

# Intrazelluläre Mechanismen der MHC I- Antigenpräsentation in Chlamydien-infizierten dendritischen Zellen

## Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

**Dorothee Fiegl**

aus Schwabach

Tübingen

2011



Tag der mündlichen Qualifikation:

16.01.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

PD Dr. Michael Knittler

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Friedrich Götz



*Be dendritic*

*Turn something bad into good*

*M.K.*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>X</b>
<b>Summary</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Chlamydien</b>	<b>1</b>
1.1.1 Historisches und Taxonomie	1
1.1.2 Entwicklungszyklus	2
1.1.3 Krankheitsbilder	4
1.1.4 Interaktion mit der Wirtszelle	6
<b>1.2 Das Immunsystem</b>	<b>8</b>
1.2.1 Das angeborene Immunsystem	8
1.2.2 Das adaptive Immunsystem	9
1.2.3 Die zellautonome Immunität	12
1.2.4 Die Immunreaktion nach der Infektion mit Chlamydien	13
1.2.5 Zelluläre Mechanismen der klassischen MHC I-Antigenpräsentation	14
1.2.6 Funktion dendritischer Zellen und Wege der MHC I-Kreuzpräsentation	17
<b>1.3 Fragestellung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>2 Material</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Chemikalien, Reagenzien, Detergenzien</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Glaswaren</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Plastikwaren</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Verbrauchsmaterial</b>	<b>25</b>
<b>2.5 Geräte</b>	<b>25</b>

<b>2.6</b>	<b>EDV-Programme</b>	<b>27</b>
<b>2.7</b>	<b>Medien und Medienzusätze</b>	<b>27</b>
<b>2.8</b>	<b>Inhibitoren</b>	<b>28</b>
<b>2.9</b>	<b>Antikörper</b>	<b>28</b>
<b>2.10</b>	<b>Enzyme</b>	<b>32</b>
<b>2.11</b>	<b>Gewichts- und Längenstandards</b>	<b>32</b>
<b>2.12</b>	<b>Kits</b>	<b>32</b>
<b>2.13</b>	<b>Primer</b>	<b>32</b>
<b>2.14</b>	<b>siRNAs</b>	<b>33</b>
<b>2.15</b>	<b>Vektoren</b>	<b>34</b>
<b>2.16</b>	<b>Chlamydienstämme</b>	<b>34</b>
<b>2.17</b>	<b>Mausstamm</b>	<b>34</b>
<b>2.18</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkulturmethoden</b>	<b>36</b>
3.1.1	Kultivieren von Zellen	36
3.1.2	Kryokonservierung von Zellen	37
3.1.3	Auftauen kryokonservierter Zellen	38
3.1.4	Test auf Mykoplasmenkontamination	38
<b>3.2</b>	<b>Chlamydienarbeiten</b>	<b>39</b>
3.2.1	Chlamydienstammkonservierung	39
3.2.2	Aufreinigung der infektiösen EBs mittels Ultrazentrifugation	40
3.2.3	Titration	42
3.2.4	Infektion von Zellkulturen	42
3.2.5	Hitzeinaktivierung von Chlamydien	43
3.2.6	Bestimmung der chlamydialen Reproduktion	43
<b>3.3</b>	<b>Immunfluoreszenzmikroskopie</b>	<b>44</b>
<b>3.4</b>	<b>Transmissionselektronenmikroskopie</b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b>Histologische Analysen</b>	<b>46</b>
<b>3.6</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>47</b>
3.6.1	Durchflusszytometrie	47

---

3.6.2	Bestimmung der Phagozytoseaktivität dendritischer Zellen	49
3.6.3	Herstellung von Zelllysaten	50
3.6.4	Zellfraktionierung in zytosolische und nukleäre Fraktion	50
<b>3.7</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>51</b>
3.7.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
3.7.2	Western Blot-Analyse	52
3.7.3	Deglykosylierung von MHC I mittels Endoglykosidase H (EndoH)	54
3.7.4	Deglykosylierung von MHC I mittels N-Glykosidase F (PNGase F)	55
3.7.5	Bestimmung der MHC I-Oberflächenstabilität	55
3.7.6	Bestimmung des MHC I-Recyclings	55
<b>3.8</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>56</b>
3.8.1	RNA-Extraktion	56
3.8.2	Reverse Transkription	56
3.8.3	Semiquantitative PCR	57
3.8.4	Real-Time Quantitative PCR	58
<b>3.9</b>	<b>Antigenpräsentations-Assay</b>	<b>59</b>
3.9.1	siRNA-Transfektion	60
3.9.2	Verwendung enzymatischer Inhibitoren und Antikörperneutralisation von Oberflächen-MHC I	61
3.9.3	EB-Immunisierung von C57BL/6-Mäusen und Gewinnung der CD8+ T-Zellen aus der Milz	62
3.9.4	IFN- $\gamma$ ELISA	64
<b>3.10</b>	<b>Zytokin-Array</b>	<b>64</b>
<b>3.11</b>	<b>Bio-Plex Zytokin-Assay</b>	<b>65</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>C57BL/6-Mäuse als Infektionsmodell für <i>C. psittaci</i></b>	<b>66</b>
4.1.1	Infektionsverlauf <i>in vivo</i>	66
4.1.2	Histologische Untersuchungen der Lunge nach Infektion mit <i>C. psittaci</i>	68
4.1.3	Zytokinlevel im Serum nach der Infektion mit <i>C. psittaci</i>	70
4.1.4	Infektionsverlauf nach EB-Immunisierung	71
4.1.5	Zytokinlevel im Serum nach EB-Immunisierung	72
<b>4.2</b>	<b>Zelluläre Mechanismen der Prozessierung chlamydialer Antigene in DCs</b>	<b>75</b>

4.2.1	Chlamydienantigene werden in DCs auf MHC I präsentiert	75
4.2.1.1	Reinheit der CD8+ T-Zellen	75
4.2.1.2	Antigenpräsentations-Assay	76
4.2.2	Morphologische und funktionale Reifung der DCs durch Chlamydieninfektion	78
4.2.2.1	Morphologische Differenzierung	79
4.2.2.2	Reduktion der Phagozytoseaktivität	80
4.2.2.3	Sekretion proinflammatorischer Zytokine	81
4.2.2.4	Expression von DC-Oberflächenmarkern	84
4.2.3	Unterschiedliche Entwicklung der Chlamydien in DCs und Epithelzellen	85
4.2.3.1	Morphologische Unterschiede der chlamydialen Einschlüsse	85
4.2.3.2	Unterschiede in Vermehrung und Metabolismus	87
4.2.3.3	Expression und Lokalisation der chlamydialen Protease CPAF	90
4.2.4	Die Rolle der zellautonomen Resistenz in DCs nach Chlamydieninfektion	92
4.2.5	Prozessierung der Chlamydienantigene in DCs	97
4.2.6	Regulation des MHC I-Beladekomplexes	99
4.2.6.1	Komponenten der MHC I-Antigenpräsentation in nicht infizierten JAWSII-Zellen	99
4.2.6.2	Lokalisation der MHC Klasse I-Allel-Produkte in nicht infizierten JAWSII	101
4.2.6.3	MHC I-Oberflächenstabilität	103
4.2.6.4	MHC I-Recycling	104
4.2.6.5	Komponenten der MHC I-Antigenpräsentation in infizierten DCs und Epithelzellen	106
4.2.6.6	Die Rolle von TNF- $\alpha$ bei der Antigenpräsentation von DCs	108
4.2.6.7	Lokalisation von MHC I in JAWSII nach Infektion mit Chlamydien	111
4.2.6.8	MHC I-Oberflächenpräsentation nach Infektion mit Chlamydien	113
4.2.6.9	Kolokalisation von MHC I mit Kompartimenten der vakuolaren Kreuzpräsentation	117
4.2.6.10	Intrazelluläre Lokalisation von TAP in DCs	120
4.2.7	Komponenten der MHC I-Präsentation chlamydialer Antigene	122
4.2.7.1	Überprüfung der siRNA-vermittelten Repression	122
4.2.7.2	Antigenpräsentations-Assay	124
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>129</b>
5.1	Chlamydien stimulieren die zelluläre Immunabwehr	129
5.2	DC-Reifung nach Chlamydieninfektion	131
5.3	Chlamydien-Antigenpräsentation durch Kreuzpräsentation	134
5.4	Prozessierung chlamydialer Antigene	135
5.5	IFN- $\gamma$ -unabhängige Induktion von GBP1	138
5.6	Beladung der MHC I-Moleküle	139

5.7	Postuliertes Arbeitsmodell	143
5.8	Ausblick für weitere Forschungsarbeiten	146
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>147</b>
	<b>Formelverzeichnis</b>	<b>161</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>161</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>161</b>
	<b>Anhang</b>	<b>163</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>164</b>

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Δ	Delta
APA	Antigenpräsentations-Assay
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Becton Dickinson
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Chlamydia/Chlamydophila</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CPAF	<i>chlamydial protease-like activity factor</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt ( <i>cytotoxic T-lymphocyte</i> )
Da	Dalton
DC	dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EB	Elementarkörperchen ( <i>elementary body</i> )
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

---

ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FC	<i>flow cytometry</i>
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GBP	<i>guanylate-binding protein</i>
h	Stunde/n (hour/s)
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
hpi	<i>hours post infection</i>
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
i.d.R.	in der Regel
i.p.	intraperitoneal
IAS	Interalveolarsepten
IB	Intermediärkörperchen ( <i>intermediate body</i> )
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IF	Immunfluoreszenz
IFN- $\gamma$ (- $\alpha$ , - $\beta$ )	Interferon gamma (-alpha, -beta)
IFU	<i>inclusion-forming unit</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRG	<i>immunity-related GTPase</i>
LGV	Lymphgranuloma venereum
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliampere
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute/n
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>

mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVE	multivesikuläres Endosom
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PAS	Perjodsäure-Schiffsches Reagenz
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDI	Proteindisulfidisomerase
PFA	Paraformaldehyd
pi	<i>post infection</i>
PLC	Peptidbeladekomplex ( <i>peptide loading complex</i> )
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
RB	Retikularkörperchen ( <i>reticulate body</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sec	Sekunde/n
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T-cell receptor</i> )
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$ (- $\beta$ )	Tumornekrosefaktor alpha (-beta)
TTS	Typ III Sekretionssystem ( <i>type III secretion system</i> )
u.a.	unter anderem

usw.	und so weiter
WB	Western Blot
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

# Zusammenfassung

Für die effektive Bekämpfung einer Chlamydieninfektion sind zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs), die durch infizierte dendritische Zellen (DCs) aktiviert wurden, von entscheidender Bedeutung. Trotz dieser wichtigen Aufgabe der CTLs sind die intrazellulären Prozesse der chlamydialen Antigenpräsentation auf MHC I-Moleküle in infizierten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) weitgehend unverstanden.

Um die MHC I-vermittelte Präsentation chlamydialer Antigene zu untersuchen, wurden *in vitro*-Infektionsstudien mit der immortalisierten DC-Zelllinie JAWSII durchgeführt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit *C. psittaci* zur funktionalen Reifung der DCs führt, was sich in ihrer morphologischen Differenzierung sowie der Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine äußerte. Anhand von Immunfluoreszenzuntersuchungen wurde die Kollokalisierung chlamydialer Inklusionen mit Cathepsin-positiven Endosomen beobachtet, wobei den Cathepsinen eine entscheidende Rolle für die Antigenprozessierung der vakuolaren MHC I-Kreuzpräsentation zugesprochen wird. Des Weiteren zeigte sich während der Infektion eine Hochregulation der MHC I-Expression sowie der MHC I-Oberflächenpräsentation. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass im Verlauf der Chlamydieninfektion MHC I-Moleküle in DCs verstärkt endosomal recyceln und in Cathepsin-positive Kompartimente gelangen.

Um die Relevanz der verschiedenen Komponenten des klassischen MHC I-Weges und der Kreuzpräsentationswege für die chlamydiale Antigenpräsentation zu untersuchen, wurden abschließend Antigenpräsentations-Assays durchgeführt. Dabei wurde die Aktivierung Chlamydien-spezifischer CTLs durch verschiedene DC-Varianten, bei denen die Wege der Antigenpräsentation an verschiedenen Stellen in gezielter Weise mittels Inhibition oder siRNA beeinträchtigt wurden, ermittelt. Bei Inhibition der MHC I-Oberflächenpräsentation und des endosomalen Recyclings ist die chlamydiale Antigenpräsentation weitestgehend unterbunden. Ebenso scheint die Proteolyse durch Cathepsin D und S von entscheidender Bedeutung zu sein. Die Prozessierung der chlamydialen Antigene ist zudem abhängig von dem Antigen-Transporter TAP sowie dem Proteasom. Im Gegensatz dazu ist das Chaperon

Tapasin, welches die Assemblierung und Reifung der MHC I-Moleküle im ER kontrolliert, für die MHC I-Beladung mit chlamydialen Antigenen nicht essentiell.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise darauf, dass chlamydiale Antigene zunächst in Endosomen Cathepsin-abhängig präprozessiert werden, bevor sie ins Zytosol gelangen, um dort durch das Proteasom weiter abgebaut zu werden. Da für TAP auch eine Lokalisation in endozytotischen Membranen beobachtet werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass chlamydiale Antigene über TAP vom Zytosol wieder in endosomale Kompartimente transportiert werden, in denen die Beladung der MHC I-Moleküle stattfindet. Bei diesen MHC I-Molekülen handelt es sich vermutlich überwiegend um präexistierende MHCs, die über endosomale Recycling-Prozesse von der Zelloberfläche zurück in die Zelle gelangen. Die gewonnenen Erkenntnisse geben erstmalig ein erweitertes Verständnis zu Abläufen der DC-vermittelten MHC I-Immunabwehr gegen Chlamydien und liefern entscheidende Grundlagen für zukünftige immunologische Behandlungsstrategien.

## Summary

Cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) primed by infected dendritic cells (DCs) play an important role in the effective immune response against chlamydial infection. Despite the crucial role of the CTLs, the intracellular pathway of chlamydial antigen presentation by MHC I in infected professional antigen-presenting cells (APCs) is still unclear.

To investigate MHC I-presentation of chlamydial antigens in DCs we performed *in vitro*-infection studies using the DC cell line JAWSII. We demonstrate that *C. psittaci* infection leads to maturation of DCs as shown by morphological changes as well as secretion of different proinflammatory cytokines and chemokines. By immunofluorescence studies we observed a colocalization of chlamydial inclusions with late endosomes containing cathepsins, which are believed to play an essential role in the antigen processing of the vacuolar MHC I cross-presentation. Furthermore, upon chlamydial infection the expression of new synthesized MHC I molecules and surface presentation of MHC I-complexes is up-regulated. This is accompanied by an increased level of endosomal MHC I-recycling. Most interestingly, our experiments revealed that during DC-infection MHC I molecules are translocated to cathepsin-containing compartments.

Finally, we have analyzed the activation of chlamydia-specific CTLs by infected DCs that are blocked for different components of the classical and non-classical MHC I-machinery. Chlamydial antigen presentation is abolished when MHC I surface presentation and endosomal recycling of infected DCs are inhibited. We also found that proteolysis by cathepsin D and S in the endosomal compartments is critical for MHC I presentation. Moreover, chlamydial antigen processing appears to depend on the antigenic peptide transporter TAP and requires functional proteasome. In contrast, the chaperone Tapasin that controls MHC I assembly and maturation in the ER seems not to be necessary for MHC I peptide loading with chlamydial antigens.

Taken together, these studies provide evidence that chlamydial antigens are processed through a complex intracellular pathway that involves preprocessing in endosomes via different cathepsins and entry into the cytosol for further processing by the proteasome. In view of our observation that in DCs TAP localizes also to endocytic membranes, we propose

that chlamydial antigens are translocated from the cytosol via TAP into endosomes and are mainly loaded on MHC I molecules derived from the endosomal recycling pathway. These findings give new insights into the DC-mediated MHC I immune defense against chlamydia and provide important basics for future therapeutic and immunological approaches.



# 1 Einleitung

## 1.1 Chlamydien

### 1.1.1 Historisches und Taxonomie

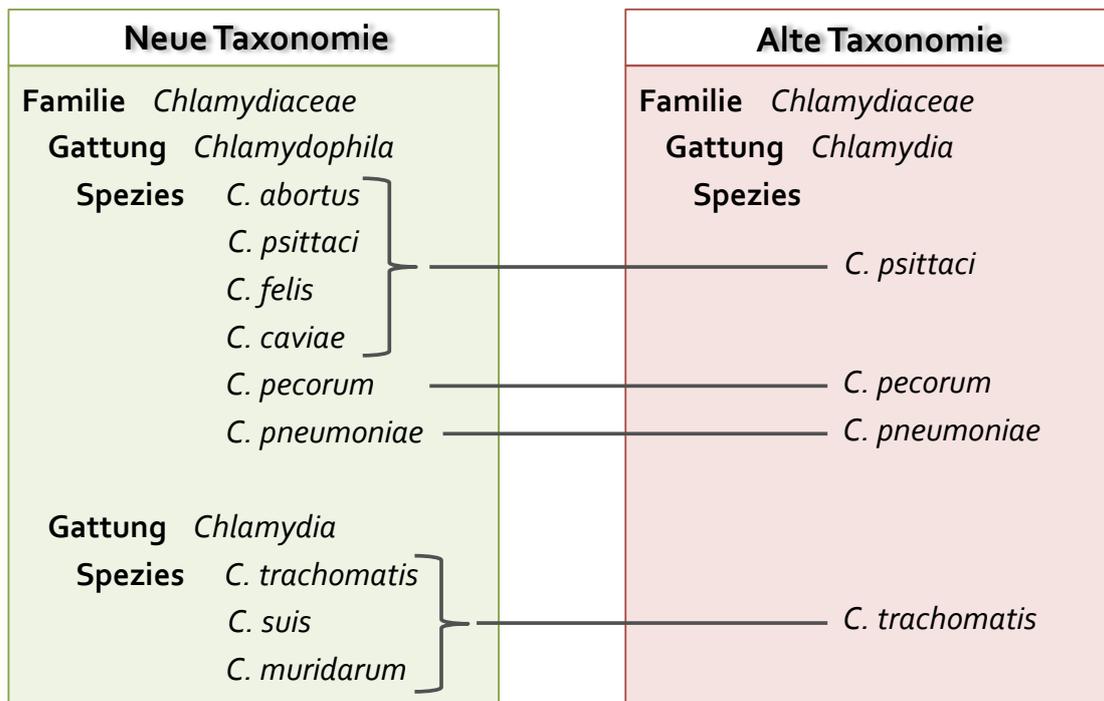
Chlamydien wurden erstmals 1907 von Halberstaedter und von Prowazek beschrieben (Halberstaedter and von Prowazek, 1907), nachdem die Wissenschaftler intrazytoplasmatische Mikroorganismen innerhalb von Zellen eines Konjunktivalabstrichs von Patienten mit Trachom entdeckt hatten (Vanrompay et al., 1995). Aufgrund der Annahme, dass es sich um Protozoen handelt, wurde die Bezeichnung *Chlamydozoa* eingeführt.

Im Winter 1929/1930 kam es in Europa und den USA zum Ausbruch einer Psittakose-Pandemie (Vanrompay et al., 1995). Diese auch als Papageienkrankheit bezeichnete Infektionskrankheit wird von Psittaciden (Papageien und Sittichen) auf den Menschen übertragen. Damals konnte erstmals ein Isolat des Erregers gewonnen sowie der Ursprung der Pandemie bestimmt werden. Aufgrund der geringen Größe des Erregers wurde davon ausgegangen, dass es sich um ein Virus handelt (Coles, 1930). Erst in den 1960er Jahren stellte sich heraus, dass Chlamydien den Bakterien zuzuordnen sind (Moulder, 1966), da sie sowohl Desoxyribonukleinsäure (DNA, *deoxyribonucleic acid*) als auch Ribonukleinsäure (RNA, *ribonucleic acid*) aufweisen und ihr Entwicklungszyklus sich komplett vom viralen Replikationsmechanismus unterscheidet.

Innerhalb der Bakterien bilden Chlamydien aufgrund ihres einzigartigen Entwicklungszyklus, auf den in Abschnitt 1.1.2 noch genauer eingegangen wird, eine eigene Ordnung, *Chlamydiales*, u.a. mit der Familie *Chlamydiaceae*. Bis in die 1990er Jahre umfasste diese Familie die Gattung *Chlamydia* mit den vier Spezies *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pecorum*. 1999 warben Everett et al., basierend auf molekularbiologischen Daten hauptsächlich der 16S und 23S ribosomalen RNA (rRNA)-Sequenzen, für eine neue taxonomische Klassifizierung der Chlamydien (Everett and Andersen, 1999). Seitdem wird die Ordnung *Chlamydiales* in weitere Familien

und die Familie der *Chlamydiaceae* in die zwei Gattungen *Chlamydia* und *Chlamydophila* mit insgesamt neun Arten unterteilt (Tab. 1).

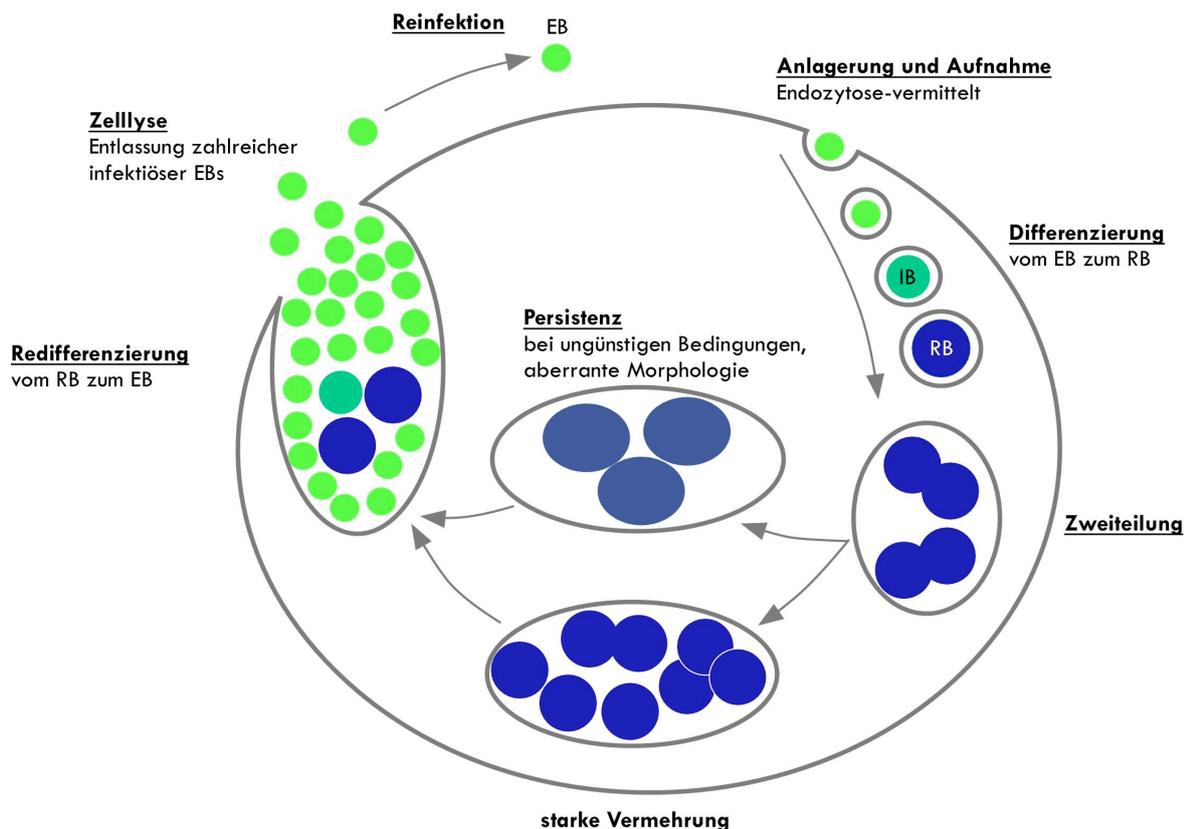
**Tabelle 1: Gegenüberstellung der alten und neuen Systematik**  
Modifiziert nach Bush und Everett (Bush and Everett, 2001).



### 1.1.2 Entwicklungszyklus

Chlamydien sind gram-negative, kokkoide Bakterien mit einer obligat intrazellulären Lebensweise. Das Besondere aller Arten der *Chlamydiales* ist der für diese Ordnung typische biphasische Entwicklungszyklus, der von Bedson und Bland erstmals 1932 beschrieben wurde und der durch zwei morphologisch und funktional unterschiedliche Erscheinungsformen gekennzeichnet ist (Bedson and Bland, 1932). Die infektiösen, metabolisch inaktiven Elementarkörperchen (EB, *elementary body*) haben eine Größe von 0,3 µm bis 0,6 µm und sind nicht vermehrungsfähig, außerhalb der Wirtszellen aber überlebensfähig. Nach der Aufnahme in die Wirtszelle durch Endozytose befindet sich das aufgenommene EB innerhalb der parasitophoren Vakuole, auch Einschluss bzw. Inklusion genannt, und differenziert nach kurzer Zeit zum Retikularkörperchen (RB, *reticulate body*) aus. Vereinzelt wird in Veröffentlichungen noch eine weitere Form, die Übergangsform zwischen EB und RB, als IB (*intermediate body*) bezeichnet (Moulder, 1991; Vanrompay et al., 1995). RBs haben eine Größe von etwa 1 µm, sind metabolisch aktiv und nicht infektiös. Die

Vermehrung der RBs erfolgt durch Zweiteilung, bis die Inklusion soweit an Größe zugenommen hat, dass nahezu die gesamte Zelle ausgefüllt ist. Anschließend redifferenzieren sich die RBs wieder zu EBs, die daraufhin in großer Zahl aus der Wirtszelle entlassen werden und weitere Wirtszellen infizieren können. Die Freisetzung erfolgt durch Lyse der Wirtszelle oder durch Fusion der Plasmamembran mit der Einschlußmembran (Everett, 2000). Die Redifferenzierung vom RB zum EB verläuft innerhalb der Inklusion asynchron, so dass die unterschiedlichen Stadien zeitgleich in einem Einschluß vorliegen können (McClarty, 1994). Herrschen für Chlamydien ungünstige Bedingungen in Form von Nahrungsmittelknappheit oder antimikrobiellen Substanzen (wie Penicillin und IFN- $\gamma$ ) in der Umgebung sind diese in der Lage, in das Stadium der Persistenz überzugehen, in dem Wachstum, Replikation und Vermehrung eingestellt werden und die Umwandlung in EBs unterbunden ist (Beatty et al., 1994). Persistente Chlamydien unterscheiden sich durch ihre atypische Form überdies morphologisch von den üblichen Stadien. Die Dauer des Entwicklungszyklus hängt stark von der jeweiligen Spezies sowie vom Wirtszelltyp ab. Für *C. psittaci* beispielsweise wird eine Zyklusdauer von 30 bis 60 Stunden beschrieben (Moulder, 1991).



**Abbildung 1: Entwicklungszyklus der Chlamydien**

Der chlamydiale Entwicklungszyklus läuft bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich schnell ab. Bei *Chlamydomphila psittaci* kann der gesamte Zyklus bereits nach etwa 30 Stunden abgeschlossen sein, bei *Chlamydia trachomatis* hingegen erst nach 72 Stunden (EB: Elementarkörperchen, IB: Intermediärkörperchen, RB: Retikularkörperchen). Die schematische Darstellung wurde modifiziert nach AbdelRahman und Belland (Abdelrahman and Belland, 2005).

### 1.1.3 Krankheitsbilder

Chlamydieninfektionen stellen weltweit ein erhebliches, sowohl human- als auch veterinärmedizinisches Problem dar. Die humanpathogenen Arten *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomphila pneumoniae* und *Chlamydomphila psittaci* unterscheiden sich in ihrem Infektionsort und rufen ein breites Spektrum an Erkrankungen hervor.

*Chlamydia trachomatis* lässt sich in mehrere Serotypen unterteilen (Manavi, 2006). Die Serotypen A-C verursachen das sogenannte Trachom, das weltweit die häufigste Ursache infektionsbedingter Erblindungen darstellt (Burton and Mabey, 2009). Bei dieser vor allem in den Tropen vorkommenden Konjunktivitis wendet sich ohne Behandlung im weiteren Verlauf das Augenlid nach innen, was durch die stetige Reibung der Wimpern auf der Hornhaut (Trichiasis) zur Erblindung führt. Die Serovare D-K von *C. trachomatis*, als Erreger

der sexuell übertragenen Urogenitalinfektionen, sind vor allem in den Industrienationen mit einer hohen Prävalenz bei jungen Erwachsenen unter 25 Jahren weit verbreitet. Diese Infektionen verlaufen jedoch sehr häufig asymptomatisch (Manavi, 2006), was die Behandlung maßgeblich erschwert. Bei infizierten Frauen kann es daraufhin zu chronischen Entzündungsreaktionen kommen, die zu irreversiblen Schäden der Gebärmutter und Eileiter führen. Die Folgen sind häufig Eileiterschwangerschaften, Fehlgeburten und Infertilität. Die Serovare L<sub>1</sub>-L<sub>3</sub> verursachen das sogenannte Lymphgranuloma venereum (LGV) (Manavi, 2006). Diese Infektionskrankheit wird auch durch sexuellen Kontakt übertragen, ist häufig in tropischen Ländern verbreitet und äußert sich durch eine starke Schwellung der Lymphknoten im Genital- bzw. Leistenbereich (Manavi, 2006).

Der Erreger *Chlamydomphila pneumoniae* ist weltweit verbreitet. Die Seroprävalenz bei 20-Jährigen liegt bei 50 % und steigt mit dem Lebensalter auf 70-80 % bei älteren Erwachsenen an (Campbell and Kuo, 2004). Die Infektion wird auf aerogenem Weg von Mensch zu Mensch übertragen, verläuft häufig asymptomatisch oder führt zu akuten Erkrankungen des Respirationstraktes wie zum Beispiel Pneumonie, Bronchitis, Sinusitis und Pharyngitis (Kuo et al., 1995). Auch eine Beteiligung dieser Bakterien an Arteriosklerose und allgemein an kardiovaskulären Erkrankungen wird vermutet (Campbell and Kuo, 2004).

Das natürliche Reservoir von *Chlamydomphila psittaci* sind Vögel. Als zoonotischer Erreger wird *C. psittaci* durch engen Kontakt zu infizierten Vögeln, hauptsächlich durch Inhalation kontaminierter Aerosole von Vogelsekreten oder staubigem Vogelkot, auf den Menschen übertragen und verursacht zunächst grippeartige Symptome (Beeckman and Vanrompay, 2009). Die Psittakose, auch Ornithose genannt, kann unter Umständen einen harmlosen Verlauf nehmen. Die Erreger können sich aber auch systemisch manifestieren und unterschiedliche Organe wie Herz, Leber und Magen-Darm-Trakt befallen (Beeckman and Vanrompay, 2009). Im schlimmsten Fall kann die Infektion tödlich verlaufen, in Deutschland ist die Erkrankung daher meldepflichtig.

Wie bereits erwähnt, stellen Chlamydien auch ein erhebliches veterinärmedizinisches Problem dar. So führt zum Beispiel die Infektion mit *Chlamydomphila abortus* zu Aborten bei Schafen mit wirtschaftlichen Konsequenzen für landwirtschaftliche Betriebe. Der Erreger verfügt auch über zoonotisches Potential und kann bei schwangeren Frauen ebenfalls einen Abort auslösen (Pospischil et al., 2002).

### 1.1.4 Interaktion mit der Wirtszelle

Die internalisierten Chlamydien entwickeln und vermehren sich nach der Infektion einer Wirtszelle räumlich abgegrenzt innerhalb der membranumschlossenen Inklusion. Trotz dieser strukturellen Isolierung treten Chlamydien über sogenannte Effektorproteine mit ihrer zytosolischen Umgebung in Kontakt und modifizieren dabei metabolische Funktionen der Wirtszelle sowie bestimmte Abwehrmechanismen zu ihren Gunsten (Valdivia, 2008). Dadurch stellen Chlamydien ihre Entwicklung und ihr Überleben innerhalb der Wirtszelle sicher.

Zunächst gelingt es den Chlamydien nach der Aufnahme durch Rezeptor-vermittelte Endozytose die Fusion der parasitophoren Vakuole mit Lysosomen zu verhindern, indem sie die Membran ihrer Eintrittsvakuole gezielt umstrukturieren (Fields and Hackstadt, 2002; Scidmore et al., 2003). Darüber hinaus akquirieren Chlamydien während des gesamten Entwicklungszyklus sämtliche für das Bakterienwachstum und die Replikation essentiellen Moleküle wie Aminosäuren, Nukleotide und Lipide von der Wirtszelle (Hackstadt et al., 1995; Hatch, 1975; McClarty, 1994; van Ooij et al., 2000).

Neuere Studien konnten belegen, dass es infolge einer zellulären Chlamydieninfektion zu einer Auflösung der Golgi-Struktur kommt (Heuer et al., 2009). Der Golgi-Apparat zersetzt sich in kleine Einheiten (sogenannte Ministapel), die sich ringförmig um die Chlamydieninklusionen lagern. Es konnte gezeigt werden, dass eine effiziente Chlamydieninfektion auf diese Golgi-Fragmentierung angewiesen ist. Hier scheint das zelluläre Protein Golgin-84 eine entscheidende Rolle zu spielen (Heuer et al., 2009), da es für die Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur und die Verbindung der einzelnen Golgi-Stapel verantwortlich ist. Als Zentrum des vesikulären Membrantransports beinhaltet der Golgi-Apparat eine Vielzahl an Nährstoffen, die von Chlamydien benötigt werden. Dabei sind spezifische, im Golgi hergestellte Fette, vor allem Sphingolipide und Cholesterol, von besonderer Bedeutung, da diese Lipide in die Bakterien innerhalb der Inklusion eingebaut werden. Bis heute ist jedoch der genaue Mechanismus der Lipidübertragung in die Inklusion unbekannt. Neben der Hypothese der Nährstoffaufnahme und Versorgung mit Membrankomponenten durch Fusion zwischen Inklusion und exozytotischen Vesikeln (Fields and Hackstadt, 2002) werden für die Lipidübertragung weitere Transportwege direkt über den Golgi diskutiert (Rejman Lipinski et al., 2009). So könnten zum einen

Sphingolipid/Cholesterol-reiche Vesikel aus dem Golgi mit den Inklusionenmembranen verschmelzen oder spezifische Lipid-Transportproteine die jeweiligen Fette von der Golgi-Membran zur Inklusionenmembran transferieren. Zum anderen wäre auch die direkte Aufnahme fragmentierter Golgi-Ministapel denkbar.

Chlamydien werden auch als Energieparasiten bezeichnet. Obwohl Chlamydien selbst in der Lage sind, ATP (Adenosintriphosphat) zu synthetisieren, sind sie zu Beginn der Entwicklung vom ATP der Wirtszelle abhängig (Fields and Hackstadt, 2002; Shaw et al., 2000). Dies erklärt höchstwahrscheinlich auch die räumliche Nähe der Mitochondrien zu den chlamydialen Inklusionen.

Die Injektion der verschiedenen Effektorproteine ins Zytosol der Wirtszelle erfolgt unter anderem über ein Typ III Sekretionssystem (TTS), für das alle Chlamydienspezies kodieren (Peters et al., 2007; Valdivia, 2008). Aber auch andere Sekretionsmechanismen werden genutzt. Die chlamydiale Protease CPAF (*chlamydial protease-like activity factor*) beispielsweise wird aller Wahrscheinlichkeit nach TTS-unabhängig zunächst ins Lumen der Inklusion und dann ins Zytosol transloziert (Heuer et al., 2003).

CPAF ist nach Translokation in das Zytosol in der Lage, die essentiellen MHC (*major histocompatibility complex*)-Transkriptionsfaktoren RFX5 und USF-1 (Zhong et al., 2001) zu degradieren. Dadurch werden die Prozesse der Antigenpräsentation in den Wirtszellen erheblich gestört und die Chlamydien entgehen der Erkennung durch T-Zellen. Auch die CD1-vermittelte Lipid-Antigenpräsentation wird durch CPAF nachweislich beeinträchtigt (Kawana et al., 2007).

Durch CPAF werden darüber hinaus pro-apoptotische BH<sub>3</sub>-only Proteine degradiert (Miyairi and Byrne, 2006; Pirbhai et al., 2006). Durch die Inhibition der Apoptose versuchen die Chlamydien offenbar optimale Bedingungen zu schaffen, die das Parasitieren in den Wirtszellen gewährleisten bis ihr Replikationszyklus beendet ist. Während der Infektion mit Chlamydien spielt möglicherweise aber auch die Induktion der Apoptose eine Rolle (Perfettini et al., 2000; Roan and Starnbach, 2008). So konnte durch eine Studie von Jendro (Jendro et al., 2004) aufgezeigt werden, dass Chlamydien-infizierte Makrophagen durch Sekretion pro-apoptotischer Zytokine (TNF- $\alpha$ ) parakrin in T-Zellen Apoptose induzieren. Da die Eliminierung der Chlamydien T-Zell-abhängig ist, stellt dies möglicherweise einen Immunevasionsmechanismus für Chlamydien dar (Miyairi and Byrne, 2006).

Auf welche Weise der Zelltod der Wirtszelle am Ende des chlamydialen Entwicklungszyklus eintritt, ist nach wie vor unklar, da darüber bislang widersprüchliche Erkenntnisse vorliegen. Es ist aber denkbar, dass Chlamydien gegen Ende des Zyklus Apoptose induzieren, um Nekrose zu vermeiden, da durch Nekrose inflammatorische Prozesse stimuliert werden (Roan and Starnbach, 2008).

### **1.2 Das Immunsystem**

Das Immunsystem der Vertebraten gilt als komplexes Abwehrsystem zum Schutz vor pathogenen Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten sowie Krebszellen. Seine Hauptaufgabe besteht in der Erkennung und Eliminierung fremder Eindringlinge. Dabei wird ein Erreger zunächst über angeborene Abwehrmechanismen, die unspezifisch, aber sehr schnell binnen weniger Stunden reagieren, bekämpft. Werden die Barrieren des angeborenen Immunsystems dennoch überwunden, werden die spezifischen Abwehrmechanismen des adaptiven Immunsystems aktiviert (Goldsby et al., 2003).

#### **1.2.1 Das angeborene Immunsystem**

Das angeborene Immunsystem wird auch als unspezifische Wirtsabwehr bezeichnet. Es reagiert demnach Erreger-unabhängig, ist aber in der Lage, schnell und effektiv einzugreifen.

Zunächst wird der Körper durch mechanische Barrieren wie Haut und Schleimhäute vor dem Eindringen verschiedener Pathogene geschützt. Abgesehen von der natürlichen Bakterienflora verhindert zudem der saure pH-Wert von 3-5 auf der Haut das Wachstum vieler Mikroben und über die Schleimhäute eingedrungene Erreger werden von dem zähflüssigen Schleim aufgehalten und durch synchrone Bewegungen der Zilien aus dem Körper geschleust.

Zu den physiologischen Hindernissen für Pathogene gehören die Körpertemperatur, die vor allem bei Fieber das Wachstum verschiedener Erreger inhibiert sowie der saure pH-Wert des Magens. Aber auch verschiedene chemische Mediatoren in Form von löslichen Proteinen und zellassozierten Rezeptoren wirken entscheidend an der Erregerabwehr mit. Wichtige lösliche Proteine sind das Lysozym der Tränen, das zur Zerstörung der bakteriellen Zellwand führt und die immunologisch hochwirksamen Interferone. Ebenso zu den löslichen

Proteinen zählen die Komponenten des Komplementsystems, die zum einen in der Lage sind, die Membran von Mikroorganismen unmittelbar zu zerstören und die zum anderen zur Markierung eingedrungener Krankheitserreger und damit zu deren Erkennung durch Phagozyten beitragen. Als zellassoziierte Rezeptoren gehören die TLRs (*toll-like receptors*) zu den PRRs (*pattern recognition receptors*). TLRs dienen der Erkennung sogenannter PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), die ausschließlich auf Pathogenen vorkommen. TLR<sub>4</sub> erkennt beispielsweise das Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien, was nach Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade zu einer Entzündungsreaktion und damit zur Immunabwehr gegen den Erreger führt.

Die Aufnahme extrazellulärer Partikel durch Phagozytose stellt ebenfalls einen essentiellen Prozess des angeborenen Immunsystems dar. Spezielle Zellen des Immunsystems wie Blutmonozyten, Neutrophile und Gewebemakrophagen sind in der Lage, Partikel zu internalisieren, durch Fusion des Phagosoms mit Lysosomen zu verdauen und schließlich die verdauten und damit unschädlichen Produkte wieder in die Umgebung zu entlassen.

Nach einer Verletzung des Gewebes treten durch das Eindringen von Gewebeflüssigkeit antibakterielle Serumproteine, wie Akut-Phase-Proteine, sowie Phagozyten in die Wunde ein, was einer Vermehrung und Ausbreitung möglicher Krankheitserreger direkt entgegenwirkt (Goldsby et al., 2003).

### **1.2.2 Das adaptive Immunsystem**

Das adaptive Immunsystem reagiert antigenspezifisch und ist daher auf die Vielfältigkeit der möglichen Erreger ausgerichtet. Nach überstandener Infektion bietet es außerdem häufig langjährigen Schutz. Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort benötigt die Anpassung an den Erreger bei der adaptiven Immunantwort mehr Zeit, so dass die Aktivität erst nach mehreren Tagen eintritt. Die spezifische Immunantwort wird in humorale, sprich Antikörper-vermittelte, und zelluläre Immunantwort unterteilt.

Die entscheidenden Zellen der humoralen Immunantwort sind die B-Lymphozyten. Naive B-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche membrangebundene Antikörper. Die Antikörper eines B-Lymphozyts sind in der Lage, exakt ein Epitop eines Antigens spezifisch zu binden. Wenn B-Lymphozyten, die mit dem Blut durch den Körper zirkulieren, über den membranständigen Antikörper das entsprechende Antigen binden, kommt es zur Aktivierung der naiven B-Zelle und damit zu deren Proliferation und Differenzierung zu

Plasmazellen. Plasmazellen exprimieren in der Folge zahlreiche Klone des entsprechenden Antikörpers und sezernieren bis zu 2000 Antikörper-Moleküle pro Sekunde in die Umgebung. Abhängig von dem jeweiligen Antigen, gegen das die Antikörper gerichtet sind, kommt es zu unterschiedlichen Reaktionen. Bakterielle Toxine, virale Partikel oder andere lösliche Proteine werden von den Antikörpern gebunden und dadurch zunächst neutralisiert. Zur Eliminierung werden die Antigen-Antikörper-Komplexe von phagozytierenden Zellen aufgenommen und abgebaut. Binden die Antikörper hingegen Antigene, die sich auf der Oberfläche von Mikroorganismen befinden, kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems und somit zur Lyse des Pathogens.

Für die Aktivierung der zellulären Immunantwort sind die dendritischen Zellen (DCs, *dendritic cells*) als zellulärer Bestandteil des angeborenen Immunsystems von entscheidender Bedeutung. Als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs, *antigen-presenting cells*) sind unreife DCs in der Lage, Fremdpartikel aus der Peripherie zu internalisieren und intrazellulär in kleine Peptid-Antigene zu degradieren. Dieser Vorgang wird als Antigenprozessierung bezeichnet. Die generierten Antigene werden anschließend von MHC-Molekülen gebunden, als MHC-Antigen-Komplex auf die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert. MHC-Moleküle sind polymorphe Glykoproteine, die in zwei Klassen unterschieden werden, MHC I und MHC II. MHC I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert, während MHC II-Moleküle nur von professionellen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden.

Die von den DCs präsentierten Antigene werden von naiven T-Lymphozyten erkannt. Diese Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche einen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR, *T-cell receptor*), der im Gegensatz zu Antikörpern nur MHC-gebundene Antigene erkennen kann. Durch die zusätzliche Expression bestimmter Kostimulatoren (CD80, CD86) auf den DCs und entsprechender Rezeptoren auf den T-Lymphozyten (CD28) kommt es zur Aktivierung der antigenspezifischen T-Lymphozyten (Lipscomb and Masten, 2002) und somit zu deren Proliferation und Differenzierung zu T-Effektorzellen.

