modell aufgrund der Immortalisierung der Zellen nicht imstande, adäquat auf die Infektion zu reagieren. Die Zusammensetzung des Nährmediums könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Daher könnte die Induktion von GLUT1 in zukünftigen Versuchen in einem glukosedeprierten Medium untersucht werden.

Im Gegensatz dazu konnte mithilfe dieser Arbeit gezeigt werden, dass GLUT1 in humanen Eileiterzellen im Unterschied zu HeLa-Zellen nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch die Chlamydieninfektion induziert wird (**Abb. 7.8 C**). Dies deutet darauf hin, dass die Zellen bzw. das intrazelluläre Pathogen mehr Glukose zur ATP-Gewinnung benötigen. Eileiterzellen reagieren scheinbar empfindlicher auf Stressoren wie die Infektion als die immortalisierten HeLa-Zellen. Möglich ist auch, dass die bei FT-Zellen höhere Zahl an IFUs, die für eine produktive Infektion erforderlich ist, die Zellen trotz der ähnlichen Infektionsrate bereits mehr beeinträchtigt als HeLa-Zellen und FT-Zellen daher zur Aufrechterhaltung ihrer Grundfunktionen mehr Energie benötigen.

LDHA wird in Tumorzellen bei Hypoxie vermehrt induziert. Dies ist durch den sogenannten Warburg-Effekt bedingt, der besagt, dass Tumorzellen vorwiegend anaerobe Glykolyse zur Energiegewinnung nutzen. Pyruvat wird also nicht in den Mitochondrien oxidiert, sondern zu Laktat abgebaut. Hierdurch entstehen mehr Substrate für den Ribonukleotidstoffwechsel der Zellen, sodass sich der Warburg-Effekt vor allem bei schnell proliferierenden Zellen mit hohem Energiebedarf findet. In infizierten HeLa-Zellen konnte daher ein signifikanter Anstieg der LDHA durch Hypoxie gezeigt werden (**Abb. 7.8 B**). Interessant ist, dass die Infektion mit *C. trachomatis* nicht zu einer Induktion von LDHA führt. Genau wie bei GLUT1 würden wir ebenfalls eine Induktion durch die Infektion

erwarten, da die Laktatproduktion in chlamydieninfizierten Zellen ansteigt⁶⁷ und laut früheren Studien auch unter Normoxie infizierte Zellen den Warburg-Effekt aufweisen⁷¹. Auch hier könnte eine mögliche Erklärung sein, dass zelleigene Mechanismen in den Tumorzellen kompromittiert sind, oder diese durch die Infektion alleine noch nicht so eingeschränkt sind, dass dies in einer messbaren Hochregulierung sichtbar werden würde. Es ist darüber hinaus denkbar, dass lediglich die Enzymaktivität gesteigert wird und eine zusätzliche Induktion nicht nötig ist. Man könnte daher zusätzlich die Laktatkonzentration im Medium bestimmen, um ein Vorhandensein des Warburg-Effekts in unserem Versuchsaufbau zu überprüfen.

FT-Zellen zeigen unter Normoxie eine Tendenz zur LDHA-Induktion durch die Chlamydieninfektion, jedoch nicht unter Hypoxie. In nicht infizierten, hypoxischen Zellen ist jedoch auch ein nicht signifikanter Anstieg der Induktion sichtbar (**Abb. 7.8 D**). Diese Ergebnisse würden die bisherige Studienlage unterstreichen und zeigen, dass der Metabolismus von Primärzellen im Gegensatz zu HeLa-Zellen auf die unterschiedlichen Stimuli reagiert und sich dem erhöhten Energie- und Substratbedarf anpasst. Dies könnte ein möglicher Vorteil des FT-Zellmodells gegenüber der genetisch modifizierten Karzinomzelllinie HeLa sein. Die Ergebnisse für die LDHA sind jedoch nicht signifikant und daher nur eingeschränkt beurteilbar.

8.5 Die Beeinflussung der Infektionsrate durch Estradiol

Die physiologische Konzentration der Sexualhormone Estradiol und Progesteron im FGT variiert deutlich, sowohl nach Alter und Fruchtbarkeitsstatus der Frau als auch im Rahmen des weiblichen Zyklus. Eine tagesgenaue Übersicht an Referenzwerten für E2 und P4 diene als Orientierung für die Versuchsreihen¹³¹. Dieser zufolge weist E2 während des Zyklus durchschnittliche Serumkonzentrationen von 50-400 pg/ml auf, P4 von ca. 5-25 ng/ml. In einer ersten Versuchsreihe (Daten nicht gezeigt) wurden E2-Konzentrationen in 50 pg/ml-Schritten aufwärts bis 400 pg/ml getestet, wobei sich der deutlichste Effekt auf die Infektionsrate bei der Maximalkonzentration zeigte. In weiteren Versuchen wurde daher stets diese verwendet. Gleiches gilt für die Progesteron-Maximalkonzentration (25 ng/ml).

Für HeLa-Zellen ist bekannt, dass unter E2-Einfluss die Adhäsion und Infektionsrate der Chlamydien an die Zellen zunimmt^{83,93,94}. Wir konnten die Zunahme der Infektionsrate in

unseren Versuchen bestätigen, da sich unter Normoxie signifikant mehr Zellen mit Einschlüssen fanden als in nicht mit E2 stimulierten Kontrollen (**Abb. 7.9 E**). Auch unter Hypoxie lässt sich ein Anstieg erkennen. Mögliche Erklärungen könnten folgende rezeptorvermittelte Mechanismen sein: Zum einen wird die chlamydiale Endozytose über zelluläres Clathrin vermittelt¹³². Clathrin interagiert mit dem gut erforschten Östrogenrezeptor ER α und beeinflusst nach E2-Behandlung intrazelluläre Signalwege⁹⁵. Zum anderen ist die Adhäsion an die Wirtszelle über die Protein-Disulfid-Isomerase vermittelt, eine Untereinheit des Östrogenrezeptorkomplexes¹, der möglicherweise nach Stimulation mit E2 eine vermehrte Adhäsion ermöglicht.

Ob diese Mechanismen hier eine Rolle spielen, ist jedoch unklar, insbesondere deshalb, weil oft beschrieben wird, dass HeLa-Zellen ER α nicht stabil exprimieren^{133,134}. Natürlich ist eine Restaktivität dennoch möglich, da andere E2-Experimente in HeLa-Zellen ebenfalls signifikante Ergebnisse aufweisen¹³⁵. Zudem gibt es weitere Östrogenrezeptorvarianten wie ER β , ERR α , GPER oder verschiedene Splicingvarianten, die physiologischerweise im FGT vorkommen und daher auch in unseren Zellen eine Rolle spielen können^{136,137}. Diese Varianten verfügen möglicherweise auch über die oben genannten Mechanismen und stellen hierüber einen Zusammenhang zwischen erhöhter Infektionsrate und Estradiolbehandlung her.

Es sind jedoch auch rezeptorunabhängige Mechanismen für HeLa-Zellen und andere, ER-negative Zellen beschrieben^{118,137,138}. So führt zum Beispiel Estradiol in ER α - und ER β -negativen HCC38-Brustkrebszellen zu einem signifikanten Anstieg der Proteinkinase C¹¹⁸. In HeLa-Zellen konnte wiederum gezeigt werden, dass diese Proteinkinase bei *C. trachomatis*-Infektion vermehrt an die Membran der Einschlussvakuole angelagert und dort phosphoryliert wird¹¹⁹, wo sie wiederum unter anderem die chlamydialen Inc-Membranproteine phosphorylieren kann¹³⁹. Da Inc-Proteine die intrinsische Apoptose der Wirtszelle verhindern können³⁰, sind möglicherweise mehr Zellen mit Einschlussvakuolen darstellbar, die ohne die PKC-Inc-Aktivierung bereits apoptotisch geworden wären und sich somit in der Immunfluoreszenzfärbung nicht mehr hätten darstellen lassen. Dies ist ein möglicher Erklärungsansatz für die vermehrte Infektionsrate, der in weiteren Experimenten erforscht werden könnte. Unabhängig davon sollten die hier verwendeten HeLa-Zellen auf das Vorhandensein von unterschiedlichen Östrogenrezeptoren untersucht werden.

