

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Miethke)

Chlamydia trachomatis benötigt TLR3 der Wirtszelle für eine erfolgreiche
Replikation

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Lina Kellner

aus
Speyer
2022

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Thomas Miethke

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	3
1.1 <i>Chlamydia trachomatis</i>	3
1.1.1 Epidemiologie	3
1.1.2 Invasion, Replikation und Freisetzung von <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar D	4
1.1.3 Infektionsverlauf und Therapie	5
1.2 Das menschliche Immunsystem.....	6
1.2.1 Toll-like-Rezeptoren.....	7
1.3 Die Interaktion zwischen <i>Chlamydien</i> und TLR3 der Wirtszelle	9
1.3.1 <i>Chlamydia muridarum</i>	9
1.3.2 <i>Chlamydia trachomatis</i>	9
1.4 Ziele dieser Dissertation	10
2 MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1 Material.....	11
2.1.1 Allgemeine Chemikalien	11
2.1.2 Biologische Materialien.....	12
2.1.3 Medien und Puffer	12
2.1.4 Kommerzielle Kits.....	16
2.1.5 Primer	16
2.1.6 Antikörper	17
2.1.7 Zellstimulantien/-inhibitoren	18
2.1.8 Programme und Datenbanken.....	18
2.1.9 Geräte.....	19
2.1.10 Sonstige Materialien	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Zellen.....	22

2.2.2	<i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar D	24
2.2.3	Immunfluoreszenz-Färbung und -Mikroskopie.....	26
2.2.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	27
2.2.5	Western Blot	28
2.2.6	RNA-Isolierung	29
2.2.7	DNA-Isolierung	29
2.2.8	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	30
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
2.2.10	RNA-Array	32
2.2.11	Statistische Analyse	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	TLR3-Signalweg in Epithelzellen des humanen Urogenitaltrakts	34
3.1.1	TLR3- und TRIF-Transkription	34
3.1.2	Zytokin-Produktion.....	35
3.1.3	TLR3- und TRIF-Lokalisation.....	39
3.1.4	IRF3- und TBK1-Expression und -Aktivierung	42
3.1.5	Zytokinausstoß nach Infektion	45
3.2	TLR3-abhängige Entwicklung von <i>Chlamydia trachomatis</i>	46
3.2.1	Chlamydiales Wachstum unter TLR3-Inhibition	46
3.2.2	Chlamydialer Replikationszyklus unter TLR3-Inhibition	48
3.2.3	<i>Chlamydia trachomatis</i> Inklusionsinhalt unter TLR3-Inhibition	54
3.2.4	Chlamydiales Wachstum unter TLR4-Inhibition	56
3.3	Transkriptionsänderungen in T24/83-Zellen durch <i>Chlamydia trachomatis</i> . 57	
3.3.1	Inflammatorische Reaktion	58
3.3.2	Veränderungen gesamter Signalwege.....	62
3.3.1	Veränderungen des zellulären Lipidmetabolismus	64
4	DISKUSSION	67
4.1	<i>Chlamydia trachomatis</i> und Toll-like-Rezeptor 3	67
4.2	TLR3-Expression und Funktion in Zellen des humanen Urogenitaltrakts	67
4.2.1	Unzureichende IRF3-Phosphorylierung führt zu funktionsloser TLR3-Signalkette in HeLa-Zellen	67
4.2.2	TLR3-Signalweg in T24/83-Zellen ist funktionsfähig.....	68

4.3 TLR3-spezifische Immunantwort auf <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar D Infektion bleibt aus	69
4.4 <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar D benötigt TLR3 für eine erfolgreiche Reproduktion	71
4.5 Ausblick.....	74
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	75
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	76
7 TABELLARISCHER ANHANG.....	82
8 LEBENSLAUF	97
9 DANKSAGUNG	98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	aberrant body
Akt	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	bovine serum albumin
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	complementary DNA
CH25H	Cholesterin-25-Hydroxylase
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COMC	chlamydial outer membrane complex
CRISPR	Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats
d	Tag
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	desoxyribonucleic acid
dsRNA	double-stranded RNA
EB	elementary body
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bisaminoethylethertetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ERK	extracellular-signal regulated kinases
FKS	Fetales Kälberserum
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
h	Stunden
H ₂ O	Dihydrogenmonoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ 1
IFN-β	Interferon beta
IFU	infectious units
IgG	Immunglobulin G
IKBKE/IKKε/IKK _γ	Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IRF3	interferon regulatory factor 3
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LGV	Lymphogranuloma venerum
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MD-2	myeloid differentiation factor 2

MgCl ₂ *6 H ₂ O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
min	Minute
MOI	multiplicity of infection
MOMP	major outer membrane protein
mRNA	messenger RNA
MTOC	microtubule organizing center
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
N ₂	Distickstoff
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaN ₃	Natriumazid
NES	Normalized Enrichment Score
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PAA	Polyacrylamid
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PFA	Perfluoralkoxylalkan
PID	Pelvic Inflammatory Disease
pIRF3	phospho-IRF3
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly-(I:C)	Polyiosinic-polycytidylic acid
PRR	pattern recognition receptor
pTBK1	phospho-TBK1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RB	reticulate body
RNA	ribonucleic acid
RSV	resporatory syncytial virus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Trankriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natrium-dodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
TBK1	TANK-binding kinase 1
TEMED (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Tetramethylethylendiamine
TIRAP	Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein
TLR	Toll-like Receptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
TRAM	translocating chain-associated membrane protein
TRIF/TICAM1	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β

1 EINLEITUNG

1.1 *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis ist ein humanpathogenes Bakterium, welches durch seinen gramnegativen Zellwandaufbau ¹ und sein obligat intrazelluläres Wachstum ² gekennzeichnet ist.

In der taxonomischen Nomenklatur gehört *Chlamydia trachomatis* neben weiteren humanpathogenen, aber auch zoopathogenen, Arten der Gattung *Chlamydia* an. Die Gattung *Chlamydia* ist Teil der Familie der *Chlamydiaceae* und diese wiederum der Ordnung *Chlamydiales* zugeordnet ³.

Die Spezies *Chlamydia trachomatis* kann ihrerseits in zwei Biovare unterteilt werden: Das Trachom Biovar, zu dem Serovare A-C und Serovare D-K gehören, und das Lymphogranuloma venerum (LGV) Biovar mit den Serovaren L1-3 ⁴. Je nach Serovar kann sich eine Infektion mit *Chlamydia trachomatis* unterschiedlich manifestieren.

Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die möglichen Manifestationsformen und ihre Komplikationen.

Serovar	Klinische Manifestation	Komplikationen
A-C	Keratokonjunktivitis	Narbentrachom, Erblindung
D-K	Konjunktivitis ♂ Urethritis, Proktitis ♀ Zervizitis, Urethritis, Proktitis	Reiter Syndrom, Reaktive Arthritis ♂ Epididymitis, Prostatitis ♀ Endometritis/Salpingitis/ Adnexitis pelvic inflammatory disease (PID), ektope Schwangerschaft, Perihepatitis (Fitz-Hugh-Curtis - Syndrom), Infertilität
L1-L3	Lymphogranuloma venerum: Inguinales Syndrom, Proktitis	Fibrose, rektale Strikturen

Abbildung 1: Klinische Manifestationsformen von *Chlamydia trachomatis* ⁵

Übersicht aller *Chlamydia trachomatis* Serovare, ihre klinischen Manifestationsformen und mögliche Komplikationen.

Da in dieser Arbeit im speziellen *Chlamydia trachomatis* Serovar D untersucht wurde, konzentrieren sich alle weiteren Erläuterungen, falls nicht anders beschrieben, auf eben diesen Erreger und die von ihm verursachten Infektionen des Urogenitaltrakts.

1.1.1 Epidemiologie

Sexuell übertragbare Erkrankungen verfolgen seit 1990 einen ansteigenden Trend in Europa ⁶. Als häufigster Erreger mit einer geschätzten Fallzahl von 124,3 Millionen Infektionen weltweit jährlich ⁷ ist *Chlamydia trachomatis* Serovar D-K von immenser Bedeutung. In Europa liegt die Prävalenz unter Frauen schätzungsweise bei 3,2 % und unter Männern bei 2,2 % ⁷.

1.1.2 Invasion, Replikation und Freisetzung von *Chlamydia trachomatis* Serovar D

Chlamydia trachomatis ist ein obligat intrazelluläres Bakterium, wobei zwischen unterschiedlichen Existenzformen differenziert werden kann. Elementarkörperchen (EBs) bilden mit 0,3 µm Durchmesser die kleinere⁸, metabolisch wenig aktive, aber infektiöse Form⁹. Durch einen noch nicht abschließend geklärten Mechanismus wird das EB in das Zellinnere aufgenommen¹⁰. In einer intrazellulär liegenden Vakuole, Inklusion genannt, findet dann die Transformation in das Retikularkörperchen (RB) statt. Diese deutlich größere Form mit 1 µm Durchmesser⁸ ist zwar nicht infektiös, stellt jedoch die metabolisch aktive Form dar und beginnt daher mit der Replikation⁹. Durch binäre Teilung des RBs füllt sich die Inklusion zunehmend mit Inhalt, was in einer maximalen RB-Anzahl etwa 32 h *post infectionem* gipfelt¹¹. Während dieser Phase bezieht die Chlamydien-Inklusion Nährstoffe von ihrer Wirtszelle. Hierbei handelt es sich um Kohlenhydrate, bestimmte Aminosäuren, ATP und einige Vitamine ebenso wie Lipide⁸, die entweder über vesikulären oder nicht-vesikulären Transport zu der Inklusion gelangen¹².

Die Vollendung des Replikationszyklus besteht aus der Konversion der vervielfältigten RBs in EBs, was ab einer Infektionsdauer von 24 h asynchron beginnt und nach weiteren 16 h zu einer maximalen EB-Last innerhalb der Inklusionen führt¹¹. Der auslösende Reiz für die Entwicklung vom RB zurück zum EB ist nicht gänzlich geklärt. Plausibel erscheint der Verlust des Kontakts der RBs zur Inklusionsmembran mit zunehmender Füllung der Inklusion¹³. Eine weitere Theorie betitelt die Größe des RBs als ausschlaggebend für die Entwicklung zum EB¹¹. Für das Freisetzen der infektiösen EBs ist sowohl die Zelllyse als auch die kontrollierte Freigabe der Inklusionsinhalte ohne den Tod der Wirtszelle bekannt, wobei beide Mechanismen parallel stattzufinden scheinen¹⁴. An diesem Punkt schließt sich der Vermehrungszyklus und die freigesetzten EBs können weitere Nachbarzellen infizieren.

Neben den beiden beschriebenen Existenzformen konnte in der Vergangenheit ein dritter, morphologisch aberranter Zustand des Erregers identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um vergrößerte RBs, die weder eine Teilung, noch eine Entwicklung zu EBs vollziehen. Verschiedene Auslöser konnten identifiziert werden, die diesen Zustand reversibel herbeiführen¹⁵. Dazu zählt unter anderem der Einfluss von Antibiotika und Zytokinen¹⁶. Auch in humanen Gewebeproben konnten die so genannten aberrant bodies (ABs) gefunden werden, sodass man davon ausgeht, dass sie in der Persistenz einer Infektion eine wichtige Rolle spielen könnten¹⁷.

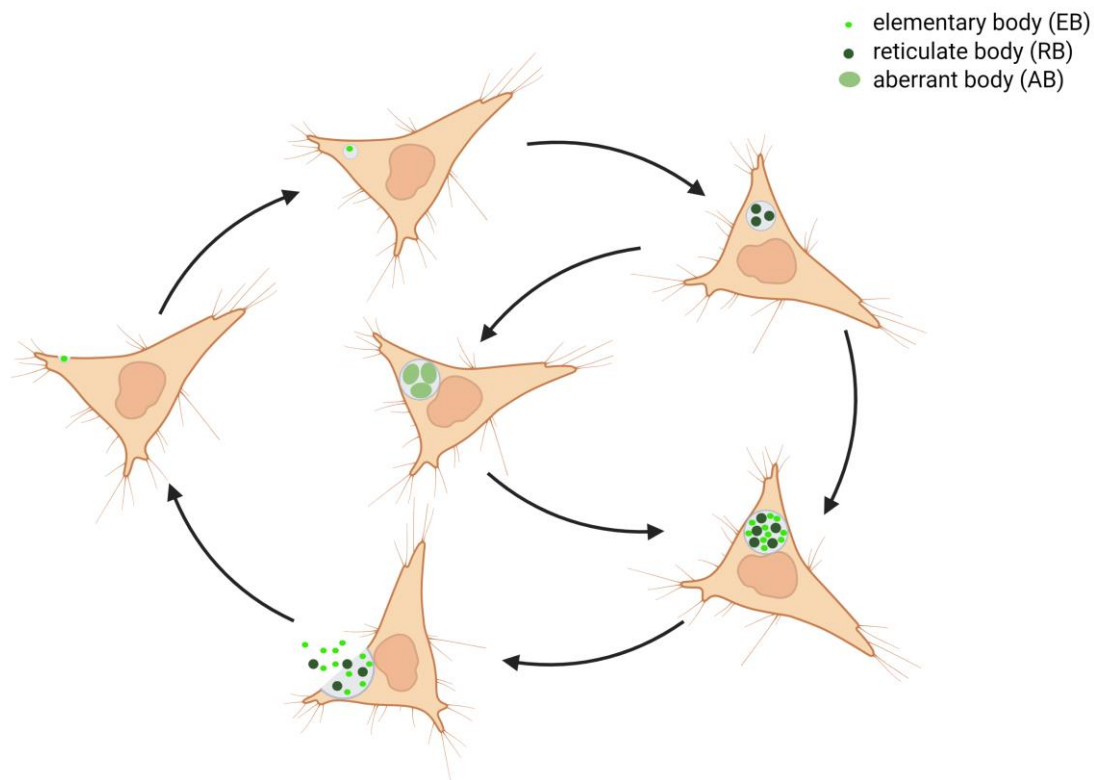


Abbildung 2: Der Replikationszyklus von *Chlamydia trachomatis* ⁸

Zu Beginn der Infektion findet die Invasion der Wirtszelle durch ein EB statt (links). Es folgt die frühe Infektionsphase mit der Differenzierung zum RB (links oben). In der mittleren Phase findet die Replikation der RBs, die Reifung der Inklusion, sowie die Redifferenzierung zu EBs statt (rechts oben und rechts unten). Die späte Phase ist durch die Freisetzung des Erregers gekennzeichnet (unten). Während der mittleren Entwicklungsphase kann die Situation einer Persistenz eintreten, in welcher morphologisch abnorme Varianten in den Inklusionen zu finden sind (ABs) (mittig). Erstellt mit BioRender.com.

1.1.3 Infektionsverlauf und Therapie

Chlamydia trachomatis Serovar D kann eine Reihe pathologischer Veränderungen und daraus resultierende Komplikationen auslösen, die in Abbildung 1 aufgeführt sind. Darüber hinaus sind im Fall einer Schwangerschaft bei bestehender oder stattgehabter Infektion mit *Chlamydia trachomatis* eine Korrelation mit vermehrter spontaner Frühgeburtlichkeit und ein erhöhtes Risiko für Totgeburten zu verzeichnen ¹⁸. Langfristig erhöhen vor allem rezidivierende Infekte das Risiko für Unfruchtbarkeit und die Entwicklung einer chronischen Unterleibsentzündung (Pelvic Inflammatory Disease, PID) bei Frauen ¹⁹.

Die führenden Symptome einer Infektion wie urethraler oder vaginaler Ausfluss sowie Unterleibschmerzen ²⁰ treten allerdings nicht immer auf.

Je nach Lokalisation können bis zu 90 % der *Chlamydia trachomatis* Infektionen asymptomatisch verlaufen, sodass sich eine nötige Therapie häufig verzögert und eine langfristige Infektion besteht ²¹. Zwar existiert in Deutschland seit 2008 ein Screening-Programm für Frauen bis 25 Jahre, doch werden von dieser Zielgruppe nur etwa 11 % tatsächlich erreicht ²⁰. Auch in der Mutterschaftsvorsorge der gesetzlichen Krankenversicherungen ist seit 1995 die Untersuchung auf *Chlamydia trachomatis* vorgesehen ²². Eine einheitliche Meldepflicht bezüglich einer *Chlamydia trachomatis* Infektion besteht in Deutschland nicht ²².

Da aktuell kein Impfstoff vorhanden ist, steht die Prävention in Form von allgemeiner Verhütung sexuell übertragbarer Infektionen im Vordergrund. Eine risikoorientierte Diagnostik wird angesichts der beschriebenen Infektionsverläufe angestrebt²¹.

Die Behandlung einer *Chlamydia trachomatis* Infektion findet regelhaft mit Antibiotika statt, wobei Resistenzentwicklungen die Ausnahme sind⁵. Zur Therapie einer unkomplizierten Urethritis oder Zervizitis wird eine 7-tägige Einnahme von Doxycyclin oder alternativ die Einmalgabe von Azithromycin empfohlen²¹. Eine schwerwiegendere Infektion wie eine chronische Unterleibsentszündung benötigt hingegen eine intensivere Behandlung mit Antibiotikakombinationen und einer verlängerten Therapiedauer²¹. Auch bei Rezidiven, welche durch erneute Ansteckung häufig nach antibiotischer Therapie vorkommen, sollte eine verlängerte Therapiedauer angestrebt werden²².

Eine komplikationsreiche Infektion mit all ihren möglichen Folgen bedarf einer intensivierten Intervention bis hin zur operativen Versorgung wie beispielsweise im Fall einer Extrauterin gravidität.

1.2 Das menschliche Immunsystem

Der menschliche Körper besitzt eine Vielzahl an Mechanismen, die eine Infektion verhindern oder, im Fall einer Infektion, eine Heilung bewirken können.

Als äußerste Zellschicht sind Epithelzellen einer Vielzahl pathogener Faktoren ausgesetzt. Um zu verhindern, dass diese Schutzbarriere zur Außenwelt von Keimen durchdrungen wird oder deren Zellen in Mitleidenschaft gezogen werden, spielen mehrere Faktoren zusammen. Der feste Zusammenhalt epithelialer Zellen dient als physikalischer Schutz vor mechanischen Einwirkungen. Insbesondere an Schleimhäuten bildet ein der Epithelzellschicht aufliegendes Sekret eine Art Schutzschicht. Diese kann, je nach Lokalisation in unterschiedlicher Zusammensetzung, das Eindringen pathogener Erreger verhindern. Wichtige Bestandteile können hier Lysozyme oder antimikrobielle Peptide sein. Als chemischer Schutz dient zudem in einigen Körperarealen ein saurer pH-Wert. Auch die Besiedlung mit nicht-pathogenen Keimen, sogenannten kommensalen Bakterien oder Mikrobiota, verringert das Risiko einer Infektion²³.

Gelingt es pathogenen Keimen dennoch in den Körper einzudringen, stehen Mechanismen des angeborenen Immunsystems bereit, um unmittelbar darauf zu reagieren. Gelöste Stoffe wie das Komplementsystem und natürliche Antikörper befinden sich im Extrazellularraum und können eindringende Keime binden. Als Hauptvertreter des zellulären angeborenen Immunsystems gelten Makrophagen und dendritische Zellen. Sie sind hauptsächlich für die Phagozytose der Erreger, die Einleitung einer Entzündungsreaktion durch Zytokinausschüttung und die Antigenpräsentation an das erworbene Immunsystem zuständig. Hierzu besitzen sie bestimmte Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRR), die zur Erkennung körperfremder Strukturen, auch pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) genannt, dienen²³.

Das erworbene Immunsystem kann dann mit einer zeitlichen Verzögerung pathogenspezifisch reagieren²³. Hierfür sind hauptsächlich B- und T-Lymphozyten zuständig, die an die aktuelle Erregersituation angepasst werden müssen. Ein Beispiel dafür ist die somatische DNA-Rekombination, wie sie bei der Bildung antigenspezifischer Rezeptoren stattfindet²⁴.

Neben den genannten Zellen des Immunsystems ist es ebenfalls anderen Zelltypen des menschlichen Körpers möglich, PAMPs mithilfe von PRRs zu erkennen und eine Immunreaktion einzuleiten. So auch Epithelzellen, die neben den bereits genannten

Schutzmechanismen zusätzlich in der Lage sind, zu der Erkennung und Abwehr eingedrungener Erreger beizutragen. Insbesondere im weiblichen Urogenitaltrakt unterliegen die Epithelzellen bei der Unterstützung des angeborenen und erworbenen Immunsystems zudem hormonellen Einflüssen²⁵.

1.2.1 Toll-like-Rezeptoren

Eine Untergruppe der PRRs bilden die Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Sie können sowohl in der Plasmamembran als auch in der Membran intrazellulärer Zellkompartimente lokalisiert sein. TLR1, 2, 4, 5, 6 und 11 befinden sich in der Plasmamembran, um extrazelluläre Liganden, meist Proteine oder Lipide, zu binden. In intrazellulären Kompartimenten erkennen TLR3, 7, 8 und 9 fremdes Erbmaterial²⁶. Die Expressionsintensität der einzelnen TLRs kann je nach Zelltyp und zellulärer Situation variieren²⁷. Sowohl ihre Liganden als auch die nachfolgenden Signalwege und deren Auswirkungen auf die Zelle unterscheiden sich.

Eine Besonderheit bildet der TLR3-Signalweg, denn er verläuft als einziger MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88)-unabhängig²⁷. Darüber hinaus ist TLR3 als antiviraler PRR bekannt, der beispielsweise bei der Erkennung und Abwehr des respiratory syncytial virus (RSV), Encephalomyokarditis Virus, Cytomegalievirus (CMV) und Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) bedeutend ist²⁶.

Die Expression von TLR3 wurde unter anderem in Epithelzellen der Atemwege, des Urogenitaltrakts und des Verdauungstraktes nachgewiesen²⁷. Lokalisiert ist er hauptsächlich an der Membran früher Endosomen²⁸. Transmembranständig liegt TLR3 in Monomeren vor, die durch das Binden von dsRNA dimerisieren^{29, 30}. Geschieht dies, beispielsweise während einer Infektion, wird das intrazellulär liegende Adapterprotein TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF), auch TICAM-1 genannt, zu den entstandenen TLR3-Dimeren rekrutiert²⁸. Hieraus resultiert wiederum eine Rekrutierung und Aktivierung von TANK-binding kinase 1 (TBK1). TBK1 besitzt eine Kinaseaktivität, die zur Phosphorylierung von TRIF und schließlich von IRF3 (interferon regulatory factor 3) führt³¹. Möglicherweise geschieht dies in Kombination mit weiteren Enzymen wie IKBKE (Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon), auch IKK ϵ oder IKKi genannt,³² und Akt (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase)³³. Die Phosphorylierung von IRF3 bringt zeitgleich dessen Homodimerisierung mit sich³⁴. Eine Anreicherung von pIRF3-Dimeren im Zellkern ist die Folge^{35, 36}. Im Zellkern können diese Dimere als Transkriptionsfaktoren aktiv wirken und unter anderem die Expression des Zytokins Interferon beta (IFN- β) induzieren³⁷.

Abbildung 3 zeigt eine Übersicht dieser Signalabfolge.

Am Ende des TLR3-Signalwegs steht somit eine IFN- β -Ausschüttung, die ebenso autokrin wie parakrin verschiedene Systeme der Wirts- und Nachbarzellen beeinflusst. Direkte oder indirekte Folgen können Apoptose sowie Pyroptose, aber auch Autophagie und die Beeinflussung des adaptiven Immunsystems sein³⁸.

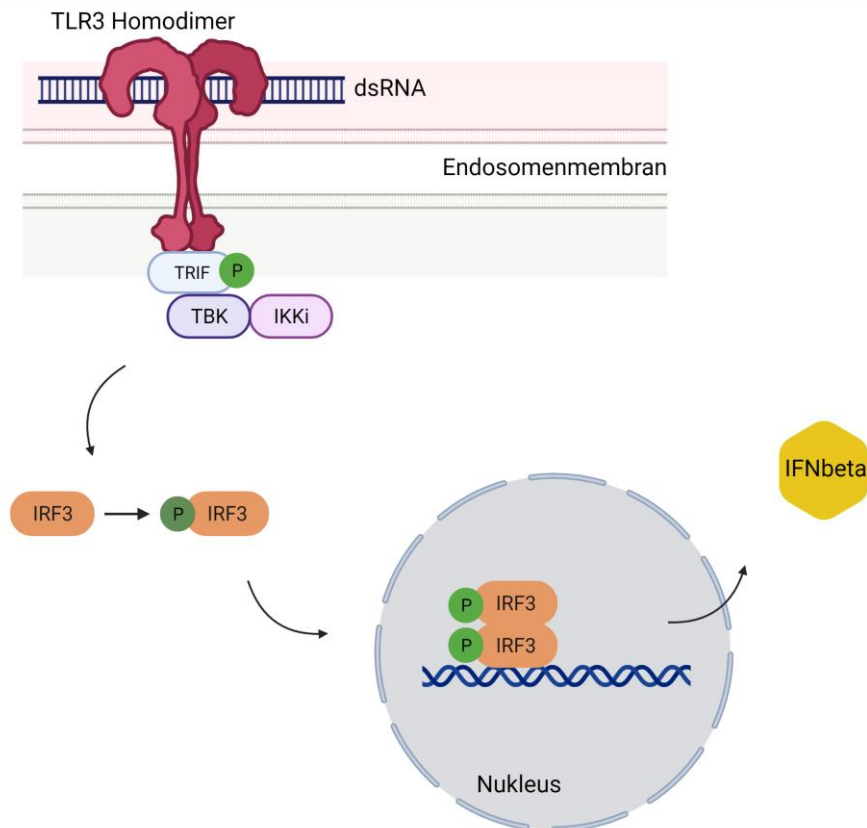


Abbildung 3: Signalweg des Toll-like-Rezeptors 3 (TLR3) ³⁹

Eine TLR3-Aktivierung führt über das intrazelluläre Adapterprotein TRIF zu einer TBK1-Aktivierung, welche wiederum eine Phosphorylierung von IRF3 bewirkt. pIRF3 dimerisiert und transloziert in den Zellkern, wo es die Transkription von IFN-β induziert. Erstellt mit BioRender.com.

Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) befindet sich in der Plasmamembran der Zelle, wo es in Kombination mit dem myeloid differentiation factor 2 (MD-2) Lipopolysaccharide (LPS), ein Bestandteil bakterieller Zellwände, bindet ⁴⁰.

Findet eine Signalwegaktivierung statt, wird Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein (TIRAP) zu TLR4 rekrutiert, gefolgt von dem Adapterprotein MyD88 ⁴¹. Die Folge ist eine Aktivierung von nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) und mitogen-activated protein kinase (MAPK), was zu einer Zytokinausschüttung, unter anderem von IL-6, führt ⁴¹. Darüber hinaus ist TLR4 ebenfalls in der Lage, mithilfe der Adapterproteine translocating chain-associated membrane protein (TRAM) und TRIF zu einer IRF3-Aktivierung zu führen. Dies geschieht durch eine Verlagerung von TLR4 in intrazelluläre Endosomen ⁴².

1.3 Die Interaktion zwischen *Chlamydien* und TLR3 der Wirtszelle

Die Interaktion zwischen *Chlamydia trachomatis* und seiner Wirtszelle ist Gegenstand aktueller Forschung. In der Vergangenheit wurde postuliert, dass humane Epithelzellen maßgeblich an der Initiierung einer Entzündungsreaktion in Folge einer Infektion beteiligt sind ⁴³. Noch drastischer formuliert dies ein Review zum zellulären Paradigma der *Chlamydia trachomatis* Pathologie ⁴⁴. Bezüglich TLR3 im speziellen sind diverse Beobachtungen in murinen und humanen Zellen beschrieben. Zusammengefasst stellt sich der bisherige Forschungsstand zu der Interaktion zwischen TLR3 der Wirtszelle und *Chlamydia trachomatis* sowie seinem Äquivalent in Mäusen *Chlamydia muridarum* wie folgt dar.

1.3.1 *Chlamydia muridarum*

In klonierten murinen Eileiterzellen konnte unter *Chlamydia muridarum* Infektion eine IRF3- und TRIF-abhängige IFN- β -Induktion durch partiellen Knockdown gezeigt werden ⁴⁵. Auch *in vivo* fiel eine verminderte IFN- β -Produktion in infizierten TLR3-defizienten Mäusen in den ersten Tagen einer Infektion auf. Eine verlangsamte Beseitigung des Erregers, wie sie auf eine verminderte Zytokinproduktion hätte folgen können, blieb jedoch aus ⁴⁶. Dennoch leiteten diese Ergebnisse zu der Annahme, dass eine TLR3-Signalwegaktivierung in Epithelzellen zu einer ersten Immunantwort gegen *Chlamydia muridarum* führt. Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit den Nachkommen, die im Verlauf einer *Chlamydia muridarum* Infektion produziert werden, und deren Infektiosität. Verliehen Infektionen in Eileiterzellen TLR3-defizienter Mäuse, so zeigten ihre Nachkommen eine höhere Infektiosität und eine vermehrte Reproduktion verglichen mit Nachkommen aus Infektionen in Wildtyp-Mauszellen ⁴⁷. Interpretiert wurden diese Beobachtungen als Zeichen dafür, dass eine vorhandene TLR3-Signalkaskade die Reproduktion von *Chlamydia muridarum* beeinträchtigt. Darüber hinaus zeigte sich *in vivo* eine vermehrte *Chlamydia muridarum* Ausscheidung innerhalb der ersten 24 Tage einer Infektion, wenn die Mäuse TLR3-defizient waren. Im weiteren Verlauf glich sich diese jedoch wieder den Werten der Wildtypmäuse an ⁴⁸.

1.3.2 *Chlamydia trachomatis*

Bei einer Infektion von immortalisierten humanen Eileiterzellen mit *Chlamydia trachomatis* Serovar L2 konnte eine IFN- β -Induktion bestätigt werden ⁴⁹. Darüber hinaus wurde die Entwicklung von *Chlamydia trachomatis* Serovar D Inklusionen in der genannten Zelllinie untersucht. Das Verhältnis zwischen Erregeranzahl und Anzahl der verwendeten Wirtszellen, auch multiplicity of infection (MOI) genannt, betrug 10. Dabei wurden Inklusionen nach einer 36-stündigen Infektion mithilfe von Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Ein TLR3-Funktionsausfall, der mittels CRISPR-Knockout-Lentivirus etabliert wurde, ermöglichte die Beurteilung der Inklusionsmorphologie in TLR3-Abhängigkeit. In Abwesenheit von TLR3 stellten sich die Inklusionen verglichen mit der Kontrolle größer, abnorm geformt und schwächer gefärbt dar ⁴⁹. Welche funktionellen Aspekte diese Veränderungen mit sich bringen, ist zum momentanen Zeitpunkt nicht eindeutig zu sagen. Die Schlussfolgerung der Autoren war eine ungehinderte Reproduktion von *Chlamydia trachomatis* bei fehlendem TLR3, welche zum fortlaufenden Wachstum der Inklusionen und zu einer verminderten Kondensation des Erbmaterials führt ⁴⁹.

1.4 Ziele dieser Dissertation

Die genannten Erkenntnisse stellen wichtige Schritte in der Erforschung der Interaktion zwischen *Chlamydia trachomatis* und TLR3 der Wirtszelle dar. Diese Dissertation soll, mit speziellem Augenmerk auf *Chlamydia trachomatis* Serovar D in Zelllinien des humanen Urogenitaltrakts, für weiteren Wissenszuwachs auf diesem Gebiet sorgen. Geleitet wurden die Versuche durch folgende Fragen: Induziert *Chlamydia trachomatis* eine TLR3-vermittelte Abwehrreaktion? Gibt es andere Mechanismen, welche die Zelle nach einer Infektion TLR3-vermittelt beeinflussen? Welchen Einfluss hat TLR3 auf den Erreger und wie wirkt sich ein funktioneller Ausfall von TLR3 auf die Entwicklung und Vermehrung von *Chlamydia trachomatis* aus?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma
Acetat	Sigma
Acrylamid/bis-Acrylamid 30% Lösung	Sigma
Agarose	Invitrogen
Albumin Fraktion V	Roth
Ammoniumpersulfat	Pharmacia Biotech/Promega
Bromphenolblau	Roth
Calciumchlorid	Sigma
Cyclohexamid	Sigma
Dimethyl Sulfoxide	Applichem
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
DMEM-high glucose	Sigma
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma
EDTA	Sigma
EGTA	Applichem
EMEM	Sigma
Ethidiumbromidlösung	Roth
Fetales Kälberserum	Gibco
Gentamycin	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Merck
H ₂ O	Millipore Q
HEPES	Roth
Isopropanol	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
L-Glutamin	Sigma
L-Glutaminsäure	Sigma
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Mc Coy's	Sigma
Methanol	Roth
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Sigma
Natriumdesoxycholat	Sigma
Natrium-dodecylsulfat	Applichem
Natriumfluorid	Applichem
Natriumorthovanadat	Sigma
n-octyl-β-D-glucopyranoside	Thermo Scientific
Nonidet P-40	Sigma
Paraformaldehyd	Roth
Penicillin-Streptomycin	Sigma
PMSF	Applichem
Protease-Inhibitor-Tablette (Complete mini)	Roche
RPMI-1640 Medium	Sigma
Salzsäure	Merck

Saponin	Sigma
Sucrose	Sigma
Tetramethylethylenediamine	Applichem
Tris base	Biorad
Tris-HCl	Roth
Triton X-100	Serva
Trypan Blau Färbung	Gibco
Trypsin-EDTA solution	Sigma
Tween 20	Sigma
Vancomycin Hydrochlorid	Applichem
βGlycerophosphat	Sigma

2.1.2 Biologische Materialien

Zelllinien:

T24/83	humane Blasenkarzinomzelllinie, ECACC, zur Verfügung gestellt durch AG PD Dr. Philip Erben
HeLa	humane Adenokarzinomzelllinie der Zervix, ATCC, Cell line service
UMUC-3	humane Blasenkarzinomzelllinie, ECACC, zur Verfügung gestellt durch AG PD Dr. Philip Erben
RT112	humane Blasenkarzinomzelllinie, ECACC, zur Verfügung gestellt durch AG PD Dr. Philip Erben
UROtsa	immortalisierte humane Blaszelllinie, zur Verfügung gestellt von Fr. Prof. Dr. Ruth Knüchel-Clarke, AG PD Dr. Philip Erben

Erreger:

Chlamydia trachomatis Serovar D ATCC ® VR-885

2.1.3 Medien und Puffer

Wachstumsmedien:

HeLa:

EMEM 500 ml
2 mM L-Glutamin
10 % FKS
5ml Penicillin-Streptomycin (10,000U-10mg/ml)
Vancomycin 25 mg
Gentamycin 5 mg

T24/83:

Mc Coys 500 ml
10 % FKS
5ml Penicillin-Streptomycin (10,000U-10mg/ml)
Vancomycin 25 mg
Gentamycin 5 mg

UROtsa:
RPMI-1640 Medium 500 ml
5 % FKS
25 mg Vancomycin
5 mg Gentamycin

RT112:
DMEM 500 ml
10 % FKS
25 mg Vancomycin
5 mg Gentamycin

UMUC-3:
DMEM 500 ml
10 % FKS
25 mg Vancomycin
5 mg Gentamycin

Infektionsmedien:

HeLa:
EMEM 500ml
2 mM L-Glutamin

T24/83:
Mc Coy's 500 ml

UROtsa:
RPMI-1640 Medium 500 ml

RT112:
DMEM 500 ml

UMUC-3:
DMEM 500 ml

SPG-Puffer:

75 g Sucrose
0,52 g KH_2PO_4
1,22 g Na_2HPO_4
0,72 g L-Glutaminsäure
auf 1 l H_2O auffüllen
pH auf 7,4 einstellen
Sterilfiltration mit 0,2 μM Filter und Lagerung bei
4°C

Kryokonservierungs-
lösung:

90 %FKS
10 % DMSO

5x SB-/Lämmli-Puffer:	14,4 mM Bromphenolblau 479,6 mM Glycerin 19,8 mM SDS 0,358 mM 2-Mercaptoethanol Tris-HCl bis pH 6,8
Nonidet-Puffer:	50 mM HEPES (pH 7,6) 120 mM NaCl 20 mM β -Glycerolphosphat 1 mM NaF 1 mM EDTA (pH 8,0) 1 mM EGTA (pH 7,6) 0,5 % NP-40 0,4 mM PMSF 1 mM Na ₃ VO ₄ 4,3 mM n-octyl- β -D-glucopyranoside 10 % Glycerol
RIPA-Puffer:	100 mM Tris-HCl (pH 7,4 oder 8,0), 1,5 M NaCl 5 % Natriumdesoxycholat 5 % Triton X-100 0,5 % SDS 1 Protease-Inhibitor-Tablette
DNase-Puffer:	100 mM Tris-Base 500 mM MgCl ₂ *6 H ₂ O 130 mM CaCl ₂
Lower-solution:	1,5 M TRIS 0,1 % SDS H ₂ O HCl bis pH 8,7
Upper-solution:	0,5 M TRIS 0,1 % SDS H ₂ O HCl bis pH 6,8
Trenngel (10 %):	5 ml H ₂ O 3 ml lower-solution 4 ml PAA (30 %) 120 μ l APS (10 %) 12 μ l TEMED
Sammelgel (4 %):	2,9 ml H ₂ O 1,25 ml upper-solution 0,6 ml PAA (30 %) 50 μ l APS (10 %) 5 μ l TEMED

Gelelektrophoresepuffer (10x):	1l H ₂ O 30,28 g Tris-HCL (250mM) 144,13 g Glycin (1,92 M) 10 g SDS (10 g/l) pH 8,3 vor der Verwendung fand eine Verdünnung 1:10 mit H ₂ O statt
Towbin-Puffer:	50 mM Tris base 40 mM Glycin 0,037 % SDS 20 % Methanol H ₂ O
10x TBS-T:	100 mM Tris 1,5 M NaCl 0,5 % Tween pH 7,4 H ₂ O
Ethidium Bromid Gel:	50 µg Ethidium Bromid in 100ml 1%ige Agarose
TAE-Puffer:	40mM Trisbase 20mM Acetat 1mM EDTA

2.1.4 Kommerzielle Kits

Name	Hersteller
Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Duo Set ELISA Development System, Human IFN- β	Bio Techne GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Duo Set ELISA Development System , Human ELISA IL-6	Bio Techne GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Duo Set ELISA Development System , Human ELISA IL-8	Bio Techne GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Duo Set Ancillary Reagent Kit 2	R&D Systems, Bio Techne GmbH, Wiesbaden, Deutschland
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Western Bright Chemilumineszenz Substrat Quantum	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
BD Cytotfix/Cytoperm, Fixation/Permeabilization Kit	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
GeneChip® WT Plus Reagent Kit	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Dream Taq Green PCR Master Mix (2x)	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.5 Primer

Ziel-Protein	Sequenz (5'-3')	Zielort
TLR3 forward	GGAAAGGCTAGCAGTCAT	Exon 1/5
TLR3 reverse	CAGCAACTTCATGGCTAAC	Exon 2/5
TRIF forward	GAGCCTGAGGAGATGAG	Exon 2/2
TRIF reverse	CAGTGGAGGTTGCATCTG	Exon 2/2
Aktin forward	GAGCTACGAGCTGCCTGA	Exon 4/6
Aktin reverse	CACTGTGTTGGCGTACAG	Exon 5/6
Mycoplasma forward	GGGAGCAAACAGGATTAGATACC CT	
Mycoplasma reverse	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAA CCTC	
Mycoplasma 1 forward	CGCCTGGGTAGTACATTCCGC	
Mycoplasma 1 reverse	GCGGTGTGTACAAGACCCGA	
Mycoplasma 2 forward	CGCCTGAGTAGTACGTACGC	
Mycoplasma 2 reverse	GCGGTGTGTACAAACCCCGA	

Alle Primer wurden von Sigma bezogen.