Neben dem TCR exprimieren T-Lymphozyten auf ihrer Zellmembran entweder das Glycoprotein CD4 oder CD8. Somit lassen sich T-Zellen in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterscheiden. CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden auch als T-Helferzellen bezeichnet und erkennen bzw. binden entsprechende Antigene, die auf MHC II-Molekülen präsentiert werden. Nach der Aktivierung von T-Helferzellen werden verschiedene Zytokine sezerniert. Entsprechend der

Zytokinsekretion lassen sich aktivierte T-Helferzellen in die zwei Subpopulationen  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -Zellen einteilen.  $T_{H1}$ -Zellen sezernieren vor allem IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  und stimulieren die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen.  $T_{H2}$ -Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-6 sowie IL-10 und sind in erster Linie für die B-Zell-Aktivierung wichtig.

CD8+ T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen nur, wenn es MHC I-vermittelt präsentiert wird. Aktivierte CD8+ T-Zellen proliferieren und differenzieren daraufhin zu zytotoxischen T-Zellen, die nach erneutem Antigenkontakt die betreffende Zelle durch Einleitung der Apoptose gezielt eliminieren. Dies gelingt den zytotoxischen T-Zellen durch Ausschüttung Poren-bildender Perforine und Serinproteasen, auch Granzyme genannt. Zudem sezernieren zytotoxische T-Zellen nach Antigenkontakt ebenfalls das Zytokin IFN- $\gamma$ , das unter anderem die MHC-Expression in den benachbarten Zellen induziert und dadurch die Antigenpräsentation begünstigt.

Ein Teil der aktivierten B- und T-Lymphozyten differenziert zu Gedächtniszellen aus, die eine überdurchschnittliche Lebensdauer haben und auf mögliche Reinfektionen wesentlich schneller reagieren können.

Das Entscheidende der adaptiven Immunantwort ist die antigenische Spezifität. Um auszuschließen, dass Antikörper oder T-Zell-Rezeptoren körpereigene Strukturen erkennen, werden Lymphozyten im Lauf ihrer Entwicklung einem Selektionsprozess unterzogen. Bei B-Lymphozyten findet die Selektion im Knochenmark statt. Die Selektion von T-Lymphozyten, die selbst-reaktive Rezeptoren exprimieren oder die körpereigene MHC-Moleküle nicht erkennen können, erfolgt im Thymus.

Trotz der eindeutigen Unterschiede zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem wie Spezifität und damit Flexibilität gegenüber Pathogenen, zeitlicher Reaktivität der Immunantwort und Möglichkeiten bei Reinfektionen greifen die beiden Abwehrsysteme an mehreren Schnittstellen ineinander, um Pathogene möglichst effizient zu eliminieren. So sezernieren stimulierte Makrophagen Zytokine, die das adaptive Immunsystem regulieren und aktivierte T-Zellen produzieren Signalmoleküle, die wiederum das phagozytische Potential der Makrophagen anheben. Auch die dendritischen Zellen, die für die Aktivierung der T-Lymphozyten essentiell sind, sind in diesem Zusammenhang zu erwähnen (Goldsby et al., 2003).

### 1.2.3 Die zellautonome Immunität

Interferone sind sehr wichtige Signalmoleküle sowohl für angeborene als auch adaptive Abwehrmechanismen. Auf zellulärer Ebene führt die Stimulation mit Typ I Interferon (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) und vor allem mit Typ II Interferon (IFN- $\gamma$ ) zur Aktivierung der Genexpression zahlreicher Gene (Vestal, 2005). Darunter sind hauptsächlich Mitglieder der drei GTPase Protein-Familien, Mx-Proteine, p47 GTPasen und p65 GTPasen. Einige Vertreter dieser GTPasen besitzen antimikrobielle Eigenschaften und werden daher auch als zellautonome Resistenzfaktoren bezeichnet.

Die Mx-Proteine werden unter anderem im Human- und Maussystem durch Typ I Interferon induziert und zeigen eine starke antivirale Aktivität gegenüber RNA-Viren (Haller and Kochs, 2002). Bereits 1986 konnte gezeigt werden, dass Mx-Proteine an der Resistenz gegenüber Influenzaviren beteiligt sind (Staeheli et al., 1986).

Von den p47 GTPasen, auch IRGs (*immunity-related GTPases*) genannt, sind bislang 23 murine Vertreter bekannt (Bekpen et al., 2005). Diese werden sehr stark durch IFN- $\gamma$  induziert, sind aber auch durch IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und LPS stimulierbar (Taylor et al., 2004). Die antimikrobielle Aktivität der p47 GTPasen richtet sich gegen ein breites Spektrum intrazellulärer Pathogene, die innerhalb einer parasitophoren Vakuole lokalisiert sind (Hunn et al., 2011). Beispiele hierfür sind *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Listeria monocytogenes* sowie *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydophila psittaci*. Die IRGs sind intrazellulär häufig mit der parasitophoren Vakuole assoziiert und in der Folge vermutlich an deren Auflösung beteiligt (Hunn et al., 2011). Der genaue funktionale Mechanismus ist jedoch noch unbekannt. Im Humansystem konnten keine p47 GTPasen mit vergleichbarer Resistenzwirkung nachgewiesen werden (Bekpen et al., 2005).

Die p65 GTPasen, auch GBPs (*guanylate-binding proteins*) genannt, werden hauptsächlich durch IFN- $\gamma$  induziert und liegen innerhalb der Vertebraten hoch konserviert vor (Degrandi et al., 2007). Durch IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sowie TNF- $\alpha$  konnte ebenfalls eine Aktivierung der Genexpression beobachtet werden (Vestal, 2005). Für murines GBP<sub>1</sub> bis GBP<sub>5</sub> ist zudem eine Induktion durch Stimulation mit LPS beschrieben worden (Nguyen et al., 2002). Auch GBPs spielen eine Rolle in der Abwehr intrazellulärer Pathogene. So konnte nachgewiesen werden, dass eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* und *Toxoplasma gondii* in C57BL/6-Mäusen zu einer Induktion verschiedener GBPs führt (Degrandi et al.,

2007). In *T. gondii*-infizierten Makrophagen zeigte sich außerdem eine deutliche Kolo-kalisation der GBPs mit der parasitophoren Vakuole. Darüber hinaus konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie die Beteiligung von GBP<sub>1</sub>, GBP<sub>6</sub>, GBP<sub>7</sub> und GBP<sub>10</sub> an der zellautonomen Immunität gegen *Listeria monocytogenes* und *Mycobacterium bovis* im Maussystem nachgewiesen werden (Kim et al., 2011a).

#### **1.2.4 Die Immunreaktion nach der Infektion mit Chlamydien**

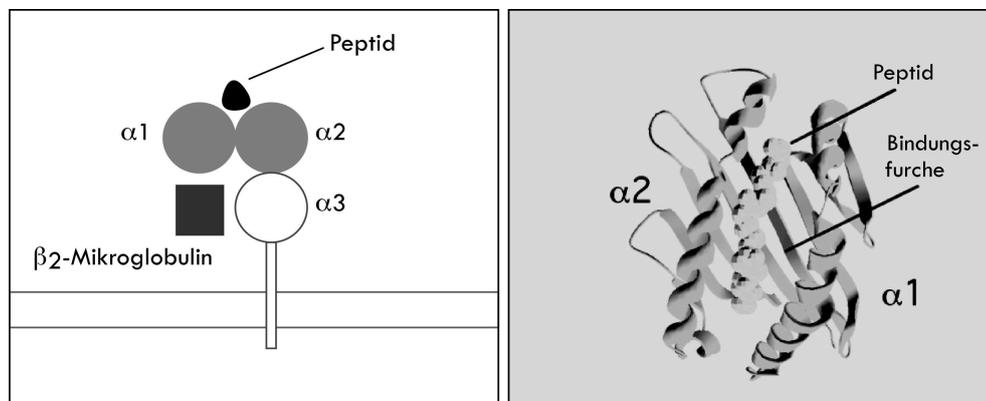
Durch eine Chlamydieninfektion werden angeborene Mechanismen sowie B-Zell- und T-Zell-abhängige Immunreaktionen hervorgerufen.

Zu Beginn werden durch infizierte Epithelzellen Zytokine sezerniert, die verschiedene Zellen des angeborenen Immunsystems rekrutieren (Roan and Starnbach, 2008). Dazu zählen natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Neutrophile, Makrophagen und dendritische Zellen, die ihrerseits wiederum proinflammatorische Zytokine sezernieren. Durch NK-Zellen beispielsweise wird IFN- $\gamma$  freigesetzt, das entscheidend dazu beiträgt, das chlamydiale Wachstum zu unterbinden. Durch IFN- $\gamma$  kommt es zur Induktion der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), einem zellulären Enzym, das die für Chlamydien essentielle Aminosäure Tryptophan abbaut und somit chlamydiales Wachstum inhibiert. Wie in 1.2.3 bereits ausführlich beschrieben, kommt es durch IFN- $\gamma$  außerdem zur Aktivierung der zellulären Immunität. Neben den angeborenen sind aber vor allem die adaptiven Abwehrmechanismen für die erfolgreiche Bekämpfung der Chlamydien von Bedeutung. Chlamydien-spezifische Antikörper können dazu beitragen, Chlamydien zu neutralisieren, sind aber nicht in der Lage, auf intrazellulär lokalisierte Bakterien zuzugreifen. Zur Erkennung und Eliminierung infizierter Zellen ist daher die zelluläre Immunantwort essentiell (Wizel et al., 2008).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass dabei CD<sub>4</sub><sup>+</sup> und CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T-Zellen gleichermaßen wichtig sind (Roan and Starnbach, 2008). CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T<sub>H1</sub>-Zellen produzieren und sezernieren IFN- $\gamma$  und stimulieren CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T-Zellen. CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T-Zellen sezernieren ebenfalls IFN- $\gamma$  und sind als zytotoxische T-Zellen zusätzlich in der Lage, infizierte Zellen direkt zu eliminieren. Ihnen kommt damit eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle von Infektionen, hervorgerufen durch intrazelluläre Pathogene, zu.

### 1.2.5 Zelluläre Mechanismen der klassischen MHC I-Antigenpräsentation

In eukaryotischen Zellen werden Proteine nicht nur exprimiert, sondern auch kontinuierlich degradiert, um die Proteinmengen zu kontrollieren und fehlerhafte Proteine abzubauen (Goldberg and Rock, 1992). Ein gewisser Anteil degradiertes Proteine wird aus dem Zytosol ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, dort auf MHC I-Moleküle geladen und schließlich auf der Zellmembran präsentiert. Wie bereits erwähnt, werden MHC I-Moleküle von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert. Somit werden über MHC I fortwährend Fragmente des gesamten Protein-Pools nahezu aller Körperzellen auf deren Zelloberfläche präsentiert. In gesunden Zellen werden die präsentierten Peptide durch das überwachende Immunsystem ignoriert, da durch den Selektionsprozess keine passenden T-Zell-Rezeptoren für körpereigene Peptide existieren. Ist eine Zelle durch Mutationen entartet oder mit einem Pathogen infiziert, werden die daraufhin präsentierten Antigene von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt und die Zelle wird letztlich eliminiert (Rock et al., 2010).



**Abbildung 2: Struktur des MHC I-Moleküls**

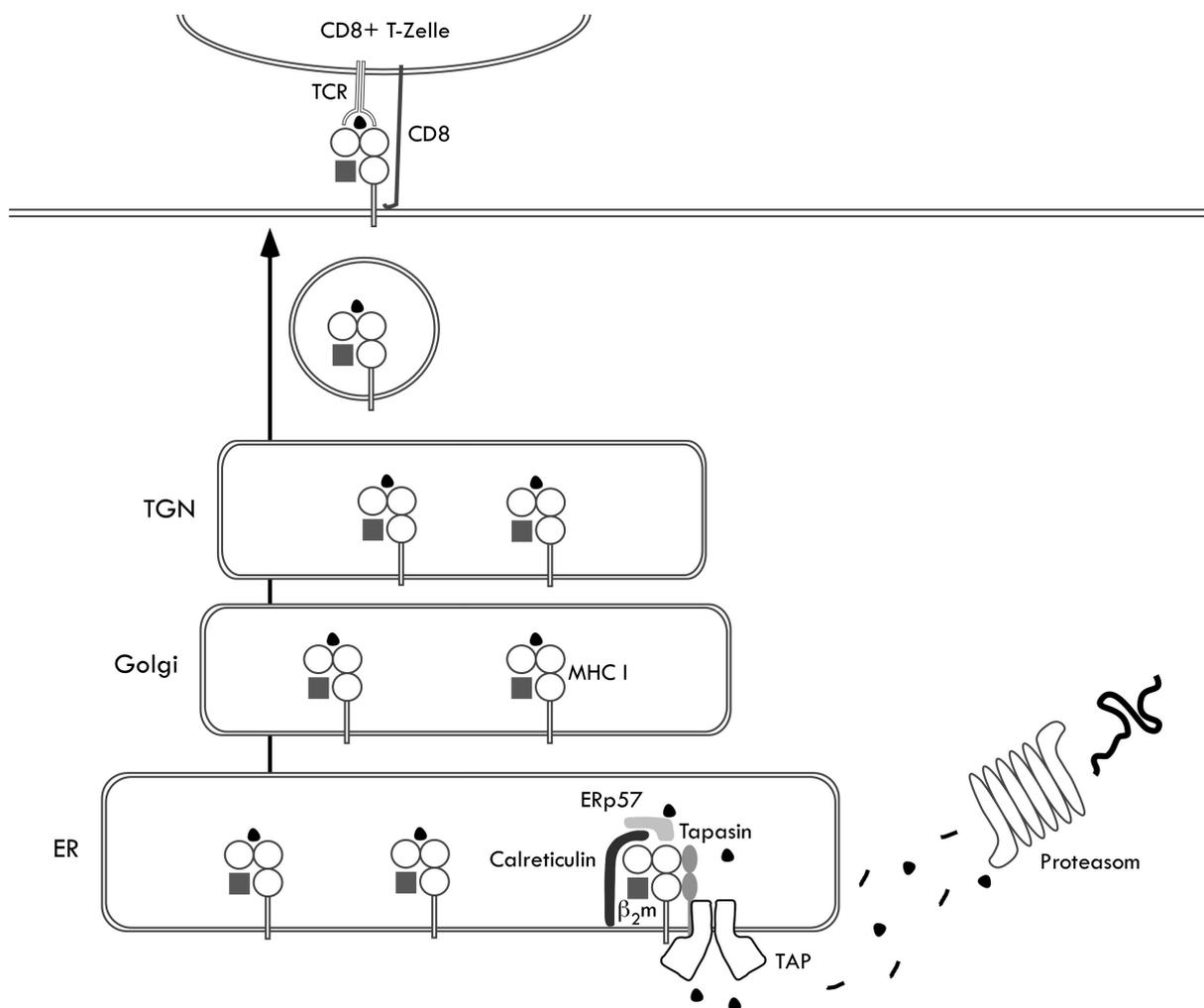
MHC I besteht aus der schweren Kette, mit den drei Domänen  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$ , das mit dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin assoziiert vorliegt. Die Kristallstrukturanalyse von MHC I wurde mit dem „PDB-viewer“ erstellt (Guex and Peitsch, 1997). Die Darstellung wurde in Anlehnung an Janeway modifiziert (Janeway et al., 2002).

MHC I-Moleküle bestehen aus einer in der Plasmamembran verankerten schweren Kette, auch  $\alpha$ -Untereinheit genannt, und einer löslichen leichten Kette, dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin (Abb. 2). Die  $\alpha$ -Untereinheit weist drei Domänen auf,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$ , wobei die Domänen  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  die Peptidbindungsfurche bilden, in der die generierten Peptide präsentiert werden (Raghavan et al., 2008).

MHC I-bindende Peptide haben eine Peptidlänge von 8-11 Aminosäuren und besitzen in der Regel zwei Ankerreste (die Bezeichnung „Ankerrest“ wird verwendet, wenn eine Position innerhalb des Peptids durch eine Gruppe charakteristischer Aminosäurereste mit verwandten Seitenketten besetzt wird), wobei sich eine Ankerposition am C-terminalen Ende befindet und häufig aliphatische oder basische Eigenschaften aufweist. Die entsprechende Peptidbindungsfurche der MHC I-Moleküle ist zu beiden Enden strukturell geschlossen und der Peptidligand liegt meist in gestreckter Konformation vor (Madden et al., 1993). Die Peptidbindungsfurche der MHC I-Moleküle besitzt Bindungstaschen, die mit den Seitenketten der gebundenen Peptid-Antigene wechselwirken (Falk et al., 1991). Diese nichtkovalenten Bindungskräfte gehen vor allem auf elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen zurück. Die Aminosäuren der Ankerpositionen des präsentierten Peptids interagieren mit den invarianten Positionen der Bindungstaschen. Da die Interaktionsstellen innerhalb der MHC I-Bindungstaschen stark polymorph sind (Bouvier and Wiley, 1994; Saper et al., 1991), findet man unterschiedliche Präferenzen der verschiedenen MHC I-Allel-Produkte in Bezug auf das zu bindende Peptid-Antigen. Die Bindungstaschen werden daher auch als *specificity pockets* bezeichnet, da sie die Ankerreste des Peptids Allel-spezifisch binden (Falk et al., 1991; Rammensee et al., 1993).

Bei der klassischen MHC I-Antigenpräsentation findet die MHC I-Peptidbeladung im ER statt. Dafür werden zunächst endogene Proteine im Zytosol durch das Proteasom in kurze Peptide gespalten. Das Proteasom stellt einen sehr großen zytosolischen Proteinkomplex mit proteolytischer Enzymaktivität dar (Kim et al., 2011b). Das 26S Proteasom eukaryotischer Zellen besteht aus einer zylindrischen 20S Untereinheit mit dem proteolytisch aktiven Zentrum und aus zwei 19S Untereinheiten, die die Interaktion mit den Substrat-Proteinen regulieren (Kloetzel, 2004). Unter Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie IFN- $\gamma$  kommt es zu einer Umstrukturierung des aktiven Zentrums und damit zu einer Veränderung der proteolytischen Eigenschaften des Proteasoms gemäß den Anforderungen an Peptide, die auf MHC I geladen werden sollen. Das Proteasom wird infolgedessen Immunoproteasom genannt (Kloetzel, 2004). Die entstandenen Peptidfragmente werden anschließend über den Transporter TAP (*transporter associated with antigen processing*), bestehend aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2, aus dem Zytosol in das ER-Lumen transportiert (Raghavan et al., 2008). Im ER bilden unbeladene

MHC I-Moleküle über das Chaperon Tapasin einen stabilen Komplex mit TAP. Zusammen mit ERp57, PDI (Proteindisulfidisomerase) und dem Lectin-Chaperon Calreticulin, die mit dem TAP-Tapasin-MHC I-Komplex assoziieren, entsteht der sogenannte Peptidbeladekomplex (PLC, *peptide loading complex*), der eine optimale MHC I-Peptidbeladung ermöglicht (Leonhardt et al., 2010; Raghavan et al., 2008). Nachdem MHC I ein Peptid gebunden hat, dissoziiert das MHC I-Molekül von dem Komplex und der neu entstandene, stabile MHC I-Peptid-Komplex verlässt das ER über den sekretorischen Weg Richtung Plasmamembran (Jensen, 2007). Auf der Plasmamembran werden die Antigene den zytotoxischen T-Zellen präsentiert.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der klassischen MHC I-Antigenpräsentation**

Zytosolisch lokalisierte Proteine werden über das Proteasom in Peptid-Antigene degradiert, die über TAP in das Lumen des ER gelangen und dort von neu synthetisierten MHC I-Molekülen gebunden werden. Über den Golgi und das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) werden die Peptid-MHC I-Komplexe auf die Plasmamembran transportiert und von CD8+ T-Zellen mit entsprechendem TCR erkannt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Loch und Tampe (Loch and Tampe, 2005).

Der entsprechende TCR erkennt und bindet das MHC I-gebundene Antigen, insbesondere die Seitenketten des Peptids, die aus der MHC I-Peptidbindungsfurche herausragen. Entscheidend für die funktionale Immunsynapse ist auch, dass T-Zellen das Antigen ausschließlich im Kontext der MHC I-Bindung erkennen. Man spricht hier von der sogenannten MHC-Restriktion der T-Lymphozyten.

Für die Initiation einer zytotoxischen T-Zell (CTL, *cytotoxic T-lymphocyte*)-Antwort müssen naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen zunächst aktiviert werden. Dies gelingt über die MHC I-vermittelte Präsentation entsprechender Antigene durch dendritische Zellen. DCs und Makrophagen besitzen die Fähigkeit, nicht nur endogene Antigene, sondern auch Antigene exogenen Ursprungs auf MHC I zu präsentieren (Rock et al., 2010). Dieser Mechanismus wird Kreuzpräsentation genannt.

### **1.2.6 Funktion dendritischer Zellen und Wege der MHC I-Kreuzpräsentation**

Dendritische Zellen sind wichtig für die angeborene Immunantwort, da sie in der Lage sind, auf Infektionen unmittelbar durch die Sekretion schützender Zytokine zu reagieren (Lipscomb and Masten, 2002). Die wesentliche Funktion der dendritischen Zellen besteht jedoch darin, der Umgebung Erreger-spezifische Antigene zu präsentieren und somit die primäre, adaptive Immunantwort, passend zu der jeweiligen Gefahrensituation, einzuleiten. Dendritische Zellen stellen demzufolge eine Art Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar.

Vorläuferzellen der DCs, die ursprünglich von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark abstammen, strömen mit dem Blutstrom in periphere Gewebe verschiedener Organe ein. Diese noch unreifen DCs haben die Fähigkeit, Fremdartigene über Phagozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose aufzunehmen und intrazellulär zu prozessieren, was zur Reifung der DCs führt. Mature dendritische Zellen wandern aus den Geweben in drainierende Lymphknoten ein, wo es zur Interaktion mit antigenspezifischen, naiven T-Zellen und somit zur Initiation einer Immunantwort kommt (Lipscomb and Masten, 2002). Im ausdifferenzierten Zustand vergrößert sich die Oberfläche der DCs, indem sich zahlreiche Ausstülpungen der Plasmamembran, sogenannte Dendriten, ausbilden. Diese Morphologie ist für die Zellen namensgebend.

Dendritische Zellen stellen keine homogene Zellpopulation dar, sondern sie lassen sich gemäß ihrer Lokalisation, Zytokinsekretion und CD-Oberflächenmerkmale in verschiedene

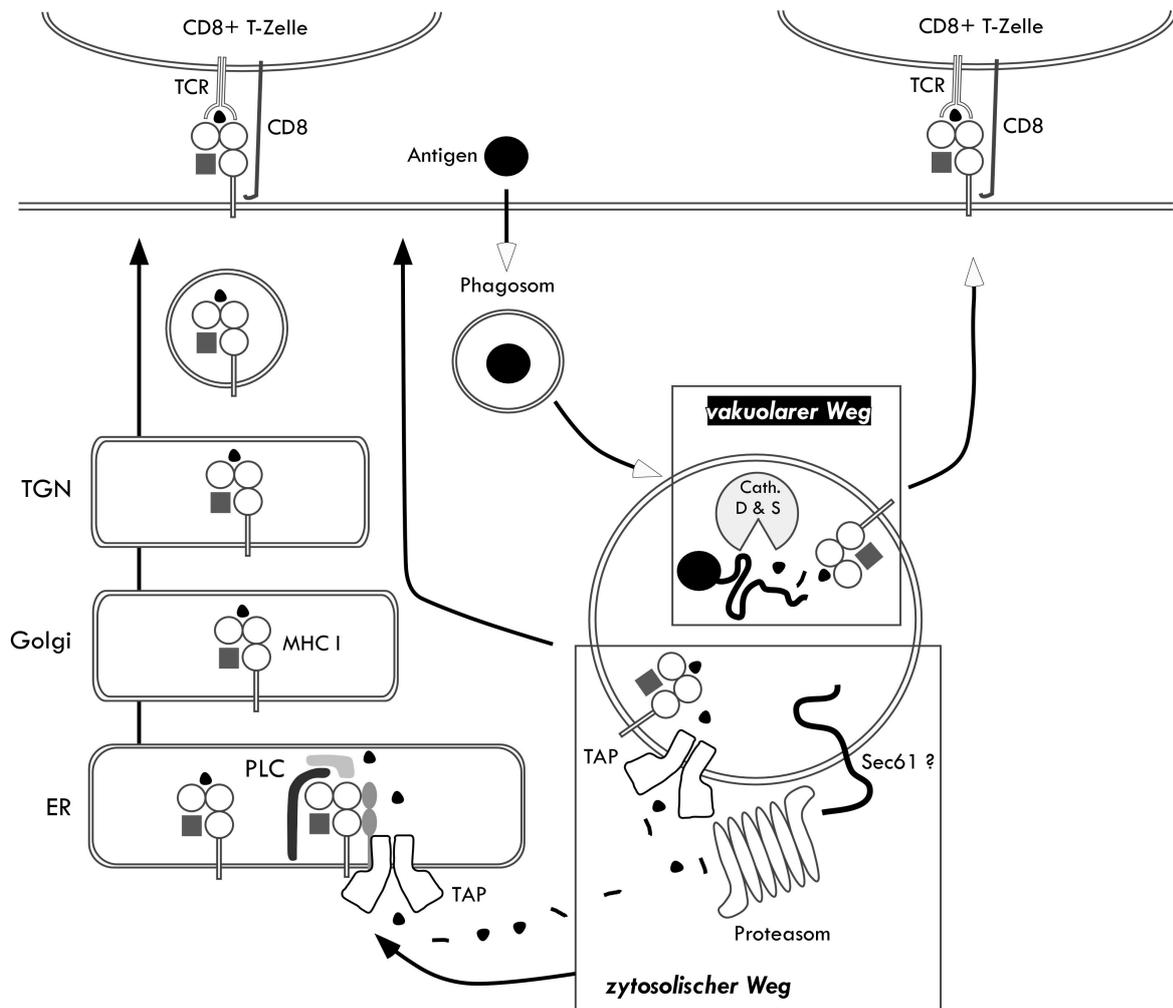
DC-Subpopulationen einteilen (Shortman and Liu, 2002; Zuniga et al., 2004). Bezüglich der Entstehung dieser verschiedenen Subtypen existieren mehrere Hypothesen. Einerseits könnte es sich um unterschiedliche Aktivierungsstadien von Zellen einer Abstammungslinie handeln, die sich aufgrund exogener Signale aus der lokalen Umgebung anders entwickeln und sich dadurch letztlich auch in ihrer Funktion unterscheiden. Andererseits könnten die DC-Subtypen auch differenzierten Zellen separater Vorläuferzellen entsprechen (Shortman and Liu, 2002; Zuniga et al., 2004). Vermutlich sind Erkenntnisse beider Modelle zutreffend. Für das Human- und Maussystem findet man sehr häufig eine Einteilung in myeloide DCs und plasmacytoide DCs (Zuniga et al., 2004). Myeloide DCs weisen das Oberflächenmerkmal CD11b auf und sind gewebeständig in sämtlichen Organen zu finden. Sie sind phagozytotisch sehr aktiv und zeigen nach Zellreifung eine charakteristische IL-12-Sekretion sowie die Expression von TLR2 und 4 (Sallusto and Lanzavecchia, 2002). Plasmacytoide DCs besitzen kein CD11b-Merkmal und ihre Morphologie ähnelt der von Plasmazellen (Rossi and Young, 2005; Shortman and Liu, 2002). Sie spielen eine besondere Rolle bei der Immunantwort gegen virale Infektionen (Barchet et al., 2005) und zeichnen sich nach der Reifung durch Typ I Interferon-Produktion sowie durch Expression von TLR7 und 9 aus (Sallusto and Lanzavecchia, 2002). Zu den charakteristischen DC-Oberflächenmarkern zählen CD11b, CD11c sowie die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86. Je nach zellulärem Reifungsgrad weisen DCs eine induzierbare und/oder konstitutive Expression von MHC I und MHC II auf. Aufgenommene antigene Strukturen werden innerhalb der Phagosomen proteolytisch degradiert, auf MHC II-Moleküle geladen und auf der Zelloberfläche CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert.

DCs sind aber auch in der Lage, Partikel aus der Umgebung nach deren Aufnahme und Prozessierung MHC I-vermittelt zu präsentieren. Da diese Proteine zunächst nicht frei im Zytosol, sondern membranumschlossen innerhalb des Phagosoms vorliegen, findet die Antigenprozessierung und -präsentation auf MHC I nicht über den klassischen Weg, sondern über Wege der sogenannten Kreuzpräsentation statt. Dadurch ist es möglich naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren und eine CTL-Immunantwort zu initiieren.

Verschiedene Wege der Kreuzpräsentation sind in der Vergangenheit beschrieben und diskutiert worden. Zwei dieser Wege, der vakuolare Weg (*vacuolar pathway*) und der zytosolische Weg (*phagosome-to-cytosol pathway*) konnten bisher gut charakterisiert werden (Abb. 4). Beim vakuolaren Präsentationsweg werden die Peptide innerhalb des

Phagosoms generiert, dort direkt auf MHC I geladen und vesikulär zur Zellmembran transportiert (Raghavan et al., 2008; Rock et al., 2010). Für den Abbau der Proteine zu kleinen Peptiden sind in erster Linie Proteasen wie Cathepsin S und D verantwortlich (Fonteneau et al., 2003; Shen et al., 2004). Die proteolytische Aktivität der Proteasen bei neutralem pH-Wert ist dabei sehr wichtig, da eine stabile Peptidbindung an MHC I bei saurem pH-Wert nicht möglich ist (Rock et al., 2010). Die MHC I-Moleküle gelangen entweder nach der Neusynthese über das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in die Phagosomen oder es handelt sich um recycelte MHC I-Moleküle, die nach der Präsentation auf der Zelloberfläche durch Endozytose wieder ins Zellinnere aufgenommen werden. Der vakuolare Weg ist demnach Cathepsin-abhängig und unabhängig vom Proteasom sowie von TAP (Raghavan et al., 2008; Shen and Rock, 2006).

Beim zytosolischen Weg werden die Proteine vom Phagosom womöglich über Sec61 ins Zytosol transferiert und dort durch das Proteasom degradiert (Rock et al., 2010). Der Sec61-Komplex vermittelt über eine wässrige Pore die Translokation sekretorischer Proteine ins ER-Lumen (Translokon) sowie die Insertion von Membranproteinen in die ER-Membran. Der Komplex besteht aus einer  $\alpha$ -Untereinheit, die den eigentlichen Translokationskanal bildet, sowie einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit, die mit dem Kanal assoziiert sind. Der Sec61-Kanal ist auch Teil des ER-Qualitätskontrollapparates ERAD (*ER-associated protein degradation*), durch den falsch gefaltete Proteine im ER erkannt und über Sec61 zum Abbau ins Zytosol zurücktransportiert werden (Osborne et al., 2005). Darüber hinaus wird vermutet, dass Sec61 neben seiner ER-Translokations- und ERAD-Funktion auch für die Überführung von Peptid-Antigenen aus vakuolaren Kompartimenten ins Zytosol verantwortlich ist (Blanchard and Shastri, 2010; Wizel et al., 2008). Die durch das Proteasom generierten Peptide werden anschließend über TAP ins ER transportiert und dort, wie beim klassischen Präsentationsweg, auf MHC I geladen. Da verschiedene Komponenten des ER auch in Phagosomen nachgewiesen werden konnten, ist auch denkbar, dass die Peptide aus dem Zytosol TAP-abhängig zurück in das Phagosom gelangen und dort die MHC I-Beladung stattfindet (Amigorena and Savina, 2010). Somit handelt es sich hier um einen TAP- und Proteasom-abhängigen Antigenpräsentationsweg.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der MHC I-Kreuzpräsentation dendritischer Zellen**

Die Prozessierung der Antigene sowie die Beladung der MHC I-Moleküle findet beim vakuolaren Kreuzpräsentationsweg innerhalb des Phagosoms statt. Dieser Weg ist Cathepsin-abhängig sowie Proteasom- und TAP-unabhängig. Beim zytosolischen Weg verlassen die phagozytierten Proteine das Phagosom und werden im Zytosol über das Proteasom abgebaut. Die Beladung der MHC I-Moleküle findet entweder im ER oder nach Rücktransport der generierten Peptid-Antigene im Phagosom statt. Dieser Weg ist TAP- und Proteasom-abhängig. Die Abbildung wurde modifiziert nach Amigorena und Savina (Amigorena and Savina, 2010)

### 1.3 Fragestellung der Arbeit

Chlamydieninfektionen stellen sowohl im humanmedizinischen als auch im veterinärmedizinischen Bereich ein nicht zu unterschätzendes Problem dar, da die unterschiedlichen Chlamydienspezies zu einem breiten Spektrum an Erkrankungen mit ernstzunehmenden Folgen wie Erblindung und Infertilität führen können. Chlamydien entwickeln und vermehren sich als obligat intrazelluläre Bakterien innerhalb einer parasitophoren Vakuole. Wie bei anderen intrazellulären Bakterien rufen die Erreger nach Infektion in erster Linie eine zelluläre Immunantwort hervor. In diesem Zusammenhang

spielen auch Chlamydien-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine funktionale Rolle. Zur Aktivierung dieser T-Zellen müssen chlamydiale Antigene zunächst von dendritischen Zellen MHC I-vermittelt präsentiert werden. Internalisierte Chlamydien, die in der Zellmembranumschlossen innerhalb der parasitophoren Vakuole vorliegen, haben allerdings keinen Zugang zum klassischen MHC I-Antigenpräsentationsweg zytosolischer Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, wie chlamydiale Antigene in den MHC I-Weg infizierter dendritischer Zellen gelangen.

Anhand zellbiologischer, biochemischer, molekularbiologischer sowie tierexperimenteller Methoden wurden die intrazellulären Mechanismen der MHC I-Antigenpräsentation chlamydialer Antigene am murinen Modellsystem C57BL/6 ermittelt.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien, Reagenzien, Detergenzien

Acetat	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Bovines Albumin, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Citrat	Merck, Darmstadt
CNBr-Sepharose™ 4B	Amersham Pharmacia, UK
Complete™-Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
Dextran 40.000 (Fluorescein Isothiocyanat Dextran)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethyldicarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Digitonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA)	Serva, Heidelberg
Glucose D (+)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutardialdehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim

---

Hydrochlorid	Riedel-de Haën, Seelze
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Ketamin, 10 %	WDT, Garbsen
Kohrsolin®	Thermo Fisher Scientific, UK
L-Glutaminsäure	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Milchpulver	Heirler-Cenovis, Radolfzell
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumkakodylat	Sigma-Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenolrot	Roth, Karlsruhe
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	BDH Laboratory Supplies, UK
Ponceau S Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rompun, 2 %	Bayer, Leverkusen
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sucrose	Serva, Heidelberg
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris	Invitrogen, Karlsruhe

Trizol (peqGold TriFast™)  
Trypsin  
Visipaque™ 320  
Wasserstoffperoxid, 30 %

Peqlab, Erlangen  
Roth, Karlsruhe  
GE Healthcare, München  
Merck, Darmstadt

## 2.2 Glaswaren

Bechergläser  
Deckgläser  
Erlenmeyer-Kolben  
Glaspipetten  
Microliter™ Syringes  
Objektträger (Stärke 1 mm, 76 x 26 mm)  
Pasteur-Pipetten

Schott-DURAN, Wertheim  
Menzel-Gläser, Braunschweig  
Schott-DURAN, Wertheim  
Scherf Präzision, Meiningen  
Hamilton, Bonaduz, Schweiz  
Superior, Lauda-Königshofen  
Hirschmann, Eberstadt

## 2.3 Plastikwaren

Deckglasröhrchen  
Einmalspritzen, Norm-Ject® (1 ml, 5 ml)  
FACS-Röhrchen (Polystyrene Round Bottom Tube)  
Immuno Plate, mixisorp (F 96)  
Kryogefäße (2 ml)  
Mikrotiterplatten (6-well, 96-well)  
Pipettenspitzen  
Polystyrol Röhrchen (12 ml)  
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)  
Real-Time PCR Gefäße  
Ultrazentrifugenröhrchen, Microfuge (1,5 ml)  
Ultrazentrifugenröhrchen, Quick-Seal (34 ml)  
Uvette®, 220-1600 nm  
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)  
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)

Thermo Fisher Scientific, UK  
Henke Sass Wolf, Tuttlingen  
BD Falcon, USA  
Nunc, Dänemark  
Greiner Bio-One, Frickenhausen  
Greiner Bio-One, Frickenhausen  
Greiner Bio-One, Frickenhausen  
Greiner Bio-One, Frickenhausen  
Eppendorf, Hamburg  
Peqlab, Erlangen  
Beckman, USA  
Beckman, USA  
Eppendorf, Hamburg  
Greiner Bio-One, Frickenhausen  
Greiner Bio-One, Frickenhausen

## 2.4 Verbrauchsmaterial

Entwickler, Roentrol HG	Tetenal, Norderstedt
Fixierer, Superfix LR	Tetenal, Norderstedt
Homogenisierungsröhrchen, Lysing Matrix D	MP Biomedicals, Eschwege
Injektionsnadel, Sterican 26 G x 1/2	Braun, Melsungen
Nitrozellulose Protran®, 0,45 mm	Thermo Fisher Scientific, UK
Parafilm	American National Can, USA
Röntgenfilm Super RX, 100 NIF	Fujifilm, Japan
Scalpellklingen	B. Braun, Melsungen
Serumröhrchen, 1 ml Z-Gel	Thermo Fisher Scientific, UK
Untersuchungshandschuhe	Meditrade, Kiefersfelden
Whatman-Filter, 3 mm	Thermo Fisher Scientific, UK
Zellsieb, 70 µm	BD Falcon, USA

## 2.5 Geräte

Agarosegelelektro- phoresekammern	Horizon® 58 Eigenbau	Gibco-BRL, Karlsruhe Universität zu Köln
Brutschränke	Brutschrank für Bakterien Zellkultur CO <sub>2</sub> Inkubator	Bergmann, Berlin Forma Scientific, USA Heraeus Christ, Osterode
Densitometer	Chromoscan 3	Joyce Loebel, UK
Durchflusszytometer	FACSCalibur Power Mac G4	Becton Dickinson, Heidelberg Apple, USA
ELISA-Reader	Sunrise Remote	Tecan, Österreich
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	IKA-Combimag RTC	Janke & Kunkel, Staufen i. B.
Mikroskope	Leica DM IL Axioskop mit UV Lampe AxioVert 200M LSM 5 EXCITER Tecnai 12	Leica Microsystems, Wetzlar Zeiss, Göppingen Zeiss, Göppingen Zeiss, Göppingen FEI, Niederlande

## Material

---

Netzgeräte	Powerpack P21	Biometra, Göttingen
	Power Pac 300	Bio-Rad, München
	Gibco BRL Modell 200	Gibco-BLR, Karlsruhe
pH-Meter	pH Benchtop Orion 3 Star	Thermo Electron, USA
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Accu Jet®	Brand, Wertheim
Pipetten	Gilson (2,10,20,200, 1000 µl)	Gilson, USA
	PreCision® (10, 50 µl)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Protein Array-Reader	Bio-Plex™ 200 System	Bio-Rad, München
Reinstwasseranlage	Milli-Q Water System	Millipore, Frankreich
Röntgenfilm Entwickler	Medical Film Processor QX-70	Konica, Hohenbrunn
Schlauchpumpe	Minipuls 2	Gilson, USA
Schüttelgeräte	VortexGenie 2	Scientific Industries, USA
	Kreisschüttler 3015	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
	Schüttler 37 °C Raum: KS501D	Janke & Kunkel, Staufen
SDS-PAGE	Elektrophorese-Apparatur	FLI Eigenbau
Sonifizierer	Sonifier B-12	Branson, USA
Sterilbänke	Model 3336 S/N 32002	CEAG Schirp, Selm-Bork
Stickstofftank	Chronos	Messer, Griesheim
Thermocycler	SmartCycler	Cepheid, USA
	T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Transfektion	Nucleofector™ II	Lonza, Köln
Ultrazentrifugen	Optima™ TL (TLA-45 Rotor)	Beckman Coulter, Krefeld
	Optima™ LE-80K (SW 28 Rotor)	Beckman Coulter, Krefeld
UV-Transilluminator	Quantum	Peqlab, Erlangen
Waagen	Mettler PE200	Mettler Waagen, Giessen
	A200S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Julabo U3	Julabo, Seelbach

Western Blot	Elektroblot-Apparatur	FLI Eigenbau
Zählkammer	Neubauer	Roth, Karlsruhe
Zell-Separation	autoMACS™	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zentrifugen	Biofuge A	Heraeus Christ, Osterode
	Megafuge 2.OR (Heraeus 8160G-Rotor)	Heraeus Christ, Osterode
	Zentrifuge EBA 12	Hettich, Tuttlingen

## 2.6 EDV-Programme

Agarosegel-Dokumentation	Vision Capt 1	Peqlab, Erlangen
DNA-Sequenzverarbeitung	Vector NTI Suit 10.1	Invitrogen, Karlsruhe
ELISA-Reader	Magellan 5	Tecan, Österreich
FACSCalibur-Auswertung	Cellquest pro	Becton Dickinson, Heidelberg
Graphikprogramme	Adobe Photoshop 7.0 Canvas 7.0	Adobe Systems, USA Deneba, USA
Immunfluoreszenzanalyse	Axio Vision	Zeiss, Göttingen
Kristallstrukturanalyse	PDB-viewer	Expasy, Schweiz
Literaturverarbeitung	Endnote 7.0	Thomson Reuters, USA
Real-Time PCR	Cepheid SmartCycler 2.0	Cepheid, USA
Röntgenfilm- Quantifizierung	UN-SCAN-IT Gel 6.1	Silk Scientific Inc., USA
Tabellen und Diagramme	Excel und Power Point 2010	Microsoft, USA
Textverarbeitung	Word 2010	Microsoft, USA

## 2.7 Medien und Medienzusätze

Amphotericin B	Bristol-Myers Squibb, Österreich
Dynabeads mouse T-Activator CD3/CD28	Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
GM-CSF, murin	Invitrogen, Karlsruhe

IFN- $\gamma$ , murin	Invitrogen, Karlsruhe
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	Grünenthal, Aachen
Streptomycinsulfat	Sanavita, Werne
TNF- $\alpha$ , murin	R&D Systems, USA

## 2.8 Inhibitoren

H89, Dihydrochloride	Santa Cruz, Heidelberg
Pepstatin A (Cathepsin D-Inhibitor)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Primaquin Diphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Z-FA-FMK (Cathepsin S-Inhibitor)	Enzo Life Science, Lörrach

## 2.9 Antikörper

### Primärantikörper

Zielprotein/Epitop	Klon/AK-Nr.	Konjugation	Verdünnung	Firma
$\beta$ -Actin	polyklonal/ A 5060		1:20.000 WB	Sigma-Aldrich, Steinheim
cathepsin D	polyklonal/ G-19, sc-6494		1:200 IF	Santa Cruz, USA
cathepsin S	polyklonal/ H-50, sc-30057		1:1.000 WB	Santa Cruz, USA
cathepsin S	polyklonal/ M-19, sc-6505		1:200 IF	Santa Cruz, USA
CD8a	monoklonal/ 53-6.7	FITC	1:50 FC	BD, Heidelberg
CD11b	monoklonal/ M1/70	PE	1:20 FC	BD, Heidelberg
CD11c	monoklonal/ HL3	FITC	1:50 FC	BD, Heidelberg
CD40	monoklonal/ 3/23	FITC	1:10 FC	Acris, Herford

CD80	monoklonal/ RM80	FITC	1:10 FC	Acris, Herford
CD80	monoklonal/ 16-10A1	Biotin	1:50 FC	BD, Heidelberg
CD86	monoklonal/ GL-1	FITC	1:50 FC	BD, Heidelberg
Chlamydia-LPS	monoklonal/ BDI 168		1:50 FC	abcam, UK
<i>C. trachomatis</i>	polyklonal/ ab21211	FITC	1:100 IF	abcam, UK
<i>C. trachomatis</i>	polyklonal/ ab13943		1:200 IF	abcam, UK
CPAF	polyklonal		1:1000 WB 1:50 IF	Prof. A Essig, Uniklinik Ulm
EEA1	polyklonal/ ab2900		1:500 IF	abcam, UK
GAPDH	monoklonal/ 6C5		1:1.000 WB	Millipore, USA
GBP1	polyklonal/ M-18, sc-10586		1:500 WB 1:200 IF	Santa Cruz, USA
Giantin	polyklonal/ ab24586		1:1.000 IF	abcam, UK
HSP60 ( <i>C. trachomatis</i> )	monoklonal/ A57-B9		1:1.000 WB	Acris, Herford
HSP60	polyklonal/ ab46798		1:20.000 WB	abcam, UK
KDEL	monoklonal/ KDEL-1		1:200 IF	Prof. G. Butcher Babraham Institute, Cambridge, UK
LAMP-1	polyklonal/ ab24170		1:1.000 IF	abcam, UK

## Material

---

M6PR	polyklonal/ ab61774		1:1.000 IF	abcam, UK
MHCI	monoklonal/ 3B10.7		1:500 WB	Prof. P. Cresswell, Yale University, USA
MHCI, H2-D <sup>b</sup>	polyklonal/ T18		1:1.000 WB	Prof. T. Elliott, University of Bristol, UK
MHCI, H2-D <sup>b</sup>	monoklonal/ KH95	FITC	1:50 FC	BD, Heidelberg
MHCI, H2-D <sup>b</sup>	monoklonal/ KH95		1:100 APA	Santa Cruz, USA
MHCI, H2-D <sup>q</sup> /L <sup>q</sup>	monoklonal/ KH117	Biotin	1:50 FC	BD, Heidelberg
MHCI, H2-K <sup>b</sup>	monoklonal/ AF6-88.5		1:50 FC 1:500 APA	BD, Heidelberg
MHCI, H2-K <sup>b</sup>	monoklonal/ AF6-88.5	PE	1:50 FC	BD, Heidelberg
MHCI, H2-K <sup>b</sup>	polyklonal/ ab93364		1:500 WB	abcam, UK
MHCI, H2-K <sup>q</sup>	monoklonal/ KH114		1:50 FC	Biozol, Eching
NFκB p65	polyklonal/ 14-6731		1:1.000 WB	eBioscience, USA
Rab11	monoklonal/ 47		1:2.000 WB 1:100 IF	Millipore, USA
TAP1	polyklonal/ D90		1:2.000 WB	Dr. M. Knittler, FLI Tübingen
TAP2	polyklonal/ 116/5		1:2.000 WB	Dr. M. Knittler, FLI Tübingen
TAP2	monoklonal/ Mac394		1:500 IF	Dr. M. Knittler, FLI Tübingen

Tapasin	polyklonal/ R.sin E	1:1.000 WB	Prof. P. Cresswell, Yale University, USA
Tapasin	monoklonal/ PaSTa-1	1:20 IP	Prof. P. Cresswell, Yale University, USA
TGN46	polyklonal/ ab50595	1:200 IF	abcam, UK
TNF- $\alpha$	polyklonal/ 05-168	1:1.000	Upstate, USA
pRb	polyklonal/ M-153, sc-7905	1:1.000 WB	Santa Cruz, USA

### Sekundärantikörper

Zielprotein/Epitop	Konjugation	Verdünnung	Firma
Biotin	FITC	1:400 FC	Sigma-Aldrich, Steinheim
IgG-Goat	FITC	1:200 FC/IF	Dianova, Hamburg
IgG-Goat	TRITC	1:200 FC/IF	Dianova, Hamburg
IgG-Guinea Pig	FITC	1:200 FC/IF	Dianova, Hamburg
IgG-Guinea Pig	TRITC	1:200 FC/IF	Dianova, Hamburg
IgG-Mouse	APC	1:200 FC/IF	BD, Heidelberg
IgG-Mouse	FITC	1:200 FC/IF	Dianova, Hamburg
IgG-Mouse	FITC	1:200 FC/IF	Dianova, Hamburg
IgG-Mouse	TRITC	1:200 FC/IF	Dianova, Hamburg
IgG-Rabbit	TRITC	1:200 FC/IF	Dianova, Hamburg
IgG-Rabbit	FITC	1:200 FC/IF	Dianova, Hamburg
IgG-Rat	FITC	1:200 FC/IF	Dianova, Hamburg
IgG-Goat	HRP	1:2.000 WB	Dianova, Hamburg
IgG-Rabbit	HRP	1:2.000 WB	Dianova, Hamburg
IgG-Mouse	HRP	1:2.000 WB	Dianova, Hamburg

## 2.10 Enzyme

Endoglykosidase H (EndoH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
N-Glycosidase F (PNGase F)	Boehringer, Mannheim

## 2.11 Gewichts- und Längenstandards

MassRuler™ DNA Ladder Mix (100 bp, 1 kb)	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

## 2.12 Kits

BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, UK
Bio-Plex mouse cytokine 23-plex panel	Bio Rad, München
IMAGEN™ Chlamydia	Oxoid, UK
Eindeckmedium ProLong® Gold	Invitrogen, Karlsruhe
Mouse CD8+ T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mouse Cytokine Array, Panel A	R&D Systems, USA
Mouse Dendritic Cell Nucleofector® Kit	Lonza, Köln
Mouse IFN- $\gamma$ Platinum ELISA	eBioscience, USA
QuantiTect SYBR Green I Kit	Qiagen, Hilden
ReddyMix™ 2 x PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, UK
Reverse Transcription System	Promega, USA

## 2.13 Primer

Alle Primer wurden bei der Firma metabion in Martinsried bestellt.