Die Einwirkung von Estradiol auf die Chlamydieninfektion in humanen Primärzellen ist bisher nur wenig untersucht. Wir konnten in diesen keinen Einfluss auf die Infektionsrate nachweisen (**Abb. 7.9 F**). Ursächlich hierfür ist eventuell eine andere Suszeptibilität der Zellen für das Hormon, weshalb auch hier die Östrogenrezeptoren untersucht werden sollten. Die Rolle der PKC und andere mögliche, nicht rezeptorvermittelte Signalwege in Primärzellen des Eileiters sind bisher ebenfalls kaum untersucht.

Ein Zusammenhang mit der geringeren Empfänglichkeit der Primärzellen für die Pathogene selbst (die in Abschnitt 8.1 beschriebene für eine suffiziente Infektion notwendige deutlich höhere IFU-Zahl) ist möglich. Bei Verwendung einer höheren IFU-Zahl wäre ein eventueller Anstieg der Infektionsrate unter E2-Einfluss möglicherweise nachweisbar.

8.6 Infektiosität, Entzündungsparameter und Wirtszellmetabolismus unter E2-Stimulation

Um zu überprüfen, ob Estradiol und seine Auswirkungen auf die Infektionsrate auch die Infektiosität der Chlamydien beeinflussen, wurden Reinfektionsversuche nach E2-Stimulation durchgeführt. Die Entzündungsreaktion und der Glukosemetabolismus der Wirtszelle nach Infektion unter E2-Stimulation wurden ebenfalls untersucht. Wir nahmen an, dass aufgrund der größeren Anzahl an Einschlüssen in HeLa-Zellen insgesamt mehr EBs vorliegen, was wiederum eine höhere Reinfektionsrate zur Folge hätte. Dies konnte jedoch nicht gezeigt werden. Auch konnte entgegen unseren Erwartungen kein Einfluss von Estradiol und der erhöhten Infektionsrate auf die Induktion von proinflammatorischen MAP-Kinasen, Zytokinen oder den Stoffwechsellzymen GLUT1 und LDHA nachgewiesen werden. Mehr Einschlüsse scheinen also nicht automatisch mehr infektiöse Chlamydien oder mehr Entzündung zu bedingen.

Dies könnte folgendermaßen erklärt werden: Es ist beschrieben, dass Estradiol die Transkription chlamydialer Gene verändert. Unter anderem wird der chlamydiale Lipid- und Nukleotidstoffwechsel herunterreguliert¹⁰⁴. Zudem konnte eine vermehrte Transkription von Genen nachgewiesen werden, die mit der Bildung von aberranten RBs in Verbindung gebracht werden, und darüber hinaus morphologisch aberrante RBs gezeigt werden¹⁰⁴. Es wird oft vermutet, dass die morphologisch aberranten RBs mit klinischer Persistenz einhergehen. Eine mögliche durch Estradiol ausgelöste persistierende Infektion wird in der Literatur diskutiert^{98,140}.

Unsere Ergebnisse könnten also durch eine E2-bedingte Veränderung des chlamydialen Stoffwechsels, eventuell im Sinne der Entwicklung aberranter RBs, zu erklären sein. Hinweise liefern für eine Bildung aberranter RBs könnte die Morphologie, nämlich die Einschussgröße in der Immunfluoreszenzfärbung und die Anfertigung elektronenmikroskopischer Bilder. Das Chlamydientranskriptom, insbesondere Gene des Lebenszyklus (z.B. *euo*, *hctA* oder *omcB*), sollte zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht werden. Wenn Stoffwechsel oder Phänotyp in unseren Infektionsversuchen nach E2-Stimulation Veränderungen im Rahmen einer möglicherweise persistierenden Infektion aufweisen würden, könnte dies die unveränderte Reinfektionsrate trotz der höheren Zahl an Einschlüssen erklären.

Bei Doxycyclin-induzierter chlamydialer Persistenz wird eine verringerte Expression der hier untersuchten Zytokine beschrieben, möglicherweise durch geringere chlamydiale Stoffwechselaktivität¹⁴¹. Eine durch Hypoxie ausgelöste Reaktivierung von persistenten Chlamydien nach IFN- γ -Behandlung zeigt verglichen mit einer normoxischen Chlamydieninfektion ebenfalls eine abgeschwächte Entzündungsreaktion⁹⁰. Sollte in unseren Versuchen also eine Umstellung des chlamydialen Stoffwechsels in Richtung estradiol-induzierter Persistenz darstellbar sein, wäre dies eine mögliche Erklärung für die hier nicht nachweisbare verstärkte Entzündungsreaktion unter E2.

Ein weiterer Signalweg, der mit unseren Ergebnissen in Verbindung stehen könnte, ist der Wnt-Signalweg. Dieser wird rezeptorunabhängig von E2 beeinflusst¹¹⁶ und kann sowohl durch chlamydiale Infektion moduliert werden⁷⁵ als auch selbst die Infektion modulieren¹¹⁷. Er dient darüber hinaus als Aktivator zellulären Überlebens und Proliferation. Eine Überschneidung mit inflammatorischen und metabolischen Signalwegen ist daher denkbar und sollte ebenfalls in zukünftigen Studien untersucht werden.

FT-Zellen, die keine Unterschiede in der Infektionsrate aufwiesen, zeigten ebenfalls keine signifikant veränderte Reinfektionsrate. Ein bei stärkerer Infektion nachzuweisender Einfluss ist ähnlich wie bei der Infektionsrate nicht auszuschließen. Der Glukosetransporter 1 wird durch E2, anders als durch Hypoxie und Chlamydieninfektion, nicht vermehrt induziert. Die Laktatdehydrogenase A wird tendenziell durch Hypoxie

induziert; ein Effekt, der durch E2-Behandlung eher verstärkt und durch die Infektion abgemildert zu werden scheint (**Abb. 7.13 D**).

In vivo sind Eileiterzellen hormonellen Einflüssen, also auch Estradiol, ausgesetzt. Unsere Ergebnisse für GLUT1 bilden möglicherweise den Normalzustand in vivo ab, was erklären würde, weshalb sich in vitro keine Auswirkungen auf den Glukosestoffwechsel darstellen ließen. Da die Primärzellen auch aus einer in vivo hypoxischen Umgebung stammen, erklärt sich bei der LDHA der Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie eventuell nicht durch eine vermehrte Induktion unter Hypoxie, sondern durch eine verringerte Induktion unter Normoxie. Bei mehr Sauerstoff in der Umgebung kann mehr aerobe Glykolyse stattfinden, sodass die Zelle weniger LDHA induziert. Da in FT-Zellen die Infektion durch Estradiol insgesamt kaum beeinflusst wird, ist bei den metabolischen Veränderungen davon auszugehen, dass diese direkt durch die E2-Behandlung bedingt sind und nicht, wie in HeLa-Zellen, durch Veränderungen der Infektion durch *C. trachomatis*.

8.7 Estradiol induziert IL-1 β in humanen Eileiterzellen

Das Interleukin 1 hat zwei Unterformen, IL-1 α und IL-1 β , die beide an den IL-1-Rezeptor binden können und über MAP-Kinasen an der Entzündungsreaktion beteiligt sind. IL-1 β wird in endozervikalen Primärzellen durch chlamydiale HSPs induziert⁷⁷ und gilt als wichtiger Faktor bei Entzündungsreaktion und Gewebeschädigung, insbesondere für die zilentragenden Zellen des FT-Zellmodells. Bei Antagonisierung durch den IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1RA) konnte trotz florider Chlamydieninfektion keine Gewebeschädigung mehr nachgewiesen werden⁶¹. Für die Gewebeschädigung bei Infektion ist also nicht nur die chlamydienvermittelte Zellyse verantwortlich. IL-1 β selbst verfügt zwar nicht über chemotaktische Funktionen, ist jedoch imstande, IL-8 zu induzieren und somit die Invasion von Neutrophilen in das infizierte Gewebe zu fördern. In der Pathogenese klinischer Komplikationen kommt diesem Interleukin daher eine besondere Rolle zu. Dies konnte von in vivo-Studien bekräftigt werden⁶³.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Estradiol in humanen Primärzellen IL-1 β induziert. Dieser Effekt ist in hypoxischen, uninfizierten Zellen signifikant, lässt sich jedoch auch in infizierten Zellen sowie unter Normoxie als Tendenz gut erkennen. Da IL-1 β die systemische Entzündungsreaktion fördert und andere Zytokine, darunter IL-8, induziert, wird somit die proinflammatorische Antwort des Zellverbandes nach

Chlamydieninfektion verstärkt. Wir stellen daher die Hypothese auf, dass der Hormonstatus während der Chlamydieninfektion über IL-1 β den klinischen Verlauf beeinflussen kann. Bei prämenopausalen Frauen könnte in diesem Fall eine Infektion in den estradioldominierten ersten zwei Wochen des Zyklus in einer stärkeren Gewebeschädigung resultieren als in den letzten zwei Wochen des weiblichen Zyklus. In Primärzellen aus weiblichen Schweinen konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Infektionsverlauf und zyklusabhängigem Zeitpunkt der Infektion gezeigt werden⁹⁸. Die Beeinflussung des Interleukins 1 β durch E2 ist also möglicherweise einer der Mechanismen, der dies verursacht, wenn auch wahrscheinlich nicht der einzige.

