

Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. H. Wagner, Ph. D. (Melbourne))

Inhibition von Apoptose in menschlichen Zellen durch Infektion mit *Chlamydia pneumoniae*

Claudia Schwarz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker
2. apl. Prof. Dr. Th. Chr. Miethke

Die Dissertation wurde am 12.01.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005 angenommen.

Schau und du wirst finden
– was nicht gesucht wird, das wird unentdeckt bleiben.

Sophokles, griechischer Dramatiker, 496-406/5 v. Chr.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	9
1. Einleitung und Problemstellung	11
1.1. Einleitung	11
1.1.1. Definition der Apoptose	11
1.1.2. Formen des Zelltods	11
1.1.3. Molekularer Ablauf der Apoptose	12
1.1.4. Morphologische Zeichen der Apoptose	16
1.1.5. Biologische Anwendungen des physiologischen Zelltodes	16
1.1.6. Antiapoptotische Aktivitäten von Viren, Parasiten und Bakterien	17
1.1.7. Replikationszyklus der Chlamydien	18
1.1.8. Krankheiten durch Chlamydien	19
1.2. Problemstellung	20
2. Material und Methodik	21
2.1. Material	21
2.1.1. Antibiotika	21
2.1.2. Antikörper	21
2.1.3. Bakterienstamm und Zelllinien	21
2.1.4. Chemikalien und Biochemikalien	21
2.1.5. Geräte	23
2.1.6. Puffer, Medien und Gele	24
2.2. Methodik	25
2.2.1. Kultur von Wirtszellen und Bakterienzucht	25
2.2.1.1. Zellkultur HeLa 229 und HEP-2	25
2.2.1.2. Auftauen und Einfrieren	25
2.2.1.3. Vermehrung der Chlamydien in HEP-2 und Aufreinigung der Bakterien	26
2.2.1.4. Chlamydienfärbung und Bestimmung der Infektiosität	27
2.2.2. Induktion und Nachweis von Apoptose	27
2.2.2.1. Vorbereitung der HeLa 229-Zellen für Infektionsexperimente	27

2.2.2.2. Kernfragmentierung	28
2.2.2.3. DNS-Fragmentierung	28
2.2.2.4. Nachweis von Effektorcaspasenaktivität	29
2.2.2.5. Westernblot zum Nachweis von Caspase-3 und -9	30
2.2.2.6. Das zellfreie System zur Messung des Effektes von Cytochrom c	31
2.2.2.7. Intrazelluläre Cytochrom c-Färbung	31
2.2.2.8. Luciferase Reporter Assay	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Inhibition der morphologischen Aspekte der Apoptose durch <i>Chlamydia pneumoniae</i>	33
3.2. Blockade der Effektorcaspasenaktivierung	36
3.3. Blockade der Aktivierung der Initiatorcaspase-9 durch Staurosporin im Verlauf der Infektion	39
3.4. Inhibition der durch den CD95-Rezeptor ausgelösten Apoptose	40
3.5. Blockade der Staurosporin-induzierten Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien durch Chlamydieninfektion	42
3.6. Schutz vor Cytochrom c-induzierter Caspasenaktivierung durch Infektion mit Chlamydien in einem zellfreien System	43
3.7. Bakterielle Proteinsynthese ist für den Schutz gegen Apoptose notwendig	45
3.8. Der Schutz gegen Apoptose entsteht ohne vermehrte HSP-70 oder Bcl-2-Expression der Zelle und ohne nachweisbare Aktivierung des NF- κ B-Systems	48
4. Diskussion	51
4.1. Pro- und antiapoptotische Aktivitäten von Chlamydien	51
4.2. Inhibierender Eingriff der Chlamydien in den Signaltransduktionsweg der Apoptose	53
4.3. Bakterielle Proteinsynthese zur Apoptoseinhibition	55
4.4. Bax-abhängige Apoptoseinduktion durch Infektion mit Chlamydien	56
4.5. Nekrose und Chlamydieninfektion	57
4.6. Beiträge der Wirtszelle	58
4.7. Die Bedeutung der Apoptoseinhibition für die klinische Infektion	58

5. Zusammenfassung	60
6. Literaturverzeichnis	61
Danksagung	71

Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptosis inducing factor
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2-antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated x protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology domain
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bik	Bcl-2-interacting killer
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
Blk	B lymphoid tyrosine kinase
Bmf	Bcl-2 modifying factor
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CD95	Cluster of differentiation 95
cFLIP	Cellular FLICE-inhibitory protein
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino]-1-propansulfonat
CPAF	Chlamydial protease-like activity factor
d	Tag(e)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEVD	Abkürzung für die Aminosäuren: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Valin und Asparaginsäure
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DIABLO	Direct IAP binding protein with low isoelectric point
DISC	Death inducing signalling complex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNP	2, 4-Dinitrophenol
DNS	Desoxyribonukleinsäure

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N,N',N'-tetraessigsäure
FADD	Fas-associated death domain
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FLICE	FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme
h	Stunde(n)
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
Hrk	Harakiri, Bcl-2 interacting protein
HSP-70	Heat shock protein 70
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IL-10	Interleukin-10
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (Mol/l)
MDB	Mitotic dilution buffer
min	Minute(n)
Nedd8	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
Noxa	NADPH oxidase activator
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	Maß für den Säuregrad (pondus hydrogenii)
PI	Propidiumiodid
Puma	p53-upregulated modulator of apoptosis
RFU	Relative fluorescence units
RFX5	Regulatory factor X, 5
RNAse	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
SPG	Sucrose-phosphate-glutamate
SUMO-1	Small ubiquitin-related modifier 1
TAE	Tris-Acetat-EDTA

tBid	Truncated Bid
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris-buffered saline)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF β	Transforming growth factor- β
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxy-methyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylene-sorsitan monolaurate
U/min	Umdrehungen/min
UV	Ultraviolett
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
x g	-fache Erdbeschleunigung ($g=9,81 \text{ m/sec}^2$)

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Die zwei Signaltransduktionswege der Apoptoseinitiation beim Säugetier
- Abbildung 2: Inhibition der durch Staurosporin induzierten morphologischen Kernapoptose durch *C. pneumoniae*
- Abbildung 3: Darstellung der Kernmorphologie von HeLa 229-Zellen unter verschiedenen Bedingungen
- Abbildung 4: Die Infektion mit *C. pneumoniae* reduziert die DNS-Fragmentierung durch Staurosporin
- Abbildung 5: Verminderung der messbaren Effektorcaspasenaktivität in mit *C. pneumoniae* infizierten Zellen
- Abbildung 6: Abhängigkeit der proteolytischen Aktivitätshemmung von der Stärke der Infektion
- Abbildung 7: Inhibition der Staurosporin-induzierten Caspase-9- und Caspase-3-Prozessierung durch Infektion mit *C. pneumoniae*
- Abbildung 8: Reduktion der durch anti-CD95/ DNP ausgelösten Kernfragmentierung durch Infektion mit *C. pneumoniae*
- Abbildung 9: Durch Infektion mit *C. pneumoniae* wird die Entstehung DEVD-spaltender Aktivität nach Behandlung mit anti-CD95 und DNP in HeLa 229-Zellen inhibiert
- Abbildung 10: Blockade der Staurosporin-induzierten Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien durch Infektion mit *C. pneumoniae*
- Abbildung 11: Die Caspasenaktivierung durch Cytochrom c wird im zellfreien System durch Infektion mit *C. pneumoniae* gehemmt
- Abbildung 12: Die Infektion mit *C. pneumoniae* inhibiert die Prozessierung der Caspasen-3 und -9 im zellfreien System
- Abbildung 13: Reduzierte Inhibition der Apoptose durch *C. pneumoniae* nach Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese durch Rifampicin
- Abbildung 14: Die frühzeitige Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese hebt den Schutz der Chlamydien vor induzierter Apoptose auf
- Abbildung 15: Einfluss von Rifampicin auf das Wachstum von *C. pneumoniae*
- Abbildung 16: Kein Beitrag der infizierten Wirtszelle zur Hemmung der Apoptose durch vermehrte HSP-70- oder Bcl-2-Produktion

Abbildung 17: Keine Induktion der NF- κ B-Aktivität durch Infektion mit *C. pneumoniae*

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Einleitung

Diese Arbeit untersucht den Effekt der Infektion mit dem obligat intrazellulären Bakterium *Chlamydia pneumoniae* auf den Ablauf der experimentell induzierten Apoptose in der Wirtszelle. Hier soll zunächst dargestellt werden, was man unter dem Begriff der Apoptose versteht, und welche Bedeutung sie in Physiologie und Infektionsbiologie besitzt.

1.1.1. Definition der Apoptose

Bereits im Jahr 1842 gab es erste Arbeiten zur Untersuchung des Zelltodes. Carl Vogt beobachtete in seinen Untersuchungen zur Entwicklungsbiologie der Geburtshelferkröte, dass beim Umbau von Knorpelgewebe Zellen verschwanden und fand Anhalt dafür, dass diese Zellen starben (Vogt, 1842). Auch weitere Arbeiten Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben das Phänomen dieses genau vorhersagbaren Todes von Zellen und Gewebsbezirken. Der Begriff „programmierter Zelltod“ wurde geprägt (Lockshin and Williams, 1965). Kurz darauf wurde entdeckt, dass für manche Formen des programmierten Zelltodes Proteinneusynthese notwendig ist. Es muss sich also dabei um einen aktiven Prozess handeln (Tata, 1966). Kerr beschrieb 1972, dass auch in den Zellen des erwachsenen Menschen ein Zelltodsystem existiert. Er und seine Mitautoren bezeichneten diesen Vorgang als „Apoptose“, altgriechisch für „Wegfallen“, etwa wie das Abfallen der Blätter von Bäumen oder der Blütenblätter von Blumen. Damit wurde das Prinzip beschrieben, dass sich der Organismus von Teilen seiner selbst entledigt und dies ein geregelter, wahrscheinlich für den Organismus vorteilhafter Vorgang ist (Kerr et al., 1972).

1.1.2. Formen des Zelltods

Apoptose ist also ein aktiver Prozess: Die Zelle stirbt infolge der Aktivierung ihres intrazellulären Zelltodsystems (s.u.). Auch wenn vermutlich der überwiegende Teil des in vivo stattfindenden Zelltodes durch Apoptose stattfindet, können Zellen auch in Abwesenheit von Apoptose sterben. Der aktive Beitrag der Zelle zu diesem nicht-apoptotischen Zelltod ist unklar, und verschiedene Autoren benutzen verschiedene Namen zu seiner Beschreibung. Die gängigste Bezeichnung ist die

der Nekrose. Ein möglicherweise wichtiger Unterschied zwischen diesen Formen besteht in der Konsequenz des Zelltodes für die umgebenden Zellen. Apoptotische Zellen werden vor dem Verlust der Membranintegrität phagozytiert, und es erfolgt keine Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Hart et al., 1996). Nekrotische Zellen dagegen verlieren die Membranintegrität, der Zellinhalt läuft aus und kann bei benachbarten Zellen schwere Entzündungen auslösen (Savill et al., 1993).

In der Literatur wird weiter der Begriff des „Programmierten Zelltodes“ benutzt. Apoptose und „Programmierter Zelltod“ beschreiben den gleichen molekularen Prozess, den physiologischen Zelltod. Die Bezeichnung „Programmierter Zelltod“ ist dem physiologisch während der Ontogenese auftretenden Zelltod vorbehalten (Häcker, 1999).

1.1.3. Molekularer Ablauf der Apoptose

Ein Signaltransduktionsweg führt zum Tod durch Apoptose. Ein gängiges Modell unterscheidet zwei getrennte Wege der Apoptoseinitiierung, den todesrezeptorvermittelten und den sog. mitochondrialen Weg. Beide münden in einer gemeinsamen Endstrecke.

Die Aktivierung über den rezeptorvermittelten Weg kann über unterschiedliche Todesrezeptoren vermittelt werden. Der bekannteste Todesrezeptor ist CD95. Durch Bindung des Liganden an den Rezeptor wird die Bildung des intrazellulären Aktivierungskomplexes DISC (death inducing signalling complex) ausgelöst. CD95 bindet hierbei an das Protein FADD, und FADD wiederum interagiert mit Procaspase-8. In diesem Prozess der DISC-Bildung wird Caspase-8 aktiviert. Die aktivierte Caspase-8 aktiviert die Effektorcaspase-3 durch limitierte Proteolyse (Krueger et al., 2001; Ashkenazi and Dixit, 1998). Caspase-8 kann weiter durch Spaltung des BH3-only-Proteins Bid zu tBid (s.u.) in den mitochondrialen Weg eingreifen (Li et al., 1998; Lou et al., 1998).

Der mitochondriale Weg wird rezeptorunabhängig aktiviert; man spricht häufig von einer Aktivierung durch verschiedene Formen von Stress, sei es durch Entzug von Wachstumsfaktoren, UV-Strahlung oder im Experiment durch den Kinaseinhibitor

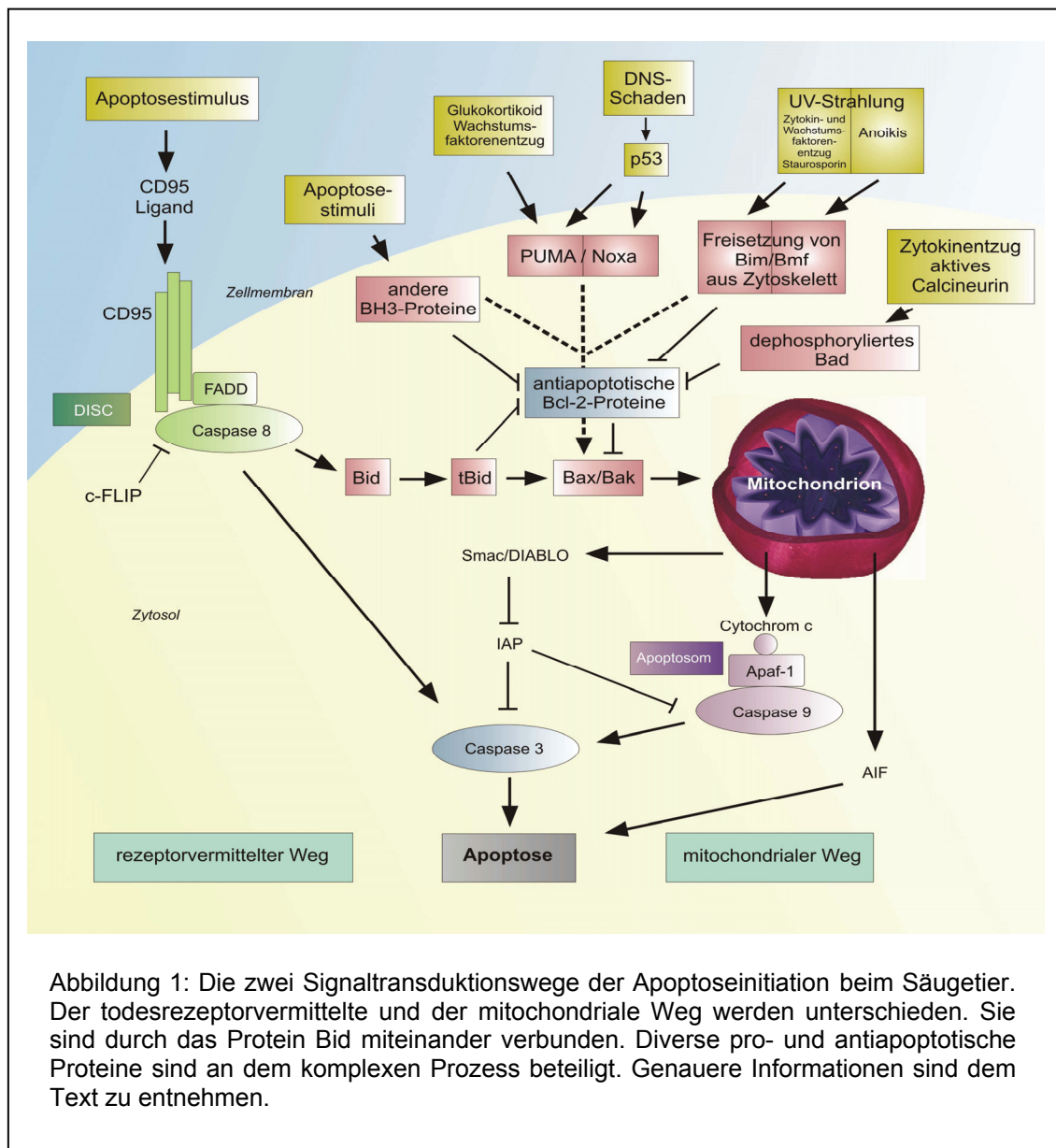
Staurosporin. Durch einen komplexen Vorgang wird dann die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma ausgelöst. Dort kann Cytochrom c mit dem Adapter Apaf-1, der Procaspase-9 und ATP einen Aktivierungskomplex bilden, der „Apoptosom“ genannt wird. In diesem Komplex wird die Procaspase-9 aktiviert, die ihrerseits die Caspasen-3 und -7 aktiviert. Caspase-3 aktiviert die Caspasen-7 und -6 (Slee et al., 1999).

Die Aktivität von Caspase-3 (und teilweise von Caspasen-6 und -7) führt durch Proteolyse von mehreren hundert Substraten zu vielseitigen Veränderungen innerhalb der Zelle (Fischer et al., 2003). Die Ordnung des Zytoskeletts löst sich auf und die Zellmembran externalisiert Phosphatidylserin. Durch die Interaktion mit einem Phosphatidylserin-Rezeptor der Phagozyten werden zusätzlich die anti-inflammatorischen Zytokine TGF β und IL-10 aktiviert. Die DNS wird in Stücke geschnitten, bis zuletzt einzelne Fragmente von der Länge vorhanden sind, die um ein Nukleosom gewickelt ist (etwa 250 pb).

Bisher sind beim Menschen sechs Caspasen bekannt, die mit der Apoptose in Zusammenhang stehen. Sie liegen als inaktive Zymogene im Zytoplasma vor. Bei der Prozessierung zur aktiven Caspase wird die Prodomäne abgespalten. Die katalytische Domäne besteht aus zwei Untereinheiten, die ebenfalls durch Proteolyse entstehen. Sie bilden ein Heterodimer mit einem katalytischen Zentrum. Zwei dieser Heterodimere bilden die aktive Caspase (Cain et al., 1999). Beim Menschen wie auch bei anderen Vertebraten werden die Caspasen in zwei Gruppen unterteilt: Die Initiatorcaspasen-8, -9 und -10, die nach Rekrutierung in einen Proteinkomplex durch Autokatalyse aktiviert werden, und die Effektorcaspasen-3, -6 und -7, die durch die Initiatorcaspasen aktiviert werden. Die Einordnung der Caspase-2 wird noch diskutiert (Thornberry and Lazebnik, 1998).

Es existiert eine große Anzahl von Regulatorproteinen, die entweder stimulierend oder hemmend in die Apoptose eingreifen. Die Proteine der Bcl-2-Familie regulieren die Freisetzung von Cytochrom c. Bcl-2-Proteine sind durch die sog. Bcl-2-Homologiedomänen (BH-Domänen) 1-4 gekennzeichnet. Die Familie besteht aus drei Untergruppen (Abbildung 1): den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen, den proapoptotischen Proteinen der Bax/Bak-Gruppe und den proapoptotischen Proteinen

der BH3-only-Gruppe (vereinfacht auch BH3-Proteine genannt). Letztere besitzen lediglich die BH3-Domäne.



Zu den antiapoptotischen Regulatoren zählen Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1, Boo/Diva/Bcl-2-L10 und Bcl-B. Sie können die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien verhindern (Adams and Cory, 2001; Bouillet and Strasser, 2002).

Essentiell für die Freisetzung von Cytochrom c ist die Bax/Bak-Gruppe. In Zellen, denen diese beiden Proteine fehlen, ist der mitochondriale Weg inaktiv (Bouillet

and Strasser, 2002). Bax transloziert während der Aktivierung an die Mitochondrienmembran, inseriert dort und komplexiert mit weiteren Bax-Molekülen, was über einen kontrovers diskutierten Vorgang zur Freisetzung von Cytochrom c führt. In diese Gruppe lassen sich aufgrund der proapoptotischen Eigenschaften und Strukturähnlichkeiten auch Bcl-x_S, Bok/Mtd und Bcl-G_L einordnen (Eskes et al., 2000; Bouillet and Strasser, 2002).

Zu den BH3-only-Proteinen gehören mindestens acht Proteine: Bad, Bid, Bik/ Blk, Bim, Bmf, Hrk, Noxa und Puma. Ihre Funktion besteht darin, nach eigener Aktivierung durch Apoptosestimuli die Bax/Bak-Gruppe zu aktivieren oder antiapoptotische Bcl-2-Proteine zu „neutralisieren“. Die Regulation der BH3-only-Proteine erfolgt auf unterschiedliche Weise, wobei im Allgemeinen ein Apoptosestimulus ein BH3-only-Protein aktiviert. Bisher lassen sich nur ein Teil der Apoptosestimuli und ein Teil der BH3-only-Proteine einander zuordnen.