### Primer für die Mykoplasmen-PCR:

TW 28	5'-CCAGACTCCTACGGGAGGCA-3'
TW 29	5'-TGCGAGCATACTACTCAGGC-3'

### Primer für chlamydiale Gene (Goellner, 2007):

gyrA for	5'-GCGAAGCATCGTAAATGTGC-3'
gyrA rev	5'-AGCCGAAGTTTCCTTGACCAT-3'

ftsW for 5'-TTGTTCCCTGCGTCGCTATC-3'  
 ftsW rev 5'-AAAAGCTATTACGGCTGCGGA-3'

groEL for 5'-CAACAGGTAGCAGAATCCGGA-3'  
 groEL rev 5'-CTCTTCGCTGATAAGTTGGCAA-3'

sctN for 5'-TGGTCTGGGAGAACCTATCG-3'  
 sctN rev 5'-TCTGGCGACTGTGAGCATAC-3'

cpaf for 5'-CGCACCTGAGCATCGTTA-3'  
 cpaf rev 5'-AAGACAAAACCCCCAGCTCCT-3'

#### Primer für murine Gene:

m-gapdh for 5'-CACCTTCGATGCCGGGGCTG-3'  
 m-gapdh rev 5'-TGTTGGGGGCCGAGTTGGGA-3'

m-GBP1 for 5'-CAGACTCCTGGAAAGGGACTC-3'  
 m-GBP1 rev 5'-CAGCCAAATCCTCCTTGGATTC-3'

#### 2.14 siRNAs

Alle siRNAs wurden als „GeneSolution siRNA“ von der Firma Qiagen in Hilden bestellt. Als Negativkontrolle wurde die „AllStars Negative Control siRNA“ (Kat. Nr. 1027280) eingesetzt, deren Sequenz keine Homologie zu einem bekannten Säugergen aufweist.

GBP1 5'-CAGAAGGAACAGAGTTATCAA-3'  
 5'-TTGCATATCTCTGAAGATAAA-3'  
 5'-CAGATTGAAATGGAACGTATA-3'  
 5'-CAGGAAAGACTTCTCAAGCAA-3'

H2-D <sup>b</sup>	5'-CAGAGTGGTGCTGCAGAGCAT-3' 5'-TCCGAGATTGTAAAGCGTGAA-3' 5'-CCCTCAGTTCTCTTTACACAA-3' 5'-CCGGTACATCTCTGTCGGCTA-3'
H2-K <sup>b</sup>	5'-CACAGCAGACCTGAAGATAAA-3' 5'-TAGATGAATAAACTTCCAGAA-3' 5'-GGCGCTGATCACCAAACACAA-3' 5'-TCCAGAATCTGGGTCACTAAA-3'
TAP <sub>1</sub>	5'-CACATCCTCTTTCTCAGAGAA-3' 5'-CTGGTCCAGTATGATCACCAT-3' 5'-CTGGATTACTGTACTGGAACA-3' 5'-TTGGAAGAAATGAAGACTCTA-3'
Tapasin	5'-CCGGTCCTCGTGAGCTAATAA-3' 5'-CTGGTGGGTCTCGGCCCTTTA-3' 5'-AAAGGTCTTCATAGCATCTTA-3' 5'-CACCGCTGGACTCGAACTAAA-3'

## 2.15 Vektoren

TOPO Myko (Positivkontrolle, siehe Anhang)	T. Weißer, FLI Tübingen
TOPO Myko-100bp (Interne Kontrolle, siehe Anhang)	T. Weißer, FLI Tübingen

## 2.16 Chlamydienstämme

<i>Chlamydomphila psittaci</i> , Stamm DC15	Dr. K. Sachse, FLI Jena
<i>Chlamydia muridarum</i> , Stamm DC39	Dr. K. Sachse, FLI Jena

## 2.17 Mausstamm

Für tierexperimentelle Untersuchungen wurde der Maus-Inzuchtstamm C57BL/6 aus der Kleintierzucht des FLI Tübingen eingesetzt. Der MHC-Haplotyp der C57BL/6-Inzucht-Mäuse

ist für alle MHC-Komplexe H2-b. Exprimiert werden die MHC-Komplexe H2-A<sup>b</sup> (MHC II), H2-D<sup>b</sup> und H2-K<sup>b</sup> (beide MHC I). Der MHC I-Komplex H2-L<sup>b</sup> wird nicht exprimiert.

## 2.18 Zelllinien

BGM (Barron et al., 1970)

Buffalo-Green-Monkey-Zellen (permanente Zelllinie aus dem Nierenepithel der grünen Meerkatze) werden in der Regel zur Anzucht von Chlamydien eingesetzt und wurden unserem Institut freundlicherweise von Dr. Sachse vom FLI Jena überlassen.

HeLa (ATCC # CCL-2™)

Hierbei handelt es sich um eine immortalisierte humane Epithelzelllinie aus dem Zervixkarzinom der Patientin **Henrietta Lacks** (1951). Diese Zelllinie zählt zu den ältesten Zelllinien überhaupt.

JAWSII (ATCC # CRL-11904™)

Bei dieser immortalisierten Zelllinie handelt es sich um unreife dendritische Zellen aus dem Knochenmark einer p53 *knockout* C57BL/6-Maus (MacKay and Moore, 1997).

MN-R (CCLV-RIE # 282)

Die MN-R-Zelllinie ist eine murine Epithelzelllinie aus der Niere neugeborener Mäuse. Die Zelllinie stammt von der Zellbank des FLI Riems – Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine (CCLV).

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkulturmethoden

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter Verwendung einer Sicherheitswerkbank und einem beheizbaren CO<sub>2</sub>-Inkubator mit gesättigter Wasserdampf-atmosphäre unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 3.1.1 Kultivieren von Zellen

Primäre Zellen haben zumeist nur eine begrenzte Lebensdauer in Kultur und benötigen häufig eine *in vivo*-ähnliche Kultivierungsumgebung. Daher ist ihre Kultivierung experimentell sehr komplex und erfordert zahlreiche Adaptionen wie z.B. die der Medienzusammensetzung oder der entsprechenden Kultivierungsoberfläche. Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit immortalisierte Zelllinien eingesetzt, die gegenüber primären Zellen den Vorteil besitzen, dass sie in Kultur unbegrenzt vermehrt werden können und bei der Durchführung von zellbiologischen, biochemischen und molekularbiologischen Experimenten als einheitliche Zellpopulation reproduzierbare Ergebnisse liefern. Alle verwendeten immortalisierten Zelllinien (JAWSII, HeLa, BGM und MN-R) wurden bei 37 °C und 7,5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Das verwendete Medium setzte sich aus Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), 10 % fetalem Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin sowie dem Antimykotikum Amphotericin B (2,5 µg/ml) zusammen. JAWSII-Zellen wurden nach Angaben der Zellbank ATCC (*American Type Culture Collection*) mit 20 % FCS sowie dem Zytokin GM-CSF (5 ng/ml) kultiviert. Für Infektionsexperimente wurden die Zellen grundsätzlich in definierter Zellzahl in antibiotikafreiem Medium mit geringerer FCS-Konzentration (5 %) ausgesät. FCS wurde bei Bedarf aufgetaut und im Wasserbad bei 56 °C für 45 min hitzeinaktiviert.

Jeden Tag wurden die Zelllinien unter dem Mikroskop morphologisch beurteilt und in der Regel nach 2-3 Tagen 1:5 (JAWSII) oder 1:10 geteilt. Hierfür wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst und dem Verdünnungsfaktor entsprechend mit

frischem Medium umgesetzt. Durch die Zugabe des serumhaltigen Mediums wird die Wirkung des Trypsins sofort inaktiviert und EDTA teilweise gebunden.

Trypsin/EDTA (JAWSII)	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	1,15 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
	Trypsin	2,5 g
	EDTA	0,3 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1 Liter
Trypsin/EDTA (andere)	NaCl	8 g
	KCl	0,8 g
	Glucose	1 g
	NaHCO <sub>3</sub>	0,58 g
	Trypsin	0,5 g
	EDTA	0,2 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1 Liter

Trypsin/EDTA wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

### 3.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Durch eine Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff können Zelllinien dauerhaft erhalten und gelagert werden. Nach dem Pelletieren der Zellen durch Zentrifugation (300 × g, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen in einer Einfrierlösung (10 % DMSO in FCS) resuspendiert und zu jeweils 1 ml in Kryogefäße überführt. Das Lösungsmittel DMSO fungiert hierbei als Gefrierschutzmittel, indem es sich als polares Lösungsmittel zwischen die Wassermoleküle lagert, die hierdurch in ihrer regelmäßigen Anordnung, wie sie für die Eisbildung erforderlich ist, gestört sind. So wird mittels DMSO verhindert, dass sich in den Zellen und/oder der Einfrierlösung zerstörende Eiskristalle bilden und das Zellmaterial bleibt auf Dauer intakt. Um die Zellen möglichst schonend zu behandeln, folgte vor der Lagerung im

Stickstofftank zunächst für 2 Stunden eine Aufbewahrung bei – 20 °C und für die folgenden 2-3 Tage bei – 70 °C.

Einfrierlösung                      10 % DMSO in FCS

### 3.1.3 Auftauen kryokonservierter Zellen

Im Gegensatz zur Kryokonservierung sollte aufgrund der zelltoxischen Eigenschaft des DMSO im flüssigen Zustand das Auftauen von Zellen möglichst schnell durchgeführt werden. Nach dem Auftauen der Zellen bei 37 °C wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen mit 9 ml Medium überführt und zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen je nach Pelletgröße in 5 ml oder 10 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche entsprechender Größe überführt.

### 3.1.4 Test auf Mykoplasmenkontamination

Mykoplasmen stellen in der Zellkultur ein großes Problem dar, da eine Kontamination durch die lichtmikroskopische Betrachtung nicht zu erkennen ist. Die Bakterien greifen allerdings in den Stoffwechselhaushalt der Zellen ein und verändern somit deren Eigenschaften. Um eine stets vergleichbare Qualität der Zellkulturexperimente zu gewährleisten, wurden daher sämtliche Zelllinien regelmäßig mittels einer im Institut von Frau Tanja Weißer entwickelten Polymerasekettenreaktions (PCR, *polymerase chain reaction*)-Analyse auf Mykoplasmen-DNA getestet (verwendete 16S rRNA PCR-Primer siehe 2.13).

Nach der Kultivierung der Zellen für mindestens 2 Tage, wurden 100 µl Zellkulturüberstand entnommen, 5 min im Wasserbad aufgeköcht und kurz bei 10.000 x g abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 2 µl für die PCR eingesetzt und im Anschluss 5 µl des PCR-Ansatzes im 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die gewählten Primer wurde bei kontaminierten Proben neben dem Amplifikat der internen Kontrolle ein PCR-Produkt von 560 bp amplifiziert.

PCR-Ansatz:

	Ansatz 1x
H <sub>2</sub> O	5 µl
Primer TW 28	1 µl (10 pmol final)
Primer TW29	1 µl (10 pmol final)
Interne Kontroll-DNA	1 µl
ReddyMix, 2 x	10 µl
Probe	2 µl
gesamt	20 µl

Temperaturprofil:

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Ende
Temperatur	95 °C	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Zeit	60 sec	30 sec	60 sec	90 sec	5 min	∞
			X 29			

## 3.2 Chlamydienarbeiten

Sämtliche Chlamydienarbeiten wurden unter Verwendung einer Sicherheitswerkbank der Klasse II bei sterilen Bedingungen durchgeführt.

### 3.2.1 Chlamydienstammkonservierung

Für die Vermehrung von Chlamydien ist aufgrund ihrer obligat intrazellulären Lebensweise eine Wiederanzucht in Zellen erforderlich. Für einige Chlamydienstämme ist eine Aufzentrifugation der Bakterien auf die jeweiligen Wirtszellen notwendig, nicht jedoch bei *Chlamydomphila psittaci* oder *Chlamydia muridarum*. Für die zelluläre Wiederanzucht der Chlamydien wurden wie in vielen anderen Labors BGM (Buffalo-Green-Monkey)-Zellen eingesetzt.

Die Zellen wurden in T175-Zellkulturflaschen ausgesät und in antibiotikafreiem Medium kultiviert. Sobald der Zellrasen nahezu konfluent war, wurden die Zellen mit  $5 \times 10^7$  IFUs

(*inclusion-forming units*) bzw. einer sehr stark infizierten und zuvor sonifizierten Vorkultur infiziert. Um den optimalen Erntezeitpunkt bestimmen zu können, wurden parallel Monolayer-Zellen im Deckglasröhrchen mit 1/125 der Chlamydiendosis infiziert. Nach 30 h (*Chlamydophila psittaci*) bzw. 48 h (*Chlamydia muridarum*) Inkubation bei 37 °C und 7,5 % CO<sub>2</sub> wurden zunächst die Chlamydieneinschlüsse im Kontrollpräparat durch direkte Immunfluoreszenz mit dem „IMAGEN™ Chlamydia Test“ nach Vorschrift des Herstellers angefärbt und die Infektion quantitativ sowie qualitativ im Fluoreszenzmikroskop (AxioVert 200M) beurteilt. Bei maximaler Größe der Einschlüsse wurde das Medium der T175-Flaschen vorsichtig durch 3 ml Chlamydientransportmedium (SPGA) pro Flasche ersetzt und der chlamydienhaltige Zellrasen mit einem Zellschaber abgeerntet. Um die Chlamydien aus noch intakten Zellen zu gewinnen, wurde die geerntete Zellsuspension im Ultraschallbad dreimal für jeweils 10 sec bei 100 Watt sonifiziert und bis zur weiteren experimentellen Verwendung in 200 µl Aliquots bei – 70 °C eingefroren.

Chlamydientransportmedium	Sucrose	74,60 g
(SPGA)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,52 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,25 g
	L-Glutaminsäure	0,92 g
	bovines Albumin, Fraktion V	1 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1 Liter

Abgesehen von Albumin wurden alle Substanzen in H<sub>2</sub> O<sub>bidest</sub> gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Nach Zugabe von Albumin wurde die Lösung sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur weiteren experimentellen Verwendung bei – 20 °C gelagert.

### 3.2.2 Aufreinigung der infektiösen EBs mittels Ultrazentrifugation

Für die Immunisierung und Infektion der C57BL/6-Mäuse im Tierversuch wurden die infektiösen EBs aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge mit ausschwingendem Rotor in Anlehnung an Caldwell (Caldwell et al., 1981).

Nach der Ernte der Chlamydien wurde die Suspension zunächst im Ultraschallbad sonifiziert (siehe 3.2.1) und anschließend zentrifugiert (4.000 x g, 3 min, 4 °C). Der chlamydienhaltige

Überstand wurde zurückbehalten, das Pellet mit Medium resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Die Überstände aus beiden Zentrifugationsschritten wurden vereinigt und in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Danach erfolgte die Unterschichtung der Chlamydien suspension mit Visipaque-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen. Bei Visipaque handelt es sich um ein Kontrastmittel relativ hoher Dichte. Pro Röhrchen wurden über eine Schlauchpumpen-Pipette 2 ml einer 8 %igen Lösung, 3 ml einer 15 %igen Lösung gefolgt von 5 ml einer 30 %igen Lösung überführt. Nach dem Austarieren der Röhrchen wurden diese verschweißt und zentrifugiert (40.000 x g, 50 min, 4 °C). Bei den gewählten Bedingungen wurden Zelltrümmer durch das Visipaque aufgehalten, während die Chlamydien im Pellet sedimentiert werden konnten. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, für die zweite Ultrazentrifugation über die Schlauchpumpe in ein neues Ultrazentrifugenröhrchen überführt und mit Visipaque-Lösungen wie folgt unterschichtet: je 1 ml 8 %, 15 % und 30 %, 12 ml 36 %, 8 ml 40 %, 5 ml 47 %. Nach der zweiten Ultrazentrifugation (50.000 x g, 50 min, 4 °C) befanden sich die EBs im Grenzbereich zwischen der 40 %-Schicht und der 47 %-Schicht, während die RBs in der 36 %-Schicht verteilt waren. Vom Röhrchenboden aus wurden die EB- und RB-Bereiche in jeweils neue Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Um die beiden Chlamydienformen von Visipaque zu trennen wurden die Röhrchen mit PBS gefüllt, verschweißt und erneut zentrifugiert (30.000 x g, 50 min, 4 °C). Das Pellet wurde in SPGA-Medium aufgenommen, portioniert und bei -70 °C eingefroren. Vor und nach der Aufreinigung wurde die Schlauchpumpe mit 75 %igem Ethanol und 5 %igem Kohrsolin desinfiziert und mit PBS gespült.

10 x PBS	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1 Liter

### 3.2.3 Titration

Nach 6 Wochen Lagerung wurde der Titer des Chlamydienstocks ermittelt, da nach dieser Zeit kein Titerabfall mehr zu erwarten war. Hierfür wurden jeweils  $7 \times 10^4$  BGM-Zellen in 5 Deckgläsern ausgesät und mit 1 ml antibiotikafreiem Medium etwa 24 h kultiviert bis eine Konfluenz der Zellen von etwa 80 % vorlag. Nach möglichst schnellem Auftauen eines Aliquots des Chlamydienstocks wurde eine Verdünnungsreihe in PBS von  $10^{-2}$  bis  $10^{-6}$  hergestellt. Die Infektion der Zellen erfolgte mit jeweils 100 µl der vortitrierten Chlamydien suspension. Nach einstündiger Zentrifugation bei  $4.000 \times g$  und  $37^\circ C$  wurden die Röhren aufgeschraubt und weitere 24 h im Inkubator kultiviert. Für die Auswertung wurden die Einschlüsse in den Präparaten durch direkten Immunfluoreszenztest mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gegen Chlamydien-LPS angefärbt. Hierfür wurde der „IMAGEN™ Chlamydia Test“ von Oxoid verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Von einem geeigneten Präparat wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop die Einschlüsse pro Gesichtsfeld in mindestens 20 Gesichtsfeldern ausgezählt und der Titer des Chlamydienstocks berechnet. Hierfür wurde das Produkt aus dem Mittelwert der Einschlüsse aus 20 Gesichtsfeldern (X), dem Sehfeldfaktor des 63er Objektivs (2500) sowie dem Verdünnungsfaktor des ausgewerteten Präparats und dem Volumenumrechnungsfaktor (10) gebildet. Der Volumenumrechnungsfaktor ergibt sich daraus, dass die Präparate mit 100 µl infiziert wurden, der Titer aber immer pro ml angegeben wird.

$$EB/ml = X \times \text{Sehfeldfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumenumrechnungsfaktor}$$

Formel 1: Berechnung des Chlamydientiters

### 3.2.4 Infektion von Zellkulturen

Für Infektionsexperimente wurden die Zellen zunächst in definierter Zellzahl in antibiotikafreiem Medium ausgesät und nach 24 Stunden mit Chlamydien infiziert, indem entsprechend der gewünschten MOI (*multiplicity of infection*) das errechnete Volumen einer Chlamydien suspension direkt in das Medium der Zellen gegeben wurde. Die Chlamydien wurden zuvor aufgetaut und gegebenenfalls in PBS verdünnt. Für Versuchsansätze in Deckgläsern wurden die Chlamydien eine Stunde bei  $4.000 \times g$  und  $37^\circ C$  auf die Zellen

aufzentrifugiert. Bei allen anderen Versuchsansätzen wurden die Zellen nach der Infektion ohne vorherige Zentrifugation direkt im Inkubator kultiviert. Um Versuche mit Proben unterschiedlicher Infektionsdauer durchführen zu können, wurden die Zellen entweder zu unterschiedlichen Zeitpunkten infiziert oder die Zellen wurden nach zeitgleicher Infektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten für den Versuch eingesetzt. Für den Großteil der Experimente wurden die Zellen mit einer MOI von 3 infiziert. Für den Antigenpräsentations-Assay wurde eine MOI von 5 und für die Chlamydienstammkonservierung eine MOI von 10 gewählt, um eine massive Infektion der Zellen zu erzielen.

### **3.2.5 Hitzeinaktivierung von Chlamydien**

Für Experimente mit hitzeinaktivierten Chlamydien wurde ein Aliquot des Chlamydienstocks aufgetaut und bei 56 °C für 30 min im Heizblock inkubiert (Rey-Ladino et al., 2005). Anschließend wurden Zellen wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben mit den hitzeinaktivierten Chlamydien infiziert.

### **3.2.6 Bestimmung der chlamydialen Reproduktion**

Für Untersuchungen zur Vermehrung der Chlamydien in dendritischen Zellen im Vergleich zu Epithelzellen wurde die Menge der intrazellulär vorliegenden sowie der in den Zellkulturüberstand entlassenen, infektiösen Chlamydien mittels Titration bestimmt und die Reproduktionsrate berechnet.

Zunächst wurden hierfür JAWSII-Zellen (DCs) und MN-R-Zellen (Epithelzellen) in ähnlicher Zelldichte in Deckglasröhrchen mit jeweils 1 ml Medium ausgesät. Da die Zellen von unterschiedlicher Größe sind, wurden von JAWSII daher  $7 \times 10^4$  Zellen und von MN-R  $3 \times 10^4$  Zellen eingesetzt. Nach einem Tag erfolgte die Infektion der Zellen mit *C. psittaci* (DC15), MOI < 1, damit theoretisch jedes infektiöse Chlamydien-EB eine Wirtszelle infizieren konnte. Für die Infektion wurden die Deckglasröhrchen 1 h bei  $4.000 \times g$  und 37 °C zentrifugiert und im Anschluss daran im Brutschrank kultiviert. 24 und 48 Stunden nach der Infektion wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und SPGA-Medium (siehe 3.2.1) auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen in den Deckglasröhrchen jeweils dreimal für 10 sec bei 100 Watt sonifiziert und ebenso wie die Zellkulturüberstände in verschiedenen Verdünnungen zur Titration auf BGM-Zellen aufzentrifugiert ( $4.000 \times g$ , 1 h, 37 °C). Nach der

Zentrifugation und einer weiteren Stunde bei 37 °C im Brutschrank wurde das Medium der BGM-Zellen gewechselt. 24 Stunden nach der Infektion der BGM-Zellen erfolgte die Auswertung mittels Immunfluoreszenztest (siehe 3.2.3). Die errechneten Titer wurden ins Verhältnis zur eingesetzten Infektionsdosis gesetzt.

### 3.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Mittels Immunfluoreszenz (IF) können bestimmte Zielproteine in Zellen markiert und anschließend durch die Betrachtung im IF-Mikroskop lokalisiert werden.

Für IF-Experimente wurden die Zellen in Deckglasröhrchen ausgesät und je nach Fragestellung mit Chlamydien infiziert oder mit Reagenzien behandelt. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei Raumtemperatur (RT) auf dem Schüttler fixiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und in Waschpuffer (0,1 % Saponin) für 10 min bei RT permeabilisiert. Nach einstündigem Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit Blockpuffer (0,1 % Saponin/ 3 % BSA) folgte die Inkubation mit Primärantikörpern (i.d.R. 1:200 verdünnt in Blockpuffer) für 60 min ebenfalls bei RT. Danach wurden die Zellen dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper (i.d.R. 1:200 verdünnt in Blockpuffer) für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der Antikörper durch erneutes Waschen der Proben gründlich entfernt und das Deckglas mit den Zellen nach unten zeigend zusammen mit 10 µl Eindeckmedium (ProLong® Gold, Invitrogen) auf einen Objektträger gelegt. Nach dem Aushärten des Eindeckmediums über Nacht und dem Abdichten der Proben mit Nagellack konnten die Präparate mithilfe des Fluoreszenzmikroskops im Apo Tome Modus betrachtet und fotografiert werden.

Bei fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen im Weitfeld ergibt sich das Problem, dass auch die Ebenen unter und über der eigentlichen Fokusebene abgebildet werden. Dadurch kommt es zur Überstrahlung der Fluoreszenzsignale. Durch Apo Tome werden ausschließlich die Fluoreszenzsignale aus der Fokusebene aufgenommen und als gestochen scharfes Bild in guter Auflösung dargestellt. Mit diesen Aufnahmen, die bei dem Einsatz des 63er Objektivs einer Schnittebene von 0,7 µm entsprechen, können sehr gute Kollokalisationsanalysen durchgeführt werden (Workshop Konfokale Mikroskopie, 30.9.2008, Zeiss). Dabei werden die Expressionsmuster zweier Proteine farblich, z.B. rot

und grün, dargestellt und computergestützt übereinandergelegt. Bereiche, die für beide Proteine positiv sind, erscheinen daraufhin gelb bzw. orange.

### Quantifizierung der Kollokalisierung

Das Zusatzmodul Kollokalisierung des Programms „AxioVision“ ermöglicht es, eine quantitative Aussage über die Kollokalisierung zweier Proteine treffen zu können. Dabei wird zunächst ein sogenanntes „Scatter“-Diagramm erstellt, welches über die Pixelintensität der beiden Fluoreszenzkanäle Aufschluss gibt und nach Bestimmung der Schwellenwerte, die Kollokalisationsregion begrenzt (Costes et al., 2004). Für die Auswertungen in dieser Arbeit wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson eingesetzt, der von dem Anteil kollokalisierter Signale in beiden Kanälen abhängt und der sich somit für die objektive Beurteilung einer Kollokalisierung zweier Proteine sehr gut eignet (Manders et al., 1992). Der Wertebereich des Pearson-Koeffizienten geht von -1 bis 1, wobei Werte, die größer als null sind für eine positive Kollokalisierung sprechen und der Wert 1 eine 100 %ige Kollokalisierung beschreibt (<http://www.zeiss.de>).

Fixierlösung (IF)	2 % Paraformaldehyd in PBS 2 Tropfen NaOH zugeben (2 M) pH 7,4
Waschpuffer (IF)	0,1 % Saponin in PBS
Blockpuffer (IF)	0,1 % Saponin 3 % BSA in PBS

## 3.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Durch die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wird ein Objekt abgebildet, indem Elektronen hindurchstrahlen. Der große Vorteil der Transmissionselektronenmikroskopie besteht in ihrer enormen Auflösung. Die Präparation der Objekte erfolgt nach einem relativ aufwändigen Verfahren. Für diese Arbeit wurden Chlamydien-infizierte Zellen in

experimenteller Kooperation mit Frau Prof. Liebler-Tenorio, FLI Jena, für die TEM aufgearbeitet und elektronenmikroskopisch analysiert.

Da pro Ultradünnschnitt nur wenige Zellen beurteilt werden können, wurde, um möglichst jede Zelle zu infizieren, eine MOI von 10 gewählt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24 hpi, 48 hpi, 72 hpi) wurden die JAWSII-Zellen (T75) mit Fixierlösung (6 ml) überschichtet, mindestens eine Stunde bei 4 °C inkubiert und anschließend viermal für 15 min bei 4 °C mit Cacodylatpuffer gewaschen. Nach dem vorsichtigen Abschaben der Zellen mit einem Zellschaber wurden die fixierten Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 1.500 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit Cacodylatpuffer überschichtet und bei 4 °C gelagert, bis die Einbettung und die mikroskopische Untersuchung am FLI in Jena erfolgte. Hierfür wurden die Zellen zunächst in 2 % flüssiger Agarose eingebettet und in 1 mm<sup>3</sup> große Würfel geschnitten. Anschließend folgte die Fixierung der Würfel in 2 % Osmium, die Entwässerung mit Hilfe verschiedener Aceton-Verdünnungen sowie die Infiltration von Araldit Cy212. Nach der Polymerisation konnten Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 85 nm angefertigt werden.

Cacodylatpuffer (TEM)	0,1 M Natriumcacodylat in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> mit HCL (1 M) pH-Wert auf 7,2-7,4 einstellen
Fixierlösung (TEM)	2,5 % Glutardialdehyd in Cacodylatpuffer

### 3.5 Histologische Analysen

Um einen Eindruck von der Schädigung des Lungengewebes sowie der initialen Immunreaktionen in der Lunge nach Chlamydieninfektion bei Mäusen zu erlangen, wurden histologische Schnitte von Lungen infizierter C57BL/6-Mäuse angefertigt und beurteilt. Die experimentelle Durchführung der histologischen Untersuchungen sowie die pathologische Beurteilung der Schnitte wurden in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Liebler-Tenorio, FLI Jena, durchgeführt.

9 Wochen alte C57BL/6-Mäuse wurden mit  $1 \times 10^5$  IFUs (DC15) intranasal infiziert. Nach 2, 4 und 11 Tagen wurde jeweils einer Maus die Lunge entnommen und direkt zur Fixierung in neutral gepuffertes Formalin gegeben. Am FLI in Jena wurden die Proben zunächst

vollständig entwässert und in flüssigem Paraffin eingebettet. Mithilfe eines Mikrotoms wurden aus dem kalten Paraffinblock Gewebeschnitte im  $\mu\text{m}$ -Bereich angefertigt, die für die immunhistologischen Untersuchungen auf geladene Objektträger aufgezogen und mit unterschiedlichen Methoden gefärbt wurden. Zum einen wurden die Präparate zur besseren Beurteilung der Gewebestrukturen einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung unterzogen und zum anderen wurde eine Perjodsäure-Schiff'sches Reagenz (PAS)-Reaktion durchgeführt um entzündungsbedingte Ansammlungen von Flüssigkeit (Exsudat) besser darstellen zu können. Zusätzlich wurden zur Darstellung von Gefäß- und Kapillarwänden der Faktor VIII sowie die Chlamydieneinschlüsse immunhistologisch mit entsprechenden Antikörpern spezifisch angefärbt. Abschließend wurden die verschiedenen Lungenschnitte fotografisch dokumentiert.

## **3.6 Zellbiologische Methoden**

### **3.6.1 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Detektionsreagenzien bestimmte Eigenschaften von Zellpopulationen zu analysieren. Die durchflusszytometrische Analyse ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist in den meisten Anwendungen die Antigen-Antikörper-Interaktion, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension in einem Flüssigkeitsstrom an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsenergieniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photonendetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Größe und inhaltlichen Strukturen (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen. Eine simultane Messung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ist möglich, weil sich die

eingesetzten Farbstoffe zwar bei der gleichen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische, Emissionsspektren verfügen.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen wurden die Zellen stets auf Eis transportiert und sämtliche Schritte bei 4 °C durchgeführt. Mit infizierten Zellen wurde bis zur Fixierung unter der Sterilbank gearbeitet.

### **Detektion von Oberflächenmolekülen**

Zunächst wurden die Zellen abtrypsinisiert und zweimal mit je 1 ml kaltem DFN gewaschen (300 x g, 5 min, 4 °C). Anschließend folgte die Zugabe des Primärantikörpers (verdünnt in DFN), der während der Inkubation für 30 min bei 4 °C auf dem Überkopfröller spezifisch an das gewünschte Protein bindet. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit je 200 µl kaltem DFN gewaschen. Im Anschluss wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (verdünnt in DFN) zugegeben und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln auf dem Überkopfröller inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet dabei spezifisch an den Primärantikörper, wodurch das gewünschte Protein über das Fluorochrom später zu detektieren ist. Sobald die Zellen fluoreszenzmarkiert sind, ist darauf zu achten, dass die Proben keinem direkten Licht mehr ausgesetzt sind. Nach zwei weiteren Waschstufen wurden die Zellen mit 200 µl 1 %igem PFA für 10 min fixiert, zur Entfernung des PFA noch einmal mit DFN gewaschen und für die Messung im FACSCalibur™ von BD in 500 µl DFN aufgenommen.

### **Detektion intrazellulär lokalisierter Proteine**

Für eine Markierung von intrazellulär lokalisierten Proteinen wurden die Zellen nach dem Abtrypsinisieren und Waschen mit 200 µl 1 %igem PFA für 10 min fixiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen zum Blocken der unspezifischen Antikörperbindungsstellen mit 200 µl Blockpuffer (10 mM Glycin in PBS) gewaschen. Um die Zellmembran für die Antikörper passierbar zu machen, wurden die Zellen mit 200 µl Waschpuffer (0,5 % Ovalbumin, 0,5 % Saponin in PBS) für 30 min bei RT permeabilisiert und für weitere 30 min mit dem Primärantikörper (verdünnt in Waschpuffer) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit Sekundärantikörper (verdünnt in

Waschpuffer) für 30 min im Dunkeln. Nach einem Waschschrift mit 200 µl DFN wurden die Zellen in 500 µl DFN aufgenommen und mit dem FACSCalibur™ von BD gemessen.

500 x DAB	449 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 246 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
DFN	10 % FCS 0,2 % 500 x DAB 0,1 % Natriumazid in PBS
Fixierlösung (FC)	2 % Paraformaldehyd in PBS 2 Tropfen NaOH (2 M) pH 7,4
Blockpuffer (FC)	10 mM Glycin in PBS
Waschpuffer (FC)	0,5 % Ovalbumin 0,5 % Saponin in PBS

### 3.6.2 Bestimmung der Phagozytoseaktivität dendritischer Zellen

Nach der Infektion unreifer dendritischer Zellen differenzieren diese zu reifen DCs aus, was unter anderem den Verlust der Phagozytosefähigkeit zur Folge hat. Um den Einfluss der Infektion mit Chlamydien auf die DC-Reifung zu überprüfen, wurde die Phagozytosefähigkeit nach Infektion über die Aufnahme von FITC-gekoppeltem Dextran 40.000 Da in JAWSII durchflusszytometrisch gemessen.

JAWSII-Zellen wurden hierfür ausgesät und für 72 h mit *C. psittaci* (MOI 3) infiziert. Im Anschluss an die Infektionsdauer wurden 2 mg/ml FITC-gekoppeltes Dextran 40.000 Da direkt zu den Zellen gegeben. Nach sechsständiger Inkubation wurden die Zellen abtrypsinisiert, zweimal mit je 200 µl DFN gewaschen und mit 200 µl 1%igem PFA für

10 min fixiert. Zur Entfernung des PFA wurden die Zellen nochmals mit 200 µl DFN gewaschen und für die Messung im FACSCalibur™ in 500 µl DFN aufgenommen (siehe 3.6.1). Die Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu einer nicht infizierten Kontrolle entspricht der Reduktion der Phagozytosefähigkeit in differenzierten DCs.

### 3.6.3 Herstellung von Zelllysaten

Um Zelllysate herzustellen wurde zunächst das Medium der Zellen entfernt und anschließend der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von Lysepuffer (200 µl pro T75-Flasche) wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Inkubation der Zellen für 30 min auf Eis, folgte ein Zentrifugationsschritt (25.000 x g, 30 min, 4 °C), um die nicht lysierten Bestandteile wie Zellkerne zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und der Proteingehalt der hergestellten Zelllysate mit Hilfe des „BCA Protein Assay Kits“ nach Angaben des Herstellers bestimmt. Anschließend konnten die Lysate bei – 20 °C gelagert oder direkt für die SDS-PAGE eingesetzt werden (siehe 3.7.1). Hierfür wurden von jeder Probe in der Regel 80 µg Protein verwendet. Für eine β-Actin Anfärbung reichten 20 µg pro Tasche aus.

Lysepuffer

1 % Triton X-100 in PBS

Complete™-Proteaseinhibitor

### 3.6.4 Zellfraktionierung in zytosolische und nukleäre Fraktion

Bei einer Zellfraktionierung werden einzelne Zellbestandteile voneinander getrennt. Mit der hier beschriebenen Methode wurden Zelllysate der zytosolischen sowie der nukleären Fraktion von JAWSII-Zellen hergestellt.

Die Zellen wurden in einer T75-Zellkulturflasche kultiviert und zunächst zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 200 µl kaltem Puffer I je T75-Flasche wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Sedimentation der noch intakten Zellkerne durch Zentrifugation bei 1.200 x g für 5 min bei 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, als zytosolische Fraktion gekennzeichnet und bis

zur weiteren Verwendung bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Um die nukleäre Fraktion möglichst rein, das heißt ohne zytosolische Zellbestandteile, zu isolieren wurde das Pellet mit  $200\text{ }\mu\text{l}$  kaltem Puffer I resuspendiert, erneut für  $15\text{ min}$  auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert ( $1.200 \times g$ ,  $5\text{ min}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Um die Zellkerne aufzuschließen wurde das Pellet in  $200\text{ }\mu\text{l}$  kaltem Puffer II resuspendiert, für  $15\text{ min}$  auf Eis inkubiert und diesmal bei maximaler Geschwindigkeit für  $5\text{ min}$  bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues  $1,5\text{ ml}$  Reaktionsgefäß überführt und als nukleäre Fraktion gekennzeichnet. Bis zur Analyse im Western Blot (siehe 3.7.1 und 3.7.2) wurde die Fraktion bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Puffer I	$0,33\text{ M}$ Sucrose $10\text{ mM}$ Hepes, pH $7,4$ $1\text{ mM}$ $\text{MgCl}_2$ $0,1\%$ Triton X-100 Complete™-Proteaseinhibitor
Puffer II	$0,45\text{ M}$ NaCl $10\text{ mM}$ Hepes, pH $7,4$ Complete™-Proteaseinhibitor

## 3.7 Proteinbiochemische Methoden

### 3.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-PAGE nach Laemmli können Proteine im Zelllysate nach ihrer scheinbaren Größe aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) bindet dabei gleichmäßig an Proteine, führt zu deren Denaturierung und verleiht ihnen eine negative Ladung. Dadurch wandern sie im elektrischen Feld Richtung Pluspol, werden währenddessen durch das Polyacrylamid-Gel aufgehalten und somit gemäß ihrer Größe aufgetrennt.

Die Proben wurden zunächst mit  $2 \times$  Probenpuffer versetzt,  $20\text{ min}$  bei RT geschüttelt und anschließend mit einer Hamilton-Pipette auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in  $1 \times$  E-Puffer mit  $0,1\%$  SDS bei  $30\text{ mA}$ . Als Molekulargewichtsmarker wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ der Firma Fermentas verwendet.