Den Zytokinen kommt möglicherweise noch eine andere Bedeutung zu: gesunde schwangere Frauen, deren Zervix- und Vaginalsekret zwischen der 22. und 34. Schwangerschaftswoche auf Zytokine untersucht wurde, zeigten ein erhöhtes Risiko für eine Frühgeburt, wenn die Proben niedrige Konzentrationen von IL-1 α und/oder IL-1 β enthielten¹⁴². Der Körper produziert im Laufe der Schwangerschaft zunehmend mehr Östrogen. Wenn E2 wiederum proinflammatorisches IL-1 β induziert, könnte dieses bei einer beginnenden Infektion frühzeitig Zellen des Immunsystems rekrutieren und damit eine Ausbreitung der Infektion auf die Fruchthöhle verhindern. E2-induziertes IL-1 β könnte sich somit im Falle einer Infektion protektiv auf die Schwangerschaft auswirken.

Die Induktion von IL-1 β durch E2 scheint jedoch nicht zu einer pERK-Induktion zu führen oder pERK-vermittelt zu sein, da in unseren Versuchen kein Einfluss von Infektion, Hypoxie oder Estradiol auf die Phosphorylierung der MAP-Kinase nachzuweisen ist. Eine IL-1 β -vermittelte Induktion von IL-8 ist laut unseren Ergebnissen möglich, jedoch nicht eindeutig darstellbar. Die Induktion von IL-8 wird jedoch über eine Vielzahl von Signalwegen reguliert, sodass andere Kaskaden und Stimuli hier eventuell im Vordergrund stehen.

8.8 Bedeutung und Ausblick

Infektionsmodelle, die auf Karzinomzelllinien basieren, haben aufgrund der genetischen Veränderung dieser Zellen nur eine eingeschränkte Aussagekraft hinsichtlich des Verlaufes einer Infektion mit *C. trachomatis*. Darüber hinaus wird in diesen Versuchen häufig das Mikromilieu des weiblichen Genitaltraktes, das unter anderem durch niedrige Sauerstoffwerte und hormonelle Modulation gekennzeichnet ist, nicht berücksichtigt. Der

Versuchsaufbau der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bezieht daher die Verwendung von Primärzellen aus dem weiblichen Eileiter und Zellkultur mit Sexualhormonen oder unter Hypoxie mit ein.

Das Primärzellmodell hat sich als geeignetes Modell für die Untersuchung von Chlamydieninfektionen in vitro erwiesen. Es gelangen der Nachweis von Einschlüssen und unterschiedliche Auswertungsmöglichkeiten wie Western Blot oder RT-PCR, so dass sich Ergebnisse aus Primärzellversuchen mit Resultaten aus dem bewährten HeLa-Modell vergleichen lassen. Erschwert wird dies durch die Variabilität von Zellkultur und Auswertungsergebnissen der Eileiter, sodass möglicherweise mehr Wiederholungen durchgeführt werden sollten, um die Aussagekraft der Versuche zu erhöhen. Auf der anderen Seite bildet das Primärzellmodell hiermit die biologische Variabilität unterschiedlicher Patientinnen ab, was Ansatzpunkte für klinische Studien liefern kann. In Zusammenschau sollte das FT-Zellmodell weiter etabliert werden und auch hinsichtlich anderer Stimuli erforscht werden. Ein weiterer aktueller Ansatz ist die Etablierung von Organoidmodellen, die die Handhabung von Primärzellen möglicherweise erleichtern können^{143,144}, oder die Co-Kultur mit Stromazellen, um Interaktionen der verschiedenen Zellen zu überprüfen¹²⁰.

Im weiblichen Genitaltrakt herrschen im Allgemeinen niedrige Sauerstoffkonzentrationen vor. Unter Kulturbedingungen wirkt Hypoxie sowohl auf das Pathogen als auch auf die Wirtszellkultur ein. Unsere Versuche konnten zeigen, dass eine Oxygenierung von 2% O₂ in einer Verzögerung des chlamydialen Lebenszyklus resultiert. Um dieses Ergebnis genauer zu untersuchen, sollte die Transkription der entsprechenden Gene des Proliferationszyklus bestimmt werden. Des Weiteren könnten die dafür ursächlichen Signaltransduktoren untersucht werden, z.B. auf eine mögliche Beteiligung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α . Für den klinischen Aspekt ist jedoch die resultierende Entzündungsreaktion relevanter, da diese zu großen Teilen die Schädigung des Tubengewebes bedingt. Die in unseren Versuchen bestimmten Entzündungsparameter zeigten jedoch keine hypoxiebedingten Veränderungen. Es wäre interessant, die Sauerstoffkonzentrationen im FGT von infizierten Frauen näher zu untersuchen, um eine eventuelle Korrelation in vivo festzustellen.

Das Sexualhormon Estradiol beeinflusst sowohl die Entzündungsreaktion als auch den Wirtszellstoffwechsel. Da der weibliche Genitaltrakt stets wechselnden Konzentrationen von E2 ausgesetzt ist, spielt auch dieses Hormon eine Rolle im Verlauf der Infektion. Die Mechanismen, über welche die Wirkung von E2 vermittelt wird, sind jedoch noch unklar und sollten weiter erforscht werden. So könnten sich zukünftige Versuche mit beteiligten Rezeptoren und intrazellulären Signalkaskaden in beiden Zellmodellen befassen. Die mögliche E2-vermittelte Persistenzinduktion in HeLa-Zellen oder Veränderungen im Metabolismus des Pathogens kann mithilfe des Chlamydientranskriptoms evaluiert werden. Die E2-vermittelte Induktion von IL-1 β in FT-Zellen ist ebenfalls ein interessanter Anhaltspunkt. In vitro sollten IL-1 β -vermittelte Reaktionen wie die Induktion weiterer proinflammatorischer Mediatoren oder eine mögliche Schädigung der Zellstruktur analysiert werden. In vivo konnte die Korrelation zwischen hohen IL-1 β -Spiegeln und tubarer Infertilität bereits gezeigt werden⁶³. Zusätzlich sollte in klinischen Studien der Hormonstatus infizierter Frauen bestimmt werden, um eventuelle Auswirkungen des weiblichen Zyklus auf IL-1 β und auf klinische Komplikationen in vivo zu eruieren.

Um neben Hypoxie und hormoneller Stimulation weitere Faktoren aus der Mikroumgebung des FGT mit einzubeziehen, könnten sich zukünftige Versuche mit dem Einfluss des genitalen Mikrobioms beschäftigen. Als Mikrobiom bezeichnet man die Gesamtheit an mikrobiellen Organismen, die den FGT besiedeln. Es stellt eine wichtige Einflussgröße für zahlreiche Erkrankungen des FGT dar. Auswirkungen auf die Chlamydieninfektion können beispielsweise durch Co-Infektionsversuche mit physiologisch im FGT vorkommenden Bakterien näher untersucht werden.

Mit dem Ziel, in vitro gewonnene Erkenntnisse aus dem FT-Zellmodell mit klinischen Aspekten in Verbindung zu bringen, können Resultate einzelner Tuben mit der Krankheits- oder Sozialanamnese der jeweiligen Eileiterspenderin korreliert werden. Es kann für weitere Versuche relevant sein, ob beispielsweise frühere Chlamydieninfektionen mit einer geringeren Entzündungsantwort einhergehen, oder ob die hier untersuchten Parameter als Biomarker oder Prädiktoren für den klinischen Verlauf dienen könnten. Hierfür ist jedoch eine deutlich größere Zahl an Spenderinnen und Versuchsreihen vonnöten, als für diese Arbeit vorhanden war.