2.1.6 Antikörper

Immunfluoreszenzfärbung

Farbstoff: DAPI 1:10000 in 1xPermWash

Primäre Antikörper:

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
ACI-FITC	unverdünnt	Progen, Heidelberg, Deutschland
Anti-TLR3 (ab62566)	1:100 in 1 % BSA/PermWash	Abcam plc Cambridge, UK
Anti-Chlamydia ACI-P	1:10 in 1 % BSA/PermWash	Progen, Heidelberg, Deutschland
Anti-TRIF PA5-28105	1:200 in 1% BSA/PBS	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA

Sekundäre Antikörper:

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Goat-anti-rabbit IgG-Alexa-488	1:1000 in 3 %BSA/PermWash	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Goat-anti-mouse IgG-Alexa-633	1:1000 in 3 %BSA/PermWash	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA

Western Blot

Primäre Antikörper:

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-TBK1	1:1000 in 5 % BSA/TBS-T	Cell Signaling Technology Europe BV, Frankfurt, Deutschland
Anti p-IRF3 (Ser396)	1:1000 in 5 % BSA/TBS-T	Cell Signaling Technology Europe BV, Frankfurt, Deutschland
Anti p-IRF3 (S386)	1:1000 in 1 %BSA/TBS-T	Abcam plc Cambridge, UK
Anti-IRF3	1:1000 in 5 % BSA/TBS-T	Cell Signaling Technology Europe BV, Frankfurt, Deutschland
Anti-Vinculin	1:5000 in 1 % BSA/TBS-T	Abcam plc Cambridge, UK
Anti-Lamin A/C	1:1000-10000 in 1 % BSA/TBS-T	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Anti-Histone H3	1:5000 in 2-3 % BSA/TBS-T	Abcam plc Cambridge, UK

Sekundäre Antikörper:

Swine anti Rabbit	1:3000 in 1xTBS-T	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Goat anti Mouse	1:3000 in 1xTBS-T	Agilent Dako, Santa Clara, USA

2.1.7 Zellstimulantien/-inhibitoren

Produkt	Hersteller
Poly I:C	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Lipofectamine RNAiMAX	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
TLR3/dsRNA Complex Inhibitor(thiophenecarboxamido-propionate)	Calbiochem über Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
E.coli LPS (tlrl-ebmps)	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
TAK-242 TLR4 Inhibitor	Cayman Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich

2.1.8 Programme und Datenbanken

Fiji	Open-source program ⁵⁰
HoKaWo	HAMAMATSU, Hamamatsucity, Japan
Graph Pad Prism 7.02	Graph Pad Software, San Diego, California, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Microsoft Power Point	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Magellan™	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	Kanehisa Laboratories ⁵¹
Custom CDF Version 22	California Digital Library ⁵²
SAS JMP10 Genomics, Version 6	SAS Institute, Cary, NC, USA
software R v3.4.0	R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria ⁵³
Integrated development environment for R	RStudio, Palo Alto, USA ⁵⁴
fgsea package	Computer Technologies Department, ITMO University, Sankt Petersburg, Russland ⁵⁵

2.1.9 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Biorad Model 200/2.0 Electrophoresis Power Supply	Bio Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Biorad Power Pac 1000	Bio Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Biometra Fastblot B43	Biometra, Göttingen, Deutschland
Pharmacia LKB Multidrive XL Elektrophoresis	Pharmacia, Buckinghamshire, UK
Biorad Mini-PROTEAN II Cell	Bio Rad Laboratories, Hercules, California, USA
TECAN Spark 10M	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Nanophotometer P330	IMPLEN, München, Deutschland
ECL Chemo Cam Imager HR 6.0	Intas Science Imaging, Göttingen, Deutschland
Gel iX 20 SmartView Imager	Intas Science Imaging, Göttingen, Deutschland
Spectroom TV Zoom Lens H6X8	Rainbow CCTV, Irvine, California, USA
Kamera Orca-flash.4.OLT	HAMAMATSU, Hamamatsu-city, Japan
Gefriertruhe -80°C	Colora, Frankenthal, Deutschland
Kühlschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Kühlschrank 4°C	Kirsch, München, Deutschland
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikroskop CK2	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop DMRB	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop DM2000/2500	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Lampe EL6000	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Kamera DFC420	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle	Sharp, Köln, Deutschland
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Schüttler Polymax 2040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Präzisionswaagen Extend	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Ultrazentrifuge SORVALL RC 6+ Centrifuge	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	GFL, Duisburg, Deutschland
Konfokales Mikroskop SP5	Leica, Wetzlar, Deutschland
Rotationsschüttler RS-RD 5	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
Thermocycler Tpersonal	Biometra, Göttingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Brutschrank Function lin	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Mikroliterzentrifuge MIKRO 22R	Hettich Zentrifugen, Kirchlingern, Deutschland
Biofuge Stratos Zentifuge	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Heizblock OBT	CLF analytische Laborgeräte GmbH, Emersacker, Deutschland
Abzug	Köttermann, Uetze, Deutschland
Stickstofftank ARPEGE 170	Cryopal, Bussy-Saint-Georges, Frankreich
GeneChip Hybridization oven 640	Affymetrix, High Wycombe, UK
GeneChip Fluidics Station 450	Affymetrix, High Wycombe, UK
GeneChip Scanner 3000	Affymetrix, High Wycombe, UK

2.1.10 Sonstige Materialien

Sterilfilter 0,2 µM	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
BD Discardit II 5 / 10 ml Spritzen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Deckgläser	Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda Königshofen, Deutschland
Eppendorfggefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppiständer Combi-Rack	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Cryovials	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Mechanischer Zähler	IVO Laboratories, El Segundo, California, USA
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Akron, Ohio, USA
Pipetboy acu 2	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
Pipette 1 / 5 / 10 / 25 / 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen Multiuniversal	Roth, Lichtentanne, Deutschland
Pipettenspitzen Ultratip	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen CELLSTAR	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Well-Platten CELLSTAR 6 / 12 / 24 Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Glas-Beads (1,7-2,1 mm Durchmesser)	Roth, Lichtentanne, Deutschland
Cell Scraper	TPP, Trasadingen, Schweiz
Combitips plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transferpipette	Brand, Wertheim, Deutschland
Oak-Ridge-Röhrchen PPCO	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
GeneChip™ Human Gene 2.0 ST Array	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
cellulose nitrate strips, 0,45 µm Porengröße	Sartorius, Göttingen, Deutschland
PVDF Blotting Membrane	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Gel-Blotting-Paper GB005	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

2.2 Methoden

2.2.1 Zellen

2.2.1.1 Zellkultur und Kryokonservierung

Verwendet wurden die folgenden Zelllinien: HeLa, T24/83, UROtsa, RT112 und UMUC-3. Je nach Zelllinie variierte die Zusammensetzung des Wachstumsmediums. In 2.1.3 findet sich eine Auflistung der Wachstumsmedien und ihrer Bestandteile. Die Zelllinien wurden in 175 cm² Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ in 25 ml Wachstumsmedium kultiviert. Das Splitten der Zellen fand jeden zweiten bis dritten Tag, jedoch immer nach visueller Wachstumskontrolle am Lichtmikroskop, statt. Hierzu wurde das vorhandene Medium abgenommen, verworfen und der Zellrasen mit Trypsin bedeckt, um ein Ablösen der Zellen zu bewirken. Nach 3-5 Minuten Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde, abermals lichtmikroskopisch, die aufgehobene Adhäsion überprüft. Mit der Zugabe des entsprechenden Wachstumsmediums wurde die lysierende Wirkung des Trypsins gestoppt. Die sich nun in Suspension befindlichen Zellen konnten den Kulturflaschen entnommen und, in frischem Wachstumsmedium verdünnt, in neue Kulturflaschen ausgesät werden.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen analog zum Splitten mit Trypsin abgelöst. Die in Suspension befindlichen Zellen wurden samt Medium in ein Falcon-Tube transferiert. Eine kleine Menge der Zellsuspension wurde entnommen, mit Trypanblau vermengt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die restlichen Zellen wurden für 10 Minuten bei 4 °C und 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert, um Mediumsreste in der Zellsuspension zu minimieren. Das Zellpellet wurde in Kryokonservierungslösung, bestehend aus 90% FKS und 10% DMSO, aufgenommen und in Kryovials aliquotiert (3-6 x 10⁶ Zellen in 1 ml Lösung pro Kryovial). Über Nacht wurden die Zellen auf -80 °C heruntergekühlt und ab dem darauffolgenden Tag in flüssigem N₂ gelagert.

Jede verwendete Zelllinie wurde mittels PCR mit den in 2.1.5 angegebenen Primern negativ auf Mycoplasmen getestet.

2.2.1.2 Poly-(I:C)-Transfektion

Polyinosinic-polycytidylic acid, kurz Poly-(I:C), ist ein synthetisches, doppelsträngiges Homopolymer mit einer Länge zwischen 1.5 – 8 kbp, welches als RNA-Modell zur Untersuchung von TLR3-initiierten Signalwegen genutzt werden kann³⁰. Da Poly-(I:C) für eine erfolgreiche TLR3-Aktivierung in die Zelle eindringen muss, wird ein Transfektionsreagenz benötigt. In unserem Fall wurde Lipofectamine 2000 verwendet, welches nach dem Prinzip der Lipofektion funktioniert.

Vor Beginn der Stimulation wurden die ausgesäten Zellen mit Infektionsmedium gewaschen. Die Infektionsmedien mit ihren Bestandteilen sind für jede verwendete Zelllinie in 2.1.3 aufgeführt. Hierbei ist die Abwesenheit von FKS entscheidend, um eine erfolgreiche Transfektion zu erreichen. Es wurden 5 µg Poly-(I:C) und 3 µl Lipofectamine 2000 pro ml Medium eingesetzt. Die Transfektion mit Lipofectamine 2000 wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Kontrolle wurde stets simultan eine reine Lipofectamine 2000 Transfektion ohne Zugabe von Poly-(I:C) in einer Konzentration von 3 µl / ml durchgeführt. Die weitere Inkubation der Zellen fand bei

37 °C und 5 % CO₂ statt, wobei die Inkubationsdauer sowie die weitere Behandlung versuchsabhängig variierten.

2.2.1.3 LPS-Stimulation

Lipopolysaccharide (LPS) kommen natürlicherweise in den Zellwänden gramnegativer Bakterien vor und lösen durch ihre immunogene Eigenschaft Abwehrreaktionen aus. Auch Zellen, die nicht Teil des Immunsystems sind, können auf LPS reagieren. Ein bekannter Rezeptor hierfür ist TLR4, weshalb in den durchgeführten Versuchen eine LPS-Stimulation für die Aktivierung der TLR4-Signalkaskade verwendet wurde. Die LPS-Lösung wurde bei -20 °C gelagert. Für die Stimulation der Zellen wurde LPS in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt, verdünnt in mit 10 % FKS versetztem Infektionsmedium. Die Infektionsmedien aller verwendeten Zelllinien sind in 2.1.3 aufgelistet. Das vorliegende Wachstumsmedium wurde gegen das LPS-haltige Medium ausgetauscht und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ für 4 h inkubiert. Die weitere Behandlung variierte versuchsabhängig.

2.2.1.4 TLR3-Inhibition

Der hier verwendete TLR3/dsRNA-Komplex Inhibitor (Thiophenecarboxamido-Propionat von Calbiochem) bewirkt eine selektive Hemmung derjenigen Signalkaskade, die durch eine Aktivierung des TLR3 ausgelöst wird⁵⁶. Um eine ausreichende Wirkung zu erzeugen, müssen die zu inhibierenden Zellen laut Herstellerangaben mindestens 12 h vor Kontakt mit eventuellen Stimulantien wie Chlamydien oder Poly-(I:C) mit dem Inhibitor vorinkubiert werden.

Der Inhibitor wurde nach Herstellerangaben in DMSO gelöst. Die Zusammensetzungen der Wachstums- und Infektionsmedien aller verwendeten Zelllinien sind in 2.1.3 aufgeführt. Für die Vorinkubation der Zellen mit TLR3-Inhibitor wurde das Wachstumsmedium gegen TLR3-Inhibitor-haltiges Medium getauscht. Der Inhibitor wurde in mit 10 % FKS versetztem Infektionsmedium in der angegebenen Konzentration (3, 10, 30 oder 100 µM) gelöst und auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ konnte dann die weitere Behandlung der inhibierten Zellen stattfinden. Um eine TLR3-Inhibition aufrechtzuerhalten, wurde bei allen weiteren Versuchsschritten die initiale Inhibitorkonzentration beibehalten.

2.2.1.5 TLR4-Inhibitor

TAK-242 (bezogen von Cayman Bertin Pharma) ist ein selektiver TLR4-Inhibitor, der durch sein Binden an den Rezeptor eine Aktivierung durch TLR4-Agonisten wie beispielsweise LPS verhindert⁵⁷. Vor der Verwendung wurde TAK-242 nach Herstellerangaben in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. In 2.1.3 sind die Zusammensetzungen der Wachstums- und Infektionsmedien aller verwendeten Zelllinien aufgeführt. Um eine Inhibition vorzunehmen, fand eine Vorinkubation mit dem Inhibitor für eine Stunde statt. Hierzu wurde das Wachstumsmedium der Zellen entfernt und durch TLR4-Inhibitor-haltiges Medium ersetzt. Dieses Medium bestand aus mit 10 % FKS versetztem Infektionsmedium und dem TLR4-Inhibitor in einer Konzentration von 1 µM. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ konnte von einer vorliegenden Inhibition ausgegangen werden und die Zellen weiterbehandelt werden. Um eine TLR4-

Inhibition aufrechtzuerhalten, wurde bei allen weiteren Versuchsschritten der Inhibitor in einer Konzentration von 1 μM den verwendeten Medien beigefügt.

2.2.1.6 Fraktionierte Zelllyse

Die fraktionierte Zelllyse dient der Auftrennung der Zelle in ihre verschiedenen Kompartimente, um die Lokalisation der im Zelllysate befindlichen Proteine zu bestimmen. Generell ist eine Auftrennung in mehrere Untereinheiten, wie etwa Zellembra, Zytosol, Zellkernmembran, Zytoskelett, flüssige Zellkernbestandteile und DANN, möglich. Bei den hier vorgenommenen Fraktionierungen wurde lediglich zwischen Zytosol- und Nukleuskompartiment differenziert. Zu Beginn wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, von der Well-Platte abtrypsinisiert und mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Zum Aufbrechen der zellulären Membran wurde 1 ml Nonidet-Lyse-Puffer pro 5×10^6 Zellen verwendet. Der Kern blieb bei dieser Lysemethode unversehrt. Zur Lyse der Zellmembran wurden die Zellen mit dem Puffer vermischt, 45 Sekunden gevortext und für 30-60 Minuten bei 4 °C im Rotationsschüttler inkubiert. Durch anschließendes Zentrifugieren bei 13000 x g und 4 °C für 20 Minuten konnte die dem Überstand entsprechende zytosolische Fraktion von den restlichen Zellkernen und -trümmern im Pellet abgenommen werden. Beide Fraktionen wurden anschließend mit $\frac{1}{4}$ des Eigenvolumens an 5xSB-Puffer vermischt und aufgeköcht, die Zytosolfraktion für 5, die DNA-haltige Zellkernfraktion für 10 Minuten. Zur Aufbewahrung wurden die Lysate bei -20 °C eingefroren.

2.2.2 *Chlamydia trachomatis* Serovar D

2.2.2.1 Infektion

Die Infektion von Zellen mit *C. trachomatis* fand frühestens 16 h nach der Zellaussaat statt, sodass von einer bestehenden Adhäsion der Zellen und einer möglichst stressfreien Umgebungssituation ausgegangen werden konnte.

Die Bestandteile der Wachstums- und Infektionsmedien der verwendeten Zelllinien sind in 2.1.3 aufgelistet. Das Wachstumsmedium wurde abgenommen und die adhären Zellen dreimal mit Infektionsmedium gewaschen. *Chlamydia trachomatis* Serovar D wurde direkt nach dem Auftauen mit Infektionsmedium vermengt und unmittelbar auf die Zellen gegeben. Die MOI („multiplicity of infection“) wurde mithilfe der Zellzahl der tags zuvor ausgesäten Wirtszellen und der Stockkonzentration (in IFUs pro μl) berechnet. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 wurde ein Mediumswechsel zu mit 10 % FKS versetztem Infektionsmedium vorgenommen, um eine hinreichende Versorgung der Zellen zu gewährleisten und Stress durch Proteinmangel und freie Chlamydien im Medium zu vermeiden. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2 , wobei der Zeitraum und die weitere Behandlung in den verschiedenen Experimenten variierten.

2.2.2.2 Herstellung eines *Chlamydia trachomatis* Serovar D Stocks

Zur Anzucht eines neuen *Chlamydia trachomatis* Stocks wurden HeLa Zellen als Wirtszellen verwendet. Zunächst wurden die Zellen in 175 cm^2 Kulturflaschen so kultiviert, dass bei Infektion eine Konfluenz von 80 % bestand. Die Infektion erfolgte mit HeLa-Infektionsmedium (Zusammensetzung siehe 2.1.3), wobei Cyclohexamid in

einer Konzentration von 1 µg/ml hinzugefügt wurde. Der weitere Infektionsablauf wurde wie in 2.2.2.1 beschrieben durchgeführt. Nach einer 48-stündigen Infektionsdauer wurden die Zellen mittels Zellschaber von den Kulturflaschen gelöst und mithilfe von Glas-Beads aufgebrochen (siehe 2.2.2.3). Mit dem so gewonnenen infektiösen Überstand erfolgte eine weitere Infektionsrunde, wobei die Anzahl der infizierten Zellen etwa verzehnfacht wurde.

Nach erneuten 48 h Infektionsdauer konnte die Isolierung der Chlamydien beginnen. Hierzu wurden abermals die Zellen mittels Schaber aus den Kulturflaschen gelöst, aufgebrochen und die übrigen Zelltrümmer durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 800 x g und 4 °C von dem infektiösen Überstand getrennt. Dieser Überstand wurde nun in sterile Ultrazentrifugenröhrchen überführt und für 1 h bei 22000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach diesem Schritt befanden sich die infektiösen EBs in dem Pellet. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit je 5 ml vorgekühltem SPG-Puffer resuspendiert und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Abermals wurde der Überstand verworfen, die Pellets in insgesamt 1-2 ml vorgekühltem SPG-Puffer gelöst, aliquotiert und für 2 h auf 4°C vorgekühlt. Anschließend folgte das weitere Herunterkühlen auf -20°C für mindestens 12 h bis schließlich das Lagern des Stocks bei -80°C erfolgte.

Zur Bestimmung der IFU-Konzentration wurden HeLa-Zellen in 1 ml HeLa-Wachstumsmedium (Zusammensetzung siehe 2.1.3) in 12-Well-Platten ausgesät und am Folgetag mit unterschiedlichen Stock-Verdünnungen im Bereich 1:200-20.000 infiziert (siehe 2.2.2.1). Nach 24 h wurde eine Chlamydien-Schnellfärbung durchgeführt (siehe 2.2.3.1) und die MOI in den unterschiedlichen Bedingungen ausgezählt. Mit folgender Formel konnte anschließend die IFU-Konzentration des Stocks berechnet werden:

$$\text{MOI} \times \text{Zellzahl/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{X IFUs/ml}$$

Der Mittelwert aller Verdünnungen ergab die Konzentration des Stocks in der Einheit IFUs/ml.

2.2.2.3 Zellaufschluss

Nach einer Infektionsdauer von 48 h ist der Entwicklungszyklus von *Chlamydia trachomatis* beendet ¹¹. Das bedeutet, dass eine Entwicklung vom initialen EB über stoffwechselaktive RBs zu vervielfältigten infektiösen EBs durchlaufen wurde. Ein Zellaufschluss mittels Glas-Beads ermöglicht es, diese EBs aus den Wirtszellen zu entfernen.

Die infizierten Zellen wurden mittels Zellschaber vom Well gelöst. Die nun im Medium schwimmenden Zellen wurden im Volumenverhältnis 1:1 mit sterilen Glas-Beads mit einem Durchmesser zwischen 1,7 und 2,1 mm in ein Falcon Tube gegeben und für 15 Minuten gevortext. Bei diesem Schritt findet ein Aufplatzen der Zellen durch die Scherkräfte statt, die Chlamydien bleiben allerdings aufgrund ihrer Größe unversehrt. Das Gemisch aus Medium, Zelltrümmern und *Chlamydia trachomatis* wurde dann bei 800 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert, wodurch sich die vorhandenen Zelltrümmer im Pellet und die Chlamydien im Überstand befanden. Der chlamydienhaltige Überstand konnte nun entweder zu einer Isolierung der infektiösen EBs (siehe 2.2.2.2) oder für einen weiteren Infektionszyklus verwendet werden.

2.2.3 Immunfluoreszenz-Färbung und -Mikroskopie

Bei der Immunfluoreszenz-Färbung können zelluläre Strukturen mithilfe von an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern visualisiert werden. Fluoreszenzfarbstoffe besitzen die Eigenschaft, unter Anregung mit Licht eine Emission zu erzeugen. Je nach Farbstoff unterscheiden sich sowohl die zur Anregung benötigte Wellenlänge, als auch die Wellenlänge des emittierten Lichts.

Man unterscheidet zwischen direkter Färbung, bei der ein Antikörper das gewünschte Antigen bindet und gleichzeitig mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, und indirekter Färbung, wobei zuerst ein Primärantikörper das Antigen bindet und anschließend durch einen mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Sekundärantikörper detektierbar gemacht wird. Darüber hinaus existieren Farbstoffe, die bestimmte zelluläre Strukturen binden.

Die intrazelluläre Lokalisation des Antigens wurde am Epifluoreszenzmikroskop dargestellt. Für Immunfluoreszenz-Färbungen vorgesehene Zellen wurden stets auf Deckgläschen kultiviert.

2.2.3.1 Direkte Immunfluoreszenz-Färbung mit ACI-FITC

Die Chlamydien-Schnellfärbelösung ACI-FITC besteht aus einer Mischung von drei monoklonalen Antikörpern, welche an Fluoresceinisothiocyanat gebunden sind. Die von den Antikörpern erkannten Epitope sind Teile von LPS, MOMP (major outer membrane protein) und ein speziesspezifisches Omc (chlamydial outer membrane complex). Als Gegenfärbung enthält die Färbelösung Evans Blue. Dies ist ein Farbstoff, welcher unspezifisch Proteine bindet und somit die Wirtszellen sichtbar macht.

Nach entsprechender Behandlung und Infektion der zu färbenden Zellen wurde das vorhandene Medium abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zum Fixieren wurde der Zellrasen mit einer Mischung aus Methanol und Aceton im Verhältnis 1:1 bedeckt und für einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die nun den fixierten Zellrasen enthaltenden Deckgläschen wurden den Wells entnommen, kurz an der Luft getrocknet und mit der bewachsenen Oberfläche auf einen 15 µl Tropfen ACI-FITC transferiert. In einer Nasskammer erfolgte bei 37 °C eine 30-minütige Inkubation in Dunkelheit. Um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Deckgläschen einmal in PBS und anschließend einmal in Leitungswasser gewaschen. Objektträger wurden beschriftet und mit einem Tropfen einer Glycerol-PBS-Mischung in dem Verhältnis 1:1 pro Deckgläschen versehen. Die gewaschenen Deckgläschen wurden auf die Objektträger gelegt. Hierbei zeigte der gefärbte Zellrasen nach unten, sodass sich die bewachsene Fläche in der Glycerol-PBS-Mischung befand. Gelagert wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4°C. Die Auswertung fand lichtmikroskopisch am Mikroskop Leica DM2000/2500, Lampe Leica EL6000, Kamera Leica DFC420 statt. Die elektronische Nachbearbeitung erfolgte mit Fiji⁵⁰.

2.2.3.2 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung

Vor dem Beginn der Färbung wurde das vorhandene Medium abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Nun fand die Fixierung und Permeabilisierung mit 200 µl Cytofix/Cytoperm (4,2 %PFA-solution Kit BD, #554714) pro Well für 20 Minuten bei 4 °C statt. Die Permeabilisierung ermöglicht es den darauffolgenden Substanzen in die Zelle einzudringen und so intrazelluläre Strukturen zu erreichen. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal gewaschen. Ein Waschgang beinhaltete das Inkubieren mit 1xPerm/-Wash für 5 Minuten. Für 1 h wurden die Zellen bei 20 °C blockiert. Die Blocklösung bestand aus 1 % BSA, 10 % Ziegen-Serum und 0,3 M Glycin in 1 x Perm/-Wash. Es folgten drei weitere Waschgänge und die Inkubation mit dem/den Primärantikörper/n in den geeigneten Verdünnungen für 2 h bei RT. Bei jedem durchgeführten Versuch wurde eine Kontrollfärbung mit dem Sekundärantikörper durchgeführt. Diese Proben wurden während der Inkubation des Primärantikörpers in 1 x Perm/-Wash belassen. Nach einem erneuten Waschvorgang wurde/n der/die Sekundärantikörper, ebenfalls in den geeigneten Verdünnungen, auf die Zellen gegeben und im Dunkeln für eine Stunde bei RT inkubiert. Am Ende jeder Färbung erfolgte im letzten Waschgang die direkte Färbung von DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, um die Zellkerne darzustellen. Hierzu wurde DAPI in einer 1:10.000-15.000 Verdünnung zu 1xPerm/-Wash hinzugefügt. Nach 5-minütiger Inkubation folgten zwei herkömmliche Waschschrte. Zuletzt wurden die gefärbten Deckgläschen auf beschriftete mit Glycerol/PBS-Tropfen vorbereitete Objektträger transferiert. Bis zur Auswertung am Mikroskop Leica DMRB wurden die Proben bei 4 °C und in Dunkelheit gelagert. Die nachträgliche Bildbearbeitung erfolgte elektronisch mit Fiji⁵⁰.

2.2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA gehört zu den quantitativen Immunoassays und kann zur Konzentrationsbestimmung verschiedener Biomoleküle verwendet werden. Das Funktionsschema beruht auf der Antigen-Antikörper-Bindung. Bei der hier angewandten Sandwich-Assay Variante wird das Antigen an zwei Antikörper gebunden. Einer dient dem Fixieren an der festen Phase, der andere kann mit einem Enzym gekoppelt werden, über dessen Substratumsetzung eine Quantifizierung möglich wird. Je mehr Antigen vorhanden, desto höher ist die Konzentration des umgesetzten Substrats. Mittels Standardkurve kann so auf die Antigenkonzentration in einer Probe geschlossen werden.

Für die durchgeführten ELISAs wurden die unter 2.1.4 aufgeführten Kits verwendet. Alle Reagenzien wurden nach Herstellerangaben vor Gebrauch gelöst und verdünnt. Vorbereitend wurden 100 µl Capture Antibody pro Well auf die ELISA-Platte gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Überstände entfernt und die Platte dreimal mit 400 µl Wash-Buffer pro Well gewaschen. Ein Ausklopfen der Platte auf Papier sorgt dafür, dass möglichst wenig Pufferrest in den Wells verbleibt. Als Nächstes wurde der am Plattenboden gebundene Antikörper mit 300 µl Blockreagenz pro Well bedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um bei späterer Antigen-Zugabe unspezifische Bindungen zu minimieren. Nach abermaligem Waschen wurden nach Pipettierschema 100 µl des Standards bzw. der Proben je Well hinzugefügt. Während der 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur bilden sich Bindungen zwischen dem Capture Antibody und dem gesuchten Biomolekül aus. Anschließend entfernt ein weiterer Waschschrte nicht gebundene Anteile der Proben- bzw. des Standards. Als Nächstes wurden 100 µl

Detection Antibody pro Wells dazugegeben. Nach 2 h Inkubationszeit sollte jedes vorhandene Antigen-Epitop gebunden sein. Überschüssiger Detection Antibody wurde bei einem erneuten Waschschrift entfernt. Für die Quantifizierung wurden nun pro Well 100 µl HRP (Streptavidin-Horseradish Peroxidase)-haltige Enzymlösung hinzugefügt. Nach 20-minütiger Inkubation wurde überschüssige Enzymlösung durch Waschen entfernt und die Wells mit je 100 µl Substratlösung in Dunkelheit inkubiert. Das in der Substratlösung enthaltene TMB (Tetramethylbenzidine) färbt sich bei Umsetzung durch die Peroxidase blau. Nach 20 Minuten wurde diese Reaktion mit einer schwefelsäurehaltigen Stopp-Lösung beendet, was zu einem Farbumschlag von blau nach gelb führt. Es folgte eine Quantifizierung dieser Farbintensität mit einem Absorptionsmaximum von 450 nm am Photometer.

2.2.5 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum Auftrennen, Detektieren und Quantifizieren von Proteinen aus einem Proteingemisch. Er besteht aus drei Schritten: Der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, bei welcher die Proteine nach Molekulargröße aufgetrennt werden, dem Blot, wobei die in dem Gel befindlichen Proteine auf eine Membran transferiert werden, und der Proteindetektion mittels HRP gekoppelter Antikörper.

Die hier durchgeführten Western Blots untersuchten zelluläre Proteine, sodass es sich bei den Proteingemischen um Zelllysate handelte. Die verwendeten Gele, bestehend aus 10-%igem Trenngel und 4-%igem Sammelgel, wurden spätestens am Vortag gegossen und über Nacht getrocknet, um von einer vollständigen Polymerisierung ausgehen zu können. Jede Geltasche wurde mit 8-10 µl Lysat befüllt. Unter einer konstanten Spannung von 80 Volt wurden die im Lysat vorhandenen Proteine im Sammelgel auf eine Höhe gebracht, sodass ein gleichzeitiges Eintreten in das Trenngel stattfand. Nun wurde die Spannung auf 100-140 Volt erhöht. Nach ausreichender Auftrennung der unterschiedlich großen Proteine, ersichtlich an dem simultan mitlaufenden Marker, wurden die Gele aus der Gelelektrophoresekammer entfernt und, ebenso wie das Blotpapier, in Towbinpuffer inkubiert. Die verwendete Nitrozellulose-Membran wurde 1-2 Minuten mit H₂O behandelt und anschließend ebenfalls für mindestens 15 Minuten in Towbinpuffer inkubiert. Für den Semidry-Blot wurde das Gel passgenau auf die vorbehandelte Membran gelegt. Oben und unten mit Blotpapier bedeckt fand dann über 60 Minuten bei konstanten 15 Volt der Proteintransfer auf die Membran statt. Um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern wurde die Membran nun für 30-60 Minuten geblockt. Abhängig vom Antikörper wurde hierfür Milchpulver- oder BSA-Lösung verwendet. Anschließend fand die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C statt. Nach dreimaligem Waschen in 1 x TBST für je 10 Minuten folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Ein erneuter Waschvorgang in 1 x TBST über 3 x 15 Minuten sorgte für das Entfernen von überschüssigem Sekundärantikörper. Da es sich bei den verwendeten Sekundärantikörpern um HRP-gekoppelte Antikörper handelte, wurde zur Detektion der Proteine ein Chemilumineszenzverfahren angewandt. Hierfür wurde das aufgelistete Western Bright Substrat Kit verwendet. Das gebundene HRP katalysiert die Oxidation des in der Substratlösung enthaltenen Luminols. So entsteht messbare Lumineszenz. Die Entwicklung der Bilder fand an dem ECL Chemo Cam Imager HR 6.0 statt, bearbeitet und ausgewertet wurden sie mithilfe des Programms Fiji⁵⁰.

2.2.6 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurde das RNeasy Mini Kit verwendet. Hierbei wird nach der Zellyse durch wiederholtes Zentrifugieren des Lysats über eine Membran die enthaltene RNA aufgereinigt, bis sie schließlich im letzten Zentrifugierschritt aus der Membran gewaschen wird.

Die im Kit enthaltenen Reagenzien wurden wie angegeben vorbereitet. Das vorliegende Medium der Zellen wurde entfernt und die Zelladhäsionen durch Trypsinzugabe aufgehoben. Die Zellen wurden mittels Neubauer Kammer gezählt. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Zellen, hierzu wurde die Zellsuspension mit PBS vermergt und bei 400 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der dritten Wiederholung wurde der PBS-Überstand sorgfältig von den Zellpellets abgenommen, um möglichst reine Zellen zu erhalten. Je nach zuvor ermittelter Zellzahl wurde das Zellpellet in 350 bzw. 600 µl Buffer RLT resuspendiert. Dies führt zum Aufbrechen der Zellen, sodass die später zu isolierende RNA frei wird. Durch die denaturierende Eigenschaft des Puffers wird gleichzeitig verhindert, dass RNasen freie RNA abbauen. Der nächste Schritt ist die Homogenisierung des Lysats, wofür es unterschiedliche Methoden gibt. In diesem Fall wurden 20-gauge Nadeln verwendet, durch welche das Lysat mit einer Spritze mindestens fünfmal aufgezogen wurde. Durch das Homogenisieren wird die Viskosität des Lysats reduziert, wodurch im späteren Verlauf eine gute Bindung der RNA an die Säulenmembran gewährleistet werden kann. Dieses homogenisierte Lysat wurde nun im Verhältnis 1:1 mit 70 %igem Ethanol vermischt und auf die Säule aufgetragen. Es folgte das Zentrifugieren für mindestens 15 Sekunden bei mindestens 8000 x g. Bei diesem und den weiteren Aufreinigungsschritten bleibt die RNA an der Säulenmembran haften, andere Zellbestandteile werden jedoch durch die Zentrifugalkraft durch die Säule gepresst. Der sich im „collection tube“ befindliche Durchfluss wurde verworfen, 700 µl Buffer RW1 auf die Säulenmembran gegeben und ein weiteres Mal unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Durch diesen Schritt wird im speziellen die vorhandene DNA herausgewaschen, die dann mit dem Durchfluss verworfen wird. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl Buffer RPE, zuerst für 15 Sekunden, anschließend für mindestens 2 Minuten bei über 8000 x g, wonach abermals der Durchfluss verworfen wurde. Um die Säule von Pufferresten gänzlich zu befreien, wurden die Säulen in frische „collection tubes“ gestellt und für eine Minute bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach diesen Aufreinigungsschritten sollte sich möglichst reine RNA in der Säulenmembran befinden. Im letzten Schritt wurden die Säulen in verschließbare „collection tubes“ gestellt und nach der Zugabe von 30-50 µl RNase-freiem Wasser für eine Minute bei mindestens 8000 x g zentrifugiert. Durch das Wasser werden die Bindungen zwischen RNA und Membran gelöst und die zuvor aufgereinigte RNA wird durch die Säule in das „collection tube“ gewasche. Bei einer zu erwartenden RNA-Menge über 30 µg kann dieser Schritt wiederholt werden.