Zusammensetzung des Acrylamidgels:

	Sammelgel 4 %	Trenngel 10 %
Acrylamid	1,3 ml	10 ml
Trenngelpuffer		7,5 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	6,1 ml	12 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,3 ml
APS	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	50 µl	50 µl

2 x SDS-Probenpuffer

10 % SDS                      20 ml

100 % Glycerin              10 ml

0,5 M Tris (pH 6,8)        12,5 ml

H<sub>2</sub> O<sub>bidest</sub>                      7,5 ml

einige Kristalle Bromphenolblau

7 % β-Mecaptoethanol (frisch zugeben)

10 x E-Puffer

250 mM Tris

1,9 M Glycin

für SDS-PAGE: 1 x E-Puffer mit 0,1 % SDS

für Western Blot: 1 x E-Puffer

Sammelgelpuffer                      0,5 M Tris, pH 6,8

Trenngelpuffer                        1,5 M Tris, pH 8,8

### 3.7.2 Western Blot-Analyse

Die Western Blot-Analyse wurde nach Renart und Towbin (Renart et al., 1979; Towbin et al., 1979) modifiziert. Nachdem die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, folgte mittels Western Blot der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (0,45 µm) bei einer Stromstärke von 400 mA für 35 min. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x E-Puffer verwendet. Um die Übertragung umgehend zu überprüfen, wurden die Proteine durch eine Ponceau S-

Lösung reversibel angefärbt. Anschließend wurde die Membran mit Wasser gewaschen und in Blocklösung für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen und mit einem für das gewünschte Protein spezifischen Primärantikörper (verdünnt in Waschpuffer mit 10 % FCS) 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal gewaschen und mit dem entsprechenden HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörper 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten erfolgte die Detektion der spezifisch gebundenen Antikörper in der Dunkelkammer mittels ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Reaktion. Bei HRP handelt es sich um eine Peroxidase aus dem Meerrettich, die die Oxidation von Luminol unter Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert. Dadurch kommt es zur Emission von sichtbarem Licht, das durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert werden kann. Die beiden ECL-Lösungen wurden im Verhältnis 1:2 gemischt und auf die Membran gegeben. Nach 1 min wurde die Membran auf einem Whatman-Filter getrocknet. Anschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und in einer automatischen Entwicklermaschine (Medical Film Processor QX-70) entwickelt.

Ponceau-S-Lösung	0,1 % Ponceau-S 5 % Acetat
Waschpuffer (WB)	0,1 % Tween 20 in PBS
Blockpuffer (WB)	0,1 % Tween 20 5 % Milchpulver in PBS
Antikörperlösung	0,1 % Tween 20 10 % FCS in PBS

Detektionslösung A	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	88,56 ml
	1 M Tris-HCL (pH 8,5)	10 ml
	250 nM Luminol	1 ml
	90 mM p-Cumarinsäure	0,44 ml
	Lagerung bei 4 °C	
Detektionslösung B	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	89,94 ml
	1 M Tris-HCL (pH 8,5)	10 ml
	30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60 µl
	Lagerung bei 4 °C	

### 3.7.3 Deglykosylierung von MHC I mittels Endoglykosidase H (EndoH)

Während der Prozessierung werden Proteine wie MHC I posttranslational im ER mit N-glykosidisch gebundenen Zuckerseitenketten versehen, die im Golgi weiter modifiziert werden. Bei Endoglykosidase H handelt es sich um ein Enzym, welches N-glykosidisch gebundene Zuckerreste vom *high mannose*-Typ abspaltet, die noch nicht modifiziert wurden (Yamamoto, 1994). Da modifizierte Glykoproteine somit EndoH-resistent sind, kann mittels EndoH-Verdau zwischen ER-ständigen und post-ER Proteinen unterschieden werden.

10 µl Zelllysat wurden mit 20 µl EndoH-Puffer für 30 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurden 1,5 µl ( $\hat{=}$  7,5 U) EndoH hinzugegeben und über Nacht bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Als Negativkontrolle wurde für jedes Lysat ein Ansatz ohne EndoH mitgeführt. Die EndoH-Sensitivität konnte anschließend mittels Western Blot überprüft werden, da die Deglykosylierung zu einer Abnahme des Molekulargewichts führt.

EndoH-Puffer	50 mM Trinatriumcitrat pH 5,5
	0,1 M $\beta$ -Mercaptoethanol
	0,01 % SDS

### 3.7.4 Deglykosylierung von MHC I mittels N-Glykosidase F (PNGase F)

Das Enzym PNGase F spaltet, anders als EndoH, alle N-glykosidisch gebundenen Zuckerreste von Glykoproteinen ab. Der Verdau mit PNGase F stellt somit für die Deglykosylierung von Glykoproteinen eine Kontrolle dar, da jedes Glykoprotein nach dem Verdau vollständig deglykosyliert und folglich im Western Blot durch sein geringeres Molekulargewicht erkennbar sein sollte.

10 µl Lysat wurden zusammen mit 1 µl des mitgelieferten 10 x Puffers für 30 min bei RT geschüttelt. Nach der Zugabe von je 1 µl Enzym wurden die Proben bei 37 °C über Nacht im Thermocycler inkubiert. Die mit PNGase F verdauten Proben wurden zusammen mit unverdauten Kontrollproben im Western Blot auf die Deglykosylierung hin überprüft.

### 3.7.5 Bestimmung der MHC I-Oberflächenstabilität

Um die Oberflächenstabilität der MHC I-Moleküle in JAWSII zu ermitteln, wurden die Zellen mit Brefeldin A (BFA) inkubiert. BFA blockiert den Proteintransport vom ER zum Golgi und verhindert damit die Zufuhr neu synthetisierter MHC I-Moleküle aus dem ER Richtung Plasmamembran (Nuchtern et al., 1989). Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  in T25-Flaschen ausgesät und für 3, 6, 12 und 18 Stunden mit BFA (10 µg/ml) inkubiert. Die Detektion der MHC I-Oberflächenmoleküle erfolgte im Durchflusszytometer, nach vorheriger Inkubation der Zellen mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern (siehe 3.6.1). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

### 3.7.6 Bestimmung des MHC I-Recyclings

Um den Anteil recycelter MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche von JAWSII zu bestimmen, wurden die Zellen mit Primaquin behandelt. Durch die Zugabe von Primaquin wird das Recycling endozytotisch aufgenommener Oberflächenmoleküle spezifisch inhibiert (Reid and Watts, 1990). Im Durchflusszytometer kann anschließend der Rückgang der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle gemessen und dadurch der Anteil recycelter Moleküle errechnet werden.

JAWSII-Zellen wurden mit einer Zellzahl von  $3 \times 10^5$  pro *well* in 6-*well*-Platten ausgesät und für 72 h mit 10 µM Primaquin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abtrypsinisiert, mit

spezifischen Antikörpern gegen MHC I inkubiert und durchflusszytometrisch gemessen (siehe 3.6.1).

### 3.8 Molekularbiologische Methoden

#### 3.8.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem Reagenz „peqGold TriFast™“ von Peqlab. Das Prinzip basiert auf einer Flüssigphasen-Separation.

1 ml TriFast wurden pro 10 cm<sup>2</sup> Flaschenboden zu den adhären Zellen gegeben und diese durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren lysiert. Danach wurde die Suspension je nach Volumen in ein entsprechendes Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei RT inkubiert. Pro ml TriFast wurden 0,2 ml Chloroform zugeben und für 15 sec kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurden die Proben zur Phasentrennung zentrifugiert (12.000 x g, 5 min, RT). Die obere flüssige Phase, in der die RNA angereichert vorliegt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem ml TriFast gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C präzipitiert. Der Isopropanolüberstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet zweimal mit 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen. Dabei wurde das Pellet durch Vortexen resuspendiert und anschließend jeweils 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde im Heizblock bei 56 °C getrocknet und in 50 µl RNase-freiem DEPC-Wasser (0,1 % DEPC, autoklaviert) gelöst. Zuletzt wurde die RNA-Konzentration im Photometer gemessen und bei –70 °C gelagert oder direkt in die PCR eingesetzt.

DEPC-Wasser

0,1 % DEPC in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, autoklaviert

#### 3.8.2 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) RNA in komplementäre DNA (cDNA, *complementary* DNA) umgeschrieben. Da DNA wesentlich stabiler ist als RNA, lässt sich eine cDNA-Probe entsprechend besser lagern. Durch den Einsatz von Random-Primern wird keine spezifische Sequenz sondern die gesamte RNA der

Probe transkribiert. Bei diesen Primern handelt es sich um eine Mischung aus kurzen Sequenzen (8 Nukleotide) mit jeder möglichen Basen-Kombination. Verwendet wurde das RT-System von Promega. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

RT-Ansatz:

	Ansatz 1 x
MgCl <sub>2</sub>	4 µl
Puffer	2 µl
dNTP	2 µl
Random-Primer	1 µl
RNasin	0,5 µl
AMV-RT (20 U/µl)	0,75 µl
RNA-Probe (1 µg in H <sub>2</sub> O)	10 µl
gesamt	20 µl

Temperaturprofil:

	Transkription	Transkription	Denaturierung	Ende
Temperatur	42 °C	42 °C	95 °C	4 °C
Zeit	Pause	30 min	5 min	∞

### 3.8.3 Semiquantitative PCR

Mittels semiquantitativer PCR können bekannte DNA bzw. cDNA-Sequenzen im Thermocycler amplifiziert werden. Dabei lagert sich ein spezifischer Primer an die komplementäre Sequenz des durch Denaturierung entstandenen DNA-Einzelstrangs an und initiiert somit die Synthese der DNA durch die DNA-Polymerase. Die Thermostabilität dieses Enzyms erlaubt die Abfolge mehrerer Zyklen im vollautomatischen Thermocycler. Die PCR-Produkte werden anschließend im Agarosegel gemäß ihrer Größe aufgetrennt.

PCR-Ansatz:

	Ansatz 1 x
H <sub>2</sub> O	7 µl
Primer for	1 µl (25 pmol final)
Primer rev	1 µl (25 pmol final)
ReddyMix, 2 x	10 µl
Probe	1 µl (50 ng)
	20 µl

Temperaturprofil:

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Ende
Temperatur	94 °C	94 °C	55 /56 /58 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Zeit	5 min	30 sec	30 sec	60 sec	10 min	∞
		X 25				

### 3.8.4 Real-Time Quantitative PCR

Die Real-Time Quantitative PCR ermöglicht die Quantifizierung der mRNA (*messenger RNA*) einer Probe in Echtzeit. Im ersten Schritt wird die RNA in cDNA translatiert und anschließend ein spezifisches Fragment amplifiziert. Eine Möglichkeit der Quantifizierung ist die Verwendung von interkalierenden Farbstoffen wie SYBR Green I, das an doppelsträngige DNA bindet und ein Fluoreszenzsignal emittiert. Somit nimmt die Fluoreszenz proportional zu den PCR-Fragmenten mit jedem Zyklus zu. Als Richtwert wird der sogenannte Ct-Wert (*cycle threshold*) ermittelt. Der Ct-Wert entspricht der Zyklusanzahl, bei der ein für alle Proben konstantes Fluoreszenzniveau erreicht ist. Liegen in einer Probe viele mRNA-Moleküle eines Gens vor, werden entsprechend weniger Zyklen benötigt, um dieses Fluoreszenzniveau zu erreichen.

Für eine relative Quantifizierung wird der Ct-Wert eines Referenzgens, zum Beispiel GAPDH, ermittelt und von dem Ct-Wert des Zielgens abgezogen ( $\Delta$ Ct-Wert). Um einen relativen Expressionsunterschied zwischen zwei Proben zu berechnen, bietet sich die sogenannte  $\Delta\Delta$ Ct-Methode an. Dabei wird der  $\Delta$ Ct-Wert der Probe 1 von dem  $\Delta$ Ct-Wert der Probe 2

abgezogen. Geht man von einer 100 %igen Effizienz, also von einer Verdoppelung der Amplifikate in jedem Zyklus aus, so ergibt sich aus der Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  der relative Unterschied in der mRNA-Ausgangsmenge der beiden Proben (Livak and Schmittgen, 2001).

Ein Nachteil der Real-Time PCR ist, dass das Fluoreszenzsignal unspezifischer PCR-Produkte ebenfalls gemessen wird. Um die Fragmentlänge und somit die Spezifität der PCR-Produkte zu bestimmen wird nach Ablauf der PCR eine Schmelzkurve erstellt.

PCR-Ansatz:

	Ansatz 1 x
H <sub>2</sub> O	8,25 µl
SYBP Green I	12,5 µl
Primer for	1 µl (25 pmol final)
Primer rev	1 µl (25 pmol final)
RT	0,25 µl
Probe	2 µl (50 ng)
	25 µl

### 3.9 Antigenpräsentations-Assay

Um zu untersuchen, welche Komponenten bei der MHC I-vermittelten Präsentation von chlamydialen Antigenen in DCs eine funktionale Rolle spielen, wurde zunächst die Expression und Funktion verschiedener Proteine in DC-Populationen durch die Transfektion spezifischer siRNA (*short interfering RNA*) bzw. durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren sowie neutralisierender Antikörper ausgeschaltet. Nach der Infektion der unterschiedlichen DC-Populationen mit *C. psittaci* wurden diese zusammen mit Chlamydien-spezifischen CD8+ T-Zellen aus der Milz zuvor EB-immunisierter C57BL/6-Mäuse kokultiviert. Über die im ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ermittelte IFN- $\gamma$ -Sekretion der kokultivierten CD8+ T-Zellen konnten direkte Rückschlüsse auf die antigenspezifische CD8+ T-Zell-Stimulierung und somit auf die Einflussnahme der herunterregulierten bzw. blockierten Komponenten bei der MHC I-vermittelten Chlamydien-Antigenpräsentation in DCs gezogen werden (Abb. 5).

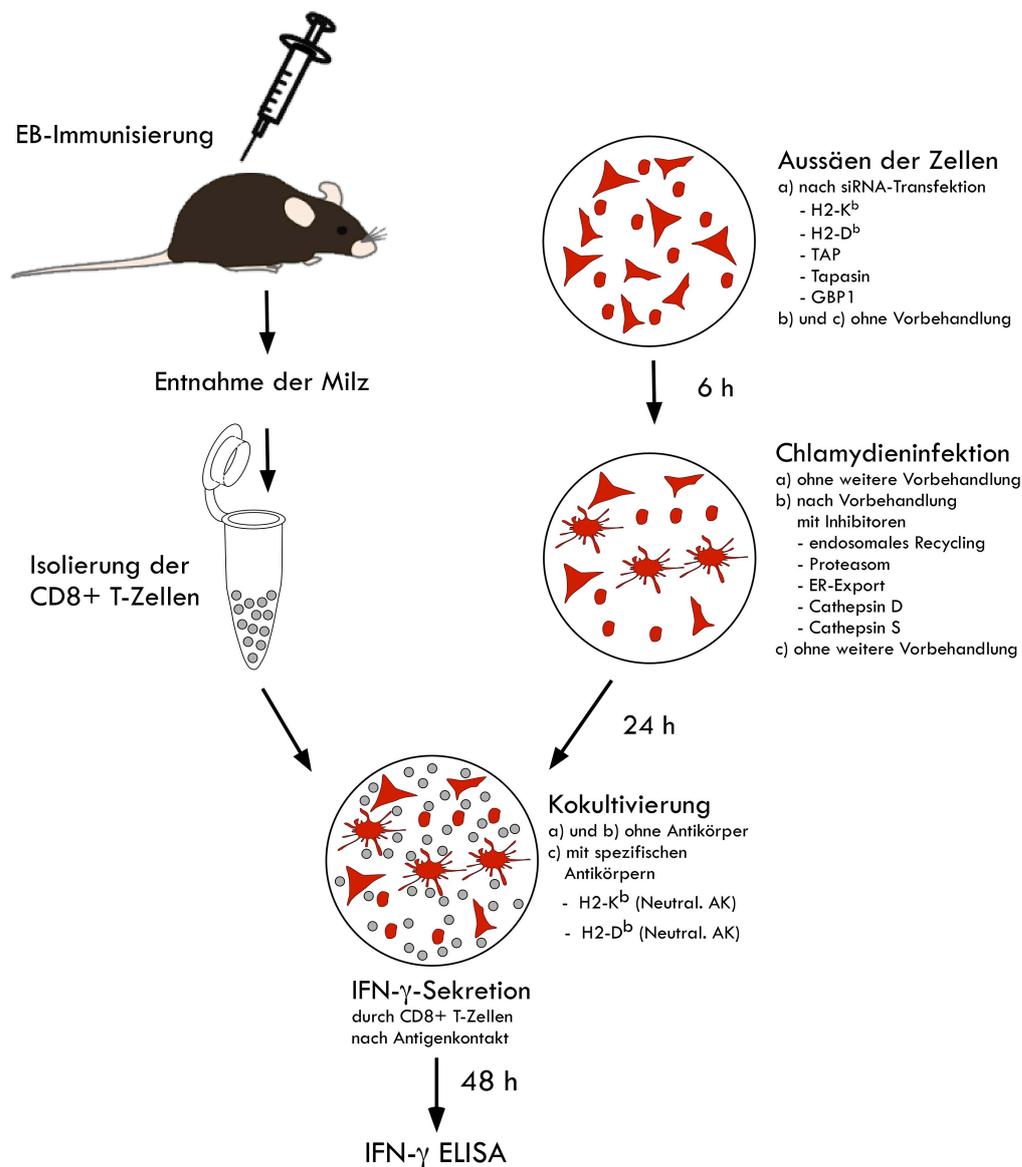


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Antigenpräsentations-Assays

### 3.9.1 siRNA-Transfektion

Die sogenannte RNA-Interferenz ist ein zelleigener Mechanismus, der es erlaubt Gene zielgerichtet auszuschalten. Die daran beteiligten siRNAs sind kleine, 21-26 Nukleotide umfassende RNA-Moleküle, die in der Lage sind, bestimmte Enzymkomplexe so zu aktivieren, dass zur Sequenz der siRNAs komplementäre mRNAs enzymatisch abgebaut werden und ein Gen somit posttranskriptionell herunterreguliert wird (Fire et al., 1998). Durch die Transfektion synthetischer siRNAs in Zellen kann der Mechanismus der RNA-Interferenz für wissenschaftliche Fragestellungen genutzt werden.

Um einen maximalen *knockdown*-Effekt zu erzielen, wurden für jedes relevante Gen gleichzeitig vier siRNAs eingesetzt (siehe 2.14). Die siRNAs der Firma Qiagen wurden nach Angaben des Herstellers gelöst, portioniert und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Transfektionen der JAWSII-Zellen wurden verschiedene Methoden getestet, wobei die höchste Transfektionsrate mit dem Nucleofector und dem entsprechenden „Mouse Dendritic Cell Nucleofector® Kit“ der Firma Lonza erzielt werden konnte. Die gewählte Methode der Nucleofektion basiert auf Elektroporation mit speziellen Reagenzien.

Zur Vorbereitung wurden zunächst alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht, das Zellkulturmedium warmgestellt ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und die siRNAs auf Eis aufgetaut. Pro Transfektionsansatz wurden  $150\text{ }\mu\text{l}$  „Nucleofector Solution“ mit jeweils  $3\text{ }\mu\text{l}$  ( $300\text{ nM}$ ) der vier spezifischen siRNAs für jedes Gen durch auf- und abpipettieren gemischt. In der Zwischenzeit wurden  $5 \times 10^5$  JAWSII-Zellen abzentrifugiert ( $300 \times g$ ,  $10\text{ min}$ , RT) und anschließend mit dem Nucleofector Solution-siRNA-Gemisch vorsichtig resuspendiert. Die Zell-Suspension wurde zügig in eine Küvette pipettiert und mit dem Programm „Y-001“ transfiziert. Direkt im Anschluss wurde frisches Medium zu den Zellen gegeben und mit einer speziellen, zellschonenden Einmalpipette auf mindestens  $10\text{ wells}$  (Reaktionsvertiefungen) einer 96-Loch Mikrotiterplatte verteilt. Um Lysate herzustellen wurden die Zellen pro Ansatz in einem *well* einer 6-Loch Mikrotiterplatte kultiviert. Vor dem experimentellen Einsatz wurde der siRNA-Effekt auf die Proteinexpression in den jeweiligen Zellen mittels Western Blot, Real-Time PCR oder Durchflusszytometrie überprüft. Für den Antigenpräsentations-Assay erfolgte die Infektion mit *Chlamydomphila psittaci* (DC15, MOI 5) 6 Stunden nach der siRNA-Transfektion der JAWSII-Zellen, indem das errechnete Volumen der Chlamydiensuspension mit  $2,5 \times 10^5$  IFUs zu den Zellen im 96-*well* pipettiert wurde.

### **3.9.2 Verwendung enzymatischer Inhibitoren und Antikörperneutralisation von Oberflächen-MHC I**

Bestimmte zu untersuchende enzymatische Faktoren (Cathepsin D und S, Proteasom) oder zelluläre Transportwege (ER-Export, endosomales Recycling) wurden nicht über den Einsatz von siRNA ausgeschaltet, sondern mittels spezifischer Inhibitoren blockiert. Diese experimentelle Vorgehensweise wurde insbesondere für die beiden Cathepsine gewählt, da sie in entsprechenden Vorversuchen der Arbeit aufgrund ihrer Stabilität und biologischen

Halbwertszeit von mindestens 16-18 Stunden (Capony et al., 1989; Nissler et al., 1999) nur eine geringe siRNA-vermittelte Reduktion ihrer Proteinmengen zeigten. 4 Stunden nach der Ausplattierung der Zellen wurden die entsprechenden Inhibitoren in geeigneter Konzentration zu den Zellen gegeben. Darüber hinaus wurden im Falle von H2-D<sup>b</sup> und H2-K<sup>b</sup> in Ergänzung zu den siRNA-Experimenten (siehe 3.9.1) Versuchsansätze durchgeführt, in denen durch Zugabe neutralisierender Antikörper die entsprechenden Oberflächen-MHC I-Moleküle maskiert wurden. Die Antikörper wurden den infizierten DCs zusammen mit den CD8+ T-Zellen ins Zellkulturmedium hinzugefügt.

Recycling-Inhibitor (Primaquin):	20 µM, 2 h vor Infektion
Cathepsin D-Inhibitor (Pepstatin A):	50 µM, 2 h vor Infektion
Cathepsin S-Inhibitor (Z-FA-FMK):	2 µM, 2 h vor Infektion
anti-H2-K <sup>b</sup> Antikörper (Klon AF6.88.5):	1 µg/ml Medium, zusammen mit T-Zellen
anti-H2-D <sup>b</sup> Antikörper (Klon KH95):	1 µg/ml Medium, zusammen mit T-Zellen
Proteasom-Inhibitor (Lactacystin):	50 µM, für 3 h vor Zugabe der T-Zellen
ER-Export-Inhibitor (H89):	50 µM, für 3 h vor Zugabe der T-Zellen

### 3.9.3 EB-Immunisierung von C57BL/6-Mäusen und Gewinnung der CD8+ T-Zellen aus der Milz

Um aktivierte CD8+ T-Zellen gegen chlamydiale Antigene zu erhalten, wurden 6-8 Wochen alte C57BL/6-Mäuse zunächst intraperitoneal mit einer Dosis von  $5 \times 10^7$  IFUs immunisiert, gefolgt von dem 1. *boost* (weitere Immunisierung zur Verstärkung/Auffrischung der Immunreaktion) nach 2 Wochen und einem 2. *boost* eine weitere Woche später. Nach nochmals einer Woche folgte die *challenge*-Infektion (Belastungsinfektion) mit *Chlamydomytila psittaci* intranasal. Hierfür wurden die Mäuse zunächst durch die intraperitoneale (i.p.) Verabreichung einer Ketamin-Rompun-Lösung narkotisiert (Volumen in µl = Gewicht in g mal 10) und anschließend mit einer Dosis von  $5 \times 10^5$  IFUs infiziert. Eine bzw. zwei Wochen nach der *challenge*-Infektion wurde den Mäusen die Milz entnommen, um CD8+ T-Zellen zu isolieren (Abb. 6). Während des Tierversuchs wurden die Mäuse jeden Tag gewogen und der gesundheitliche Zustand protokolliert.



Abbildung 6: Immunisierungsschema

Die Milzen wurden nach der Entnahme zunächst in sterile, mit PBS gefüllte 12 ml-Polystyrol-Röhrchen überführt und auf Eis gelagert. Zur Freisetzung der Zellen wurde das Organ an einer Stelle durchgeschnitten und mit leichtem Druck durch ein Zellsieb (70  $\mu\text{m}$ ) gedrückt. Die dadurch gewonnene Zellsuspension wurde anschließend abzentrifugiert (300  $\times$  g, 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ ) und einmal mit PBS gewaschen. Die Gewinnung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte mithilfe des „CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kits“ der Firma Miltenyi. Dabei wurden sämtliche Milzzellen, die nicht CD8-positiv (+) sind, durch Inkubation mit einem entsprechenden Antikörpercocktail von Biotin-gekoppelten Antikörpern gebunden und anschließend durch Inkubation mit anti-Biotin Antikörpern, die mit magnetischen Kügelchen verbunden sind, markiert. Die Separation der Zellen erfolgte im „autoMACS“ durch ein magnetisches Feld. Dabei wurden alle magnetisch markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einem separaten Röhrchen aufgefangen werden konnten. Anschließend wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen in speziellem Kokultivierungsmedium aufgenommen, gezählt und im Verhältnis 1:6 (DCs:CD8<sup>+</sup> T-Zellen), sprich  $3 \times 10^5$  pro 96-well, für den Versuch eingesetzt. Die Reinheit der gewonnenen Zellpopulation wurde durchflusszytometrisch mit FITC-markierten anti-CD8a Antikörpern bestimmt.

MACS-Puffer	BSA	5 g
	EDTA	0,75 g
	PBS	ad 1 Liter
	pH 7,2	

Der MACS-Puffer wurde sterilfiltriert, entgast und kaltgestellt.

Kokultivierungsmedium	IMDM, ohne Antibiotika
	5 % FCS
	5 ng/ml GM-CSF
	50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol

### 3.9.4 IFN- $\gamma$ ELISA

Nachdem zytotoxische T-Zellen ihr spezifisches Antigen erkannt haben, sezernieren sie das Zytokin IFN- $\gamma$  (Lampe et al., 1998). Um IFN- $\gamma$  quantitativ nachzuweisen, wurde der „Mouse IFN- $\gamma$  Platinum ELISA“ von eBioscience verwendet.

48 Stunden nach der Zugabe der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Überstände aus den 96-wells in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und der Gehalt an IFN- $\gamma$  mittels ELISA getestet. Der restliche Überstand konnte bei – 70 °C gelagert werden.

Die wells der eingesetzten ELISA Platten waren bereits mit IFN- $\gamma$ -spezifischen Antikörpern beschichtet und konnten direkt mit den Proben bzw. den IFN- $\gamma$ -Standardverdünnungen inkubiert werden. Zusätzlich zu den Proben erfolgte die erste Inkubation (2 h) zusammen mit einem Biotin-gekoppelten zweiten IFN- $\gamma$ -Antikörper, der ein anderes Epitop erkennt. Nachdem nicht gebundener biotinylierter Antikörper durch mehrmaliges Waschen entfernt wurde, wurde HRP-gekoppeltes Streptavidin, welches mit hoher Affinität Biotin bindet, zu den wells gegeben. Nach einstündiger Inkubation und anschließendem Waschen wurde das HRP-Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben, was unter Einwirkung der Peroxidase zu einem blauen Produkt führte, welches in seiner Intensität proportional zu dem gebundenen IFN- $\gamma$  ist. Diese Reaktion wurde mit Phosphorsäure (Stoppesolution) abgestoppt, woraufhin die Farbe von blau zu gelb umschlug. Anschließend wurde die Platte bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen und die Daten mit Excel ausgewertet.

### 3.10 Zytokin-Array

Um einen Eindruck davon zu gewinnen, welche Zytokine und Chemokine im Serum infizierter sowie zuvor immunisierter C57BL/6-Mäuse im Vergleich zu Kontrollen vorliegen, wurde ein Zytokin-Array verwendet. Der Array der Firma R&B Systems besteht aus einer Nitrozellulosemembran, auf der verschiedene Antikörper punktförmig aufgebracht sind, wodurch in nur einem Test 40 verschiedene Zytokine und Chemokine einer Serumprobe

quantitativ detektiert werden können. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Das Blut je einer nicht infizierten, einer infizierten, sowie einer zuvor immunisierten C57BL/6-Maus (jeweils 4 dpi, DC15,  $5 \times 10^5$  IFUs) wurde in Serumröhrchen gegeben und abzentrifugiert (10.000 x g, 3 min). 180 µl jeder Serumprobe wurden zusammen mit 820 µl Puffer 5, 500 µl Puffer 4 und 15 µl biotinyliertem Antikörpercocktail gemischt und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf jeweils einen Array gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde eine HRP-gekoppelte Streptavidin-Lösung zugegen und für 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss konnten die Zytokine und Chemokine mittels Chemielumineszenz detektiert werden (siehe 3.7.2). Zur Erstellung des Proteinprofils wurden die Filme eingescannt und densitometrisch quantifiziert.

### 3.11 Bio-Plex Zytokin-Assay

Mit dem „Bio-Plex Suspension Array System“ von Bio-Rad ist es möglich verschiedene Zytokine und Chemokine gleichzeitig innerhalb einer Vertiefung einer 96-well-Platte quantitativ zu bestimmen.

Hierfür wurden in einem ersten Schritt fluoreszenzmarkierte Polystyrolkugeln (*beads*) kovalent an Zytokin-spezifische Antikörper gebunden, so dass alle Antikörper, die gegen ein und dasselbe Zytokin gerichtet waren über einen unverwechselbaren Farbcode verfügten. Nach 30-minütiger Inkubation mit der Probe und anschließendem Waschvorgang über eine Vakuumfiltration wurden biotinylierte Detektionsantikörper zugegeben, die ihrerseits im folgenden Inkubationsschritt von Phycoerythrin-markiertem Streptavidin erkannt und gebunden wurden. Die Messung der Proben erfolgte im Protein Array-Reader, der im Prinzip dem Durchflusszytometer ähnelt. Dabei werden die Zytokine über das Fluoreszenzsignal der *beads* klassifiziert (635 nm) und über das gebundene Phycoerythrin quantifiziert (532 nm).

Gemessen wurde der Zytokinspiegel aus Zellkulturüberständen nicht infizierter und Chlamydien-infizierter (24 hpi, 48 hpi) JAWSII-Zellen. Der Assay wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Ulrich Wulle am FLI Tübingen nach Herstellerangaben durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

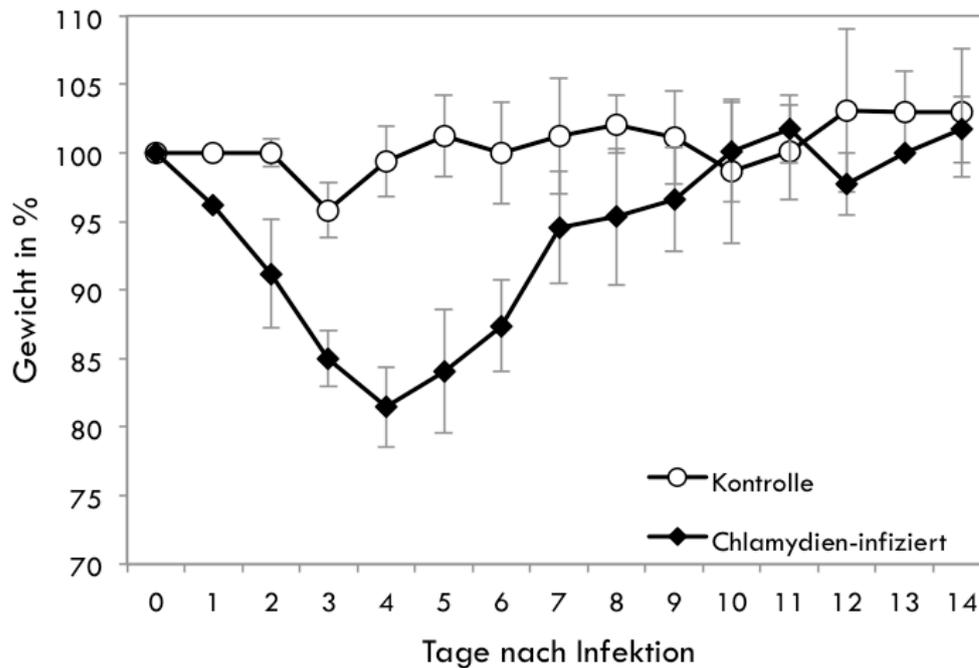
Wie bereits in der Einleitung beschrieben (siehe 1.2.4) sind zelluläre Abwehrmechanismen für die Eliminierung intrazellulärer Pathogene wie Chlamydien von entscheidender Bedeutung (Agrawal et al., 2008). Hierbei spielen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die durch MHC I-präsentierte chlamydiale Antigene aktiviert werden, eine zentrale Rolle (Wizel et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels biochemischer, zellbiologischer und immunologischer Methoden untersucht, wie Chlamydienantigene in infizierten dendritischen Zellen intrazellulär prozessiert werden und zur Präsentation auf MHC Klasse I-Moleküle gelangen. Dendritische Zellen sind vermutlich die ersten Immunzellen, die einer Chlamydieninfektion entgegentreten (Ojcius et al., 1998). Für die Untersuchungen wurde die dendritische Zelllinie JAWSII (ATCC # CRL-11904<sup>TM</sup>, siehe 2.18), die ursprünglich aus dem Knochenmark einer C57BL/6-Maus stammt, verwendet (MacKay and Moore, 1997). Infiziert wurde stets mit dem nicht aviären *Chlamydomphila psittaci*-Stamm DC15 (siehe 2.16), einem Isolat aus einem abortierten Rinderfötus (Goellner et al., 2006).

### 4.1 C57BL/6-Mäuse als Infektionsmodell für *C. psittaci*

Um zu untersuchen, welche *in vivo*-Relevanz *C. psittaci*-Infektionen im Mausmodell besitzen, wurden C57BL/6-Mäuse zunächst intranasal infiziert und hinsichtlich möglicher Gewichtsveränderungen, Entzündungserscheinungen der Lunge und des Zytokinspiegels im Serum untersucht.

#### 4.1.1 Infektionsverlauf *in vivo*

Zur Durchführung der Infektionsstudien wurden 10-12 Wochen alte C57BL/6-Mäuse mit unterschiedlichen Dosen ( $4 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  und  $5 \times 10^5$  IFUs) intranasal infiziert und anschließend für zwei Wochen täglich gewogen und beobachtet. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Mäuse, die über den gleichen Zeitraum ebenfalls täglich gewogen und beobachtet wurden.



**Abbildung 7: Gewichtsverlauf nach Chlamydieninfektion von C57BL/6-Mäusen**

10 bis 12 Wochen alte C57BL/6-Mäuse wurden mit *C. psittaci* (DC15) intranasal infiziert ( $5 \times 10^5$  IFUs) und täglich gewogen. An Tag 4 nach Infektion erreichte der Gewichtsverlust ein Maximum von etwa 20 % im Vergleich zum Ausgangsgewicht. Das Gewicht der Kontroll-Mäuse blieb über den gewählten Zeitraum nahezu konstant. Bei einem Gewichtsverlust nach der Infektion von mehr als 20 % des Ausgangsgewichts wurden die Mäuse aus tierschutzrechtlichen Gründen vorsorglich getötet.

Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, verläuft die Infektion von C57BL/6-Mäusen mit *C. psittaci* nicht letal, sondern führt nach einer verabreichten Infektionsdosis von  $5 \times 10^5$  IFUs zu einem deutlichen Gewichtsverlust von bis zu 20 % an Tag 4 nach der Infektion. Diese Phase der deutlichsten Krankheitssymptome ist außerdem geprägt von Fellsträuben, veränderter Körperhaltung, dem Beginn einer Tachypnoe (Schnellatmung) sowie verändertem Spontanverhalten (zu beobachtende Apathie). Spätestens an Tag 10 nach Infektion haben die Mäuse wieder ihr Ausgangsgewicht erreicht und erscheinen klinisch unauffällig. Die Infektionen mit den geringeren Dosen ( $< 5 \times 10^5$  IFUs) führten nicht zu vergleichbaren Beobachtungen und verliefen vorwiegend subklinisch.

Vor allem die Beeinträchtigungen bei der Atmung deuten darauf hin, dass es durch die intranasale Infektion mit Chlamydien zu einer Schädigung des Lungengewebes kommt. Um dies genauer beurteilen zu können, wurden Lungen nach Infektion histologisch untersucht.

#### 4.1.2 Histologische Untersuchungen der Lunge nach Infektion mit *C. psittaci*

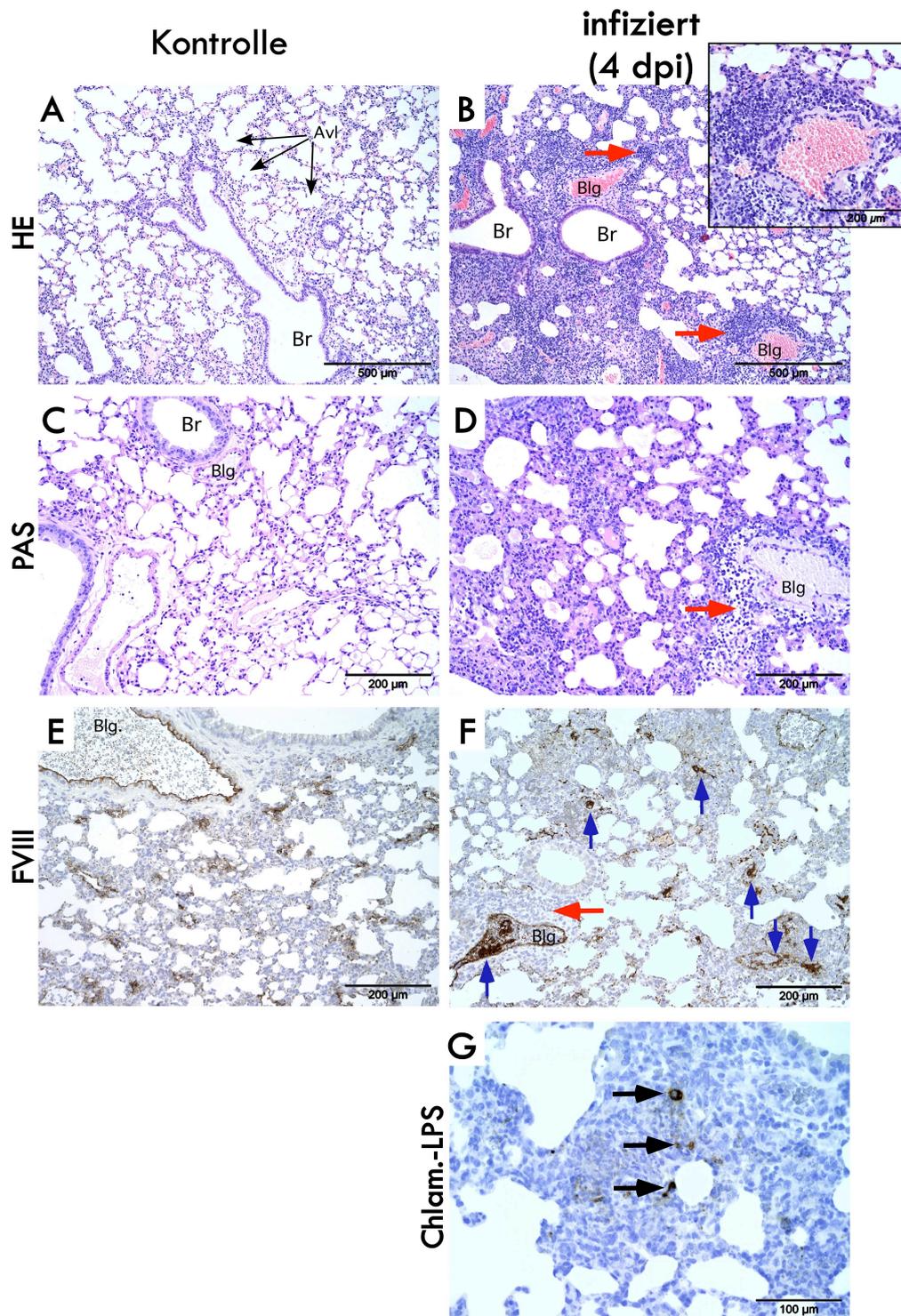
Zur Untersuchung der Lungen wurden 9 Wochen alte C57BL/6-Mäuse mit  $5 \times 10^5$  IFUs (DC15) intranasal infiziert. Nach 2, 4 und 11 Tagen wurde jeweils einer Maus die Lunge entnommen. Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden von den Lungen nach der Fixierung und der Einbettung in Paraffin Gewebeschnitte angefertigt.

Wie Abbildung 8 zeigt, kommt es 4 Tage nach der intranasalen Infektion mit Chlamydien zu einer massiven Transmigration von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten durch die Gefäßwände und folglich zu einer perivaskulären Infiltration dieser Zellen in die Lunge (Abb. 8, rote Pfeile). Die PAS-Reaktion zeigt außerdem eine entzündungsbedingt vermehrte Ansammlung von Flüssigkeit in den Interalveolarsepten (IAS) und gibt Hinweise auf vermehrte Exsudation von Serumproteinen in den IAS (Abb. 8D). Des Weiteren lässt die immunhistologische Anfärbung von Faktor VIII auf eine hochgradige Ansammlung von Thrombozyten im Entzündungsbereich schließen (Abb. 8F, blaue Pfeile). Die Infektion mit Chlamydien konnte ebenfalls immunhistologisch bestätigt werden (Abb. 8G, schwarze Pfeile).

Nach Beurteilung der übrigen Präparate (hier nicht gezeigt) ist darüber hinaus zu erwähnen, dass bereits 2 Tage nach der Infektion eine multifokale, akut eitrige Bronchopneumonie festzustellen ist. Die Alveolen sind schon zu diesem Zeitpunkt mit neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen gefüllt.

Die immunhistologischen Untersuchungen ergaben, dass 11 Tage nach der Infektion nur noch wenige Einschlüsse zu detektieren sind. Allerdings konnte hier eine hochgradige Infiltration vor allem von Lymphozyten sowie Alveolarmakrophagen und DCs gezeigt werden. Diese Infiltrationen ziehen entlang der Gefäße durch das gesamte Lungengewebe.

Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass es durch die intranasale Infektion mit *C. psittaci* in C57BL/6-Mäusen zunächst zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems kommt und nach spätestens 11 Tagen zu einer Chlamydien-spezifischen, adaptiven, lymphozytären Immunantwort.

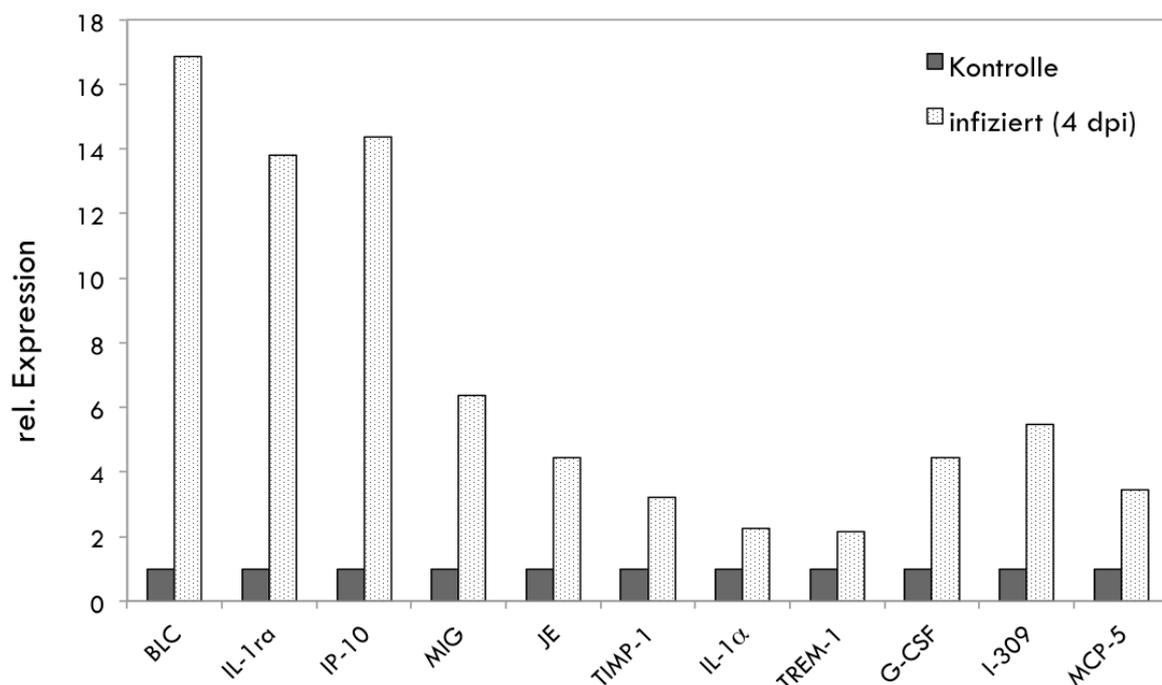


**Abbildung 8: Histologische Untersuchungen der Lunge 4 Tage nach der Infektion mit Chlamydien**

Die Lunge wurde 4 Tage nach Infektion mit *C. psittaci* ( $5 \times 10^5$  IFUs, intranasal) entnommen und präpariert. Die fertigen Schnitte wurden zur besseren Darstellung der Gewebestruktur HE gefärbt (A,B). Um Flüssigkeitsansammlungen zu markieren wurde eine PAS-Reaktion durchgeführt (C,D). Darüber hinaus wurden Faktor VIII (FVIII) (E,F) und Chlamydien-LPS (G) immunhistologisch angefärbt. A, C und E zeigen Lungen-Gewebeschnitte einer nicht infizierten Kontroll-Maus. B, D, F und G zeigen Lungen-Gewebeschnitte von einer Maus 4 dpi. Markiert sind perivaskuläre Infiltrate aus Lymphozyten, Alveolarmakrophagen und DCs (rote Pfeile), Ansammlungen von Thrombozyten im Entzündungsbereich (blaue Pfeile) sowie Chlamydieneinschlüsse (schwarze Pfeile). Verwendete Abkürzungen: Bronchiolus (Br), Blutgefäß (Blg), Alveolarlumina (Avl).