Wie bereits oben erwähnt, wird durch das CD95-Signal, aber auch durch den Tumornekrosefaktor, die Bid-Aktivierung und damit die Apoptoseinduktion ausgelöst. Bim und Bmf können auf mehrere Arten stimuliert werden. Dabei ist bedeutsam, dass beide Proteine an das Zytoskelett der Zelle gebunden sind. Bim bindet an DLC1 („dynein light chain“), einer Komponente des Dynein-Motor-Komplexes (Puthalakath et al., 1999), Bmf an DLC2, einer Komponente des Myosin-V-Motor-Komplexes (Puthalakath et al., 2001). Gewisse Stimuli, wie Zytokinentzug, abnormaler Kalziumionenfluss (Bouillet et al., 1999), Entzug von Wachstumsfaktoren bei Neuronen (Harris and Johnson, 2001), Behandlung mit Taxol, Ionomycin (Bouillet and Strasser, 2002) oder Staurosporin (Fischer et al., 2004b) führen zur Freisetzung von Bim aus dem Zytoskelett. Bim kann dadurch z.B. die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine aufsuchen und antagonisieren (Puthalakath et al., 1999). Bmf dagegen wird durch Anoikis, dem Ablösen von Zellen aus dem Zellverband, aktiviert. Sowohl Bim als auch Bmf werden durch UV-Strahlung aus dem Zytoskelett freigesetzt (Puthalakath et al., 2001).

Puma und Noxa werden auf der Transkriptionsebene reguliert. Bisher ist bekannt, dass die Genexpression von Puma durch DNS-Schäden (z.B. durch ionisierende Strahlung oder Behandlung mit Etoposid), Behandlung mit Glukokortikoiden und Entzug von Wachstumsfaktoren induziert wird (Han et al., 2001). Noxa kann nach

bisherigem Wissen durch Röntgenstrahlung aktiviert werden (Oda et al., 2000). Die Apoptose infolge von DNS-Schäden wird bei beiden Proteinen (mindestens in Thymozyten und Fibroblasten) durch den Tumorsuppressor p53 vermittelt, der Noxa und Puma transkriptionell induziert (Han et al., 2001).

Bad kann durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert werden. Im phosphorylierten Zustand ist Bad üblicherweise an das Protein 14-3-3 σ gebunden. Dadurch vermag es nicht, mit den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen zu heterodimerisieren und diese dadurch zu inaktivieren. Dieser antiapoptotische Zustand kann durch Proteinkinasen wie Akt oder Raf-1 unterstützt werden. Durch Dephosphorylierung, die z.B. durch Zytokinenzug oder durch aktives Calcineurin hervorgerufen werden kann, bricht die Bindung zum 14-3-3 σ -Protein weg und Bad kann die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine hemmen. Damit kommt es zum Zelltod (Wang et al., 1999; Bouillet and Strasser, 2002)

Weitere Regulatorproteine wie die mitochondrialen Proteine DIABLO/Smac und AIF (Adams and Cory, 2001), das zelluläre Protein cFLIP (Krueger et al., 2001) und die IAP (inhibitor of apoptosis proteins) (Deveraux and Reed, 1999; Adams and Cory, 2001) greifen an verschiedenen Stellen der Signaltransduktion stimulierend oder hemmend ein (Abbildung 1).

1.1.4. Morphologische Zeichen der Apoptose

Lichtmikroskopisch sichtbar ist ein Herauslösen der betroffenen Zelle aus dem Zellverband. Die Fragmentierung der Zelle beginnt mit dem Ausstülpfen der Membran an mehreren Stellen und schließlich dem Ablösen von membranumschlossenen Vesikeln, den sogenannten apoptotischen Körperchen. Die Kondensation des Chromatins und der Zerfall des Zellkerns werden beobachtet. Die sog. apoptotischen Körperchen (membranumschlossene Zerfallsprodukte) werden zügig durch benachbarte Zellen oder Makrophagen phagozytiert (Häcker, 1999; Savill et al., 1993; Thornberry and Lazebnik, 1998).

1.1.5. Biologische Anwendungen des physiologischen Zelltodes

Der physiologische Zelltod ist bei der Ontogenese und während des Lebens von vielzelligen Tieren von großer Bedeutung.

Der „Programmierte Zelltod“ findet während der **Embryogenese** statt, und erlaubt die Restrukturierung von Geweben (Sanders and Wride, 1995).

Die Apoptose spielt weiter eine wichtige Rolle im **Immunsystem**. Während der Reifung der Thymozyten werden potentiell autoreaktive Thymozyten durch Apoptose eliminiert (King and Ashwell, 1994). Granulozyten werden ständig im Knochenmark neu hergestellt und sterben nach wenigen Tagen in der Peripherie durch Apoptose.

Um die Zellzahl in den proliferierenden Geweben in erwachsenen Organismen konstant zu halten (**Gewebshomöostase**), muss durch Apoptose eine entsprechende Anzahl von Zellen wieder sterben. Dies gilt sehr wahrscheinlich für alle fortlaufend proliferierenden Gewebe (Häcker, 1999). Zum Beispiel entsteht bei der spezifischen Immunantwort nach Antigenkontakt eine große Zahl von B- und T-Lymphozyten der entsprechenden Antigenpezifität. Wenn die Infektion überstanden ist, werden die Lymphozyten durch Apoptose wieder bis zum Ausgangswert abgebaut (Strasser and Bouillet, 2003).

Apoptose wird auch zur **Verteidigung** des Organismus **gegen schädliche Einflüsse** verwendet. So werden beispielsweise Zellen, die durch ionisierende Strahlung, Zytostatika oder andere Substanzen einen **DNS-Schaden** erlitten haben, durch Arrest in der G1-Phase von der weiteren Zellteilung abgehalten oder sie begehen Selbstmord in Form von Apoptose (Yonish-Rouach, 1996; Wyllie et al., 1999). Dadurch kann sich der Organismus vor der Proliferation genetisch veränderter Zellen schützen. Die Wahrscheinlichkeit der Tumorbildung wird reduziert. Auch zytotoxische T-Lymphozyten können genetisch veränderte oder mit Viren infizierte Zellen dazu zwingen, ihren Apoptoseapparat zu aktivieren (Sarin et al., 1997; Vaux and Strasser, 1996).

Um eine **Virusinfektion** wirksam von der weiteren Ausbreitung abzuhalten, kann eine Zelle ebenfalls ihr Apoptosesystem in Gang setzen. Da Viren Wirtszellen zu ihrer weiteren Verbreitung benötigen, ist der Tod der infizierten Zellen ein für den Organismus vorteilhafter Vorgang, um die Virusinfektion einzudämmen (Moss et al., 1999).

1.1.6. Antiapoptotische Aktivitäten von Viren, Parasiten und Bakterien

Bei einigen Viren konnten antiapoptotische Aktivitäten nachgewiesen werden, die den Viren das Überleben und die Vermehrung in einigen Zelltypen ermöglichen.

Dazu zählen z.B. Adenovirus Typ 5, Zytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus, Herpes simplex-Viren Typ 1 und 2 und Varicella-Zoster-Virus (Müller and Rudel, 2001; Miller, 1997; Teodoro and Branton, 1997; Hood, 2003). Diese Viren tragen Gene, deren Produkte direkt das Apoptosesystem der Wirtszelle blockieren.

Auch mehrere Parasiten- und Bakterienstämme vermehren sich (zum Teil obligat) intrazellulär. Für deren Vermehrung wäre es ebenso nützlich, wenn sie die apoptotische Aktivität ihrer Wirtszellen zu ihren Gunsten beeinflussen könnten. Nash fand 1998 beim intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* antiapoptotische Aktivitäten (Nash, 1998).

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien. Zwei der drei humanpathogenen Spezies sind bereits auf ihren Einfluss auf das Apoptosesystem der Wirtszelle untersucht worden. *C. psittaci* induziert Apoptose in Epithelien und Makrophagen in vitro (Gibellini et al., 1998; Ojcius et al., 1998); neuere Arbeiten beschreiben auch eine antiapoptotische Aktivität (Greene et al., 2004). Von *C. trachomatis* wird ebenfalls sowohl über Apoptoseinduzierende als auch -inhibierende Aktivität berichtet. Einerseits induzieren diese Bakterien Apoptose in vitro und in vivo (Gibellini et al., 1998; Perfettini et al., 1999), andererseits inhibieren sie in vitro die Apoptose, die experimentell ausgelöst wurde (Fan et al., 1998). Die Gründe für diese unterschiedlichen Reaktionen können bisher nur vermutet werden (siehe auch Diskussion). Wie schließlich die dritte humanpathogene Chlamydienpezies, *C. pneumoniae*, die Apoptose humaner Zellen beeinflusst, ist Inhalt dieser Dissertation.

1.1.7. Replikationszyklus der Chlamydien

Alle drei humanpathogenen Chlamydienstämme wachsen und vermehren sich obligat intrazellulär. Dafür benutzen die Bakterien verschiedene Faktoren der Wirtszelle, wie etwa Nukleotide (Grayston, 1994). Der biphasische Entwicklungszyklus dauert bei *C. pneumoniae* ca. 72 Stunden, bei *C. trachomatis* und *C. psittaci* je nach Stamm zwischen 30 und 84 Stunden (Hogan et al., 2004). Währenddessen wandeln sich die Chlamydien von infektiösen, etwa 0,3 µm großen Elementarkörperchen in nicht-infektiöse, aber metabolisch aktive, etwa 1,2 µm große Retikularkörperchen um und wieder zurück.

Die erste, ungefähr vier bis zwölf Stunden dauernde Phase des Zyklus umfasst den Eintritt der Elementarkörperchen und die Umwandlung zur reproduktiven Form. Diese Phase beginnt mit dem Anheften der birnenförmigen (*C. pneumoniae*) oder runden (*C. trachomatis et psittaci*) Elementarkörperchen an die Wirtszelle. Die Zellwand der Wirtszelle stülpt sich aus und die Elementarkörperchen werden internalisiert. Dann wandeln sie sich in Retikularkörperchen um. Diese wachsen in der Vakuole heran und vermehren sich (Phase 2). Die dritte Phase besteht aus der Konversion zu Elementarkörperchen und der Freisetzung der infektiösen Einschlüsse (Kuo et al., 1988; Kuo and Grayston, 1990).

1.1.8. Krankheiten durch Chlamydien

Alle drei Spezies können eine Pneumonie verursachen, am häufigsten *C. pneumoniae*. *C. trachomatis* verursacht darüber hinaus sexuell übertragbare Infektionen des Urogenitaltraktes, wie Urethritis und Zervizitis, selten Epididymitis oder Salpingitis. Nach letzterer besteht ein erhöhtes Risiko für eine extrauterine Schwangerschaft oder tubuläre Unfruchtbarkeit. In tropischen Ländern kommen drei weitere durch *C. trachomatis* verursachte Krankheitsbilder vor: Lymphogranuloma venereum, Einflußkörperchen-Konjunktivitis und Trachom. Endokarditis, Myokarditis und Perikarditis, aber auch reaktive Arthritis, sind seltene Krankheitsbilder. Die Mehrzahl der Chlamydienerkrankungen verläuft leicht mit Infektionen v.a. im Hals-Nasen-Ohren-Bereich wie Pharyngitis, Laryngitis, Sinusitis, Bronchitis oder Otitis media. Die Übertragung erfolgt dabei über Tröpfchen von Mensch zu Mensch. Dagegen erfolgt die Übertragung der meldepflichtigen Psittakose (auch Ornithose oder Papageienkrankheit genannt) durch infizierten Kot- und Federstaub von Papageien, Wellensittichen und andere Vogelarten. Es kann ein schwerer Krankheitsverlauf mit hohem Fieber und atypischer Pneumonie auftreten. Nach überstandener Pneumonie oder Bronchitis besteht zumindest bei *C. pneumoniae* ein erhöhtes Risiko, an Asthma bronchiale zu erkranken (Grayston, 1994; Myhre and Mardh, 1982).

C. pneumoniae wurde in vivo in arteriosklerotischen Plaques und im peripheren Blut gefunden. In vitro wurden die Infektion und das Überleben in menschlichen Endothelzellen verschiedener Gefäße und glatten Muskelzellen der Aorta gezeigt (Gaydos et al., 1996). Ob *C. pneumoniae* bei Arteriosklerose und Koronarer Herzkrankheit eine Rolle spielt, wird immer noch kontrovers diskutiert. Einige Autoren

sind der Meinung, dass die chronische Infektion mit *C. pneumoniae* zum Fortschreiten der Arteriosklerose und der Koronaren Herzkrankheit beiträgt (Campbell and Kuo, 2004; Saikku, 2000).

1.2. Problemstellung

Sowohl Apoptoseinduzierende als auch -inhibierende Eigenschaften wurden bei zwei Chlamydienspezies beschrieben. Für *C. pneumoniae* lagen keine Daten vor. Das Ziel der Arbeit war es, die Einflussnahme dieser Bakterienspezies auf das Apoptosesystem der infizierten Zelle zu verstehen. Die Veränderungen der apoptotischen Antwort während der Infektion wurden sowohl in intakten Zellen als auch in Zellextrakten untersucht. Einige der möglichen Beiträge durch die Bakterien oder Wirtszellen wurden analysiert.

**The Microbe is so very small
You cannot make him out at all.
But many sanguine people hope
To see him through a microscope.**

Hilaire Belloc, Britischer Schriftsteller, 1870-1953

2. Material und Methodik

2.1. Material

2.1.1. Antibiotika

Bezeichnung

Rifampicin
Penicillin/Streptomycin

Hersteller

Calbiochem, Schwalbach
Biochrom KG, Berlin

2.1.2. Antikörper

Bezeichnung

Anti-Bcl-2
Anti-Caspase-3
Anti-Caspase-8
Anti-Caspase-9
Anti-CD95/Fas

Anti-Chlamydia-LPS

Anti-Cytochrom c
Anti-HSP-70
Anti-Mouse

Anti-Mouse
Anti-Rabbit
Anti-XIAP
(human/mouse)

Herkunft

mouse, monoclonal, IgG 1
rabbit, polyclonal
mouse monoclonal
rabbit, polyclonal
mouse, IgM

mouse, monoclonal, IgG 3,
FITC-conjugated with/
without Evansblue

mouse, monoclonal, IgG 2b
mouse, monoclonal
goat, Cy3-conjugated

goat, IgG-HRP
goat, IgG-HRP
rabbit, polyclonal, IgG

Hersteller

BD Pharmingen, Freiburg
BD Pharmingen, Freiburg
Cell Signaling Technologie
BD Pharmingen, Freiburg
Upstate Biotechnology, New
York, USA
Progen, Heidelberg

BD Pharmingen, Freiburg
Stressgen, Victoria, Canada
Jackson ImmunoResearch,
West Grove, PA, USA
Dianova, Hamburg
Calbiochem, Schwalbach
R&D Systems, Wiesbaden

2.1.3. Bakterienstamm und Zelllinien

Bezeichnung

Chlamydia pneumoniae
(Stamm CM-1)
HeLa 229
HEp-2

ATCC-Nummer

VR-1360

CCL-2.1
CCL-23

Hersteller (von allen)

American Type Culture
Collection, Rockville, Maryland,
USA

2.1.4. Chemikalien und Biochemikalien

Bezeichnung

Acridinorange
Acrylamid
Agarose

Hersteller

Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bio-Rad, München
GibcoBRL, Karlsruhe

APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bisbenzimid Hoechst No. 33342 Trichloride (DNS-Farbstoff)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Butylalkohol	Roth, Karlsruhe
CHAPS 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino]- 1-propansulfonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland
Cis-Diammine platinum (II) dichloride	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cycloheximide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEVD-AMC (Acetyl-DEVD-7-amino-4-methyl-coumarin)	Bachem, Heidelberg
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)	Biochrom KG, Berlin
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNP (2, 4-Dinitrophenol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Enhanced Luminol (NEL 105)	Perkin Elmer, Boston, USA
Eosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure, 100 %	Roth, Karlsruhe
Ethanol, 70 %	Hausapotheke
Ethanol, 100 %	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS (fetal calf serum)	Biochrom KG, Berlin
5-Fluorouracil	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd, 37 %	Merck, Darmstadt
L-Glutamin, 200 mM	Biochrom KG, Berlin
Glycerin, 1,25 M	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HCl	Roth, Karlsruhe
Hepes, pH 7,0	Fluko, Neu-Ulm
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Apotheke
1 Kb Leiter	Peqlab, Erlangen
KCl	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl_2	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na-EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Na-EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaHCO_3	Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
NaOH, 32 %	Merck, Darmstadt
PBS (Trockenmedium für 10 Liter, pH 7,2)	Biochrom KG, Berlin
Phenol	Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNAse A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Saccharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
See Blue (Marker)	Novex, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Taxol (from <i>Taxus brevifolia</i> , Minimum 95%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris Ultra	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Biochrom KG, Berlin
Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorsitan Monolaurate)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Urografin, 76 %	Schering, Berlin

2.1.5. Geräte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Gerätetyp</i>	<i>Hersteller</i>
Blotkammer	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank	Cytoperm BB 6220	Heraeus, Hanau
Durchflusscytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Elektrophoresekammern:		
1. SDS-PAGE-Gele	Mighty Small SE260 Mini-vertikal unit	Hofer, San Francisco, CA, USA
2. Agarose-Gele	Max Submarine Unit HE99X	Hofer, San Francisco, CA, USA
Geldokumentationssystem	EAGLE EYE	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Heizblock		Liebisch, Bielefeld
Mikroskope:		
1. Licht-	ID203, Axiovert 100	Zeiss, Jena
2. Konfokal-	Axiovert 100 M Laser Scanning Microscope	Zeiss, Jena
pH-Meter	761 Calimatic	Knick; Berlin
Sicherheitswerkbank	HLB 2472 GS	Heraeus, Hanau
Waagen		Sartorius, Göttingen
Wasserbad		Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifugen:		
1. Tisch-	Centifuge 5415C	Eppendorf
	Biofuge 15 R	Heraeus, Hanau
	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
2. Groß-	Sorvall RC 26 Plus	Du Pont, Newton, CT, USA
Fluorescent Plate Reader	2350 Millipore CytoFluor	Triad, Lakewood, NJ, USA

2.1.6. Puffer, Medien und GeleDMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)für 10 Liter:

10 Liter dH₂O
37 g NaHCO₃
pH 7,2 einstellen

DMEM-Zuchtmedium:

500 ml DMEM
2 mM L-Glutamin
50 ml FCS (inaktiviert 1 h bei 56°C)
5 ml Penicillin/Streptomycin

DMEM-Infektionsmedium HeLa 229:

500 ml DMEM
2 mM L-Glutamin

DMEM-Infektionsmedium HEp-2:

500 ml DMEM
2 mM L-Glutamin
500 µg Cycloheximide

Laufpuffer 5 x (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese):

9 Liter dH₂O
151 g Tris 124 mM
940 g Glycerin 1,25 M
500 ml SDS 10 % (w/v)

Mitotic Dilution Buffer (MDB) (Lazebnik et al., 1993):

10 mM Hepes pH 7,0
40 mM β-Glycerophosphat
50 mM NaCl
2 mM MgCl₂
5 mM EGTA

NP-40-Puffer:

150 mM NaCl
1 % (v/v) IGEPAL CA-630
50 mM Tris pH 8,0
dH₂O

S100-Puffer:

100 mM HepesKOH pH 7,5
3 M KCl
1 M MgCl₂
0,5 M Na-EDTA
0,5 M Na-EGTA
dH₂O

SDS-Ladepuffer 4 x:

200 mM TrisHCl pH 6,8
400 mM DTT
8 % SDS (w/v)
40 % Glycerol (v/v)
0,1% Bromphenolblau (w/v)

SDS-Polyacrylamid-Gel 12 %:Trenngel:

4 ml Acrylamid
2,5 ml 1,5 M TrisHCl pH 8,8
100 µl SDS 10 %
3,3 ml dH₂O
5 µl TEMED
50 µl 10 % APS

Sammelgel:

12 ml Acrylamid
7,5 ml 1,5 M TrisHCl pH 8,8
300 µl SDS 10 %
9,9 ml dH₂O
15 µl TEMED
150 µl 10 % APS

SPG (Aufbewahrung Chlamydien):

100 mg dH₂O
7,5 g Saccharose
52 mg KH₂PO₄
122 mg Na₂HPO₄
72 mg L-Glutaminsäure

TAE-Puffer 50 x (DNA-Elektrophorese):

242 g Tris
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
NaOH 10 M zutropfen (zum Lösen von EDTA)
dH₂O (auf 1 Liter auffüllen)

TBS/Tween für 15 Liter:

15 Liter dH₂O
118,5 g TrisHCl
132 g NaCl
7,5 ml Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorsitan Monolaurate)
pH 7,5 mit HCl

TE-Puffer:

10 mM TrisHCl pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0

Transferpuffer 2 x (Westernblot):

58,55 g Glycin 78mM
116,29 g Tris 96mM
in 3 Liter H₂O auflösen
auf pH 8,3 einstellen
7,4 g SDS
mit H₂O auf 8 Liter auffüllen

Verdau-Puffer:

Tris
NaCl, 150 mM
SDS, 0,5 %

2.2. Methodik

2.2.1. Kultur von Wirtszellen und Bakterienzucht

2.2.1.1. Zellkultur HeLa 229 und HEp-2

Die Zellen wurden auf 15 cm Ø-Kulturschalen mit 12-15 ml DMEM-Zuchtmedium pro Schale im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Dabei wurde eine Dichte von 2-3 Millionen Zellen je Kulturschale (gute Stoffwechselsituation für Versuche am nächsten Tag) oder 5 Millionen Zellen je Kulturschale (zur starken Anhebung der Zellzahl in kurzer Zeit) eingehalten. Um die Zellen auszudünnen, wurde DMEM abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS vorsichtig gewaschen, 3-5 ml Trypsin wurde für 5 min zugegeben, und die Zellen wurden zusammen mit etwas DMEM-Zuchtmedium in ein 50 ml Röhrchen (TPP, Schweiz) überführt. Die Dichte der Zellen wurde in einer Zählkammer gezählt, die neue Verdünnung ausgerechnet und durchgeführt.