Im Anschluss wurde stets die Konzentration der isolierten RNA am Nanophotometer gemessen. Aufbewahrt wurde die RNA bei -20 °C.

2.2.7 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung wurde mit dem peq GOLD tissue DNA Mini Kit durchgeführt. Hierbei wird das Zelllysat auf eine DNA-bindende Membran gegeben. Durch mehrfaches Zentrifugieren wird diese aufgereinigt und im letzten Schritt wieder von der Membran gelöst.

Die Reagenzien wurden den Herstellerangaben entsprechend vorbereitet. Das vorliegende Medium der Zellen wurde entfernt und ihre Adhäsion mit Trypsin gelöst. In frischem Wachstumsmedium wurden die Zellen aufgenommen, in Falcons überführt und bei 400 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Bestandteile der Wachstumsmedien aller verwendeten Zelllinien sind in 2.1.3 aufgelistet. Durch das Zählen der abtrypsinisierten Zellen in einer Neubauer Zählkammer wurde sichergestellt, dass die Zellzahl 5×10^6 nicht überschreitet, um dem Verstopfen der Säule vorzubeugen. Es folgte das dreimalige Waschen der Zellen in PBS. Nach dem letzten Waschschrift wurde der PBS-Überstand sorgfältig abgesaugt, sodass die Zellen möglichst rein vorlagen. Ein Ansatz bestehend aus 400 µl DNA Lysis Buffer T, 20 µl Proteinase K und 15 µl RNase-A (20 mg/ml) je Probe wurde vorbereitet und zum Pellet hinzugefügt. Das Resuspendieren und Vortexen sorgt für ein gutes Vermischen der Zellen mit dem Lysepuffer. Nach einer 15- bis 30-minütigen Inkubation im 50 °C Schüttelwasserbad geht man von einer vollständigen Zellyse aus und die Lysate können weiterverarbeitet werden. Dem Lysat wurden 200 µl DNA Binding Buffer zugefügt und sorgfältig resuspendiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf eine PerfectBind DNA Column geladen, welche eine Minute lang bei 10.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen wurde. Dieser Vorgang dem Binden der DNA aus dem Lysat an die Silica-Membran. Durch mehrfaches Waschen wurde die gebundene DNA aufgereinigt. Hierzu wurden 650 µl DNA Wash Buffer auf die Membran pipettiert, die Säule nochmals bei 10.000 x g für eine Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und die Säule in ein neues Eppi gestellt. Um Pufferreste zu entfernen, wurde dann ohne eine weitere Zugabe die Säule bei 10.000 x g für 2 Minuten trocken zentrifugiert. Für die Elution der DNA wurden 100-200 µl Elution Buffer auf die Membran gegeben und für 3 Minuten bei RT inkubiert. In dieser Zeit wird die Bindung zwischen DNA und Silica-Membran aufgehoben. In einem frischen Eppi wurde die Säule nun bei 6.000 x g eine Minute lang zentrifugiert.

Die Konzentration der so gewonnenen DNA wurde am Nanophotometer gemessen. Eine Aufbewahrung fand bei -20 °C statt. Die isolierte DNA wurde für Mykoplasmen-PCRs eingesetzt.

2.2.8 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird aus Zellen isolierte RNA mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit anschließender PCR und Gelelektrophorese ermöglicht dies den Nachweis von intrazellulärer RNA.

Die zu untersuchende RNA wurde wie oben beschrieben isoliert, deren Konzentration gemessen und zur Aufbewahrung bei -20 °C eingefroren oder direkt weiterverwendet. Das Umschreiben in cDNA erfolgte mit dem Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit. Hierzu wurde ein 12 µl Mix, bestehend aus 1 µg RNA, 1 µl Primer Oligo dT und H₂O hergestellt. Bei 65 °C erfolgt die Bindung der Primer an die RNA. Anschließend wurden dem Mix gemäß Kit-Anleitung 4 µl 5xReaction Buffer, 2 µl dNTP, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor und 1 µl RevertAid M-MuLV RT hinzugefügt. Während einer Inkubation im Cyclyer bei 25 °C für 5 Minuten, gefolgt von 60 Minuten bei 42 °C wird die RNA von der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Ein abschließendes Erhitzen auf 70 °C für 5 Minuten sorgt für das Inaktivieren des Enzyms.

Die so gewonnene cDNA konnte nun mittels PCR vervielfältigt werden.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifikation eines Templates mithilfe einer thermostabilen Polymerase. Ein Zyklus besteht aus drei Reaktionsschritten, wobei Inkubationszeit und -temperatur für den jeweiligen Reaktionsschritt optimiert sind. Die Denaturierung dient der Trennung des doppelsträngigen Templates, während der Annealingphase binden die Primer und während der Elongationsphase bildet die Polymerase den komplementären Strang.

In den durchgeführten Versuchen bestand das Template aus genomischer DNA oder cDNA, das verwendete Enzym war die Dream-Taq DNA Polymerase. Die verwendeten Primer wurden je nach Ziel DNA-Abschnitt gewählt. Es wurde ein PCR-Ansatz in folgender Zusammensetzung angefertigt:

10 µl 2x Dream-Taq
0,5 µl Primer x
0,5 µl Primer y
300 ng DNA

Der Ansatz wurde mit H₂O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt.

Alle Komponenten wurden durch Resuspendieren vermengt und kurz abzentrifugiert. Nach Auswahl des entsprechenden PCR-Programms und Aufheizen des Deckels wurden die Ansätze in den Thermocycler gestellt.

Um die Zellreihen auf Verunreinigung durch Mycoplasmen zu testen, wurden die in 2.1.5 tabellarisierten Primer verwendet und das folgende Programm gewählt:

1. 95 °C 3 min
2. 95 °C 30 sec
3. 54 °C 30 sec
4. 72 °C 45 sec
5. 95 °C 30 sec
6. 50 °C 30 sec
7. 72 °C 45 sec
8. 72 °C 5 min

Die Schritte 2.-4. wurden 6-mal wiederholt, die Schritte 5.-7. 25-mal.

Für das Vervielfältigen von Aktin-, TLR3- und TRIF-cDNA wurde folgendes Programm verwendet:

1. 95 °C 3 min 20 sec
2. 95 °C 30 sec
3. 54 °C 30 sec
4. 72 °C 30 sec
5. 95 °C 30 sec
6. 50 °C 30 sec
7. 72 °C 30 sec
8. 72 °C 5 min

Die verwendeten Primer sind ebenfalls in Tabelle 2.1.5 aufgelistet.

Die Schritte 2.-4. wurden 6-mal wiederholt, die Schritte 5.-7. 25-mal.

Nach Beendigung der Programme wurden die Proben auf 4 °C gekühlt. Anschließend wurden sie dem Gerät entnommen und weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren.

Zur Visualisierung der amplifizierten DNA-Abschnitte wurde eine Gelelektrophorese in 1- bzw. 2-%igem Ethydiumbromid-Agarosegel durchgeführt. Als Marker wurde je nach erwarteter Bandengröße ein 100 bp oder 1 kbp Marker verwendet. Die Taschen wurden mit 10 µl Probe befüllt und das Gel für 30-60 Minuten an eine Stromstärke von 120-140 mA angeschlossen. Zur Auswertung wurden die Gele am Gel iX 20 SmatView Imager UV-belichtet. Eine nachträgliche elektronische Bearbeitung der Fotos fand mithilfe des Programms Fiji⁵⁰ statt.

2.2.10 RNA-Array

Die Microarray-Analyse fand in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Medizinische Forschung der Medizinischen Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg statt.

Ziel einer RNA-Arrays ist die Erfassung und Gegenüberstellung der zellulären mRNA-Profile verschiedener Zellpopulationen.

Es wurden die GeneChip™ Human Gene 2.0 ST Arrays von Thermo Fisher verwendet. Bei den untersuchten Zellen handelte es sich um T24/83-Zellen. Es erfolgte die Auswertung der mRNA-Profile unter folgenden Bedingungen: *Chlamydia trachomatis* Serovar D Infektion (MOI 5) zu einem frühen (4,5 h Infektionsdauer) und späten (24 h Infektionsdauer) Zeitpunkt, Poly-(I:C)-Stimulation, LPS-Stimulation. Die Kontrollen wurden entsprechend früher oder später Infektion jeweils für denselben Zeitraum unbehandelt kultiviert. Außerdem wurden Kombinationen beider Infektionszeitpunkte mit TLR3- bzw. TLR4-Inhibitor, sowie die gleichzeitige Stimulation und Inhibition desselben Signalwegs durchgeführt. Für jede Bedingung wurden Triplikate generiert.

Die Stimulation mit Poly-(I:C) oder LPS wurde über einen Zeitraum von 4 h durchgeführt.

Zur Isolierung der zellulären RNA wurde das in 2.2.6 beschriebene RNeasy Mini Kit verwendet. Für die weiteren Schritte wurden die in Materialien gelisteten Kits von Thermo Fisher und Geräte von Affymetrix verwendet. Protokollgerecht fand die Bildung von biotinylierter cDNA statt. Es folgte die Hybridisierung der cDNA mit den Gen-Chips. Anschließend wurden diese gewaschen, gefärbt und ausgelesen.

Für die Auswertung fand der Vergleich der Expressionsintensitäten wie folgt statt:

<i>Chlamydia trachomatis</i> 4h/24h	-	Kontrolle 4h/24h
<i>Chlamydia trachomatis</i> + TLR3-Inhibition 4h/24h	-	Kontrolle 4h/24h
<i>Chlamydia trachomatis</i> + TLR4-Inhibition 4h/24h	-	Kontrolle 4h/24h
LPS-Stimulation	-	Kontrolle 4h/24h
LPS-Stimulation + TLR4-Inhibition	-	Kontrolle 4h/24h
Poly-(I:C)-Stimulation	-	Kontrolle 4h/24h
Poly-(I:C)-Stimulation + TLR3-Inhibition	-	Kontrolle 4h/24h
<i>Chlamydia trachomatis</i> + TLR3-Inhibition 4h/24h	-	<i>Chlamydia trachomatis</i> 4h/24h
<i>Chlamydia trachomatis</i> + TLR4-Inhibition 4h/24h	-	<i>Chlamydia trachomatis</i> 4h/24h
LPS-Stimulation + TLR4-Inhibitor	-	LPS-Stimulation
Poly-(I:C)-Stimulation + TLR3-Inhibition	-	Poly-(I:C)-Stimulation

Hierbei gingen aus den Vergleichen die absolute RNA-Expressionsdifferenz sowie die Signifikanz der Expressionsänderung in Form des P-Wertes und des adjustierten P-Wertes hervor.

Eine Vielzahl von Genen wurde über eine öffentliche Datenbank (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg>) bestimmten Signalwegen und zellulären Funktionen zugeordnet.

2.2.11 Statistische Analyse

Die erhobenen Daten des RNA-Arrays durchliefen eine Bearbeitung und Analyse mithilfe verschiedener Programme. Die Zuordnung der Arrays fand mithilfe einer Custom CDF Version 22 statt, die auf Gen-Definitionen von ENTREZ basiert⁵². Die RMA-Normalisierung der Fluoreszenz-Rohdaten fand durch Hintergrund-Korrektur, Quantile-Normalisierung und log₂-Transformation statt. Es folgte die Analyse mittels ANOVA (SAS JMP10 Genomics) mit einer Signifikanzgrenze bei einem α -Fehler von 0,05 mit durchgeführter FDR (false discovery rate)-Korrektur.

Neben einzelnen Daten wurden Gen-Gruppen einer statistischen Analyse unterzogen (Gene Set Enrichment Analysis), wodurch signifikante Veränderungen in der Expression gesamter Signalwege und von Genen einer Funktionseinheit dargestellt werden konnten. Hierzu wurden die folgenden Programme verwendet: „software R v3.4.0“⁵³, „Integrated development environment for R“⁵⁴ und „fgsea package“⁵⁵.

Die statistische Analyse aller weiteren Daten fand mithilfe der Software Graph Pad Prism 7.03 statt. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Zum Analysieren mehrerer Datensätze wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Tukey post-hoc Test verwendet. Bei dem Vergleich zweier Datensätze wurde der unpaired t-Test angewandt. Die Signifikanzgrenze lag stets bei $\alpha=0,05$.

3 ERGEBNISSE

Thema dieser Dissertation ist die Interaktion zwischen *Chlamydia trachomatis* Serovar D und TLR3 in humanen Epithelzellen. Der Erstkontakt zwischen *Chlamydia trachomatis* Serovar D und humanen Zellen *in vivo* findet zumeist im menschlichen Urogenitaltrakt statt. Als Modell für die dem Erreger ausgesetzte Zellschicht wurden epitheliale Krebszelllinien des humanen Urogenitaltrakts verwendet. Ziel war es, die gegenseitige Beeinflussung von Erreger und Rezeptor in der Wirtszelle zu beleuchten. Zelluläre RNA, Proteinexpression, -modulation und -lokalisation, Mediatorenausschüttung, aus Immunfluoreszenzbildern erhobene Parameter bezüglich Inklusionszahl und -größe sowie zelluläre mRNA-Expressionslevel wurden herangezogen, um Veränderungen unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen.

3.1 TLR3-Signalweg in Epithelzellen des humanen Urogenitaltrakts

3.1.1 TLR3- und TRIF-Transkription

In den folgenden Versuchen wurden mehrere Blasenkarzinom-Zelllinien und eine Zervixkarzinom-Zelllinie verwendet. Voraussetzung für eine stattfindende Interaktion zwischen *Chlamydia trachomatis* und TLR3 ist die adäquate Expression des Rezeptors seitens der Zelle. Daher bestand der erste Schritt darin, die zelluläre Transkription des Rezeptors selbst und seines intrazellulären Adapterproteins TRIF auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR in allen verwendeten Zelllinien nachzuweisen.

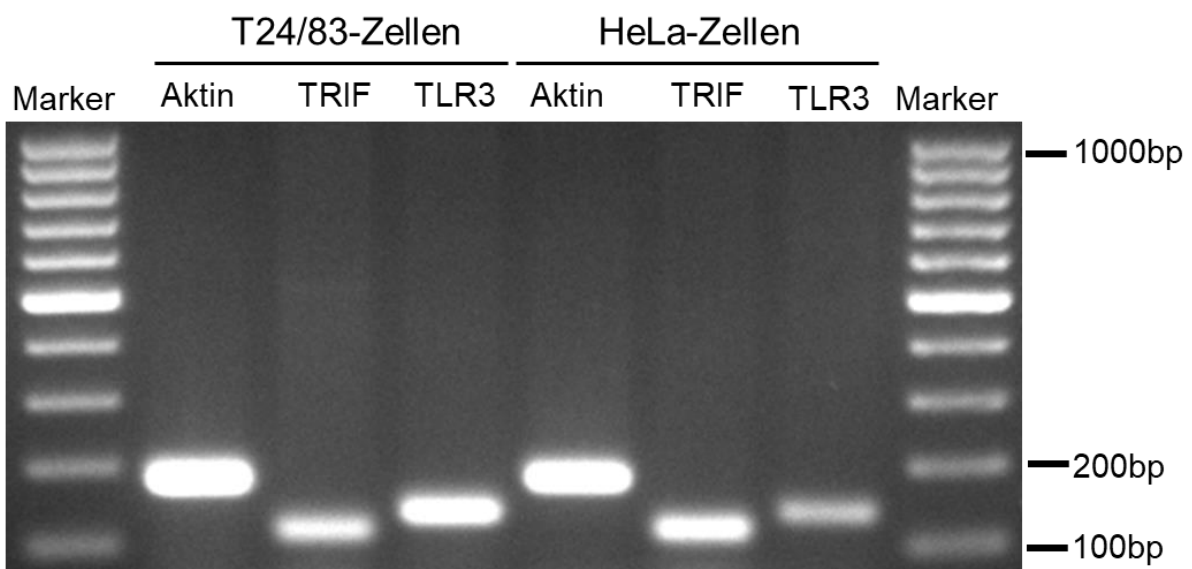


Abbildung 4: TLR3 und TRIF werden in T24/83- und HeLa-Zellen transkribiert

T24/83- und HeLa Zellen wurden kultiviert und deren RNA mittels RNA-Lyse Kit isoliert. Es folgte die Replikation mit RT-PCR sowie die Auftrennung und die Darstellung in Ethidiumbromid-Agarosegel. Die verwendeten Primer binden jeweils an Exons der entsprechenden RNA (siehe 2.1.5). Das dargestellte Bild ist repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuchsdurchführungen. Dargestellt sind TRIF bei 112 bp und TLR3 bei 137 bp. Als Ladekontrolle diente Aktin bei 181 bp.

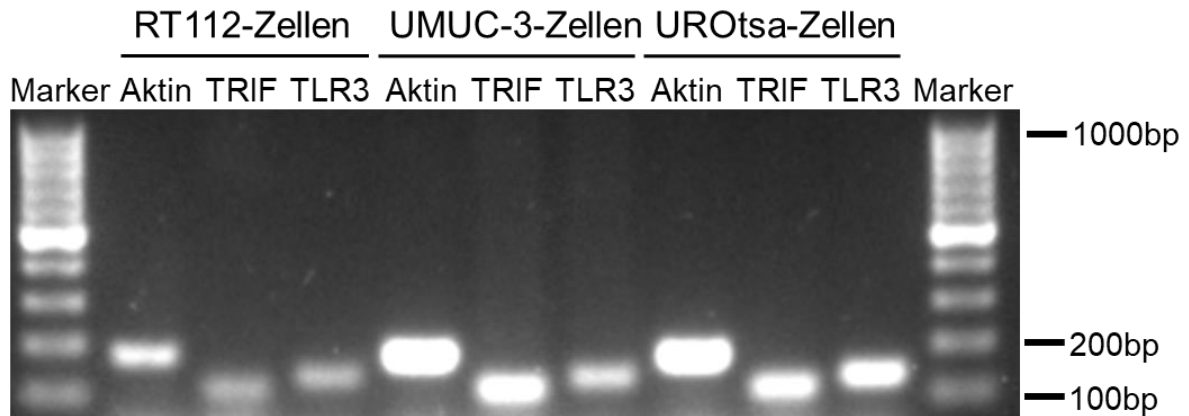


Abbildung 5: TLR3 und TRIF werden in RT112-, UMU-3- und UROtsa-Zellen transkribiert

RT112-, UMUC-3- und UROtsa-Zellen wurden kultiviert und deren RNA mittels RNA-Lyse Kit isoliert. Es folgte die Replikation mit RT-PCR sowie die Auftrennung und die Darstellung in Ethidiumbromid-Agarosegel. Die verwendeten Primer binden jeweils an Exons der entsprechenden RNA (siehe 2.1.5). Der Versuch wurde einmalig durchgeführt. Dargestellt sind TRIF bei 112 bp und TLR3 bei 137 bp. Als Ladekontrolle diente Aktin bei 181 bp.

Alle getesteten Zelllinien weisen TLR3- und TRIF-mRNA auf und bieten somit die Grundlage für eine Interaktion zwischen TLR3 und *Chlamydia trachomatis*.

3.1.2 Zytokin-Produktion

Am Ende des untersuchten TLR3-Signalweges findet die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF3 und dessen Translokation in den Zellkern statt, was die Produktion von IFN- β auslöst. Da der mRNA-Nachweis von TLR3 und TRIF weder eine Aussage über die Funktionalität der Proteine noch über die Aktivierbarkeit der nachfolgenden Signalkette erlaubt, wurden die verschiedenen Zelllinien auf die Fähigkeit, IFN- β zu produzieren, untersucht. Als Stimulus wurde Poly-(I:C), ein synthetisches, doppelsträngiges RNA-Analogon, welches eine spezifische Aktivierung des TLR3-Signalwegs induziert³⁰, verwendet.

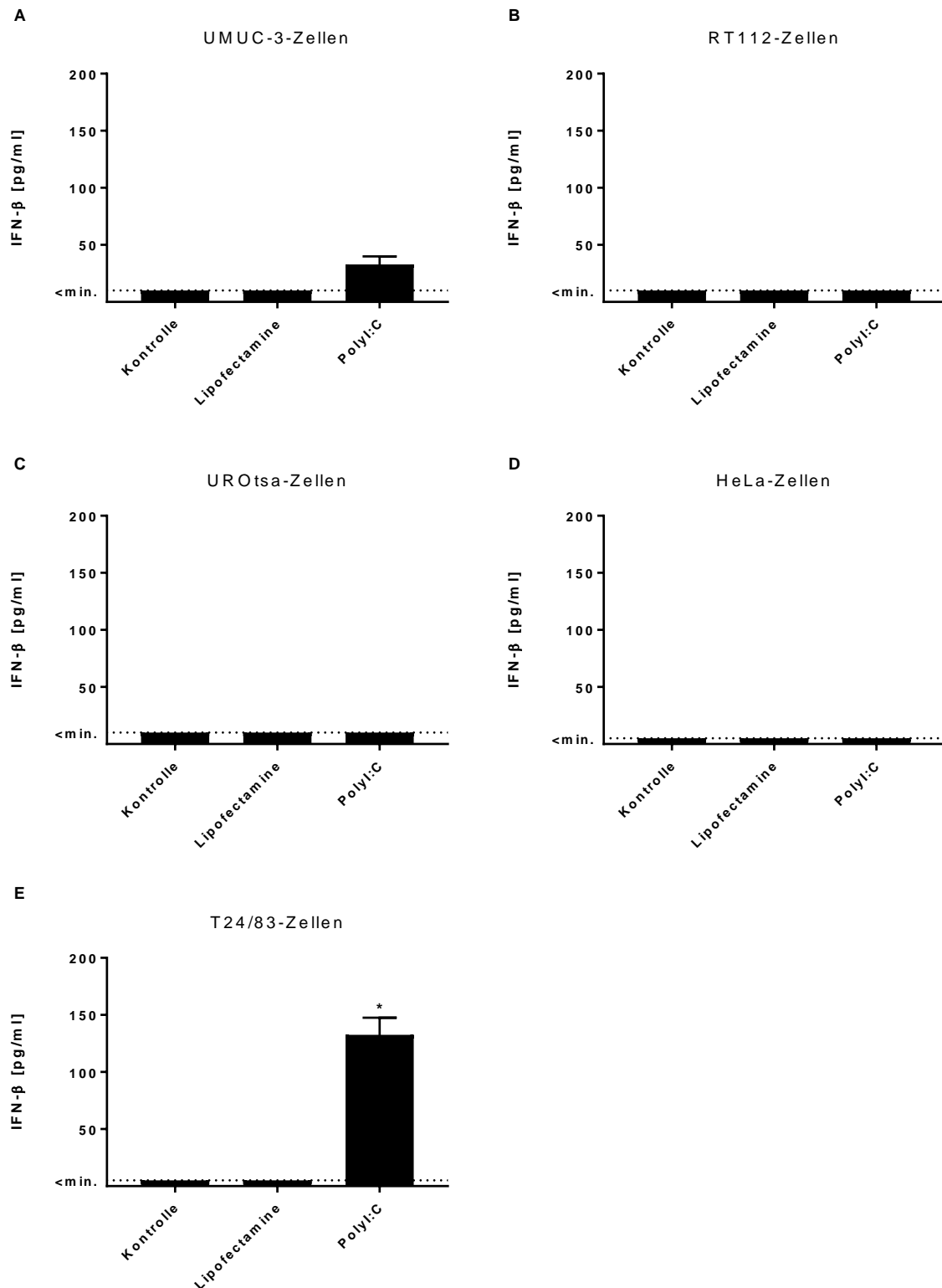


Abbildung 6: UMUC-3- und T24/83-Zellen produzieren IFN-β bei TLR3-Stimulus

UMUC-3-, RT112-, UROtsa-, HeLa- und T24/83-Zellen wurden kultiviert (60.000 Zellen / Well in einer 24-Well-Platte) und für 4 (A, B, C) bzw. 6 (D, E) h folgenden Bedingungen ausgesetzt: unbehandelt, 3 µl Lipofectamine2000 / ml Wachstumsmedium oder 3 µl Lipofectamine2000 + 5 µg Poly(I:C) / ml Wachstumsmedium. Anschließend wurde die IFN-β-Konzentration in den Überständen mittels ELISA gemessen. Für jede Bedingung wurden Triplikate angefertigt. Die Werte in A, B, C zeigen ein einmalig durchgeführtes Experiment. Die Werte in D, E zeigen repräsentativ eine von drei voneinander unabhängigen Versuchsdurchführungen. * ANOVA post-hoc-Test Tukey, $p < 0,05$

Unter den getesteten Blasenkarzinom-Zelllinien konnten lediglich T24/83- und UMUC-3-Zellen durch TLR3-Aktivierung mittels Poly-(I:C) zu einer IFN- β -Produktion stimuliert werden. Wie in Abbildung 6A zu sehen ist, fällt die IFN- β -Produktion durch UMUC-3-Zellen hierbei wesentlich geringer aus als durch T24/83-Zellen (Abbildung 6E). Die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa, in Abbildung 6D dargestellt, zeigte keine IFN- β -Ausschüttung nach Stimulation. Aufgrund der deutlich signifikanten Signalstärke erfüllte die Blasenkarzinom-Zelllinie T24/83 die geforderten Bedingungen für weitere Untersuchungen der TLR3-Signalkaskade.

So wie das Aktivieren ist auch das Blockieren einer zellulären Reaktion ein wichtiges Instrument, um die Rolle eines Signalwegs zu evaluieren. Um eine Inhibition des TLR3 bei T24/83-Zellen zu erproben, wurde in einem weiteren Experiment eine Titration mit dem Inhibitor Thiophenecarboxamido-Propionat vorgenommen. Dieser Inhibitor stellt einen kompetitiven TLR3-Antagonisten dar, der den TLR3-Rezeptor in RAW264.7-Zellen bei einer Konzentration von 27 μM spezifisch hemmt (IC₉₀)⁵⁶. Um eine adäquate Konzentration zur Hemmung des Signalwegs in T24/83-Zellen zu finden, wurden Konzentrationen von 3 bis 100 μM eingesetzt.

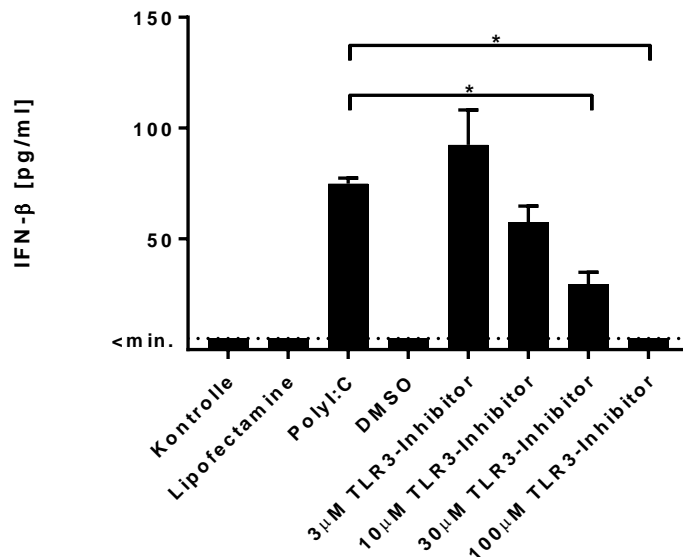


Abbildung 7: Die TLR3-Inhibition in T24/83-Zellen ist titrierbar und bei einer Konzentration von 100 μM Inhibitor maximal

T24/83-Zellen (60.000 Zellen / Well in einer 24-Well-Platte) wurden in unterschiedlichen Konzentrationen des TLR3-Inhibitors Thiophenecarboxamido-Propionat behandelt und anschließend für 4 h mit 5 μg Poly-(I:C) / ml stimuliert. Als Kontrollen diente die reine Poly-(I:C)-Stimulation und die Behandlung mit 10 μl DMSO / ml Wachstumsmedium. Die IFN- β -Konzentration in den Überständen wurde mittels ELISA gemessen. Alle Bedingungen wurden in Triplikaten angelegt. Der Versuch wurde einmalig durchgeführt. * ANOVA post-hoc-Test Tukey, $p < 0,05$.

In Abbildung 7 ist zu sehen, dass die IFN- β -Produktion in T24/83-Zellen mit steigender Inhibitor-Konzentration und gleichbleibender Poly-(I:C)-Konzentration sinkt. Eine Inhibitor-Konzentration von 30 μM zeigt bereits eine signifikante Signalreduktion. Die maximal eingesetzte Inhibitor-Konzentration von 100 μM hat eine vollständige Blockade des durch Poly-(I:C) induzierten Signals zur Folge.

Um zu evaluieren, ob es sich um einen rezeptorspezifischen Effekt handelt, wurde die Ausschüttung von IFN- β und IL-6 in TLR3- und TLR4-inhibierten sowie unbehandelten Zellen gemessen. Als Stimulantien dienten LPS und Poly-(I:C).

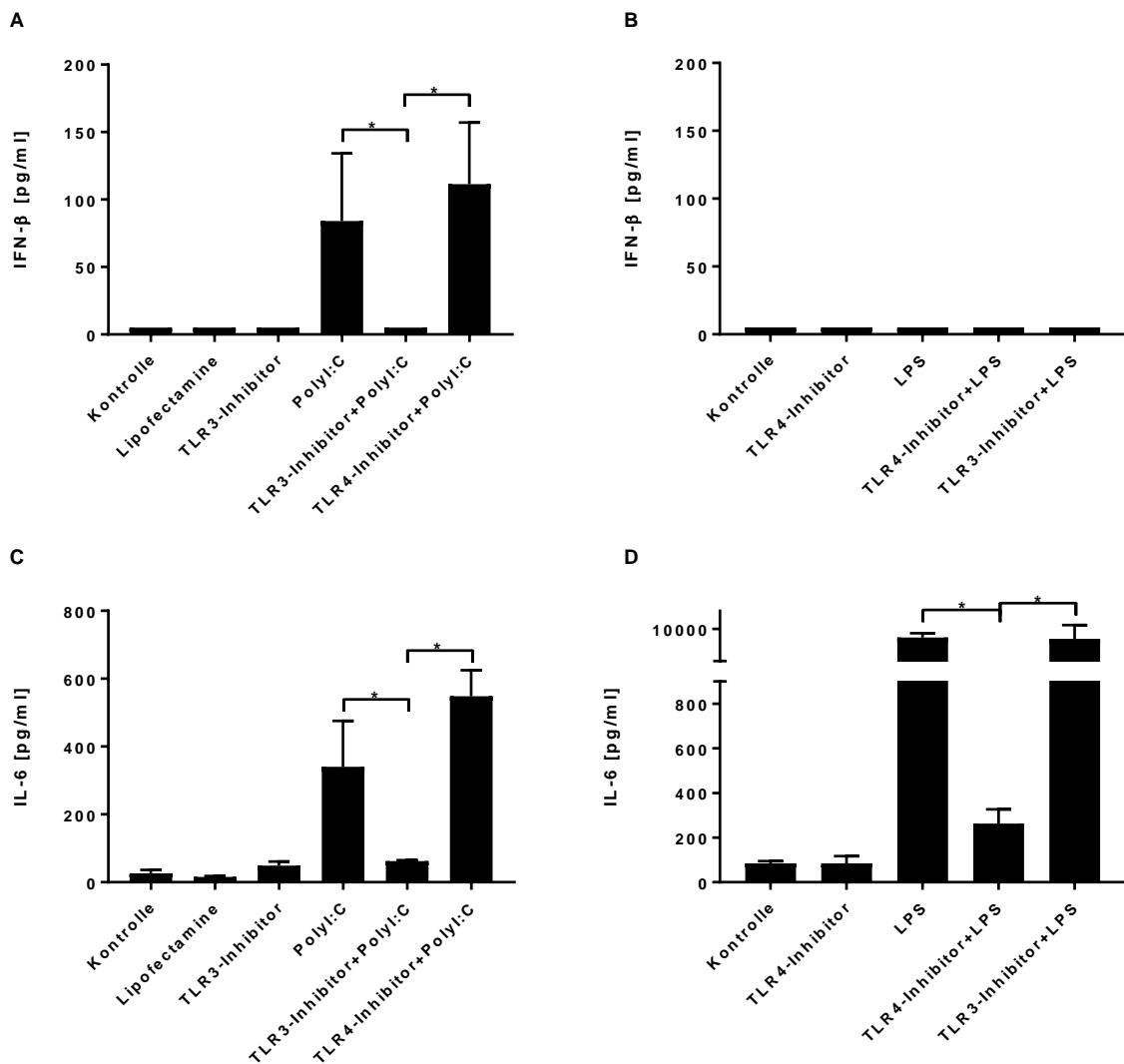


Abbildung 8: TLR3- und TLR4-Inhibitor blockieren jeweiligen Signalweg spezifisch

T24/83-Zellen (60.000 Zellen/Well in einer 24-Well-Platte) wurden mit 5 µg Poly(I:C) / ml Medium (A, C) oder 1 µg LPS / ml Medium (B, D) jeweils in Kombination mit dem TLR3-Inhibitor Thiophenecarboxamido-Propionat (100 µM) oder dem TLR4-Inhibitor TAK-242 (1 µM) behandelt. Die Kultivierungsdauer betrug, bedingt durch die Inkubationszeiten der Stimulantien, in A, C 20 h und in B, D 40 h. Aus den Überständen wurde mittels ELSIA die IFN-β- (A, B) und IL-6-Konzentration (C, D) bestimmt. Für jede Bedingung wurden Triplikate angefertigt. Der Versuch wurde einmalig durchgeführt. * ANOVA, post-hoc-Test Tukey, $p < 0,05$.

Die Produktion von IFN-β und IL-6 durch T24/83-Zellen ist in Abbildung 8 dargestellt. Abbildung 8A und B zeigen, dass weder das Kultivieren der Kontrollgruppe, noch das Stimulieren der Zellen mit LPS eine messbare IFN-β-Ausschüttung zur Folge haben. Einzig eine Poly-(I:C)-Transfektion erzeugt eine signifikante IFN-β-Produktion, welche sich mit dem TLR3-Inhibitor, nicht aber mit dem TLR4-Inhibitor blockieren lässt. Somit scheint die IFN-β-Produktion eine TLR3-spezifische Zytokin-Antwort zu sein.

Abbildung 8C und 8D zeigen die IL-6-Produktion der T24/83-Zellen. In kultivierten Zellen ist ein Grundausschüttungsniveau an IL-6 festzustellen. Poly-(I:C) verstärkt diese Ausschüttung signifikant. Durch den Einsatz des TLR3-Inhibitors wird diese wiederum nahezu auf das Ausgangsniveau gesenkt. Noch potenter als Poly-(I:C) wirkt LPS, dies steigert die IL-6-Ausschüttung der Zellen auf etwa das 100-fache. Auch hier bewirkt der dazugehörige Inhibitor, in diesem Fall der TLR4-Inhibitor, eine

signifikante Aufhebung der IL-6-Ausschüttung, während der TLR3-Inhibitor keinen Einfluss nimmt.

Die beiden Substanzen LPS und Poly-(I:C) stellen potente Stimulantien für den IL-6-Signalweg dar. Die Inhibitoren unterbinden diese Stimulation spezifisch.

Insgesamt ist festzustellen, dass die Behandlung mit TLR3- und TLR4-Inhibitor das Ausschüttungsniveau keines der gemessenen Zytokine ohne die Zugabe von Stimulantien beeinflusst.

Insgesamt demonstrieren die Ergebnisse in Abbildung 8 eine Hemmung des TLR3- und TLR4-Signalwegs durch den jeweiligen Inhibitor. Eine Beeinträchtigung des jeweils anderen Signalwegs ist nicht zu sehen. Diese Ergebnisse bekräftigten die Annahme der spezifischen Wirkung der Inhibitoren. Die mit TLR3-Inhibitor behandelten Zellen bleiben reaktionsfähig für andere TLR-Signalwege und lediglich die TLR3-spezifischen Signalwege werden unterbrochen.