### 4.1.3 Zytokinlevel im Serum nach der Infektion mit *C. psittaci*

Um einen weiteren Einblick in die anti-chlamydiale Immunreaktion zu erhalten, wurde neben den bisherigen Experimenten der Zytokinspiegel verschiedener Zytokine im Serum infizierter C57BL/6-Mäuse mittels Zytokin-Array ermittelt. Hierfür wurde das Serum aus dem Blut der Mäuse am Tag der maximalen Gewichtsabnahme (4 dpi) gewonnen und nach Herstellerangaben mit dem Array inkubiert. Als Kontrolle diente das Serum einer nicht infizierten Maus.



**Abbildung 9: Expressionslevel verschiedener Zytokine und Chemokine im Serum nach Infektion**

4 Tage nach Infektion mit *C. psittaci* wurde aus dem Blut der Mäuse Serum gewonnen und mittels Zytokin-Array der Firma R&D Systems auf verschiedene Zytokine und Chemokine im Vergleich zum Serum einer nicht infizierten Kontroll-Maus getestet.

In Abbildung 9 sind alle Zytokine und Chemokine gezeigt, die im Serum infizierter Mäuse im Vergleich zur Kontrolle eine veränderte Expression aufwiesen. Die Untersuchungen ergaben, dass es 4 Tage nach der Infektion mit *C. psittaci* zu einer Induktion verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine kommt. Darunter sind einige  $T_{H1}$ -Zytokine wie IP-10, MIG, TIMP-1, IL-1 $\alpha$ , TREM-1 und MCP-5 und einige  $T_{H2}$ -Zytokine wie BLC, IL-1ra, G-CSF und I-309. JE (MCP-1) ist ein Chemokin, das sowohl für eine  $T_{H1}$ - als auch für eine  $T_{H2}$ -Immunantwort wichtig ist.

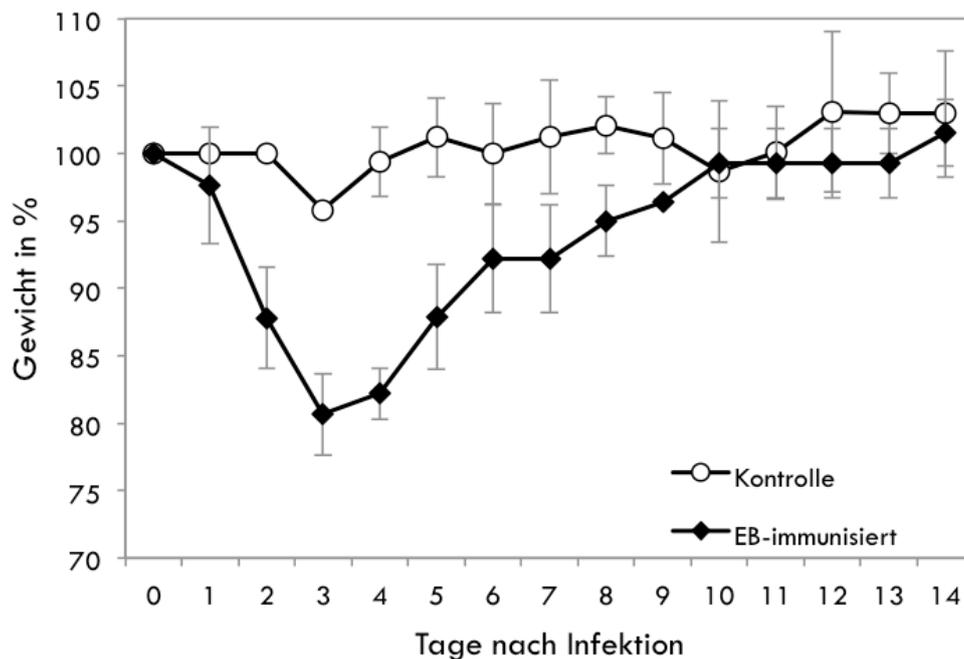
Das vorliegende Zytokinprofil bestätigt die Beobachtungen der histologischen Untersuchungen (Abb. 8). So konnte eine Induktion für eine Reihe verschiedener

Chemokine festgestellt werden, die chemotaktisch auf die in die Lunge einwandernden Zellen wie Neutrophile, Alveolarmakrophagen, DCs und Lymphozyten wirken (Tab. 2).

Abschließend ist festzuhalten, dass aufgrund der gezeigten Ergebnisse C<sub>57</sub>BL/6-Mäuse als Infektionsmodell für *C. psittaci*-Infektionsstudien geeignet sind. In den ersten Tagen erfolgt eine Aktivierung der angeborenen Immunität in Form der Einwanderung von Neutrophilen und Makrophagen in die Lunge. Ab Tag 4 wandern auch verstärkt Lymphozyten in das Lungengewebe ein, was darauf hindeutet, dass eine adaptive Immunität gegen Chlamydien eingeleitet wird.

#### **4.1.4 Infektionsverlauf nach EB-Immunisierung**

Wie die Arbeiten der Gruppe von Brunham zeigen, kommt es nach der EB-Immunisierung von C<sub>57</sub>BL/6-Mäusen mit *C. muridarum* schon während der frühen Phase der Infektion zu einer Chlamydien-spezifischen CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T-Zell-Immunität (Jiang et al., 2008), die sowohl in *in vivo*- als auch in *ex vivo*-Experimenten nachgewiesen werden konnte. Um zu überprüfen, welchen Einfluss eine vorherige EB-Immunisierung auf die frühphasige Immunabwehr gegen eine *C. psittaci*-Infektion hat, wurden C<sub>57</sub>BL/6-Mäuse i.p. immunisiert (siehe 3.9.3) und nach dem *challenge* für zwei Wochen täglich gewogen und beobachtet. Außerdem wurde das Zytokinprofil des Serums bestimmt.



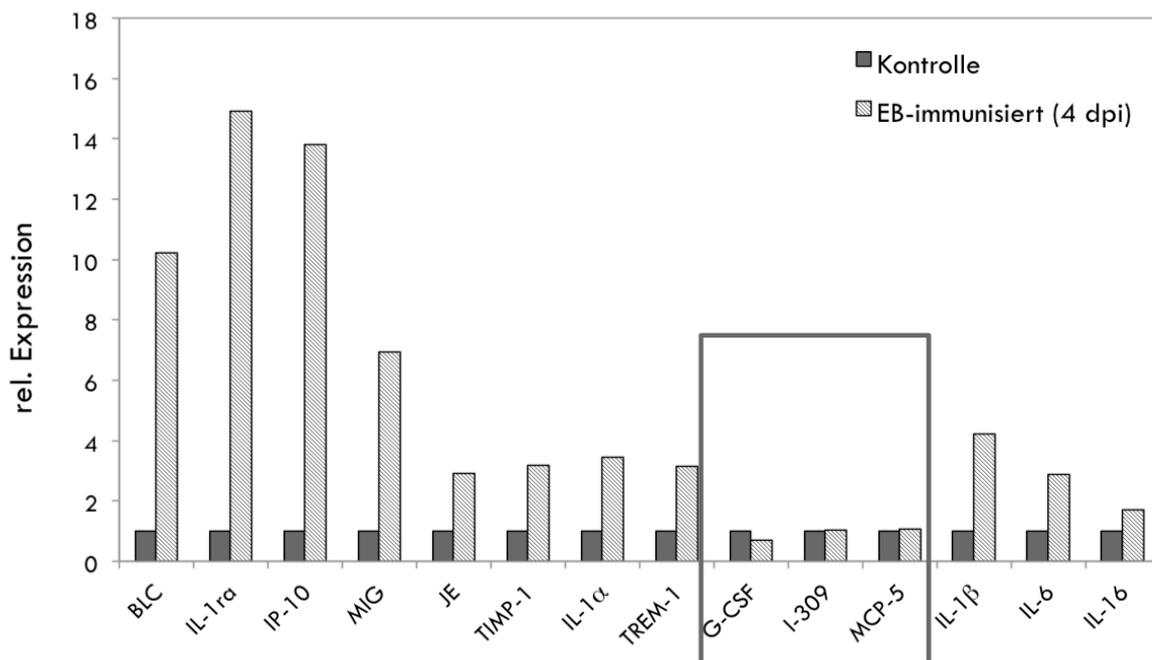
**Abbildung 10: Gewichtsverlauf nach EB-Immunsierung von C57BL/6-Mäusen**

6-8 Wochen alte C57BL/6-Mäuse wurden mit einer Dosis von jeweils  $5 \times 10^7$  IFUs insgesamt dreimal i.p. immunisiert und eine Woche nach dem letzten *boost* mit einer Dosis von  $5 \times 10^5$  IFUs intranasal infiziert. Die Immunisierung führt nicht zu einem milderen Krankheitsverlauf, vielmehr kommt es zu einer raschen Gewichtsabnahme mit einem Maximum an Tag 3 nach Infektion (20 %). Anschließend nehmen die Mäuse wieder stetig zu bis spätestens an Tag 14 das Ausgangsgewicht wieder erreicht wird. Bei einem Gewichtsverlust nach der Infektion von mehr als 20 % des Ausgangsgewichts wurden die Mäuse aus tierschutzrechtlichen Gründen vorsorglich getötet.

Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, ändert die EB-Immunsierung nichts daran, dass die Mäuse an den ersten Tagen nach dem *challenge* stark an Gewicht verlieren. Spätestens 14 Tage nach der Infektion haben die Mäuse wieder ihr Normalgewicht erreicht.

#### 4.1.5 Zytokinlevel im Serum nach EB-Immunsierung

Zusätzlich zum Gewichtsverlauf wurde das Zytokinprofil des Serums nach der EB-Immunsierung ermittelt.



**Abbildung 11: Expressionslevel verschiedener Zytokine und Chemokine im Serum nach EB-Immunisierung**

Der Zytokinspiegel des Serums einer zuvor EB-immunisierten C57BL/6-Maus wurde 4 Tage nach dem *challenge* mittels Zytokin-Array ermittelt und mit der Kontrolle (Serum einer nicht infizierten Maus) verglichen. Grau umrandet sind die Zytokine, die im Gegensatz zum Zytokinprofil nach Infektion ohne Immunisierung (Abb. 9) keinen Unterschied zur Kontrolle aufwiesen. Die letzten drei Interleukine (IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-16) wurden nur nach EB-Immunisierung induziert (vgl. Abb. 9).

Im Vergleich zu einer Intranasal-Infektion ohne Immunisierung sind mit vorheriger EB-Immunisierung die Zytokine G-CSF, I-309 und MCP-5 auf dem Niveau des Kontrollserums (Abb. 9, Abb. 11, grauer Rahmen). Zudem ist im Serum der EB-immunisierten Mäuse eine vermehrte Expression der Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-16 nachweisbar.

Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass offensichtlich nach vorheriger EB-Immunisierung verschiedene T<sub>H2</sub>-relevante Zytokine (G-CSF, I-309) nicht induziert werden, während mit IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-16 wichtige T<sub>H1</sub>-Zytokine vermehrt im Serum nachweisbar sind. Somit kommt es durch die EB-Immunisierung zu einer Modifikation des Immunstatus Chlamydien-infizierter Mäuse hin zu einer Aktivierung der zellulären Immunitätsprozesse.

Tabelle 2 gibt Aufschluss über die spezifischen Funktionen aller induzierten Zytokine sowie deren Bedeutung für die pro- und antiinflammatorische Immunantwort.

**Tabelle 2: Zytokine und Chemokine des Zytokin-Arrays**

(<http://www.copewithcytokines.de>)

Grün: Diese Zytokine werden durch Infektion sowie nach vorheriger EB-Immunsierung induziert.

Blau: Erhöhter Zytokinspiegel nach Infektion; nach vorheriger EB-Immunsierung liegt der Zytokinspiegel wieder auf Kontrollniveau.

Lila: Diese Zytokine sind nur nach vorheriger EB-Immunsierung im Vergleich zur Kontrolle vermehrt exprimiert.

Zytokin/Chemokin	produzierende Zellen	Hauptwirkung	TH1	TH2	Pro-inflammatorisch	Anti-inflammatorisch
<b>BLC</b>	follikuläre DCs in lymphatischen Organen	stimuliert Migration der B-Zellen zu B-Zell-Follikel		x		x
<b>IL-1ra</b>	Monozyten Makrophagen DCs u.a.	Rezeptorantagonist von IL-1; spezifischer Inhibitor von IL-1 $\alpha$ und IL-1 $\beta$		x		x
<b>IP-10</b>	Monozyten Fibroblasten Endothelzellen	IFN- $\gamma$ induziertes Protein 10 kDa (IP-10), bewirkt T-Zell-Adhäsion an Endothelzellen, rekrutiert aktivierte T-Lymphozyten, Monozyten, DCs, NK-Zellen	x		x	
<b>MIG</b>	Makrophagen Neutrophile	induziert durch IFN- $\gamma$ , Chemoattractant für T-Lymphozyten und NK-Zellen	x		x	
<b>JE (MCP-1)</b>	Monozyten Endothelzellen Epithelzellen	stimuliert Monozyten, T-Lymphozyten und DCs	x	x	x	x
<b>TIMP-1</b>	verschiedene somatische Zellen	Inhibitor von Matrix Metalloproteinasen, inhibiert Degradation extrazellulärer Matrix, Wachstumsfaktor für verschiedene Zellen	x		x	
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Monozyten Makrophagen Epithelzellen u.a.	zentrale Rolle bei Immunantwort, Aktivierung von T-Lymphozyten, induziert Fieber	x		x	
<b>TREM-1</b>	Monozyten Makrophagen Neutrophile NK-Zellen DCs	aktivierender Rezeptor, reguliert Aktivität verschiedener Immunzellen (Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen, DCs)	x		x	
<b>G-CSF</b>	Monozyten Makrophagen Neutrophile Fibroblasten	stimuliert Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen von Granulozyten		x		x
<b>I-309</b>	T-Lymphozyten	Chemoattractant für Monozyten		x	x	
<b>MCP-5</b>	aktivierte Makrophagen	stimuliert periphere Blutmonozyten	x		x	
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Monozyten Makrophagen Epithelzellen u.a.	hochwirksam, reguliert IL-6 Freisetzung, bewirkt Anstieg neutrophiler Granulozyten, induziert Fieber	x		x	
<b>IL-6</b>	T- und B-Lymphozyten Makrophagen DCs u.a.	Wachstum und Differenzierung von T- und B-Lymphozyten, induziert Akutphase-Reaktion, Inhibition der TNF und IL-1 Produktion durch Makrophagen	x	x	x	x
<b>IL-16</b>	überwiegend CD8+ T-Lymphozyten u.v.a.	Chemoattractant für CD4+ T-Lymphozyten, Monozyten und Eosinophile	x		x	

## 4.2 Zelluläre Mechanismen der Prozessierung chlamydialer Antigene in DCs

### 4.2.1 Chlamydienantigene werden in DCs auf MHC I präsentiert

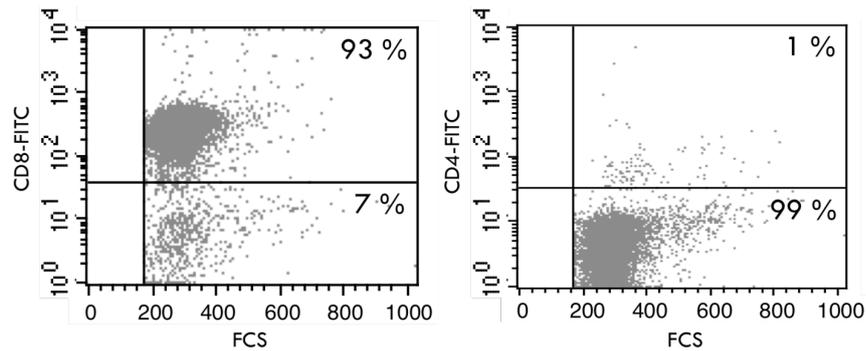
Die vorangegangenen Infektionsexperimente zeigen, dass C<sub>57</sub>BL/6-Mäuse ein geeignetes Tiermodell für Infektionen mit *C. psittaci* darstellen und dass vermutlich T<sub>H</sub>1-vermittelte Immunreaktionen zur Bekämpfung von Chlamydieninfektionen in C<sub>57</sub>BL/6-Mäusen beitragen. In verschiedenen Veröffentlichungen wird den spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen dabei eine entscheidende Rolle zugeordnet (Igiertseme et al., 1994; Magee et al., 1995; Wize et al., 2008; Wize et al., 2002). Für die T-Zell-Aktivierung spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen müssen nach Infektion zunächst professionelle APCs wie dendritische Zellen Peptid-Antigene prozessieren und diese zur Präsentation auf MHC Klasse I-Moleküle laden.

Mithilfe des Antigenpräsentations-Assays kann die MHC I-vermittelte Präsentation chlamydialer Antigene durch DCs gemessen werden. Dabei wird im ELISA die IFN- $\gamma$ -Sekretion Chlamydien-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt, die zuvor mit Chlamydien-infizierten DCs kokultiviert wurden.

#### 4.2.1.1 Reinheit der CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Für diesen Versuch wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von C<sub>57</sub>BL/6-Mäusen mithilfe des „CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kits“ der Firma Miltenyi isoliert. Die daraufhin magnetisch markierten CD8-negativen Zellen aus der Milz wurden im magnetischen Feld des „autoMACS“ von den CD8-positiven (+) T-Zellen separiert.

Um sicherzustellen, dass ausschließlich CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Kokultivierung zum Einsatz kommen, wurde zunächst mittels Durchflusszytometrie die Reinheit der isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz überprüft. Hierfür wurden die Zellen mit FITC-markierten anti-CD8 Antikörpern inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Der Anteil an fluoreszenzmarkierten Zellen spiegelt den Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Population Milz-isolierter T-Zellen wider. Um auszuschließen, dass mögliche CD4<sup>+</sup> T-Zellen und eine Antigenpräsentation auf MHC II für den Nachweis einer IFN- $\gamma$ -Sekretion mitverantwortlich sind, wurde die isolierte Zellpopulation vor dem experimentellen Einsatz auch auf den Oberflächenmarker CD4 hin durchflusszytometrisch untersucht.



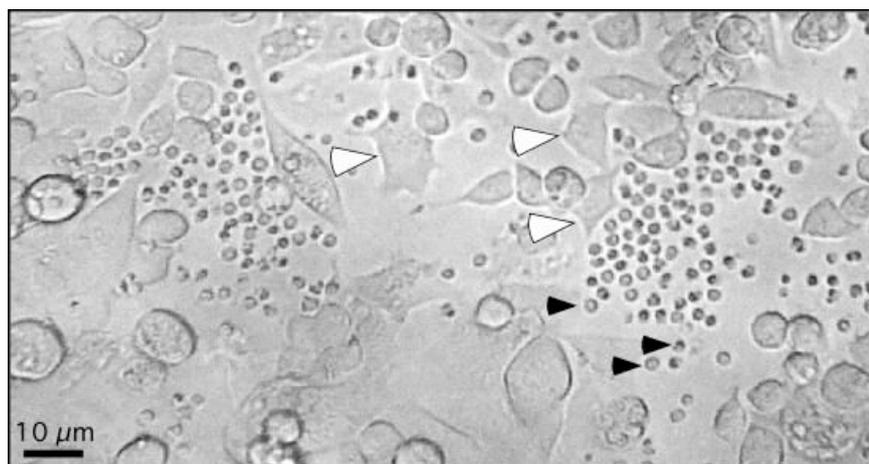
**Abbildung 12: Reinheit der CD8+ T-Zellen aus der Milz**

Aus der Milz einer C57BL/6-Maus wurden die CD8+ T-Zellen isoliert. Die isolierten Zellen wurden mit FITC-markierten anti-CD8 und zur Kontrolle mit anti-CD4 Antikörpern inkubiert und mittels Durchflusszytometrie auf ihre Reinheit hin untersucht.

Abbildung 12 zeigt das Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchung der isolierten CD8+ T-Zellen. Bei allen Untersuchungen zur Reinheit der isolierten CD8+ T-Zellpopulationen lag der Anteil der CD8+ T-Zellen stets bei über 90 %, während die Population von CD4+ Zellen lediglich 1 % ausmachte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass in den Antigenpräsentations-Assay nahezu ausschließlich CD8+ T-Zellen aus der Milz eingesetzt wurden, und nur diese zur IFN- $\gamma$ -Sekretion beigetragen haben.

#### 4.2.1.2 Antigenpräsentations-Assay

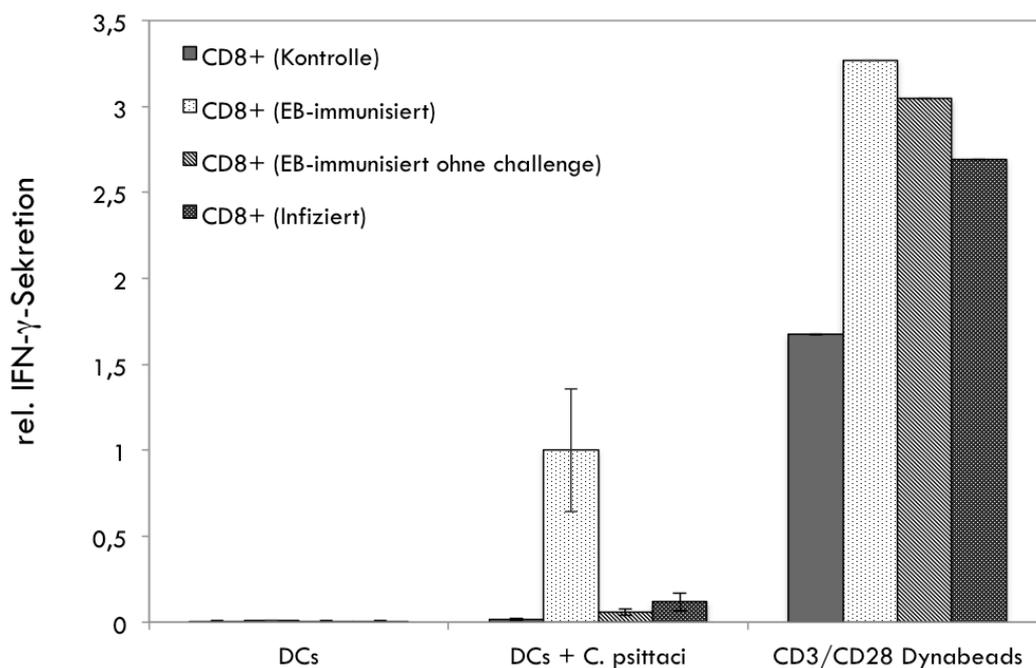
Für den Antigenpräsentations-Assay wurden JAWSII 24 Stunden nach der *C. psittaci*-Infektion (DC15, MOI 5) mit CD8+ T-Zellen aus der Milz von C57BL/6-Mäusen kokultiviert (Abb. 13).



**Abbildung 13: Lichtmikroskopische Aufnahme des Antigenpräsentations-Assays**

Dendritische Zellen wurden mit *C. psittaci* infiziert (MOI 5) und nach 24 h mit CD8+ T-Zellen aus der Milz einer C57BL/6-Maus für weitere 48 h kokultiviert. Weiße Pfeile markieren die DCs, die schwarzen Pfeile zeigen auf die wesentlich kleineren T-Lymphozyten.

48 Stunden nach der Zugabe der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und mittels ELISA auf den Gehalt an IFN- $\gamma$  getestet. Um zu untersuchen, wann der Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit spezifischen Rezeptoren (TCR) für Chlamydienantigene aus der Milz von C57BL/6-Mäusen möglichst hoch ist, wurden im Antigenpräsentations-Assay CD8<sup>+</sup> T-Zellen vier unterschiedlich behandelte Mäuse verglichen. Darunter die CD8<sup>+</sup> T-Zellen einer unbehandelten Kontroll-Maus, einer EB-immunisierten Maus, einer EB-immunisierten Maus ohne *challenge*-Infektion sowie einer Maus, die einmal intranasal mit aufgereinigten Chlamydien-EBs infiziert wurde. Die Milzen wurden den Mäusen jeweils eine Woche nach der letzten Behandlung (*challenge*-Infektion oder 2. *boost*-Immunsierung) entnommen. Als Negativkontrolle diente die Kultivierung der T-Zellen mit nicht infizierten DCs. Um zu zeigen, dass die CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen prinzipiell zur IFN- $\gamma$ -Sekretion stimuliert werden können, wurde als Positivkontrolle ein Ansatz mit CD3/CD28 „Dynabeads“ gewählt.



**Abbildung 14: IFN- $\gamma$ -Sekretion verschiedener CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen nach Kokultivierung mit DCs**

Verschiedene CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für 48 Stunden mit nicht infizierten sowie zuvor *C. psittaci*-infizierten dendritischen Zellen (24 hpi; MOI 5) kokultiviert. Anschließend wurde mittels ELISA die relative IFN- $\gamma$ -Sekretion und somit die Stimulierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte DCs mit den T-Zellen kokultiviert. Als Positivkontrolle wurden die T-Zellen zusammen mit CD3/CD28 „Dynabeads“ kultiviert. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen stammten von einer unbehandelten Kontroll-Maus, einer EB-immunisierten Maus (mit *challenge*), einer EB-immunisierten Maus ohne *challenge* und einer einmal intranasal infizierten Maus. Die IFN- $\gamma$ -Konzentration des Überstandes aus der Kokultivierung zwischen Chlamydien-infizierten DCs und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus EB-immunisierten Mäusen wurde gleich 1 gesetzt.

Das Ergebnis des IFN- $\gamma$  ELISA in Abbildung 14 macht deutlich, dass die isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den unterschiedlich behandelten Mäusen alle durch CD3/CD28 „Dynabeads“ zur IFN- $\gamma$ -Sekretion angeregt werden konnten. Demnach verlief die Isolierung intakter CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgreich.

Bei dem Kokultivierungsansatz infizierter JAWSII mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der EB-immunisierten C57BL/6-Maus ist im Gegensatz zu den Ansätzen mit isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen anders behandelte Mäuse eine hohe IFN- $\gamma$ -Konzentration im Kulturüberstand messbar. Das bedeutet zum einen, dass Chlamydien-infizierte DCs offenbar in der Lage sind, CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus einer EB-immunisierten Maus zur IFN- $\gamma$ -Sekretion anzuregen. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass DCs chlamydiale Antigene intrazellulär prozessieren und diese MHC I-abhängig auf der Zelloberfläche gegenüber Chlamydien-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren.

Zum anderen kann aus der Milz EB-immunisierter Mäuse ein höherer Anteil Chlamydien-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert werden. Hieraus lässt sich folgern, dass die EB-Immunsierung mit der anschließenden intranasalen *challenge*-Infektion in den C57BL/6-Mäusen innerhalb des gewählten Immunisierungs- und Infektionszeitraumes eine effiziente Generierung Chlamydien-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bewirkt. Daher wurden für die weiterführenden Experimente (siehe 4.2.7.2) entsprechend generierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen eingesetzt.

Nachdem durch Kokultivierungs-Assays gezeigt werden konnte, dass es in infizierten DCs zu einer funktionalen MHC I-vermittelten Präsentation chlamydialer Antigene kommt, wurden Untersuchungen zu den entsprechenden zellulären Mechanismen der Antigenprozessierung sowie dem Ort der intrazellulären MHC I-Beladung durchgeführt. Hierfür wurde zunächst in nachfolgenden Experimenten der Prozess der DC-Reifung nach Chlamydieninfektion im Detail analysiert.

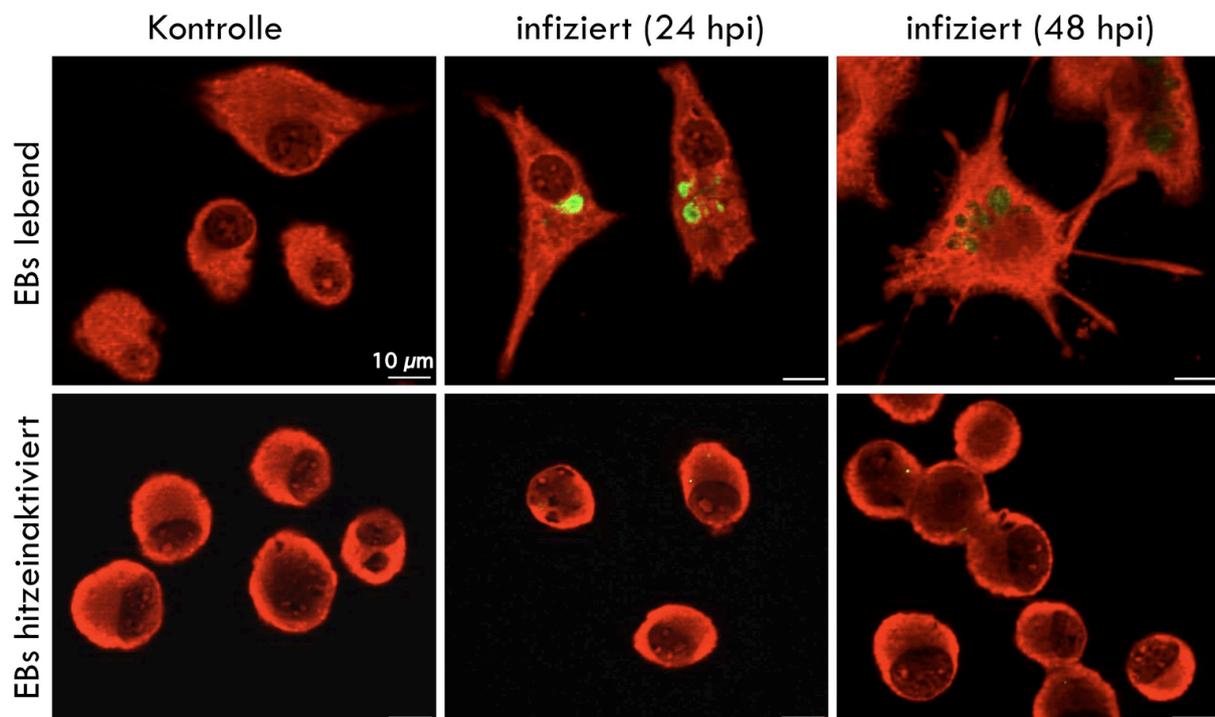
### **4.2.2 Morphologische und funktionale Reifung der DCs durch Chlamydieninfektion**

Dendritischen Zellen kommt bei der Initiation der adaptiven Immunreaktion eine Schlüsselfunktion zu. Unreife DCs nehmen Fremdartigene im Körper auf, differenzieren zu reifen DCs aus und wandern zu lymphatischen Organen, um anderen Immunzellen Antigene

des Eindringlings zu präsentieren (Lipscomb and Masten, 2002). Im Zuge der Differenzierung kommt es zu morphologischen und funktionalen Veränderungen der DCs, die im Folgenden für die Infektion mit Chlamydien untersucht werden.

#### 4.2.2.1 Morphologische Differenzierung

Die morphologischen Veränderungen in DCs nach der Infektion mit Chlamydien wurden mittels Immunfluoreszenz untersucht. JAWSII-Zellen wurden hierfür auf Deckglasröhrchen ausgesät und für 24 und 48 Stunden mit lebenden sowie hitzeinaktivierten *C. psittaci*-EBs infiziert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mittels „IMAGEN™ Chlamydia Test“ fluoreszenzmarkiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.



**Abbildung 15: Morphologische Differenzierung der DCs nach Infektion mit Chlamydien**

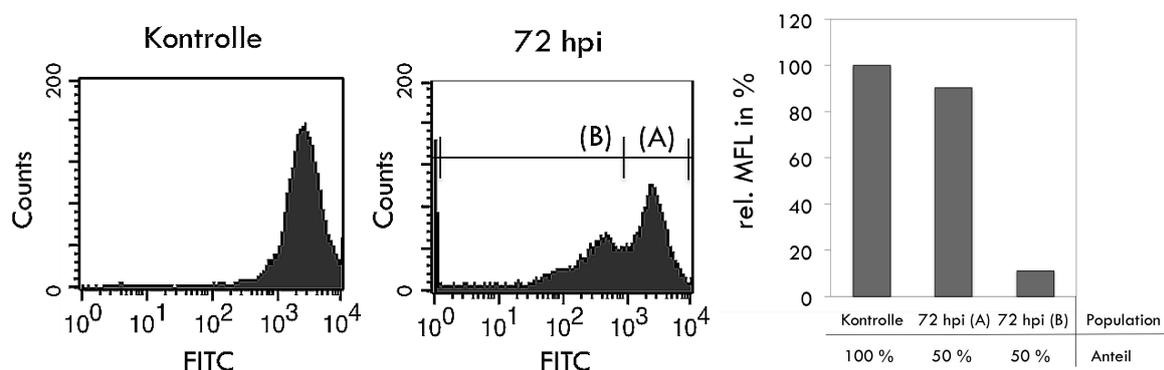
JAWSII-Zellen wurden für 24 und 48 h zum einen mit lebenden und zum anderen mit hitzeinaktivierten EBs (*elementary bodies*, infektiöse Form der Chlamydien, hier *C. psittaci*) infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (IMAGEN™ Chlamydia Test) inkubiert und die fertigen Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Zellkörper erscheinen rot, Chlamydieneinschlüsse grün.

Nach Infektion mit Chlamydien kommt es in den JAWSII-Zellen zu einer eindrucksvollen morphologischen Differenzierung (Abb. 15). Viele Dendriten bilden sich aus, was zu einer starken Vergrößerung der Zelloberfläche führt und somit die Kapazitäten der Antigenpräsentation erweitert. Nach Infektion mit hitzeinaktivierten EBs ist eine

entsprechende morphologische Veränderung nicht zu beobachten, was dafür spricht, dass für diesen induzierten Veränderungsprozess intakte EBs essentiell sind.

#### 4.2.2.2 Reduktion der Phagozytoseaktivität

Unreife dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit, Partikel zu phagozytieren. Diese Fähigkeit verlieren sie jedoch im Zuge des Differenzierungsprozesses wieder (Inaba et al., 1993). Um den Differenzierungsgrad bzw. das phagozytotische Potential in JAWSII nach der Infektion mit Chlamydien zu bestimmen, wurden die Zellen nach Infektion (72 hpi, MOI 3) für einen Zeitraum von 6 Stunden mit FITC-gekoppeltem Dextran 40.000 Da inkubiert (2mg/ml). Dextrane sind hochmolekulare Glucopolysaccharide, die von DCs über Phagozytose aufgenommen werden (Sallusto et al., 1995). Durch die Kopplung an einen Fluoreszenzfarbstoff ist die intrazelluläre Aufnahme des Dextrans durchflusszytometrisch zu detektieren. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität spiegelt den Rückgang des phagozytotischen Potentials der DCs und somit den Differenzierungsgrad wider.



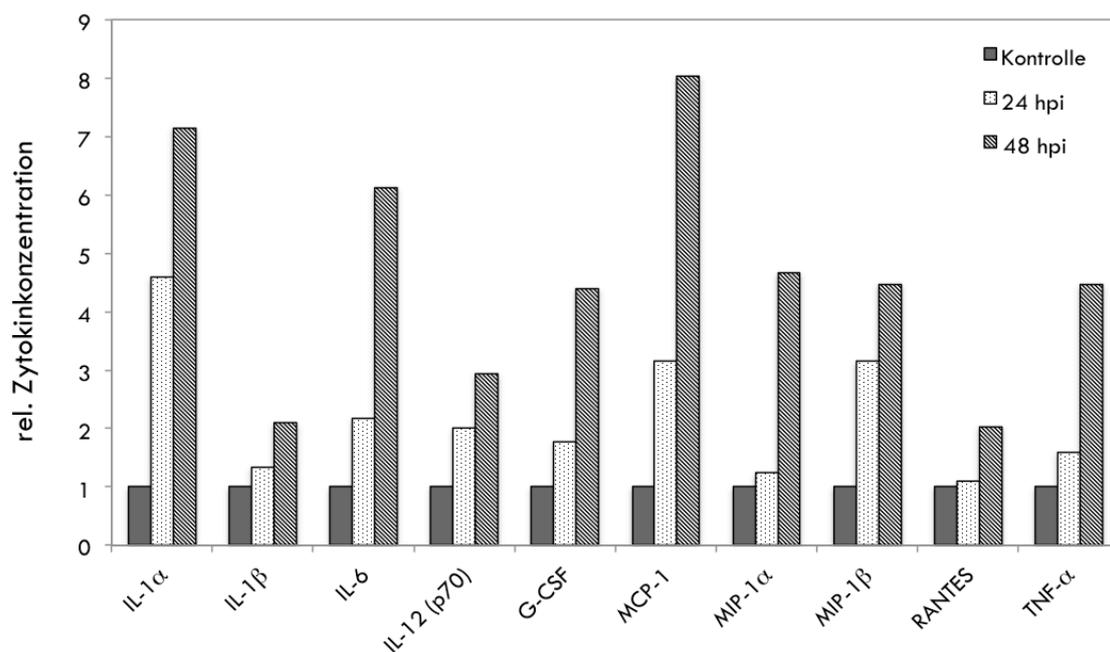
**Abbildung 16: Reduktion der Phagozytoseaktivität von DCs nach Chlamydieninfektion**

Nicht infizierte und infizierte (72 hpi) Zellen wurden für 6h mit FITC-Dextran 40.000 Da inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie gemessen. Rechts sind die relativen Mean-Fluoreszenz-Werte aus dem Experiment links graphisch dargestellt.

In Abbildung 16 ist deutlich zu erkennen, dass sich die Probe mit 72-stündiger Infektion in zwei Zellpopulationen teilt. Etwa 50 % der Zellen weisen eine mit der Kontrolle vergleichbare Fluoreszenzintensität auf, während die andere Hälfte der Zellen eine Reduktion der Fluoreszenzintensität von 89 % zeigt. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass es in JAWSII-Zellen durch die Infektion mit Chlamydien zu einer reifungsabhängigen Reduktion der Phagozytoseaktivität kommt.

#### 4.2.2.3 Sekretion proinflammatorischer Zytokine

Zytokine und Chemokine ermöglichen die Kommunikation zwischen den verschiedenen Immunzellen. Nach der Infektion von DCs werden eine Reihe wichtiger Zytokine sezerniert, die entscheidende Prozesse für die nachfolgende Immunreaktion einleiten. Diese funktionale Reifung der DCs nach einer Chlamydieninfektion in Zellkultur wurde anhand der Konzentration verschiedener Zytokine aus entsprechenden Zellkulturüberständen mittels Bio-Plex Zytokin-Assay untersucht. Für den Assay wurden die Überstände 24 und 48 Stunden *C. psittaci*-infizierter JAWSII eingesetzt.



**Abbildung 17: Von DCs sezernierte Zytokine nach Chlamydieninfektion in der Zellkultur**

Die Zellkulturüberstände von nicht infizierten und *C. psittaci*-infizierten JAWSII-Zellen wurden mittels „Bio-Plex Zytokin-Assay“ auf die Konzentration verschiedener Zytokine hin untersucht. Die gemessene Zytokinkonzentration aus der Probe der nicht infizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt, die Werte der übrigen Proben wurden im Verhältnis zur Kontrolle berechnet.

Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, werden von JAWSII-Zellen nach der Chlamydieninfektion eine Vielzahl von wichtigen  $T_H1$ -Zytokinen sezerniert. Tabelle 3 gibt Aufschluss über die Hauptaufgaben der in Abbildung 17 dargestellten Zytokine, und deren Relevanz für eine  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Immunantwort. So konnten neben IL-12, das als entscheidender proinflammatorischer Induktor einer  $T_H1$ -Antwort während der Antigenpräsentation fungiert, die DC-reifungsabhängige Sekretion der LPS-stimulierten Zyto- und Chemokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  sowie G-CSF, MCP-1 und RANTES nachgewiesen werden.

Besonders zu erwähnen ist die Sekretion von TNF- $\alpha$ , da DCs nicht nur in der Lage sind, TNF- $\alpha$  zu sezernieren, sondern durch TNF- $\alpha$  auch innerhalb der DCs autokrin zelluläre Signalwege stimuliert werden, die für die Funktion antigenpräsentierender Zellen sowie für die Einleitung einer effizienten zellulären Immunantwort von entscheidender Bedeutung sind (Blanco et al., 2008).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse des „Bio-Plex Zytokin-Assays“ in Übereinstimmung mit den Resultaten des Kokultivierungs-Assays (Abb. 14) zeigen, dass die Chlamydieninfektion von JAWSII-Zellen eine funktionale DC-Reifung bewirkt.