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigt sich, dass das Eileiterzellmodell als gutes Modell für Infektionsversuche mit *C. trachomatis* dient. Des Weiteren wurden die Auswirkungen von Hypoxie und Estradiol auf den Infektionsverlauf gezeigt. Diese Arbeit zeigt unterschiedliche Ansätze auf, herkömmliche Infektionsmodelle zu optimieren und physiologische Stimuli in Zellmodelle einzubeziehen. Ein solches Vorgehen kann möglicherweise zum Verständnis der Infektion in vivo und des klinischen Verlaufes beitragen und so die Prävalenz von genitalen *C. trachomatis*-Infektionen und deren Komplikationen senken.

9 Literaturverzeichnis

1. Davis CH, Raulston JE, Wyrick PB. Protein disulfide isomerase, a component of the estrogen receptor complex, is associated with *Chlamydia trachomatis* serovar E attached to human endometrial epithelial cells. *Infect Immun*. 2002;70(7):3413-3418. doi:10.1128/IAI.70.7.3413-3418.2002.
2. Abromaitis S, Stephens RS. Attachment and entry of chlamydia have distinct requirements for host protein disulfide isomerase. *PLoS Pathog*. 2009;5(4). doi:10.1371/journal.ppat.1000357.
3. Lee JK, Enciso GA, Boassa D, et al. Replication-dependent size reduction precedes differentiation in *Chlamydia trachomatis*. *Nat Commun*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-017-02432-0.
4. Wyrick PB. Intracellular survival by *Chlamydia*. *Cell Microbiol*. 2000;2(4):275-282. doi:10.1046/j.1462-5822.2000.00059.x.
5. Choroszy-KRÓL I, Frej-MĄDRZAK M, Jama-Kmiecik A, Bober T, Sarowska J. Characteristics of the *chlamydia trachomatis* species - Immunopathology and infections. *Adv Clin Exp Med*. 2012;21(6):799-808.
6. Wyrick PB. *Chlamydia trachomatis* persistence in vitro: an overview. *J Infect Dis*. 2010;201 Suppl (Suppl 2):S88-S95. doi:10.1086/652394.
7. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev*. 1994;58(4):686-699.
8. Bavoil PM. What's in a word: the use, misuse, and abuse of the word "persistence" in *Chlamydia* biology. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4(March):27. doi:10.3389/fcimb.2014.00027.
9. Shemer Y, Sarov I. Inhibition of growth of *Chlamydia trachomatis* by human gamma interferon. *Infect Immun*. 1985;48(2):592-596.
10. Ramsey KH, Miranpuri GS, Sigar IM, Ouellette S, Byrne GI. *Chlamydia trachomatis* persistence in the female mouse genital tract: inducible nitric oxide synthase and infection outcome. *Infect Immun*. 2001;69(8):5131-5137. doi:10.1128/IAI.69.8.5131-5137.2001.
11. Kramer MJ, Gordon FB. Ultrastructural Analysis of the Effects of Penicillin and Chlortetracycline on the Development of a Genital Tract *Chlamydia*. *Infect Immun*.

- 1971;3(2):333-341.
12. Matsumoto A, Manire GP. Electron Microscopic Observations on the Effects of Penicillin on the Morphology of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol.* 1970;101(1):278-285.
 13. Kintner J, Lajoie D, Hall J, Whittimore J, Schoborg R V. Commonly prescribed β -lactam antibiotics induce *C. trachomatis* persistence/stress in culture at physiologically relevant concentrations. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4(April):44. doi:10.3389/fcimb.2014.00044.
 14. Raulston JE. Response of *Chlamydia trachomatis* serovar E to iron restriction vitro and evidence for iron-regulated chlamydial proteins. *Infect Immun.* 1997;65(11):4539-4547.
 15. Thompson CC, Carabeo RA. An optimal method of iron starvation of the obligate intracellular pathogen, *Chlamydia trachomatis*. *Front Microbiol.* 2011;2(February):20. doi:10.3389/fmicb.2011.00020.
 16. Dean D, Suchland RJ, Stamm WE. Evidence for long-term cervical persistence of *Chlamydia trachomatis* by omp1 genotyping. *J Infect Dis.* 2000;182(3):909-916. doi:10.1086/315778.
 17. Bragina EY, Gomberg MA, Dmitriev GA. Electron microscopic evidence of persistent chlamydial infection following treatment. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2001;15(5):405-409. doi:10.1046/j.1468-3083.2001.00342.x.
 18. Lewis ME, Belland RJ, AbdelRahman YM, et al. Morphologic and molecular evaluation of *Chlamydia trachomatis* growth in human endocervix reveals distinct growth patterns. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4(June):71. doi:10.3389/fcimb.2014.00071.
 19. Gehre L, Gorgette O, Perrinet S, et al. Sequestration of host metabolism by an intracellular pathogen. *Elife.* 2016;5(MARCH2016). doi:10.7554/eLife.12552.
 20. Omsland A, Sager J, Nair V, Sturdevant DE, Hackstadt T. Developmental stage-specific metabolic and transcriptional activity of *Chlamydia trachomatis* in an axenic medium. 2012;109(48):19781-19785. doi:10.1073/pnas.1212831109.
 21. Saka HA, Thompson JW, Chen YS, et al. Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of *Chlamydia trachomatis* developmental forms. *Mol Microbiol.* 2011;82(5):1185-1203. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07877.x.

22. Mehlitz A, Eylert E, Huber C, et al. Metabolic adaptation of *Chlamydia trachomatis* to mammalian host cells. *Mol Microbiol.* 2017;103(6):1004-1019. doi:10.1111/mmi.13603.
23. Tipples G, McClarty G. The obligate intracellular bacterium *Chlamydia trachomatis* is auxotrophic for three of the four ribonucleoside triphosphates. *Mol Microbiol.* 1993;8(6):1105-1114. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01655.x.
24. Hackstadt T, Scidmore MA, Rockey DD. Lipid metabolism in *Chlamydia trachomatis*-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(11):4877-4881. doi:10.1073/pnas.92.11.4877.
25. Carabeo RA, Mead DJ, Hackstadt T. Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(11):6771-6776. doi:10.1073/pnas.1131289100.
26. Dumoux M, Menny A, Delacour D, Hayward RD. A *Chlamydia* effector recruits CEP170 to reprogram host microtubule organization. *Co Biol.* 2015;128(July):3420-3434. doi:10.1242/jcs.169318.
27. Wesolowski J, Weber MM, Nawrotek A, et al. *Chlamydia* hijacks ARF GTPases to coordinate microtubule posttranslational modifications and golgi complex positioning. *MBio.* 2017;8(3). doi:10.1128/mBio.02280-16.
28. Al-Zeer MA, Al-Younes HM, Kerr M, et al. *Chlamydia trachomatis* remodels stable microtubules to coordinate Golgi stack recruitment to the chlamydial inclusion surface. *Mol Microbiol.* 2014;94(6):1285-1297. doi:10.1111/mmi.12829.
29. Pais S V., Key CE, Borges V, et al. CteG is a *Chlamydia trachomatis* effector protein that associates with the Golgi complex of infected host cells. *Sci Rep.* 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-42647-3.
30. Weber MM, Lam JL, Dooley CA, et al. Absence of Specific *Chlamydia trachomatis* Inclusion Membrane Proteins Triggers Premature Inclusion Membrane Lysis and Host Cell Death. *Cell Rep.* 2017;19(7):1406-1417. doi:10.1016/j.celrep.2017.04.058.
31. Gulve N, Prusty BK, Rudel T. *Chlamydia trachomatis* impairs host base excision repair by downregulating polymerase β . *Cell Microbiol.* 2019;21(4). doi:10.1111/cmi.12986.
32. Waguia Kontchou C, Tzivelekidis T, Gentle IE, Häcker G. Infection of epithelial cells