3.1.3 TLR3- und TRIF-Lokalisation

TLR3 liegt intrazellulär, meist in der Membran früher Endosomen, und bindet dort fremdes Erbmaterial ²⁸. Neben der Dimerisierung von TLR3 ²⁹ ist das Rekrutieren des Adapterproteins TRIF ein wichtiger Schritt bei der Einleitung einer zellulären Reaktion auf einen TLR3-spezifischen Stimulus ²⁸. Um diese Anfangsschritte der Signalwegaktivierung darzustellen, wurden T24/83- und HeLa-Zellen verwendet.

Mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen wurde das intrazelluläre Verteilungsmuster von TLR3 und TRIF in kultivierten Zellen sowie während der Infektion mit *Chlamydia trachomatis* untersucht. Um das Erreichen intrazellulärer Strukturen zu gewährleisten, erfolgte die Färbung unter Permeabilisierung mit Saponin.

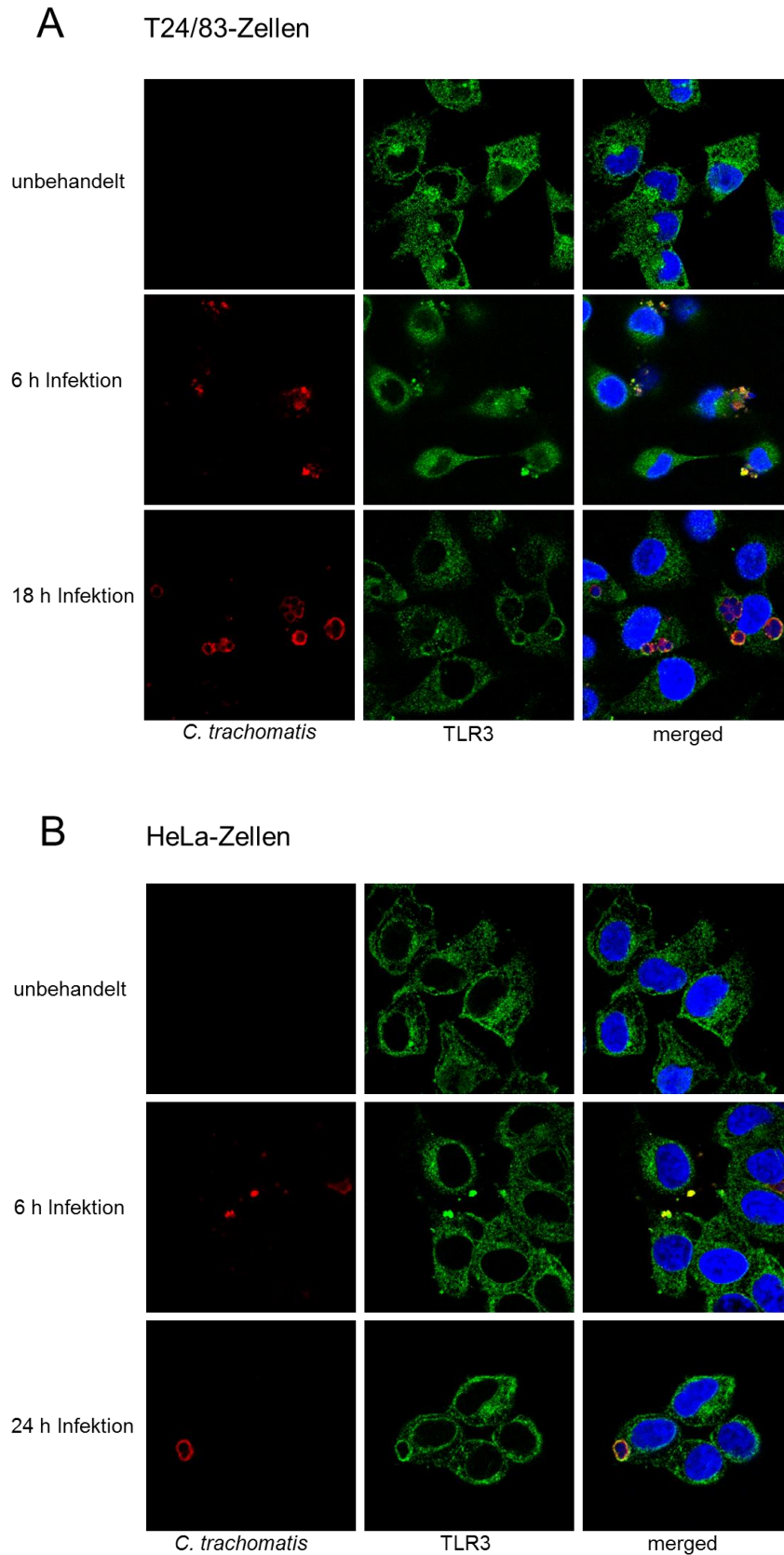


Abbildung 9: TLR3 wird zu *Chlamydia trachomatis* Inklusionen rekrutiert
T24/83- (A) und HeLa-Zellen (B) wurden kultiviert (75.000 Zellen/Well in einer 24-Well-Platte), mit *Chlamydia trachomatis* Serovar D infiziert (MOI 1,5) und nach 6, 18 und 24 h fixiert. Es folgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-Chlamydia ACI-P (rot), Anti-TLR3 (ab62566) (grün) und DAPI (blau). Dargestellt sind konfokale Bilder (Leica SP5 Mikroskop), repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuchsdurchführungen. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Simone Albrecht.

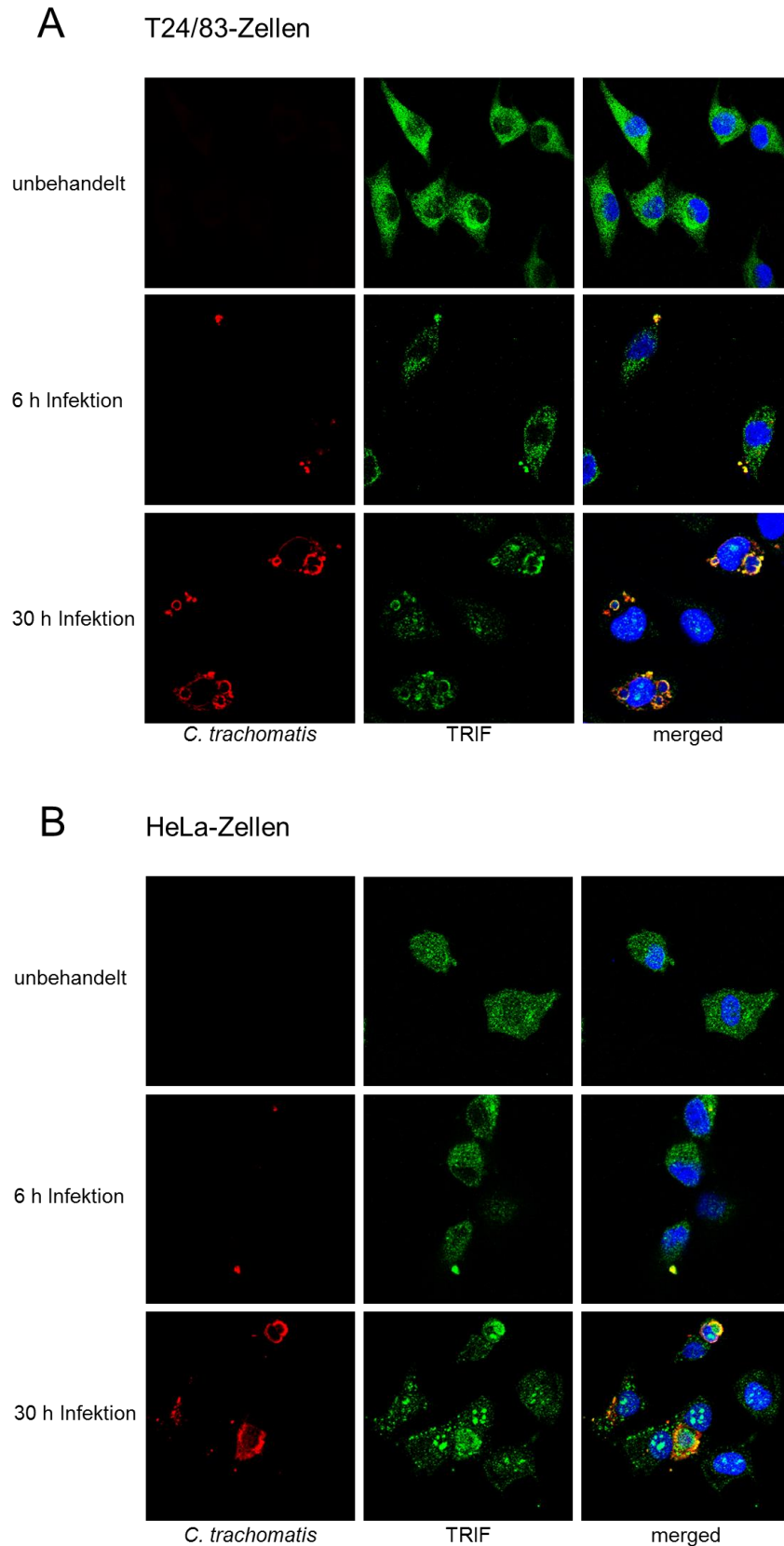


Abbildung 10: TRIF wird zu *Chlamydia trachomatis* Inklusionen rekrutiert
 Versuchsdurchführung siehe Abbildung 9. Fixierung der Zellen nach 6- und 30-stündiger Infektion. Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-Chlamydia ACI-P (rot), Anti-TRIF (grün) und DAPI (blau). Dargestellt sind konfokale Bilder (Leica SP5 Mikroskop), repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuchsdurchführungen. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Simone Albrecht.

TLR3 und TRIF liegen in beiden Zelllinien im uninfizierten Zustand intrazellulär verteilt vor (Abbildung 9 und Abbildung 10). Im Fall von TLR3 in T24/83-Zellen zeigt sich zusätzlich eine paranukleäre Verdichtung (Abbildung 9A), was durch eine Anlagerung an das microtubule organizing center (MTOC) zu erklären ist⁵⁸. Werden die Zellen infiziert, erscheint in HeLa- und T24/83-Zellen bereits in einem frühen Stadium der Infektion, 6 h *post infectionem*, das Bild einer Kolo-kalisation von *Chlamydia trachomatis* Inklusionen und TLR3 (Abbildung 9).

Auch im weiteren Verlauf, Abbildung 9A: 18 h und 9B: 24 h *post infectionem*, ist eine Verdichtung des Rezeptors an den Rändern der Inklusionen sichtbar.

Für das Adapterprotein TRIF findet ebenfalls in beiden Zelllinien sowohl zu frühen als auch zu späteren Infektionszeitpunkten eine Rekrutierung zu den Inklusionen statt (Abbildung 10).

Darüber hinaus ist zu bemerken, dass sich die kleinen Inklusionen zu Beginn der Infektion in peripheren Bereichen der infizierten Zellen befinden. Bei fortschreitender Infektion sind eine deutliche Größenzunahme der Inklusionen sowie eine Lokalisationsänderung in Richtung Zellkern zu erkennen. Letzteres konnte in der Vergangenheit auch für den Infektionsverlauf anderer *Chlamydia trachomatis* Serotypen gezeigt werden⁵⁸.

Somit lässt sich eine Distributionsänderung von TLR3 und TRIF bei einer Infektion im Sinne einer Rekrutierung zu *Chlamydia trachomatis* Inklusionen feststellen.

3.1.4 IRF3- und TBK1-Expression und -Aktivierung

In der TLR3-Signalkaskade kommt es nach einer TLR3-Aktivierung und TRIF-Rekrutierung im weiteren Verlauf zu einer Phosphorylierung von TBK1 und IRF3³¹. Daher wurden diese beiden Proteine herangezogen, um zu untersuchen, inwieweit sich die Rekrutierung von TLR3 und TRIF zu *Chlamydia trachomatis* Inklusionen auf den folgenden Signalweg auswirkt. Dies geschah mit fraktionierten Zelllysaten beider Zelllinien, T24/83 und HeLa. Mittels Western Blot wurde die Expression beider Proteine sowie die Phosphorylierung von IRF3 dargestellt. Hierbei wurden die Proteine des Zytosols und des Zellkerns getrennt voneinander betrachtet. Als Negativkontrolle der TLR3-Signalwegaktivierung dienten unbehandelte Zellen, als Positivkontrolle fand eine Poly-(I:C)-Stimulation statt.

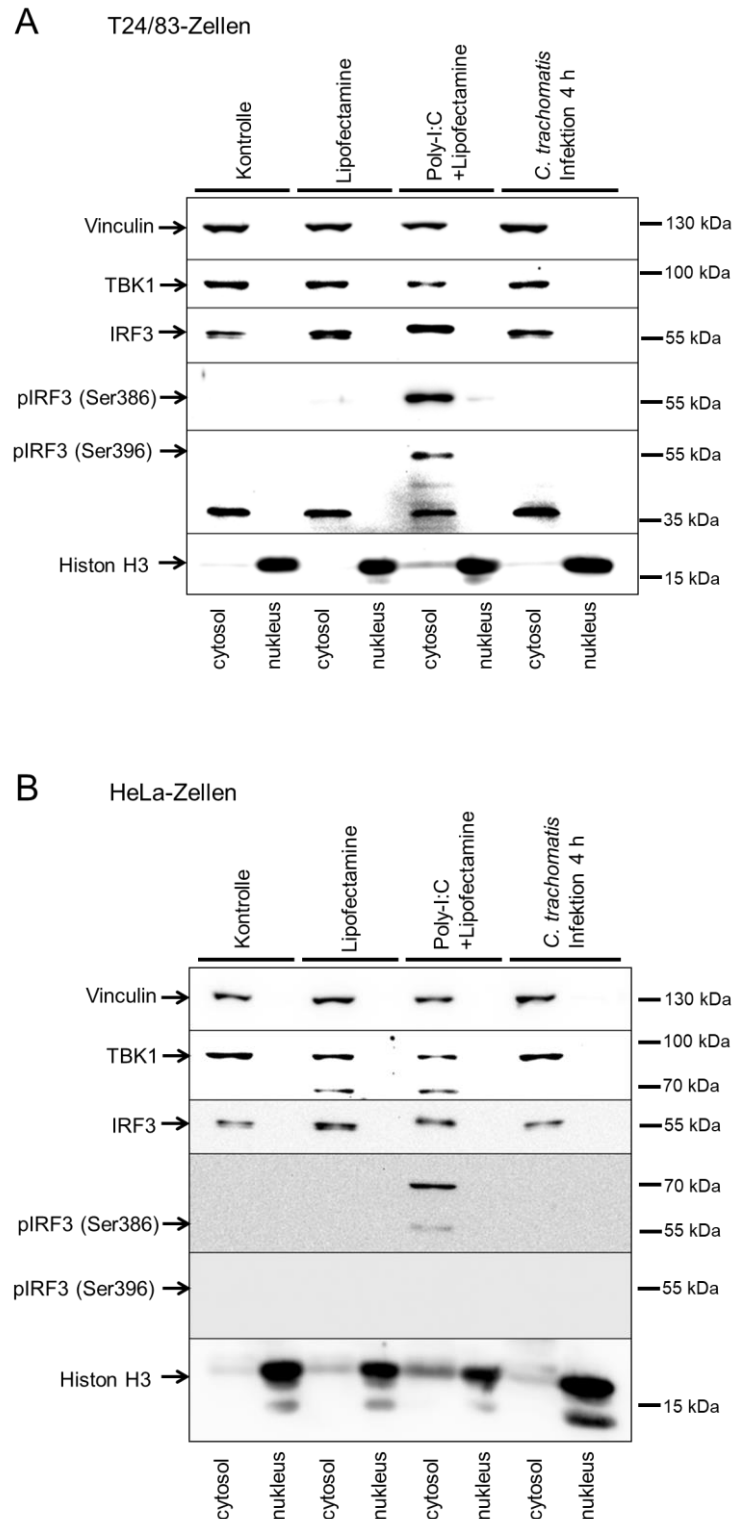


Abbildung 11: *Chlamydia trachomatis* führt zu keiner IRF3-Phosphorylierung

T24/83- (A) und HeLa-Zellen (B) (450.000 Zellen / Well in einer 6-Well-Platte) wurden kultiviert, mit Lipofectamine 2000 behandelt, mit Poly(I:C) und Lipofectamine 2000 behandelt oder über 4 h mit *Chlamydia trachomatis* infiziert (MOI 2). Es folgte eine fraktionierte Zelllyse mit Nonidet- und Laemmli-Puffer und die Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE. Folgende Antikörper wurden verwendet: Anti-IRF3, Anti-pIRF3(Ser386) sowie Anti-pIRF3(Ser396), welche bei einer Molekülmasse von 55 kDa liegen, und Anti-TBK1, mit einer Molekülmasse von 80 kDa. Als Ladekontrolle diente für die zytosolische Fraktion Anti-Vinculin mit einer Molekülgröße von 124 kDa und für die Nukleusfraktion Anti-Histon H3 mit einer Molekülgröße von 17 kDa. Es fand eine unabhängige Wiederholung des Versuchs statt, das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für beide Durchführungen.

Die Ladekontrollen zeigen, dass die Auftrennung von Zytosol und Nukleus durch eine fraktionierte Zelllyse erfolgreich war.

Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen sowie mit reinem Lipofectamine transfizierte Zellen. Außerdem wurden mit Poly-(I:C) transfizierte Zellen und mit *Chlamydia trachomatis* infizierte Zellen untersucht. Abbildung 11A zeigt, dass sowohl TBK1 als auch IRF3 in allen Bedingungen in T24/83-Zellen im Zytosol vorliegen. Die Phosphorylierung von IRF3, welche an mehreren Stellen des Proteins stattfinden kann, wurde an zwei Serin-Resten überprüft. Beide, Ser386 und Ser396, wiesen unter Poly-(I:C)-Stimulation eine Phosphorylierung auf. Eine Translokation von pIRF3 in den Nukleus konnte nicht gezeigt werden. Die vorliegenden Banden im pIRF3 (Ser396)-Blot bei etwa 35 kDa tauchen in allen Bedingungen auf und wurden daher als Artefakt gewertet. Eine Infektion mit *Chlamydia trachomatis* Serovar D bewirkt bei T24/83-Zellen unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Phosphorylierung von IRF3.

Auch HeLa-Zellen besitzen, wie aus Abbildung 11B ersichtlich, in ihrer zytosolischen Fraktion TBK1 und IRF3 in allen getesteten Bedingungen. Die zusätzlichen Banden unter TBK1 bei etwa 70 kDa erscheinen sowohl in der Lipofectamine-Kontrolle als auch nach Poly-(I:C)-Transfektion, sodass dies als Artefakt, möglicherweise ausgelöst durch die Transfektion, gewertet wurde. Nach Poly-(I:C)-Transfektion ist in HeLa-Zellen ein schwaches pIRF3 (Ser386)-Signal bei 55 kDa zu erkennen. Die darüberliegende Bande bei etwa 70 kDa stellt am ehesten eine unspezifische Hintergrundbande dar. pIRF3 (Ser396) erscheint in keiner der vorliegenden Bedingungen. Eine inkomplette Phosphorylierung von IRF3 unter Poly-(I:C)-Stimulation deckt sich mit den Ergebnissen einer fehlenden IFN- β -Produktion (Abbildung 6B). Eine pIRF3-Translokation konnte dementsprechend nicht nachgewiesen werden.

In T24/83-Zellen konnte eine Aktivierung der TLR3-Signalkaskade nach Poly-(I:C)-Stimulation gezeigt werden (Abbildung 11A), bei HeLa Zellen war eine Aktivierung durch Poly-(I:C) hingegen nicht möglich (Abbildung 11B). Eine Aktivierung der Signalkette durch eine Infektion mit *Chlamydia trachomatis* konnte bei keiner der beiden Zelllinien festgestellt werden.

3.1.5 Zytokinausstoß nach Infektion

Eine Stimulation mit Poly-(I:C) führt zu einer Zytokinausschüttung bei T24/83-Zellen, das konnte bereits in Abbildung 6A gezeigt werden. Um zu überprüfen, ob die fehlende Phosphorylierung von IRF3 nach der Infektion mit *Chlamydia trachomatis* in Abbildung 11 mit einer Inaktivität der Signalkette gleichzusetzen ist, wurde die IFN- β -Produktion nach Infektion gemessen.

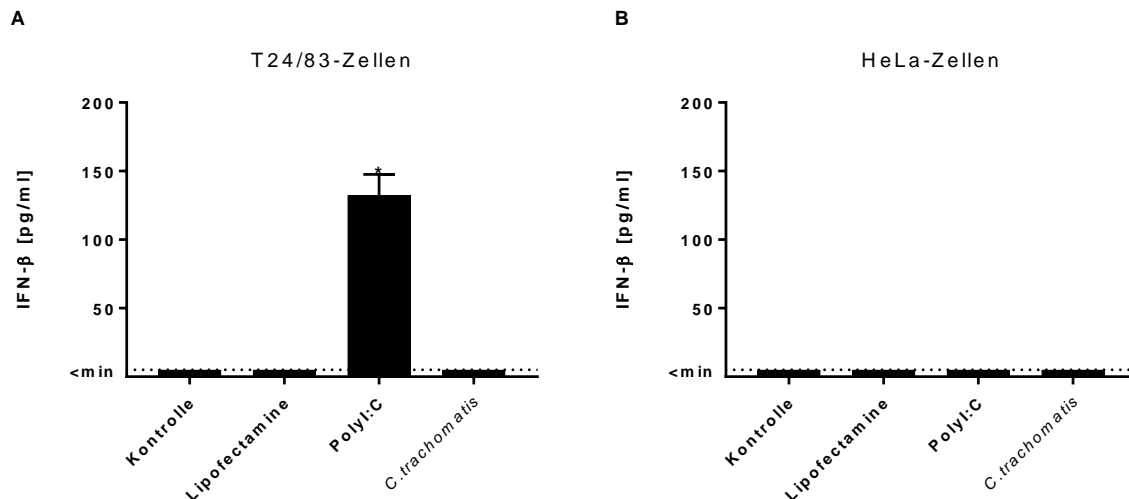


Abbildung 12: *Chlamydia trachomatis* Infektion führt zu keiner IFN- β -Produktion

T24/83- (A) und HeLa-Zellen (B) (60.000 Zellen / Well in einer 24-Well-Platte) wurden unter den selben Bedingungen wie in Abbildung 6 (D, E) kultiviert. Darüber hinaus fand eine 24-stündige Infektion mit *Chlamydia trachomatis* (MOI 5) statt. Die IFN- β -Konzentrationen der Überstände wurden mittels ELISA ermittelt. Jede Bedingung wurde in Triplikaten angefertigt. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuchsdurchführungen. * ANOVA post-hoc-Test Tukey, $p < 0,05$.

T24/83-Zellen produzierten IFN- β nach Poly-(I:C)-Stimulation, jedoch nicht nach *Chlamydia trachomatis* Infektion. HeLa Zellen schütteten weder nach *Chlamydia trachomatis* Infektion, noch nach Poly-(I:C)-Stimulation IFN- β aus (Abbildung 12).

Pathogene Erreger sind neben der Aktivierung von Signalwegen ebenfalls in der Lage, Abwehrreaktionen der Wirtszelle zu unterbinden⁴¹. Um eine Beeinflussung der Funktion des TLR3-Signalwegs und eine daraus resultierende Behinderung der Signalwegaktivierung durch *Chlamydia trachomatis* auszuschließen, erfolgte eine Kombination aus TLR3-Stimulation und Chlamydien-Infektion.

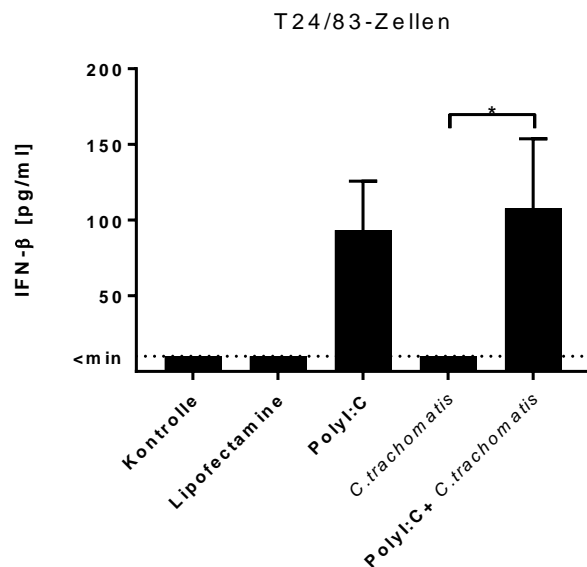


Abbildung 13: *Chlamydia trachomatis* inhibiert nicht die TLR3-bedingte IFN- β -Freisetzung

Versuchsaufbau siehe Abbildung 12. Ergänzend wurde eine Kombination aus Poly-(I:C)-Stimulation und Infektion durchgeführt. Die Werte sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuchsdurchführungen. * ANOVA post-hoc-Test Tukey, $p < 0,05$.

Eine Infektion mit *Chlamydia trachomatis* führt weder zu einer Produktion von IFN- β , noch unterdrückt sie diese im Fall einer künstlich herbeigeführten TLR3-Signalwegaktivierung durch Poly-(I:C) (Abbildung 13).

3.2 TLR3-abhängige Entwicklung von *Chlamydia trachomatis*

Die bisher gezeigten Versuche haben sich ausschließlich auf die Untersuchung der Abläufe in der Wirtszelle beschränkt. Hier konnte keine Beeinflussung der bekannten TLR3-Signalkaskade durch *Chlamydia trachomatis* Serovar D gezeigt werden. Die Folgen einer möglichen Interaktion können allerdings auch auf Seiten des Erregers zum Tragen kommen. Um Erkenntnisse über die Einflussnahme von TLR3 auf die Entwicklung von *Chlamydia trachomatis* und den Infektionsverlauf im Allgemeinen zu erlangen, wurde in den folgenden Versuchen mit der Hemmung des Rezeptors mittels Thiophenecarboxamido-Propionat gearbeitet. Die Methode der Immunfluoreszenzmikroskopie und die hieraus entstandenen Bilder ermöglichten die statistische Auswertung der Inklusionszahl pro Zelle und der Inklusionsgrößen sowie die Beurteilung der Morphologie der Inklusionsinhalte.

3.2.1 Chlamydiales Wachstum unter TLR3-Inhibition

Nach dem Eindringen eines EBs in die Wirtszelle bildet sich eine Inklusion, in welcher die Umwandlung vom EB zum RB stattfindet. Daraufhin beginnt das RB mit seiner binären Teilung, sodass die Inklusion wächst, während sie sich mehr und mehr mit RBs füllt². Vor diesem Hintergrund wurde die Größe der *Chlamydia trachomatis* Inklusionen als geeigneter Parameter erachtet, um ihre Entwicklung zu beurteilen. Im folgenden Versuch wurden T24/83-Zellen infiziert, eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt und die Fläche der auf den Aufnahmen

vorhandenen Inklusionen gemessen. Zur Darstellung TLR3-abhängiger Veränderungen wurde eine Titration des TLR3-Inhibitors in drei Abstufungen vorgenommen.

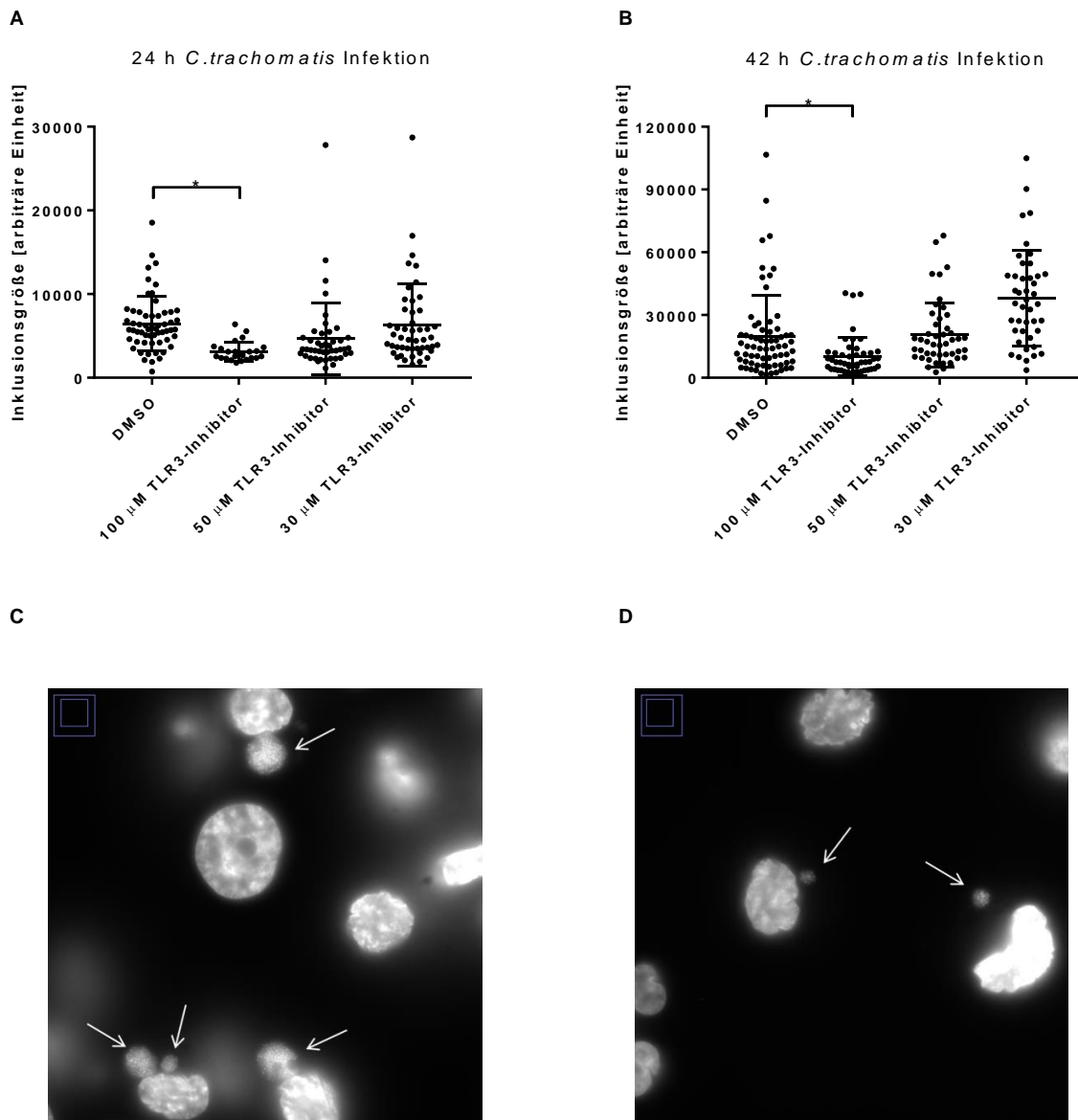


Abbildung 14: TLR3-Inhibition beeinflusst Inklusionsgröße von *Chlamydia trachomatis* Serovar D T24/83-Zellen (150.000 Zellen / Well auf Glasplättchen in einer 24-Well-Platte) wurden mit 10 μ l DMSO / ml Medium oder TLR3-Inhibitor in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt und anschließend für 24 (A) und 42 (B) h mit *Chlamydia trachomatis* infiziert (MOI 1,5). Die Zellen wurden fixiert, mit Anti-TLR3 (ab62566), Anti-Chlamydia ACI-P und DAPI gefärbt und fotografiert (Mikroskop DMRB Leica, Kamera Olympus CK2). Beispielhaft sind *C. trachomatis* Inklusionen in der DAPI Färbung nach 24 h Infektion unter DMSO-Behandlung (C) und 100 μ M TLR3-Inhibitor-Behandlung (D) mit Pfeilen markiert. Jede Bedingung wurde in Triplikaten ausgeführt. Einmalig durchgeführtes Experiment. Die Auswertung der Inklusionsgrößen fand mit Fiji statt. * ANOVA post-hoc-Test Tukey, $p < 0,05$.

Der TLR3-Inhibitor wurde in DMSO gelöst, daher stellte eine DMSO-Behandlung die Kontrolle dar. Abbildung 14 zeigt, dass die Inhibition von TLR3 in Wirtszellen das Wachstum der intrazellulären Inklusionen von *Chlamydia trachomatis* beeinflusst. Sowohl nach 24 h (Abbildung 14A) als auch nach 42 h (Abbildung 14B) Infektionsdauer war die Größe der *Chlamydia trachomatis* Inklusionen unter Behandlung mit 100 µM TLR3-Inhibitor signifikant reduziert.

Wie in 3.1.2 Zytokin-Produktion gezeigt wurde, ist der Effekt des TLR3-Inhibitors auf die Signalkaskadenaktivierung titrierbar. In Abbildung 14 lässt sich ebenfalls ein konzentrationsabhängiger Effekt des TLR3-Inhibitors auf das Inklusionswachstum feststellen, jedoch ohne statistische Signifikanz.

3.2.2 Chlamydialer Replikationszyklus unter TLR3-Inhibition

Der Replikationszyklus von *Chlamydia trachomatis* endet mit der Rückbildung der vervielfältigten RBs zu infektiösen EBs, diese ist nach 48 h größtenteils abgeschlossen ¹¹. Nach dieser Zeitspanne kann ein neuer Infektionszyklus beginnen. Um die erfolgreiche Vermehrung von *Chlamydia trachomatis* in unseren Versuchen zu verifizieren, wurden Zellen infiziert (1. Generation) und nach einer 48-, 72- oder 96-stündigen Infektion mit Glas-Beads aufgebrochen. Die im Überstand befindlichen Inklusionsinhalte wurden auf frische Zellen gegeben, sodass eine Infektion durch die gebildeten *Chlamydia trachomatis* Nachkommen (2. Generation) stattfinden konnte. Sowohl die Zellen der ersten Infektion (1. Generation *C. trachomatis*) als auch die Zellen der Nachkommeninfektion (2. Generation *C. trachomatis*) wurden durchgehend mit DMSO bzw. TLR3-Inhibitor behandelt.

In erster und zweiter *C. trachomatis*-Generation erfolgte das Fixieren und Färben der infizierten Zellen. Abbildung 15 zeigt eine repräsentative Auswahl der aufgenommenen Bilder der Immunfluoreszenzmikroskopie.