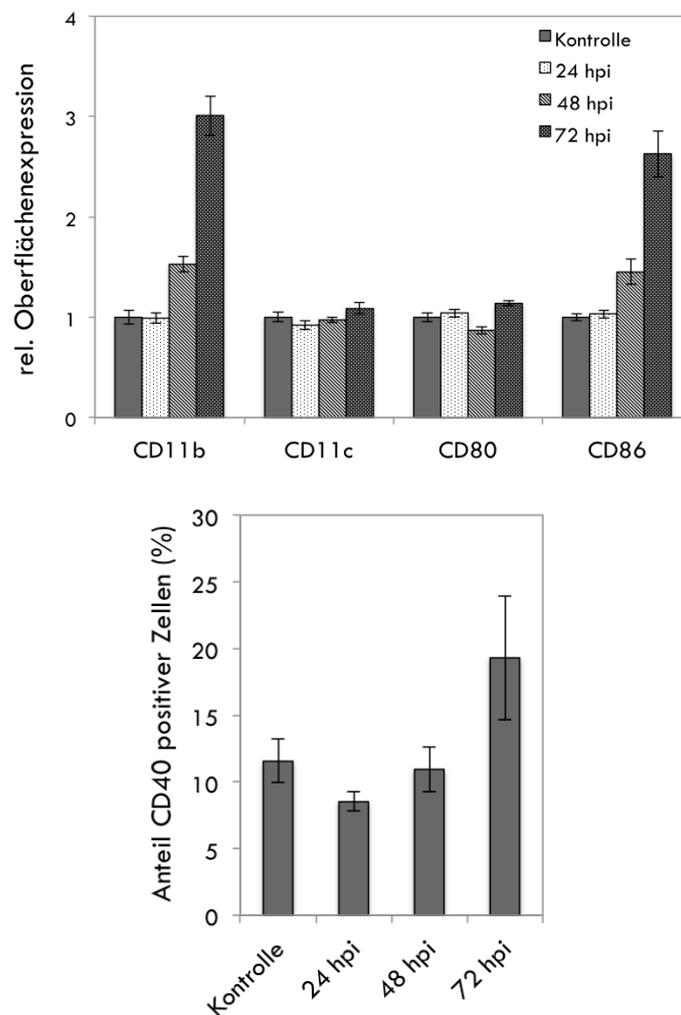
Tabelle 3: Zytokine und Chemokine des Bio-Plex Assays  
(<http://www.copewithcytokines.de>)

Zytokin/Chemokin	produzierende Zellen	Hauptwirkung	TH1	TH2	Pro-inflammatorisch	Anti-inflammatorisch
<b>IL-1 <math>\alpha</math></b>	Monozyten Makrophagen Epithelzellen u.a.	zentrale Rolle bei Immunantwort, Aktivierung von T-Zellen, induziert Fieber	x		x	
<b>IL-1 <math>\beta</math></b>	Monozyten Makrophagen Epithelzellen u.a.	hochwirksam, reguliert IL-6 Freisetzung, bewirkt Anstieg neutrophiler Granulozyten, induziert Fieber	x		x	
<b>IL-6</b>	T- und B-Lymphozyten Makrophagen DCs u.a.	Wachstum und Differenzierung von T- und B-Lymphozyten, induziert Akutphase-Reaktion, Inhibition der TNF- und IL-1-Produktion durch Makrophagen	x	x	x	x
<b>IL-12 (p70)</b>	Monozyten Makrophagen DCs T- und B-Lymphozyten	Induktion der IFN- $\gamma$ -, IL-2- und TNF- $\alpha$ -Synthese in T-Lymphozyten	x		x	
<b>G-CSF</b>	Monozyten Makrophagen Neutrophile Fibroblasten	stimuliert Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen von Granulozyten		x		x
<b>MCP-1</b>	Monozyten Endothelzellen Epithelzellen	stimuliert Monozyten, T-Zellen und DCs	x	x	x	x
<b>MIP-1 <math>\alpha</math></b>	Monozyten Makrophagen	Stimulation der TNF- $\alpha$ Sekretion in Makrophagen; Aktivierung von Granulozyten	x		x	
<b>MIP-1 <math>\beta</math></b>	Monozyten Makrophagen	Chemoattractant für Makrophagen und Lymphozyten	x		x	
<b>RANTES</b>	Monozyten T-Lymphozyten	Wird induziert durch TNF- $\alpha$ und IL-1 $\alpha$ , Chemoattractant für Monozyten und T-Lymphozyten, Rekrutiert Leukozyten zum Entzündungsherd	x		x	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Monozyten Makrophagen Neutrophile T-Lymphozyten	multifunktionales Zytokin, Stimulation der Akutphase-Reaktion, wichtig für Zellaktivierung, Zelldifferenzierung und Zytokinproduktion	x		x	

#### 4.2.2.4 Expression von DC-Oberflächenmarkern

Eine weitere wichtige funktionale Komponente während der DC-Reifung ist die Expression verschiedener DC-Oberflächenmoleküle wie CD11b, CD11c, CD80, CD86 und CD40 (Morelli et al., 2001). Diese Moleküle können nach dem Ausdifferenzieren unterschiedlich reguliert sein.

Für diesen Versuch wurden JAWSII-Zellen unterschiedlich lange mit *C. psittaci* (MOI 3) infiziert (24, 48 und 72 hpi) und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen verschiedene DC-Oberflächenmarker inkubiert. Nach der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen durch entsprechende Sekundärantikörper erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie.



**Abbildung 18: Regulation der DC-Oberflächenmarker nach Infektion mit Chlamydien in JAWSII**

JAWSII-Zellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden mit *C. psittaci* infiziert und nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten, spezifischen Antikörpern durchflusszytometrisch gemessen. Als Kontrolle dienten nicht infizierte JAWSII. Das Ergebnis für CD40 wird in einem separaten Diagramm dargestellt, da in den Proben zwei Populationen, eine CD40-negative und eine CD40-positive, zu messen waren.

Abbildung 18 zeigt das Ergebnis der Untersuchungen zur Regulation der DC-Oberflächenmarker. Nach der Chlamydieninfektion steigt die Oberflächenexpression von CD11b und CD86 um das 2 bis 3 fache an. Des Weiteren lässt sich 72 Stunden nach der Infektion ein bis zu 20 % höherer Anteil an CD40-positiven Zellen nachweisen. Die Oberflächenmarker CD11c und CD80 werden von JAWSII durchaus detektierbar auf der Oberfläche exprimiert, allerdings zeigte sich unter den gewählten experimentellen Bedingungen keine nachweisbare infektionsbedingte Induktion der Oberflächenexpression. Zusammenfassend lässt sich aus den bisher beschriebenen Untersuchungen der Arbeit folgern, dass JAWSII nach einer Chlamydieninfektion die Fähigkeit zur funktionalen Präsentation chlamydialer Antigene gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 14) sowie die morphologischen und funktionalen Eigenschaften gereifter DCs aufweisen.

#### **4.2.3 Unterschiedliche Entwicklung der Chlamydien in DCs und Epithelzellen**

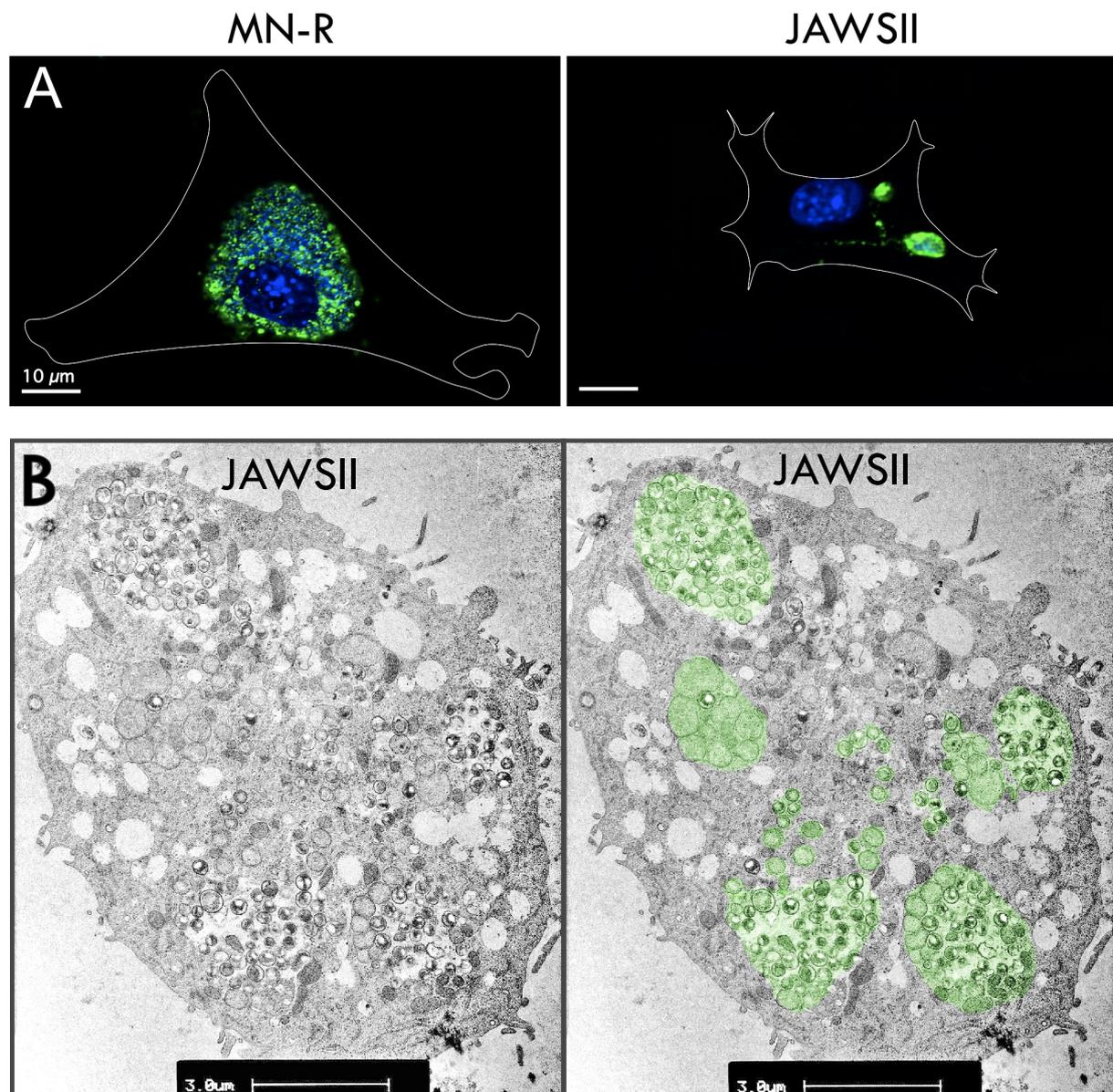
Epithelzellen sind als natürliche Zielzellen der Chlamydien nach der Infektion nur in begrenztem Maße in der Lage, eine zelluläre Gegenwehr zu leisten. Vielmehr werden essentielle zelluläre Prozesse der Epithelzellen von den Chlamydien so umprogrammiert, dass hauptsächlich die bakterielle Vermehrung gewährleistet ist (Heuer et al., 2009; McClarty, 1994; Miyairi and Byrne, 2006).

In Epithelzellen können sich Chlamydien in der Regel sehr effizient und mit hoher Reproduktionsrate vermehren, bis die infizierte Wirtszelle schließlich in der späten Phase des Infektionszyklus in den Zelltod übergeht und infektiöse Chlamydien-EBs in die Umgebung entlässt (Miyairi and Byrne, 2006). Im folgenden Teil der Arbeit wurden daher die Prozesse der Chlamydieninfektion in Epithelzellen und DCs vergleichend untersucht.

##### **4.2.3.1 Morphologische Unterschiede der chlamydialen Einschlüsse**

Um die Morphologie der Einschlüsse in DCs und Epithelzellen zu vergleichen, wurden die Zellen für 24 Stunden mit einer MOI von 3 infiziert und anschließend mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Als Modell-Epithelzelle wurde die murine Epithelzelllinie MN-R (siehe 2.18), die uns von der Zellbank des FLI Riems zur Verfügung gestellt wurde, gewählt. Um die Einschlüsse spezifisch anzufärben, wurde ein FITC-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen *Chlamydia trachomatis* der Firma abcam eingesetzt, der aber auch *C. psittaci* spezifisch bindet. Das verwendete Eindeckmedium

enthält DAPI, einen Farbstoff, der in die DNA interkaliert und diese somit spezifisch markiert. Die fertigen Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop optisch beurteilt und fotografiert. Von JAWSII-Zellen wurden zusätzlich TEM-Aufnahmen angefertigt (siehe 3.4), um die genaue Struktur und die zelluläre Verteilung der Einschlüsse im Detail zu bestimmen.



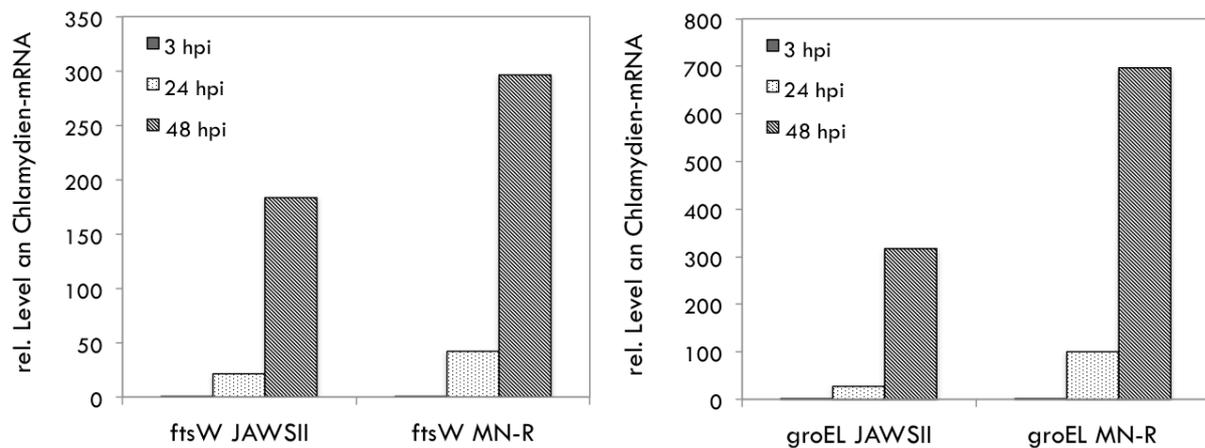
**Abbildung 19: Morphologie der Einschlüsse in DCs und Epithelzellen**

A) MN-R (Epithelzelllinie) und JAWSII (dendritische Zelllinie) wurden auf Deckglasröhrchen ausgesät und mit *C. psittaci* infiziert (24 h, MOI 3). Die Einschlüsse wurden mittels Immunfluoreszenz spezifisch angefärbt (grün) und mit dem Fluoreszenzmikroskop optisch dargestellt. Der Zellkern erscheint durch Anfärbung mit DAPI blau, die DNA der Chlamydien ist ebenfalls DAPI positiv. B) JAWSII wurden mit *C. psittaci* infiziert (72 h, MOI 10), für die TEM aufbereitet und fotografiert. Im rechten Bild wurden Chlamydien-positive Strukturen zur besseren Veranschaulichung nachträglich grün gefärbt.

In Abbildung 19A ist die unterschiedliche Morphologie der Einschlüsse sehr deutlich zu erkennen. Während in MN-R-Zellen ein großer Einschluss perinukleär vorliegt, sind in JAWSII-Zellen kleine, multiple Einschlüsse, die peripher in den Zellen lokalisiert sind, zu erkennen. Zudem hat es den Anschein, dass sich auch außerhalb der membranumschlossenen Einschlüsse Chlamydien frei in den Zellen befinden. Diese Beobachtung wird durch die TEM-Aufnahme in Abbildung 19B untermauert. Die Abbildung zeigt eine JAWSII-Zelle 72 Stunden nach der Infektion, bei der rechts die chlamydialen Strukturen nachträglich grün markiert wurden. Auch hier sind die multiplen Einschlüsse sichtbar, die sich teilweise im distalen Bereich auflösen, woraufhin vereinzelt Chlamydien frei werden. Darüber hinaus liegen in JAWSII-Zellen 72 Stunden nach der Infektion vorwiegend die größeren, metabolisch aktiven RBs in den Einschlüssen vor. Diese Beobachtung ist von besonderem Interesse, da bei einer *C. psittaci*-Infektion in Epithelzellen zu diesem Zeitpunkt die Umwandlung zu infektiösen EBs normalerweise bereits abgeschlossen ist (Friis, 1972; Rockey et al., 1996). Diese Tatsache weist auf eine Störung des für *C. psittaci* typischen etwa 30-stündigen Entwicklungszyklus in infizierten JAWSII hin.

#### 4.2.3.2 Unterschiede in Vermehrung und Metabolismus

Um einen Einblick in die unterschiedliche Entwicklung der Chlamydien in den beiden Zelltypen zu erhalten, wurde die Expression chlamydialer Gene auf Transkriptionsebene mittels Real-Time PCR untersucht. Hierfür wurde mit *ftsW* die mRNA eines für die Teilung essentiellen Proteinfaktors und mit *groEL* die mRNA des metabolisch wichtigen Chaperons HSP60 gewählt. Zur Auswahl dieser beiden Gene wurden zuvor in entsprechenden Vorexperimenten mittels semiquantitativer PCR verschiedene chlamydiale Gentranskripte amplifiziert (Daten hier nicht gezeigt).



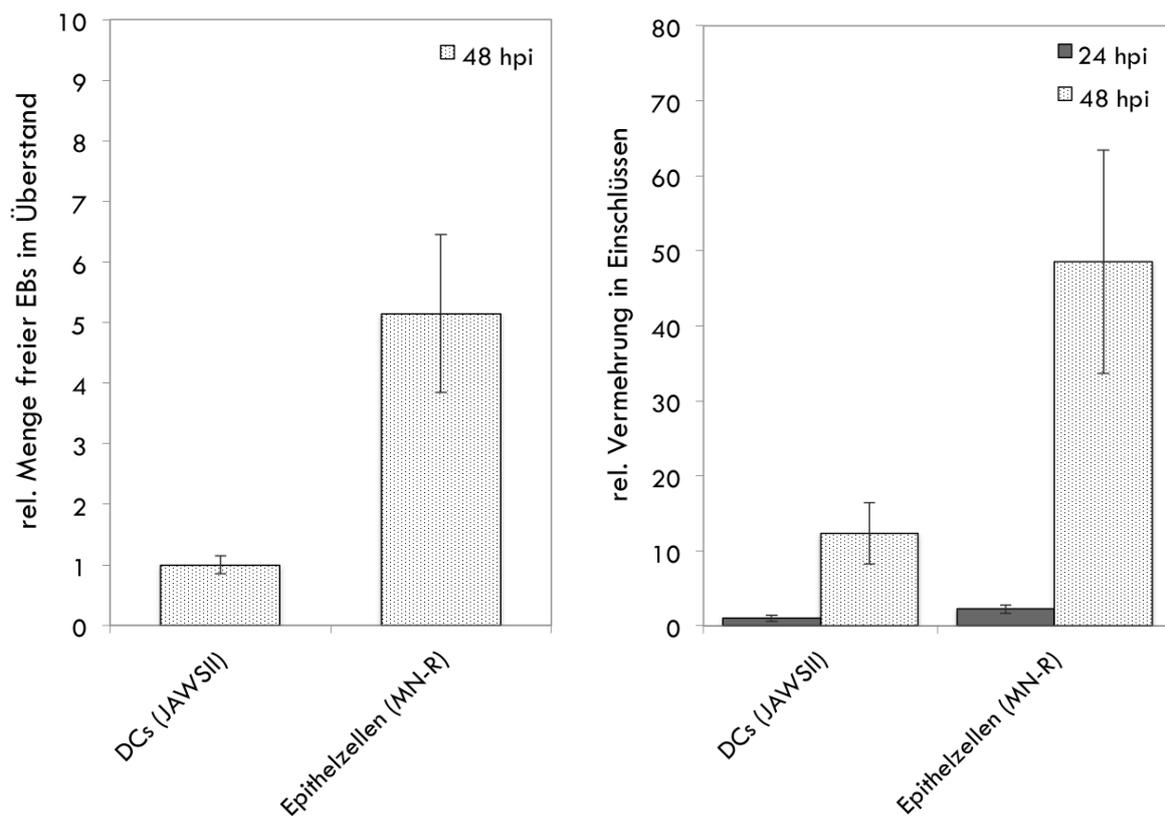
**Abbildung 20: Transkriptmenge chlamydialer Gene in JAWSII und MN-R**

Aus infizierten JAWSII und MN-R (3, 24, 48 hpi) wurde zunächst die RNA extrahiert und anschließend mit spezifischen Primerpaaren für ftsW und groEL die entsprechende mRNA mittels Real-Time PCR in Echtzeit amplifiziert. Zur Ermittlung der relativen Expressionsunterschiede wurde die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewendet. (Abweichung der Ct-Werte  $< 0,31$ ;  $n=2$ ).

Sowohl bei dem Teilungsprotein ftsW als auch bei dem Chaperon groEL, der mRNA für HSP60, liegt ein Unterschied in der Transkriptmenge nach Infektion in DCs im Vergleich zu Epithelzellen vor (Abb. 20). In MN-R-Zellen ist die Transkriptmenge für beide hier betrachteten chlamydialen Gene nach 24 und 48 Stunden größer als in JAWSII. Der Grund dafür kann in einer gestörten Genexpression der Chlamydien in den JAWSII-Zellen liegen und/oder in einem gestörten bzw. verlangsamten Entwicklungszyklus.

Um die Effizienz der Chlamydienreproduktion in Epithelzellen und DCs zu untersuchen, wurde die intrazelluläre Vermehrung sowie die Menge an freigewordenen infektiösen Chlamydien über ein Standard-Reinfektionsexperiment auf BGM-Zellen ermittelt (siehe 3.2.6). Bei BGM handelt es sich um eine Zelllinie aus dem Nierenepithel der grünen Meerkatze, die vorzugsweise für die Anzucht von Chlamydien im Labor Verwendung findet (Vanrompay et al., 1992).

Für das Reinfektionsexperiment wurden JAWSII und MN-R für 24 und 48 Stunden infiziert. Anschließend wurden die Chlamydien aus dem Zellkulturüberstand und aus den Einschlüssen (nach der Freisetzung durch Sonifikation) in PBS verdünnt und auf BGM-Zellen gegeben. Nach 24 Stunden konnten die Einschlüsse in den BGM-Zellen mittels Immunfluoreszenztest angefärbt, ausgezählt sowie der Proben-titer bestimmt werden.



**Abbildung 21: Vermehrung der Chlamydien in DCs und Epithelzellen**

JAWSII und MN-R wurden für 24 und 48 Stunden mit Chlamydien infiziert (MOI < 1). Anschließend wurden die Chlamydien aus dem Kulturüberstand und aus den Einschlüssen (nach Sonifizierung) zur Titration auf BGM-Zellen gegeben. Nach 24 h wurde mittels „IMAGEN™ Chlamydia Test“ der Titer der Proben bestimmt. Der kleinste Wert wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

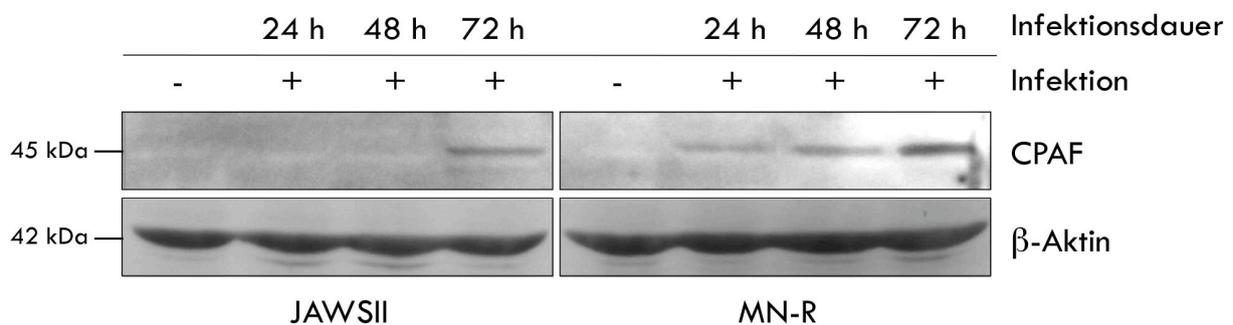
24 Stunden nach der Infektion sind sowohl in JAWSII als auch in MN-R keine Chlamydien im Überstand nachweisbar. Nach 48 Stunden sind im Zellkulturüberstand infizierter JAWSII-Zellen fünfmal weniger infektiöse EBs nachzuweisen als in MN-R-Zellen. Ähnlich sieht es für die intrazellulären EBs aus. 24 Stunden nach der Infektion ist die Reproduktionsrate generell noch nicht sehr hoch, jedoch in den MN-R-Zellen deutlich höher als in JAWSII. Nach 48 Stunden ist in den JAWSII die Vermehrungsrate der Chlamydien etwa um das Fünffache geringer als in MN-R (Abb. 21). Zusammenfassend bedeutet dies, dass sich die Chlamydien in Epithelzellen erwartungsgemäß sehr effizient vermehren und infektiöse EBs in größerem Maße freigesetzt werden, während es in JAWSII zu einer reduzierten Vermehrung und Freisetzung der Bakterien kommt.

Die erfolgreiche Replikation der Chlamydien in Epithelzellen wird mit verschiedenen chlamydialen Proteinen in Verbindung gebracht, die als Virulenzfaktoren durch die Membran der Einschlüsse ins Zytosol sezerniert werden können (Valdivia, 2008; Zhong,

2009) und hier entscheidend dazu beitragen, dass zelluläre Mechanismen zugunsten der chlamydialen Entwicklung verändert werden. Der bislang bekannteste Vertreter dieser sezernierten Proteine ist die chlamydiale Protease CPAF (Christian et al., 2010; Zhong et al., 2001).

#### 4.2.3.3 Expression und Lokalisation der chlamydialen Protease CPAF

Das Protein CPAF ist eine chlamydiale Protease, die aus den Inklusionen in das Zytoplast infizierter Zellen sezerniert wird und dort verschiedene, immunologisch relevante, wirtszelleigene Transkriptionsfaktoren degradiert (Fan et al., 2002). Um die Expression dieser Protease in infizierten MN-R-Zellen im Vergleich zu infizierten JAWSII-Zellen zu überprüfen, wurden Western Blot-Analysen mit einem spezifischen anti-CPAF Antiserum aus der Maus durchgeführt. Das verwendete Antiserum wurde uns von Prof. Andreas Essig aus Ulm zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein Antiserum gegen CPAF aus *C. trachomatis*, welches mit CPAF aus *C. psittaci* kreuzreagiert.



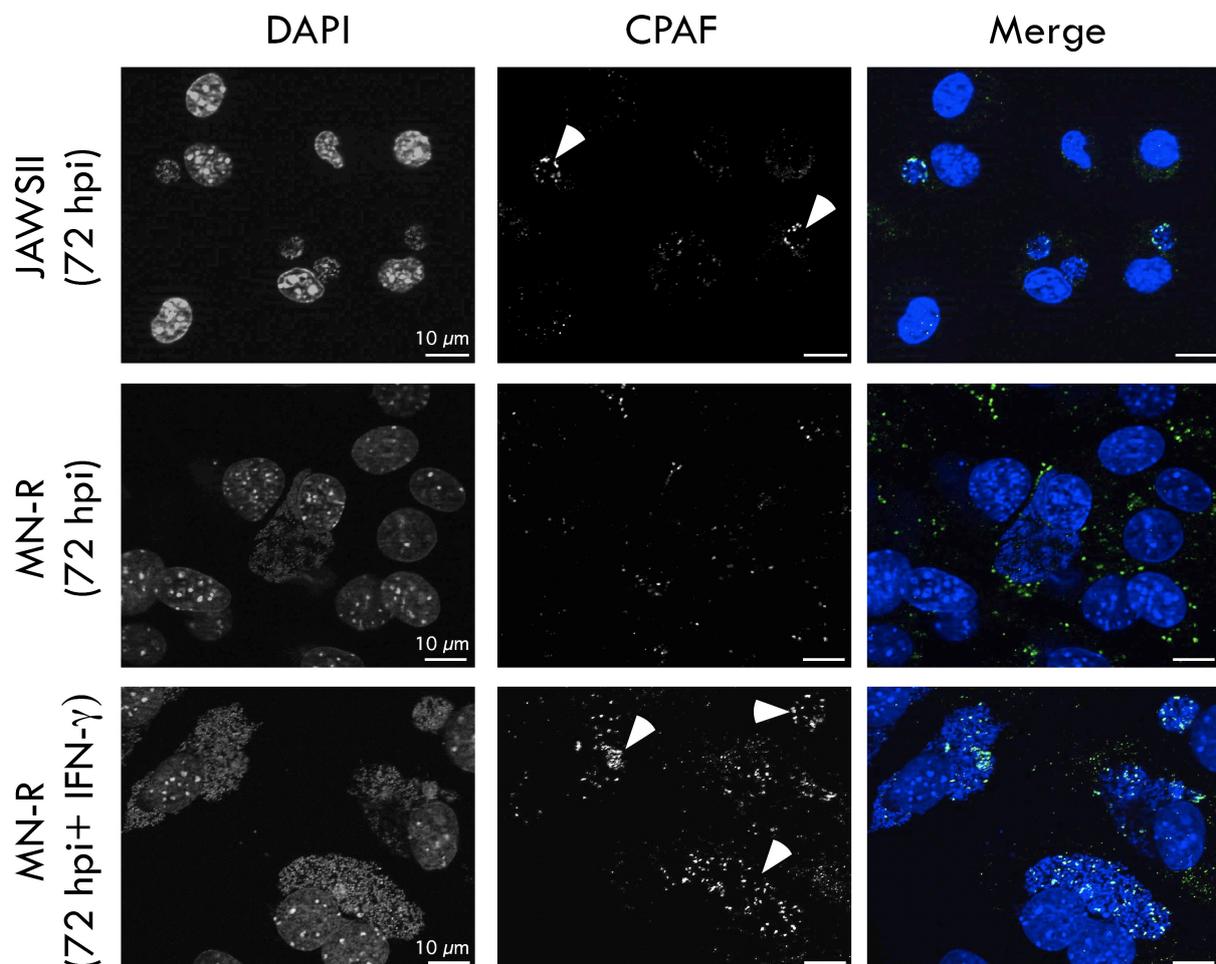
**Abbildung 22: Expression von CPAF in JAWSII und MN-R**

Lysate von nicht infizierten und *C. psittaci*-infizierten JAWSII und MN-R (24, 48, 72 hpi; MOI 3) wurden im Western Blot auf die Expression der chlamydialen Protease CPAF hin getestet. Hierfür wurde ein anti-CPAF Antiserum aus der Maus verwendet, das ursprünglich gegen CPAF von *C. trachomatis* gerichtet ist, aber mit dem von *C. psittaci* kreuzreagiert. Als Ladekontrolle diente ein anti-β-Aktin Antikörper. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die gezeigten β-Aktin Kontrollbanden wurden aus einem äquivalenten Experiment übernommen.

In JAWSII lässt sich CPAF erst 72 Stunden nach der Infektion detektieren, während in MN-R bereits 24 Stunden nach der Infektion eine schwache Bande auftaucht und die Expression von CPAF mit der Infektionsdauer weiter zunimmt (Abb. 22). In JAWSII liegt somit nach Infektion mit gleicher MOI eine deutlich geringere Konzentration der chlamydialen Protease CPAF vor. Da CPAF seine proteolytischen Eigenschaften erst nach der Sekretion ins Zytoplast der Wirtszelle entfaltet (Dong et al., 2004), wurde in weiteren Experimenten die

intrazelluläre Lokalisation von CPAF in Epithelzellen und DCs untersucht. Falls CPAF in infizierten JAWSII nicht ins Zytosol gelangt, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass DCs im Gegensatz zu Epithelzellen zelluläre Abwehrmechanismen besitzen, die in der Lage sind, der chlamydialen Vermehrung und Reifung entgegenzutreten und somit die Infektionslast infizierter Zellen zu reduzieren.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen (JAWSII und MN-R) für 72 Stunden mit *C. psittaci* infiziert und anschließend mittels Immunfluoreszenz auf die Lokalisation von CPAF hin untersucht. CPAF wurde mit dem anti-CPAF Antiserum aus der Maus und dem entsprechenden FITC-markierten Sekundärantikörper spezifisch angefärbt. Des Weiteren erfolgte eine Anfärbung der Zellkerne und Chlamydieninklusionen mittels DAPI.



**Abbildung 23: Lokalisation von CPAF in JAWSII und MN-R**

In JAWSII und MN-R wurde 72 hpi die Lokalisation von CPAF mittels IF dargestellt. DAPI-positive Bereiche (Zellkern und Inklusionen) erscheinen blau. CPAF wurde mit einem anti-CPAF Antiserum aus der Maus und mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt (grün). In einem Ansatz wurden MN-R-Zellen 4 h nach der Infektion zusätzlich mit IFN- $\gamma$  stimuliert (100 U). Die Lokalisation von CPAF in den Inklusionen ist mit weißen Pfeilen verdeutlicht.

Für *C. pneumoniae*-infizierte Epithelzellen konnte bereits gezeigt werden, dass CPAF spätestens 72 Stunden nach der Infektion in das Zytosol infizierter Epithelzellen sezerniert wird (Heuer et al., 2003). Interessanterweise wird CPAF in JAWSII 72 Stunden nach der Infektion nicht ins Zytosol sezerniert, sondern befindet sich noch immer innerhalb der chlamydialen Inklusionen (Abb. 23, erste Reihe, weiße Pfeile). In MN-R-Zellen lässt sich CPAF zu diesem Zeitpunkt erwartungsgemäß nicht mehr in den chlamydialen Einschlüssen detektieren (Abb. 23, zweite Reihe). Wie die Arbeiten von Heuer et al. (Heuer et al., 2003) zeigen, wird die Translokation von CPAF ins Zytosol während einer durch IFN- $\gamma$  hervorgerufenen persistenten Infektion verhindert. Um zu überprüfen, ob die Anwesenheit von IFN- $\gamma$  dazu führt, dass CPAF auch in MN-R-Zellen in den Einschlüssen verbleibt, wurden die Epithelzellen für die Immunfluoreszenzanalyse 4 Stunden nach der Infektion zusätzlich mit IFN- $\gamma$  (100 U) stimuliert. Wie in Abbildung 23 (dritte Reihe, weiße Pfeile) zu erkennen ist, ist CPAF nach der Behandlung mit IFN- $\gamma$  in MN-R-Zellen tatsächlich innerhalb der Inklusionen nachweisbar. Dies belegt, dass CPAF im Verlauf einer normalen chlamydialen Vermehrung ins Zytosol der Wirtszelle sezerniert wird, dieser Prozess jedoch bei einem gestörten Entwicklungszyklus (in JAWSII und IFN- $\gamma$ -behandelten MN-R-Zellen) nachhaltig blockiert ist. Entsprechende Kontrollen mit nicht infizierten Zellen wurden ebenfalls mit dem anti-CPAF Antiserum inkubiert, zeigten aber wie erwartet keine spezifische Anfärbung und wurden hier nicht abgebildet.

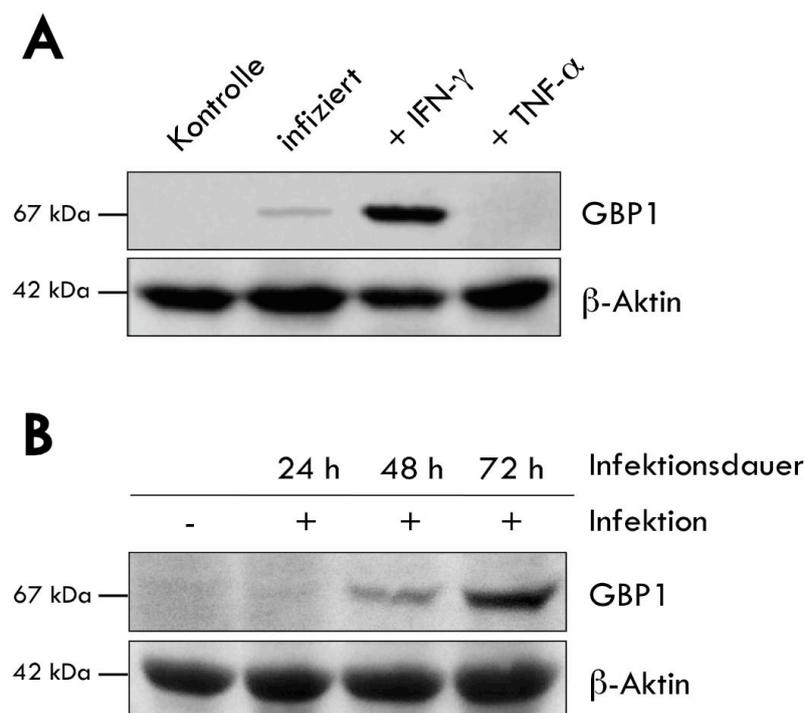
Durch die vorangegangenen Experimente konnten deutliche Unterschiede in der Entwicklung der Chlamydien in Epithelzellen im Vergleich zu DCs aufgezeigt werden, die darauf hindeuten, dass DCs über Mechanismen verfügen, die einer Infektion mit Chlamydien entgegenwirken. Im Folgenden wurde nun untersucht, inwiefern möglicherweise Faktoren der zellautonomen Resistenz für die gehemmte Entwicklung der Chlamydien in den JAWSII mitverantwortlich sind. Hierbei wurde insbesondere auf die Rolle von GBP<sub>1</sub> eingegangen (Boehm et al., 1998).

#### **4.2.4 Die Rolle der zellautonomen Resistenz in DCs nach Chlamydieninfektion**

Faktoren der zellautonomen Immunität tragen zur Bekämpfung intrazellulärer Erreger bei. Wichtige Vertreter gehören zu den GBPs, die durch proinflammatorische Zytokine (hauptsächlich IFN- $\gamma$ ) sowie durch LPS induziert werden können (MacMicking, 2004). Durch

Arbeiten von Klaus Pfeffer und Kollegen konnte bereits gezeigt werden, dass einige GBPs nach der *Toxoplasma gondii*-Infektion von Mäusen induziert werden (Degrandi et al., 2007). Zudem konnte eine Kolokalisation von GBPs mit dem intrazellulären Parasiten beobachtet werden, was die Vermutung nahe legt, dass GBPs mit intrazellulären Erregern interagieren und eine wichtige Funktion in der Immunabwehr der Wirtszellen erfüllen.

Um zu untersuchen, inwieweit GBPs in die Prozesse der Chlamydieninfektion von DCs eingreifen, wurde zunächst für GBP<sub>1</sub> die Expression in JAWSII nach Infektion sowie nach IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Stimulation mittels Western Blot analysiert. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit einer MOI von 3 infiziert und mit 20 ng/ml IFN- $\gamma$  bzw. 30 ng/ml TNF- $\alpha$  für jeweils 48 Stunden stimuliert. Zur spezifischen Anfärbung von murinem GBP<sub>1</sub> wurde der polyklonale Antikörper M18 von der Firma Santa Cruz verwendet.



**Abbildung 24: Expression von GBP<sub>1</sub>**

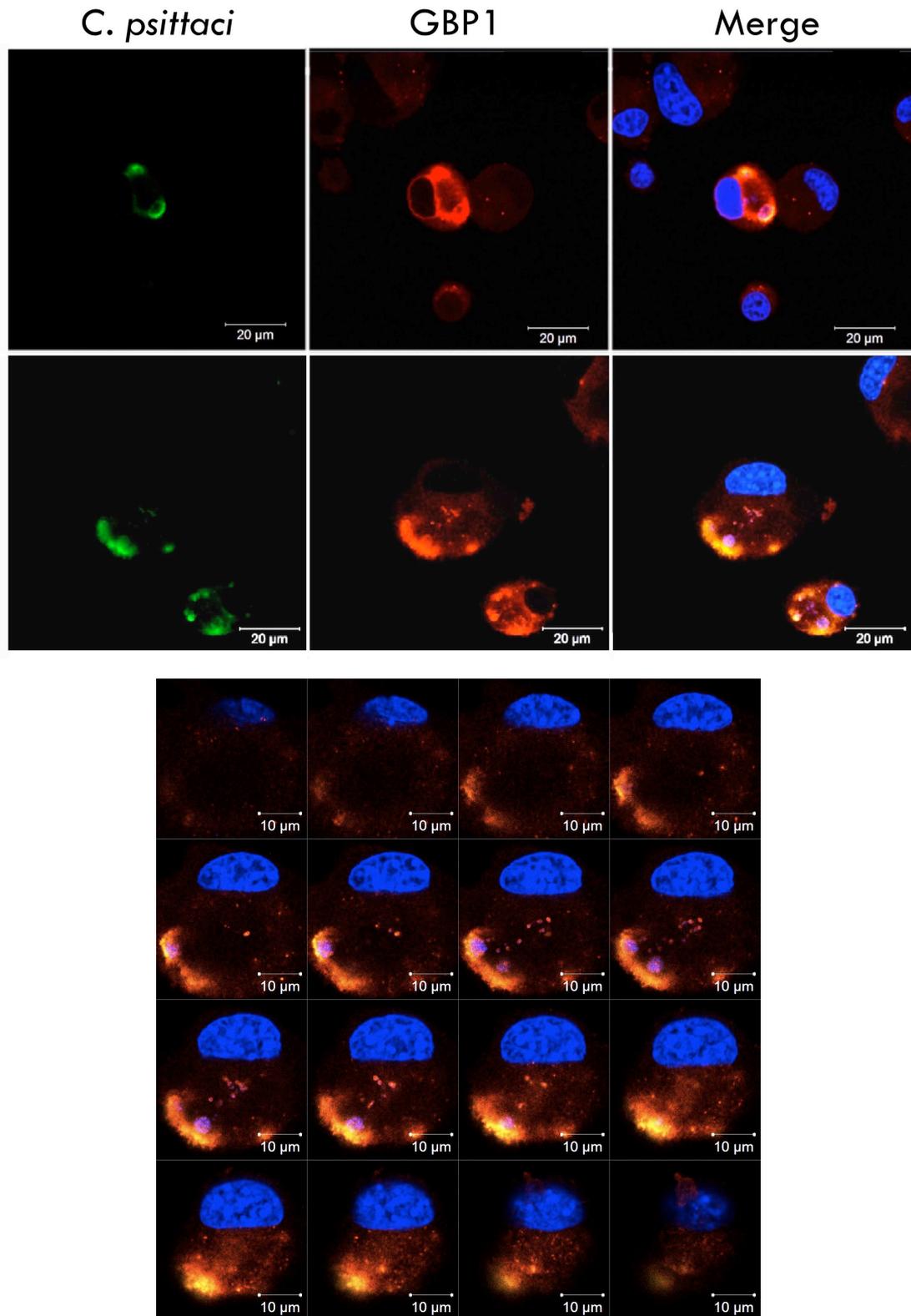
A) Der Western Blot zeigt die GBP<sub>1</sub>-Expression in nicht infizierten und *C. psittaci*-infizierten (MOI 3) JAWSII sowie nach IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Stimulation für jeweils 48 Stunden. In B) ist die GBP<sub>1</sub>-Expression nach 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion mit *C. psittaci* (MOI 3) dargestellt. Als Ladekontrolle wurden die Blots jeweils gegen  $\beta$ -Aktin gefärbt.

Die Expression des zellautonomen Resistenzfaktors GBP<sub>1</sub> lässt sich nach Infektion sowie nach IFN- $\gamma$ -Stimulation in JAWSII nachweisen. Nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  ist GBP<sub>1</sub> hingegen erwartungsgemäß nicht zu detektieren (Abb. 24A). Interessanterweise wird GBP<sub>1</sub> während der Infektion mit Chlamydien in JAWSII IFN- $\gamma$ -unabhängig induziert (Abb. 24B),

was auf eine LPS-abhängige Expressionsstimulation des zellautonomen Resistenzfaktors GBP<sub>1</sub> schließen lässt (Han, 1999).

Um die Lokalisation des induzierten GBP<sub>1</sub> in infizierten JAWSII zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Nach dem Aussäen auf Deckglasröhrchen wurden die Zellen zu diesem Zweck für 24 Stunden mit *C. psittaci* infiziert und nach der Fixierung mit spezifischen Antikörpern gegen GBP<sub>1</sub> (M-18) und Chlamydien inkubiert. Der eingesetzte anti-Chlamydien Antikörper ist bereits mit FITC gekoppelt, der anti-GBP<sub>1</sub> Antikörper wurde mit einem TRITC-gekoppelten Sekundärantikörper gegen IgG-Goat fluoreszenzmarkiert.

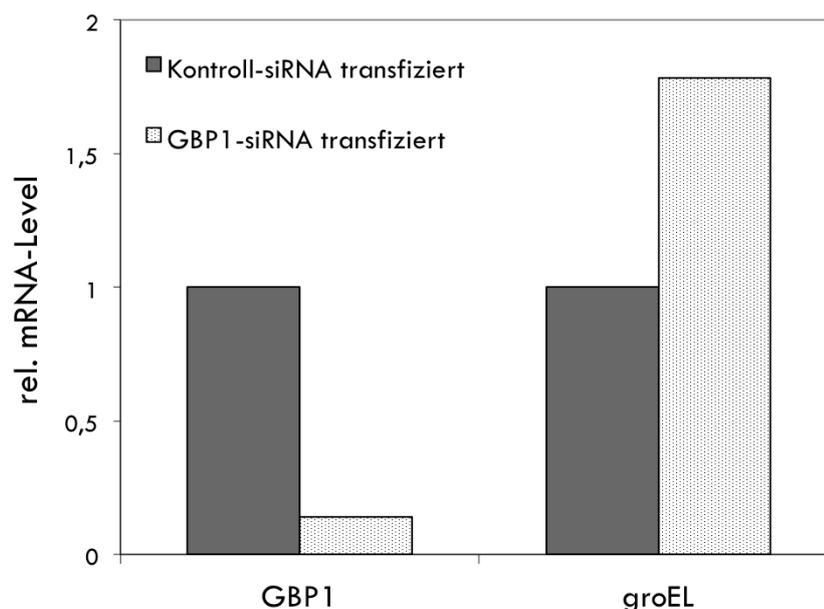
Abbildung 25 zeigt das Ergebnis der Immunfluoreszenzanalyse. Es ist deutlich zu erkennen, dass GBP<sub>1</sub> nur in den tatsächlich infizierten Zellen verstärkt exprimiert wird und eindeutig mit den parasitophoren Vakuolen der Chlamydien kolokalisiert (Pearson-Wert: 0,64). Der Pearson-Korrelationskoeffizient gibt an, ob ein Zusammenhang zwischen zwei Messdaten besteht oder nicht. Liegt der Wert zwischen 0 und 1 besteht ein positiver Zusammenhang (siehe 3.3). In dem hier betrachteten Fall bedeutet dies, dass die gemessenen Pixel einer Zelle sowohl grün als auch rot fluoreszieren, und damit GBP<sub>1</sub> mit Chlamydien kolokalisiert. Die Aufnahmen in Abbildung 25 vermitteln den Eindruck, dass sich GBP<sub>1</sub> strukturell um die Inklusionen herum anordnet. Der Z-Stapel in der unteren Abbildung zeigt ferner, dass auch die sehr kleinen, punktförmigen Chlamydien-positiven Strukturen im Zentrum der Zelle mit GBP<sub>1</sub> kolokalisiert sind. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass GBP<sub>1</sub> als zellautonomer Resistenzfaktor mit den Einschlüssen interagiert und an der zellautonomen Chlamydienabwehr der Wirtszelle beteiligt ist.