2.2.1.2. Auftauen und Einfrieren

Die Zellen wurden aus dem Stickstoff zum schnellen Auftauen für einige Minuten ins Wasserbad oder den Brutschrank gegeben. Sobald die Suspension vollständig aufgetaut war, wurden sie in ein 13 ml Röhrchen überführt, und vorsichtig wurden über 5 min ca. 10 ml warmes DMEM-Zuchtmedium hinzugefügt. Dabei wurde vorsichtig geschüttelt. Danach wurden die Zellen 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Das Medium wurde zusammen mit dem herausgewaschenen DMSO vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 10 ml Zuchtmedium resuspendiert, auf einer 10cm Ø-Kulturschale ausgesät und bis zum nächsten Tag im Brutschrank inkubiert.

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit Trypsin abgedaut, in Zuchtmedium aufgenommen und 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Dann wurden sie in PBS aufgenommen und nochmals 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Pro Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) wurden 5-10 Millionen Zellen in einem Gemisch aus 10 % DMSO und 90 % FCS aufgenommen. Die Röhrchen wurden -in Zellstoff gepackt- 1 h auf -20 °C eingefroren, danach wurden sie bei -70 °C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.1.3. Vermehrung der Chlamydien in HEp-2 und Aufreinigung der Bakterien

Zur Vermehrung der Chlamydien wurden am ersten Tag 250 000 HEp-2-Zellen auf 6-Lochplatten (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Die Wahl dieser Zelllinie erfolgte aufgrund einer besseren Vermehrung und Infektiosität der Chlamydien im Vergleich zu anderen Zelllinien. Am Tag 2 wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und danach mit DMEM-Infektionsmedium bedeckt. Die gewünschte Menge Chlamydien wurde zugegeben, und die 6-Lochplatten wurden 45 min bei 35 °C und 900 x g (~3000 U/min) zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entstand eine größere Nähe von Bakterien und Wirtszellen. Dadurch wurde die Phagozytose der Bakterien erleichtert. Die Zentrifugation erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Kuo und Grayston (1976). Danach wurden die Platten 72 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber (Greiner, Esslingen) von den Platten entfernt, und die Organismen wurden durch Homogenisation (Vortexen mit 1,7-2,0mm Glasperlen der Fa. Roth, Karlsruhe) freigesetzt. Diese Chlamydien konnten zur erneuten Infektion verwendet werden oder bei entsprechend großer Menge aufgereinigt werden.

Für eine Aufreinigung hat sich als günstig erwiesen, zunächst eine 6-Lochplatte zu infizieren und diese nach drei Tagen auf 4-6 Platten zu verteilen (je nach Stärke der Infektion; dies wurde beurteilt durch die Chlamydienfärbung). Nach weiteren drei Tagen konnte man die Zellen auf 16-24 Platten verteilen, um Chlamydien aus dieser Kultur 72 h später aufzureinigen.

Die Aufreinigung erfolgte in Anlehnung an ein veröffentlichtes Protokoll unter Verwendung von Dichtegradienten (Howard et al., 1974). Die homogenisierten Chlamydienkulturen wurden 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Dabei bildeten die Zellreste den Niederschlag, die Chlamydien befanden sich im Überstand. Dieser wurde in zuvor sterilisierte Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman, Krefeld) gegeben. Die Ultrazentrifugation lief 30 min bei 4 °C und 20 000 x g. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit einer 26 G-Nadel (B. Braun, Melsungen) in 5 ml PBS resuspendiert. 5 ml 30 % Urografin wurden untergeschichtet (Stocklösung 76 %ig; mit 30 mM TrisHCl, pH 7,6, 20:31 verdünnt). Es wurde 1 h bei 4 °C und 20 000 x g zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand abgesaugt und der Niederschlag wurde

in 10 ml PBS mit einer 26 G-Nadel resuspendiert. Nochmals wurde 1 h bei 4 °C und 20 000 x g zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen wurde das Pellet in ca. 3-5 ml SPG resuspendiert und 1 ml je Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) aliquotiert. Sehr langsam (eingewickelt in Tücher) wurden die Chlamydien bei -70 °C eingefroren. Die gereinigten Chlamydien wurden bei -70 °C gelagert und während der nächsten zwei Monate für Experimente eingesetzt. Vor Beginn der Experimente wurde der Infektionstiter bestimmt und eine Mycoplasmen-PCR zum Ausschluss einer Kontamination durchgeführt.

2.2.1.4. Chlamydienfärbung und Bestimmung der Infektiosität

Sterilisierte Deckgläschen (Kittel Gläser) wurden vor der Zellaussaat in eine 6-Lochplatte gelegt. Die Färbung wurde 48 h nach Infektion durchgeführt, da sich zu diesem Zeitpunkt die Organismen noch innerhalb der Zellen befanden, die Einschlüsse aber bereits gut sichtbar waren. Das DMEM-Infektionsmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden für 10 min mit Methanol bedeckt. Nach dieser Fixierung wurde das Methanol abgesaugt und die Zellen mit wenigen Tropfen des Anti-Chlamydien-LPS-Antikörpers (Fluoreszeinisothiocyanat-konjugiert, mit Evans-blue) bedeckt. Nach 30 min im Brutschrank wurde der Farbstoff sehr vorsichtig mit Wasser abgespült und das Deckgläschen an der Luft getrocknet. Mit einem Tropfen Einschlussmedium wurde es dann mit der Oberseite nach unten auf einem Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) fixiert und sofort unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Zur Bestimmung der Infektionstiter wurden HeLa 229-Zellen (auf Deckgläschen in 6-Lochplatten wachsend) mit unterschiedlichen Verdünnungen von aufgereinigten Chlamydien infiziert. Mit Hilfe der Chlamydienfärbung wurde die durchschnittliche Anzahl von Einschlüssen pro Zelle ermittelt.

2.2.2. Induktion und Nachweis von Apoptose

2.2.2.1. Vorbereitung der HeLa-Zellen für Infektionsexperimente

Die Zellen wurden am Vortag in der benötigten Konzentration auf die gewünschten Kulturschalen unter Verwendung von Zuchtmedium ausgesät. Am Infektionstag

wurde das Medium abgesaugt, und die Löcher wurden mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Infektionsmedium bedeckt (je Loch einer 12-Lochplatte mit 1 ml, einer 6-Lochplatte mit 2 ml). Die Chlamydien wurden in der gewünschten Konzentration hinzupipettiert, und die Platten wurden bei 35 °C 45 min bei 900 x g zentrifugiert. Drei Stunden später wurde FCS zu einer Endkonzentration von 5 % zugefügt.

2.2.2.2. Kernfragmentierung

200 000 HeLa 229-Zellen wurden je Loch einer 6-Lochplatte ausplattiert, und am nächsten Tag wurden einige der Kulturlöcher mit *C. pneumoniae* infiziert (1,5 Elementarkörperchen/ Zelle). Am Tag 2 wurden die Zellen 1:2 aufgeteilt und auf mit Deckgläschen bedeckte Löcher einer 12-Lochplatte (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. 72 h nach Infektion wurden einige der Kulturen für 4 h mit 1 µM Staurosporin behandelt, die anderen nicht. In einem anderen Versuch wurden die Zellen statt mit Staurosporin mit anti-CD95 und DNP über 5 h behandelt. Alle Zellen wurden 30min bei 37 °C mit 20 µM eines interkalierenden DNS-Farbstoffes (Bisbenzimid Hoechst No. 33342 Trichloride) gefärbt. Dann wurden sie mit PBS gewaschen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde die Kernmorphologie als normal oder apoptotisch bewertet. Mindestens 300 Kerne pro Deckgläschen wurden ausgezählt.

2.2.2.3. DNS-Fragmentierung

250 000 HeLa 229-Zellen wurden in 6-Lochplatten ausplattiert und am nächsten Tag mit durchschnittlich einem infektiösen Partikel pro Zelle infiziert oder nicht infiziert. Am Tag darauf wurden die Zellen abgedaut, auf 100 000 Zellen pro Loch neu ausgesät und am dritten Tag nach der Infektion ein Teil der Zellen für 10 h mit 1 µM Staurosporin behandelt. Alle Zellen wurden dann mit PBS gewaschen, mit Trypsin 5 min inkubiert und zusammen mit DMEM vom Boden gelöst, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, 4 min bei 7000 U/min zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Nochmals folgte ein Waschschrift mit PBS.

Die Zellen wurden in je 200 µl Verdaupuffer mit 20 µg/ml Proteinase K aufgenommen und bei 37 °C über Nacht verdaut, mindestens jedoch für 4 h. 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde jedem Reaktionsgefäß zugegeben. Das Reagenz wurde dann durch Vortexen gemischt und anschließend 5 min bei Raumtemperatur und 14 000 U/min zentrifugiert. Die obere Phase wurde in neue

Reaktionsgefäße überführt, und je 200 µl Chloroform (99,9 %) wurden zugegeben. Ein weiteres Mal wurde durch Vortexen gemischt und danach zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut sauber abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Zum Präzipitieren wurde je 500 µl Isopropanol zugegeben, dann 20 min bei 14 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Es folgte die Zugabe von je 500 µl 70 % Ethanol und eine fünfminütige Zentrifugation bei 14 000 U/min. Der Überstand wurde nun sehr sauber abgenommen (erst mit der blauen, dann der gelben Pipettenspitze). Die DNS-Niederschläge wurden zum Trocknen zunächst stehen gelassen. Je 40 µl der Lösung aus TrisEDTA (TE) und 10 µg/ml RNase A wurden zugegeben. Die Gefäße wurden 5 min stehen gelassen und dann 1 h bei 37 °C im Block inkubiert. Dann wurde den Proben Lade-puffer hinzugefügt. Ein 1 % Agarose Gel wurde mit der Gelwanne in eine Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit 1 x TAE-Puffer gefüllt. 8 µl einer Lösung von DNA-Größenstandards (1 Kb Leitemix) sowie die Proben wurden aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 100-120 V eingestellt. Dabei wurden die DNS-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Das sichtbar werdende Bandenmuster wurde fotografisch mittels des Geldokumentationssystems EAGLE EYE festgehalten.

2.2.2.4. Nachweis von Effektorcaspasenaktivität

80 000 HeLa 229-Zellen wurden je Loch einer 12-Lochplatte ausgesät. Ein Teil der Zellen wurde mit *C. pneumoniae* infiziert. Bei einigen Versuchsansätzen wurde Rifampicin zu unterschiedlichen Zeiten zugegeben. Bei einem Teil der Zellen wurde nach 2 bzw. 3 Tagen die Apoptose durch vierstündige Staurosporinbehandlung induziert, bei einem anderen Teil durch sechsstündige anti-CD95- und DNP-Zugabe. Dann wurde das Medium abgesaugt. Nach nochmaliger Waschung und Absaugung von PBS wurden ca. 200 µl Trypsin auf jedes Loch gegeben. Nach 5 min im Brutschrank wurden die Zellen in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden 4 min bei 7000 U/min zentrifugiert, das Medium wurde abgesaugt, und die Zellen wurden in PBS resuspendiert. Eine erneute vierminütige Zentrifugation bei 7000U/min folgte. Jetzt wurde sehr genau unter Zuhilfenahme einer Eppendorf-pipette mit gelber Spitze abgesaugt. Die Zelllyse erfolgte in 40 µl NP-40-Puffer mit Proteaseinhibitoren. Die Reaktionsgefäße wurden 10 min auf Eis gegeben und dann durch Vortexen gemischt. Die Lysate wurden für 5 min in der Kühlzentrifuge

bei 15 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bot die Grundlage für die anschließende Dreifachmessung. Entsprechend viele Löcher einer 96-Lochplatte wurden mit je 90 µl eines MDB-Puffers mit BSA, CHAPS und DEVD-AMC gefüllt. Aus jedem Reaktionsgefäß wurden 3 x 10 µl Überstand entnommen und die Löcher damit auf 100 µl aufgefüllt. Die Platte wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert, bevor die Messung des vom DEVD abgespaltenen freien AMC stattfand. Dabei wurde mit einem Fluorescent Plate Reader die Fluoreszenz bei 390 nm (Anregung) und bei 490 nm (Emission) gemessen und von den erhaltenen Werten wurde die Hintergrundfluoreszenz abgezogen.

2.2.2.5. Westernblot zum Nachweis von Caspase-3 und -9

200 000 HeLa 229-Zellen wurden auf 6-Lochplatten ausgesät und mit einem Elementarkörperchen *C. pneumoniae* pro Zelle infiziert oder nicht infiziert. Einem Teil der Kulturlöcher wurde 10 µg/ml Rifampicin zugesetzt. Nach 48 bzw. 72 h wurde bei einigen Zellen die Apoptose durch Zugabe von 1 µM Staurosporin über 4 h induziert. Die Zellen wurden mit Trypsin vom Boden gelöst und in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen 4 min bei 7000 U/min mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in je 40 µl NP-40-Puffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Dann wurden die Lysate durch Vortexen gemischt und 5 min bei 4 °C und 15 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Gefäße pipettiert und bei -80 °C eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden je 15 µl Probe zusammen mit 5 µl SDS-Ladepuffer 5 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Die Proben wurden kurz auf Eis abgekühlt und dann bei 14 000 U/min 3 min zentrifugiert.

Die Proteine wurden auf einem 12%igen SDS-haltigen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Protran Nitrocellulosemembran (0,45 µm; Schleicher&Schuell, Dassel) übertragen. Die Membran wurde 1 h in TBS/Tween mit 5 % Magermilchpulver blockiert. Dann wurde der erste Antikörper und die Membran in TBS/Tween mit 5 % Magermilchpulver über 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in TBS/Tween wurde der zweite Antikörper in TBS/Tween mit 5 % Magermilchpulver über 1 h zugegeben. Danach wurde die Membran noch dreimal mit TBS/Tween gewaschen.

Die Entwicklerflüssigkeit des Hyperfilm ECL-Reagenzes (Amersham Pharmacia, Braunschweig) wurde auf eine Frischhaltefolie gegeben und die Nitrozellulose-

membran darin gebadet. Die Membran wurde in eine andere Frischhaltefolie eingewickelt und im Dunkeln für 30 sec, 3-6 min und 20-30 min auf einen Röntgenfilm geklemmt. Dann erfolgte die Filmentwicklung.

2.2.2.6. Das zellfreie System zur Messung des Effekts von Cytochrom c

HeLa 229-Zellen wurden auf 6-Lochplatten ausgesät und zum Teil infiziert. Die Zellen wurden am nächsten Tag auf Platten mit 15 cm \varnothing umgesetzt. Am dritten Tag nach der Infektion wurde das Medium zunächst abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, PBS abgesaugt und die Zellen mit Trypsin bedeckt. Nach Inkubation bei 37 °C über einige Minuten wurden die Zellen mit Medium ab gespült und zentrifugiert. Der nach dem Absaugen zurückbleibende Niederschlag wurde mit PBS resuspendiert und in Reaktionsgefäße pipettiert. Eine erneute Zentrifugation erfolgte. Die Zellen wurden dann in je 100 μ l S100-Puffer mit 4 μ l Proteaseinhibitoren und 1 mM Dithiothreitol aufgenommen. Die Reaktionsgefäße wurden 15 min auf Eis gestellt, um die Zellen schwellen zu lassen. Schließlich wurden die Zellen mehrmals durch eine 22 G-Nadel aufgezogen, bis etwa 80% der Zellen aufgeissen waren. Dies wurde durch eine 1:1-Färbung mit Eosin unter dem Mikroskop festgestellt. Diese färbte die geöffneten Zellen rot. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 10 000 x g und 4 °C wurden die Überstände aliquotiert und bei -70 °C eingefroren. Die Proteinkonzentration der Extrakte wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm festgestellt. Die Aktivierung der Caspasen erfolgte durch Zugabe von 1 mM dATP zusammen mit 250 μ M Cytochrom c (vom Rind) oder ohne dasselbe auf jeweils 500 μ g Protein in S100-Puffer. Das Endvolumen betrug 40 μ l. Nach Inkubation über 2-3 h bei 37 °C im Heizblock wurden für den Caspasenassay Triplikate von je 10 μ l aliquotiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem nicht extrahierter Zellen (siehe 2.2.2.4. Nachweis von Effektorcaspasenaktivität).

Für die Verarbeitung im Westernblot wurden nach der zwei- bis dreistündigen Inkubation zu je 15 μ l Probe 5 μ l SDS-Ladepuffer (4 x) gegeben und 5 min bei 95 °C denaturiert. Weiter wurde wie bei nicht extrahierten Zellen vorgegangen (siehe 2.2.2.5. Westernblot).

2.2.2.7. Intrazelluläre Cytochrom c-Färbung

200 000 HeLa 229-Zellen wurden auf 6-Lochplatten ausgesät und am nächsten Tag zum Teil infiziert. Am Tag danach wurden die Zellen 1:2 aufgeteilt und in eine

12-Lochplatte ausgesät, die zuvor steril mit Deckgläschen bestückt wurde. 48 h nach der Infektion wurde ein Teil der Zellen für 5 h mit Staurosporin behandelt. Das Medium wurde abgesaugt, und die Zellen wurden vorsichtig mit angewärmten PBS gewaschen. Nach erneutem Absaugen wurde mit 2 % Formalin über 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Dabei wurden die Kulturlöcher zunächst mit 500 µl PBS bedeckt und dann mit je 500 µl einer 4 %igen Formaldehyd-Lösung aufgefüllt. Die Lösung wurde abgesaugt und die Kulturlöcher zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden sie zweimal mit je 500 µl PBS/ 0,5 % BSA gewaschen und zuletzt zweimal mit je 500 µl PBS/ 0,5 % BSA/ 0,5 % Saponin. Im ersten Färbeschritt wurden 250 µl PBS/ BSA/ Saponin mit anti-Cytochrom c (1:500) für 20 min auf jede Probe gegeben. Durch Zugabe von je 500 µl PBS/ BSA/ Saponin begann die Waschphase zur Entfernung von überschüssigem anti-Cytochrom c. Es wurde abgesaugt und noch dreimal gewaschen. Im zweiten Färbeschritt wurde mit einem an Cy3 (wasserlöslicher, roter Cyanin-Farbstoff) konjugierten (goat anti-mouse) Antikörper 1:500 in 250 µl PBS/ BSA/ Saponin über 20 min gefärbt. Zweimal wurden die Kulturlöcher mit PBS/ BSA/ Saponin gewaschen, dann zweimal mit PBS/ BSA und erneut zweimal mit PBS. Die Deckgläschen wurden mit der Pinzette aus den mit PBS gefüllten Löchern entfernt und nach leichtem Antrocknen auf einen beschrifteten Objektträger geklebt. Die nach oben liegenden Zellen wurden vor dem Mikroskopieren mit Eindeckmedium und einem Deckglas versehen.