- with *Chlamydia trachomatis* inhibits TNF-induced apoptosis at the level of receptor internalization while leaving non-apoptotic TNF-signalling intact. *Cell Microbiol.* 2016;18(11):1583-1595. doi:10.1111/cmi.12598.
33. Fan T, Lu H, Hu H, et al. Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med.* 1998;187(4):487-496. doi:10.1084/jem.187.4.487.
 34. Hess S, Rheinheimer C, Tidow F, et al. The reprogrammed host: *Chlamydia trachomatis*-induced up-regulation of glycoprotein 130 cytokines, transcription factors, and antiapoptotic genes. *Arthritis Rheum.* 2001;44(10):2392-2401. doi:10.1002/1529-0131(200110)44:10<2392::AID-ART404>3.0.CO;2-I.
 35. Amjadi F, Zandieh Z, Salehi E, et al. Variable localization of Toll-like receptors in human fallopian tube epithelial cells. *Clin Exp Reprod Med.* 2018;45(1):1-9. doi:10.5653/cerm.2018.45.1.1.
 36. Lad SP, Li J, da Silva Correia J, et al. Cleavage of p65 / RelA of the NF-kappaB pathway by *Chlamydia*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(8):2933-2938. doi:10.1073/pnas.0608393104.
 37. 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.* 1999;189(12):1931-1938.
 38. 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.* 2000;191(9):1525-1534. doi:10.1084/jem.191.9.1525.
 39. Bastidas RJ, Elwell CA, Engel JN, Valdivia RH. *Chlamydial* intracellular survival strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(5). doi:10.1101/cshperspect.a010256.
 40. Elwell C, Mirrashidi K, Engel J. *Chlamydia* cell biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(6):385-400. doi:10.1038/nrmicro.2016.30.
 41. CDC. *Reported STDs in the United States, 2016 High Burden of STDs Threaten Millions of Americans.*; 2016.
 42. Kavanagh K, Wallace L a., Robertson C, Wilson P, Scoular A. Estimation of the risk of tubal factor infertility associated with genital *chlamydial* infection in women: A

- statistical modelling study. *Int J Epidemiol.* 2013;42(March):493-503.
doi:10.1093/ije/dyt011.
43. Scott Lamontagne D, Baster K, Emmett L, et al. Incidence and reinfection rates of genital chlamydial infection among women aged 16-24 years attending general practice, family planning and genitourinary medicine clinics in England: a prospective cohort study by the Chlamydia Recall Study Advisory Group. *Sex Transm Infect.* 2007;83(4):292-303. doi:10.1136/sti.2006.022053.
 44. Walker J, Tabrizi SN, Fairley CK, et al. Chlamydia trachomatis incidence and re-infection among young women--behavioural and microbiological characteristics. *PLoS One.* 2012;7(5):e37778. doi:10.1371/journal.pone.0037778.
 45. Aghaizu A, Reid F, Kerry S, et al. Frequency and risk factors for incident and redetected Chlamydia trachomatis infection in sexually active, young, multi-ethnic women: a community based cohort study. *Sex Transm Infect.* 2014;90(7):524-528. doi:10.1136/sextrans-2014-051607.
 46. Batteiger BE, Tu W, Ofner S, et al. Repeated *Chlamydia trachomatis* Genital Infections in Adolescent Women. *J Infect Dis.* 2010;201(1):42-51. doi:10.1086/648734.
 47. Hoenderboom BM, Van Benthem BHB, Van Bergen JEAM, et al. Relation between Chlamydia trachomatis infection and pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy and tubal factor infertility in a Dutch cohort of women previously tested for chlamydia in a chlamydia screening trial. *Sexually Transmitted Infections.* 2018.
 48. Carey AJ, Beagley KW. Chlamydia trachomatis, a hidden epidemic: effects on female reproduction and options for treatment. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(6):576-586. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00819.x.
 49. Stephens RS. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol.* 2003;11(1):44-51. doi:10.1016/S0966-842X(02)00011-2.
 50. Yang C, Whitmire WM, Sturdevant GL, Bock K, Moore I, Caldwell HD. Infection of hysterectomized mice with *Chlamydia muridarum* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 2017;85(7). doi:10.1128/IAI.00197-17.
 51. Roshick C, Wood H, Caldwell HD, McClarty G. Comparison of gamma interferon-mediated antichlamydial defense mechanisms in human and mouse cells. *Infect Immun.* 2006;74(1):225-238. doi:10.1128/IAI.74.1.225-238.2006.

52. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008;134(5):703-707. doi:10.1016/j.cell.2008.08.021.
53. O'Connell CM, Ionova IA, Quayle AJ, Visintin A, Ingalls RR. Localization of TLR2 and MyD88 to Chlamydia trachomatis inclusions: Evidence for signaling by intracellular TLR2 during infection with an obligate intracellular pathogen. *J Biol Chem*. 2006;281(3):1652-1659. doi:10.1074/jbc.M510182200.
54. Su H, McClarty G, Dong F, Hatch GM, Pan ZK, Zhong G. Activation of Raf/MEK/ERK/cPLA2 Signaling Pathway Is Essential for Chlamydial Acquisition of Host Glycerophospholipids. *J Biol Chem*. 2004;279(10):9409-9416. doi:10.1074/jbc.M312008200.
55. Buchholz KR, Stephens RS. The extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway induces the inflammatory factor interleukin-8 following Chlamydia trachomatis infection. *Infect Immun*. 2007;75(12):5924-5929. doi:10.1128/IAI.01029-07.
56. Mukura LR, Hickey DK, Rodriguez-Garcia M, Fahey J V., Wira CR. Chlamydia trachomatis regulates innate immune barrier integrity and mediates cytokine and antimicrobial responses in human uterine ECC-1 epithelial cells. *Am J Reprod Immunol*. 2017;78(6). doi:10.1111/aji.12764.
57. Mukaida N, Matsumoto T, Yokoi K, Harada A, Matsushima K. Inhibition of neutrophil-mediated acute inflammation injury by an antibody against interleukin-8 (IL-8). *Inflamm Res*. 1998;47 Suppl 3:S151-S157.
58. Buchholz KR, Stephens RS. The cytosolic pattern recognition receptor NOD1 induces inflammatory interleukin-8 during Chlamydia trachomatis infection. *Infect Immun*. 2008;76(7):3150-3155. doi:10.1128/IAI.00104-08.
59. Chen F, Cheng W, Zhang S, Zhong G, Yu P. [Induction of IL-8 by Chlamydia trachomatis through MAPK pathway rather than NF-kappaB pathway]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2010;35(4):307-313. doi:10.3969/j.issn.1672-7347.2010.04.005.
60. Rasmussen SJ, Eckmann L, Quayle AJ, et al. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest*. 1997;99(1):77-87. doi:10.1172/JCI119136.

61. Hvid M, Baczynska A, Deleuran B, et al. Interleukin-1 is the initiator of Fallopian tube destruction during Chlamydia trachomatis infection. *Cell Microbiol.* 2007;9(12):2795-2803. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00996.x.
62. Yang H-T, Cohen P, Rousseau S. IL-1beta-stimulated activation of ERK1/2 and p38alpha MAPK mediates the transcriptional up-regulation of IL-6, IL-8 and GRO-alpha in HeLa cells. *Cell Signal.* 2008;20(2):375-380. doi:10.1016/j.cellsig.2007.10.025.
63. Shao R, Feng Y, Zou S, Li X, Cui P, Billig H. Quantitative analysis of hormones and inflammatory cytokines in Chlamydia trachomatis-infected women with tubal ectopic pregnancy and early intrauterine pregnancy. *Data Br.* 2016;6:135-142. doi:10.1016/j.dib.2015.11.048.
64. Balasubramaniam ES, Van Noorden S, El-Bahrawy M. The expression of interleukin (IL)-6, IL-8, and their receptors in fallopian tubes with ectopic tubal gestation. *Fertil Steril.* 2012;98(4):898-904. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.06.004.
65. Ohmer M, Tzivelekidis T, Niedenführ N, et al. Infection of HeLa cells with Chlamydia trachomatis inhibits protein synthesis and causes multiple changes to host cell pathways. *Cell Microbiol.* 2019;21(4). doi:10.1111/cmi.12993.
66. Maffei B, Laverrière M, Wu Y, et al. Infection-driven activation of transglutaminase 2 boosts glucose uptake and hexosamine biosynthesis in epithelial cells. *EMBO J.* 2020;39(8). doi:10.15252/embj.2019102166.
67. Ojcius DM, 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.* 1998;273(12):7052-7058.
68. Zhang JZ, Behrooz a, Ismail-Beigi F. Regulation of glucose transport by hypoxia. *Am J Kidney Dis.* 1999;34(1):189-202. doi:10.1053/AJKD03400189.
69. Hellwig-Bürgel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzen E, Jelkmann W. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res.* 2005;25(6):297-310. doi:10.1089/jir.2005.25.297.
70. Shim H, Dolde C, Lewis BC, et al. c-Myc transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(13):6658-6663. doi:10.1073/pnas.94.13.6658.
71. Rother M, Gonzalez E, Teixeira da Costa AR, et al. Combined Human Genome-wide