**Abbildung 25: Kolokalisation von GBP1 mit Chlamydieneinschlüssen**

24 Stunden nach Infektion wurden in Chlamydien-infizierten JAWSII GBP1 (rot) und Chlamydien (grün) mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern spezifisch markiert. Die untere Abbildung zeigt einen Z-Stapel mit Einzelaufnahmen durch die gesamte Zelle. Der ermittelte Pearson-Wert liegt bei 0,64.

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob GBP1 möglicherweise einen Einfluss auf die Vermehrung der Chlamydien hat, wurde GBP1 in JAWSII durch die Transfektion spezifischer siRNA herunterreguliert. Nach 6 Stunden wurden die Zellen mit *C. psittaci* (MOI 3) infiziert und nach weiteren 24 Stunden die RNA extrahiert. Mittels Real-Time PCR erfolgte anschließend die Messung der Transkriptmenge von groEL, der mRNA für HSP60, in Echtzeit. Zur Überprüfung der Effizienz des siRNA-vermittelten *knockdowns* wurde ebenfalls die Menge an GBP1-mRNA bestimmt. Um auszuschließen, dass allein die Transfektion mit siRNA zu einem unerwünschten, unspezifischen *off-target*-Effekt führt, wurden die Zellen zur Kontrolle mit Kontroll-siRNA transfiziert. Hierbei handelt es sich um siRNA („AllStars Negative Control siRNA“ von Quiagen), die für die zellulären Gentranskripte wirkungslos ist.



**Abbildung 26: Transkription von groEL nach GBP1-siRNA-Transfektion**

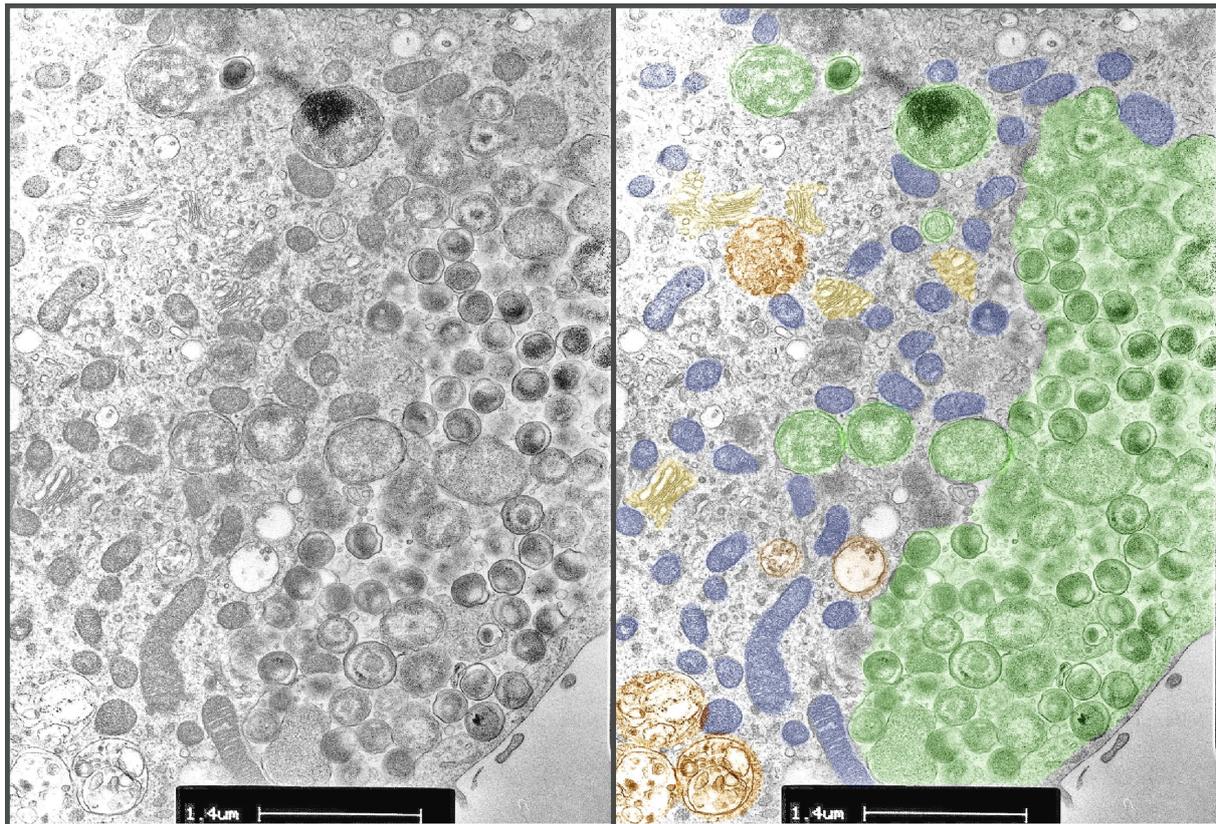
Gezeigt ist die relative Transkriptmenge, ermittelt durch Real-Time PCR, von groEL und GBP1 nach Transfektion von Kontroll-siRNA und GBP1-siRNA. Die JAWSII-Zellen wurden 6 h nach der Transfektion infiziert (MOI 3) und 24 hpi einer RNA-Extraktion unterzogen. Zur Ermittlung der relativen Expressionsunterschiede wurde die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewendet. (Abweichung der Ct-Werte < 0,25, n=3).

Das Diagramm in Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der Real-Time PCR nach siRNA-Transfektion. Eine siRNA-vermittelte Reduktion der zellulären GBP1-Expression führt zu einem detektierbaren Anstieg an groEL-mRNA, was eine stärkere, funktionale Vermehrung der Chlamydien widerspiegelt. Dies weist darauf hin, dass GBP1 einen negativen Einfluss auf die Reproduktion von Chlamydien in JAWSII hat.

#### 4.2.5 Prozessierung der Chlamydienantigene in DCs

Wie in Abschnitt 4.2.3 eingehend beschrieben wurde, zeigen sich erhebliche Unterschiede in der Entwicklung der Chlamydien nach Infektion in Epithelzellen im Vergleich zu DCs. Insbesondere die Morphologie der relativ kleinen, multiplen Einschlüsse in DCs (Abb. 19), die sich zum Teil auflösen und hierdurch Chlamydien vereinzelt ins Zytosol entlassen, wurde für die eigentlichen chlamydialen Zielzellen, die Epithelzellen, laut bisheriger Untersuchungen des Nationalen Referenzlabors für Psittakose in Jena, nicht beobachtet (persönliche Mitteilungen Prof. Dr. Liebler-Tenorio). Dieser Aspekt ist von besonderem Interesse für die MHC I-vermittelte Präsentation chlamydialer Antigene in DCs und der damit verbundenen Antigenprozessierung. In der als klassisch bezeichneten MHC I-Beladung werden zytosolische Proteine durch das Proteasom proteolytisch in Peptid-Antigene abgebaut. Das Proteasom hat allerdings auf die membranumschlossenen Chlamydien, auch wenn sich diese außerhalb der parasitophoren Vakuole befinden, keinen direkten Zugriff. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass die Chlamydien während der Infektion in DCs durch Autophagozytose in vakuolare lysosomale Kompartimente gelangen, in denen die Prozessierung der Antigene stattfindet (Ojcius et al., 1998).

Um einen detaillierten optischen Eindruck der chlamydialen Strukturen sowie der räumlichen Verteilung endo-/lysosomaler Kompartimente in infizierten DCs zu erhalten, wurden JAWSII 72 Stunden nach der Infektion mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. In Abbildung 27 ist eine entsprechende TEM-Aufnahme zu sehen, in der verschiedene Organellen zur besseren Darstellung nachträglich farblich markiert wurden.



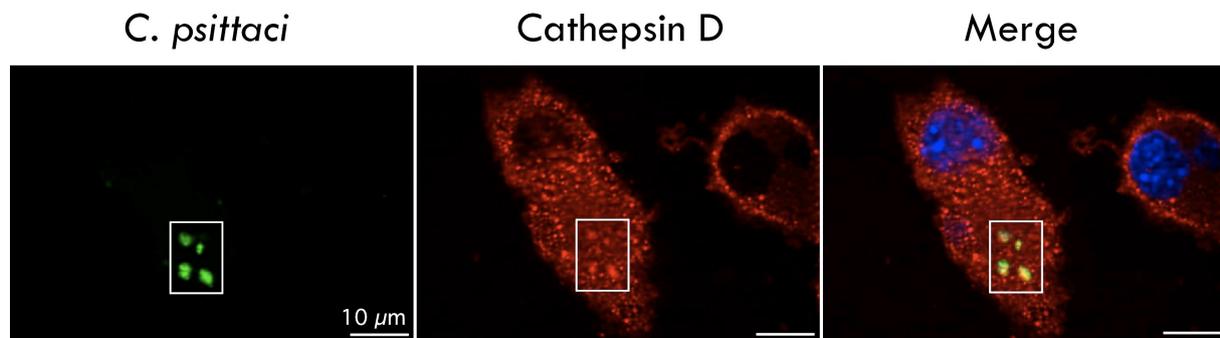
**Abbildung 27: TEM-Aufnahme einer infizierten JAWSII-Zelle**

72 hpi wurden JAWSII-Zellen für die TEM aufbearbeitet. Die hier gezeigte Aufnahme wurde im Bild rechts nachträglich farblich markiert, um die einzelnen Strukturen deutlicher hervorzuheben. Chlamydien sind grün dargestellt, Mitochondrien blau, der Golgi-Apparat gelb und vakuolare Degradationskompartimente der Zelle braun.

Chlamydien wurden grün, Mitochondrien blau, der Golgi-Apparat gelb und vakuolare Degradationskompartimente braun dargestellt. Auffallend sind die zahlreichen Mitochondrien, die um den Chlamydieneinschluss herum angeordnet sind. Dies ist damit zu erklären, dass Chlamydien als obligat intrazelluläre Bakterien für den eigenen Energiehaushalt auf das ATP der Wirtszelle, welches mitochondrialen Ursprungs ist, angewiesen sind. Von besonderem Interesse ist jedoch die räumliche Nähe multivesikulärer endosomaler Zellstrukturen (multivesikuläre Endosomen, MVEs) sowie später Exocytosekompartimente zu den sich auflösenden Chlamydieninklusionen. Teilweise ist zu erkennen (Bildrand links unten), dass sich offenbar chlamydiale Strukturen in den multivesikulären Degradationskompartimenten wiederfinden.

Um der Frage weiter nachzugehen, ob Chlamydien tatsächlich in endosomale Kompartimente überführt werden, wurden entsprechende Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Man geht davon aus, dass für die alternative Kreuzpräsentation auf MHC I

endosomale Cathepsine an der Prozessierung exogener Antigene beteiligt sind (Fonteneau et al., 2003; Shen et al., 2004). Für den Versuch wurden die Zellen daher nach 24-stündiger Infektion fixiert und durch den Einsatz fluoreszenzgekoppelter Antikörper gegen Chlamydien und Cathepsin D spezifisch angefärbt.



**Abbildung 28: Kolokalisation von Chlamydien mit endosomalen Kompartimenten**

In JAWSII-Zellen wurde 24 hpi mit Chlamydien mittels Immunfluoreszenzanalyse die Verteilung der Cathepsin D-positiven Kompartimente ermittelt. Chlamydien wurden durch den Einsatz fluoreszenzgekoppelter Antikörper mit FITC markiert (grün), Cathepsin D wurde TRITC-markiert (rot). Außerdem erfolgte eine DAPI-Färbung (blau).

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, tritt an den FITC-markierten Chlamydien-positiven Bereichen auch TRITC-markiertes Cathepsin D vermehrt auf. Das bedeutet, dass hier eine deutliche Kolokalisation zwischen Chlamydien und Cathepsin D zu beobachten ist. Der Pearson-Wert im Ausschnittbereich liegt bei 0,79. Es ist daher naheliegend, dass von DCs aufgenommene Chlamydien durch Autophagozytose zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion in endosomale, Cathepsin D-positive Kompartimente verbracht werden und dort mit großer Wahrscheinlichkeit die chlamydialen Antigene durch Cathepsin D proteolytisch generiert werden.

#### 4.2.6 Regulation des MHC I-Beladekomplexes

Von entscheidender funktionaler Bedeutung für die Antigenpräsentation ist neben der Antigenprozessierung die Regulation der MHC I-Expression sowie der akzessorischen Präsentationskomponenten.

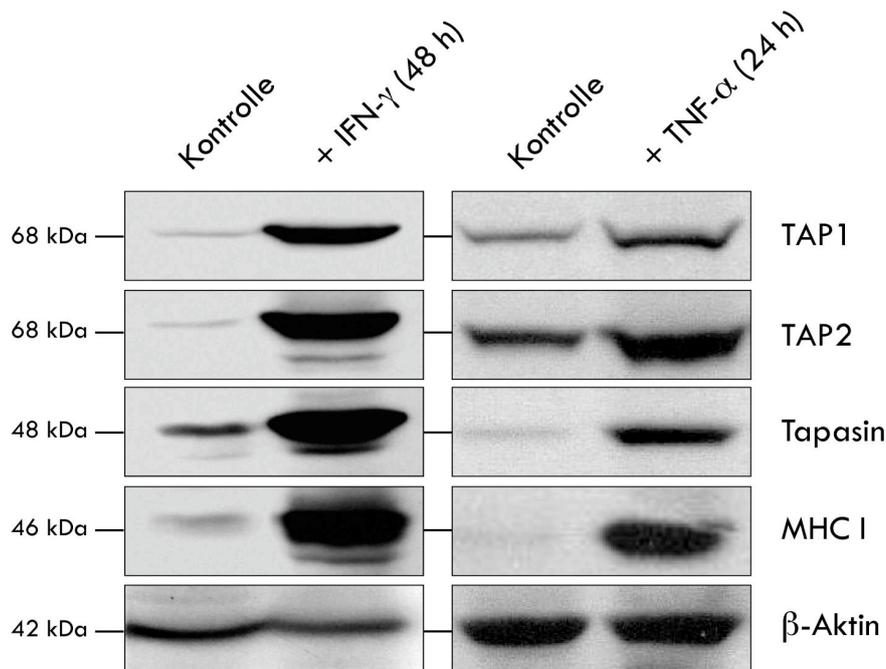
##### 4.2.6.1 Komponenten der MHC I-Antigenpräsentation in nicht infizierten JAWSII-Zellen

Um experimentelle Studien zur MHC I-vermittelten Präsentation chlamydialer Antigene in JAWSII durchführen zu können, muss gewährleistet sein, dass die einzelnen Komponenten

des MHC I-Beladekomplexes in JAWSII tatsächlich exprimiert werden. Hierzu wurde zunächst die *steady-state*-Expression und die Induzierbarkeit der TAP-Untereinheiten, TAP1 und TAP2 sowie Tapasin und MHC I in den JAWSII-Zellen überprüft.

Nicht stimulierte sowie IFN- $\gamma$ - (10 ng/ml, 48 Stunden) und TNF- $\alpha$ - (30 ng/ml, 24 Stunden) stimulierte JAWSII-Zellen wurden lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran wurde diese mit den jeweiligen Antikörpern gegen die verschiedenen Komponenten sowie den entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert.

Für TAP1, TAP2 und Tapasin wurden die Antiseren D9 $\alpha$ , 116/5 und R.sin E eingesetzt und für MHC I der Antikörper 3B10.7.



**Abbildung 29: Expression der Komponenten der MHC I-Antigenpräsentation in JAWSII**

Nicht stimulierte sowie IFN- $\gamma$ - (10 ng/ml, 48 Stunden) und TNF- $\alpha$ - (30 ng/ml, 24 Stunden) stimulierte JAWSII-Zellen wurden im Western Blot auf die Expression von TAP1, TAP2, Tapasin und MHC I hin untersucht. Als Kontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

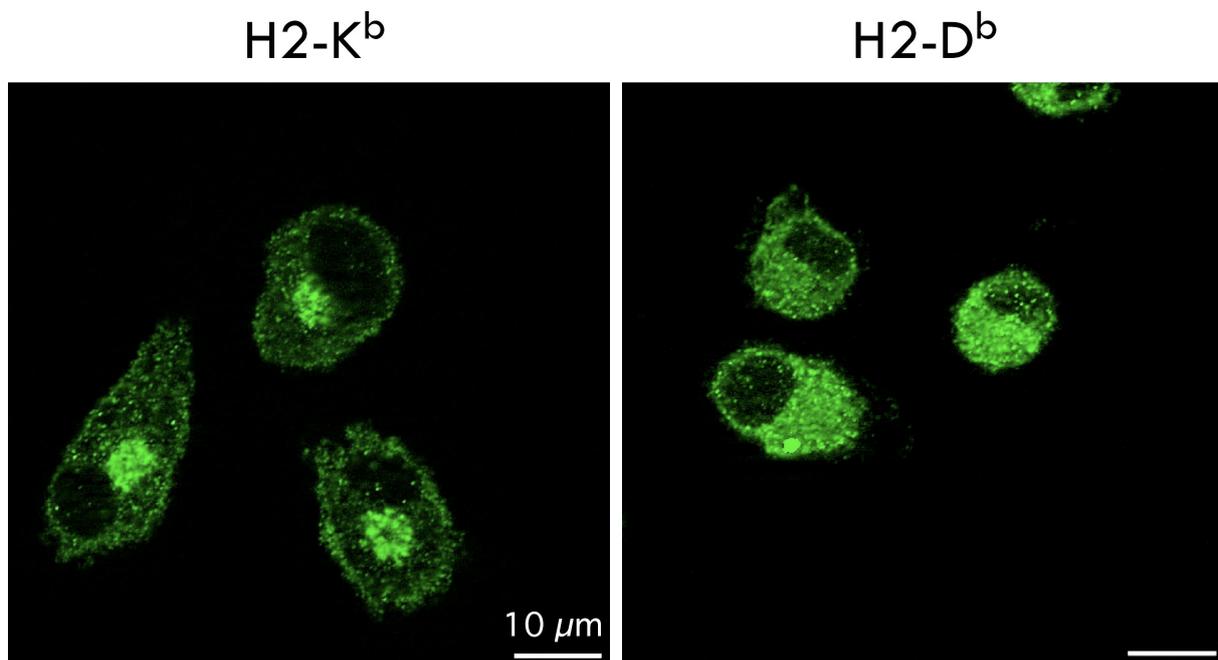
Wie der Western Blot in Abbildung 29 zeigt, werden alle untersuchten Komponenten des Beladekomplexes exprimiert und sowohl durch IFN- $\gamma$  als auch TNF- $\alpha$  induziert. Insbesondere MHC I und Tapasin zeigen in den JAWSII-Zellen nach IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Stimulation eine sehr starke Expression, wobei der Einsatz des anti-MHC I Antikörpers 3B10.7 keine Unterscheidung zwischen den verschiedenen MHC I-Allel-Produkten in JAWSII erlaubt. Auch im Falle der beiden TAP-Untereinheiten, TAP1 und TAP2, zeigt sich nach

Zugabe von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  eine deutlich nachweisbare Induktion der Proteinexpression. Somit kann davon ausgegangen werden, dass JAWSII-Zellen alle wichtigen Komponenten der MHC I-Präsentationsmaschinerie ausprägen und das für APCs charakteristische MHC I-Induktionsverhalten in Anwesenheit entsprechend relevanter Zytokine aufweisen.

#### 4.2.6.2 Lokalisation der MHC Klasse I-Allel-Produkte in nicht infizierten JAWSII

JAWSII-Zellen exprimieren bekanntermaßen die zwei MHC I-Moleküle H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> (Jiang et al., 2008). Um die Expression sowie die intrazelluläre Verteilung der beiden MHC I-Moleküle zu überprüfen, wurden die JAWSII-Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen auf Deckglasröhrchen ausgesät und nach 24 Stunden mit PFA fixiert. Nach Permeabilisierung wurden die Zellen mit Antikörpern gegen H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup>, sowie entsprechenden FITC-markierten Sekundärantikörpern spezifisch angefärbt.



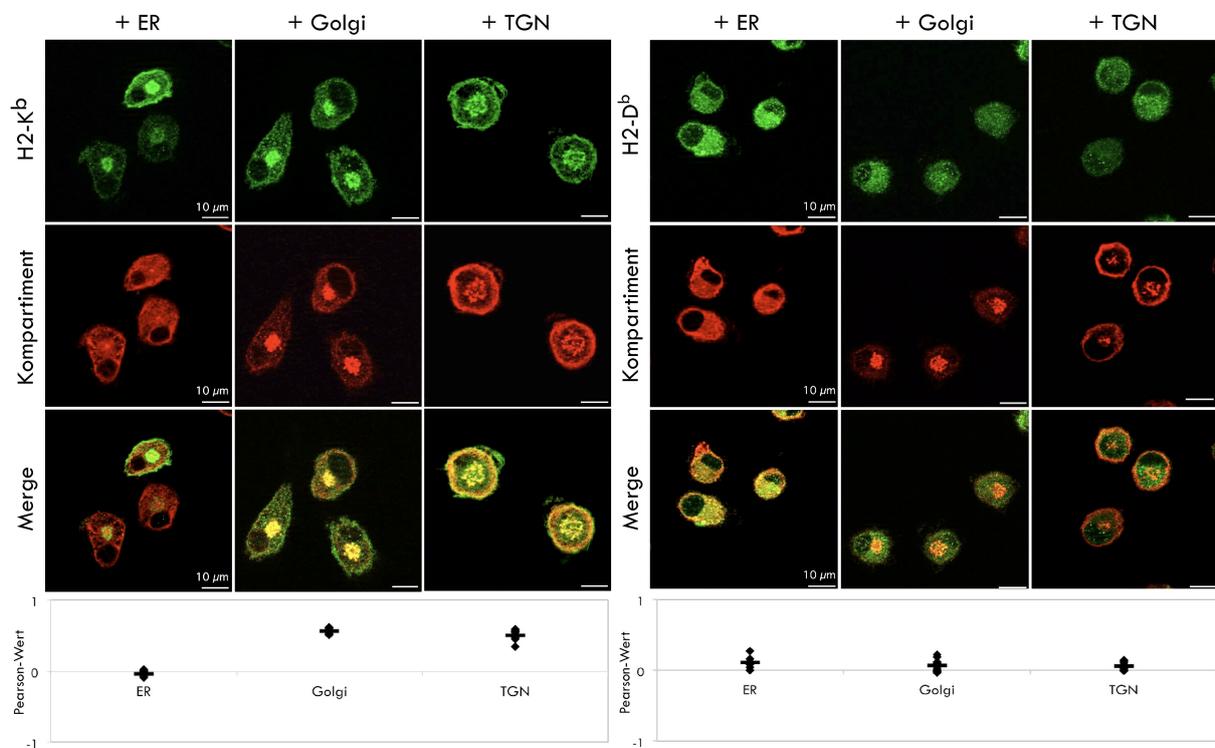
**Abbildung 30: Expressionsmuster der beiden MHC I-Moleküle in JAWSII**

Gezeigt ist die Immunfluoreszenzanalyse zu MHC I-Molekülen in nicht infizierten JAWSII-Zellen. H2-K<sup>b</sup>- und H2-D<sup>b</sup>-Moleküle sind intrazellulär unterschiedlich verteilt.

Wie in Abbildung 30 deutlich wird, sind die beiden MHC I-Moleküle H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> in der Zelle unterschiedlich verteilt. H2-K<sup>b</sup> taucht prädominant in einem Bereich nahe des Zellkerns auf, während H2-D<sup>b</sup>-Moleküle innerhalb der Zellen gleichmäßig verteilt vorliegen.

Um festzustellen, in welchem sekretorischen Membrankompartiment sich die beiden Moleküle befinden, wurden Immunfluoreszenz-Präparate hergestellt, in denen neben MHC I jeweils ein Zellkompartiment über Antikörper gegen entsprechende Markerproteine gefärbt wurde.

Für die Detektion des Endoplasmatischen Retikulums wurde ein monoklonaler anti-KDEL Antikörper eingesetzt, für den Golgi-Apparat ein anti-Giantin Antikörper und für das trans-Golgi-Netzwerk ein anti-TGN46 Antikörper. Die Primärantikörper wurden jeweils mit einem entsprechenden Sekundärantikörper TRITC-markierten. In Abbildung 31 ist das Ergebnis des Kolo-kalisationsexperiments dargestellt.



**Abbildung 31: Lokalisation der beiden MHC I-Moleküle in JAWSII**

JAWSII-Zellen wurden auf Deckglasröhrchen ausgesät und nach 24 Stunden fixiert. Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen H2-K<sup>b</sup> bzw. H2-D<sup>b</sup> inkubiert. Neben MHC I wurde außerdem jeweils ein Kompartiment des sekretorischen Transportweges über Antikörper gegen Kompartiment-spezifische Markerproteine gefärbt. Als ER-Markerprotein wurde KDEL gewählt, für den Golgi-Apparat Giantin und für das trans-Golgi-Netzwerk TGN46. Die MHC I-Moleküle wurden jeweils FITC-markiert (grün), die Kompartimente TRITC-markiert (rot).

Um eine quantitative Aussage über eine mögliche *steady-state*-Lokalisation der MHC I-Moleküle in den jeweiligen Zellkompartimenten treffen zu können, wurde von jeweils mindestens zehn Zellen mithilfe des Kolo-kalisations-Moduls des Programms „AxioVision“ die Überlagerung der roten und grünen Pixel gemessen. Das Diagramm unter

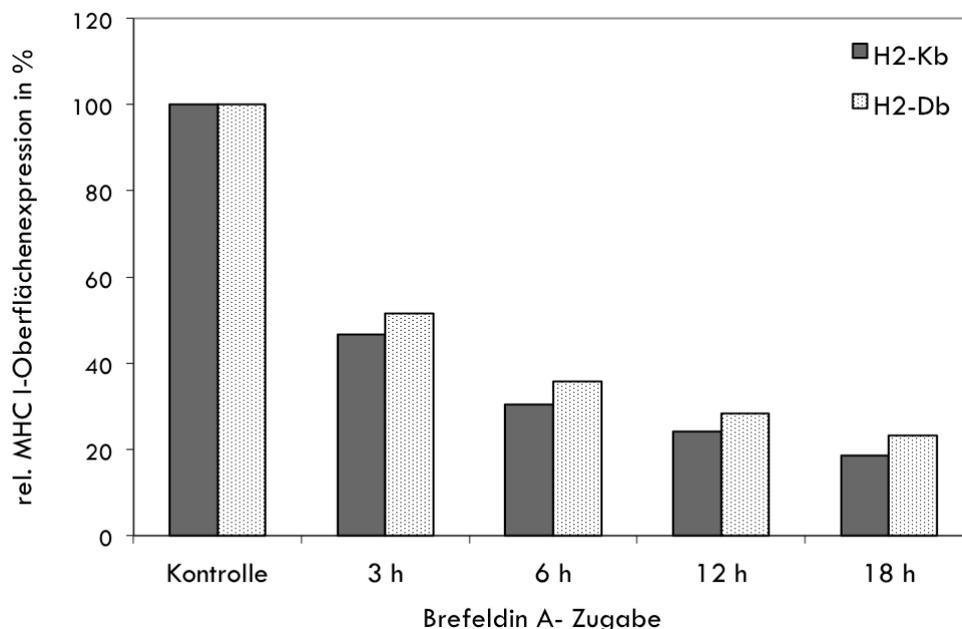
den Immunfluoreszenzaufnahmen in Abbildung 31 gibt Aufschluss über die ermittelten Pearson-Werte (siehe 3.3).

Interessanterweise ist H2-K<sup>b</sup> unter *steady-state*-Bedingungen vorwiegend in post-ER Kompartimenten lokalisiert und nicht im ER. H2-D<sup>b</sup> findet sich hingegen in allen untersuchten Zellstrukturen wieder, wobei die gleichmäßige retikuläre Anfärbung innerhalb der Zellen am deutlichsten mit dem der ER-Färbung übereinstimmt (Abb. 30, Abb. 31). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die beiden MHC I-Moleküle das ER vermutlich unterschiedlich schnell verlassen. Es ist anzunehmen, dass H2-D<sup>b</sup> nach seiner Synthese länger im ER verweilt, während neu synthetisierte H2-K<sup>b</sup>-Moleküle das ER zügig wieder verlassen und in späten post-ER-Kompartimenten wie dem Golgi-Apparat oder dem TGN akkumulieren. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als dass H2-K<sup>b</sup>-Moleküle aufgrund ihrer post-ER-Lokalisierung möglicherweise für den vakuolaren Kreuzpräsentationsweg eine funktionale Rolle spielen, da bei diesem alternativen Präsentationsweg die Beladung der MHC I-Moleküle nicht im ER, sondern in endo-/lysosomalen Kompartimenten stattfindet.

#### 4.2.6.3 MHC I-Oberflächenstabilität

Nachdem gezeigt wurde, dass sich H2-K<sup>b</sup>- und H2-D<sup>b</sup>-Moleküle hinsichtlich ihrer intrazellulären Lokalisierung unterscheiden, wurde in weiteren Experimenten mittels Durchflusszytometrie überprüft, wie sich die beiden MHC I-Moleküle bezüglich der Oberflächenstabilität (Halbwertszeit auf der Zelloberfläche) verhalten. Für diesen Versuch wurde für unterschiedliche Zeiträume Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Hierbei handelt es sich um ein von dem Pilz *Eupenicillium brefeldianum* synthetisiertes Antibiotikum, welches den Proteintransport vom ER zum Golgi blockiert. Durch die Zugabe von BFA wird somit die Zufuhr neu synthetisierter MHC I-Moleküle aus dem ER Richtung Golgi zur Plasmamembran unterbunden (Nuchtern et al., 1989). Die anschließende Messung der Oberflächen-MHC I-Moleküle im Durchflusszytometer gibt Aufschluss darüber, mit welcher Halbwertszeit die MHC I-Moleküle auf der Plasmamembran verweilen. BFA wurde mit einer Konzentration von 10 µg/ml für 3, 6, 12 und 18 Stunden auf die Zellen gegeben. Die Detektion im Durchflusszytometer erfolgte durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter, spezifischer Antikörper. Abbildung 32 zeigt das Ergebnis der Analyse.

3 Stunden nach der BFA-Zugabe ist für H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> im Vergleich zur Kontrolle noch etwa 50 % der Oberflächenexpression zu detektieren und mit zunehmender BFA-Inkubationsdauer nimmt die Menge an MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche stetig ab. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beiden MHC I-Allel-Produkte trotz ihrer unterschiedlichen intrazellulären *steady-state*-Lokalisierung eine vergleichbare Oberflächenstabilität besitzen. Dies deutet darauf hin, dass die H2-K<sup>b</sup>-Präsentation ebenso wie die der H2-D<sup>b</sup>-Moleküle (über die gewählte Zeit von 18 Stunden) auf den kontinuierlichen ER-Golgi-Transport neu synthetisierter MHC I-Moleküle angewiesen ist und nicht auf den direkten Export bereits präexistierender post-ER-Moleküle vom Golgi zur Plasmamembran zurückgeführt werden kann.



**Abbildung 32: MHC I-Oberflächenstabilität**

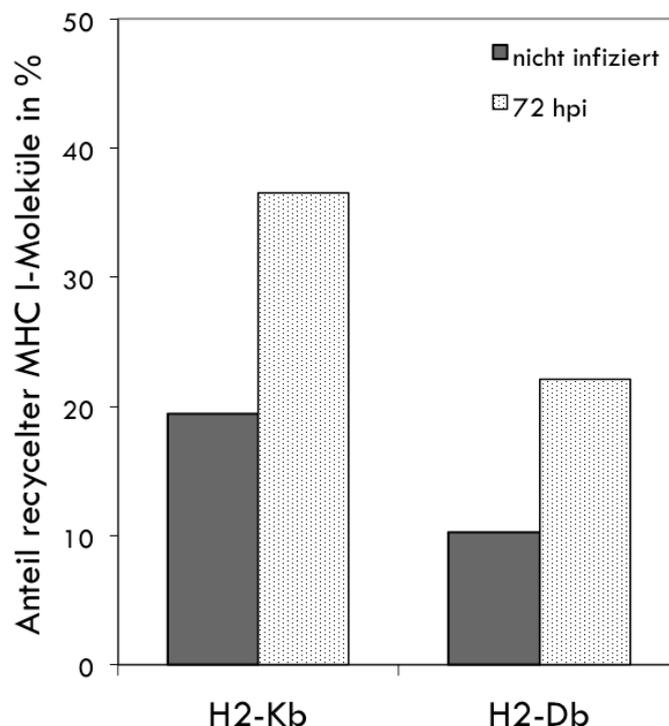
JAWSII wurden für 3, 6, 12 und 18 Stunden mit Brefeldin A (10 µg/ml) kultiviert und anschließend im Durchflusszytometer hinsichtlich der Oberflächenexpression der MHC I-Moleküle H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> untersucht. Durch die Zugabe von BFA lässt sich die Halbwertszeit von MHC auf der Zelloberfläche bestimmen, da die Zufuhr neu synthetisierter MHCs aus dem ER blockiert ist. H2-K<sup>b</sup> wurde durch den monoklonalen Antikörper AF6-88.5 und einen FITC-markierten Sekundärantikörper detektiert; für H2-D<sup>b</sup> wurde der bereits FITC-markierte Antikörper KH95 eingesetzt. Der Wert der unbehandelten Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt.

#### 4.2.6.4 MHC I-Recycling

Die antigenpräsentierenden MHC I-Moleküle gelangen nicht ausschließlich über den sekretorischen Weg aus dem ER über den Golgi auf die Zelloberfläche, sondern können als vormalige Oberflächenmoleküle nach endozytotischer Aufnahme durch die Zelle über den Weg des endosomalen Recyclings wieder auf die Plasmamembran zurücktransportiert

werden (Abdel Motal et al., 1993). Um zu untersuchen, ob und in welchem Maße die MHC I-Moleküle in JAWSII-Zellen über diesen endosomalen Weg recycelt werden, wurde dieser zelluläre Mechanismus durch die Zugabe des lysosomotropen Reagenz Primaquin (Reid and Watts, 1990) geblockt und die Menge an verbleibendem Oberflächen-MHC I in infizierten und nicht infizierten JAWSII durchflusszytometrisch gemessen. Die Zellen wurden zu diesem Zweck mit 10  $\mu$ M Primaquin behandelt, nach zwei Stunden mit *C. psittaci* (MOI 3) infiziert und 72 Stunden nach der Infektion mit spezifischen Antikörpern gegen H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> inkubiert.

Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, konnte für H2-K<sup>b</sup> in nicht infizierten und infizierten Zellen ein Anteil Oberflächen-recycelter Moleküle an der MHC I-Oberflächenpopulation von 19 % bzw. 37 % gemessen werden, für H2-D<sup>b</sup> lagen diese Werte bei lediglich 11 % (nicht infiziert) bzw. 22 % (infiziert). Somit kann festgehalten werden, dass die Menge der recycelten Oberflächen-H2-K<sup>b</sup>-Moleküle um etwa das Doppelte höher zu sein scheint als bei H2-D<sup>b</sup>, und zum anderen, dass der Anteil recycelter MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche nach Chlamydieninfektion zunimmt.



**Abbildung 33: MHC I-Recycling**

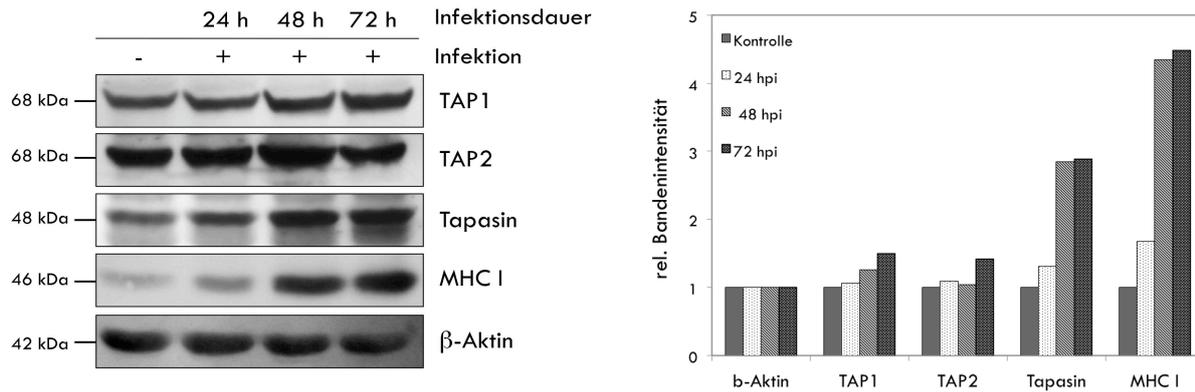
Chlamydien-infizierte (72 hpi) und nicht infizierte JAWSII-Zellen wurden mit Primaquin (10  $\mu$ M) behandelt. Die MHC I-Moleküle H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> auf der Zelloberfläche wurden durch Antikörper fluoreszenzmarkiert und im Durchflusszytometer gemessen. Im Diagramm ist die Differenz aus der Fluoreszenzintensität nach Primaquin-Zugabe und einer unbehandelten Zellpopulation gezeigt, was dem Anteil recycelter MHC I-Moleküle entspricht. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in JAWSII-Zellen alle wichtigen Komponenten der Antigenpräsentationsmaschinerie konstitutiv exprimiert werden, die zudem durch IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  induzierbar sind. JAWSII-Zellen exprimieren zwei MHC I-Moleküle, H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>d</sup>, die intrazellulär in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert sind. Beide MHC I-Moleküle zeigen endosomales Oberflächen-Recycling sowie vergleichbare Halbwertszeiten auf der Zelloberfläche. Dies belegt, dass die Zelllinie JAWSII zusätzlich zu den zellulären Eigenschaften einer funktionalen dendritischen Zelle (Abb. 15-17) alle notwendigen experimentellen Voraussetzungen zur Untersuchung der MHC I-vermittelten Präsentation chlamydialer Antigene besitzt.

#### **4.2.6.5 Komponenten der MHC I-Antigenpräsentation in infizierten DCs und Epithelzellen**

Die spezifische T<sub>H</sub>1-Immunantwort spielt bei der Bekämpfung einer Chlamydieninfektion eine entscheidende Rolle (Knight et al., 1995). Voraussetzung dafür ist die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und damit die Präsentation chlamydialer Antigene auf MHC. Chlamydien besitzen, als intrazelluläre Pathogene, jedoch die Fähigkeit, mit Hilfe von Immunevasionsstrategien der Erkennung durch T-Lymphozyten zu entgehen, indem sie in ihren natürlichen Zielzellen durch die chlamydiale Protease CPAF wichtige Transkriptionsfaktoren wie RFX5 und USF-1 für die MHC I- und MHC II-Expression degradieren (Zhong et al., 2001; Zhong et al., 1999; Zhong et al., 2000). Wie in Punkt 4.2.3.3 bereits beschrieben, wird in DCs (JAWSII) die Translokation von CPAF ins Zytosol unterbunden. Hieraus ergibt sich die Frage, ob die proteolytischen und destruktiven Eigenschaften von CPAF in DCs zur Wirkung kommen und einen entsprechend negativen Einfluss auf die Expression der MHC I-Moleküle nehmen.

Um dies zu untersuchen, wurden JAWSII-Zellen mit *C. psittaci* (MOI 3) für 24, 48 und 72 Stunden infiziert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit spezifischen Antikörpern gegen TAP1, TAP2, Tapasin und MHC I inkubiert.

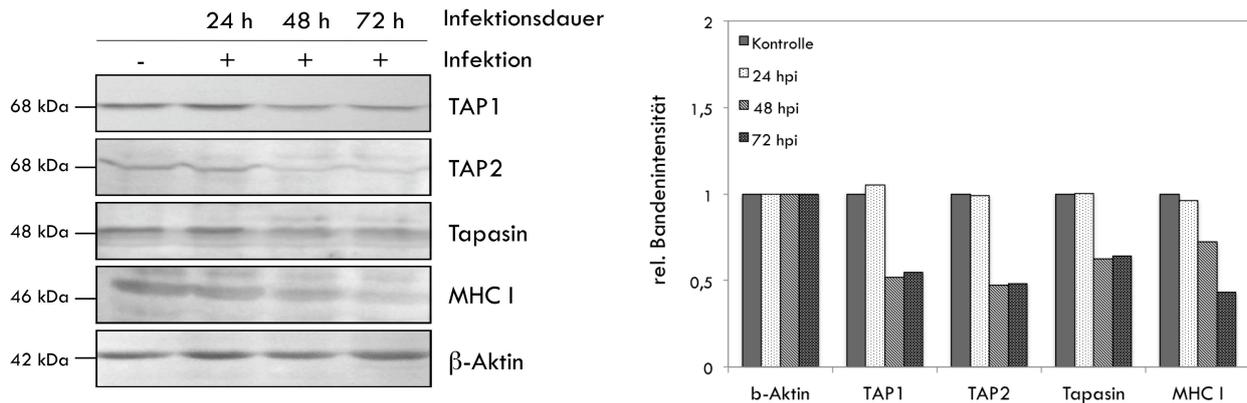


**Abbildung 34: Expression der Komponenten des MHC I-Beladekomplexes nach Infektion in JAWSII**

Lysate nicht infizierter und *C. psittaci*-infizierter (24, 48, 72 hpi) JAWSII-Zellen wurden im Western Blot auf die Expression von TAP1, TAP2, Tapasin und MHC I hin untersucht. Um die gleichmäßige Beladung zu kontrollieren wurde ein anti- $\beta$ -Aktin Antikörper eingesetzt. Für TAP1 wurde das Antiserum D90, für TAP2 das Antiserum 116/5, für Tapasin das Antiserum Rsin.E und für MHC I der monoklonale Antikörper  $\beta$ B10.7 eingesetzt. Die Bandenintensitäten wurden densitometrisch gemessen und die Werte graphisch im Balkendiagramm rechts dargestellt.

Wie in Abbildung 34 zu sehen ist, kommt es nach Infektion in JAWSII zu einer starken Induktion von Tapasin und MHC I. TAP1 und TAP2 werden hingegen kaum induziert. Da unter den gewählten Bedingungen in diesem Zellkulturmodell kein IFN- $\gamma$  vorhanden ist, lässt sich folgern, dass die hier gezeigte vermehrte Expression von MHC I in JAWSII nach Infektion mit Chlamydien IFN- $\gamma$ -unabhängig auftritt. Möglicherweise ist aber das von den JAWSII selbst sezernierte TNF- $\alpha$  (Abb. 17, Abb. 29) an der MHC I-Induktion beteiligt, da es sowohl para- als auch autokrin auf die Expression von MHC I und seiner akzessorischen Komponenten wirkt (Blanco et al., 2008; Brunner et al., 2000). Die hierzu durchgeführten Untersuchungen werden direkt nachfolgend in Abschnitt 4.2.6.6 beschrieben.