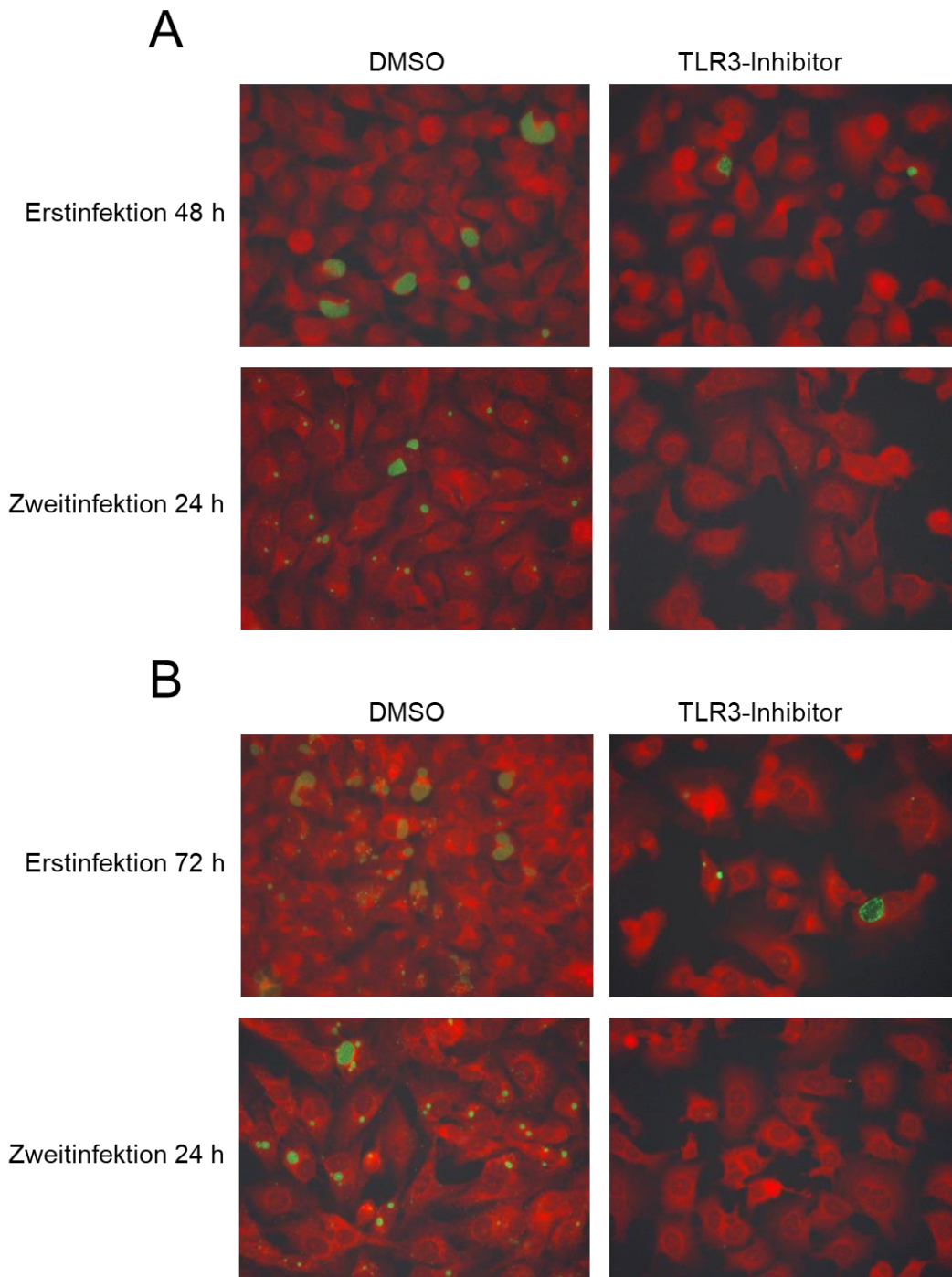


Abbildung 15A und B: Die Entwicklung von *Chlamydia trachomatis* in erster und zweiter Generation unter TLR3-Inhibition

T24/83-Zellen (60.000 Zellen / Well auf Glasplättchen in einer 24-Well-Platte) wurden mit 100 μ M TLR3-Inhibitor oder 10 μ l DMSO / ml Medium vorbehandelt, mit *Chlamydia trachomatis* Serovare D (MOI 0,1) infiziert und für 24/72/96 h (A/B/C) inkubiert. Ein Teil dieser Zellen wurde anschließend mit ACI-FITC gefärbt und fotografiert (Erstinfektion). Der andere Teil der Zellen wurde mit Glas-Beads aufgebrochen, der infektiöse Überstand auf ebenso mit TLR3-Inhibitor bzw. DMSO vorbehandelte Zellen transferiert und 24 h inkubiert. Es folgte abermals eine Färbung mit ACI-FITC und das Fotografieren der Zellen (Zweitinfektion). Mikroskop Leica DM2000/2500, Kamera Leica DFC420. Die dargestellten Bilder sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuchsdurchführungen jeweils in Triplikaten. In den Bildern sind in rot die mit Evans Blau angefärbten Zellen zu sehen, in grün stellen sich *Chlamydia trachomatis* Inklusionen dar.

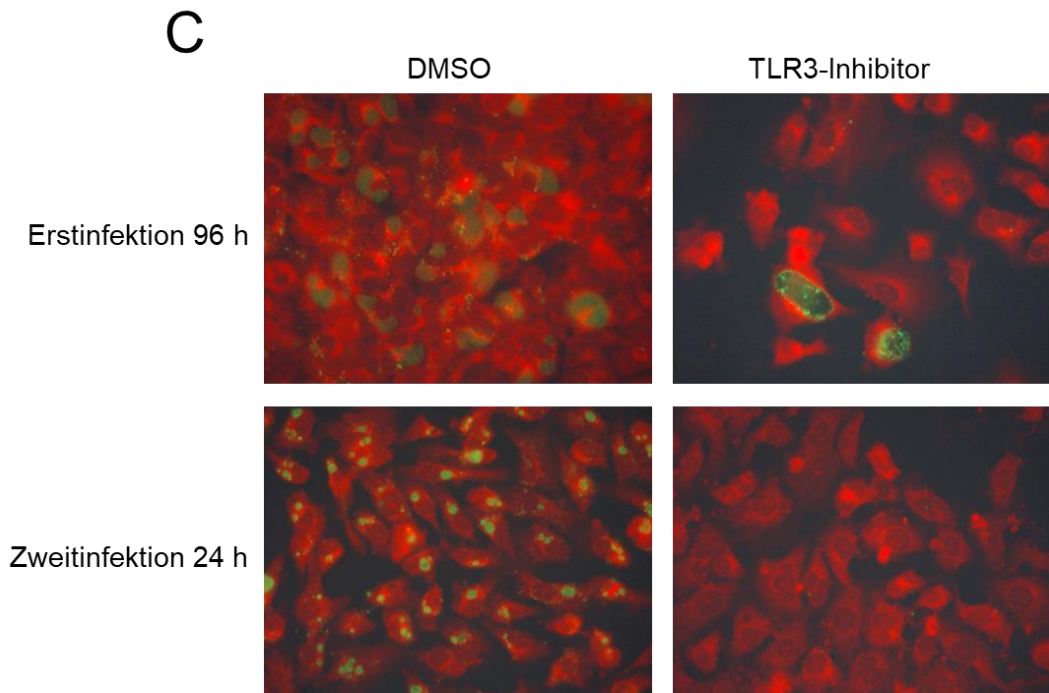


Abbildung 15C: Die Entwicklung von *Chlamydia trachomatis* in erster und zweiter Generation unter TLR3-Inhibition

T24/83-Zellen (60.000 Zellen / Well auf Glasplättchen in einer 24-Well-Platte) wurden mit 100 μ M TLR3-Inhibitor oder 10 μ l DMSO / ml Medium vorbehandelt, mit *Chlamydia trachomatis* Serovare D (MOI 0,1) infiziert und für 96 h (A/B/C) inkubiert. Ein Teil dieser Zellen wurde anschließend mit ACI-FITC gefärbt und fotografiert (Erstinfektion). Der andere Teil der Zellen wurde mit Glas-Beads aufgebrochen, der infektiöse Überstand auf ebenso mit TLR3-Inhibitor bzw. DMSO vorbehandelte Zellen transferiert und 24 h inkubiert. Es folgte abermals eine Färbung mit ACI-FITC und das Fotografieren der Zellen (Zweitinfektion). Mikroskop Leica DM2000/2500, Kamera Leica DFC420. Die dargestellten Bilder sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuchsdurchführungen jeweils in Triplikaten. In den Bildern sind in rot die mit Evans Blau angefärbten Zellen zu sehen, in grün stellen sich *Chlamydia trachomatis* Inklusionen dar.

Die Infektionsrate der Erstinfektion, entsprechend der durchschnittlichen Inklusionsanzahl pro Zelle, diente als Kontrolle für eine erfolgreiche Infektion. Aus Abbildung 16 geht hervor, dass eine Infektion mit einer MOI von 0,1 in beiden Bedingungen nach 48 h eine ähnliche mittlere Infektionsrate, nämlich 0,16 unter DMSO-Behandlung bzw. 0,18 unter TLR3-Inhibition, aufweist.

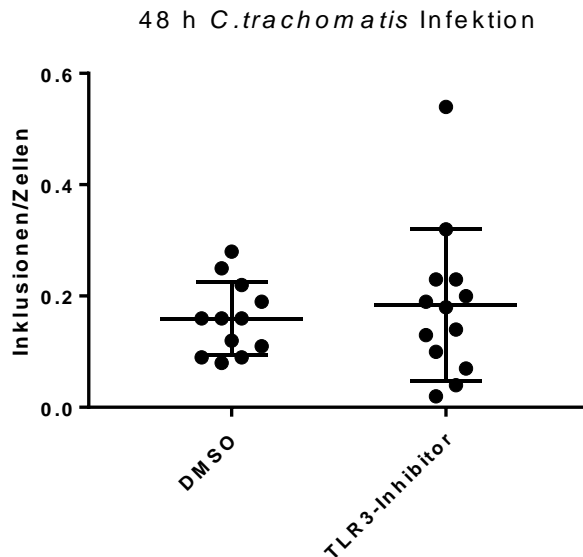


Abbildung 16: TLR3-Inhibition beeinflusst nicht die Infektionsrate durch *Chlamydia trachomatis*
 Versuch siehe Abbildung 15, die Auswertung aller Bilder fand mittels Fiji statt. Zusammenfassung der Infektionsrate (Inklusionen pro Zellen) aus drei unabhängigen Versuchsdurchführungen. * unpaired t-Test, $p < 0,05$.

Um die Größenunterschiede aus Abbildung 14 zu reproduzieren und das Wachstum über einen längeren Zeitraum zu verfolgen, wurden die Inklusionsgrößen der 1. Generation *C. trachomatis* nach 48, 72 und 96 h gemessen (Abbildung 15A, B und C). 48 h *post infectionem* zeigt sich eine signifikante Verkleinerung der Inklusionen in TLR3-inhibierten Zellen. Nach einer Infektionsdauer von 72 h konnte eine Größenabnahme der Inklusionen bei einer Versuchswiederholung nicht bestätigt werden. Bei 96 h Infektionszeit bleibt eine Größenänderung aus.

Auch die Inklusionen der 2. Generation *C. trachomatis* wurden untersucht und auf dieselbe Weise ausgewertet, wobei die Infektionsdauer dieser Generation einheitlich bei 24 h lag (Abbildung 17B). Hier zeigen sich abhängig von der Dauer der Erstinfektion steigende Inklusionsgrößen in den mit DMSO-behandelten Zellen. Dieser Effekt ist bei TLR3-inhibierten Zellen nicht zu erkennen. Verglichen mit den DMSO-Kontrollen sind die Inklusionen der 2. Generation *C. trachomatis* in Zellen mit blockiertem TLR3-Signalweg stets signifikant kleiner.

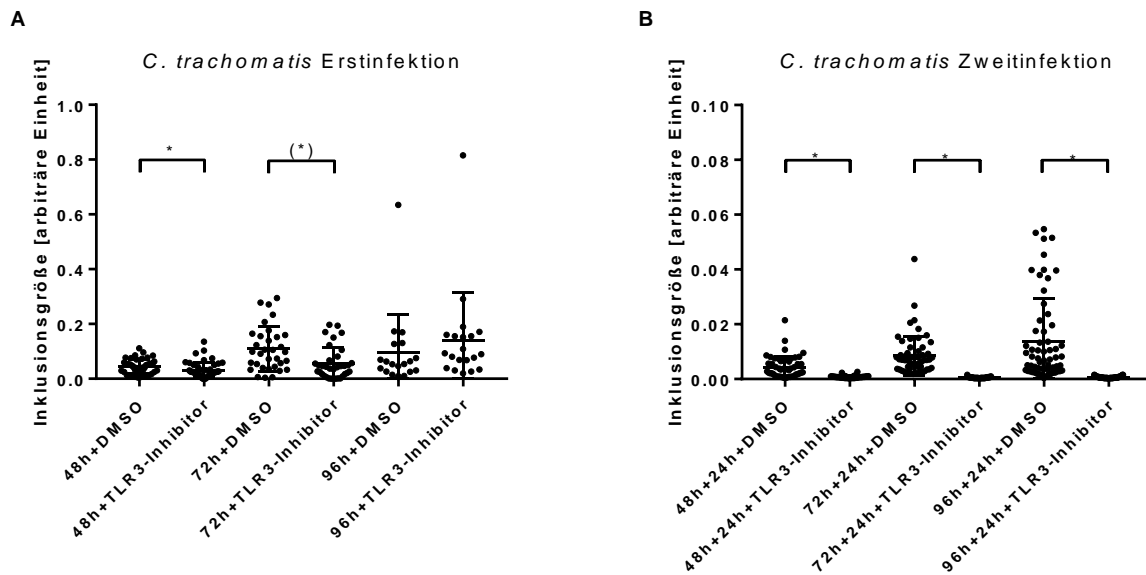


Abbildung 17: TLR3-Inhibition hemmt das Wachstum von *C. trachomatis* in erster und zweiter Generation
 Versuch siehe Abbildung 15, die Auswertung aller Bilder fand mittels Fiji statt. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für zwei (A) respektive drei (B) unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. * unpaired t-Test, $p < 0,05$. (*) Signifikanz lediglich in einer der beiden Versuchsdurchführungen gegeben.

In der 1. Generation *C. trachomatis* lässt sich demnach bei einer Infektionsdauer von 48 h ein verringertes Inklusionswachstum bei bestehender TLR3-Inhibition feststellen. Das Inklusionswachstum der 2. Generation *C. trachomatis* ist, unabhängig von der Dauer der Erstinfektion, noch deutlicher durch eine Inhibition des TLR3 beeinträchtigt.

Ein weiterführendes Experiment sollte aufklären, zu welchem Zeitpunkt eine TLR3-Inhibition stattfinden muss, um diese Wachstumsrestriktion der 2. Generation *C. trachomatis* zu erhalten.

Die Erstinfektion mit *C. trachomatis* fand für alle Bedingungen unter TLR3-Inhibition statt (1. Generation *C. trachomatis*) und betrug 48, 72 oder 96 h. Die Zellen wurden aufgebrochen und die Inklusionsinhalte samt Medium auf frische Zellen transferiert (2. Generation *C. trachomatis*). Die Nachkommeninfektion fand für 24 h in TLR3-inhibierten und in unbehandelten Zellen statt.

Abbildung 18 zeigt die Inklusionsgrößen der 2. Generation *Chlamydia trachomatis*. Verglichen werden die Inklusionsgrößen unter Infektionsbedingungen ohne und mit TLR3-Inhibition der Wirtszelle während der zweiten Infektionsrunde.

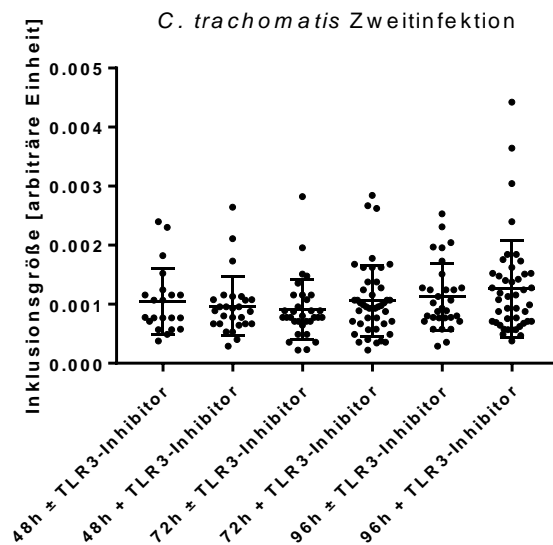


Abbildung 18: TLR3-Inhibition der Erstgeneration ist entscheidend für die Entwicklung von *C. trachomatis* in zweiter Generation

Versuch siehe Abbildung 15, ergänzend erfolgte eine Zweitinfektion ohne Zugabe des TLR3-Inhibitors, wobei der Ablauf der Erstinfektion unverändert blieb. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Dauer der Erstinfektion. Die Zweitinfektion betrug einheitlich 24 h. +: TLR3-Inhibition in Erst- und Zweitinfektion; ±: TLR3-Inhibition während der Erstinfektion, aber nicht während der Zweitinfektion. Die Auswertung aller Bilder mittels Fiji. Die dargestellten Werte zeigen einen einmalig durchgeführten Versuch. * ANOVA post-hoc-Test Tukey, $p < 0,05$.

Die Ergebnisse in Abbildung 18 zeigen eine Wachstumsrestriktion der Inklusionen in allen Bedingungen. Findet eine TLR3-Inhibition in der 1. Generation *C. trachomatis* statt, hat das Inhibieren der daraus hervorgehenden Nachkommen keinen signifikanten Einfluss auf die Inklusionsgröße der 2. Generation *C. trachomatis*.

Neben der Inklusionsgröße beinhaltet auch die Infektionsrate der Zweitinfektion Informationen über den chlamydialen Replikationszyklus. Je mehr infektiöse Nachkommen während der Erstinfektion gebildet werden, desto höher ist die Anzahl der Inklusionen pro Zelle in der Zweitinfektion, so ist die theoretische Annahme. Abbildung 19 zeigt die gezählten Inklusionen pro Zelle der 2. Generation *C. trachomatis* aus den Bildern zu dem Versuch aus Abbildung 15.

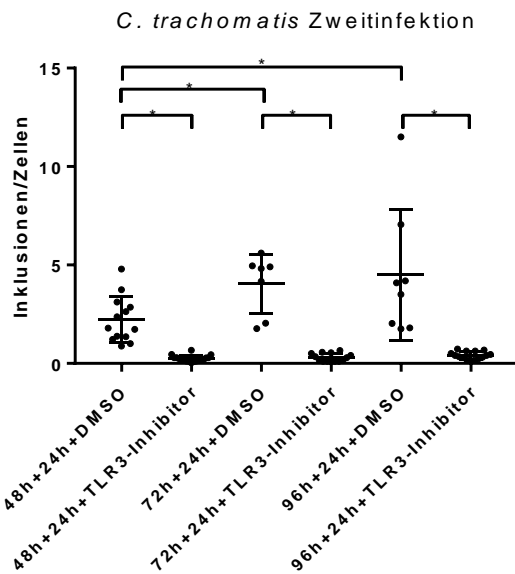


Abbildung 19: Die Anzahl infektiöser *C. trachomatis* Nachkommen ist unter TLR3-Inhibition verringert. Versuch siehe Abbildung 15, die Auswertung aller Bilder fand mittels Fiji statt. Die dargestellten Werte sind aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen zusammengefasst. * ANOVA post-hoc-Test Tukey, $p < 0,05$.

Bei dem Vergleich der DMSO-Kontrollen (Abbildung 19) fällt auf, dass eine längere Infektionsdauer der Erstinfektion zu einer erhöhten Infektionsrate in der Zweitinfektion führt.

Wurde eine TLR3-Inhibition vorgenommen, ist die Anzahl der Inklusionen pro Zelle in der Zweitinfektion deutlich verringert verglichen mit der DMSO-Kontrolle (Abbildung 19). Eine längere Dauer der Erstinfektion steigert die Infektiosität in der 2. Generation *C. trachomatis* unter TLR3-Inhibition nachweislich nicht.

3.2.3 *Chlamydia trachomatis* Inklusionsinhalt unter TLR3-Inhibition

Die metabolische Aktivität von *Chlamydia trachomatis* Inklusionen variiert je nach Existenzform und Infektionszeitpunkt⁹, was mit einer veränderten Proteinexpression und DNA-Kondensation einhergeht⁵⁹.

Somit spiegeln sich Veränderungen in der Entwicklung sowie im Stoffwechsel von *Chlamydia trachomatis* unter anderem in der vorliegenden Kondensationsform des Erbmateriale wider.

Die bisher verwendete Färbemethode mit ACI-FITC macht *Chlamydia trachomatis* Inklusionen durch Interaktion mit LPS und mit in den Inklusionen enthaltenen Proteinen sichtbar. Zur Darstellung der chlamydialen Erbsubstanz wurden Immunfluoreszenzbilder unter Verwendung des Farbstoffs DAPI angefertigt. Abbildung 20 zeigt die gefärbte DNA in infizierten T24/83-Zellen nach 24- und 42-stündiger Infektion unter TLR3-Inhibition und DMSO-Behandlung.

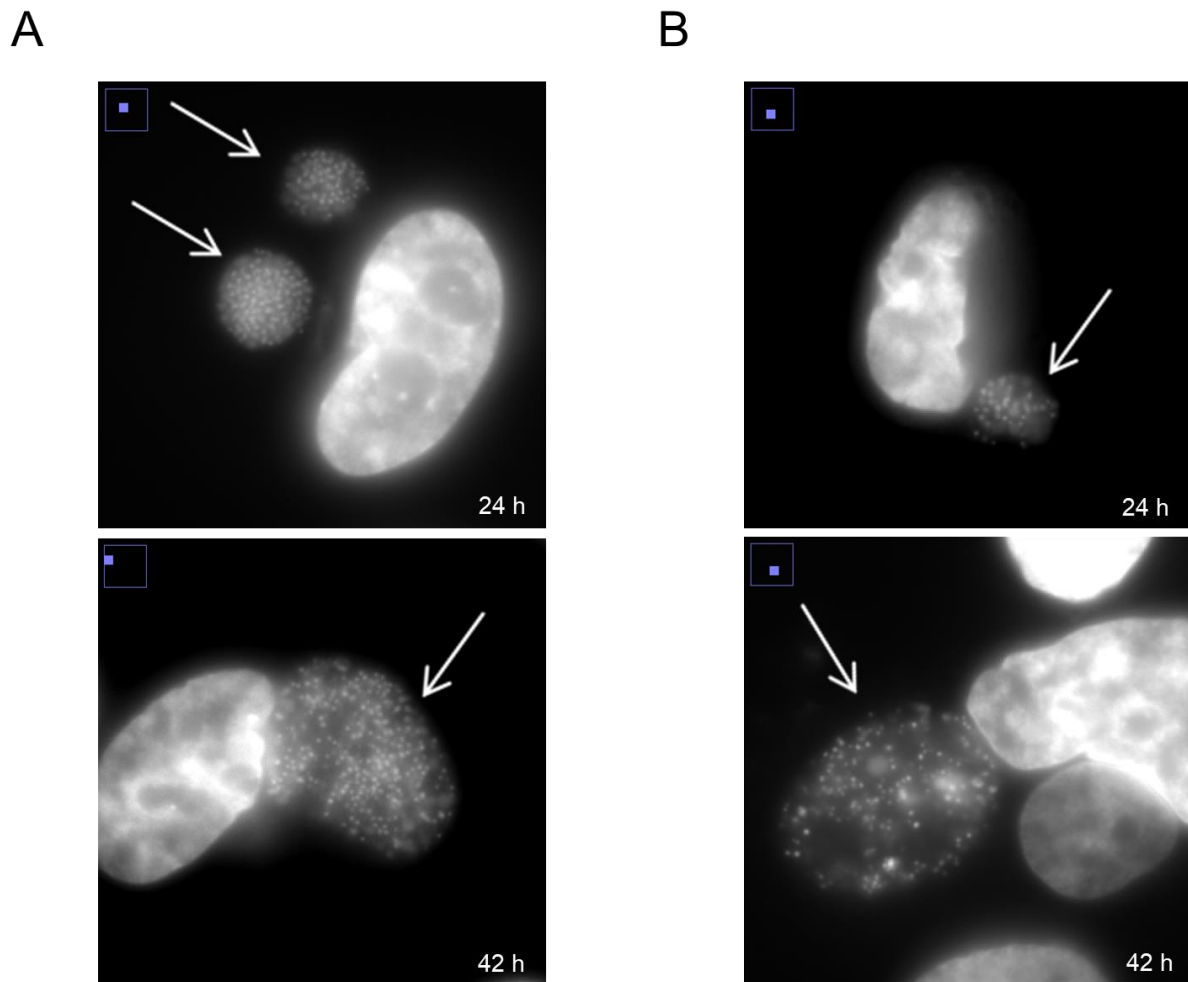


Abbildung 20: *C. trachomatis* Inklusionsinhalte unter TLR3-Inhibition

T24/83-Zellen (150.000 Zellen / Well auf Glasplättchen in einer 24-Well-Platte) wurden mit 10 μ l DMSO / ml Medium (A) oder 100 μ M TLR3-Inhibitor (B) vorbehandelt und für 24 respektive 42 h mit *Chlamydia trachomatis* infiziert (MOI 1,5). Es erfolgte die Fixierung, die Färbung mittels DAPI und die Aufnahme der Zellen (Mikroskop Leica DMRB 100er Objektiv, Kamera Orca-flash.4.OLT). Mit Pfeilen markiert sind die *C. trachomatis* Inklusionen. Die Bilder sind repräsentativ für drei unabhängige Versuchsdurchführungen. Die Bearbeitung der Bilder fand mit Fiji statt.

Zu erkennen sind die mit DAPI angefärbten Zellkerne der Wirtszellen sowie die paranukleär gelegenen *Chlamydia trachomatis* Inklusionen (weiße Pfeile in Abbildung 20). Unter beiden Bedingungen sowohl 24 als auch 42 h *post infectionem* DNA innerhalb der Inklusionen detektierbar ist. Es findet sich eine Vielzahl an intensiv fluoreszierenden punktförmigen Strukturen. Insbesondere in größeren Inklusionen, also nach einer Infektionsdauer von 42 h, sind in beiden Bedingungen leere Areale zu finden. Die Anzahl der fluoreszierenden Strukturen ist zu beiden Zeitpunkten in der DMSO-Kontrolle größer als in inhibierten Zellen. Darüber hinaus finden sich unter TLR3-Inhibition großflächigere, schwächer fluoreszierende Areale. Eine quantitative Auswertung bezüglich Anzahl und Größe dieser Strukturen konnte nicht realisiert werden.

3.2.4 Chlamydiales Wachstum unter TLR4-Inhibition

TLR4 kann als PRR, ähnlich wie TLR3, in vielen Zelltypen exprimiert werden. Insbesondere im weiblichen Urogenitaltrakt, welcher für eine Infektion mit *Chlamydia trachomatis* Serovar D von Bedeutung ist, konnte eine TLR4-Expression durch Pioli et al. nachgewiesen werden⁶⁰.

Aktiviert wird TLR4 durch Lipopolysaccharide (LPS) aus den Zellwänden gram-negativer Bakterien^{27, 40}. Somit ist eine Interaktion zwischen TLR4 und *Chlamydia trachomatis* durchaus plausibel. Ob TLR4 über eine LPS-Erkennung zu einer Immunantwort bei einer Chlamydieninfektion beiträgt, ist fraglich⁶¹⁻⁶⁴.

Im folgenden Experiment wurde der Einfluss von TLR4 auf die Entwicklung von *Chlamydia trachomatis* untersucht.

Hierzu fand eine *Chlamydia trachomatis* Infektion unbehandelter und TLR4-inhibierter T24/83-Zellen über 48 h statt (1. Generation *C. trachomatis*). Die Zellen wurden aufgebrochen und der Überstand mitsamt Inklusionsinhalten auf unbehandelte Zellen respektive TLR4-inhibierte Zellen übertragen. Nach einer Infektionsdauer von 24 h (2. Generation *C. trachomatis*) erfolgte eine Immunfluoreszenzmikroskopie.

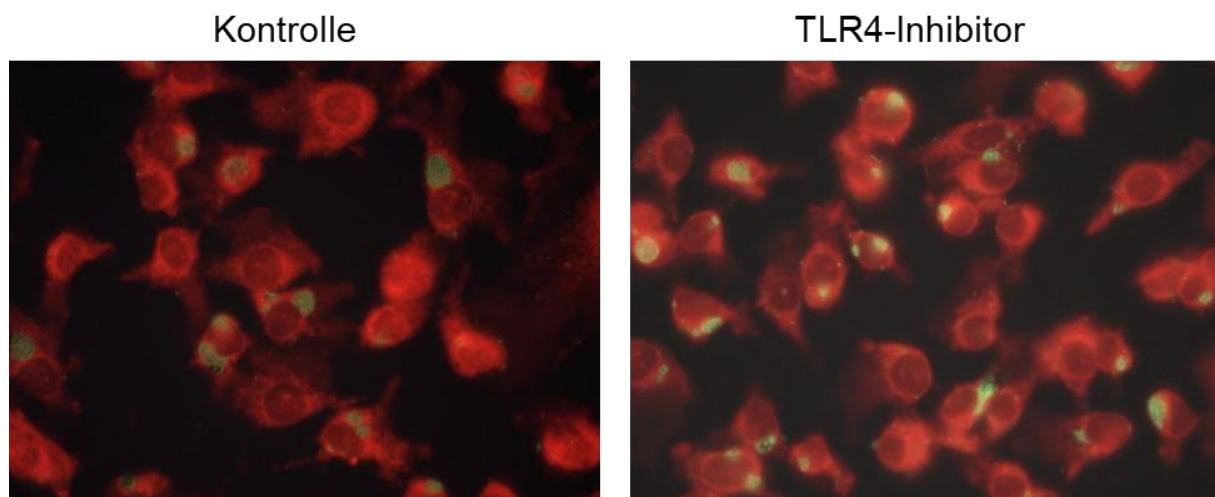


Abbildung 21: Die Entwicklung von *Chlamydia trachomatis* in zweiter Generation unter TLR4-Inhibition
T24/83-Zellen (120.000 Zellen / Well in einer 24-Well-Platte) wurden mit 1 μ M TLR4-Inhibitor vorbehandelt, mit *Chlamydia trachomatis* Serovare D infiziert (MOI 0,1) und für 48 h inkubiert. Es folgte das Aufbrechen der Zellen mit Glas-Beads und eine Infektion frischer (120.000 Zellen / Well auf Glasplättchen in einer 24-Well-Platte), ebenfalls vorbehandelter Zellen. Die Infektionsdauer der zweiten Infektion betrug 24 h. Die Zellen wurden fixiert, mit ACI-FITC gefärbt und fotografiert (Mikroskop Leica DM2000/2500, Kamera Leica DFC420, 40x Objektiv). Jede Bedingung wurde in Triplikaten angefertigt. Die dargestellten Bilder sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuchsdurchführungen. In rot sind die mit Evans Blau angefarbten Zellen zu sehen, in grün stellen sich *Chlamydia trachomatis* Inklusionen dar.

Die angefertigten Bilder in Abbildung 21 zeigen die Nachkommensinfektion von *Chlamydia trachomatis*. Unter beiden Bedingungen kommt es zu einer Infektion der Zellen. Die Flächen der Inklusionen aller drei Versuchswiederholungen wurden gemessen und sind in Abbildung 22 dargestellt.

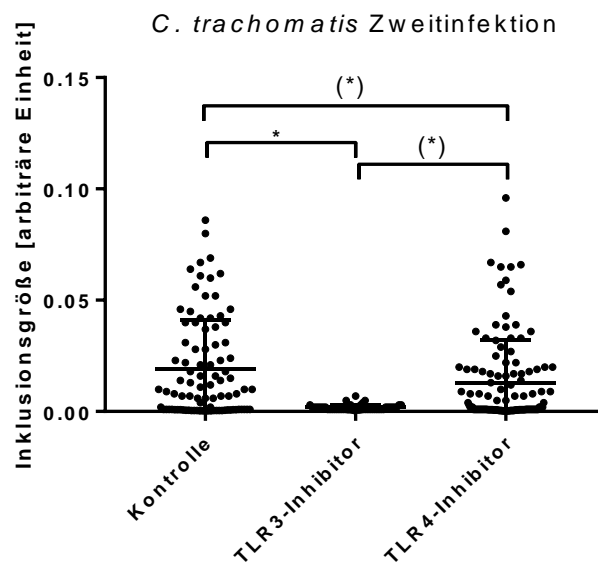


Abbildung 22: TLR4-Inhibition führt nicht zu vergleichbarer Wachstumsrestriktion von *C. trachomatis*
 Versuchsaufbau siehe Abbildung 21. Die Auswertung aller Bilder fand mittels Fiji statt. Daten beispielhaft aus einer von drei voneinander unabhängigen Versuchsdurchführungen. * ANOVA post-hoc-Test Tukey, $p < 0,05$.

Die Inhibition von TLR4 zeigt in der statistischen Auswertung eine signifikante Verkleinerung der Inklusionen der 2. Generation *Chlamydia trachomatis* (Abbildung 22). In weiterführenden Versuchen konnte sich die minimale Inklusionsverkleinerung unter TLR4-Inhibition nicht bestätigen, wobei die deutliche Wachstumsrestriktion der Inklusionen unter TLR3-Inhibition vielfach reproduzierbar war (unveröffentlichte Daten der laborinternen Arbeitsgruppe).

3.3 Transkriptionsänderungen in T24/83-Zellen durch *Chlamydia trachomatis*

Die Untersuchung TLR3-gekoppelter Vorgänge in der Zelle beschränkte sich bisher auf den anfangs beschriebenen TLR3-Signalweg. Durch die Infektion mit *Chlamydia trachomatis* bedingte Veränderungen dieser Signalkette wurden nicht nachgewiesen. Eine mRNA-Microarray-Analyse bietet die Möglichkeit, ein sehr breites Spektrum zellulärer Vorgänge gleichzeitig zu untersuchen. Daher wurde diese Methode für die Suche nach Veränderungen in zellulären Abläufen von T24/83-Zellen während einer *Chlamydia trachomatis* Infektion genutzt. Unterschieden wurde zwischen einem frühen Infektionszeitpunkt (4,5 h Infektionsdauer) und einem späten Infektionszeitpunkt (24 h Infektionsdauer). Auch die Effekte der Stimulation mit Poly-(I:C) und LPS wurden untersucht. Welche Einflüsse die Inhibition von TLR3 und TLR4 auf Infektion und Stimulation haben, war ebenfalls Teil der Fragestellung. Die RNA-Microarray-Analyse wurde in Kooperation mit dem Zentrum für Medizinische Forschung der Medizinischen Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg durchgeführt.

3.3.1 Inflammatorische Reaktion

Aus allen untersuchten Genen fand eine Selektion inflammatorisch relevanter Gene statt. Mit einbezogen wurden Gene, die folgenden Unergruppen zugehörig sind: Interleukin, Interferon, Interferon-induziert, Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und TNF- α -verwandt.

Abbildung 23 zeigt sogenannte „volcano plots“. Jedes Gen entspricht einem Punkt im Diagramm. Dargestellt ist die Signifikanz der Expressionsänderung (P-Wert) in Abhängigkeit von der Expressionsdifferenz. Die dargestellte Signifikanz gibt den negativen \log_{10} des P-Werts an. Der Zahlenwert der Expressionsdifferenz ist der \log_2 -Wert der Differenz der beiden verglichenen Expressionsintensitäten. Ist der \log_2 -Wert positiv, bedeutet dies, dass das Expressionsverhältnis zwischen den beiden untersuchten Bedingungen >1 ist, es findet eine Induktion statt. Ist der \log_2 -Wert negativ, dann ist das Expressionsverhältnis <1 , das Gen wird reprimiert.

Verglichen wurde die Expression inflammatorisch relevanter Gene unter Poly-(I:C)-Stimulation (A), LPS-Stimulation (B), früher (C) und später (D) *Chlamydia trachomatis* Infektion mit deren Expression in unbehandelten Zellen.

Solche inflammatorischen Gene, die unter einer der untersuchten Bedingungen eine signifikant veränderte Expression zeigten, sind in den entsprechenden volcano plots rot dargestellt. Eine Auflistung dieser Gene findet sich im tabellarischen Anhang (Tabelle 1 bis Tabelle 4).

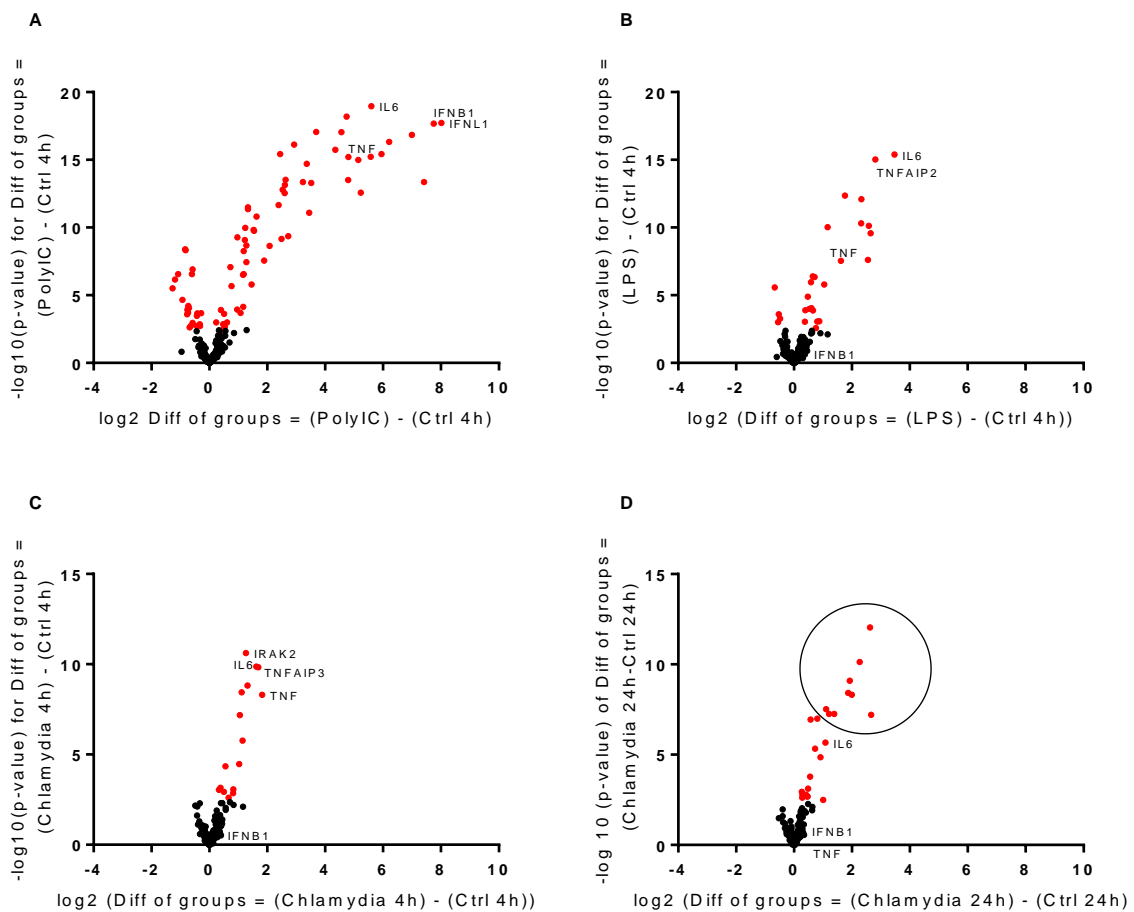


Abbildung 23: Expressionsänderungen inflammatorischer Gene durch *Chlamydia trachomatis* Infektion

T24/83-Zellen wurden in 24-Well-Platten kultiviert. Für die Kontrollbedingungen (LPS und Poly-(I:C)) sowie den späten Infektionszeitpunkt mit einer Zellzahl von 20.000 Zellen/Well, für den frühen Infektionszeitpunkt mit einer Zellzahl von 30.000 Zellen/Well. Es folgte die Behandlung mit 5 µg Poly-(I:C) / ml Medium (A), mit 1 µg LPS / ml Medium (B) oder die Infektion mit *Chlamydia trachomatis* (MOI 5) für 4,5 (C) respektive 24 h (D). Für jede Bedingung wurden Triplikate angefertigt. Anschließend wurde die zelluläre RNA isoliert und eine RNA-Microarray-Analyse durchgeführt. Mithilfe der KEGG-Datenbank wurden alle inflammatorischen Gene selektiert und in volcano plots dargestellt. Eingekreist in D sind IFN-verwandte und -induzierte Gene. In rot dargestellt sind Gene mit adjusted p value <0,05. Alle signifikant veränderten Gene der Abbildung sowie ihre Expressionsänderungen sind in Tabelle 1 (A), Tabelle 2 (B), Tabelle 3 (C) und Tabelle 4 (D) aufgelistet.