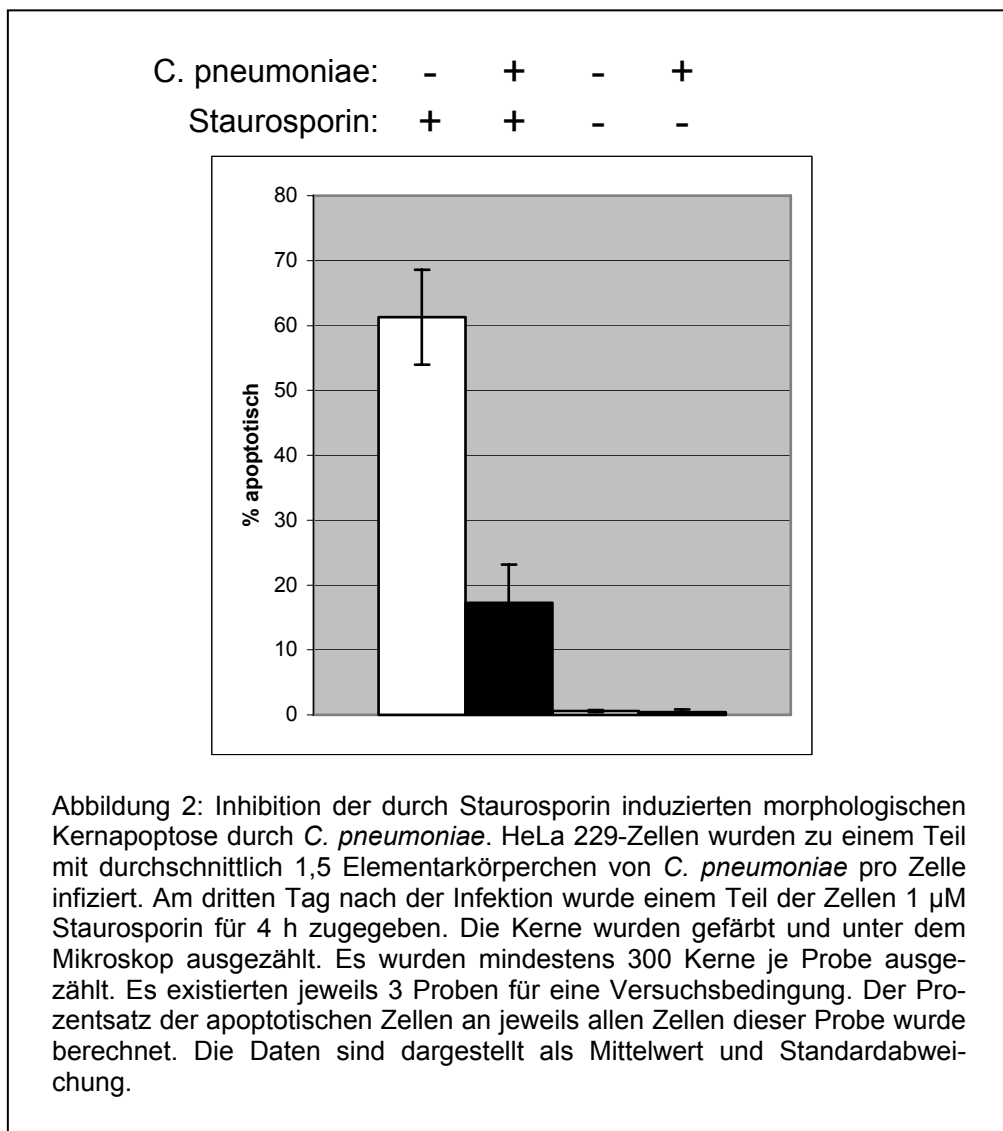
2.2.2.8. Luciferase Reporter Assay

4 Millionen HeLa 229-Zellen wurden durch Elektroporation mit 20 µg eines Plasmids transfiziert, das die Expression des Luciferase-Gens treibt. Es wurden Plasmide verwendet, in denen die Expression entweder vom konstitutiv aktiven β -Aktin-Promotor oder von einem NF- κ B-abhängigen, induzierbaren Promotor gesteuert wurde. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf 12-Lochplatten aufgeteilt, und die Proben wurden entweder nicht infiziert oder mit etwa einem Elementarkörperchen pro Zelle von *C. pneumoniae* infiziert. Die Zellen wurden 8, 24 oder 48h nach Infektion geerntet und analysiert. Dazu wurden das Luciferaseassay-System von Promega und ein Luminometer von Bertold benutzt. Einigen Experimenten wurde rekombinantes TNF in einer Konzentration von 10 ng/ml zugegeben. Dies geschah bei den 8 h-Experimenten 8 h vor der Ernte, bei den anderen 16 h vor dem Ernten.

3. Ergebnisse

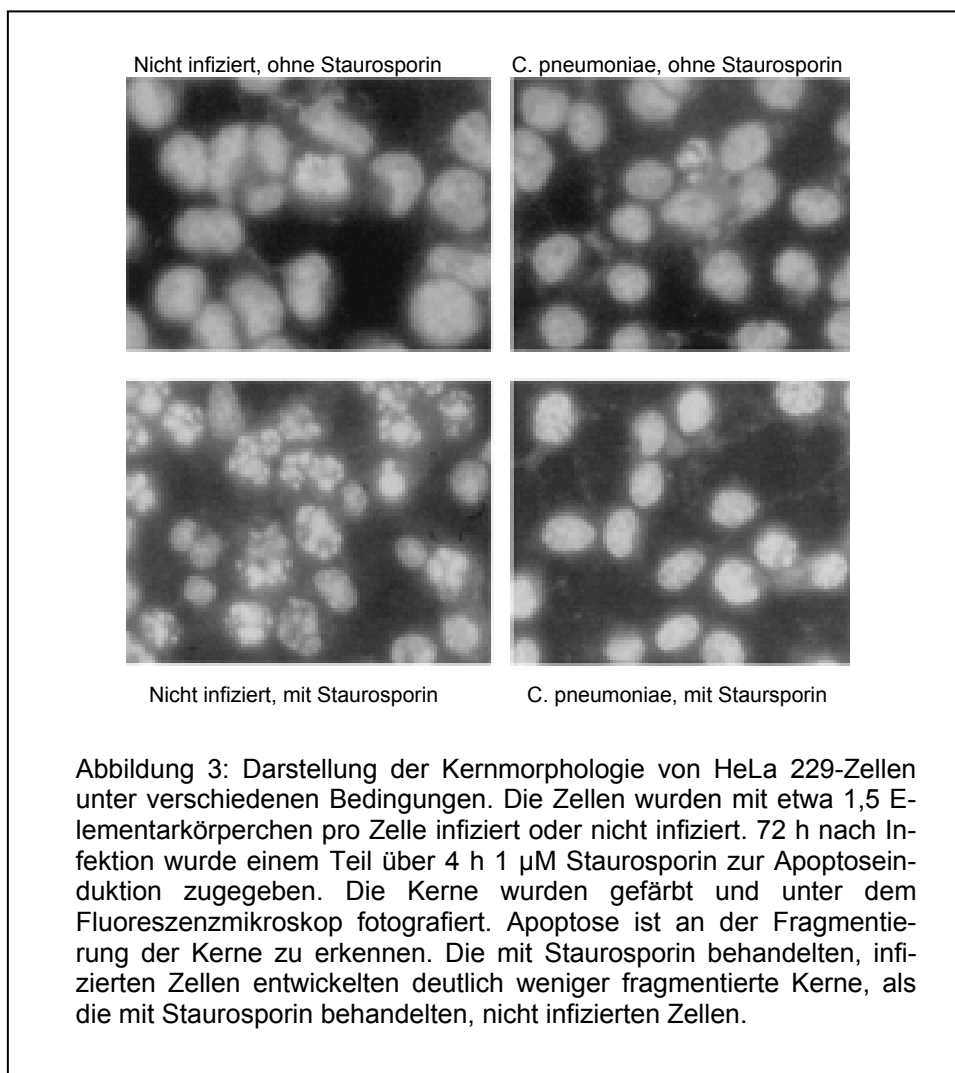
3.1. Inhibition der morphologischen Aspekte der Apoptose durch *Chlamydia pneumoniae*

Um den Einfluss von *C. pneumoniae* auf den Zelltod menschlicher Epithelzellen zu untersuchen, wurden HeLa 229-Zellen in vitro mit Elementarkörperchen von *C. pneumoniae* infiziert. Während des 72 h dauernden Entwicklungszyklus der Bakterien wurden die Zellen im Hinblick auf morphologische Apoptosezeichen (siehe Einleitung) beobachtet.



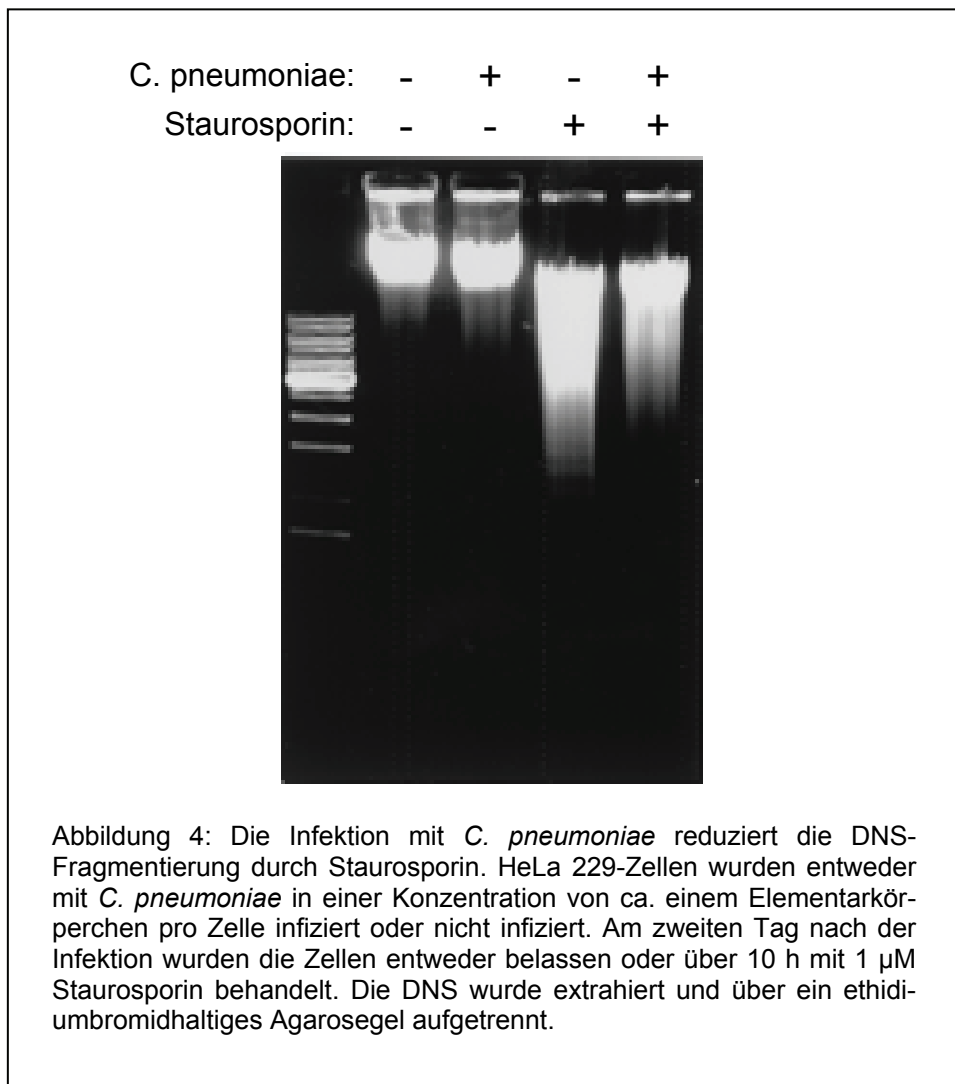
Es wurde zum Vergleich eine parallele Kultur mit nicht infizierten Zellen geführt. In keiner der Kulturen wurden lichtmikroskopisch (nicht gezeigt) oder in der Kernfärbung (s.u.) Apoptosezeichen gesehen. Das heißt, dass das Wachstum und die Replikation von *C. pneumoniae* in der Zelle keine erkennbare Reaktion in Form von Zelltod hervorrief.

In einem zweiten Versuchsansatz mit infizierten und nicht infizierten Zellen wurde nach 72 h durch vierstündige Inkubation mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin Apoptose induziert. Die Zellkerne wurden mit einem interkalierenden DNS-Farbstoff gefärbt, unter dem Mikroskop fotografiert, und der Anteil apoptotischer Zellen wurde ausgezählt (Abbildung 2). Es zeigte sich eine deutlich unterschiedliche Apoptoserate zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen.



Während die nicht infizierten Zellen zu einem hohen Prozentsatz deutliche Apoptosezeichen (Fragmentierung des Kernes) zeigten, entwickelten sehr viel weniger der infizierten Zellen diese Morphologie (Abbildung 3). Dies zeigt, dass die Empfindlichkeit von infizierten HeLa 229-Zellen auf den Apoptosestimulus Staurosporin weitaus geringer ist als bei nicht infizierten Zellen.

Ein weiteres Ereignis der Apoptose ist die Fragmentierung der genomischen DNS durch eine Caspasen-aktivierte DNase. Diese Aktivität lässt sich nach elektrophoretischer Auftrennung der DNS durch die Darstellung der sog. DNS-Leiter (Banden fragmentierter DNS) nachweisen.



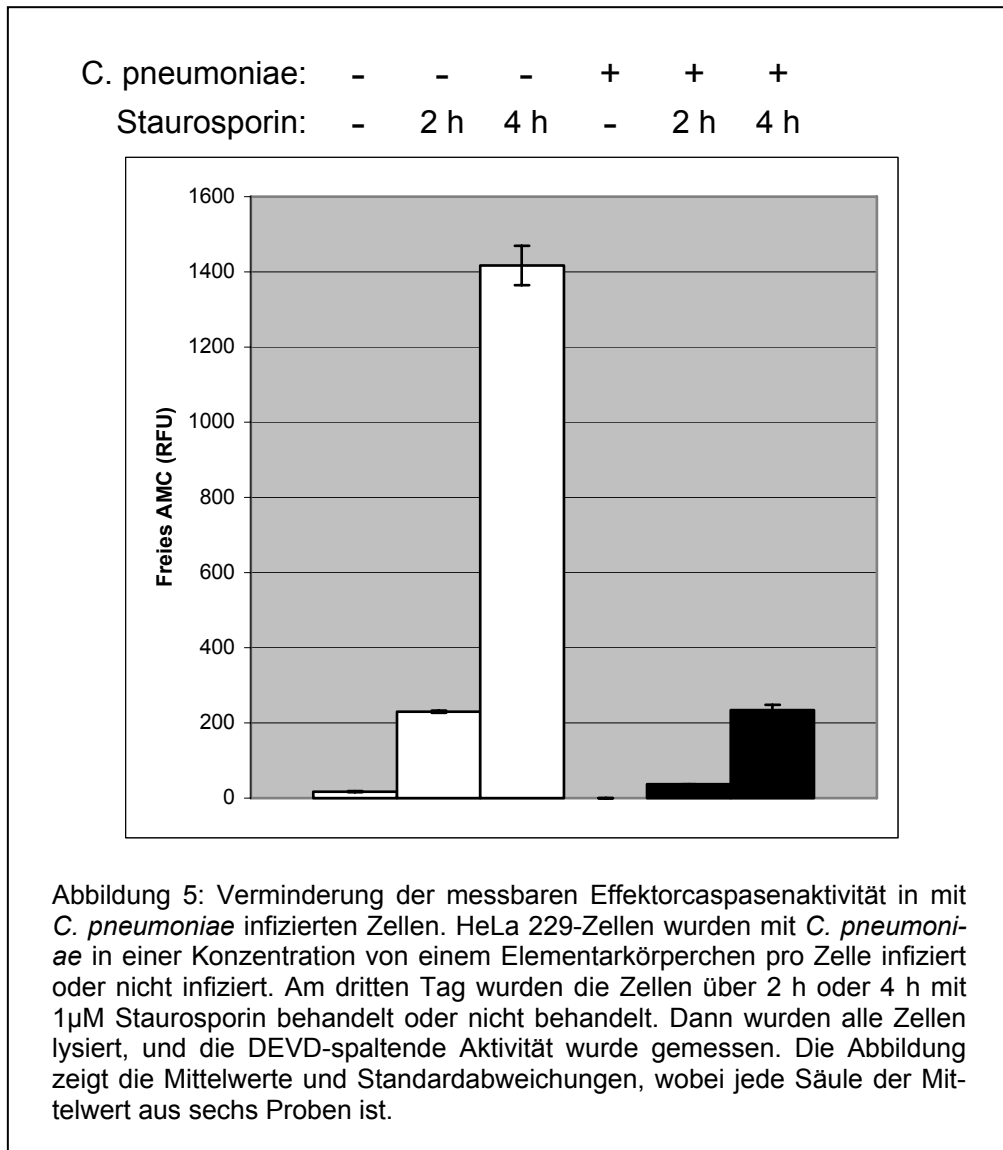
Aus den Zellen (wiederum mit/ ohne Infektion, mit/ ohne Staurosporin) wurde nach 72 h chromosomale DNS extrahiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Wie man in der Abbildung 4 sieht, führt die alleinige Infektion mit *C. pneumoniae* nicht zur DNS-Fragmentierung. Diejenigen Populationen, bei denen die Apoptose induziert wurde, zeigten eine Leiterbildung. Die beiden Leitern unterschieden sich jedoch darin, dass die Menge aufgespaltener DNS in der infizierten Population deutlich geringer war.

3.2. Blockade der Effektorcaspasenaktivierung

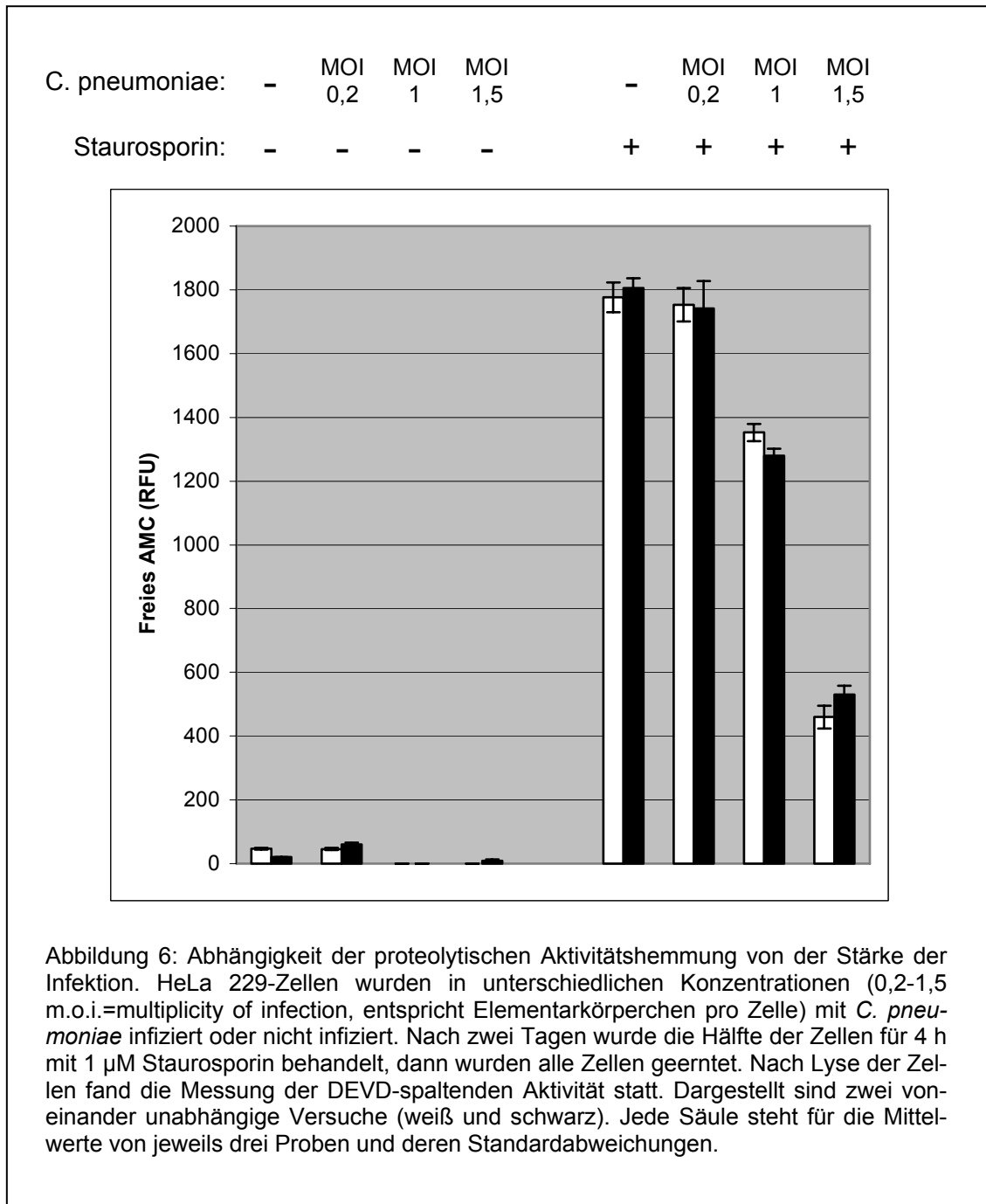
Mit den vorherigen Versuchen wurde gezeigt, dass eine Infektion mit *C. pneumoniae* die morphologischen Erscheinungen der Apoptose blockiert. Somit muss der Signaltransduktionsweg blockiert sein, der zu dieser Aktivierung führt. An welchem Schritt diese Blockade stattfindet, war jedoch unklar. Die morphologischen Erscheinungen sind die Folge der proteolytischen Aktivität von Caspasen. Es wurde daher als nächstes untersucht, ob die Aktivierung/ Aktivität von Caspasen auf Staurosporin in infizierten Zellen verändert ist.

Die Spaltung der DNS in Fragmente wird durch proteolytische Caspasenaktivität hervorgerufen, die nach der Peptidsequenz DEVD spaltet. Dafür ist vermutlich überwiegend die aktivierte Caspase-3 verantwortlich (siehe Einleitung). In diesem Experiment wurden infizierte und nicht infizierte HeLa-Zellen mit Staurosporin behandelt. Die Zellen wurden lysiert, und Caspasenaktivität wurde als Spaltung des zugesetzten Peptids DEVD-AMC gemessen.

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich ist, induzierte Staurosporin starke DEVD-spaltende Aktivität in HeLa-Zellen. In infizierten Zellen war diese Aktivität weit geringer. Je länger der Apoptosestimulus Staurosporin auf die Zellen einwirkte, umso deutlicher wurde der Unterschied zwischen den Populationen.