- RNAi and Metabolite Analyses Identify IMPDH as a Host-Directed Target against Chlamydia Infection. *Cell Host Microbe*. 2018;23(5):661-671.e8. doi:10.1016/j.chom.2018.04.002.
72. Levanon K, Ng V, Piao HY, et al. Primary ex vivo cultures of human fallopian tube epithelium as a model for serous ovarian carcinogenesis. *Oncogene*. 2010;29(8):1103-1113. doi:10.1038/onc.2009.402.
73. Fotheringham S, Levanon K, Drapkin R. Ex Vivo Culture of Primary Human Fallopian Tube Epithelial Cells. *J Vis Exp*. 2011;(51):3-7. doi:10.3791/2728.
74. Jerchel S, Knebel G, König P, Bohlmann MK, Rupp J. A human fallopian tube model for investigation of *C. trachomatis* infections. *J Vis Exp*. 2012;(66):1-6. doi:10.3791/4036.
75. Kessler M, Zielecki J, Thieck O, Mollenkopf HJ, Fotopoulou C, Meyer TF. Chlamydia trachomatis disturbs epithelial tissue homeostasis in fallopian tubes via paracrine Wnt signaling. *Am J Pathol*. 2012;180(1):186-198. doi:10.1016/j.ajpath.2011.09.015.
76. Wang J, Frohlich KM, Buckner L, et al. Altered protein secretion of chlamydia trachomatis in persistently infected human endocervical epithelial cells. *Microbiology*. 2011;157(10):2759-2771. doi:10.1099/mic.0.044917-0.
77. Jha R, Vardhan H, Bas S, Salhan S, Mittal A. Chlamydia trachomatis heat shock proteins 60 and 10 induce apoptosis in endocervical epithelial cells. *Inflamm Res*. 2011;60(1):69-78. doi:10.1007/s00011-010-0237-x.
78. Cunningham K, Stansfield SH, Patel P, et al. The IL-6 response to Chlamydia from primary reproductive epithelial cells is highly variable and may be involved in differential susceptibility to the immunopathological consequences of chlamydial infection. *BMC Immunol*. 2013;14(1). doi:10.1186/1471-2172-14-50.
79. Gupta R, Srivastava P, Vardhan H, Salhan S, Mittal A. Host immune responses to chlamydial inclusion membrane proteins B and C in Chlamydia trachomatis infected women with or without fertility disorders. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7. doi:10.1186/1477-7827-7-38.
80. Ramraj. Correlation of Clinical Data with Fallopian Tube Specimen Immune Cells and Tissue Culture Capacity. *Tissue Cell*. 2018;176(1):139-148. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

81. Lawrenson K, Notaridou M, Lee N, et al. In vitro three-dimensional modeling of fallopian tube secretory epithelial cells. *BMC Cell Biol.* 2013;14(1):1. doi:10.1186/1471-2121-14-43.
82. Moorman DR, Sixbey JW, Wyrick PB. Interaction of Chlamydia trachomatis with human genital epithelium in culture. *J Gen Microbiol.* 1986;132(4):1055-1067. doi:10.1099/00221287-132-4-1055.
83. Maslow AS, Davis CH, Choong J, Wyrick PB. Estrogen enhances attachment of Chlamydia trachomatis to human endometrial epithelial cells in vitro. *Am J Obs Gynecol.* 1988;159(4):1006-1014.
84. Sommer F, Caspers HP, Esders K, Klotz T, Engelmann U. Measurement of vaginal and minor labial oxygen tension for the evaluation of female sexual function. *J Urol.* 2001;165(4):1181-1184. doi:10.1016/S0022-5347(05)66461-0.
85. Schlenger K, Vaupel P. Oxygenation of Carcinomas of the Uterine Cervix: Evaluation by Computerized O₂ Tension Measurements. *Cancer Res.* 1991;51(22):6098-6102.
86. Maybin JA, Murray AA, Saunders PTK, Hirani N, Carmeliet P, Critchley HOD. Hypoxia and hypoxia inducible factor-1 α are required for normal endometrial repair during menstruation. *Nat Commun.* 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-017-02375-6.
87. Juul N, Jensen H, Hvid M, Christiansen G, Birkelund S. Characterization of in vitro chlamydial cultures in low-oxygen atmospheres. *J Bacteriol.* 2007;189(18):6723-6726. doi:10.1128/JB.00279-07.
88. Szaszák M, Shima K, Käding N, Hannus M, Solbach W, Rupp J. Host metabolism promotes growth of Chlamydia pneumoniae in a low oxygen environment. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(5):239-246. doi:10.1016/j.ijmm.2013.03.005.
89. Roth A, König P, van Zandbergen G, et al. Hypoxia abrogates antichlamydial properties of IFN- γ in human fallopian tube cells in vitro and ex vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(45):19502-19507. doi:10.1073/pnas.1008178107.
90. Jerchel S, Kaufhold I, Schuchardt L, Shima K, Rupp J. Host immune responses after hypoxic reactivation of IFN- γ induced persistent Chlamydia trachomatis infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4. doi:10.3389/fcimb.2014.00043.
91. Shima K, Klinger M, Solbach W, Rupp J. Activities of first-choice antimicrobials against gamma interferon-treated chlamydia trachomatis differ in hypoxia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(6):2828-2830. doi:10.1128/AAC.02211-12.

92. Kalir T, Rahaman J, Hagopian G, Demopoulos R, Cohen C, Burstein DE. Immunohistochemical detection of glucose transporter GLUT1 in benign and malignant fallopian tube epithelia, with comparison to ovarian carcinomas. *Arch Pathol Lab Med*. 2005;129(5):651-654. doi:OA-2004-164 [pii].
93. Bose SK, Goswami PC. Enhancement of adherence and growth of Chlamydia trachomatis by estrogen treatment of HeLa cells. *Infect Immun*. 1986;53(3):646-650.
94. Sugarman B, Agbor P. Estrogens and Chlamydia trachomatis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1986;183(1):125-131. doi:10.3181/00379727-183-42396.
95. Totta P, Pesiri V, Enari M, Marino M, Acconcia F. Clathrin heavy chain interacts with estrogen receptor α and modulates 17 β -estradiol signaling. *Mol Endocrinol*. 2015;29(5):739-755. doi:10.1210/me.2014-1385.
96. Hall JV, Schell M, Dessus-Babus S, et al. The multifaceted role of oestrogen in enhancing chlamydia trachomatis infection in polarized human endometrial epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2011;13(8):1183-1199. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01608.x.
97. Wyrick PB, Choong J, Davis CH, et al. Entry of genital Chlamydia trachomatis into polarized human epithelial cells. *Infect Immun*. 1989;57(8):2378-2389.
98. Guseva N V., Knight ST, Whittimore JD, Wyrick PB. Primary cultures of female swine genital epithelial cells in vitro: A new approach for the study of hormonal modulation of chlamydia infection. *Infect Immun*. 2003;71(8):4700-4710. doi:10.1128/IAI.71.8.4700-4710.2003.
99. MacDonald EM, Savoy A, Gillgrass A, et al. Susceptibility of human female primary genital epithelial cells to herpes simplex virus, type-2 and the effect of TLR3 ligand and sex hormones on infection. *Biol Reprod*. 2007;77(September):1049-1059. doi:10.1095/biolreprod.107.063933.
100. Rank RG, White HJ, Hough Jr. AJ, Pasley JN, Barron AL. Effect of estradiol on chlamydial genital infection of female guinea pigs. *Infect Immun*. 1982;38(2):699-705.
101. Baeten JM, Nyange PM, Richardson BA, et al. Hormonal contraception and risk of sexually transmitted disease acquisition: Results from a prospective study. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;185(2):380-385. doi:10.1067/mob.2001.115862.