Die Anzahl signifikant veränderter inflammatorischer Gene ist mit 16 nach 4-stündiger bzw. 23 nach 24-stündiger Infektion geringer als nach Zugabe von Poly-(I:C) (79 Gene) oder LPS (27 Gene). Abbildung 23 zeigt, dass die Mehrzahl der signifikant veränderten Gene eine Induktion erfährt. Im Fall der beiden Stimulantien Poly-(I:C) (A) und LPS (B) tritt auch eine Inhibition einiger Gene auf. Im Gegensatz dazu erfährt kein Gen nach Infektion (C, D) eine signifikante Transkriptionshemmung. Einige Gene sind aufgrund ihrer Expressionsänderung und Zugehörigkeit zu bestimmten Signalwegen hervorgehoben.

Als Effektormolekül einer TLR3-Signalwegaktivierung zeigt sich unter Poly-(I:C)-Stimulation eine Induktion des Interferon-β-1-Gens (IFNβ1). Unter LPS-Stimulation fehlt diese. Während einer Infektion mit *Chlamydia trachomatis* ist zu keinem Infektionszeitpunkt die Interferon-β-1-Gen Expression signifikant verändert. In der späten Infektionsphase zeigen allerdings folgende interferon-induzierte Gene

signifikante Transkriptionssteigerungen (Abbildung 23 D eingekreist): IFIT1, IFIT2, IFIH1, IFI6, IFIT3, IFI44L, IFI44, IFI27 und IRF9 (Tabelle 4).

Eine Induktion des TNF-Gens ist bei beiden Stimulantien, Poly-(I:C) und LPS, zu sehen. In der frühen Infektionsphase zeigt sich eine vergleichbare Expressionssteigerung (Abbildung 23C), die jedoch in der späten Infektionsphase wieder verschwindet (Abbildung 23D).

Interleukin 6 (IL-6) erfährt unter allen Bedingungen eine signifikante, unterschiedlich starke Induktion.

Während einer Infektion mit *Chlamydia trachomatis* können die Einflüsse auf die zelluläre Expression inflammatorischer Gene über verschiedenste Mechanismen ausgelöst werden. Der direkte Vergleich zwischen der Genexpression während einer *Chlamydia trachomatis* Infektion und der Kombination aus Infektion und gleichzeitiger Inhibition von TLR3 bzw. TLR4 ist in Abbildung 24 zu sehen. Bei dieser Analyse wurden nur jene Gene eingeschlossen, welche bei reiner Infektion eine signifikante Expressionsänderung verglichen mit unbehandelten Zellen aufwiesen (Abbildung 23C und D in rot dargestellt, aufgelistet in Tabelle 3 und Tabelle 4).

Abbildung 24 zeigt TLR3- und TLR4-bedingte Transkriptionsänderungen zu frühem (A und C) und spätem (B und D) Infektionszeitpunkt in Form von volcano plots.

In den Heatmap-Diagrammen (E und F) in Abbildung 24 kann der Expressionsunterschied der einzelnen Gene durch eine Infektion, eine TLR3- und eine TLR4-Inhibition nachvollzogen werden. Der Farbverlauf kennzeichnet hierbei die Stärke der Expressionsänderung in log₂-Werten.

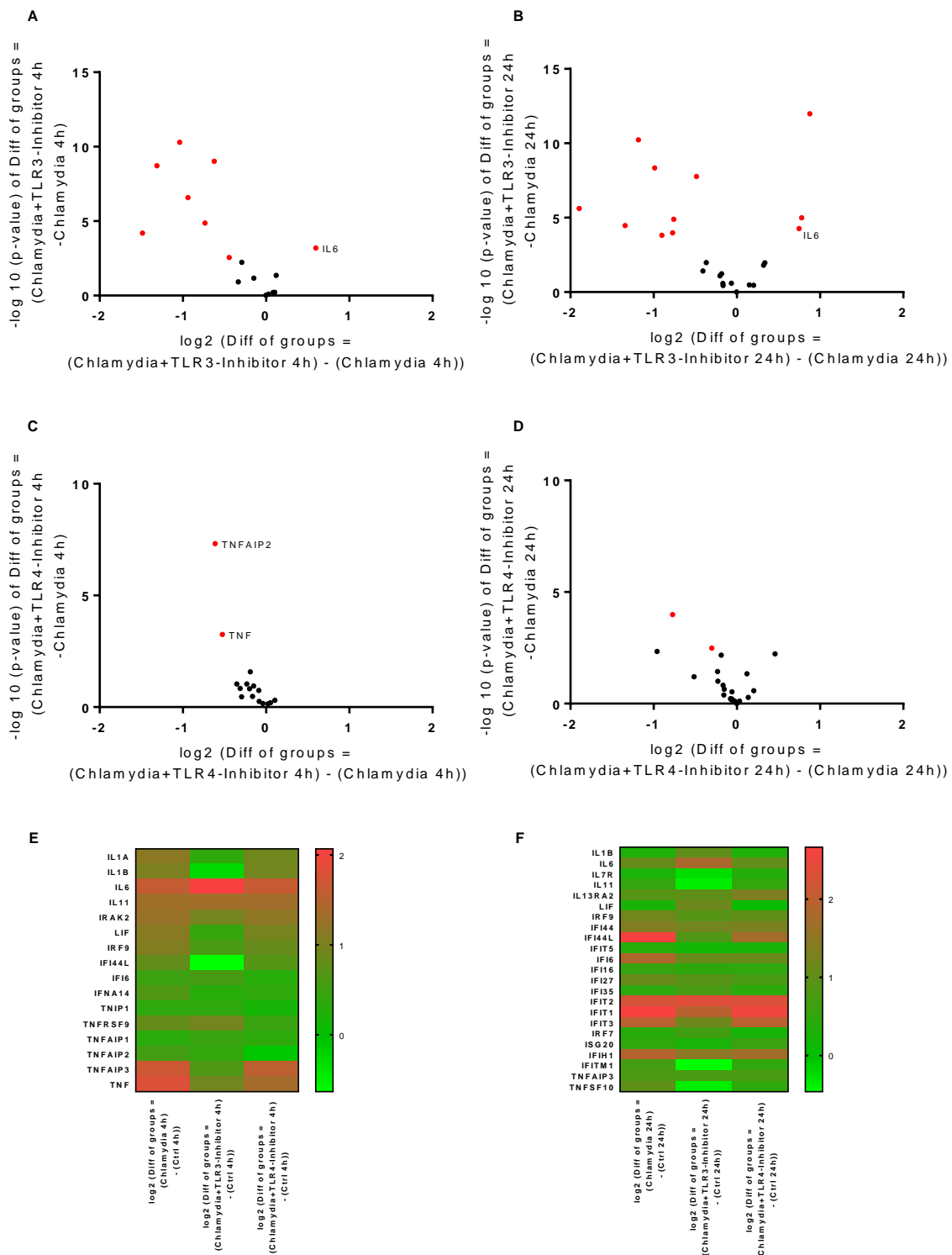


Abbildung 24: TLR3- und TLR4-Abhängigkeit inflammatorischer Geninduktionen durch *C. trachomatis*

Versuchsaufbau siehe Abbildung 23, verglichen wurden die folgenden Bedingungen: *C. trachomatis* Infektion unter TLR3- (A, B) bzw. TLR4-Inhibition (C, D) nach 4,5 und 24 h. Dargestellt sind jene Gene, die durch eine *C. trachomatis* Infektion signifikant verändert wurden (siehe Abbildung 23 C und D rot). In den volcano plots (A-D) sind in rot jene Gene markiert, die im Direktvergleich durch eine TLR3- oder TLR4-Inhibition signifikant induziert oder inhibiert wurden (adjusted p-value <0,05). Die heatmaps (E und F) zeigen die Expressionsintensitäten der in A und C, bzw. B und D dargestellten Gene. Die Farben zeigen den \log_2 -Wert der Expressionsänderung an. Verglichen wurden *C. trachomatis* Infektion, *C. trachomatis* Infektion mit TLR3-Inhibition und *C. trachomatis* mit TLR4-Inhibition nach 4,5 h (E) und nach 24 h (F) Infektionsdauer mit der unbehandelten Kontrolle.

Insgesamt beeinflusst eine TLR3-Inhibition in etwa die Hälfte der durch eine *C. trachomatis* Infektion signifikant veränderten Gene (Abbildung 24 A und B). Mit wenigen Ausnahmen bedeutet dies eine Reduktion der zuvor gesteigerten Genexpression.

In der Gruppe der interferon-induzierten Gene (Abbildung 23D eingekreist) führt eine TLR3-Inhibition bei 24-stündiger Infektion zur Hemmung der Expression folgender Gene: IFIT1, IFI44L, IFIT3 und IFI6.

Eine Ausnahme stellt IL-6 dar, welches zu beiden Infektionszeitpunkten durch eine TLR3-Inhibition gesteigert exprimiert wird.

Eine TLR4-Inhibition beeinflusst diese Gene in geringerer Anzahl und Intensität (Abbildung 24 C und D). Die TNF-Expression, als Effektormolekül des TLR4-Signalwegs, wird jedoch durch eine TLR4-Inhibition signifikant gehemmt.

3.3.2 Veränderungen gesamter Signalwege

Ebenso relevant wie die Expressionsänderung einzelner Gene durch eine *Chlamydia trachomatis* Infektion ist die Expressionsänderung von Gengruppen, welche in funktionellem Zusammenhang stehen und sich gegenseitig beeinflussen oder als Signalweg interagieren. Eine Zuordnung aller Gene zu solchen Gengruppen ist der KEGG-Datenbank⁵¹ zu entnehmen.

Um die Relevanz verschiedener Gengruppen während einer *Chlamydia trachomatis* Infektion anzuzeigen, wurde eine Selektion durchgeführt.

In Abbildung 27 sind jene Gengruppen abgebildet, deren Transkriptionsintensitäten folgende Kriterien erfüllen: In der frühen Infektionsphase mit *Chlamydia trachomatis* zeigt sich eine signifikante Expressionsveränderung (*Chlamydia* vs. Ctrl $p < 0,05$) im Sinne einer Induktion (NES *C. trachomatis* vs Ctrl $> 1,5$), wohingegen eine simultane TLR3-Inhibition die Expression dieser Signalwege verglichen mit der Kontrolle vermindert (NES Ct+T3I vs Ctrl < -1).

In dem Diagramm dargestellt sind die Expressionsänderungen (Normalized enrichment score) nach 4-stündiger *Chlamydia trachomatis* Infektion verglichen mit der Kontrolle.

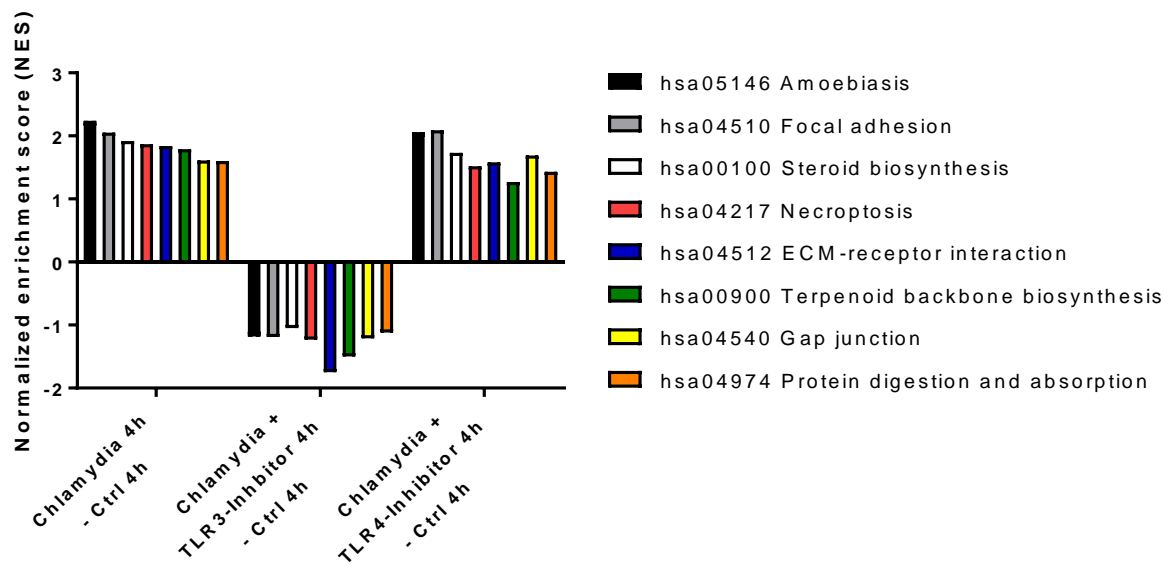


Abbildung 25: Signalwegveränderungen

Versuchsaufbau siehe Abbildung 23. Es erfolgte eine Selektion der Signalwege (KEGG-Datenbank) nach den oben genannten Kriterien. Gezeigt ist die Expressionsänderung der Signalwege während der frühen *C. trachomatis* Infektion (4,5 h) in Kombination mit einer TLR3- oder TLR4-Inhibition verglichen mit der Kontrolle. Folgende Signalwege sind dargestellt: „Amoebiasis“, „Fokale Adhäsion“, „Steroid Biosynthese“, „Nekroptose“, „ECM-Rezeptor Interaktion“, „Terpenoid-Rückgrat Biosynthese“, „Gap junction“ und „Proteinverdauung und -absorption“.

Aus diesen selektierten Gengruppen nimmt der Steroidbiosyntheseweg hinsichtlich des Infektionsverlaufs während einer *Chlamydia trachomatis* Infektion mit seiner biologischen Funktion eine relevante Rolle ein. Die Notwendigkeit der Versorgung von *Chlamydia trachomatis* Inklusionen mit Lipiden und Cholesterin für ein adäquates Inklusionswachstum konnte in der Vergangenheit mehrfach gezeigt werden^{12, 65, 66}. Die TLR3-bedingte Inhibition des Steroid Biosynthese Weges könnte somit die Ursache des beobachteten Entwicklungsdefizits des Erregers unter TLR3-Inhibition sein.

Wie sich die Expression des Steroid Biosynthese Weges in der frühen Infektionsphase verändert und welchen Einfluss eine TLR3- bzw. TLR4-Inhibition darauf hat ist in Abbildung 26 dargestellt. Die Bearbeitung der RNA-Microarray-Daten mittels Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) ermöglicht es, Veränderungen eines Signalweges zu quantifizieren und graphisch abzubilden.

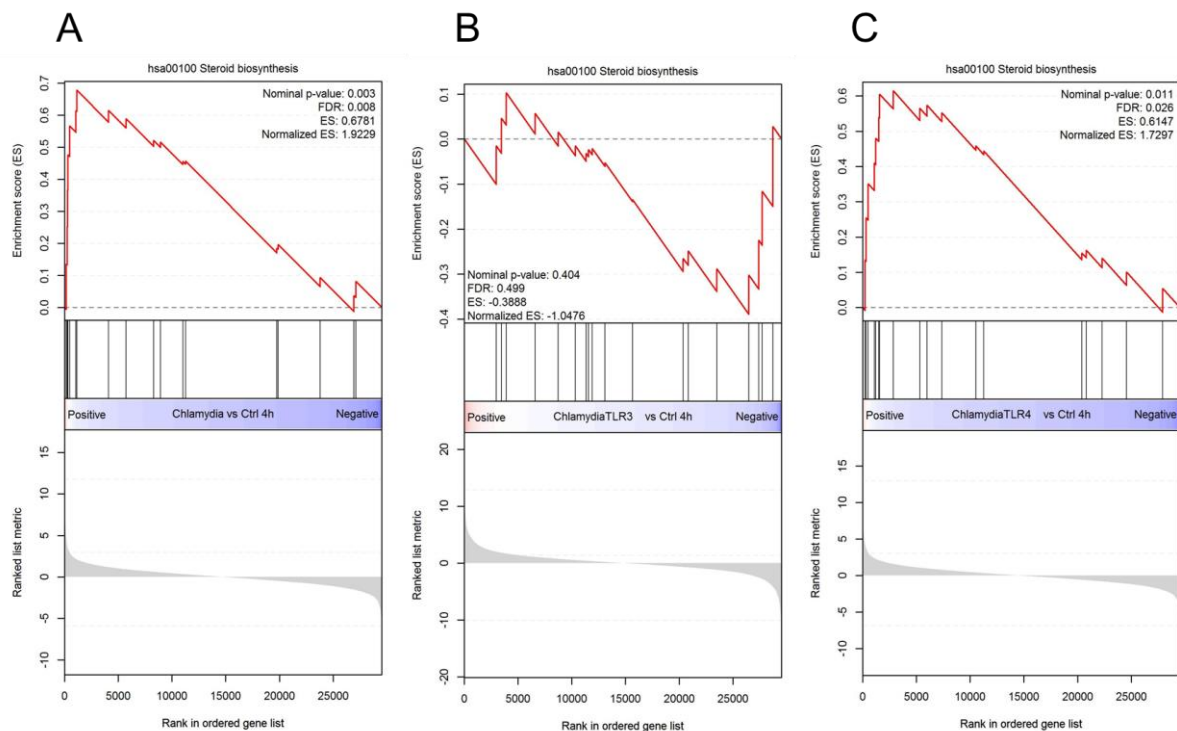


Abbildung 26: TLR3-abhängige Expressionsänderung des Steroid Biosynthese Weges in der frühen *C. trachomatis* Infektion

Versuchsaufbau siehe Abbildung 23. Verglichen wurden die folgenden Bedingungen: 4,5 h *C. trachomatis* Infektion (A), 4,5 h *C. trachomatis* Infektion unter TLR3-Inhibition (B) und 4,5 h *C. trachomatis* Infektion unter TLR4-Inhibition (C) (MOI 5) mit unbehandelten Zellen. Es fand eine Auswertung des Steroid Biosynthese Weges mittels Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) statt.

Die GSEAplots zeigen die Veränderungen über alle Gene des Steroid Biosynthese Weges. In der frühen *Chlamydia trachomatis* Infektion ist eine signifikante Induktion (Normalized Enrichment Score (NES) Chlamydia vs Ctrl 4h = 1.92; adjusted p 0,008) zu sehen. Bei zeitgleicher TLR3-Inhibition ist eine Inhibition dieses Signalweges festzustellen (NES Chlamydia + TLR3 vs Ctrl 4h = -1.05; adjusted p 0,498). Während einer Infektion unter TLR4-Inhibition zeigt sich ein Expressionsprofil, das dem unter alleiniger *Chlamydia trachomatis* Infektion ähnelt (NES Chlamydia + TLR4 vs Ctrl 4h = 1.73; adjusted p 0,026).

3.3.1 Veränderungen des zellulären Lipidmetabolismus

Nachdem bereits TLR3-abhängige Veränderungen des Cholesterinmetabolismus in seiner Gesamtheit während der frühen Infektionsphase gezeigt werden konnten, wurden nun einzelne Gene untersucht, die im späteren Verlauf der Infektion an der Ernährung der *Chlamydia trachomatis* Inklusion beteiligt sein könnten.

Hierzu wurden alle Gene in die Auswertung mit eingeschlossen, die in der KEGG-Datenbank⁵¹ der Kategorie „Metabolismus“ sowie der Unterkategorie „Lipidmetabolismus“ zugeordnet sind. Darunter fallen die folgenden Stoffwechselwege: Sphingolipid-Metabolismus, Arachidonsäure-Metabolismus, Linolsäure-Metabolismus, Glycerolipid-Metabolismus, alpha-Linolensäure-Metabolismus, Etherlipid-Metabolismus, Steroidhormon-Biosynthese, Steroid-Biosynthese, Glycerophospholipid-Metabolismus, primäre Gallensäure-Biosynthese,

Fettsäuren-Degradierung, Biosynthese von ungesättigten Fettsäuren und Fettsäure-Elongation.

Abbildung 27 beinhaltet volcano plots dieser metabolischen Gene. Expressionsniveaus der späten Infektionsphase, der Poly-(I:C)-Stimulation, der Kombination aus später Infektionsphase und TLR3-Inhibition sowie der Kombination aus Poly-(I:C)-Stimulation und TLR3-Inhibition wurden mit den Expressionsniveaus unbehandelter Zellen verglichen. In rot dargestellt sind Gene mit signifikanter Expressionsänderung.

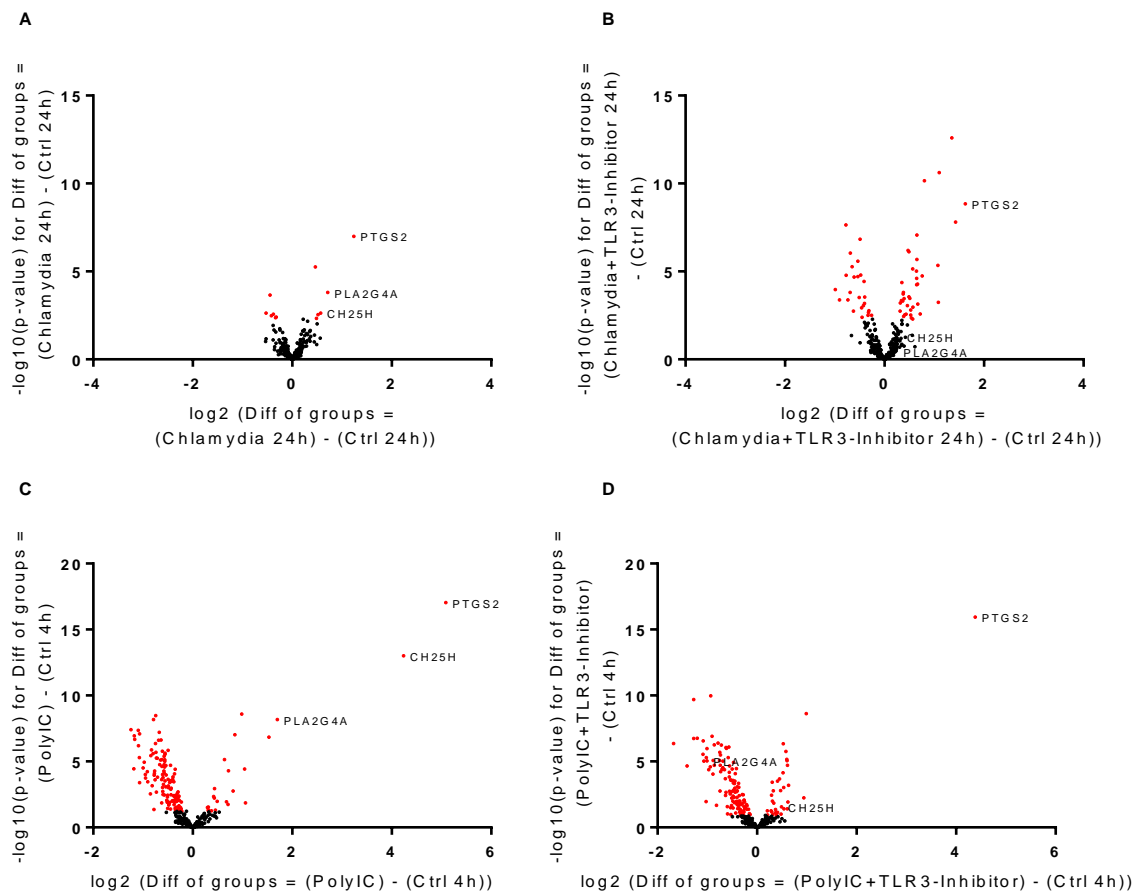


Abbildung 27: Expressionsänderungen des Lipidmetabolismus in der späten *C. trachomatis* Infektion

Versuchsaufbau siehe Abbildung 23. Verglichen wurden die folgenden Bedingungen: 24 h *C. trachomatis* Infektion (MOI 5) (A), 24 h *C. trachomatis* Infektion (MOI 5) unter TLR3-Inhibition (B), Poly-(I:C)-Stimulation (C) und Poly-(I:C)-Stimulation unter TLR3-Inhibition (D) mit unbehandelten Zellen. Dargestellt sind Expressionsintensitäten der Gene des Lipidmetabolismus (KEGG-Datenbank). In rot adjusted p-value $<0,05$. Alle signifikanten Gene sowie ihre Expressionsänderungen sind in Tabelle 5 (A), Tabelle 6 (B), Tabelle 7 (C) und Tabelle 8 (D) im tabellarischen Anhang aufgelistet.

Alle vier dargestellten Bedingungen in Abbildung 27 führen zu einer Expressionsänderung mehrerer Gene des zellulären Lipidmetabolismus' in T24/83-Zellen sowohl im Sinne einer Induktion als auch einer Inhibition. Mit 12 Genen ist in der Spätphase einer *Chlamydia trachomatis* Infektion die Anzahl der signifikant beeinflussten Gene am geringsten (rot in Abbildung 27A).

Hervorgehoben sind einige Gene, die sowohl während der Infektion als auch unter Poly-(I:C)-Stimulation eine Induktion erfahren. Eine TLR3-Inhibition hat auf diese Expressionsänderung einen variierenden Effekt.

PTGS2 kodiert die Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2, eine Isoform der induzierbaren Cyclooxygenase⁶⁷, und zeigt unter Infektion sowie unter Stimulation

die stärkste Expressionssteigerung. Die Zugabe des TLR3-Inhibitors vermindert diesen Effekt nicht.

PLA2G4A kodiert die zytosolische Phospholipase A2 der Gruppe IV, welche die Hydrolyse von Phospholipiden der zellulären Membran katalysiert ⁶⁷.

CH25H kodiert die Cholesterol 25-Hydroxylase, ein Enzym, das sowohl im Cholesterol- als auch im Lipidmetabolismus eine Rolle spielt ⁶⁷.

Beide Gene zeigen ein ähnliches Expressionsmuster. Sie werden durch die Infektion und die Poly-(I:C)-Stimulation verstärkt exprimiert (Abbildung 27 A und C). Eine zusätzliche TLR3-Inhibition während Infektion hebt diesen Effekt bei beiden Genen auf (Abbildung 27 B). Eine TLR3-Inhibition während Poly-(I:C)-Stimulation führt bei CH25H zu einer Verminderung der Expressionsinduktion. Auf PLA2G4A ist der Effekt einer TLR3-Inhibition noch deutlicher, denn das Gen wird trotz Poly-(I:C)-Transfektion reprimiert (Abbildung 27 D).

4 DISKUSSION

4.1 *Chlamydia trachomatis* und Toll-like-Rezeptor 3

TLR3 ist als Teil des angeborenen Immunsystems für die Induktion von IFN- β bei intrazellulär vorliegender Doppelstrang-RNA bekannt³⁰. Seine Rolle bei der Erkennung viraler und bakterieller Erreger, wie beispielsweise *Chlamydia trachomatis*, ist Gegenstand der aktuellen Forschung^{68, 69}. *Chlamydia trachomatis* Serovar D ist ein obligat intrazellulär wachsendes Bakterium², welches als Erreger einer sexuell übertragbaren Erkrankung weltweit verbreitet ist⁷. Als Komplikationen einer Infektion mit *Chlamydia trachomatis* sind insbesondere eine chronische Entzündung des Unterleibs (PID) und Unfruchtbarkeit¹⁹ zu nennen, wobei die ursächlichen Mechanismen bisher nicht ausreichend identifiziert werden konnten.

Es existiert eine geringe Anzahl an veröffentlichten Daten bezüglich der Interaktion zwischen *Chlamydia trachomatis* und TLR3 der Wirtszelle. Bei der Infektion muriner Zellen mit *Chlamydia muridarum* wurden in der Vergangenheit, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, Anhaltspunkte für ein TLR3-induziertes inflammatorisches Geschehen gefunden⁴⁵⁻⁴⁸. Zuletzt wurden Experimente veröffentlicht, welche während einer Infektion mit *Chlamydia trachomatis* Serovar L2 in humanen Eileiterzellen ebenfalls eine IFN- β -Induktion dokumentieren⁴⁹. Beobachtungen in der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigten unter TLR3-Knockout-Bedingungen in humanen Eileiterzellen Veränderungen in Größe und Binnenstruktur der Inklusionen von *Chlamydia trachomatis* Serovar D⁴⁹.

Entsprechend der bisher bekannten Funktion von TLR3 formen diese in der Literatur beschriebenen Beobachtungen das Bild einer Immunantwort. Hierbei wird von einer TLR3-Signalwegaktivierung und IFN- β -Produktion als Reaktion auf eine *Chlamydia trachomatis* Infektion ausgegangen. Damit verbunden wurde TLR3 ein hemmender Einfluss auf die Replikation von *Chlamydia trachomatis* zugesprochen.

Auf verschiedenen Ebenen konnte sich dieses Bild nicht bestätigen. Insbesondere die Einflüsse auf *Chlamydia trachomatis* und dessen Replikation durch einen TLR3-Funktionsausfall erfordern einen neuen Blickwinkel auf TLR3 und seine Interaktion mit *Chlamydia trachomatis*.

4.2 TLR3-Expression und Funktion in Zellen des humanen Urogenitaltrakts

Epithelzellen des humanen Urogenitaltrakts stellen, als natürliche Barriere des menschlichen Körpers, die erste Kontaktmöglichkeit für den sexuell übertragbaren Erreger *Chlamydia trachomatis* serovar D und den Reproduktionsort dieses obligat intrazellulären Bakteriums dar. Initial wurde mit diversen Blasenkarzinomzelllinien und einer Zervixkarzinomzelllinie gearbeitet, welche *in vitro* die Rolle der Wirtszellen übernehmen sollten. Mit HeLa- und T24/83-Zellen erfolgte eine ausführliche Untersuchung des TLR3-Signalweges.

4.2.1 Unzureichende IRF3-Phosphorylierung führt zu funktionsloser TLR3-Signalkette in HeLa-Zellen

Insgesamt zeigte sich der TLR3-Signalweg in HeLa-Zellen als nicht funktionsfähig. Trotz nachweisbarer mRNA von TLR3 und TRIF blieb die IRF3-Phosphorylierung in der Poly(I:C)-Positivkontrolle unzureichend, sodass eine IFN- β -Produktion in jedem

Fall ausblieb. Die Studienlage zur Aktivierung der TLR3-Signalkaskade in HeLa-Zellen ist gespalten. Ergebnisse reichen von einer IRF3-Aktivierung⁷⁰ und einer geringfügigen IFN- β -Produktion nach Poly-(I:C)-Stimulation^{71, 72} über eine fehlende Stimulierbarkeit bis hin zu einer Unterdrückung der Signalwegaktivierung⁷³ in HeLa-Zellen. Bezüglich der TLR3-Signalkaskade selbst wird in der Literatur an dem Punkt der IRF3-Phosphorylierung über eine Notwendigkeit zur Phosphorylierung der Serin-Reste an den Lokalisationen 336 und 396 berichtet⁷⁴.

Die Ergebnisse der durchgeführten Western Blots zeigten nach Poly-(I:C)-Stimulation in HeLa-Zellen zwar eine Phosphorylierung des Serin-Restes 386, eine Phosphorylierung des Serin-Restes 396 blieb jedoch aus. Diese Beobachtung ist passend zu dem Befund, dass eine IFN- β -Produktion in HeLa-Zellen durch TLR3-Stimulation nicht auslösbar ist. Dennoch fand sich in infizierten HeLa-Zellen eine TLR3- und TRIF-Rekrutierung an *Chlamydia trachomatis* Inklusionen. Nach einer Infektion konnte allerdings keine IFN- β -Produktion auf Proteinniveau nachgewiesen werden. Funami et al. beschrieben ebenfalls diese Rekrutierung der beiden Proteine, jedoch nach der Stimulation von HeLa-Zellen mit Poly-(I:C)²⁸.

Eine gezielte Stimulation von TLR3 hatte in den hier durchgeführten Experimenten keine adäquate Signalwegaktivierung in HeLa-Zellen zur Folge. Aus diesem Grund ist nicht zu sagen, inwiefern die beobachtete Rekrutierung im Fall einer *Chlamydia trachomatis* Infektion den TLR3-Signalweg in HeLa-Zellen beeinflusst.

4.2.2 TLR3-Signalweg in T24/83-Zellen ist funktionsfähig

Zellen der Blasenkarzinom-Zelllinie T24/83 erfüllten die Voraussetzungen einer komplett funktionsfähigen TLR3-Signalkaskade. Neben der vorhandenen TLR3- und TRIF-mRNA zeigten sich beide Proteine bei einer intrazellulären Immunfluoreszenzfärbung exprimiert. Im Western Blot konnte die Expression von TBK1 und IRF3 nachgewiesen werden. Nach TLR3-Stimulation durch den Agonisten Poly-(I:C) fand eine Phosphorylierung von IRF3 an beiden untersuchten Serin-Resten 386 und 396 statt. Ausgeblieben ist, nach fraktionierter Zellyse und Western Blot, der Nachweis einer phospho-IRF3-Translokation in den Zellkern. Dennoch lässt die signifikante IFN- β -Sekretion nach Poly-(I:C)-Stimulation auf eine hinreichende Signalwegaktivierung schließen. Auch in der RNA-Array-Analyse zeigte sich eine IFN β 1-Expressionssteigerung nach Poly-(I:C)-Stimulation.

In den Untersuchungen von Ayari et al. blieb diese IFN- β -Ausschüttung in T24-Zellen bei Poly-(I:C)-Konzentrationen zwischen 0,1 und 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Medium aus⁷⁵. Die Ursache für diese unterschiedlichen Beobachtungen könnte in Abweichungen von Versuchsaufbau und -durchführung liegen. Beispielsweise beträgt die Inkubationszeit mit Poly-(I:C) in der publizierten Studie bis zu 48 h, während in den hier durchgeführten Experimenten eine maximale Stimulationsdauer von 6 h erreicht wurde. Darüber hinaus wurde von Ayari et al. nicht die gleiche Transfektionssubstanz verwendet⁷⁵.

Neben IFN- β wurde in den hier dargestellten Untersuchungen auch IL-6 von Poly-(I:C) induziert. Dies ließ sich mittels ELISA auf Proteinebene nachweisen und in der Microarray-Analyse auf Transkriptionsebene bestätigen. Bereits vorhandene Studien zu T24/83-Zellen und anderen Zelltypen teilen diese Beobachtung^{75, 76}.

Für die Inhibition des TLR3-Signalwegs wurde der TLR3/dsRNA-Komplex Inhibitor Thiophenecarboxamido-Propionat verwendet. Eine signifikante Hemmung der IFN- β -Ausschüttung von T24/83-Zellen fand sich bereits bei einer Konzentration von 30 μM .

In der Makrophagenzelllinie RAW264.7 wurde bei einer Konzentration von 27 μM eine Hemmung von 90 % der IL-1-Ausschüttung erreicht (IC90-Konzentration)⁵⁶. Die TNF α -Produktion wurde bei einer Konzentration von 10 μM um 60 % reduziert⁵⁶.

Es ist davon auszugehen, dass in unterschiedlichen Zelllinien die Sensibilität für den TLR3-Inhibitor variiert. Auch die untersuchten Zytokine können unterschiedlich stark von einer TLR3-Aktivierung induziert werden.