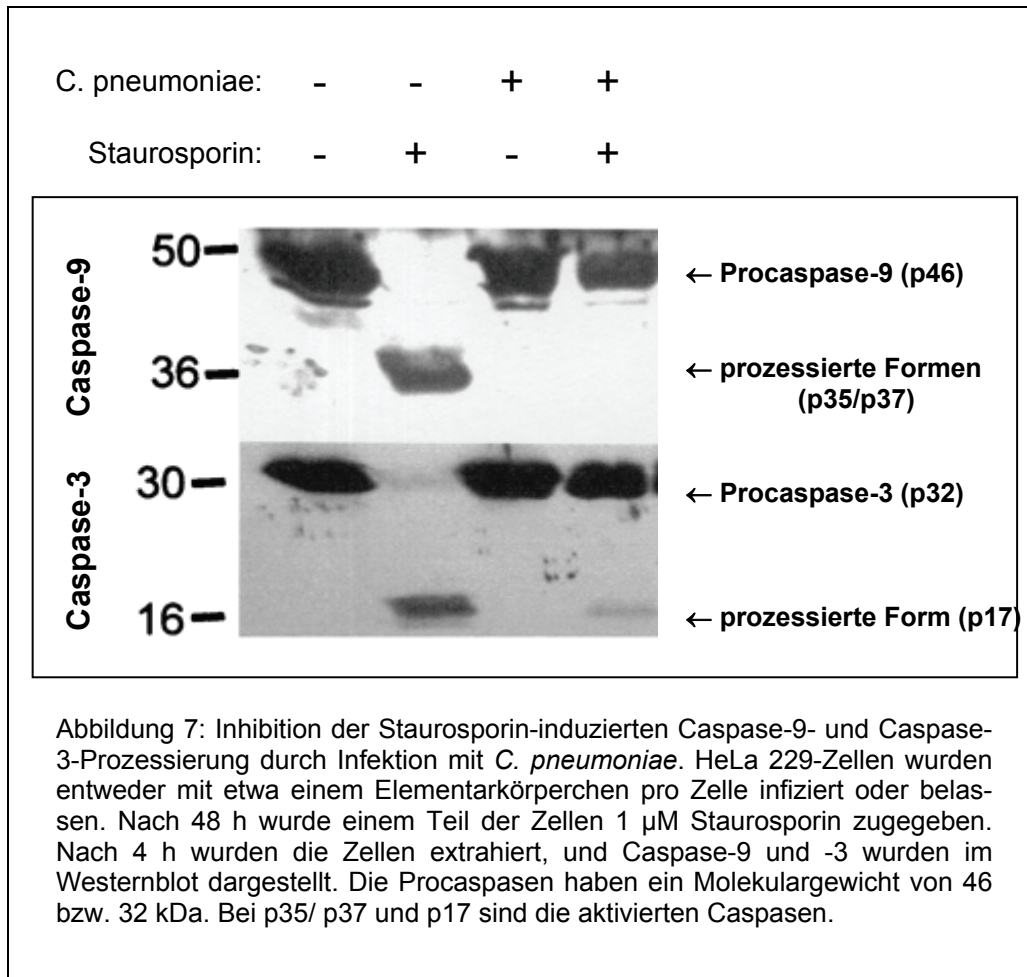
Der Umfang der proteolytischen Aktivitätshemmung war von der Stärke der Infektion abhängig. Je höher die Anzahl von Elementarkörperchen pro Zelle war, umso weniger proteolytische Aktivität wurde gemessen (Abbildung 6).



Somit ließ sich festhalten, dass die Infektion mit *C. pneumoniae* die Staurosporin-induzierte Apoptose entweder durch Hemmung der Caspase-3-Aktivität oder durch Hemmung davor liegender Schritte blockiert.

3.3. Blockade der Aktivierung der Initiatorcaspase-9 durch Staurosporin im Verlauf der Infektion

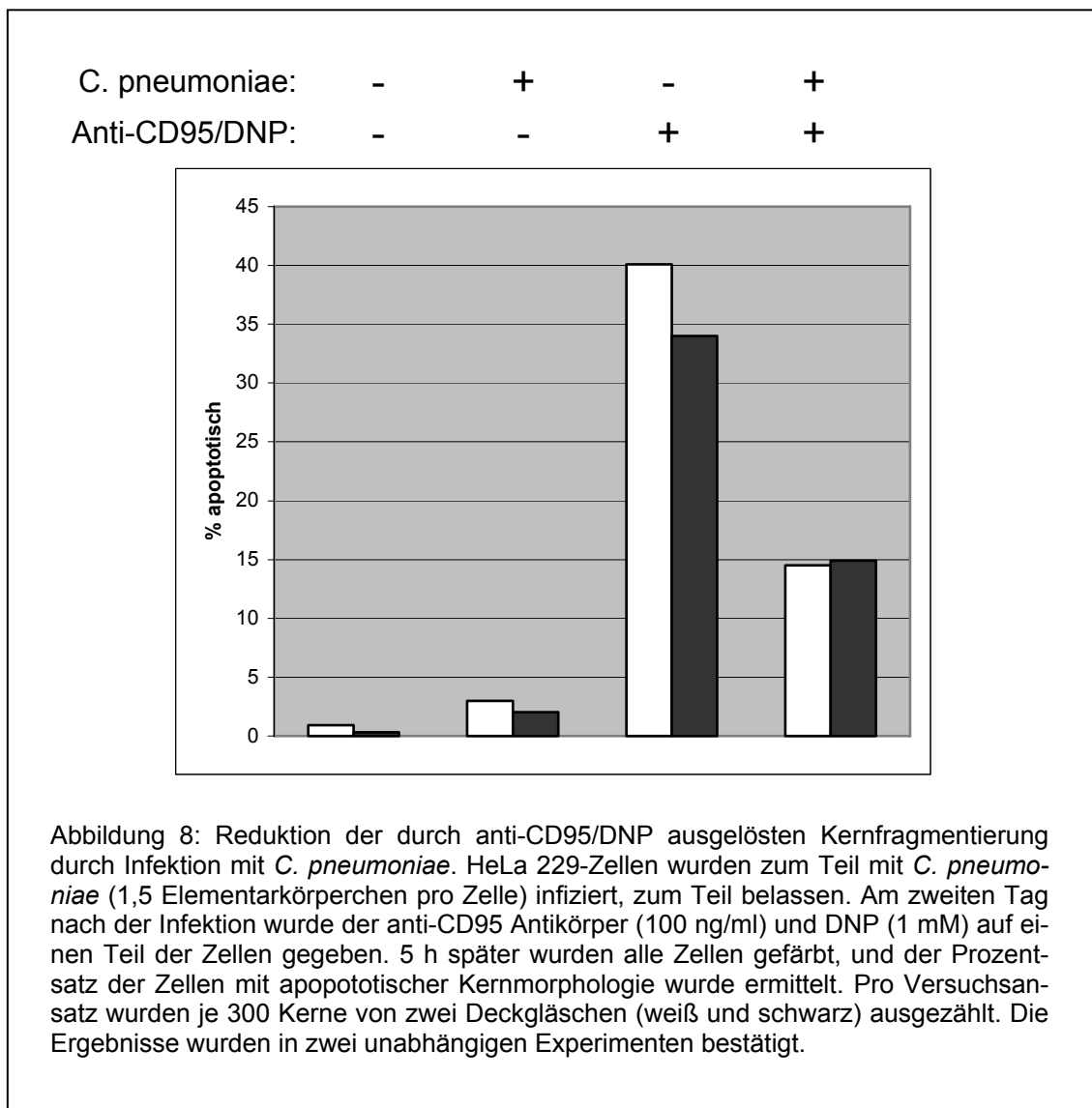
Einer dieser Schritte ist die Aktivierung der Initiatorcaspase, Caspase-9. Im Westernblot wurde der Einfluss von *C. pneumoniae* auf die Aktivierung von Caspase-3 und -9 untersucht (Abbildung 7).



Dabei stellte sich heraus, dass -wie erwartet- die Behandlung mit Staurosporin bei nicht infizierten HeLa 229-Zellen zur Aktivierung von sowohl Caspase-9 als auch Caspase-3 führte. In den mit *C. pneumoniae* infizierten Zellen war die Prozessierung der beiden Caspasen stark reduziert. Dies zeigt, dass der antiapoptotische Einfluss einer Infektion mit *C. pneumoniae* an einem noch früheren Schritt in der Signaltransduktion der Zelle liegt.

3.4. Inhibition der durch den CD95-Rezeptor ausgelösten Apoptose

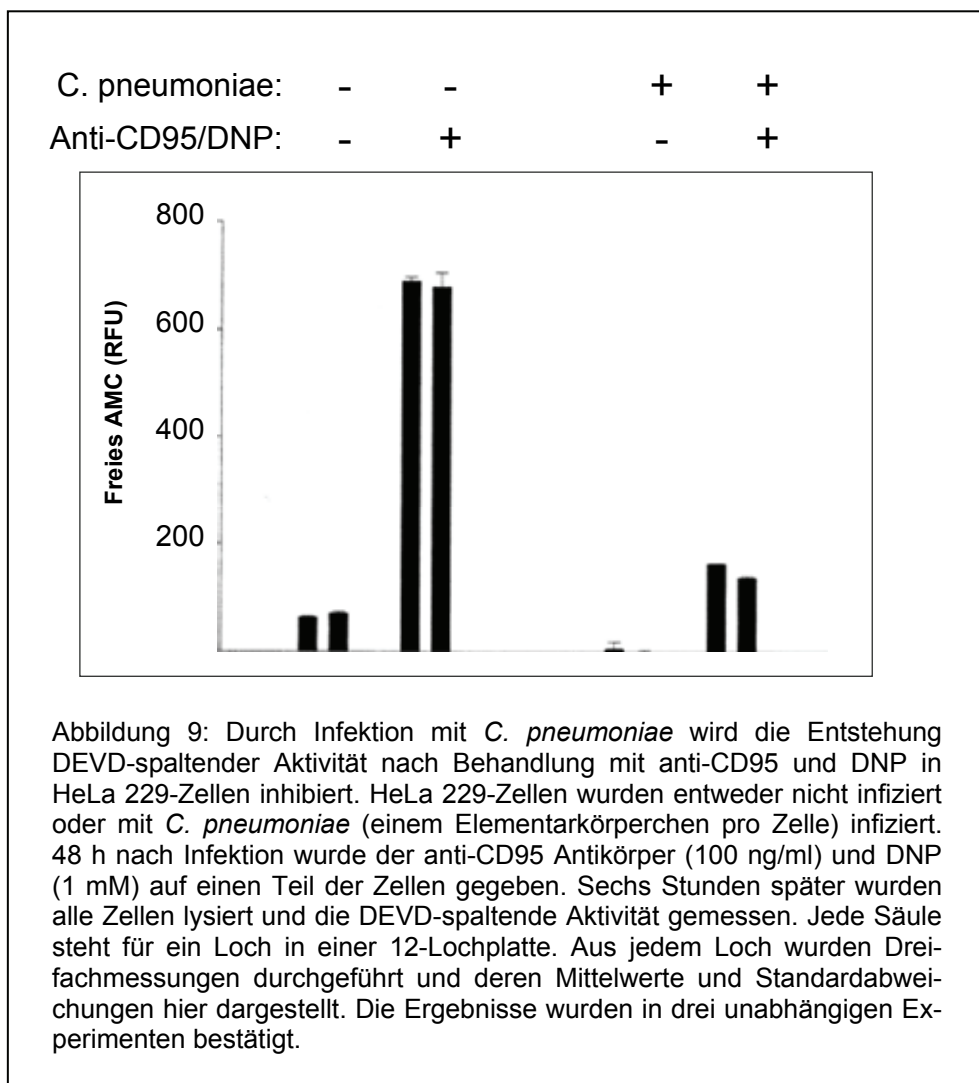
Apoptose kann durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst werden. Verschiedene Stimuli aktivieren unterschiedliche Signaltransduktionswege, und verschiedene Wege können in die Auslösung von Apoptose münden. Um weitere Informationen über die molekulare Natur der chlamydialen Apoptoseinhibition zu erhalten, wurde untersucht, wie *C. pneumoniae* die durch den CD95-Rezeptor induzierte Apoptose beeinflusst.



Manche Zellen können direkt durch ein CD95-Signal getötet werden. In den verwendeten HeLa 229-Zellen waren Verstärkertechniken notwendig, etwa die hier

eingesetzte Zugabe von 2, 4-Dinitrophenol (DNP). DNP wurde dabei in einer Konzentration verwendet, die selbst keine Apoptose auslösen konnte (Linsinger et al., 1999). Die Kerne wurden gefärbt und ausgezählt (Abbildung 8).

Die Zellen wurden weiter in einem Caspasenaktivitätstest auf die DEVD-spaltende Aktivität untersucht (Abbildung 9).

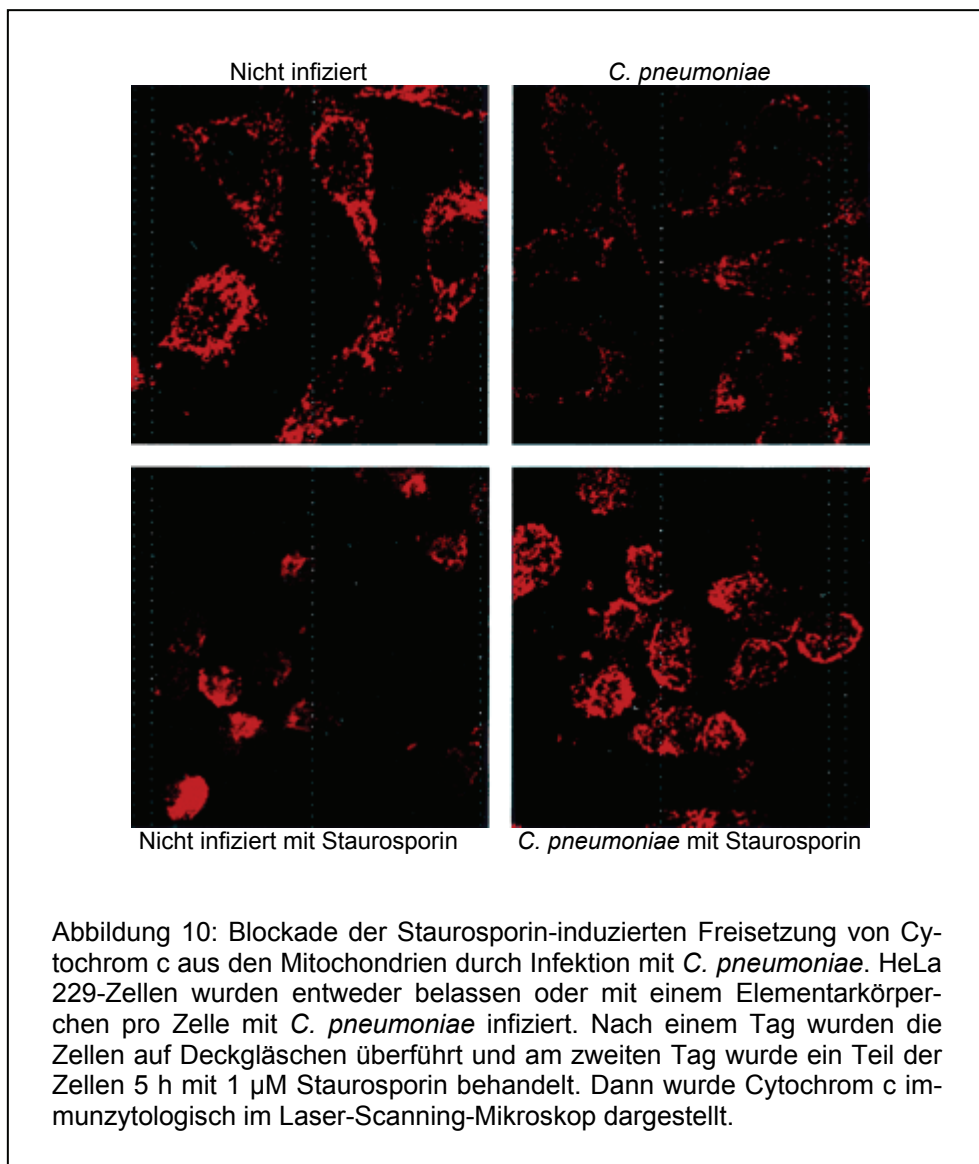


Wie die Abbildungen 8 und 9 zeigen, war sowohl der Anteil apoptotischer Kerne als auch die DEVD-spaltende Aktivität nach CD95-Stimulation in den infizierten Zellen geringer. Demnach ist der antiapoptotische Effekt einer Infektion mit *C. pneumoniae* nicht auf die Staurosporin-induzierte Apoptose beschränkt.

3.5. Blockade der Staurosporin-induzierten Cytochrom c-Freisetzung aus Mitochondrien durch Chlamydieninfektion

Einen Schritt vor der Aktivierung der Caspase-9 steht die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und die Bildung des Apoptosoms (siehe Einleitung).

An infizierten und nicht infizierten HeLa 229-Zellen wurde Cytochrom c immunzytologisch dargestellt. Abbildung 10 zeigt mit Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommene Bilder.



Die beiden Proben ohne Staurosporinbehandlung zeigten in den Mitochondrien lokalisiertes Cytochrom c. Dies entspricht einem normalen Verteilungsmuster.

In den nicht infizierten, für 5 h mit Staurosporin behandelten Zellen verteilte sich das Cytochrom c über die ganze Zelle, inklusive dem Kern. Bei den infizierten Zellen hingegen war die Freisetzung deutlich geringer. In den meisten Zellen konnte das Bild eines mitochondrialen Verteilungsmusters -wie in den unbehandelten Zellen- beobachtet werden. Die Zellen waren lediglich geschrumpft (wahrscheinlich ein direkter chemischer Effekt von Staurosporin). *C. pneumoniae* verhindert somit die Cytochrom c-Freisetzung aus Mitochondrien und damit die nachgeschaltete Caspasenaktivierung.

3.6. Schutz vor Cytochrom c-induzierter Caspasenaktivierung durch Infektion mit Chlamydien in einem zellfreien System

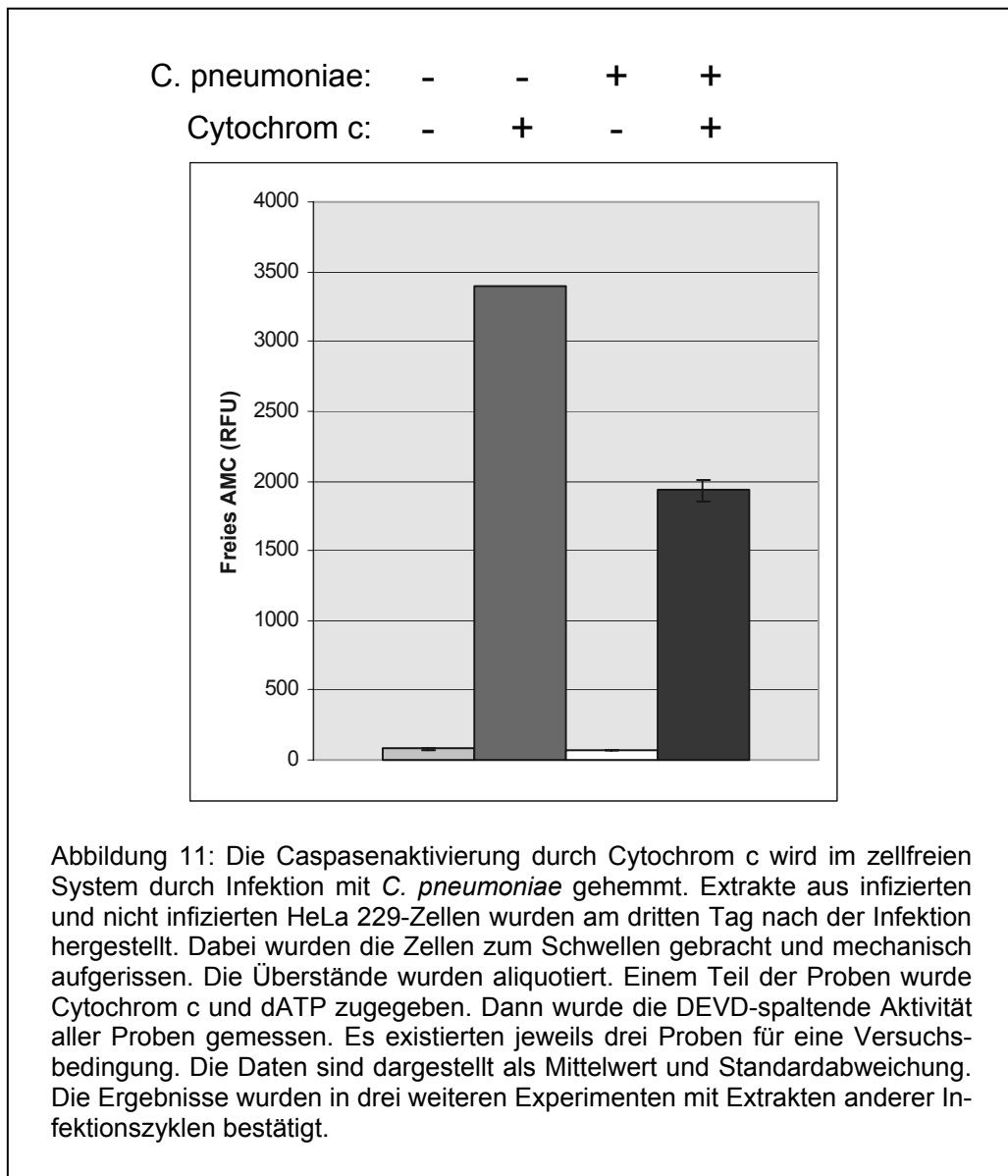
Mit der Blockade der Cytochrom c-Freisetzung wäre der Schutz der infizierten Zellen vor der Apoptose bereits gut erklärt. Es wurde untersucht, ob dennoch weitere antiapoptotische Aktivitäten in infizierten Zellen existieren.