102. McGregor JA, Hammill HA. Contraception and sexually transmitted diseases: Interactions and opportunities. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168(6):2033-2041. doi:10.1016/S0002-9378(12)90946-1.
103. Kaushic C, Zhou F, Murdin a D, Wira CR. Effects of estradiol and progesterone on susceptibility and early immune responses to Chlamydia trachomatis infection in the female reproductive tract. *Infect Immun.* 2000;68(7):4207-4216. doi:10.1128/IAI.68.7.4207-4216.2000.
104. Amirshahi A, Wan C, Beagley K, Latter J, Symonds I, Timms P. Modulation of the Chlamydia trachomatis in vitro transcriptome response by the sex hormones estradiol and progesterone. *BMC Microbiol.* 2011;11. doi:10.1186/1471-2180-11-150.
105. Agrawal T, Vats V, Wallace PK, Salhan S, Mittal A. Cervical Cytokine Responses in Women with Primary Or Recurrent Chlamydial Infection. *J Interf Cytokine Res.* 2007;27(3):221-226. doi:10.1089/jir.2006.0132.
106. Agrawal T, Vats V, Wallace PK, Salhan S, Mittal A. Role of cervical dendritic cell subsets, co-stimulatory molecules, cytokine secretion profile and beta-estradiol in development of sequelae to Chlamydia trachomatis infection. *Reprod Biol Endocrinol.* 2008;6. doi:10.1186/1477-7827-6-46.
107. Agrawal T, Bhengraj AR, Vats V, Mittal A. Chlamydia trachomatis: TLR4-mediated recognition by human dendritic cells is impaired following oestradiol treatment. *Br J Biomed Sci.* 2013;70(2):51-57. doi:10.1080/09674845.2013.11669935.
108. Lashkari BS, Anumba DOC. Estradiol alters the immune-responsiveness of cervical epithelial cells stimulated with ligands of Toll-like receptors 2 and 4. *PLoS One.* 2017;12(3). doi:10.1371/journal.pone.0173646.
109. Eddie SL, Quartuccio SM, Zhu J, et al. Three-dimensional modeling of the human fallopian tube fimbriae. *Gynecol Oncol.* 2015;136(2):348-354. doi:10.1016/j.ygyno.2014.12.015.
110. Bahar-Shany K, Brand H, Sapoznik S, et al. Exposure of fallopian tube epithelium to follicular fluid mimics carcinogenic changes in precursor lesions of serous papillary carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2014;132(2):322-327. doi:10.1016/j.ygyno.2013.12.015.
111. De Los Santos MJ, García-Laez V, Beltrán D, et al. The follicular hormonal profile in low-responder patients undergoing unstimulated cycles: Is it hypoandrogenic?

- Hum Reprod.* 2013;28(1):224-229. doi:10.1093/humrep/des349.
112. Palma-Vera SE, Schoen J, Chen S. Periovulatory follicular fluid levels of estradiol trigger inflammatory and DNA damage responses in oviduct epithelial cells. *PLoS One.* 2017;12(2). doi:10.1371/journal.pone.0172192.
 113. Grandi G, Mueller MD, Papadia A, et al. Inflammation influences steroid hormone receptors targeted by progestins in endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Reprod Immunol.* 2016;117:30-38. doi:10.1016/j.jri.2016.06.004.
 114. Guseva N V., Dessus-Babus SC, Whittimore JD, Moore CG, Wyrick PB. Characterization of estrogen-responsive epithelial cell lines and their infectivity by genital *Chlamydia trachomatis*. *Microbes Infect.* 2005;7(15):1469-1481. doi:10.1016/j.micinf.2005.05.004.
 115. Das SK, Tan J, Raja S, Halder J, Paria BC, Dey SK. Estrogen targets genes involved in protein processing, calcium homeostasis, and wnt signaling in the mouse uterus independent of estrogen receptor-alpha and -beta [In Process Citation]. *J Biol Chem.* 2000;275(37):28834-28842.
 116. Wang Y, Hanifi-Moghaddam P, Hanekamp EE, et al. Progesterone inhibition of Wnt/ β -catenin signaling in normal endometrium and endometrial cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(18):5784-5793. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0814.
 117. Kintner J, Moore CG, Whittimore JD, Butler M, Hall J V. Inhibition of Wnt Signaling Pathways Impairs *Chlamydia trachomatis* Infection in Endometrial Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(December):1-10. doi:10.3389/fcimb.2017.00501.
 118. Boyan BD, Sylvia VL, Frambach T, et al. Estrogen-dependent rapid activation of protein kinase C in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells and estrogen receptor-negative HCC38 cells is membrane-mediated and inhibited by tamoxifen. *Endocrinology.* 2003;144(5):1812-1824. doi:10.1210/en.2002-221018.
 119. Sah P, Nelson NH, Shaw JH, Lutter EI. *Chlamydia trachomatis* recruits protein kinase C during infection. *Pathog Dis.* 2019;77(6). doi:10.1093/femspd/ftz061.
 120. Kintner J, Schoborg R V., Wyrick PB, Hall J V. Progesterone antagonizes the positive influence of estrogen on *Chlamydia trachomatis* serovar E in an Ishikawa/SHT-290 co-culture model. *Pathog Dis.* 2015;73(4). doi:10.1093/femspd/ftv015.
 121. Wan C, Latter JL, Amirshahi A, et al. Progesterone Activates Multiple Innate Immune Pathways in *Chlamydia trachomatis*-Infected Endocervical Cells. *Am J*

- Reprod Immunol*. 2014;71(2):165-177. doi:10.1111/aji.12168.
122. Jacobson DL, Peralta L, Farmer M, Graham NMH, Gaydos C, Zenilman J. Relationship of hormonal contraception and cervical ectopy as measured by computerized planimetry to chlamydial infection in adolescents. *Sex Transm Dis*. 2000;27(6):313-319. doi:10.1097/00007435-200007000-00003.
123. Woods MW, Zahoor MA, Dizzell S, Verschoor CP, Kaushic C. Medroxyprogesterone acetate-treated human, primary endometrial epithelial cells reveal unique gene expression signature linked to innate immunity and HIV-1 susceptibility. *Am J Reprod Immunol*. 2018;79(1). doi:10.1111/aji.12781.
124. Quispe Calla NE, Ghonime MG, Cherpes TL, Vicetti Miguel RD. Medroxyprogesterone acetate impairs human dendritic cell activation and function. *Hum Reprod*. 2015;30(5):1169-1177. doi:10.1093/humrep/dev035.
125. Huijbregts RP, Helton ES, Michel KG, et al. Hormonal contraception and HIV-1 infection: medroxyprogesterone acetate suppresses innate and adaptive immune mechanisms. *Endocrinology*. 2013;154(3):1282-1295. doi:10.1210/en.2012-1850.
126. Hart KM, Murphy AJ, Barrett KT, Wira CR, Guyre PM, Pioli PA. Functional expression of pattern recognition receptors in tissues of the human female reproductive tract. *J Reprod Immunol*. 2009;80(1-2):33-40. doi:10.1016/j.jri.2008.12.004.
127. Fichorova RN, Cronin AO, Lien E, Anderson DJ, Ingalls RR. Response to Neisseria gonorrhoeae by Cervicovaginal Epithelial Cells Occurs in the Absence of Toll-Like Receptor 4-Mediated Signaling . *J Immunol*. 2002;168(5):2424-2432. doi:10.4049/jimmunol.168.5.2424.
128. Ault KA, Kelly KA, Ruther PE, et al. Chlamydia trachomatis enhances the expression of matrix metalloproteinases in an in vitro model of the human fallopian tube infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187(5):1377-1383. doi:10.1067/mob.2002.126850.
129. George SHL, Greenaway J, Milea A, et al. Identification of abrogated pathways in fallopian tube epithelium from BRCA1 mutation carriers. *J Pathol*. 2011;225(1):106-117. doi:10.1002/path.2927.
130. Lenz JD, Dillard JP. Pathogenesis of neisseria gonorrhoeae and the host defense in ascending infections of human fallopian tube. *Front Immunol*. 2018;9(NOV):1-18. doi:10.3389/fimmu.2018.02710.