In den hier durchgeführten Versuchen war eine vollständige Blockade des Signalwegs erwünscht, was bei einer Inhibitor-Konzentration von 100 μM erreicht wurde. Dabei blieb eine IFN- β -Ausschüttung in T24/83-Zellen nach Poly-(I:C)-Stimulation aus. Die zelluläre Reaktionsfähigkeit in Form einer Zytokinausschüttung durch TLR4-Stimulation wurde unter dieser TLR3-Inhibitor-Konzentration nicht beeinflusst.

Somit erfüllen T24/83-Zellen die nötigen Voraussetzungen, um Fragestellungen in Zusammenhang mit dem TLR3-Signalweg und Infektionsverläufen mit *Chlamydia trachomatis* zu bearbeiten.

4.3 TLR3-spezifische Immunantwort auf *Chlamydia trachomatis* Serovar D Infektion bleibt aus

Der bekannte Reaktionsmechanismus einer Zelle bei Aktivierung des TLR3 mündet in der Produktion von IFN- β ⁷⁷. Auch eine TLR3-vermittelte IL-6-Ausschüttung wurde bereits mehrfach beschrieben^{75, 76}. Über den tatsächlichen Nutzen dieser Abwehrreaktion während einer Infektion finden sich, je nach Erreger, kontroverse Publikationen⁷⁸.

Bei T24/83-Zellen konnte in der Immunfluoreszenzmikroskopie das Rekrutieren von TLR3 und seinem Adapterprotein TRIF zu *Chlamydia trachomatis* Serovar D Inklusionen beobachtet werden. Unklar ist, ob das Rekrutieren eine Anlagerung an die Inklusion darstellt oder eine Einlagerung des transmembranständigen Rezeptors in die Inklusionsmembran bzw. in die Endosomenmembran stattfindet.

In der RNA-Array-Analyse konnte für IFN β 1 keine signifikante Induktion in früher und später Infektionsphase nachgewiesen werden. Betrachtet man die Gesamtheit inflammations-assoziiertes Gene, so lässt sich nach 24-stündiger Infektion eine signifikante Induktion mehrerer interferon-induzierter Gene beobachten. Eine simultane TLR3-Inhibition reprimiert diese zum Teil.

Auf Transkriptionsebene erfährt IL6 sowohl in früher als auch in später Infektionsphase eine Induktion. Durch Poly-(I:C) konnte im ELISA ebenfalls eine IL-6-Ausschüttung von T24/83-Zellen bewirkt werden, sodass eine TLR3-vermittelte IL-6-Produktion unter einer *Chlamydia trachomatis* Infektion möglich scheint.

Trotz des funktionsfähigen TLR3-Signalwegs in dieser Zelllinie, der TLR3-Rekrutierung und der Transkriptionsänderungen zeigte sich nach einer Infektion mit *Chlamydia trachomatis* keine TLR3-Signalwegaktivierung auf Proteinebene, weder in Form einer IRF3-Aktivierung und IFN- β -Produktion, noch in Form einer IL-6-Ausschüttung (unveröffentlichte Daten der laborinternen Arbeitsgruppe).

Eine Blockade des Signalwegs durch eine *Chlamydia trachomatis* Infektion erscheint unwahrscheinlich. Einerseits ist in der Immunfluoreszenzfärbung während einer Infektion weiterhin intrazellulär vorliegendes TLR3 und TRIF darstellbar. Andererseits konnte durch eine Poly-(I:C)-Stimulation während einer Infektion eine regelrechte IFN- β -Ausschüttung herbeigeführt werden.

In weiterführenden Untersuchungen konnte auch die Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine wie etwa IL-8 oder TNF α durch eine *Chlamydia*

trachomatis Infektion nicht gemessen werden (unveröffentlichte Daten der laborinternen Arbeitsgruppe).

Insgesamt konnte keine inflammatorische Reaktion in Form einer Zytokinausschüttung durch T24/83-Zellen infolge einer *Chlamydia trachomatis* Infektion nachgewiesen werden.

Eine Schlüsselrolle in der Abwehrreaktion gegen *Chlamydia trachomatis* ist TLR3 anhand der hier dargestellten Daten daher nicht zuzuschreiben.

Derbigny et al. untersuchten die IFN- β -Produktion in Zellen der murinen Eileiterzelllinie Bm1.11. Nach einer *Chlamydia muridarum* Infektion wurde eine signifikante IFN- β -Ausschüttung der Zellen gemessen. Mittels siRNA-Knockdown von IRF3 und TRIF wurde diese Ausschüttung auf eine TLR3-Signalwegaktivierung zurückgeführt⁴⁵.

In einer weiteren Veröffentlichung wurde diese TLR3-Abhängigkeit mit einem siRNA-Knockdown des Rezeptors selbst bestätigt⁴⁶. Im Tierexperiment untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe die IFN- β -Sekretion im Urogenitaltrakt von Mäusen durch *Chlamydia muridarum*. Dabei zeigte sich 5 Tage *post infectionem* ein IFN- β -Peak in der Wildtyp-Gruppe, der bei TLR3-defizienten Mäusen nicht auftrat. Auf die Menge der ausgeschiedenen infektiösen *Chlamydia muridarum* Partikel hatte ein TLR3-Knockout keinen Einfluss⁴⁶.

Eine weitere Versuchsreihe beinhaltete die Infektion immortalisierter humaner Eileiterzellen (OE-E6/E7) mit *Chlamydia trachomatis* Serovar L2. Es zeigte sich eine signifikante IFN- β -Sekretion der Zellen unter Infektion, die durch siRNA-Knockdown und Knockout von TLR3 gesenkt werden konnte⁴⁹.

Zwischen dem Aufbau der Experimente in den beschriebenen Publikationen und in dieser Arbeit bestehen mehrere Unterschiede. Einer davon ist die verwendete „Multiplicity of Infection“ (MOI), die Anzahl der Erreger pro Zelle. Die beschriebene IFN- β -Sekretion wurde bei vergleichsweise hoher Erregerlast bei einer MOI von 10 beobachtet^{45, 46, 49}, wohingegen in den hier dargestellten Versuchen je nach Versuchsaufbau eine MOI zwischen 0,1 und 5 verwendet wurde.

Die Variation der Erregerzahl pro Zelle in dieser Arbeit hat folgende Begründung: Für die Untersuchung der infektionsbedingten Zytokinausschüttung wurde, um einen ausreichenden Reiz für eine messbare Zytokinproduktion zu gewährleisten, eine MOI von 2 bzw. 5 verwendet. Eine hohe Erregerzahl pro Zelle führt zu einem Verschmelzen der Inklusionen. Um dies zu verhindern, wurden bei der Untersuchung von Anzahl und Größe der Inklusionen niedrige MOIs eingesetzt. Insbesondere bei der Untersuchung der zweiten Generation *Chlamydia trachomatis* musste die Vermehrung während der Infektion der ersten Generation berücksichtigt werden, sodass eine MOI von 0,1 nötig war, um eine Auszählung der Inklusionen zu ermöglichen.

Während die Infektion mit *Chlamydia trachomatis* in dieser Arbeit lediglich durch die Zugabe des Erregers in das Medium der Zellen erreicht wurde, fand in den genannten Studien zu *Chlamydia muridarum* bzw. *Chlamydia trachomatis* Serovar L2 und D das Zentrifugieren der Zellen bei 300⁴⁵ bzw. 200⁴⁹ x g für eine Stunde statt. Die Experimente stellen ein Modell für eine *in vivo* Infektion mit *Chlamydia trachomatis* dar. Daher sollte das Ziel sein, unter möglichst realitätsnahen Bedingungen eine Infektion herbeizuführen. Das Zentrifugieren bedeutet in jedem Fall nicht-physiologischen Stress für die Zellen, der umgangen werden sollte. Da durchaus eine erfolgreiche Infektion durch die reine Zugabe des Erregers zum Zellmedium erreicht werden kann, wurde hier bewusst auf das Zentrifugieren verzichtet. Nicht zuletzt sind die verwendeten Zelllinien ein entscheidendes Merkmal,

welches in der Vergangenheit publizierte Ergebnisse von den hier dargestellten Daten unterscheidet.

Bei einer Infektion mit *Chlamydia trachomatis* Serovar D stößt der Erreger *in vivo* auf unterschiedliche Zelltypen des menschlichen Urogenitaltrakts. Betrachtet man den weiblichen Urogenitaltrakt, können Zellen der vaginalen Mukosa, der Harnwege und Harnblase, der Zervix, aber auch des gesamten Uterus sowie der Eileiter und der Eierstöcke betroffen sein.

HeLa-Zellen sollten hier als Modell für die Zervix dienen. Bei der Übertragung von *Chlamydia trachomatis* ist diese durch anatomische Gegebenheiten dem Erreger ausgesetzt. Aus den dargestellten Untersuchungen geht hervor, dass diese Zelllinie eine nicht funktionsfähige TLR3-Signalkaskade besitzt. Dies verhindert verlässliche Schlussfolgerungen über TLR3-abhängige Inflammationsreaktionen dieser Zellen.

Als Vertreter der Harnblase wurden T24/83-Zellen gewählt, diese ist ebenfalls durch den Urogenitaltrakt von *Chlamydia trachomatis* erreichbar. Eine TLR3-abhängige Inflammationsreaktion konnte hier nicht nachgewiesen werden. Aufgeführte Veröffentlichungen beschreiben eine TLR3-abhängige Inflammationsreaktion in Zellen humaner Eileiter⁴⁹. Es ist durchaus denkbar, dass eine *Chlamydia trachomatis* Infektion in Zellen unterschiedlicher Lokalisation und Funktion verschiedene Reaktionen hervorruft. Daher ist auch die differenzierte Betrachtung verschiedener Zelltypen wichtig, wobei uneinheitliche Ergebnisse keinen Widerspruch darstellen müssen.

4.4 *Chlamydia trachomatis* Serovar D benötigt TLR3 für eine erfolgreiche Reproduktion

Im Gegensatz zu seiner bekannten antiviralen und somit zellprotektiven Funktion suggerieren die vorgestellten Ergebnisse, dass TLR3 die Entwicklung von *Chlamydia trachomatis* unterstützt. Während die initiale Infektionsrate unter TLR3-Inhibition unverändert ist (Abbildung 16), zeigt sich das Inklusionswachstum in den ersten 48 h eingeschränkt (Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 17A). Auch die Infektiosität der Nachfolgegeneration (Abbildung 19) und dessen intrazelluläres Wachstum (Abbildung 15, Abbildung 17B) sind beeinträchtigt, wobei die TLR3-Inhibition während des Wachstums der ersten Generation *Chlamydia trachomatis* hierfür entscheidend ist. Die Nachkommenzahl ist, unabhängig von der Infektionsdauer des ersten Infektionszyklus, stark reduziert. Unter TLR3-Inhibition werden nahezu keine infektiösen Nachkommen gebildet (Abbildung 18). Dies ist nicht durch eine verlangsamte Vermehrung zu erklären und deutet daher auf eine fehlerhafte Entwicklung von *Chlamydia trachomatis* hin.

Die Färbung der Inklusionsinhalte mit DAPI in der Erstinfektion macht das Erbmateriale von *Chlamydia trachomatis* sichtbar. Inklusionen TLR3-inhibierter Zellen scheinen weniger stark kondensiertes Erbmateriale zu beinhalten. Inklusionen, welche mit DMSO behandelte Zellen hervorbringen, sind nahezu vollständig mit Erbmateriale in Form von punktuell stark fluoreszierenden Strukturen ausgefüllt. Dahingegen bilden sich in TLR3-inhibierten Zellen Inklusionen, die neben wenigen punktförmigen Strukturen größere, schwach fluoreszierende Bereiche besitzen.

In der Literatur wurden bereits mehrfach ähnliche Veränderungen der Binnenstruktur von chlamydialen Inklusionen als Auftreten von „aberrant bodies“ beschrieben. Die Bildung von „aberrant bodies“ wurde beispielsweise durch einen Aminosäuremangel, die Zugabe von IFN oder eine kontinuierliche Infektion hervorgerufen. Häufig waren diese „aberrant bodies“ größer als RBs und besaßen eine herabgesetzte Dichte⁷⁹⁻⁸².

Diese Veränderungen sind also vergleichbar mit den hier vorgestellten Beobachtungen und führen zu der Annahme, dass unter einer TLR3-Inhibition die Bildung von „aberrant bodies“ stattfindet.

Im Gegensatz dazu ist die Bildung infektiöser *Chlamydia trachomatis* Nachkommen unter TLR4-Inhibition möglich.

Eine 2019 veröffentlichte Arbeit von Xu et al. hat ebenfalls das Inklusionswachstum von *Chlamydia trachomatis* untersucht. Als Wirtszellen dienten humane Eileiterzellen (hOE) der Zelllinie OE-E6/E7, deren Infektion mit einer hohen Bakterienlast stattfand (MOI von 10). Die Auswertung des Inklusionswachstums geschah mit zwei unterschiedlichen Methoden: Nach einer 36-stündigen Infektion mit *Chlamydia trachomatis* Serovar D folgte eine Beurteilung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie, wohingegen nach einer 24-stündigen Infektion mit dem Serovar L2 die Durchflusszytometrie herangezogen wurde. Die Inklusionen in Wildtypzellen wurden mit Zellen verglichen, in welchen mittels CRISPR lentivirus System eine heterozygote TLR3-Defizienz hergestellt wurde.

HOE-Zellen mit dieser TLR3-Defizienz zeigten in der beschriebenen Veröffentlichung vergrößerte Inklusionen. In der Durchflusszytometrie wurde eine Vergrößerung des Durchmessers um durchschnittlich 2 µm gemessen⁴⁹. Interpretiert wurde dies als verbessertes Wachstum unter TLR3-Abwesenheit, möglicherweise durch das Fehlen von TLR3-bedingten wachstumsinhibierenden Effekten.

Ein Infektionszyklus von *Chlamydia trachomatis* Serovar D benötigt etwa 48 h¹¹. Verläuft dieser ungestört, so werden die Inklusionsinhalte nach diesem Zeitraum freigesetzt und infizieren weitere Zellen. Ist das Inklusionswachstum jedoch verlangsamt oder durch eine fehlerhafte Replikation eingeschränkt, könnte der Verbleib der Inklusionen in den Zellen prolongiert sein.

Eine abweichende Auslegung der Ergebnisse wäre demnach ein normales Wachstum der Inklusionen in hOE-Wildtyp-Zellen, die bei einer MOI von 10 innerhalb einer Zelle fusionieren und daher bereits nach 36-stündiger Infektion bei entsprechender Größe ihren Inhalt freigesetzt haben. In TLR3-Knockout-Zellen könnte ein fehlerhafter Replikationszyklus zu einer verzögerten Freisetzung des Inhalts führen. Somit sind die Inklusionen, welche noch dem ersten Infektionszyklus angehören, in TLR3-defizienten Zellen größer als die Inklusionen in Wildtyp-Zellen, da hier bereits eine zweite Infektionsrunde eingetreten ist.

Auch in den hier beschriebenen Versuchen führte eine geringere TLR3-Inhibitor-Konzentration (Abbildung 14) sowie ein verlängerter Infektionszeitraum von 72 und 96 h (Abbildung 17A) zu einem Verschwinden der signifikanten Größendifferenz zwischen den Inklusionen inhibierter und nicht-inhibierter T24/83-Zellen. Ein ähnlicher Mechanismus könnte in diesem Fall dazu führen, dass das Persistieren der Inklusionen das Größenverhältnis zugunsten der Inklusionen in TLR3-inhibierten Zellen verschiebt, während die Inhalte der Inklusionen in der Kontrollgruppe bei einer regelrechten Replikation bereits freigesetzt wurden.

Verglichen mit den Inklusionen in Wildtypzellen erwecken in der beschriebenen Veröffentlichung die in den Immunfluoreszenzbildern unter TLR3-Abwesenheit sichtbaren Inklusionen den Eindruck, heterogener und weniger dicht gefüllt zu sein. Objektiviert werden konnte dies jedoch nicht⁴⁹. Die Interpretation von Derbigny et al. ist eine verstärkte Reproduktion der Chlamydien. Allerdings könnte auch hier der veränderte Inklusionsinhalt ein Korrelat für eine fehlerhafte Replikation sein und somit die beschriebenen Strukturen „aberrant bodies“ darstellen.

Um zu klären, was wirklich innerhalb der Inklusionen geschieht, ob eine Inklusionsvergrößerung mit einer gesteigerten Aktivität der RBs einhergeht oder

durch die Bildung nicht-vermehrungsfähiger Einheiten zustande kommt, muss durch weitere Methodik geklärt werden. Beispielsweise ermöglicht die Aufnahme elektronenmikroskopischer Bilder eine Differenzierung der verschiedenen Existenzformen von *Chlamydia trachomatis* anhand von Größe und Feinstruktur der DNA.

Auch die Infektiosität der Zweitgeneration *Chlamydia trachomatis* wurde von Derbigny et al. untersucht. Die Erstinfektion mit *Chlamydia trachomatis* Serovar D mit einer MOI von 5 erfolgte in hOE-Zellen für 24, 48, 60 und 72 h, die Zweitinfektion der HeLa-Zellen diente dem Auszählen der infektiösen Einheiten pro Zelle. Ab einer Infektionsdauer der Erstinfektion von 60 h wurde eine signifikant gesteigerte Nachkommenproduktion in TLR3-defizienten hOE-Zellen nachgewiesen⁴⁹.

Bei einer durchschnittlichen Anzahl von 5 Erregern pro Wirtszelle ist davon auszugehen, dass nach einer 48-stündigen Infektionsdauer die Replikation von *Chlamydia trachomatis* nahezu in allen Zellen abgelaufen ist. Dies ist häufig mit dem Untergang der infizierten Zelle verbunden¹⁴. Aus diesem Grund ist eine Verlängerung der Infektionsdauer auf 60 bzw. 72 h bei einer derart hohen MOI nicht sinnvoll.

Die Ernährung von *Chlamydia trachomatis* Inklusionen über die Zufuhr zelleigener Lipide, was für eine einwandfreie Entwicklung des Erregers von Bedeutung ist, wurde bereits in der Vergangenheit untersucht und diskutiert⁸³. Die Rolle des TLR3 der Wirtszelle wurde bisher bei dieser Diskussion nicht berücksichtigt.

Bei der Auswertung des RNA-Arrays fanden sich einzelne Gene und vollständige Signalwege des zellulären Lipidmetabolismus, die während einer *Chlamydia trachomatis* Infektion TLR3-abhängig in ihrer Expression verändert wurden.

Neben den beiden Genen PTGS2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2) und CH25H (Cholesterin 25-Hydroxylase), die bekanntermaßen eine proinflammatorische Reaktion der Zelle hervorrufen^{84, 85}, veränderte sich auch die Expressionsintensität weiterer Gene, deren Rollen im Zusammenhang mit einer *Chlamydia trachomatis* Infektion noch nicht eindeutig geklärt sind.

Das Gen PLA2G4A (phospholipase A2 group IVA) ist eines davon. Nach 24-stündiger Infektion ist eine gesteigerte Transkription dieses Gens zu detektieren, welche durch gleichzeitige TLR3-Inhibition aufgehoben wird (Abbildung 27).

In der Literatur beschrieben ist eine Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A2 über eine ERK-Aktivierung. Dies soll Inklusionen von *Chlamydia trachomatis* Serovar L2 mit für deren Entwicklung notwendigen Glycerophospholipiden versorgen. Der Auslöser für die ERK-Aktivierung ist unklar, wobei intrazelluläre Mechanismen wahrscheinlich sind⁸⁶.

Betrachtet man den Steroid Biosyntheseweg zum frühen Infektionszeitpunkt, so lässt sich eine TLR3-abhängige Induktion desselben feststellen (Abbildung 26). Vorherige Untersuchungen von Hackstadt et al. haben gezeigt, dass zelleigenes Cholesterin in Inklusionen von *Chlamydia trachomatis* angereichert wird⁸⁷. Darüber hinaus kann die Entwicklung der Inklusionen durch Unterbinden der Cholesterinzufuhr verhindert werden⁶⁶.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass TLR3, neben seiner bereits bekannten Funktion, mit dem Lipidmetabolismus der Zelle interagieren und diesen verändern kann. Dies ist eine Eigenschaft, die sich der Erreger *Chlamydia trachomatis* möglicherweise zu Nutzen macht, um eine ausreichende Nährstoffversorgung während seiner Replikation zu gewährleisten. Wird dieser Mechanismus durch eine funktionelle TLR3-Blockade unterbunden, könnte dies die Vermehrung des Erregers verhindern.

Der Eingriff von TLR3 in den Zellmetabolismus ist in dieser Form noch nicht bekannt. Neben einem rezeptorspezifischen Effekt, der durch die selektive Inhibition zustande kommt, könnte eine Beeinflussung des Metabolismus unabhängig von TLR3 im Sinne eines unerwünschten Nebeneffektes des Inhibitors der Fall sein. Andere Methoden müssen zum Ausschluss solcher unerwünschten Nebeneffekte bzw. zur Bestätigung der TLR3-Abhängigkeit der Beobachtungen herangezogen werden. Die Etablierung von T24/83-Zellen mit TLR3-Knockout bzw. -Knockdown bietet eine alternative Möglichkeit, die Signalweiterleitung über TLR3 zu verhindern. Wie sich dieser Eingriff auf die Expression einzelner Proteine, beispielsweise PLA2G4A, auswirkt, könnte anhand von Western Blot oder FACS evaluiert werden.

Das Präsentieren ähnlicher Veränderungen für Metabolismus-relevante Proteine solcher Zellen würde die hier dargestellten Beobachtungen bestätigen und die Hypothese einer TLR3-abhängigen Ernährung der Inklusionen unterstützen.

4.5 Ausblick

Diese Dissertation liefert Ergebnisse und Interpretationen über die Entwicklung von *Chlamydia trachomatis* Serovar D in humanen Epithelzelllinien mit erheblichem Diskussionsbedarf. Zusammenfassend wird die These aufgestellt, dass *Chlamydia trachomatis* Serovar D während einer Infektion TLR3 der Wirtszelle für die eigene Reproduktion benötigt. Die Versorgung der Inklusionen mit Metaboliten der Zelle könnte hierfür eine entscheidende Rolle spielen. Fällt diese Versorgung weg, ist *Chlamydia trachomatis* nicht in der Lage, seinen Replikationszyklus erfolgreich zu durchlaufen.

Als eine Schwachstelle in den durchgeführten Experimenten ist die einseitige Methodik zum funktionellen Ausschalten von TLR3 zu nennen. Weiterführende Untersuchungen sollten das Spektrum der Methodik erweitern, um auszuschließen, dass es sich bei den Beobachtungen um unspezifische Nebenwirkungen des verwendeten Inhibitors handelt. Beispielsweise stellen siRNA silencing oder die Etablierung von Knockout-Zellen mittels CRISPR/Cas eine Alternative dar, um das Fehlen jeglicher TLR3-Funktionen während einer Infektion zu erreichen. Die Ausbildung desselben Phänotyps, nämlich die fehlende Produktion infektiöser *Chlamydia trachomatis* Nachkommen, würde die gezeigten Ergebnisse unterstützen. Verantwortlich für den Effekt von fehlendem TLR3 auf die Inklusionsentwicklung erscheinen einige Gene, die während einer *Chlamydia trachomatis* Infektion TLR3-abhängig eine Expressionsveränderung erfahren und in zelluläre Stoffwechselfvorgänge eingebunden sind. Der Knockdown oder Knockout bietet auch hier die Möglichkeit, die Rolle einzelner Metabolismus-Gene in diesem Zusammenhang zu untersuchen.

Die Immunfluoreszenzmikroskopie während einer *Chlamydia trachomatis* Infektion konnte bereits Anhaltspunkte dafür liefern, dass sich während einer Infektion unter TLR3-Inhibition „aberrant bodies“ ausbilden. Eine Untersuchung der Inklusionsinhalte mittels Elektronenmikroskop bietet die Möglichkeit, Inklusionsinhalte hochauflösend darzustellen und anhand von Größe und Struktur der DNA eine noch detailliertere Aussage bezüglich Veränderungen des Entwicklungszyklus von *Chlamydia trachomatis* unter TLR3-Inhibition zu treffen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das obligat intrazelluläre Bakterium *Chlamydia trachomatis* Serovar D ist der Erreger einer der häufigsten Geschlechtskrankheiten weltweit und kann bei Frauen zu Infertilität führen. Inwieweit *Chlamydia trachomatis* mit dem intrazellulären Pattern Recognition Receptor (PRR) Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3) interagiert, ist noch nicht hinreichend untersucht.

Diese Arbeit weist das Rekrutieren von TLR3 und seinem intrazellulären Adapterprotein TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) zu Inklusionen von *Chlamydia trachomatis* in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa und der Blasenkarzinomzelllinie T24/83 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nach.

Als Anhaltspunkt für eine Signalwegaktivierung dient die Phosphorylierung von interferon regulatory factor 3 (IRF3), sichtbar im Western Blot, und die Produktion von Interferon beta (IFN- β), nachgewiesen im ELISA.

HeLa-Zellen zeigten einen defekten TLR3-Signalweg, der nach Stimulation mit dem selektiven TLR3-Agonisten Poly-(I:C) nicht aktiviert werden konnte.

T24/83-Zellen hingegen wiesen einen TLR3-Signalweg auf, der auf beiden Ebenen eine Aktivierung durch Poly-(I:C) zeigte.

Auf eine Infektion mit *Chlamydia trachomatis* folgte in keiner der beiden Zelllinien eine adäquate Signalwegaktivierung durch TLR3, weder im Western Blot (phospho-IRF3-Detektion und Rekrutierung in den Zellkern) noch im ELISA (IFN- β -Produktion). Zwar konnte eine RNA-Analyse nach 24-stündiger Infektion eine gesteigerte Transkription IFN-verwandter und -induzierter Gene belegen, allerdings traf das für das IFN β 1-Gen selbst nicht zu.

Der Einsatz des TLR3/dsRNA-Komplex Inhibitors Thiophenecarboxamido-Propionat führte bei simultaner Stimulation durch Poly-(I:C) zu einer selektiven Blockade des TLR3-Signalwegs in T24/83-Zellen. Bei der Untersuchung von *Chlamydia trachomatis* unter TLR3-Inhibition konnte ein verlangsamtes Inklusionswachstum festgestellt werden. Die Bildung infektiöser Nachkommen war unter TLR3-Inhibition gestört. Schließlich zeigte die Darstellung des chlamydialen Erbmaterials innerhalb der Inklusionen durch Immunfluoreszenzmikroskopie unter TLR3-Inhibition Veränderungen in Form und Struktur.

In der Analyse zellulärer RNA-Expressionsintensitäten konnten intrazelluläre Veränderungen während einer Infektion dargestellt werden. Zudem konnte die Gentranskription infizierter Zellen mit derjenigen in infizierten und zeitgleich inhibierten Zellen verglichen werden.

Bei der Auswertung des RNA-Arrays konnten TLR3-abhängige Expressionsänderungen einzelner Gene des Lipidmetabolismus sowie des kompletten Steroidbiosynthesewegs identifiziert werden. In der Literatur bereits mehrfach beschrieben ist die Versorgung von *Chlamydia trachomatis* Inklusionen mit zelleigenen Lipiden, die eine erfolgreiche Replikation gewährleistet.

Ob ein kausaler Zusammenhang zwischen den Entwicklungsdefiziten der Inklusionen unter TLR3-Inhibition und den TLR3-Inhibitor-bedingten Veränderungen im Lipidmetabolismus besteht, muss durch weitere Experimente überprüft werden. Insbesondere die Verwendung alternativer Methoden wie beispielsweise die Infektion TLR3-defizitärer Zellen oder der Knockdown einzelner Metabolismus-Gene spielen eine wichtige Rolle dabei, unspezifische Nebenwirkungen des verwendeten TLR3-Inhibitors auszuschließen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Moulder, JW: The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses. *Annu Rev Microbiol*, 20: 107-130, 1966.
2. Abdelrahman, YM, Belland, RJ: The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol Rev*, 29: 949-959, 2005.
3. Nunes, A, Gomes, JP: Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of Chlamydia. *Infect Genet Evol*, 23: 49-64, 2014.
4. Everett, KD: Chlamydia and Chlamydiales: more than meets the eye. *Vet Microbiol*, 75: 109-126, 2000.
5. Bebear, C, de Barbeyrac, B: Genital Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Infect*, 15: 4-10, 2009.
6. Fenton, KA, Lowndes, CM: Recent trends in the epidemiology of sexually transmitted infections in the European Union. *Sex Transm Infect*, 80: 255-263, 2004.
7. Rowley, J, Vander Hoorn, S, Korenromp, E, Low, N, Unemo, M, Abu-Raddad, LJ, Chico, RM, Smolak, A, Newman, L, Gottlieb, S, Thwin, SS, Broutet, N, Taylor, MM: Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ*, 97: 548-562P, 2019.
8. Banhart, S, Rose, L, Aeberhard, L, Koch-Edelmann, S, Heuer, D: Chlamydia trachomatis and its interaction with the cellular retromer. *Int J Med Microbiol*, 2017.
9. Witkin, SS, Minis, E, Athanasiou, A, Leizer, J, Linhares, IM: Chlamydia trachomatis: the Persistent Pathogen. *Clin Vaccine Immunol*, 24, 2017.
10. Nans, A, Ford, C, Hayward, RD: Host-pathogen reorganisation during host cell entry by Chlamydia trachomatis. *Microbes Infect*, 17: 727-731, 2015.
11. Lee, JK, Enciso, GA, Boassa, D, Chander, CN, Lou, TH, Pairawan, SS, Guo, MC, Wan, FYM, Ellisman, MH, Sutterlin, C, Tan, M: Replication-dependent size reduction precedes differentiation in Chlamydia trachomatis. *Nat Commun*, 9: 45, 2018.
12. Elwell, CA, Jiang, S, Kim, JH, Lee, A, Wittmann, T, Hanada, K, Melancon, P, Engel, JN: Chlamydia trachomatis co-opts GBF1 and CERT to acquire host sphingomyelin for distinct roles during intracellular development. *PLoS Pathog*, 7: e1002198, 2011.
13. Wilson, DP, Timms, P, McElwain, DL, Bavoil, PM: Type III secretion, contact-dependent model for the intracellular development of chlamydia. *Bull Math Biol*, 68: 161-178, 2006.
14. Hybiske, K, Stephens, RS: Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 11430-11435, 2007.
15. Beatty, WL, Morrison, RP, Byrne, GI: Reactivation of persistent Chlamydia trachomatis infection in cell culture. *Infection and immunity*, 63: 199-205, 1995.
16. Hogan, RJ, Mathews, SA, Mukhopadhyay, S, Summersgill, JT, Timms, P: Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infection and immunity*, 72: 1843-1855, 2004.
17. Patton, DL, Askienazy-Elbhar, M, Henry-Suchet, J, Campbell, LA, Cappuccio, A, Tannous, W, Wang, SP, Kuo, CC: Detection of Chlamydia trachomatis in

- fallopian tube tissue in women with postinfectious tubal infertility. *Am J Obstet Gynecol*, 171: 95-101, 1994.
18. Liu, B, Roberts, CL, Clarke, M, Jorm, L, Hunt, J, Ward, J: Chlamydia and gonorrhoea infections and the risk of adverse obstetric outcomes: a retrospective cohort study. *Sex Transm Infect*, 89: 672-678, 2013.
 19. Hillis, SD, Owens, LM, Marchbanks, PA, Amsterdam, LF, Mac Kenzie, WR: Recurrent chlamydial infections increase the risks of hospitalization for ectopic pregnancy and pelvic inflammatory disease. *Am J Obstet Gynecol*, 176: 103-107, 1997.
 20. Bremer, V, Dudareva-Vizule, S, Buder, S, An der Heiden, M, Jansen, K: [Sexually transmitted infections in Germany : The current epidemiological situation]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 60: 948-957, 2017.
 21. Dr. Viviane Bremer, PDNHB, PD Dr. Wolfgang Frobenius, Dr. Wolfgang Fuchs, Dr. Gisela Gille, Prof. Dr. Gert Gross, Dr. Dagmar Heuer, Prof. Dr. Peter Höger, Dr. Christine Klapp, Prof. Dr. Volker Klauss, Prof. Dr. Walter Krause, Prof. Dr. Jens Gert Kuipers, Andrea Mais, Dr. Christoph Mayr, Prof. Dr. Elisabeth Messmer, PD Dr. Thomas Meyer, Prof. Dr. Harald Moi, Prof. Dr. Andreas Müller, Heidrun Nitschke, Prof. Dr. Andreas Plettenberg, Dr. Anja Potthoff, Prof. Dr. Klaus Püschel, Dr. Heinrich Rasokat, PD Dr. Sebastian M. Schmidt, Prof. Dr. August Stich, Prof. Dr. Eberhard Straube, Dr. Jochen Swoboda, Prof. Dr. Wolfgang Weidne: Infektionen mit Chlamydia trachomatis. 2016 pp 059/005.
 22. Chlamydiosen (Teil1): Erkrankungen durch Chlamydia trachomatis. *RKI-Ratgeber*.
 23. Murphy, K, Weaver, C: *Janeway Immunologie*, Berlin, Heidelberg, Springer Spektrum, 2018.
 24. Moresco, EM, LaVine, D, Beutler, B: Toll-like receptors. *Curr Biol*, 21: R488-493, 2011.
 25. Wira, CR, Grant-Tschudy, KS, Crane-Godreau, MA: Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *American journal of reproductive immunology*, 53: 65-76, 2005.
 26. Kawai, T, Akira, S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11: 373-384, 2010.
 27. Akira, S, Uematsu, S, Takeuchi, O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124: 783-801, 2006.
 28. Funami, K, Sasai, M, Ohba, Y, Oshiumi, H, Seya, T, Matsumoto, M: Spatiotemporal mobilization of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 in response to dsRNA. *Journal of immunology*, 179: 6867-6872, 2007.
 29. Leonard, JN, Ghirlando, R, Askins, J, Bell, JK, Margulies, DH, Davies, DR, Segal, DM: The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 258-263, 2008.
 30. Alexopoulou, L, Holt, AC, Medzhitov, R, Flavell, RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413: 732-738, 2001.
 31. Liu, S, Cai, X, Wu, J, Cong, Q, Chen, X, Li, T, Du, F, Ren, J, Wu, YT, Grishin, NV, Chen, ZJ: Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science*, 347: aaa2630, 2015.

32. Fitzgerald, KA, McWhirter, SM, Faia, KL, Rowe, DC, Latz, E, Golenbock, DT, Coyle, AJ, Liao, SM, Maniatis, T: IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*, 4: 491-496, 2003.
33. Jung, SM, Park, ZY, Rani, S, Takeuchi, O, Akira, S, Lee, JY: Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1. *Journal of immunology*, 186: 499-507, 2011.
34. Panne, D, McWhirter, SM, Maniatis, T, Harrison, SC: Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch. *The Journal of biological chemistry*, 282: 22816-22822, 2007.
35. Lin, R, Heylbroeck, C, Pitha, PM, Hiscott, J: Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*, 18: 2986-2996, 1998.
36. Kumar, KP, McBride, KM, Weaver, BK, Dingwall, C, Reich, NC: Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1. *Mol Cell Biol*, 20: 4159-4168, 2000.
37. Sato, M, Suemori, H, Hata, N, Asagiri, M, Ogasawara, K, Nakao, K, Nakaya, T, Katsuki, M, Noguchi, S, Tanaka, N, Taniguchi, T: Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity*, 13: 539-548, 2000.
38. Niedzwiedzka-Rystwej, P, Ratajczak, W, Tokarz-Deptula, B, Deptula, W: Mechanisms of type I interferon action and its role in infections and diseases transmission in mammals. *Acta Biochim Pol*, 64: 199-205, 2017.
39. Mitchell, WM, Nicodemus, CF, Carter, WA, Horvath, JC, Strayer, DR: Discordant biological and toxicological species responses to TLR3 activation. *Am J Pathol*, 184: 1062-1072, 2014.
40. Shimazu, R, Akashi, S, Ogata, H, Nagai, Y, Fukudome, K, Miyake, K, Kimoto, M: MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 189: 1777-1782, 1999.
41. Kagan, JC, Medzhitov, R: Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*, 125: 943-955, 2006.
42. Kagan, JC, Su, T, Horng, T, Chow, A, Akira, S, Medzhitov, R: TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol*, 9: 361-368, 2008.
43. Rasmussen, SJ, Eckmann, L, Quayle, AJ, Shen, L, Zhang, YX, Anderson, DJ, Fierer, J, Stephens, RS, Kagnoff, MF: Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest*, 99: 77-87, 1997.
44. Stephens, RS: The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol*, 11: 44-51, 2003.
45. Derbigny, WA, Hong, SC, Kerr, MS, Temkit, M, Johnson, RM: Chlamydia muridarum infection elicits a beta interferon response in murine oviduct epithelial cells dependent on interferon regulatory factor 3 and TRIF. *Infection and immunity*, 75: 1280-1290, 2007.
46. Derbigny, WA, Johnson, RM, Toomey, KS, Ofner, S, Jayarapu, K: The Chlamydia muridarum-induced IFN-beta response is TLR3-dependent in murine oviduct epithelial cells. *Journal of immunology*, 185: 6689-6697, 2010.
47. Derbigny, WA, Shobe, LR, Kamran, JC, Toomey, KS, Ofner, S: Identifying a role for Toll-like receptor 3 in the innate immune response to Chlamydia muridarum infection in murine oviduct epithelial cells. *Infection and immunity*, 80: 254-265, 2012.