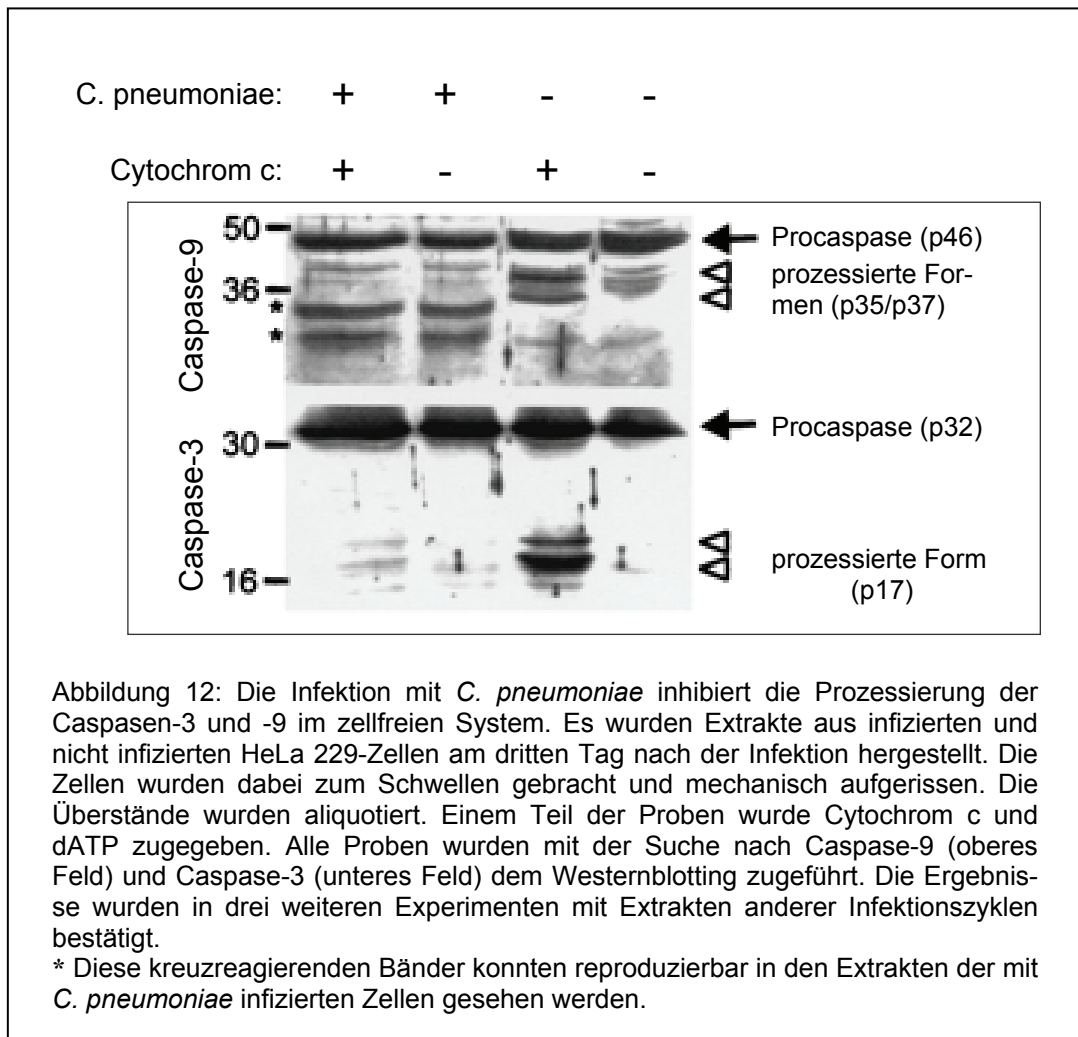
Zellextrakte wurden hergestellt und mit Cytochrom c und dATP inkubiert. Durch diese Technik war es möglich, die Effekte in Zellen nachzustellen, die nach dem Austritt von Cytochrom c aus den Mitochondrien auftreten (insbesondere die Aktivierung von Caspasen). Die Aktivierung von Caspasen wurde in Extrakten infizierter und nicht infizierter Zellen untersucht.

Überraschenderweise zeigte sich, dass die Infektion mit *C. pneumoniae* auch hier einen inhibierenden Effekt auf die Caspasenaktivierung hatte (Abbildungen 11 und 12). Es wurde also nicht nur die Freisetzung von Cytochrom c blockiert, sondern es bestand auch bei bereits freigesetztem Cytochrom c durch den Einfluss von *C. pneumoniae* ein Schutz gegen die Apoptose.

Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die Infektion mit *C. pneumoniae* die Zusammensetzung des Zytosols der Zellen in einer Weise veränderte, die die Caspasenaktivierung auf Cytochrom c-Gabe reduzierte oder verhinderte. Es ist

bisher nicht vollständig geklärt, auf welche Weise dies geschieht. Die Caspase-9 wird durch einen großen Proteinkomplex aktiviert, der aus Apaf-1, Cytochrom c, Procaspase-9 und vielleicht weiteren Komponenten besteht. Möglicherweise bindet eine *C. pneumoniae*-abhängige Komponente an diesen Komplex und beeinflusst so die Prozessierung der Caspasen.

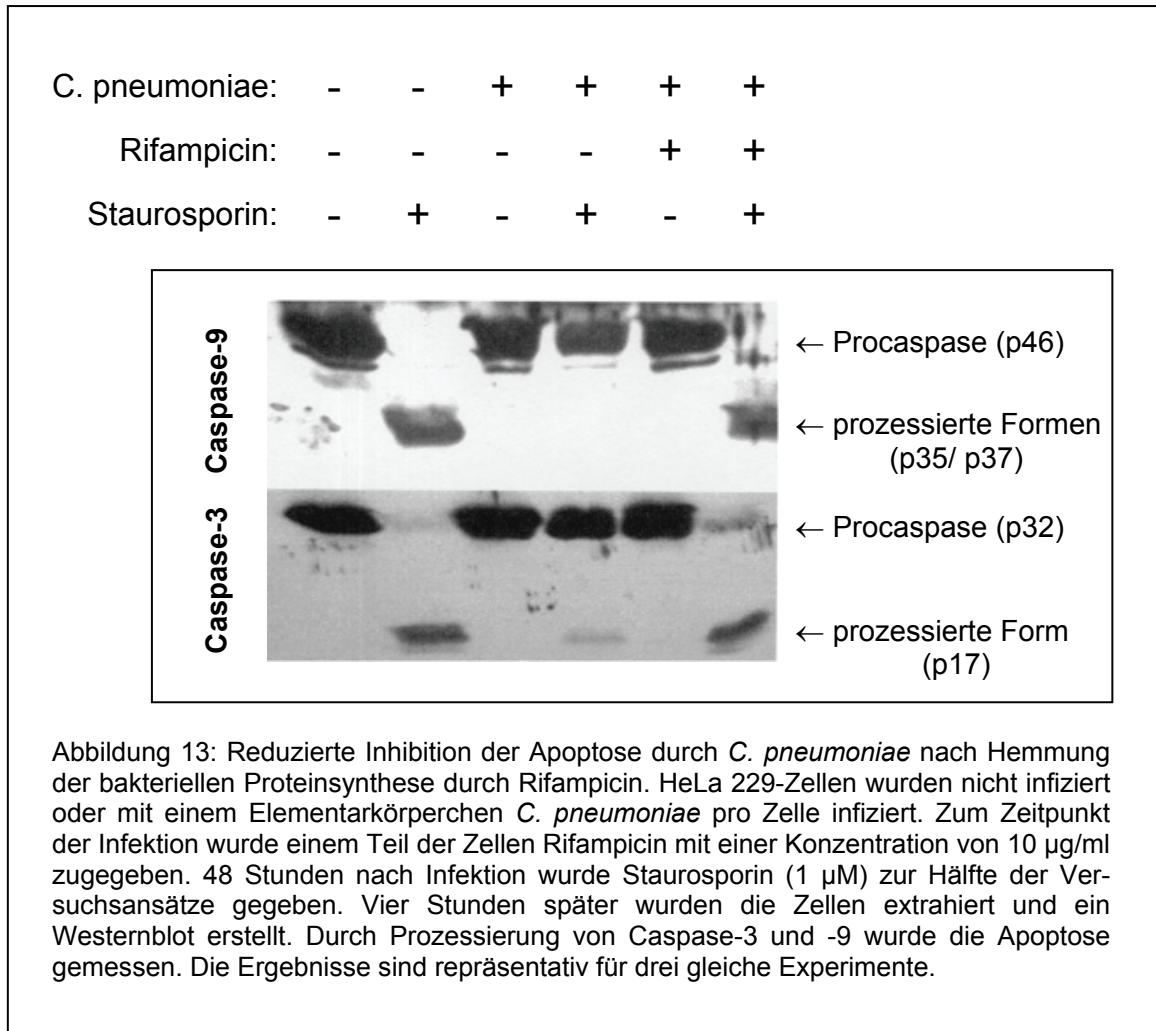




3.7. Bakterielle Proteinsynthese ist für den Schutz gegen Apoptose notwendig

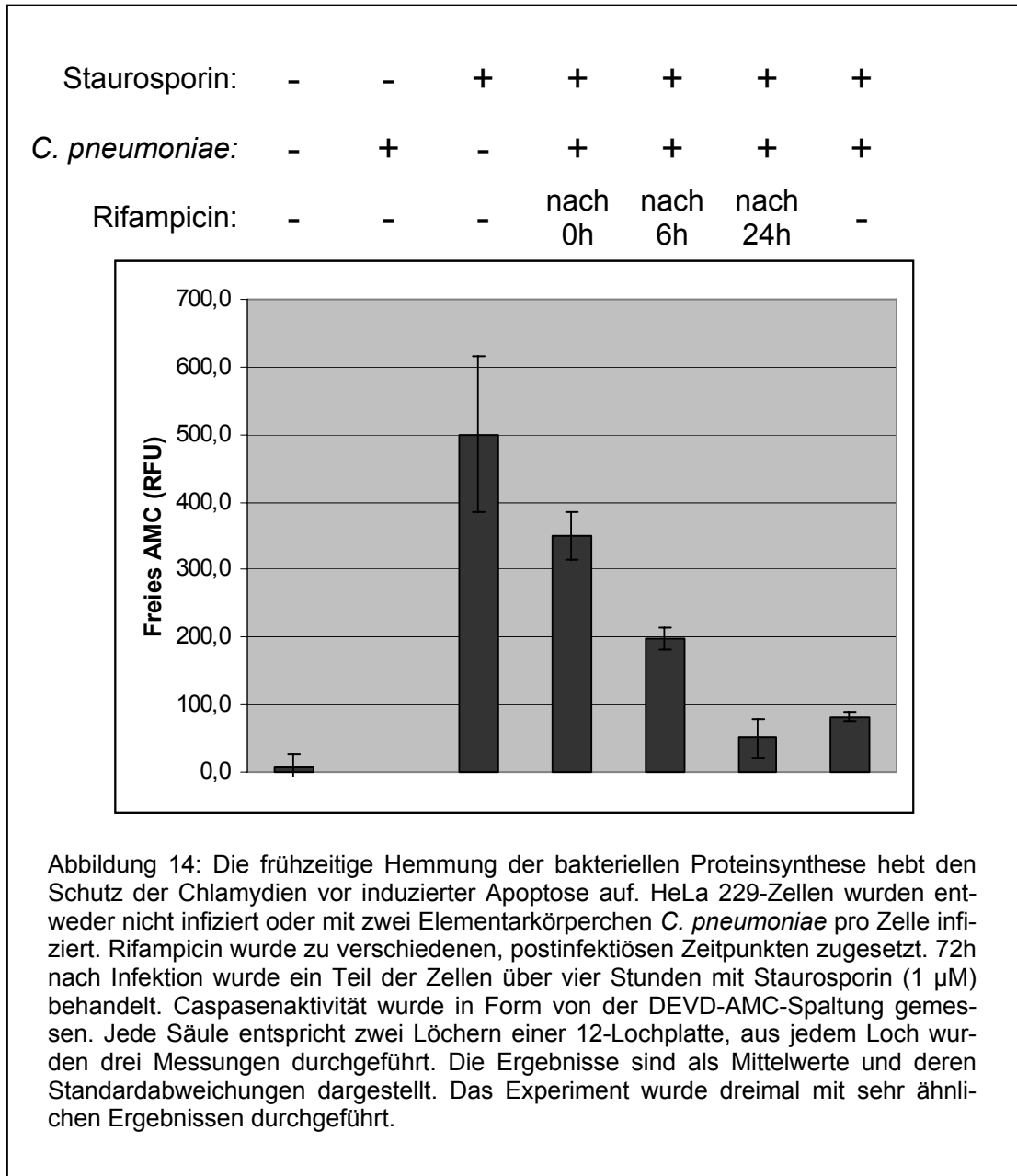
Im Weiteren wurde untersucht, ob der durch die Infektion mit Chlamydien hervorgerufene antiapoptotische Einfluss durch die Chlamydien selbst umgesetzt wird oder ob dies indirekt durch Aktivitäten der Wirtszellen geschieht. Dazu wurde zunächst die bakterielle Aktivität in Form von Proteinsynthese außer Kraft gesetzt. Dies wurde durch eine geringe Konzentration des Antibiotikums Rifampicin erreicht. Durch die geringe Konzentration wird der Apparat der Wirtszelle nicht beeinflusst. Die Apoptose-Antwort wurde durch Caspase-3- und Caspase-9-Prozessierung mit Westernblot gemessen. Bei infizierten Zellen, die eine Stau-sporinbehandlung erhalten hatten, zeigte sich -wie erwartet- nahezu keine apoptotische Antwort. Waren die infizierten Kulturen dagegen gleich nach Infektion mit

Rifampicin und später mit Staurosporin behandelt worden, so zeigte sich eine deutliche Apoptose (Abbildung 13). Für die Umsetzung der antiapoptotischen Eigenschaft wird also die bakterielle Proteinsynthese benötigt.



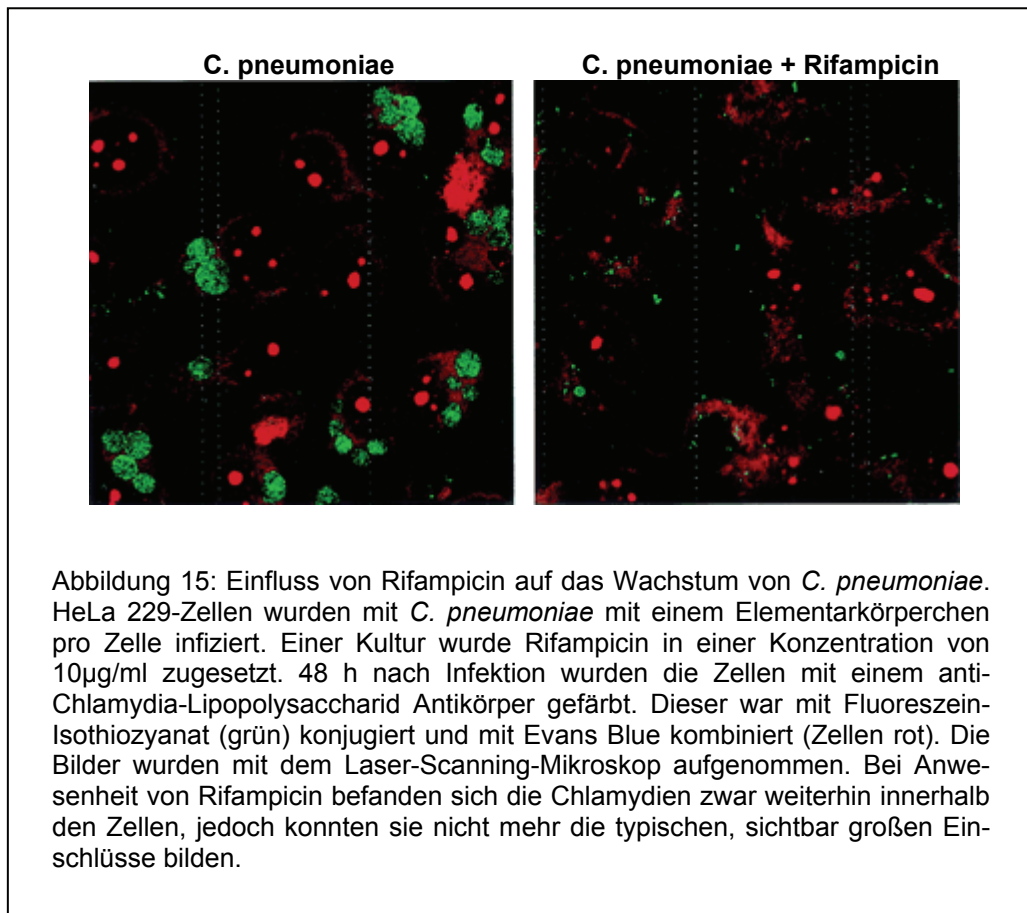
Um zu untersuchen, in welchem Zeitraum die benötigten bakteriellen Proteine produziert werden, wurde Rifampicin zu unterschiedlichen, postinfektösen Zeitpunkten zugesetzt (Abbildung 14). Bei sofort zugesetztem Antibiotikum konnte die bakterielle Proteinsynthese zum überwiegenden Teil aufgehalten werden. Sechs Stunden nach Infektion zugesetztes Rifampicin konnte die Synthese direkt oder indirekt antiapoptotisch wirkender Proteine nur noch wenig aufhalten. Nach 24 Stunden zugesetztes Rifampicin hatte gar keinen Einfluss mehr auf die antiapoptotische Aktivität der Chlamydien. Daraus lässt sich schließen, dass die antiapop-

totische Eigenschaft der Chlamydien eine frühzeitige bakterielle Proteinsynthese erfordert.



Es ließ sich beobachten, dass Chlamydien innerhalb ihrer Einschlüsse in den Zellen heranwachsen und sich vermehren. Um zu sehen, was unter dem Einfluss von Rifampicin mit den Chlamydien geschieht, wurden diese im Verlauf der Infektion gefärbt und mikroskopisch dargestellt. Dabei zeigte sich, dass sie nach wie vor von den Zellen internalisiert wurden. Die Infektion war durch Rifampicin also nicht

unterdrückt. Jedoch fanden sich unter Rifampicin keinerlei große Einschlüsse mehr. Sowohl die Produktion direkter bzw. indirekter (bisher nicht geklärt) antiapoptotischer Proteine als auch das Wachstum der Chlamydien war also beeinträchtigt.



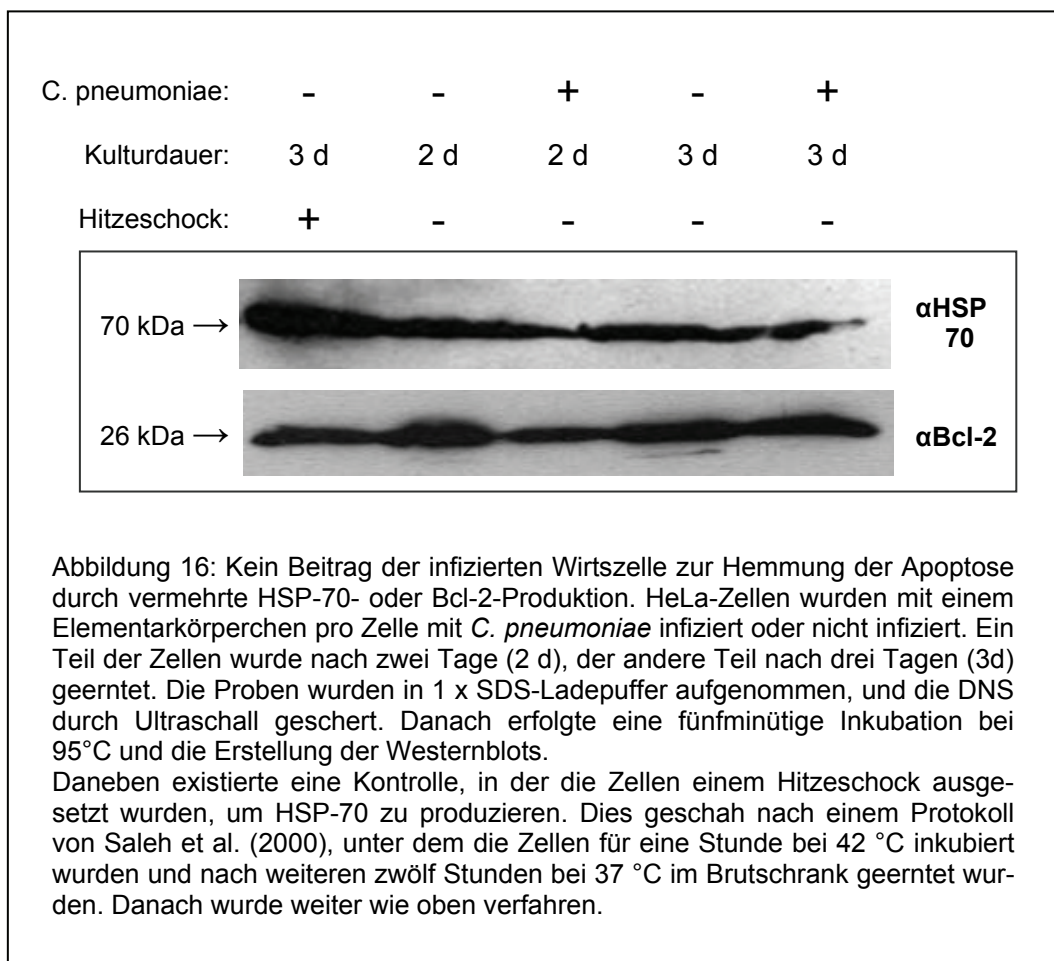
3.8. Der Schutz gegen Apoptose entsteht ohne vermehrte HSP-70 oder Bcl-2-Expression der Zelle und ohne nachweisbare Aktivierung des NF-κB-Systems

Auch wenn die chlamydielle Proteinsynthese für die antiapoptotische Aktivität benötigt wird, schließt das nicht aus, dass diese synthetisierten Faktoren zur Bildung eines antiapoptotischen Proteins durch die Wirtszelle führen. Deshalb wurden einige zelluläre Faktoren untersucht, die eine antiapoptotische Eigenschaft besitzen.