131. Stricker R, Eberhart R, Chevailler MC, Quinn FA, Bischof P, Stricker R. Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT® analyzer. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(7):883-887. doi:10.1515/CCLM.2006.160.
132. Hybiske K, Stephens RS. Mechanisms of Chlamydia trachomatis entry into nonphagocytic cells. *Infect Immun*. 2007;75(8):3925-3934. doi:10.1128/IAI.00106-07.
133. Zirngibl RA, Chan JSM, Aubin JE. Estrogen receptor-related receptor α (ERR α) regulates osteopontin expression through a non-canonical ERR α response element in a cell context-dependent manner. *J Mol Endocrinol*. 2008;40(1-2):61-73. doi:10.1677/JME-07-0114.
134. Jung E, Jang S, Lee J, et al. Truncated SRA RNA derivatives inhibit estrogen receptor- α -mediated transcription. *Mol Biol Rep*. 2016;43(10):1019-1025. doi:10.1007/s11033-016-4039-2.
135. Ramírez-López IG, Ramírez De Arellano A, Jave-Suárez LF, et al. Interaction between 17 β -estradiol, prolactin and human papillomavirus induce E6/E7 transcript and modulate the expression and localization of hormonal receptors. *Cancer Cell Int*. 2019;19(1):1-10. doi:10.1186/s12935-019-0935-6.
136. Bollig A, Miksicek RJ. An Estrogen Receptor- α Splicing Variant Mediates Both Positive and Negative Effects on Gene Transcription. *Mol Endocrinol*. 2000;14(5):634-649. doi:10.1210/mend.14.5.0460.
137. Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Vol 116. ; 2019:135-170. doi:10.1016/bs.apcsb.2019.01.001.
138. Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: Convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*. 2005;19(4):833-842. doi:10.1210/me.2004-0486.
139. Zadora PK, Chumduri C, Imami K, et al. Integrated Phosphoproteome and Transcriptome Analysis Reveals Chlamydia-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Host Cells. *Cell Rep*. 2019;26(5):1286-1302.e8. doi:10.1016/j.celrep.2019.01.006.

140. Álvarez D, Caro MR, Buendía AJ, et al. Effect of female sex hormones on the developmental cycle of *Chlamydia abortus* compared to a penicillin-induced model of persistent infection. *BMC Vet Res.* 2019;15(1):259. doi:10.1186/s12917-019-2013-7.
141. Mpiga P, Mansour S, Morisset R, Beaulieu R, Ravaoarinoro M. Sustained interleukin-6 and interleukin-8 expression following infection with *Chlamydia trachomatis* serovar L2 in a HeLa/THP-1 cell co-culture model. *Scand J Immunol.* 2006;63(3):199-207. doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01734.x.
142. Kalinka J, Sobala W, Wasiela M, Brzezińska-Błaszczak E. Decreased proinflammatory cytokines in cervicovaginal fluid, as measured by midgestation, are associated with preterm delivery. *Am J Reprod Immunol.* 2005;54(2):70-76. doi:10.1111/j.1600-0897.2005.00289.x.
143. Xie Y, Park ES, Xiang D, Li Z. Long-term organoid culture reveals enrichment of organoid-forming epithelial cells in the fimbrial portion of mouse fallopian tube. *Stem Cell Res.* 2018;32:51-60. doi:10.1016/j.scr.2018.08.021.
144. Chang YH, Chu TY, Ding DC. Human fallopian tube epithelial cells exhibit stemness features, self-renewal capacity, and Wnt-related organoid formation. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):32. doi:10.1186/s12929-019-0602-1.

10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.1:	Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von Chlamydia spp.....	8
Abb. 7.1:	Infektionsraten in HeLa und FT unter Normoxie und Hypoxie.....	37
Abb. 7.2:	Unterschiede in Morphologie und Wachstum humaner Eileiterzellen.....	38
Abb. 7.3:	Darstellung der Reinfektionsraten unter Normoxie und Hypoxie.....	40
Abb. 7.4:	Western Blot-Analyse zur Phosphorylierung von ERK1/2 in HeLa-Zellen...	41
Abb. 7.5:	Western Blot-Analyse zur Phosphorylierung von ERK1/2 in FT-Zellen.....	42
Abb. 7.6:	mRNA-Induktion der proinflammatorischen Zytokine in HeLa-Zellen.....	43
Abb. 7.7:	mRNA-Induktion der proinflammatorischen Zytokine in FT-Zellen.....	44
Abb. 7.8:	Schlüsselenzyme im Zellstoffwechsel von HeLa- und FT-Zellen.....	46
Abb. 7.9:	Der Einfluss von Estradiol auf die Infektionsraten in HeLa- und FT-Zelle....	47
Abb. 7.10:	Der Einfluss von Estradiol auf die Infektiosität von <i>C. trachomatis</i>	48
Abb. 7.11:	Western Blot-Analyse vom pERK1/2 nach hormoneller Stimulation.....	48
Abb. 7.12:	Unterschiede in der Zytokininduktion nach Infektion und E2-Gabe.....	50
Abb. 7.13:	Unterschiede im Zellstoffwechsel nach Infektion und E2-Gabe.....	51

10.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht über die verwendeten Dauerkulturzelllinien.....	25
Tab. 2:	Primersequenzen für die quantitative RT-PCR.....	26

11 Anhang

11.1 Danksagung

Abschließend möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. med. Jan Rupp für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe angefertigt haben zu dürfen. Die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die konstruktiven Anregungen und nicht zuletzt die Geduld haben sehr zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank!

Bei den Verantwortlichen des DFG-Graduiertenkollegs RTG 1743 „Genes, Environment and Inflammation“ möchte ich mich für die Chance bedanken, meine Arbeit im Rahmen des Stipendiums absolviert haben zu dürfen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Michael Bohlmann, inzwischen Chefarzt des Zentrums für Gynäkologie und Geburtshilfe im St. Elisabethenkrankenhaus in Lörrach, und der Frauenklinik des UKSH in Lübeck für die Bereitstellung von Patientenmaterial.

Ich danke Dr. Stefan Jerchel für die gute Betreuung, das Mentoring sowie für die Unterstützung und gelegentlich notwendige Aufheiterung.

Auch danke ich Dr. Simon Graspeuntner für die kompetente Beratung hinsichtlich aller statistischen Fragen und wissenschaftlichem Arbeiten.

Bei Anke Hellberg, Kristin Wischnat, Siegrid Pätzmann und Angela Gravenhorst bedanke ich mich ebenfalls für die Einarbeitung im Labor und die vielen Antworten auf meine Fragen. Auch danke ich meinen Kollegen Nadja Käding, Kensuke Shima, Dirk Friedrich, Inga Kaufhold und Lea Bartsch für die vielen Ratschläge, hilfreichen Diskussionen und die schöne Zeit im Labor.

Zu guter Letzt geht ein großes Dankeschön an meinen Ehemann, Christopher Blaum, und an Dr. med. Martje Pauly für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die wissenschaftliche Kritik, sowie an meine Freunde und Familie für die Unterstützung in den schönen und schwierigen Zeiten dieser Arbeit. Ohne euren Rückhalt wäre mir vieles deutlich schwerer gefallen.

11.2 LebenslaufPersönliche Daten

Name Schuchardt
Vorname Larissa Felicitas
Geburtsdatum 17.04.1990, Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit deutsch

Ausbildung

07/2018 - heute Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikums Itzehoe

01/2018 Approbation zur Ärztin

**10/2010 – 08/2015,
03/2016 – 11/2017** Universität zu Lübeck
Studium der Humanmedizin

09/2015 – 02/2016 Auslandssemester an der Medizinischen Universität Wien

08/2013 – 07/2014 Promotionssemester an der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie, Universität zu Lübeck (ehemals Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene)

2009 - 2010 Freiwilliges Soziales Jahr am Universitären Herzzentrum Hamburg

2009 Abitur an der Gelehrtenschule des Johanneums, Hamburg

Stipendien

**04/2013 – 03/2014,
seit 2014 assoziiert** Promotionsstipendium als Medical Research Student des RTG 1743 “Genes, Environment and Inflammation” (von der DFG gefördert)

2010 - 2017 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes

11.3 Ethikvotum

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an menschlichen Gewebeproben (humane Eileiter) wurden durch die Ethikkommission in einem Schreiben vom 08.12.2009 mit dem Aktenzeichen 09-153 genehmigt.

11.4 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

- **Chlamydia trachomatis as the Cause of Infectious Infertility: Acute, Repetitive or Persistent Long-Term Infection?**
Current Topics in Microbiology and Immunology, 2016 Jul 2.,
Schuchardt L, Rupp J.

- **Host immune responses after hypoxic reactivation of IFN- γ induced persistent Chlamydia trachomatis infection.**
Front Cell Infect Microbiol. 2014 Apr 16; 4:43
Jerchel S, Kaufhold I, Schuchardt L, Shima K, Rupp J.

- Larissa Schuchardt, Stefan Jerchel, Simon Graspentner, Jan Rupp:
How the microenvironment shapes intracellular chlamydial infection and pathogenicity
Posterpräsentation beim 12. Chlamydienworkshop in Berlin, April 2014