48. Carrasco, SE, Hu, S, Imai, DM, Kumar, R, Sandusky, GE, Yang, XF, Derbigny, WA: Toll-like receptor 3 (TLR3) promotes the resolution of Chlamydia muridarum genital tract infection in congenic C57BL/6N mice. *PLoS one*, 13: e0195165, 2018.
49. Xu, JZ, Kumar, R, Gong, H, Liu, L, Ramos-Solis, N, Li, Y, Derbigny, WA: Toll-Like Receptor 3 Deficiency Leads to Altered Immune Responses to Chlamydia trachomatis Infection in Human Oviduct Epithelial Cells. *Infection and immunity*, 87, 2019.
50. Schindelin, J, Arganda-Carreras, I, Frise, E, Kaynig, V, Longair, M, Pietzsch, T, Preibisch, S, Rueden, C, Saalfeld, S, Schmid, B, Tinevez, JY, White, DJ, Hartenstein, V, Eliceiri, K, Tomancak, P, Cardona, A: Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9: 676-682, 2012.
51. Kanehisa, M, Goto, S: KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 28: 27-30, 2000.
52. Dai, M, Wang, P, Boyd, AD, Kostov, G, Athey, B, Jones, EG, Bunney, WE, Myers, RM, Speed, TP, Akil, H, Watson, SJ, Meng, F: Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucleic Acids Res*, 33: e175, 2005.
53. R-Core-Team: R: A language and environment for statistical computing. 2017 pp R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
54. RStudio-Team: RStudio: Integrated Development for R. 2015 pp RStudio, Inc., Boston, MA, USA.
55. Sergushichev, A: An algorithm for fast preranked gene set enrichment analysis using cumulative statistic calculation. *bioRxiv*, 2016.
56. Cheng, K, Wang, X, Yin, H: Small-molecule inhibitors of the TLR3/dsRNA complex. *J Am Chem Soc*, 133: 3764-3767, 2011.
57. Matsunaga, N, Tsuchimori, N, Matsumoto, T, li, M: TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Mol Pharmacol*, 79: 34-41, 2011.
58. Clausen, JD, Christiansen, G, Holst, HU, Birkelund, S: Chlamydia trachomatis utilizes the host cell microtubule network during early events of infection. *Mol Microbiol*, 25: 441-449, 1997.
59. Belland, RJ, Zhong, G, Crane, DD, Hogan, D, Sturdevant, D, Sharma, J, Beatty, WL, Caldwell, HD: Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of Chlamydia trachomatis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 8478-8483, 2003.
60. Pioli, PA, Amiel, E, Schaefer, TM, Connolly, JE, Wira, CR, Guyre, PM: Differential expression of Toll-like receptors 2 and 4 in tissues of the human female reproductive tract. *Infection and immunity*, 72: 5799-5806, 2004.
61. Ingalls, RR, Rice, PA, Qureshi, N, Takayama, K, Lin, JS, Golenbock, DT: The inflammatory cytokine response to Chlamydia trachomatis infection is endotoxin mediated. *Infection and immunity*, 63: 3125-3130, 1995.
62. Darville, T, O'Neill, JM, Andrews, CW, Jr., Nagarajan, UM, Stahl, L, Ojcius, DM: Toll-like receptor-2, but not Toll-like receptor-4, is essential for development of oviduct pathology in chlamydial genital tract infection. *Journal of immunology*, 171: 6187-6197, 2003.
63. Nguyen, BD, Cunningham, D, Liang, X, Chen, X, Toone, EJ, Raetz, CR, Zhou, P, Valdivia, RH: Lipooligosaccharide is required for the generation of infectious elementary bodies in Chlamydia trachomatis. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 10284-10289, 2011.
64. Sasu, S, LaVerda, D, Qureshi, N, Golenbock, DT, Beasley, D: Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circ Res*, 89: 244-250, 2001.
 65. van Ooij, C, Kalman, L, van, I, Nishijima, M, Hanada, K, Mostov, K, Engel, JN: Host cell-derived sphingolipids are required for the intracellular growth of Chlamydia trachomatis. *Cell Microbiol*, 2: 627-637, 2000.
 66. Beatty, WL: Trafficking from CD63-positive late endocytic multivesicular bodies is essential for intracellular development of Chlamydia trachomatis. *J Cell Sci*, 119: 350-359, 2006.
 67. O'Leary, NA, Wright, MW, Brister, JR, Ciufu, S, Haddad, D, McVeigh, R, Rajput, B, Robbertse, B, Smith-White, B, Ako-Adjei, D, Astashyn, A, Badretdin, A, Bao, Y, Blinkova, O, Brover, V, Chetvernin, V, Choi, J, Cox, E, Ermolaeva, O, Farrell, CM, Goldfarb, T, Gupta, T, Haft, D, Hatcher, E, Hlavina, W, Joardar, VS, Kodali, VK, Li, W, Maglott, D, Masterson, P, McGarvey, KM, Murphy, MR, O'Neill, K, Pujar, S, Rangwala, SH, Rausch, D, Riddick, LD, Schoch, C, Shkeda, A, Storz, SS, Sun, H, Thibaud-Nissen, F, Tolstoy, I, Tully, RE, Vatsan, AR, Wallin, C, Webb, D, Wu, W, Landrum, MJ, Kimchi, A, Tatusova, T, DiCuccio, M, Kitts, P, Murphy, TD, Pruitt, KD: Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res*, 44: D733-745, 2016.
 68. Kawashima, T, Kosaka, A, Yan, H, Guo, Z, Uchiyama, R, Fukui, R, Kaneko, D, Kumagai, Y, You, DJ, Carreras, J, Uematsu, S, Jang, MH, Takeuchi, O, Kaisho, T, Akira, S, Miyake, K, Tsutsui, H, Saito, T, Nishimura, I, Tsuji, NM: Double-stranded RNA of intestinal commensal but not pathogenic bacteria triggers production of protective interferon-beta. *Immunity*, 38: 1187-1197, 2013.
 69. Perales-Linares, R, Navas-Martin, S: Toll-like receptor 3 in viral pathogenesis: friend or foe? *Immunology*, 140: 153-167, 2013.
 70. Oshiumi, H, Matsumoto, M, Funami, K, Akazawa, T, Seya, T: TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol*, 4: 161-167, 2003.
 71. Enoch, T, Zinn, K, Maniatis, T: Activation of the human beta-interferon gene requires an interferon-inducible factor. *Mol Cell Biol*, 6: 801-810, 1986.
 72. Milhaud, PG, Compagnon, B, Bienvenue, A, Philippot, JR: Interferon production of L929 and HeLa cells enhanced by polyriboinosinic acid-polyribocytidylic acid pH-sensitive liposomes. *Bioconjug Chem*, 3: 402-407, 1992.
 73. Guggenheim, MA, Friedman, RM, Rabson, AS: Interferon: production by chick erythrocytes activated by cell fusion. *Science*, 159: 542-543, 1968.
 74. Clement, JF, Bibeau-Poirier, A, Gravel, SP, Grandvaux, N, Bonneil, E, Thibault, P, Meloche, S, Servant, MJ: Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association. *J Virol*, 82: 3984-3996, 2008.
 75. Ayari, C, Besancon, M, Bergeron, A, LaRue, H, Bussieres, V, Fradet, Y: Poly(I:C) potentiates Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 65: 223-234, 2016.
 76. Liu, Q, Imaizumi, T, Aizawa, T, Hirono, K, Kawaguchi, S, Watanabe, S, Tsugawa, K, Matsumiya, T, Seya, K, Yoshida, H, Tanaka, H: Cytosolic Sensors of Viral RNA Are Involved in the Production of Interleukin-6 via Toll-Like Receptor 3

- Signaling in Human Glomerular Endothelial Cells. *Kidney Blood Press Res*, 44: 62-71, 2019.
77. Takeda, K, Akira, S: TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, 16: 3-9, 2004.
 78. Matsumoto, M, Oshiumi, H, Seya, T: Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev Med Virol*, 21: 67-77, 2011.
 79. Kahane, S, Friedman, MG: Reversibility of heat shock in *Chlamydia trachomatis*. *FEMS Microbiol Lett*, 76: 25-30, 1992.
 80. Coles, AM, Reynolds, DJ, Harper, A, Devitt, A, Pearce, JH: Low-nutrient induction of abnormal chlamydial development: a novel component of chlamydial pathogenesis? *FEMS Microbiol Lett*, 106: 193-200, 1993.
 81. Kutlin, A, Flegg, C, Stenzel, D, Reznik, T, Roblin, PM, Mathews, S, Timms, P, Hammerschlag, MR: Ultrastructural study of *Chlamydia pneumoniae* in a continuous-infection model. *J Clin Microbiol*, 39: 3721-3723, 2001.
 82. Pantoja, LG, Miller, RD, Ramirez, JA, Molestina, RE, Summersgill, JT: Characterization of *Chlamydia pneumoniae* persistence in HEP-2 cells treated with gamma interferon. *Infection and immunity*, 69: 7927-7932, 2001.
 83. Banhart, S, Schafer, EK, Gensch, JM, Heuer, D: Sphingolipid Metabolism and Transport in *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* Infections. *Front Cell Dev Biol*, 7: 223, 2019.
 84. Zhao, J, Chen, J, Li, M, Chen, M, Sun, C: Multifaceted Functions of CH25H and 25HC to Modulate the Lipid Metabolism, Immune Responses, and Broadly Antiviral Activities. *Viruses*, 12, 2020.
 85. Ricciotti, E, FitzGerald, GA: Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31: 986-1000, 2011.
 86. Su, H, McClarty, G, Dong, F, Hatch, GM, Pan, ZK, Zhong, G: Activation of Raf/MEK/ERK/cPLA2 signaling pathway is essential for chlamydial acquisition of host glycerophospholipids. *The Journal of biological chemistry*, 279: 9409-9416, 2004.
 87. Hackstadt, T, Rockey, DD, Heinzen, RA, Scidmore, MA: *Chlamydia trachomatis* interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *EMBO J*, 15: 964-977, 1996.

7 TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle 1: Zu Abbildung 23A, signifikante inflammatorische Genveränderung nach 4-stündiger Poly-(I:C)-Behandlung verglichen mit der Kontrolle

Gensymbol	Genname	log ₂ (Diff of groups = (PolyIC) - (Ctrl))
IRAK3	interleukin 1 receptor associated kinase 3	-1,19202899
IRAK1BP1	interleukin 1 receptor associated kinase 1 binding protein 1	-0,7666794
IL36A	interleukin 36 alpha	0,46677211
IL1A	interleukin 1 alpha	3,51572407
IL1B	interleukin 1 beta	2,08105469
IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	-1,08280259
IL6	interleukin 6	5,59421705
IL6ST	interleukin 6 signal transducer	0,3945454
IL7R	interleukin 7 receptor	1,33003567
IL10RA	interleukin 10 receptor subunit alpha	1,16729294
IL10RB	interleukin 10 receptor subunit beta	-0,32842221
IL11	interleukin 11	1,52231233
IL12A	interleukin 12A	2,72667219
IL13RA1	interleukin 13 receptor subunit alpha 1	-0,83971637
IL13RA2	interleukin 13 receptor subunit alpha 2	-1,27175328
IL18	interleukin 18	-0,41931329
ILF2	interleukin enhancer binding factor 2	-0,60439312
ILF3	interleukin enhancer binding factor 3	-0,28253793
IRAK2	interleukin 1 receptor associated kinase 2	2,44335938
LIF	LIF, interleukin 6 family cytokine	1,22555763
NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated	2,4939814
IRAK4	interleukin 1 receptor associated kinase 4	-0,73450945
IL27RA	interleukin 27 receptor subunit alpha	-0,43515767
IRF9	interferon regulatory factor 9	2,63172979
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	0,237149
NRIR	negative regulator of interferon response (non-protein coding)	1,0784346
IFI44	interferon induced protein 44	3,23065274
IFI44L	interferon induced protein 44 like	4,79210541
IFIT5	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 5	2,52924734
IFI6	interferon alpha inducible protein 6	3,3584409
IFNL2	interferon lambda 2	7,41296564
IFNL3	interferon lambda 3	6,99627774
IFNL1	interferon lambda 1	8,01213273
IFI16	interferon gamma inducible protein 16	0,96848109
IFI27	interferon alpha inducible protein 27	2,60815784
IFI35	interferon induced protein 35	1,18134341

IFIT2	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2	6,21167346
IFIT1	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1	4,7347359
IFIT3	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3	5,14345562
IFNAR1	interferon alpha and beta receptor subunit 1	-0,33563321
IFNAR2	interferon alpha and beta receptor subunit 2	1,1862333
IFNB1	interferon beta 1	7,74761874
IFNGR1	interferon gamma receptor 1	-0,58202417
IFNGR2	interferon gamma receptor 2	1,23843693
IRF2BP2	interferon regulatory factor 2 binding protein 2	1,27911996
IRF1	interferon regulatory factor 1	4,34621971
IRF2	interferon regulatory factor 2	1,33541384
IRF7	interferon regulatory factor 7	2,60331748
ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20	3,44824219
IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	5,57425413
IRF2BPL	interferon regulatory factor 2 binding protein like	0,50724638
IFRD2	interferon related developmental regulator 2	-0,73122594
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	1,27728714
PRKRA	protein activator of interferon induced protein kinase EIF2AK2	-0,76082711
TRAP1	TNF receptor associated protein 1	-0,58399853
TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1	2,92958843
TNFAIP8	TNF alpha induced protein 8	1,8933707
TNFRSF21	TNF receptor superfamily member 21	-0,43595731
TNFRSF9	TNF receptor superfamily member 9	5,94637044
C1QTNF12	C1q and TNF related 12	0,53163213
TNFRSF11B	TNF receptor superfamily member 11b	-0,6858264
TNFRSF12A	TNF receptor superfamily member 12A	-0,81929348
TNFRSF19	TNF receptor superfamily member 19	-0,6408373
TNFAIP1	TNF alpha induced protein 1	0,72499151
TNFAIP2	TNF alpha induced protein 2	3,68563179
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	4,55592589
TNFAIP6	TNF alpha induced protein 6	0,9595045
TRAF1	TNF receptor associated factor 1	5,2314807
TRAF5	TNF receptor associated factor 5	-0,70819888
TNIP2	TNFAIP3 interacting protein 2	0,47920205
TNIP3	TNFAIP3 interacting protein 3	1,45931166
TNFRSF25	TNF receptor superfamily member 25	0,60833475
TNFSF10	TNF superfamily member 10	2,38717165
TNFSF9	TNF superfamily member 9	1,54492188
TNFRSF11A	TNF receptor superfamily member 11a	-0,93538411
TNFRSF10D	TNF receptor superfamily member 10d	1,16117527
TNFRSF10B	TNF receptor superfamily member 10b	1,6271725

LITAF	lipopolysaccharide induced TNF factor	0,76087664
TNF	tumor necrosis factor	4,80106431

Tabelle 2: Zu Abbildung 23B, signifikante inflammatorische Genveränderungen nach 4-stündiger LPS-Behandlung verglichen mit der Kontrolle

Gensymbol	Genname	log2(Diff of groups = (LPS) - (Ctrl))
IL1A	interleukin 1 alpha	2,32041157
IL1B	interleukin 1 beta	2,58365885
IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	0,65385105
IL6	interleukin 6	3,46986809
IL6ST	interleukin 6 signal transducer	0,39324332
IL7R	interleukin 7 receptor	0,58589504
IL11	interleukin 11	-0,52456267
IRAK2	interleukin 1 receptor associated kinase 2	1,15820313
IRF9	interferon regulatory factor 9	0,59820114
IFI44L	interferon induced protein 44 like	0,75401947
IFIT1	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1	-0,48075889
IFNAR2	interferon alpha and beta receptor subunit 2	1,04365517
IFNGR2	interferon gamma receptor 2	0,71011662
IRF2	interferon regulatory factor 2	0,47603884
ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20	0,87044271
TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1	1,75706239
TNFAIP8	TNF alpha induced protein 8	0,80189934
TNFRSF21	TNF receptor superfamily member 21	-0,66707711
TNFRSF9	TNF receptor superfamily member 9	2,64363607
TNFAIP1	TNF alpha induced protein 1	0,64816859
TNFAIP2	TNF alpha induced protein 2	2,80672554
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	2,32415506
TRAF1	TNF receptor associated factor 1	2,55244424
TRAF3	TNF receptor associated factor 3	0,37439142
TNFSF10	TNF superfamily member 10	-0,54853799
TNFRSF10B	TNF receptor superfamily member 10b	0,5334225
TNF	tumor necrosis factor	1,6181216

Tabelle 3: Zu Abbildung 23C, signifikante inflammatorische Genveränderungen nach 4-stündiger *C. trachomatis* Infektion verglichen mit der Kontrolle

Gensymbol	Gename	log₂(Diff of groups = (Chlamydia) - (Ctrl))
IL1A	interleukin 1 alpha	1,14788553
IL1B	interleukin 1 beta	1,02766927
IL6	interleukin 6	1,61700351
IL11	interleukin 11	1,31332796
IRAK2	interleukin 1 receptor associated kinase 2	1,26041667
LIF	LIF, interleukin 6 family cytokine	1,11488055
IRF9	interferon regulatory factor 9	1,05393031
IFI44L	interferon induced protein 44 like	0,81977468
IFI6	interferon alpha inducible protein 6	0,49678725
IFNA14	interferon alpha 14	0,66048885
TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1	0,3807603
TNFRSF9	TNF receptor superfamily member 9	0,82918294
TNFAIP1	TNF alpha induced protein 1	0,32980922
TNFAIP2	TNF alpha induced protein 2	0,55281929
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	1,69069152
TNF	tumor necrosis factor	1,819619

Tabelle 4: Zu Abbildung 23D, signifikante inflammatorische Genveränderungen nach 24-stündiger *C. trachomatis* Infektion verglichen mit der Kontrolle

Gensymbol	Genname	log2(Diff of groups = (Chlamydia) - (Ctrl))
IL1B	interleukin 1 beta	0,28900825
IL6	interleukin 6	1,08380805
IL7R	interleukin 7 receptor	0,26847331
IL11	interleukin 11	0,55403646
IL13RA2	interleukin 13 receptor subunit alpha 2	0,91181098
LIF	LIF, interleukin 6 family cytokine	0,28367784
IRF9	interferon regulatory factor 9	1,20602756
IFI44	interferon induced protein 44	1,38294813
IFI44L	interferon induced protein 44 like	2,66184489
IFIT5	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 5	0,4102105
IFI6	interferon alpha inducible protein 6	1,86675347
IFI16	interferon gamma inducible protein 16	0,56814236
IFI27	interferon alpha inducible protein 27	1,10754395
IFI35	interferon induced protein 35	0,46879069
IFIT2	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2	2,26224772
IFIT1	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1	2,62383355
IFIT3	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3	1,99551053
IRF7	interferon regulatory factor 7	0,43809679
ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20	0,48201497
IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	1,9226888
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	0,72314453
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	0,79999457
TNFSF10	TNF superfamily member 10	1,00133599

Tabelle 5: Zu Abbildung 27A, signifikante Genveränderungen des Lipidmetabolismus' nach 24-stündiger *C. trachomatis* Infektion verglichen mit der Kontrolle

Gensymbol	Gename	log2 (Diff of groups = (Chlamydia) - (Ctrl))
ALDH3A2	aldehyde dehydrogenase 3 family member A2	-0,41923014
CERK	ceramide kinase	-0,32146539
CH25H	cholesterol 25-hydroxylase	0,57134332
GK2	glycerol kinase 2	-0,38188002
GPAT3	glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	0,48569065
GPD1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	-0,44843886
LPCAT2	lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	-0,52589925
NEU1	neuraminidase 1	0,46588813
PLA2G3	phospholipase A2 group III	0,51795112
PLA2G4A	phospholipase A2 group IVA	0,71346029
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	1,2364502
TBXAS1	thromboxane A synthase 1	-0,33635796

Tabelle 6: Zu Abbildung 27B, signifikante Genveränderungen des Lipidmetabolismus' nach 24-stündiger *C. trachomatis* Infektion in Kombination mit TLR3-Inhibition verglichen mit der Kontrolle

Gensymbol	Genname	log ₂ (Diff of groups = (Chlamydia+TLR3-Inhibitor) - (Ctrl))
ACAA2	acetyl-CoA acyltransferase 2	-0,98710124
ACAT1	acetyl-CoA acetyltransferase 1	-0,51011827
ACSL5	acyl-CoA synthetase long chain family member 5	-0,31248644
AGPAT2	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2	-0,42263455
AGPS	alkylglycerone phosphate synthase	-0,61012099
AKR1A1	aldo-keto reductase family 1 member A1	-0,45142958
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1 member C3	0,71573215
ALDH1B1	aldehyde dehydrogenase 1 family member B1	-0,77517361
ALDH7A1	aldehyde dehydrogenase 7 family member A1	-0,69155545
B4GALT6	beta-1,4-galactosyltransferase 6	0,53938802
CBR3	carbonyl reductase 3	-0,62441678
CHKA	choline kinase alpha	1,09933811
COMT	catechol-O-methyltransferase	0,35031467
CPT1A	carnitine palmitoyltransferase 1A	0,49172635
CYP27A1	cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1	0,52814399
CYP2J2	cytochrome P450 family 2 subfamily J member 2	0,38600667
CYP2R1	cytochrome P450 family 2 subfamily R member 1	0,49141439
CYP51A1	cytochrome P450 family 51 subfamily A member 1	0,50929091
DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase 2	0,56907823
DGKD	diacylglycerol kinase delta	0,65100098
DGKE	diacylglycerol kinase epsilon	0,36667209
DGKG	diacylglycerol kinase gamma	0,56791857
DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	0,52886285
ECHS1	enoyl-CoA hydratase, short chain 1	-0,32169596
ETNK1	ethanolamine kinase 1	0,47154405
GBA	glucosylceramidase beta	0,64667426
GLB1	galactosidase beta 1	0,31484646
GPAT3	glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	1,42774794
GPAT4	glycerol-3-phosphate acyltransferase 4	0,34122721
GPD1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	-0,40042453
GPD1L	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like	-0,73583984
GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	-0,53385417
HADH	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0,47782389
LPCAT1	lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	-0,40946452

LPCAT3	lysophosphatidylcholine acyltransferase 3	-0,68885634
LPCAT4	lysophosphatidylcholine acyltransferase 4	-0,45867242
LSS	lanosterol synthase	0,40780979
MBOAT1	membrane bound O-acyltransferase domain containing 1	-0,53390842
MSMO1	methylsterol monooxygenase 1	1,0734592
NEU1	neuraminidase 1	1,35260688
NSDHL	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	0,31891547
PAFAH1B3	platelet activating factor acetylhydrolase 1b catalytic subunit 3	-0,39830187
PEMT	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	-0,2616645
PGS1	phosphatidylglycerophosphate synthase 1	0,38054742
PLA2G15	phospholipase A2 group XV	0,66389974
PLD2	phospholipase D2	0,39378526
PLPP1	phospholipid phosphatase 1	0,43173557
PLPP2	phospholipid phosphatase 2	-0,7731798
PTDSS1	phosphatidylserine synthase 1	-0,49007161
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	1,62316895
SC5D	sterol-C5-desaturase	0,75750054
SELENOI	selenoprotein I	-0,32933214
SGMS1	sphingomyelin synthase 1	0,65186903
SGPL1	sphingosine-1-phosphate lyase 1	0,56852214
SGPP1	sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	0,64834256
SMPD1	sphingomyelin phosphodiesterase 1	0,80079481
SQLE	squalene epoxidase	0,37722439
SRD5A3	steroid 5 alpha-reductase 3	0,66821289
TAZ	tafazzin	0,64017741
TBXAS1	thromboxane A synthase 1	-0,65113661
TKFC	triokinase and FMN cyclase	0,46005588
TM7SF2	transmembrane 7 superfamily member 2	1,0836046
UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7	-0,90256076

Tabelle 7: Zu Abbildung 27C, signifikante Genveränderungen des Lipidmetabolismus' nach 4-stündiger Poly-(I:C)-Behandlung verglichen mit der Kontrolle

Gensymbol	Gename	log2(Diff of groups = (PolyIC) - (Ctrl))
ACAA2	acetyl-CoA acyltransferase 2	-1,18293563
ACADM	acyl-CoA dehydrogenase medium chain	-0,54194973
ACADSB	acyl-CoA dehydrogenase short/branched chain	-1,09471241
ACAT1	acetyl-CoA acetyltransferase 1	-0,77187358
ACOX1	acyl-CoA oxidase 1	-0,38159534
ACSL1	acyl-CoA synthetase long chain family member 1	-0,91433849
ACSL3	acyl-CoA synthetase long chain family member 3	0,84677876
ACSL4	acyl-CoA synthetase long chain family member 4	-0,67204484
ACSL5	acyl-CoA synthetase long chain family member 5	-0,61362092
ADH5	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	-0,71064029
AGK	acylglycerol kinase	-0,44797328
AGPS	alkylglycerone phosphate synthase	-0,83043903
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1 member C3	-0,59920601
ALDH1B1	aldehyde dehydrogenase 1 family member B1	-0,44348675
ALDH3A2	aldehyde dehydrogenase 3 family member A2	-1,1739555
ALDH7A1	aldehyde dehydrogenase 7 family member A1	-0,995747
ALDH9A1	aldehyde dehydrogenase 9 family member A1	-0,57486272
ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase 1	-0,97422724
B4GALT6	beta-1,4-galactosyltransferase 6	-0,81660439
CDIPT	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase	-0,68783967
CERK	ceramide kinase	-0,74024853
CH25H	cholesterol 25-hydroxylase	4,23934627
CHKA	choline kinase alpha	-0,39816859
COMT	catechol-O-methyltransferase	-0,29435575
CPT1A	carnitine palmitoyltransferase 1A	-0,55992414
CYP27A1	cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1	-1,06805508
CYP2U1	cytochrome P450 family 2 subfamily U member 1	-0,72968325
CYP4A11	cytochrome P450 family 4 subfamily A member 11	0,81066718
CYP51A1	cytochrome P450 family 51 subfamily A member 1	-0,54098732
DGKD	diacylglycerol kinase delta	-0,61844712

DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	-0,63731318
EBP	emopamil binding protein (sterol isomerase)	-0,41952559
ECI2	enoyl-CoA delta isomerase 2	-0,71290478
EHHADH	enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase	-0,76576653
ELOVL6	ELOVL fatty acid elongase 6	-0,58815246
FADS1	fatty acid desaturase 1	-0,53344373
GALC	galactosylceramidase	-0,95244565
GLB1	galactosidase beta 1	-0,5602992
GNPAT	glyceronephosphate O-acyltransferase	-0,60752802
GPAM	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	-1,07223024
GPAT3	glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	-1,16794752
GPD1L	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like	-0,57107677
GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	-0,74973817
GPX1	glutathione peroxidase 1	0,98324275
GPX2	glutathione peroxidase 2	0,71821926
GPX7	glutathione peroxidase 7	-1,24360988
HACD1	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1	-0,94990517
HACD2	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 2	-0,56526693
HADH	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0,48865631
HADHA	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha	-0,55852298
HADHB	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit beta	-0,61071954
HSD17B12	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 12	-0,41227921
HSD17B4	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 4	-0,62589164
LCLAT1	lysocardiolipin acyltransferase 1	-0,73076596
LIPA	lipase A, lysosomal acid type	-0,58098392
LPCAT3	lysophosphatidylcholine acyltransferase 3	-0,45158231
LPGAT1	lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1	-0,7995004
LTA4H	leukotriene A4 hydrolase	-0,57698568
LYPLA1	lysophospholipase I	-0,49374434
MBOAT2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	-0,77370641
MECR	mitochondrial trans-2-enoyl-CoA reductase	-1,06887596
NSDHL	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	-0,40346184
PAFAH1B1	platelet activating factor acetylhydrolase 1b regulatory subunit 1	-0,3534024
PAFAH1B2	platelet activating factor acetylhydrolase 1b catalytic subunit 2	-0,3676404
PAFAH1B3	platelet activating factor acetylhydrolase 1b catalytic subunit 3	-0,46409364
PCYT1A	phosphate cytidyltransferase 1, choline, alpha	-0,50537817

PECR	peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	-1,09249745
PGS1	phosphatidylglycerophosphate synthase 1	0,63948568
PLA2G15	phospholipase A2 group XV	-0,49293761
PLA2G4A	phospholipase A2 group IVA	1,69887908
PLD1	phospholipase D1	-0,66608639
PLPP3	phospholipid phosphatase 3	1,04056273
PPT1	palmitoyl-protein thioesterase 1	-0,78856714
PTDSS1	phosphatidylserine synthase 1	-0,74542856
PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1	-0,6085612
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	5,08522985
SC5D	sterol-C5-desaturase	-0,59606403
SCD5	stearoyl-CoA desaturase 5	-0,5560462
SCP2	sterol carrier protein 2	-0,5773112
SELENOI	selenoprotein I	-0,43793167
SGPP1	sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	-0,84122368
SMPD1	sphingomyelin phosphodiesterase 1	-0,49666695
SOAT1	sterol O-acyltransferase 1	-0,64501245
SOAT2	sterol O-acyltransferase 2	1,53000453
SPHK1	sphingosine kinase 1	0,43607762
SPTLC1	serine palmitoyltransferase long chain base subunit 1	-0,43441463
SPTLC2	serine palmitoyltransferase long chain base subunit 2	-0,30940048
SQLE	squalene epoxidase	-0,56184896
SRD5A3	steroid 5 alpha-reductase 3	-0,60004812
TBXAS1	thromboxane A synthase 1	-0,7590792
UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7	-0,84938646
UGT8	UDP glycosyltransferase 8	-0,90621462

Tabelle 8: Zu Abbildung 27D, signifikante Genveränderungen des Lipidmetabolismus' nach 4-stündiger Poly-(I:C)-Behandlung in Kombination mit TLR3-Inhibition verglichen mit der Kontrolle

Gensymbol	Gename	log2(Diff of groups = (PolyIC+TLR3-Inhibitor) - (Ctrl))
ACAA2	acetyl-CoA acyltransferase 2	-1,67968042
ACADVL	acyl-CoA dehydrogenase very long chain	0,52864583
ACAT1	acetyl-CoA acetyltransferase 1	-0,55507671
ACOX1	acyl-CoA oxidase 1	-0,438887
ACSL3	acyl-CoA synthetase long chain family member 3	0,60328918
ACSL4	acyl-CoA synthetase long chain family member 4	-0,4135813
ACSL5	acyl-CoA synthetase long chain family member 5	-1,27149853
ADH5	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	-0,85842674
AGPAT2	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2	-0,63765285
AGPS	alkylglycerone phosphate synthase	-0,55602497
AKR1A1	aldo-keto reductase family 1 member A1	-1,01786826
AKR1B1	aldo-keto reductase family 1 member B	-0,85862489
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1 member C3	-0,88550159
ALDH1B1	aldehyde dehydrogenase 1 family member B1	-0,52942425
ALDH3A2	aldehyde dehydrogenase 3 family member A2	-0,49882529
ALDH7A1	aldehyde dehydrogenase 7 family member A1	-0,96970533
ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase 1	-1,08685745
CBR1	carbonyl reductase 1	-0,74435292
CBR3	carbonyl reductase 3	-0,70639436
CDIPT	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase	-0,62664176
CDS2	CDP-diacylglycerol synthase 2	-0,45664912
CERK	ceramide kinase	-0,48341259
CHKA	choline kinase alpha	0,58099808
CYP46A1	cytochrome P450 family 46 subfamily A member 1	-0,44500821
DEGS1	delta 4-desaturase, sphingolipid 1	-0,36724411
DGAT1	diacylglycerol O-acyltransferase 1	0,3284576
DGKE	diacylglycerol kinase epsilon	0,28991876
DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	-0,47259964
EBP	emopamil binding protein (sterol isomerase)	-0,71640059
ECHS1	enoyl-CoA hydratase, short chain 1	-0,58186141
ECI2	enoyl-CoA delta isomerase 2	-0,68621207
ELOVL6	ELOVL fatty acid elongase 6	-0,73300923
ETNK1	ethanolamine kinase 1	0,61274343

FADS1	fatty acid desaturase 1	-0,55688123
FADS2	fatty acid desaturase 2	-1,07019928
FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	-0,75542771
GLA	galactosidase alpha	-0,75091995
GPAT3	glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	-0,88279127
GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	-0,55117046
GPX1	glutathione peroxidase 1	0,98910213
GPX2	glutathione peroxidase 2	0,53462551
GPX7	glutathione peroxidase 7	-1,08312811
HADH	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0,68787506
HADHA	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha	-0,27662194
HADHB	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit beta	-0,37276381
KDSR	3-ketodihydrosphingosine reductase	-0,61674875
LCAT	lecithin-cholesterol acyltransferase	0,47425555
LCLAT1	lysocardiolipin acyltransferase 1	-0,44495867
LIPA	lipase A, lysosomal acid type	-0,73397871
LPCAT3	lysophosphatidylcholine acyltransferase 3	-0,78361356
LSS	lanosterol synthase	-0,4421139
MBOAT1	membrane bound O-acyltransferase domain containing 1	-0,47845194
MBOAT2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	-0,53835485
MBOAT7	membrane bound O-acyltransferase domain containing 7	-0,73865631
MGLL	monoglyceride lipase	-0,46726393
NEU1	neuraminidase 1	0,45137002
NEU3	neuraminidase 3	0,63278419
NSDHL	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase- like	-0,29669101
PAFAH1B3	platelet activating factor acetylhydrolase 1b catalytic subunit 3	-0,90582541
PCYT2	phosphate cytidyltransferase 2, ethanolamine	-0,65712749
PECR	peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	-1,20154693
PEMT	phosphatidylethanolamine N- methyltransferase	-0,39871349
PGS1	phosphatidylglycerophosphate synthase 1	0,52327474
PLA2G4A	phospholipase A2 group IVA	-1,00782665
PLD1	phospholipase D1	-0,51862545
PLPP2	phospholipid phosphatase 2	-1,00823709
PPT1	palmitoyl-protein thioesterase 1	-0,56525985
PTDSS1	phosphatidylserine synthase 1	-0,93032439
PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1	-1,27327474

PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	4,38666214
SCP2	sterol carrier protein 2	-0,39599609
SGMS1	sphingomyelin synthase 1	0,41208815
SMPD1	sphingomyelin phosphodiesterase 1	0,30476534
SQLE	squalene epoxidase	-0,50130208
STS	steroid sulfatase	-0,41314255
TBXAS1	thromboxane A synthase 1	-0,93844118
UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	0,59688491
UGT2B10	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B10	-0,62349624
UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7	-1,40830573

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Kellner Lina
Geburtsdatum: 07.01.1994
Geburtsort: Speyer
Familienstand: ledig
Vater: Herr Dr. Olaf Alex Kellner
Mutter: Frau Ute Mester

SCHULISCHER WERDEGANG

2004-2013 Hans-Purrmann-Gymnasium Speyer
13.03.2013 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2013/14 Beginn des Studiums Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
03.09.2015 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
10.10.2019 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
01.12.2020 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)
01.02.2021 Beginn der Facharztweiterbildung in der Allgemein- und Viszeralchirurgie des Diako Mannheim

9 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Miethke für die Themenvergabe und die aufmerksame Betreuung bedanken. Seine unerschöpfliche Motivation sowie sein Engagement haben mich mitgerissen und mir viel Freude bei der Erarbeitung dieser Dissertation gebracht.

Ein besonderer Dank geht an Frau Simone Albrecht für die enge Betreuung im Labor. Sie stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite, vielen Dank dafür.

Zudem möchte ich mich bei dem gesamten Team des Forschungslabors des IMMH für die tatkräftige Unterstützung und ihre Geduld in allen Bereichen bedanken.

Frau Carolina de la Torre von dem Zentrum für Medizinische Forschung der Medizinischen Fakultät Mannheim gilt für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit ebenso mein Dank.

Vielen Dank an meine Familie und Freunde für die liebevolle Unterstützung in den letzten Jahren.