Das Hitzeschock-Protein-70 beispielsweise kann an der Caspasen-Rekrutierungs-Domäne von Apaf-1 binden und dadurch die Bindung von Procaspase-9 verhindern. Dadurch wird die Formation zu einem funktionsfähigen Apoptosom gehemmt und damit auch die Apoptose (Saleh et al., 2000; Beere et al., 2000).

Es stellte sich heraus, dass die Expression dieses Proteins durch die Wirtszelle unter Infektion mit *C. pneumoniae* im Vergleich zu nicht infizierten Zellen jedoch nicht verändert war (Abbildung 16).

Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine hemmen die Aktivierung der Bax/Bak-Proteine und damit die Apoptose (siehe Einleitung). Eine Expression dieser Proteine fand unter Infektion jedoch nicht statt (Abbildung 16).



NF- κ B wurde untersucht, weil ein NF- κ B-abhängiger Schutz gegen Apoptose in vielen Fällen beschrieben wurde. Beispielsweise benötigt das obligat intrazelluläre Bakterium *Rickettsia rickettsii* für das Überleben in endothelialen Zellen die Induktion von NF- κ B-Aktivität (Clifton et al., 1998).

HeLa-Zellen wurden dazu mit Plasmiden transfiziert, in denen die Expression des Reporters Luciferase unter Kontrolle des konstitutiv aktiven β -Aktin-Promotors (als Kontrolle) oder von einem NF- κ B-abhängigen, induzierbaren Promotor war (aus dem Enhancer der kappa-leichten Kette des B-Zellrezeptors). Die Zellen wurden infiziert oder nicht infiziert und die Luciferaseaktivität nach 8 h, 24 h oder 48 h gemessen. Infizierte und nicht infizierte Zellen wiesen eine ähnliche relative Aktivität auf (Abbildung 17). Dies zeigt, dass keine Induktion von NF- κ B-Aktivität durch die Chlamydieninfektion stattfindet.

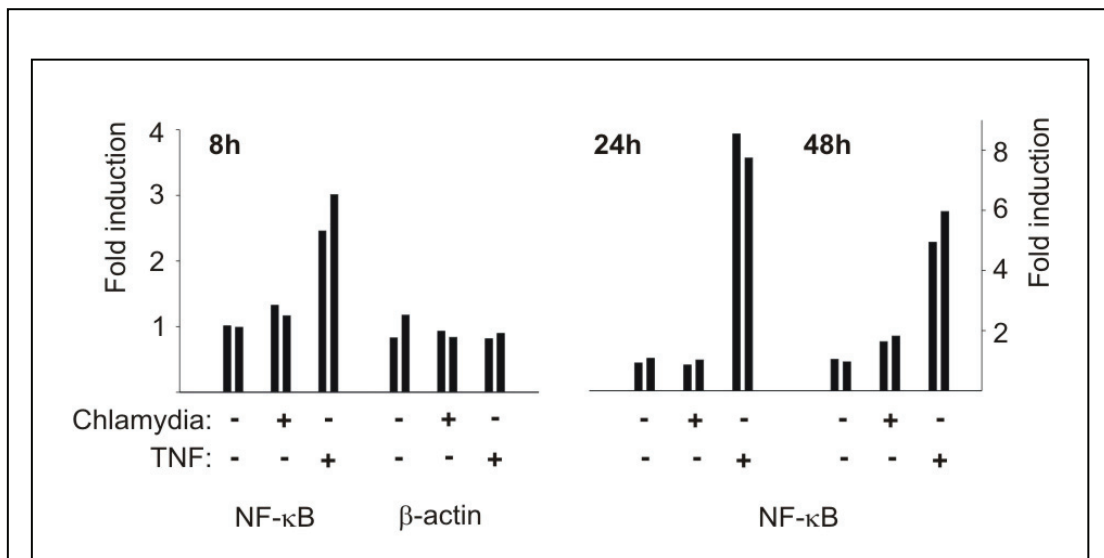


Abbildung 17: Keine Induktion der NF- κ B-Aktivität durch Infektion mit *C. pneumoniae*. HeLa-Zellen wurden durch Elektroporation mit Plasmiden transfiziert, in denen die Expression entweder vom konstitutiv aktiven β -Aktin-Promotor oder von einem NF- κ B-abhängigen, induzierbaren Promotor gesteuert wurde. Am nächsten Tag wurden die Kulturen aufgeteilt und mit einem Elementarkörperchen pro Zelle infiziert oder nicht infiziert. Einigen Proben wurde als Positiv-Kontrolle der NF- κ B-Induktion TNF (10 ng/ml) hinzugefügt (über 8 h für die 8 h-Messung und über 16 h für die 24 h- und 48 h-Messung). Nach den entsprechenden Infektionszeiten wurden die Zellen lysiert, und die Luciferaseaktivität wurde in den Extrakten gemessen. Die Ergebnisse sind als relative Aktivität gezeigt, wobei die Aktivität der unbehandelten Zellen gleich eins gesetzt wurde.

4. Diskussion

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen ergaben, dass eine Infektion mit *C. pneumoniae* die Wirtszelle vor experimentell induzierter Apoptose schützt. Diese Blockade findet im Signaltransduktionsweg noch vor der Aktivierung der Caspasen statt und betrifft sowohl den mitochondrialen als auch den CD95-Weg (der jedoch eine Verbindung zum mitochondrialen Weg besitzt). Es wird sowohl die Cytochrom c-Freisetzung blockiert als auch die Caspasenaktivierung durch bereits freies Cytochrom c. Für diese Inhibition wird die bakterielle Proteinsynthese benötigt, die innerhalb der ersten Stunden des Entwicklungszyklus abläuft.

4.1. Pro- und antiapoptotische Aktivitäten von Chlamydien

Eine Reihe von z. T. neueren Studien wurde veröffentlicht, die Inhibition, manchmal allerdings auch Induktion von Apoptose durch Chlamydien beschreiben (eine aktuelle Diskussion dieser Befunde findet sich in Byrne and Ojcius, 2004). Die verschiedenen humanpathogenen Chlamydienarten scheinen sich hier etwas unterschiedlich zu verhalten. In bestimmten Gewebearten wird Apoptose durch *C. psittaci* oder *C. trachomatis* induziert (Gibellini et al., 1998; Ojcius et al., 1998; Perfettini et al., 2000). In anderen Arbeiten wird die Inhibition der Apoptose durch die Infektion mit *C. psittaci* und *C. trachomatis* beschrieben (Greene et al., 2004; Fan et al., 1998).

Mehrere Gründe sind für diese unterschiedlichen Reaktionen denkbar:

Als obligat intrazelluläre Parasiten sind Chlamydien auf die Integrität der Wirtszelle angewiesen. Sie benötigen ausreichend Zeit für ihr Wachstum und ihre Vermehrung. Falls die Wirtszelle vorzeitig durch Apoptose sterben sollte, wäre wahrscheinlich auch die Infektion gestoppt. Unter diesem Gesichtspunkt kann Apoptose als Verteidigungsmechanismus der Zelle gesehen werden. Die antiapoptotische Aktivität der Bakterien wäre dann zumindest vorteilhaft, vielleicht sogar Voraussetzung für die Replikation von Chlamydien.

Ein Grund für die Apoptoseinduktion durch Chlamydien könnte sein, dass diese zum passenden Zeitpunkt die Zelle verlassen können, um neue Zellen zu infizieren. Geschützt vor extrazellulären Abwehrmechanismen und dem Verlust der Membranintegrität können sie innerhalb der apoptotischen Körperchen von

Makrophagen oder benachbarten Zellen phagozytiert werden. Dadurch können unter Umgehung von Nekrose und Entzündung weitere Zellen infiziert werden. Möglicherweise ist dies eine vorteilhafte und vereinfachte Form der Verbreitung.

Dieses einzigartige Nebeneinander von Induktion und Inhibition der Apoptose muss sich nicht widersprechen. Auch Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies und Stämmen sind durchaus denkbar. Außerdem können Chlamydien verschiedene Wirte befallen und auf diese jeweils anders reagieren. Auch durch den befallenen Gewebetyp können sich Unterschiede ergeben.

Nach Perfetti et al. (2002) ist es auch für einige Stämme im Bereich des Möglichen, dass innerhalb eines Infektionszyklus zu Beginn die durch äußere Einflüsse stimulierte Apoptose inhibiert werden könnte und gegen Ende des Replikationszyklus die Induktion der Apoptose stattfinden könnte. Es ist auch vorstellbar, dass kürzere und längere Zyklen existieren. Bei ersteren würde die Apoptoseinduktion sehr rasch auf die Phase der Apoptoseinhibition folgen. Und bei der zweiten Variante würde eine längere Pause eintreten, bis die Retikularkörperchen wieder in Elementarkörperchen zurückverwandelt wären und die Apoptoseinduktion stattfinden würde. Diese unterschiedlichen Zyklen gibt es -zumindest in vitro- wirklich (s.u.). Hierin könnte auch die Erklärung dafür liegen, dass bei Chlamydieninfektionen sowohl akute als auch chronische Krankheitsverläufe existieren. Während einer akuten Infektion könnte die Verbreitung der Chlamydien durch viele produktive Infektionszyklen überwiegen, während bei einer chronischen Infektion schwerpunktmäßig dagegen das nichtproduktive, intravakuoläre Wachstum überwiegt (Byrne und Ojcius unterscheiden 2004 diese Formen als produktives und persistierendes Wachstum).

Die Retikularkörperchen können tatsächlich gänzlich aufhören, sich zu teilen und als so genannte „persistierende Körperchen“ verweilen. Dies wurde in vitro beispielsweise ab einer bestimmten Konzentration Interferon γ erreicht (Beatty et al., 1993). Auch die Behandlung mit einigen Antibiotika oder der Entzug von essentiellen Nährstoffen wie bestimmten Aminosäuren kann in vitro zu persistierenden Infektionen führen. Dabei wandelt sich für einen längeren Zeitraum z.B. das Retikularkörperchen nicht mehr in das Elementarkörperchen zurück. Oder die Retikular-

körperchen teilen sich nicht mehr und entwickeln atypische Formen. Auch scheint bewiesen zu sein, dass solche persistierenden Infektionen in vivo existieren. Häufig wurden nach längerem Abstand Reaktivierungen von persistierenden Infektionen beobachtet, die nachweislich keiner Neuinfektion entsprachen. Wie der Mechanismus der persistierenden Infektionen jedoch auf molekularer Ebene im Detail funktioniert, ist Inhalt weiterer Studien (Hogan et al., 2004).

4.2. Inhibierender Eingriff der Chlamydien in den Signaltransduktionsweg der Apoptose

Auf welche Art und Weise *C. pneumoniae* die Apoptose inhibiert, ist bis heute noch nicht vollkommen geklärt. Jedoch sind durch weitere Untersuchungen enorme Fortschritte gemacht worden. Es wurde gezeigt, dass die Inhibition der Apoptose auf den mitochondrialen Weg der Apoptose beschränkt ist. Läuft die Apoptose allein über Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-3 ab, so findet keine Inhibition statt. Dies ist der Fall bei den sog. Typ-I-Zellen nach Stimulation von Todesrezeptoren (etwa CD95): Die Infektion mit Chlamydien schützt hier nicht vor Apoptose (Fischer et al., 2004a).

Wie in der Einleitung ausgeführt, besteht der Beitrag von Mitochondrien zur Apoptose in folgenden Schritten: Ein Signal zur Apoptose aktiviert ein oder mehrere Proteine der Familie der BH3-Proteine, die daraufhin Bax/Bak aktivieren. Aktives Bax/Bak setzt Cytochrom c aus den Mitochondrien frei. Bei näherer Analyse dieses Weges konnte nachgewiesen werden, dass in infizierten, mit apoptotischen Stimuli behandelten HeLa 229-Zellen bereits die Bax-Aktivierung blockiert war. Es gab keinen Unterschied in der Expression der Bax/Bak-Proteine zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen. So konnte man davon ausgehen, dass die Blockade vor der Bax/Bak-Aktivierung liegt (Fischer et al., 2004b).

Die Untersuchung der BH3-Proteine zeigte zunächst, dass die Überexpression von aktivem Bim oder Puma auch in infizierten Zellen Apoptose auslöste, dass der Schutz gegen Apoptose also proximal der Aktivierung von BH3-Proteinen liegen musste. Es wurde weiter gezeigt, dass Bim zwischen 14 und 26 Stunden nach Infektion durch *C. trachomatis* verschwindet. Hierbei blieb die Expression der mRNA unverändert, während Inhibitoren des zellulären Proteasoms den Abbau von Bim

blockieren. Auch für Infektion durch *C. pneumoniae* konnte das Verschwinden von Bim nachgewiesen werden. Dafür wurde die bakterielle Proteinsynthese benötigt. Auch das Verschwinden der BH3-Proteine Puma und Bad wurde nachgewiesen.

Somit lässt sich vermuten, dass eine charakteristische Struktur, die alle drei Proteine gleichermaßen besitzen, Zielstruktur für den Angriff ist, der letztendlich zum Verschwinden der Proteine führt. Tatsächlich konnte durch die Untersuchung von Deletionsmutanten gezeigt werden, dass die BH3-Domäne selbst (die einzige Struktur, die in allen BH3-Proteinen vorkommt) direkt das Ziel der chlamydialen Aktivität ist. Diese Untersuchungen haben zu der Vorstellung geführt, dass eine von Chlamydien synthetisierte Aktivität aktive BH3-Domänen angreift und durch eine unbekannte Modifikation den Abbau durch das Proteasom einleitet (Fischer et al., 2004b). In der Zwischenzeit wurde gezeigt, dass auch die BH3-Proteine Noxa, tBid und Bmf im Verlauf der Infektion mit *C. trachomatis* abgebaut werden (Ying et al., 2005).

Da BH3-Proteine an wahrscheinlich fast allen Fällen der Apoptoseinduktion beteiligt sind, erklärt ein umfassender Abbau dieser Proteine den praktisch vollständigen Schutz infizierter Zellen gegen experimentelle Apoptoseinduktion. Die einzige bekannte Ausnahme, bei der kein Beitrag durch BH3-Proteine notwendig ist, ist die Induktion von Apoptose durch Todesrezeptoren in Typ-I-Zellen. Wie von obigem Modell vorhergesagt, ist dies gleichzeitig der einzige Fall, in dem Chlamydien nicht gegen Apoptose beschützen. Eine Bestätigung des Modells ist auch die Inhibition der Fas-induzierten Apoptose von Typ-II-Zellen. In diesem Fall aktiviert Fas Caspase-8, die daraufhin das BH3-Protein Bid proteolytisch aktiviert. Aktives Bid (tBid) transloziert dann an die Mitochondrien und aktiviert Bax zur Freisetzung von Cytochrom c. Interessanterweise wird Bid selbst während der Infektion nicht abgebaut, aktives tBid hingegen wird degradiert. Bid ist ein BH3-Protein; die BH3-Domäne liegt allerdings im Gesamtmolekül in der Struktur verborgen und wird erst durch die Caspase-8-vermittelte Spaltung exponiert (McDonnell et al., 1999). Entsprechend scheint die chlamydiale Aktivität tBid, nicht jedoch intaktes Bid zu erkennen.

Die Daten deuten darauf hin, dass die Inhibition des Effektes von bereits freigesetztem Cytochrom c keine große Bedeutung in intakten Zellen besitzt. Da infizierte Zellen unverändert sensibel gegen die Überexpression von BH3-Proteinen sind, ist dieser Effekt von untergeordneter Bedeutung. Dennoch ist es denkbar, dass ein solcher, vermutlich kleiner Effekt in vereinzelt Zellen zum Überleben beiträgt und dadurch den „Erfolg“ der Infektion beeinflusst.

4.3. Bakterielle Proteinsynthese zur Apoptoseinhibition

Wie *C. pneumoniae* die BH3-Domäne angreift, ist bis heute noch nicht geklärt. Klar ist, dass hierfür bakterielle Proteinsynthese benötigt wird. Chlamydien besitzen ein sog. Typ III Sekretionssystem, d.h. es besteht die Möglichkeit, dass das Bakterium Proteine in die Wirtszelle einschleusen kann (Fischer et al., 2001). Im Genom sind keine offensichtlichen bekannten Apoptoseregulatoren zu erkennen, jedoch wird eine große Anzahl von Proteinen mit unbekannter Funktion codiert (Kalman et al., 1999).

2001 wurde ein Protein identifiziert, das ins Zytosol der Wirtszelle sezerniert wird und zum Abbau von Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle wie RFX5 führt. Es wurde CPAF (chlamydial protease-like activity factor) genannt (Zhong et al., 2001). Während der Chlamydieninfektion ist der RFX5-Abbau dem Abbau von Bim nur um zwei Stunden voraus. Es ist vorstellbar, dass CPAF auch den Abbau vom Bim vermittelt. Wie CPAF auf molekularer Ebene arbeitet, ist bisher nicht bekannt. Man weiß nur, dass es auch von den gleichen Inhibitoren blockiert werden kann, die das Proteasom blockieren.

Um vom Proteasom erkannt zu werden, muss das abzubauende Protein in der Regel mit Proteinen wie beispielsweise Ubiquitin, SUMO-1 oder Nedd8 eine Bindung eingehen (Cienchanover and Schwartz, 1998). Obwohl es nicht auszuschließen ist, dass CPAF auch über eine solche Bindungsfunktion verfügt, ist es wahrscheinlicher, dass die sonst üblichen Proteine Bim zum proteasomalen Abbau führen. Es ist allerdings anzumerken, dass die Ubiquitin/SUMO-Modifikation an Lysinresten erfolgt, und dass der für die Erkennung wichtige Teil von Bim (die BH3-Domäne) kein Lysin enthält. Wahrscheinlich induziert der chlamydiale Faktor

daher keine Peptidmodifikation, sondern eine Konformationsänderung, die Erkennung und Abbau durch das Proteasom zulässt.

2002 wurde von Stenner-Liewen et al. ein Protein identifiziert, welches im Genom von *C. trachomatis* gefunden wurde und in infizierten Zellen exprimiert wird. Die Expression erfolgt spät im Infektionszyklus. Es kann u. a. mit dem Todesrezeptor Fas interagieren und wird „Chlamydia protein associating with death domains“ (CADD) genannt. Durch transiente Transfektion von CADD-produzierenden Plasmiden wurde in verschiedenen Zelltypen die Caspasen-abhängige Apoptose ausgelöst. Allerdings konnte in infizierten Zellen trotz Expression von CADD keine Apoptose induziert werden. Möglicherweise hemmt CADD durch Interaktion mit Fas die Fas-abhängige Apoptose. Dies muss jedoch noch genauer untersucht werden. Die Apoptoseinduktion im Transfektionsmodell könnte wegen dem frei über das Zytosol verstreuten CADD Liganden-unabhängig stattfinden. Dann wäre die Lokalisation von CADD der entscheidende Faktor für Induktion oder Inhibition der Apoptose (Stenner-Liewen et al., 2002). Ob das Protein CADD jedoch eine große Rolle in der Apoptoseinhibition spielt, ist unklar.

4.4. Bax-abhängige Apoptoseinduktion durch Infektion mit Chlamydien

Erst vor kurzem wurden die Umstände und Mechanismen der Apoptoseinduktion genauer unter die Lupe genommen. Die infizierten, apoptotischen Zellen besaßen etliche typische Apoptosezeichen wie beispielsweise die DNS-Fragmentierung, jedoch wurden keine der bisher bekannten Caspasen aktiviert (Ojcius et al., 1998; Perfettini et al., 2002). Eine zunehmende Anzahl von Studien zeigt die Existenz von einigen Zelltodformen, die ohne Caspasenaktivierung funktionieren. Zum Beispiel kann AIF ohne die Aktivierung von Caspasen Chromatin kondensieren lassen und DNS spalten (Lorenzo et al., 1999).

Es wurde auch gezeigt, dass die Überexpression von Bax oder Bak auch ohne Anwesenheit von Caspasen zur Apoptose führen kann (Pastorino et al., 1998; Xiang et al., 1996). Perfettini et al. vermuteten 2002, dass die Apoptoseinduktion während der Infektion mit Chlamydien durch die Aktivierung von Bax ausgelöst sein könnte. Dieser Gedanke wurde durch eine weitere Arbeit mit Bax-defizienten Mäusen untermauert. Die Zellen waren resistent gegenüber Chlamydien-

induzierter Apoptose, und weniger Bakterien als in Mäusen mit Bax wurden nach zwei Zyklen gefunden. Dies führte zur Vermutung, dass die Bax-abhängige Apoptose eine neue Infektionsrunde einleitet. Noch dazu hielt die durch *C. trachomatis* ausgelöste genitale Infektion in den Wildtyp-Mäusen länger an als in den Bax-defizienten Mäusen (Perfettini et al., 2003). Dies bestätigt noch einmal die unter 4.1. bereits geäußerte Vermutung, dass die Apoptoseinduktion einen vorteilhaften Vorgang für die Verbreitung einer Infektion darstellen könnte. Weitere Studien könnten herausfinden, ob das Fehlen von Bax nicht nur zu einer eingeschränkten Verbreitung der Infektion führt, sondern auch, ob durch das verlängerte Überleben der Immuneffektorzellen eine effizientere Elimination der Infektion stattfindet (Byrne and Ojcius, 2004).

Wie Bax unabhängig von anderen BH3-Proteinen aktiviert wird, ist noch nicht vollkommen klar. Es wurde die Überlegung in den Raum gestellt, dass die Oligomerisierung von Bax vielleicht durch den oxidativen Stress, die zytosolische pH-Wert-Änderung und die vermehrte mitochondriale Stoffwechselaktivität unter Chlamydieninfektion ausgelöst wird (Byrne and Ojcius, 2004).

4.5. Nekrose und Chlamydieninfektion

Zumindest bei einigen Chlamydienstämmen tritt in vivo auch die Nekrose neben der Apoptose als Zelltodform auf. Die Nekrose ist dabei wohl für die entzündliche Reaktion und deutliche Gewebsschädigung bei chronischen Infektionen verantwortlich (Perfettini et al., 2003). Eine Studie meint herausgefunden zu haben, dass bei sehr hohen, intrazellulären *C. trachomatis*-Konzentrationen die Elementarkörperchen zweier Stämme in der Lage sind, in der frühen Infektionsphase ein Zytotoxin zu produzieren. Das Zytotoxin soll eine deutliche Homologie zu den großen Clostridien-Zytotoxinen besitzen. Die Zellen entwickeln dabei die Form eines Ballons (Belland et al., 2001). Möglicherweise mag mitunter dieses Toxin für die Nekrose verantwortlich sein. Dass in den Experimenten dieser Arbeit keine Nekrose beobachtet wurde, könnte durch einen von Haus aus vorhandenen Schutz der HeLa-Zellen gegeben sein. HeLa-Zellen sind Zervixkarzinom-Zellen. Dieses Karzinom entsteht durch Infektion der Zellen mit humanen Papillomaviren der Hochrisikogruppe. Dadurch werden Onkogene exprimiert, deren Einfluss auf p53 teilweise einen Schutzeffekt gegen Zellnekrose bedeuten kann (DeFilippis et al., 2003).

4.6. Beiträge der Wirtszelle

Chlamydien könnten natürlich auch neben der Produktion eigener Proteine durch Nutzung der Wirtszellen-Gene zu ihren pro- und antiapoptotischen Eigenschaften gelangen. Eine Studie von Wahl et al. untersuchte 2001 die Aktivierung von NF- κ B durch *C. pneumoniae* in Mono Mac 6-Zellen. Interessanterweise wurde in diesen Zellen (im Gegensatz zu HeLa-Zellen) NF- κ B aktiviert. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor für inflammatorische Zytokine einerseits, und antiapoptotische Moleküle andererseits. Die Aktivierung erfolgte postinfektiös über 48 Stunden mit einem Maximum nach einer Stunde. Wenn die Zellen mit NF- κ B -inhibierenden Substanzen wie Pyrrolidin-Dithiocarbamat oder MG-132 und Parthenolid behandelt wurden, zeigte sich eine Caspasen-abhängige Apoptose. Mono Mac 6-Zellen spielen eine bedeutende Rolle bei der Arteriosklerose und sind möglicherweise auch für den Transport der Chlamydien vom Respirationstrakt zu den Arterien verantwortlich. HeLa-Zellen stehen im Zusammenhang mit den Infektionen im Genitaltrakt. Die unterschiedlichen Gewebetypen könnten der Grund für die unterschiedliche Aktivierung des NF- κ B-Systems sein.

Die „inhibitor of apoptosis proteins“ (IAP) können die Caspasenaktivierung wirkungsvoll verhindern und ihre Expression wird vom NF- κ B-System mitreguliert. Es wurde in den Raum gestellt, dass ein Zusammenhang mit dem antiapoptotischen Chlamydienfaktor bestehen könnte (Wahl et al., 2001). Allerdings haben IAP keinen Einfluss auf BH3-Proteine und agieren distal der Freisetzung von Cytochrom c. Eine wichtige Rolle dieser Proteine hier ist daher unwahrscheinlich.

Bcl-2-Überexpression oder HSP-70-Produktion durch die Zelle spielen -wie gezeigt- keine Rolle bei der Apoptoseinhibition. In anderen Studien wurden jedoch Expressionsveränderungen etlicher Gene von pro- und antiapoptotischen Mediatoren gefunden, deren Aufgabe bei Chlamydieninfektionen jedoch nicht klar ist (Byrne and Ojcius, 2004).

4.7. Die Bedeutung der Apoptoseinhibition für die klinische Infektion

Wie bereits beschrieben, konnte *C. pneumoniae* in atheromatösen Plaques nachgewiesen werden und der Zusammenhang mit Arteriosklerose und deren Folgeerkrankungen wird diskutiert (Campbell and Kuo, 2004; Saikku, 2000). Ein therapeu-

tischer Eingriff in die antiapoptotische Aktivität von *C. pneumoniae* könnte vielleicht die Eliminierung der Bakterien erleichtern. Damit könnte das Risiko, an Folgeerkrankungen der Arteriosklerose wie Herzinfarkt, Apoplex, Aortenaneurysma oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit zu erkranken oder zu versterben, gemindert werden. Jedoch auch Menschen mit anderen chronischen Manifestationen einer Chlamydieninfektion dürften davon profitieren.

Gerade weil Antibiotika besonders bei chronischen Infektionen möglicherweise nicht mehr helfen, die Infektionen zu stoppen und zu eliminieren, muss über neue Handlungsansätze nachgedacht werden. Hogan et al. zeigten 2004, dass die Behandlung mit den falschen Antibiotika zu persistierenden Infektionen führen kann (in vitro dargestellt). Bei bereits bestehenden chronischen Infektionen reichten die Konzentrationen der normalerweise verwendeten Antibiotika selbst nach vierwöchiger Behandlung nicht aus, die Bakterien zu eliminieren, wie 2002 eine in vitro-Studie von Kutlin et al. zeigte.

Weitere Studien zu Apoptose und Chlamydien sind wichtig und notwendig, um durch ein breiteres Basiswissen und größeres Verständnis auch verbesserte diagnostische Methoden entwickeln zu können und bessere Medikamente oder auch Impfstoffe gegen Chlamydien zu finden.

Was man verstehen gelernt hat, fürchtet man nicht mehr.

Marie Curie, Physikerin, 1867-1934

5. Zusammenfassung

Chlamydia pneumoniae ist ein obligat intrazelluläres Bakterium, das insbesondere Atemwegsinfektionen hervorruft. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass mit *Chlamydia pneumoniae* infizierte HeLa 229-Zellen gegen experimentell (mit Staurosporin oder anti-CD95) induzierte Apoptose geschützt sind. Apoptose ist eine physiologische, für höherstehende Lebewesen wichtige Form des Zelltodes. Sie kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden und ist Folge spezialisierter Signaltransduktion. In diesem Signaltransduktionsweg ist die Aktivierung der Caspasen-3, -8 und -9 und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien durch Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* blockiert. Hierzu wird die bakterielle Proteinsynthese zu einem frühen Zeitpunkt des Infektionszyklus benötigt. Wie weiter gezeigt, spielen zelluläre Einflüsse durch das NF- κ B-System, HSP-70- oder Bcl-2-Überexpression keine Rolle.

6. Literaturverzeichnis

1. **Adams, J.M., Cory, S.** Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. Trends in Biochemical Sciences 26 (2001) 61-66
2. **Ashkenazi, A., Dixit, V.M.** Death receptors: signaling and modulation. Science 281 (1998) 1305-1308
3. **Beatty, W.L., Byrne, G.I., Morrison, R.P.** Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 90 (1993) 3998-4002
4. **Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M., Green, D.R.** Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. Nat Cell Biol 2 (2000) 469-475
5. **Belland, R.J., Scidmore, M.A., Crane, D.D., Hogan, D.M., Whitmire, W., McClarty, G., Caldwell, H.D.** *Chlamydia trachomatis* cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. Proc Natl Acad Sci USA 98 (2001) 13984-13989
6. **Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Kontgen, F., Adams, J.M., Strasser, A.** Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. Science 286 (1999) 1735-1738
7. **Bouillet, P., Strasser, A.** BH3-only proteins—evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. J Cell Sci 115 (2002) 1567-1574
8. **Byrne, G.I., Ojcius, D.M.** Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. Nat Rev Microbiol 2 (2004) 802-808

9. **Cain, K., Brown, D.G., Langlais, C., Cohen, G.M.** Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (~700kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* 274 (1999) 22686-22692
10. **Campbell, L.A., Kuo, C.C.** *Chlamydia pneumoniae* – an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nat Rev Microbiol* 2 (2004) 23-32
11. **Ciechanover, A., Schwartz, A.L.** The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci USA* 17 (1998) 2727-2730
12. **Clausen, J.D., Christiansen, G., Holst, H.U., Birkelund, S.** *Chlamydia trachomatis* utilizes the host cell microtubule network during early events of infection. *Mol Microbiol* 25 (1997) 441-449
13. **Clifton, D.R., Goss, R.A., Sahni, S.K., van Antwerp, D., Baggs, R.B., Marder, V.J., Silverman, D.J., Sporn, L.A.** NF-kappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 4646-4651
14. **DeFilippis, R.A., Goodwin, E.C., Wu, L., DiMaio, D.** Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol* 77 (2003) 1551-1563
15. **Deveraux, Q.L., Reed, J.C.** IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13 (1999) 239-252
16. **Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., Martinou, J.C.** Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 929-935

17. **Fan, T., Hang, L., Hu, H., Shi, L., McClarty, G.A., Nance, D.M., Greenberg, A.H., Zhong, G.** Inhibition of apoptosis in Chlamydia-infected cells: Blockade of mitochondrial cytochrom c release and caspase activation. *J Exp Med* 187 (1998) 487-496
18. **Fischer, S.F., Harlander, T., Vier, J., Häcker, G.** Protection against CD95-induced apoptosis by chlamydial infection at a mitochondrial step. *Infect Immun* 72 (2004a) 1107-1115
19. **Fischer, S.F., Schwarz, C., Vier, J., Häcker, G.** Characterization of antiapoptotic activities of *Chlamydia pneumoniae* in human cells. *Infect Immun* 69 (2001) 7121-7129
20. **Fischer, S.F., Vier, J., Kirschnek, S., Klos, A., Hess, S., Ying, S., Häcker, G.** Chlamydia inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3-only proteins. *J Exp Med* 200 (2004b) 905-916
21. **Fischer, U., Janicke, R.U., Schulze-Osthoff, K.** Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 1 (2003) 76-100
22. **Gaydos, C.A., Summersgill, J.T., Sahney, N.N., Ramirez, J.A., Quinn, T.C.** Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infect Immun* 64 (1996) 1614-1620
23. **Gibellini, D., Panaya, R., Rumpianesi, F.** Induction of apoptosis by *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* infection in tissue culture cells. *Zentralbl Bakteriologie* 288 (1998) 35-43
24. **Grayston, J.T.** Chlamydia pneumoniae (TWAR). In: "Mandell, Douglas, and Bennett's Principles & Practice of Infectious Diseases, Part III Infectious diseases and their etiologic agents", Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (Hrsg.), Churchill Livingstone, Charlottesville, USA, 1994, 4. Auflage, 2. Band, 1696-1700

25. **Greene, W., Xiao, Y., Huang, Y., McClarty, G., Zhong, G.** Chlamydia-infected cells continue to undergo mitosis and resist induction of apoptosis. *Infect Immun* 72 (2004) 451-460
26. **Häcker, G.** Die Physiologie des Zelltodes. *Die Medizinische Welt* 50 (1999) 294-301
27. **Han, J, Flemington, C., Houghton, A.B., Gu, Z., Zambetti, G.P., Lutz, R.J., Zhu. L., Chittenden, T.** Expression of *bbc3*, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 11318-11323
28. **Harris, C.A., Johnson Jr., E.M.** BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem* 276 (2001) 37754-37760
29. **Hart, S.P., Haslett, C., Dransfield, I.** Recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Experientia* 52 (1996) 950-956
30. **Hogan, R.J., Mathews, S.A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J.T., Timms, P.** Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun* 72 (2004) 1843-1855
31. **Hood, C., Cunningham, A.L., Slobedman, B., Boadle, R.A., Abendroth, A.** Varicella-Zoster virus-infected human sensory neurons are resistant to apoptosis, yet human foreskin fibroblasts are susceptible: Evidence for a cell-type-specific apoptotic response. *J Virol* 77 (2003) 12852-12864
32. **Howard, L., Orenstein, N.S., King, N.W.** Purification on renografin gradients of *Chlamydia trachomatis* grown in the yolk sac of eggs. *Appl Microbiol* 27 (1974) 102-106

33. **Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Hyman, R.W., Olinger, L., Grimwood, J., Davis, R.W., Stephens, R.S.** Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis*. *Nat Genet* 21 (1999) 385-389
34. **Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R.** Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 (1972) 239-257
35. **King, L.B., Ashwell, J.D.** Thymocyte and T cell apoptosis: is all death created equal? *Thymus* 23 (1994-1995) 209-230
36. **Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P.H., Kirchhoff, S.** FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 8247-8254
37. **Kuo, C.C., Chi, E.Y., Grayston, J.T.** Ultrastructural study of entry of *Chlamydia* strain TWAR into HeLa cells. *Infect Immun* 56 (1988) 1668-1672
38. **Kuo, C.C., Grayston, J.T.** Interaction of *Chlamydia trachomatis* organisms and HeLa 229 cells. *Infect Immun* 13 (1976) 1103-1109
39. **Kuo, C.C., Grayston, J.T.** A sensitive cell line, HL cells, for isolation and propagation of *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *J Infect Dis* 162 (1990) 755-758
40. **Kutlin, A., Roblin, P.M., Hammerschlag, M.R.** Effect of prolonged treatment with azithromycin, clarithromycin, or levofloxacin on *Chlamydia pneumoniae* in a continuous-infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (2002) 409-412
41. **Lazebnik, Y.A., Cole, S., Cooke, C.A., Nelson, W.G., Earnshaw, W.C.** Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J Cell Biol* 123 (1993) 7-22

42. **Li, H., Zhu, H., Xu, C., Yuan, J.** Cleavage of Bid by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94 (1998) 491-501
43. **Linsinger, G., Wilhelm, S., Wagner, H., Häcker, G.** Uncouplers of oxidative phosphorylation can enhance a Fas death signal. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 3299-3311
44. **Lockshin, R.A., Williams, C.M.** Programmed Cell Death. I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *J Insect Physiol* 11 (1965) 123-133
45. **Lorenzo, H.K., Susin, S.A., Penninger, J., Kroemer, G.** Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 6 (1999) 516-524
46. **Lou, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X.** Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94 (1998) 481-490
47. **McDonnell, J.M., Fushman, D., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., Cowburn, B.** Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* 96 (1999) 625-634
48. **Moss, J.E., Aliprantis, A.O., Zychlinski, A.** The regulation of apoptosis by microbial pathogens. *Int Rev Cytol* 187 (1999) 203-259
49. **Miller, L.K.** Baculovirus interaction with host apoptotic pathways. *J Cell Physiol* 173 (1997) 178-182
50. **Müller, A. Rudel, T.** Modification of host cell apoptosis by viral and bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 291 (2001) 197-207

51. **Myhre, E.B., Mardh, P.A.** Unusual manifestations of *Chlamydia trachomatis* infections. Scand J Infect Dis Suppl 32 (1982) 122-126
52. **Nash, P.B., Purner, M.B., Leon, R.P., Clarke, P., Duke, R.C., Curiel, T.J.** *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. J Immunol 160 (1998) 1824-1830
53. **Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., Tanaka, N.** Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. Science 288 (2000) 1053-1058
54. **Ojcius, D.M., Souque, P., Perfettini, J.-L., Dautry-Varsat, A.** Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia psittaci*. J Immunol 161 (1998) 4220-4226
55. **Pastorino, J.G., Chen, S.T., Tafani, M., Snyder, J.W., Farber, J.L.** The over-expression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. J Biol Chem 273 (1998) 7770-7775
56. **Perfettini, J.-L., Darville, T., Gachelin, G., Souque, P., Huerre, M., Dautry-Varsat, A., Ojcius, D.** Effect of *Chlamydia trachomatis* infection and subsequent tumor necrosis factor alpha secretion on apoptosis in the murine genital tract. Infection and Immunity 68 (2000) 2237-2244
57. **Perfettini, J.-L., Ojcius, D.M., Andrews, C.W. Jr., Korsmeyer, S.J., Rank, R.G., Darville, T.** Role of proapoptotic BAX in propagation of *Chlamydia muridarum* (the mouse pneumonitis strain of *Chlamydia trachomatis*) and the host inflammatory response. J Biol Chem 278 (2003) 9496-9502
58. **Perfettini, J.-L., Reed, J.C., Israel, N., Martinou, J.C., Dautry-Varsat, A., Ojcius, D.M.** Role of Bcl-2 family members in caspase-independent apoptosis during *Chlamydia* infection. Infect Immun 70 (2002) 55-61

59. **Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., Strasser, A.** The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3 (1999) 287-296
60. **Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C., Strasser, A.** Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293 (2001) 1829-1832
61. **Saikku, P.** *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis. *J Intern Med* 247 (2000) 391-396
62. **Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D., Alnemri, E.S.** Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2 (2000) 476-483
63. **Sanders, E.J., Wride, M.A.** Programmed cell death in development. *Int Rev Cytol* 163 (1995) 105-173
64. **Sarin, A., Williams, M.S., Alexander-Miller, M.A., Berzofsky, J.A., Zacharchuk, C.M., Henkart, P.A.** Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity* 6 (1997) 209-215
65. **Savill, J., Fadok, V., Henson, P., Haslett, C.** Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14 (1993) 131-136
66. **Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., Martin, S.J.** Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspase-2, -3, -6, -7, -8, -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144 (1999) 281-292

67. **Stenner-Liewen, F., Liewen, H., Zapata, J.M., Pawlowski, K., Godzik, A., Reed, J.C.** CADD, a Chlamydia protein that interacts with death receptors. *J Biol Chem* 277 (2002) 9633-9636

68. **Strasser, A., Bouillet, P.** The control of apoptosis in lymphocyte selection. *Immunol Rev* 193 (2003) 82-92

69. **Tata, J.R.** Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev Biol* 13 (1966) 77-94

70. **Thornberry, N.A., Lazebnik, Y.** Caspases: enemies within. *Science* 281 (1998) 1312-1316

71. **Teodoro, J.G., Branton, P.E.** Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J Virol* 71 (1997) 3620-3627

72. **Vaux, D.L., Strasser, A.** The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 93 (1996) 2239-2244

73. **Vogt, C.** Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Jent & Gassmann, Solothurn, Schweiz, 1842.

74. **Wahl, C., Oswald, F., Simnacher, U., Weiss, S., Marre, R., Essig, A.** Survival of *Chlamydia pneumoniae*-infected Mono Mac 6 cells is dependent on NF-kappaB binding activity. *Infect Immun* 69 (2001) 7039-7045

75. **Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., Reed, J.C.** Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284 (1999) 339-343

76. **Wyllie, A.H., Bellamy, C.O., Bubb, V.J., Clarke, A.R., Corbet, S., Curtis, L., Harrison, D.J., Hooper, M.L., Toft, N., Webb, S., Bird, C.C.** Apoptosis and carcinogenesis. *Br J Cancer* 80 (1999) 34-37
77. **Xiang, J., Chao, D.T., Korsmeyer, S.J.** BAX-induced cell death may not require interleukin 1 β -converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 14559-14563
78. **Ying, S., Seiffert, B., Häcker, G. und Fischer, S.F.** Broad degradation of proapoptotic proteins with the conserved Bcl-2 homology domain 3 during infection with *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 73 (2005) 1399-1403
79. **Yonish-Rouach, E.** The p53 tumor suppressor gene: a mediator of a G1 growth arrest and of apoptosis. *Experientia* 52 (1996) 1001-1007
80. **Zhong, G, Fan, P., Ji, H., Dong, F., Huang, Y.** Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J Exp Med* 193 (2001) 935-942

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Häcker für die Bereitstellung und Einführung in das Thema und seine engagierte Betreuung. Seine motivierende Art und seine Präsenz waren eine große Unterstützung durch die gesamte Zeit.

Besonders danken möchte ich Juliane Vier für die geduldige und umsichtige Einarbeitung in die Labortechniken, ihre Hilfe bei allen Problemen und das nicht nachlassende Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Allen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe danke ich für die sehr freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfe bei allen Fragen: Corina Anders, Dr. Silke Fischer, Christine Führmann, Monika Gerhard, Astrid Mack, Dr. Catharina Müller-Thomas, Dr. Barbara Seiffert, Dr. David Takramah und allen anderen ehemaligen und neuen Mitarbeitern.

Nicht zuletzt danke ich all jenen, die mich während der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit unterstützten und ermutigten: meinen Eltern, meinen Geschwistern, meinen Großeltern, Christian Strzoda, Karin Schwaier sowie allen anderen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.