Zur Untersuchung des Einflusses der Chlamydieninfektion auf die Regulierung der Komponenten des MHC I-Beladekomplexes in Epithelzellen, wurde der oben beschriebene Versuchsansatz zur Expression von TAP, Tapasin und MHC I für die in dieser Arbeit verwendete Epithelzelllinie MN-R wiederholt. Das entsprechende Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 35 dargestellt.



**Abbildung 35: Expression der Komponenten des MHC I-Beladekomplexes nach Infektion in MN-R**

Lysate nicht infizierter und *C. psittaci*-infizierter (24, 48, 72 hpi) MN-R-Zellen wurden im Western Blot auf die Expression von TAP1, TAP2, Tapasin und MHC I hin untersucht. Um die gleichmäßige Beladung zu kontrollieren wurde ein anti- $\beta$ -Aktin Antikörper eingesetzt. Für TAP1 wurde das Antiserum D90, für TAP2 das Antiserum 116/5, für Tapasin das Antiserum Rsin.E und für MHC I der monoklonale Antikörper 3B10.7 eingesetzt. Die Bandenintensitäten wurden densitometrisch gemessen und die Werte graphisch im Balkendiagramm rechts dargestellt.

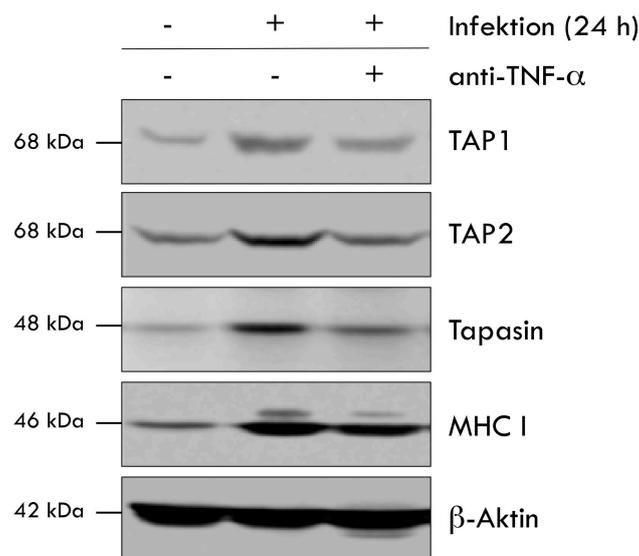
Im Gegensatz zu infizierten DCs wird MHC I in Epithelzellen (MN-R) nach Infektion mit Chlamydien reprimiert (Abb. 35). Auch die Expression des Chaperons Tapasin sowie von TAP1 und TAP2 sind 48 Stunden nach Infektion deutlich herunterreguliert. Im Hinblick auf die zeitliche Expression und Lokalisation des Virulenzfaktors CPAF in MN-R (siehe 4.2.3.3), deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass *C. psittaci* tatsächlich in der Lage ist, in infizierten MN-R-Zellen die Expression der MHC I-Präsentationsmaschinerie zu unterbinden und so negativen Einfluss auf die MHC I-vermittelte Präsentation chlamydialer Antigene zu nehmen.

#### 4.2.6.6 Die Rolle von TNF- $\alpha$ bei der Antigenpräsentation von DCs

Dendritische Zellen sezernieren nach der Infektion mit Chlamydien u.a. das Zytokin TNF- $\alpha$  (siehe 4.2.2.3). Interessanterweise ist TNF- $\alpha$  über einen para- und autokrinen Mechanismus selbst an der Reifung dendritischer Zellen beteiligt (Blanco et al., 2008; Brunner et al., 2000). Bereits die Arbeiten von Njau 2009 zu Infektionen dendritischer Zellen mit *C. pneumoniae* konnten zeigen, dass die Neutralisation von TNF- $\alpha$  zum einen zur Beeinträchtigung der DC-Reifung führt und zum anderen die Vermehrung der Chlamydien begünstigt (Njau et al., 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, inwiefern TNF- $\alpha$  möglicherweise die Komponenten der Antigenpräsentation in Chlamydien-infizierten DCs beeinflussen kann.

Für dieses Experiment wurden JAWSII-Zellen mit *C. psittaci* infiziert und 30 min zuvor mit anti-TNF- $\alpha$  Antikörpern (1 ng/ml Medium) behandelt, wodurch gewährleistet wird, dass sezerniertes TNF- $\alpha$  unmittelbar neutralisiert wird. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und zusammen mit den Lysaten nicht TNF- $\alpha$ -neutralisierter Zellen sowie nicht infizierter Kontrollzellen im Immunblot auf die Expression von TAP1, TAP2, Tapasin und MHC I hin untersucht.



**Abbildung 36: Auswirkungen der Neutralisation von TNF- $\alpha$  auf den MHC I-Beladekomplex**

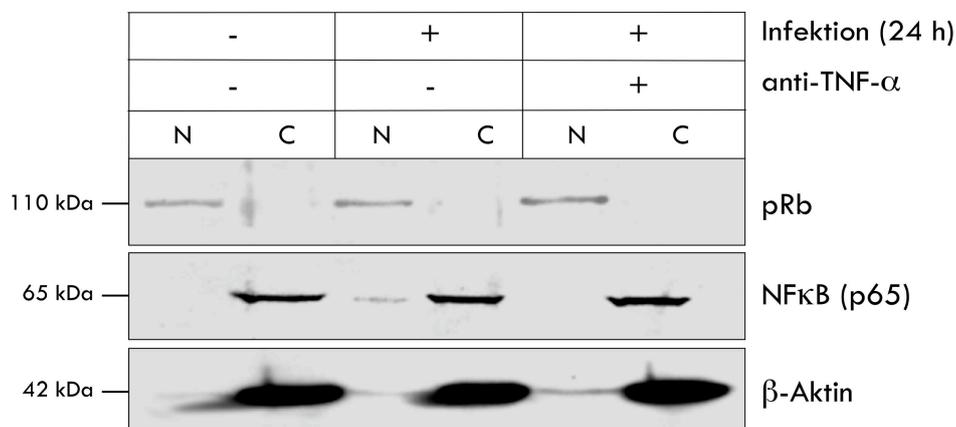
JAWSII-Zellen wurden für 24 Stunden mit *C. psittaci* (MOI 3) infiziert. In einem Versuchsansatz wurden die Zellen zusätzlich mit anti-TNF- $\alpha$  Antikörpern behandelt. Nach der Lyse der Zellen wurde die Expression von TAP1, TAP2, Tapasin und MHC I mittels Western Blot in den verschiedenen Proben untersucht. Als Kontrolle diente das Lysat nicht infizierter und un behandelter JAWSII. Die aufgetragene Proteinkonzentration wurde anhand der Expression von  $\beta$ -Aktin überprüft. Der eingesetzte TNF- $\alpha$  Neutralisierungsantikörper (05-168) der Firma Upstate wurde mit einer Konzentration von 1 ng/ml Medium zu den Zellen gegeben.

Abbildung 36 zeigt das Ergebnis der TNF- $\alpha$ -Neutralisierung nach zeitgleicher Chlamydieninfektion. Es ist sehr deutlich zu sehen, dass die Chlamydien-bedingte Induktion aller untersuchten Proteine durch den Einsatz des neutralisierenden anti-TNF- $\alpha$  Antikörpers inhibiert wird. Die über densitometrische Analysen ermittelten Inhibitionseffekte des Neutralisierungsantikörpers für die Induktion von TAP1, TAP2, Tapasin und MHC I liegen zwischen 60 und 80 %. Hieraus kann geschlossen werden, dass das von den infizierten JAWSII sezernierte TNF- $\alpha$  die MHC I-Maschinerie in DCs stimuliert.

Ein für die Regulation immunologischer Prozesse entscheidender Transkriptionsfaktor ist NF $\kappa$ B. Zytoplasmisch lokalisiertes NF $\kappa$ B ist durch die Assoziation mit Inhibitoren (wie I $\kappa$ B) inaktiv. Erst nach der Aktivierung des NF $\kappa$ B-*pathways* durch den Abbau von I $\kappa$ B kommt es

zur Translokation der Untereinheiten wie z.B. p65/RelA in den Nukleus, wo diese als Transkriptionsfaktoren die Expression einer Vielzahl immunologisch wichtiger Gene regulieren. Es ist bekannt, dass TNF- $\alpha$  zur Aktivierung von NF $\kappa$ B führt (Fitzgerald et al., 2007), was wiederum bei der konstitutiven wie auch der induzierten Expression von MHC I eine wichtige Rolle spielt (Debierre-Grockiego et al., 2009; van den Elsen and Gobin, 1999). Somit stellt sich die Frage, ob der in den vorangegangenen Experimenten beschriebene TNF- $\alpha$ -Effekt bei infizierten DCs mit der Wirkung des Zytokins auf die funktionale Kernlokalisierung von NF $\kappa$ B zusammenhängt.

Um dies zu untersuchen, wurden JAWSII-Zellen, wie im vorangegangenen Versuch beschrieben, infiziert und mit anti-TNF- $\alpha$  Antikörpern behandelt. Anschließend wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt und die Lokalisation von NF $\kappa$ B im Western Blot mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Positivkontrolle für die nukleäre Fraktion wurde der Immunblot gegen pRb angefärbt. Bei pRb handelt es sich um das Retinoblastomprotein, ein Tumorsuppressor-Protein, dessen Funktion in der Regulation des Zellzyklus besteht und das somit zellkernassoziiert vorliegt (Ameltem et al., 1996). Als Positivkontrolle für die zytosolische Fraktion diente  $\beta$ -Aktin.



**Abbildung 37: Effekt von TNF- $\alpha$  auf die zelluläre Lokalisation von NF $\kappa$ B**

JAWSII-Zellen wurden für 24 Stunden mit *C. psittaci* infiziert (MOI 3) und mit anti-TNF- $\alpha$  Antikörpern behandelt. Anschließend erfolgte eine Fraktionierung in nukleäre (N) und zytosolische (C) Fraktion sowie die Auftrennung der Proteine im SDS-Gel. Mittels spezifischer Antikörper wurde der Western Blot für NF $\kappa$ B und pRb (nukleäres Protein) angefärbt.  $\beta$ -Aktin stellt eine Kontrolle für die zytosolische Fraktion dar.

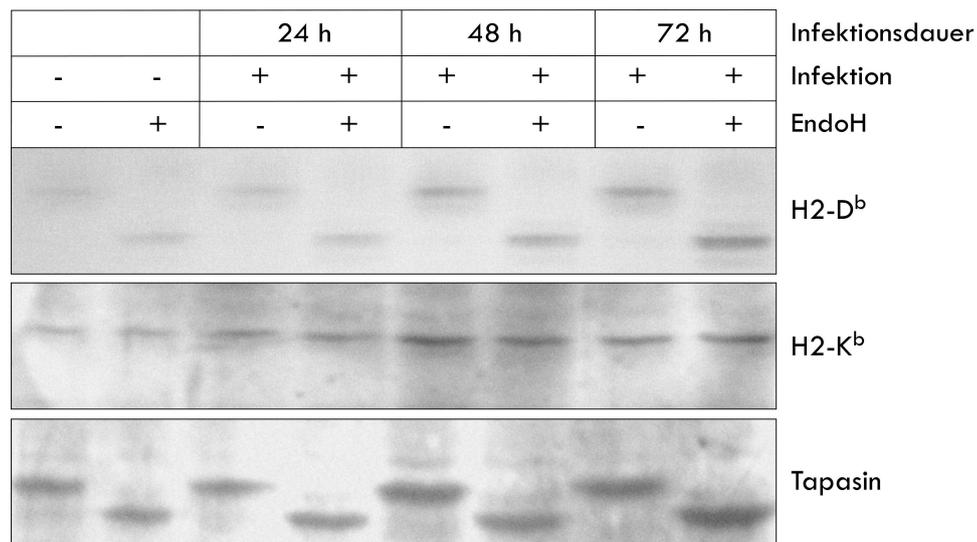
Der Immunblot in Abbildung 37 zeigt, dass NF $\kappa$ B (p65) nach Infektion von JAWSII mit Chlamydien zu einem gewissen Anteil in den Kern wandert. Durch den Einsatz neutralisierender anti-TNF- $\alpha$  Antikörper ist die Bande für NF $\kappa$ B nicht mehr in dem Blot zu

---

detektieren. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass TNF- $\alpha$  den NF $\kappa$ B-*pathway* in Chlamydien-infizierten DCs aktiviert und die Translokation von NF $\kappa$ B (p65) in den Zellkern bewirkt.

#### 4.2.6.7 Lokalisation von MHC I in JAWSII nach Infektion mit Chlamydien

In Abbildung 34 konnte gezeigt werden, dass MHC I neben Tapasin in JAWSII nach Infektion mit Chlamydien stark induziert wird. Im vorangegangenen Kapitel wurde bereits darauf hingewiesen, dass JAWSII-Zellen die zwei MHC I-Allel-Produkte H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> exprimieren, wobei H2-K<sup>b</sup> im nicht infizierten Zustand in post-ER Kompartimenten lokalisiert ist, während sich H2-D<sup>b</sup>-Moleküle vor allem im ER aufhalten. Im Folgenden wurde nun die zelluläre Lokalisation der beiden MHC I-Allel-Produkte in infizierten und nicht infizierten JAWSII-Zellen unter Verwendung von EndoH-Analysen miteinander verglichen. Zu diesem Zweck wurden Zelllysate unterschiedlich lange infizierter JAWSII (24, 48, 72 hpi) mittels EndoH deglykosyliert (siehe 3.7.3) und anschließend mit entsprechenden Kontrollen nicht EndoH-behandelter Zellen im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Eine EndoH-Sensitivität weist auf eine ER-Lokalisierung des untersuchten Proteins hin und ist anhand des reduzierten, apparenten Molekulargewichts im Vergleich zur Kontrolle im Western Blot zu detektieren. Um die Lokalisation von H2-D<sup>b</sup> zu untersuchen, wurde das polyklonale Antiserum T18 verwendet und für H2-K<sup>b</sup> ein Antikörper der Firma abcam (ab93364). Das ER-ständige Protein Tapasin diente in diesem Fall als Kontrolle dafür, ob der EndoH-Verdau erfolgreich verlaufen ist.



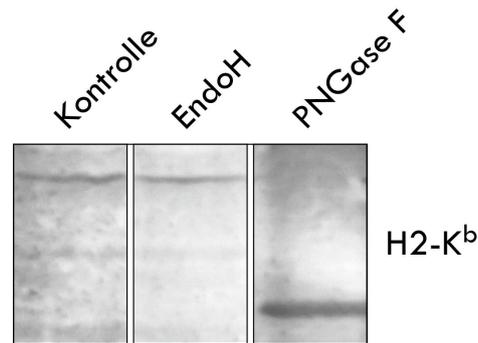
**Abbildung 38: Lokalisation der MHC I-Moleküle nach Infektion in JAWSII**

Lysate nicht infizierter und *C. psittaci*-infizierter JAWSII (24, 48, 72 hpi) wurden mit dem Enzym EndoglykosidaseH deglykosyliert und mittels SDS-PAGE zusammen mit entsprechenden Kontrollen elektrophoretisch aufgetrennt. EndoH-sensitive Proteine sind ER-ständig und weisen ein im Vergleich zur Kontrolle geringeres Molekulargewicht auf. Folgende Antikörper wurden für den Immunblot eingesetzt: T18 für H2-D<sup>b</sup>, ein polyklonaler Antikörper von abcam ab93364 für H2-K<sup>b</sup> und Rsin.E für Tapasin. Tapasin stellt als ER-ständiges Protein eine Positivkontrolle dar.

Abbildung 38 zeigt das Ergebnis des durchgeführten EndoH-Experiments. Im H2-D<sup>b</sup>-Blot ist jeweils eine Reduktion des scheinbaren Molekulargewichts bei den Proben nach EndoH-Zugabe zu erkennen. Dieser Effekt zeigt sich auch in der Tapasin-Positivkontrolle. Bei H2-K<sup>b</sup> liegen hingegen alle Banden auf einer Höhe. Damit lässt sich festhalten, dass auch nach der Chlamydieninfektion H2-D<sup>b</sup> intrazellulär vorwiegend im ER und H2-K<sup>b</sup> hauptsächlich post-ER lokalisiert ist. Es findet sich für beide Allel-Produkte keine Verschiebung zwischen den ER- und post-ER-lokalisierten Formen. Somit hat die Chlamydieninfektion keinen Einfluss auf den ER-Golgi-Transport der MHC I-Moleküle. Wie bereits in Abbildung 34 gezeigt, ist auch in diesem Experiment sowohl für MHC I (H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup>) als auch für Tapasin eine Chlamydien-bedingte Induktion der Expression zu beobachten.

Um zu zeigen, dass H2-K<sup>b</sup> prinzipiell deglykosyliert werden kann, wurde neben dem EndoH-Verdau zum Vergleich ein Verdau mit dem Enzym PNGase F durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Enzym, das in der Lage ist, Glykoproteine unabhängig vom Modifizierungsgrad der Glykane vollständig zu deglykosylieren.

Für diesen Versuch wurden Lysate nicht infizierter JAWSII zum einen mit EndoH und zum anderen mit PNGase F verdaut. Anschließend wurde die Deglykosylierung im Western Blot überprüft. Zur Kontrolle wurden auch unbehandelte Lysate mit analysiert. H2-K<sup>b</sup> wurde mithilfe des für Western Blots geeigneten Antikörpers ab93364 detektiert.



**Abbildung 39: Deglykosylierung mit PNGase F**

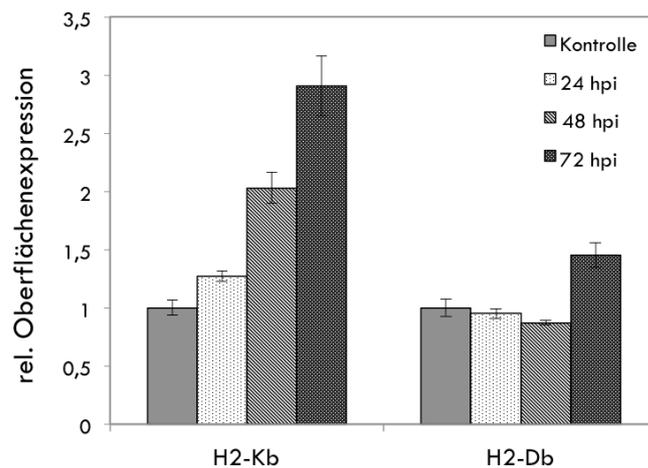
Lysate nicht infizierter Zellen wurden mit EndoH und PNGase F inkubiert. Anschließend wurde die Deglykosylierung von H2-K<sup>b</sup> im Western Blot überprüft. Eingesetzt wurde der anti-H2-K<sup>b</sup> Antikörper von abcam ab93364.

Das Ergebnis des Experiments in Abbildung 39 zeigt sehr deutlich, dass H2-K<sup>b</sup> in nicht infizierten JAWSII nach der Zugabe des Enzyms PNGase F deglykosyliert. Somit konnte die EndoH-Resistenz von H2-K<sup>b</sup> bestätigt werden.

#### 4.2.6.8 MHC I-Oberflächenpräsentation nach Infektion mit Chlamydien

Nachdem gezeigt wurde, dass MHC I in JAWSII nach Chlamydieninfektion induziert wird, wurde untersucht, ob es auch zu einer erhöhten Oberflächenexpression der beiden MHC I-Allel-Produkte, H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup>, in JAWSII kommt.

Hierfür wurden die Zellen nach Infektion mit Chlamydien (24, 48, 72 hpi) zusammen mit nicht infizierten Zellen zur Untersuchung der MHC I-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie analysiert. Von jedem Zeitwert wurde jeweils eine Probe mit einem Antikörper gegen H2-K<sup>b</sup> (AF6-88.5) und eine Probe mit einem Antikörper gegen H2-D<sup>b</sup> (KH95) inkubiert. Die Detektion von MHC I-Oberflächenmolekülen erfolgte nach Markierung der Primärantikörper durch einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper im Durchflusszytometer.



**Abbildung 40: MHC I-Oberflächenexpression in JAWSII nach Infektion mit Chlamydien**

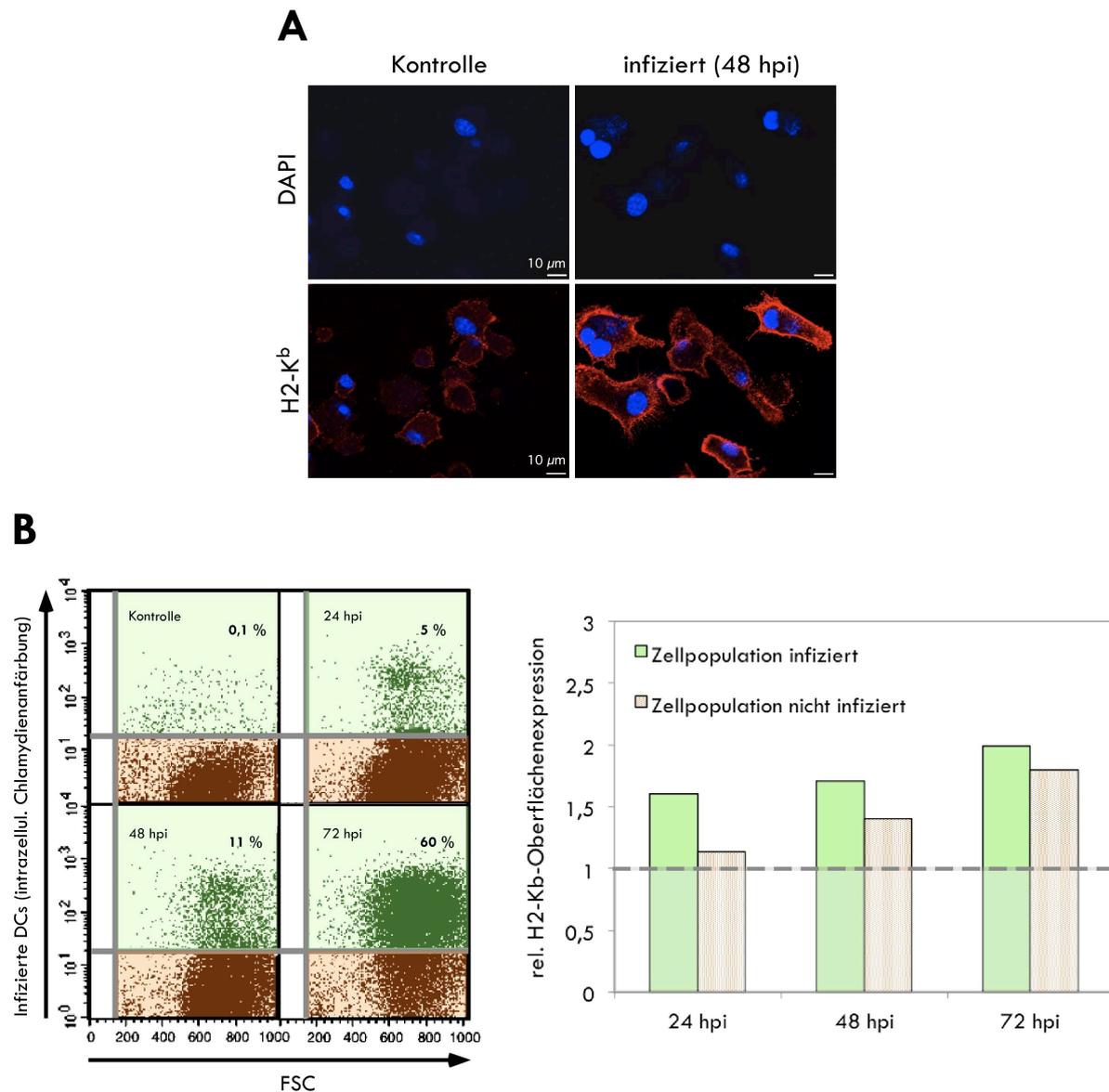
JAWSII-Zellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden mit *C. psittaci* (MOI 3) infiziert, abtrypsinisiert und mit spezifischen Antikörpern gegen H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> inkubiert, um MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche zu markieren. Durch den Einsatz fluoreszenzgekoppelter Sekundärantikörper konnte anschließend die Fluoreszenzintensität der Zellen im Durchflusszytometer gemessen werden. Die gemessene Fluoreszenzintensität nicht infizierter Zellen wurde gleich 1 gesetzt.

Wie das Diagramm in Abbildung 40 zeigt, kommt es während der Infektion mit *C. psittaci* in JAWSII zu einer vermehrten Expression von H2-K<sup>b</sup>-Molekülen auf der Zelloberfläche. 72 Stunden nach der Infektion steigt die Fluoreszenzintensität um das Dreifache an. Für H2-D<sup>b</sup> ist hingegen nur ein leichter Anstieg (um das 1,5-fache) der Oberflächenexpression zu detektieren.

Immunzellen wie dendritische Zellen und T-Zellen kommunizieren im Organismus unter anderem über die sogenannten *bystander*-Effekte (zu Deutsch: Beistehereffekte) miteinander. Bereits stimulierte und gereifte Immunzellen sind somit in der Lage, auf nicht infizierte, naive oder weniger differenzierte Zellen zu wirken und so Einfluss auf deren Immunstatus zu nehmen. Bei einer *in vitro*-Infektion von Zellkulturen mit niedrigen MOIs befinden sich in der Zellpopulation grundsätzlich auch Zellen, die nicht infiziert sind. Um zu untersuchen, ob lediglich die tatsächlich infizierten JAWSII-Zellen in der untersuchten Probe eine vermehrte Oberflächenexpression von H2-K<sup>b</sup> aufweisen, oder ob es womöglich einen Zytokin-vermittelten *bystander*-Effekt gibt, der dazu führt, dass auch nicht infizierte Zellen MHC I auf der Zelloberfläche induzieren, wurde eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen auf Deckglasröhrchen ausgesät, für 48 Stunden infiziert und vor der Antikörperinkubation mit anti-H2-K<sup>b</sup> Antikörpern nicht permeabilisiert.

Darüber hinaus erfolgte eine durchflusszytometrische Messung infizierter Zellen, die zuvor durch den Einsatz entsprechender Antikörper sowohl gegen Oberflächen-MHC I als auch gegen intrazelluläre Chlamydien gefärbt wurden.

Zu diesem Zweck wurden zunächst H2-K<sup>b</sup>-Moleküle auf der Zelloberfläche durch einen PE-gekoppelten spezifischen Antikörper detektiert. Im Anschluss daran erfolgte die Permeabilisierung, um die intrazellulär lokalisierten Chlamydien markieren zu können. Hierfür wurde der FITC-gekoppelte anti-Chlamydien-LPS Antikörper des IMAGEN Kits verwendet. Durch diese Vorgehensweise konnte nach der Messung im Durchflusszytometer die H2-K<sup>b</sup>-Oberflächenexpression von infizierten und nicht infizierten Zellen in der Population getrennt voneinander beurteilt werden. Die PE-Fluoreszenzintensität von nicht infizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt und alle weiteren Proben im Verhältnis dazu berechnet. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 41 dargestellt.



**Abbildung 41: H2-K<sup>b</sup>-Oberflächenexpression von JAWSII nach Chlamydieninfektion**

A) Nicht infizierte und mit *C. psittaci* infizierte (48 hpi, MOI 3) JAWSII-Zellen wurden für die Immunfluoreszenzanalyse nicht permeabilisiert und mit Antikörpern gegen H2-K<sup>b</sup>-Moleküle inkubiert. B) JAWSII-Zellen wurden mit *C. psittaci* infiziert (24, 48, 72 hpi; MOI 3). H2-K<sup>b</sup>-Moleküle auf der Zelloberfläche wurden durch Antikörper PE-markiert und intrazellulär lokalisierte Chlamydien wurden FITC-markiert.

Die Immunfluoreszenzanalyse (Abb. 41A) zeigt, dass die Menge an Oberflächen-MHC I in der gesamten Zellpopulation nach der Infektion mit Chlamydien deutlich zunimmt. Die Messung im Durchflusszytometer (Abb. 41B) gibt Aufschluss darüber, dass vor allem auf der Zelloberfläche von infizierten Zellen eine induzierte Expression von H2-K<sup>b</sup> vorliegt. Aber auch auf der Zelloberfläche nicht infizierter Zellen steigt im Verlauf der Infektion mit zeitlicher Verzögerung die Menge an Oberflächen-H2-K<sup>b</sup> an. Erst nach 72 Stunden erreichen infizierte und nicht infizierte JAWSII-Zellen einen vergleichbaren MHC I-Oberflächen-Level.

Dies lässt vermuten, dass von Chlamydien-infizierten Zellen ein entsprechendes Induktionssignal ausgeht, das auch in den benachbarten, nicht infizierten Zellen eine Hochregulation der MHC I-Oberflächenexpression bewirkt. Wie bereits in Abschnitt 4.2.6.6 erwähnt, könnte hierfür das von infizierten JAWSII sezernierte TNF- $\alpha$  verantwortlich sein, dass sowohl para- als auch autokrin auf die Expression der MHC I-Maschinerie wirken kann.

#### 4.2.6.9 Kolokalisation von MHC I mit Kompartimenten der vakuolaren

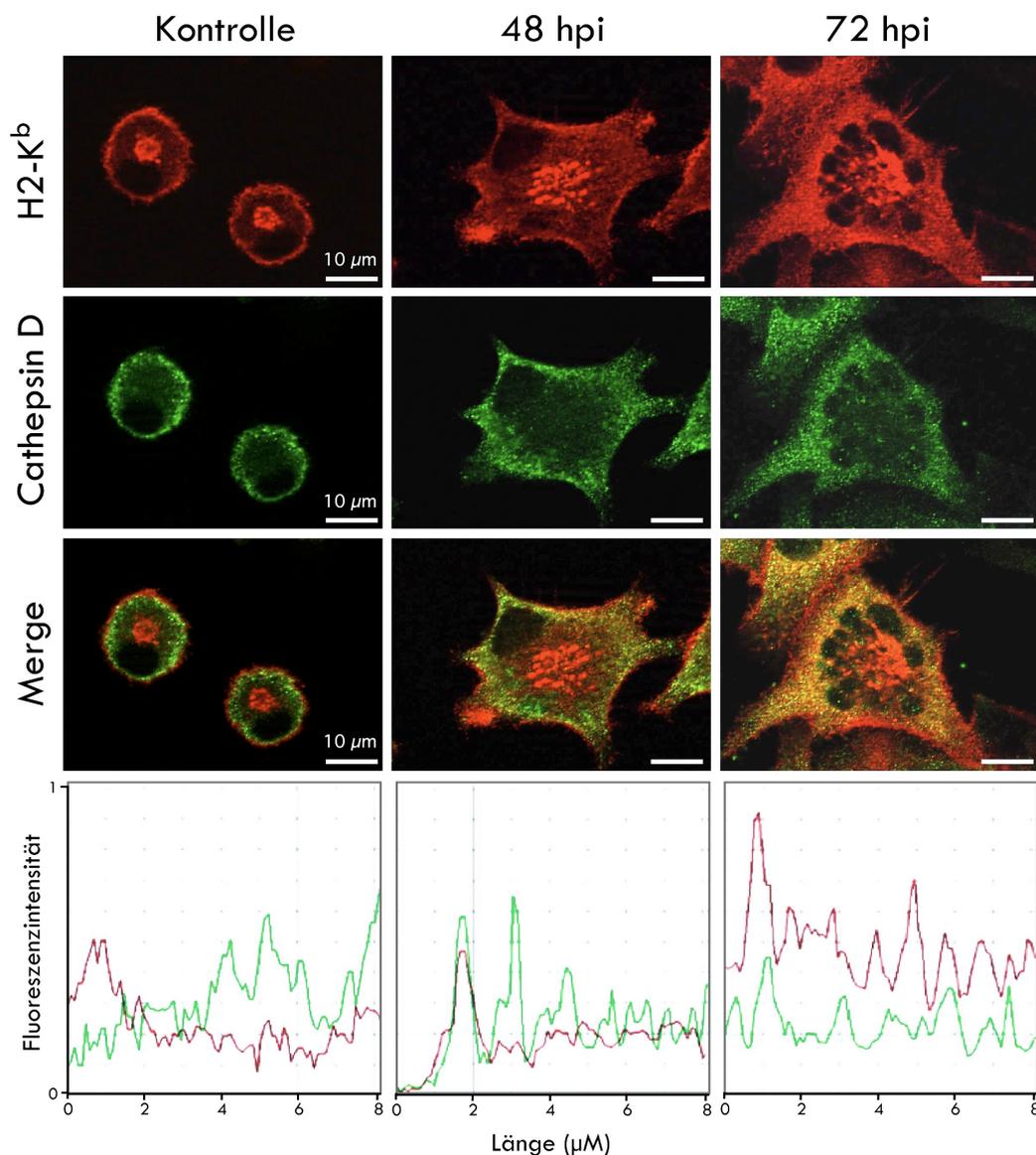
##### Kreuzpräsentation

Die Ergebnisse des Antigenpräsentations-Assays (siehe 4.2.1.2) machen deutlich, dass chlamydiale Antigene über MHC I auf die Zelloberfläche infizierter JAWSII gelangen und dort nach entsprechender Präsentation CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur IFN- $\gamma$ -Sekretion anregen. Die bisherigen Experimente zeigen zudem, dass die MHC I-Oberflächenexpression, vor allem von H2-K<sup>b</sup> induziert wird. Des Weiteren belegen die hier durchgeführten Untersuchungen, dass sich die chlamydialen Einschlüsse in JAWSII teilweise auflösen und intrazellulär freiwerdende Chlamydien in endo-/lysosomale Kompartimente gelangen, die Cathepsin D enthalten. Im Folgenden wurde nun anhand von Kolokalisationsexperimenten untersucht, ob in Chlamydien-infizierten DCs MHC I-Moleküle zur Antigenbeladung in diese Cathepsin D-positiven Kompartimente überführt werden.

JAWSII-Zellen wurden hierfür auf Deckglasröhrchen ausgesät und für 48 und 72 Stunden mit *C. psittaci* infiziert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen H2-K<sup>b</sup> (AF6-88.5) und Cathepsin D (G-19) inkubiert und diese durch entsprechende Sekundärantikörper fluoreszenzmarkiert. Die Auswertung der Präparate erfolgte mithilfe des Fluoreszenzmikroskops sowie des Kolokalisations-Moduls des Programms „AxioVision“. Während in der Kontrolle mit nicht infizierten JAWSII-Zellen keine nachweisbare Kolokalisation zwischen MHC I und Cathepsin D zu beobachten ist, zeigt sich 48 und insbesondere 72 Stunden nach der Infektion mit Chlamydien eine partielle Kolokalisation von H2-K<sup>b</sup> und Cathepsin D-positiven endosomalen Kompartimenten, wie die Gelb-Orangefärbung bei der Überlagerung von roten und grünen Pixeln in Abbildung 42 verdeutlicht. Zur weiteren Veranschaulichung der Kolokalisation ist im unteren Teil der Abbildung ein Profil durch die Zellen dargestellt, welches die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Pixel wiedergibt. Hieraus geht zum einen hervor, dass die rote

Fluoreszenzintensität (H2-K<sup>b</sup>) 72 Stunden nach Infektion zunimmt und zum anderen, dass sich die Profile für grüne und rote Fluoreszenz in diesem Bild nahezu überlagern.

Mit Blick auf die bisher diskutierten MHC I-Kreuzpräsentationswege exogener Antigene in DCs (Basha et al., 2008), lässt die nach Infektion veränderte intrazelluläre Lokalisierung der zuvor im Golgi und TGN befindlichen MHC I-Moleküle eine Beladung chlamydialer Antigene in endosomalen Kompartimenten infizierter DCs vermuten.

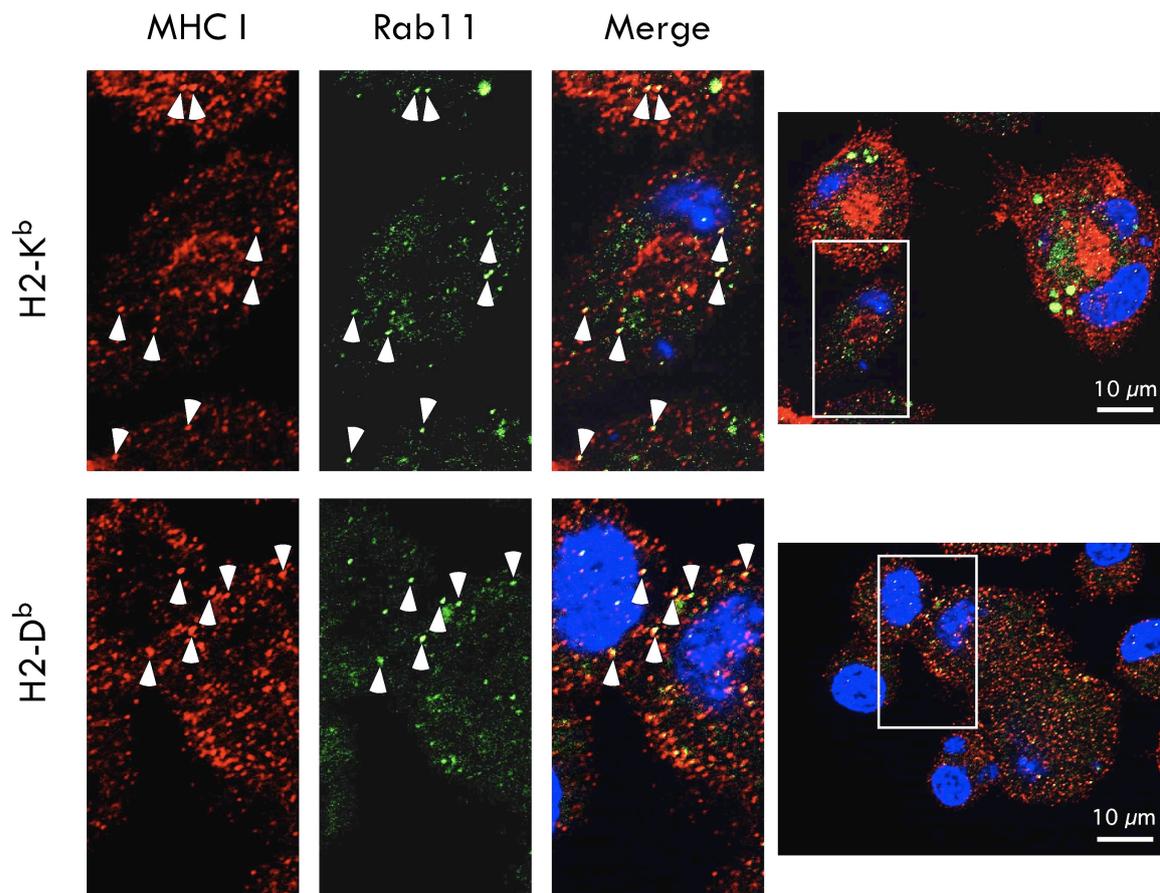


**Abbildung 42: Kolokalisation von H2-K<sup>b</sup>-Molekülen mit Endosomen nach Infektion mit Chlamydien**

JAWSII-Zellen wurden auf Deckglasröhrchen ausgesät und für 48 bzw. 72 Stunden mit *C. psittaci* (MOI 3) infiziert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen Cathepsin D (grün) und H2-K<sup>b</sup> (rot) markiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Zur weiteren Veranschaulichung der Kolokalisation wurde ein Profil der Zellen erstellt, das die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Pixel wiedergibt.

Für MHC I-Moleküle, die sich an Prozessen der endosomalen Kreuzpräsentation beteiligen, wird eine Internalisation von der Zelloberfläche und eine Translokation in endosomale Kompartimente postuliert (Basha et al., 2008). Im Falle der MHC I-Moleküle H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass sie in JAWSII-Zellen zu einem gewissen Anteil (19 bzw. 11 %) endosomal recyceln und sich dieser Anteil nach chlamydialer Infektion nahezu verdoppelt (Abb. 33). Um zu untersuchen, ob MHC I in JAWSII nach der Infektion mit Chlamydien tatsächlich in Recycling-Kompartimenten zu detektieren ist, wurden entsprechende Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Ein geeignetes Markerprotein für die Detektion endosomaler Recycling-Kompartimente ist Rab11. Hierbei handelt es sich um eine GTPase der Rab-Proteinfamilie, deren Mitglieder durch die Regulierung von Endozytose, Exozytose, Vesikeltransport sowie Vesikelfusion eine bedeutende Rolle im intrazellulären Membrantransport spielen. Rab11 befindet sich in Recycling-Endosomen, dem TGN aber auch in sekretorischen Vesikeln und ist entscheidend an der Steuerung des endosomalen Membrantransports beteiligt (Ullrich et al., 1996).

Auf Deckglasröhrchen ausgesäte und *C. psittaci*-infizierte JAWSII (24 hpi, MOI 3) wurden nach der Fixierung mit spezifischen Antikörpern gegen Rab11 und H2-K<sup>b</sup> bzw. H2-D<sup>b</sup> inkubiert. Rab11 wurde mithilfe eines FITC-gekoppelten Sekundärantikörpers markiert, H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> mithilfe eines TRITC-gekoppelten Sekundärantikörpers. Die Auswertung der Präparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.



**Abbildung 43: Kolokalisation von H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> mit Recycling-Kompartimenten nach Chlamydieninfektion**  
 JAWSII-Zellen wurden auf Deckglasröhrchen ausgesät und für 24 Stunden mit *C. psittaci* (MOI 3) infiziert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen Rab11 (grün) und H2-K<sup>b</sup> bzw. H2-D<sup>b</sup> (rot) markiert. Die fertigen Präparate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

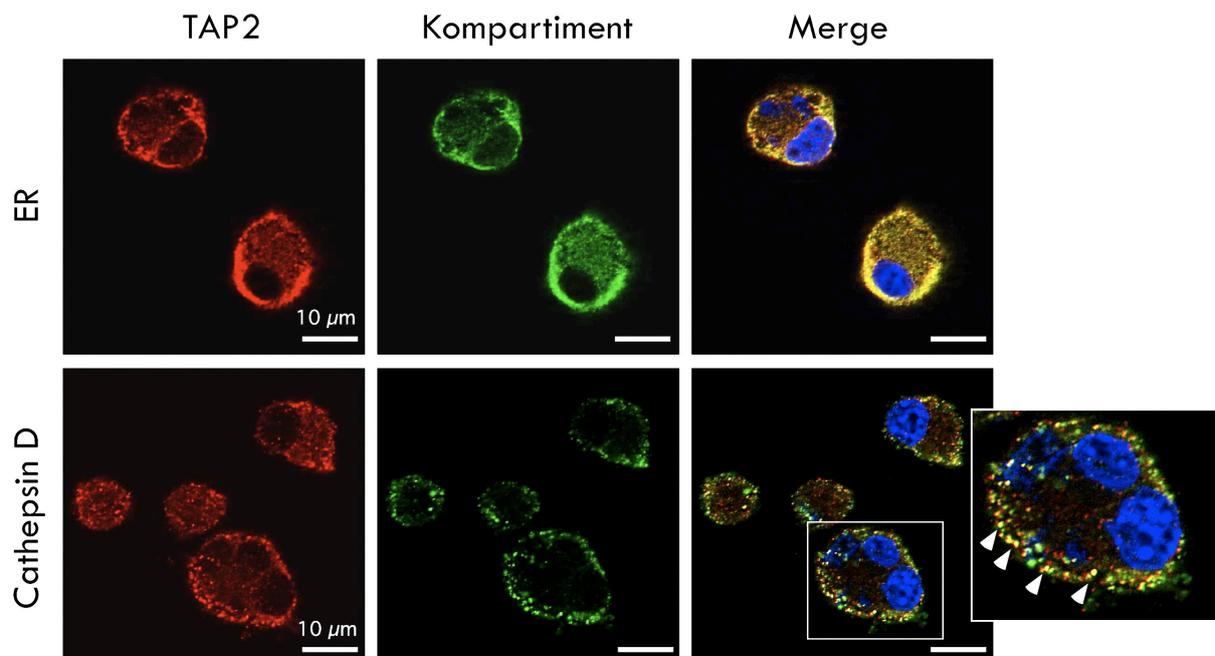
Durch die Auswertung der Immunfluoreszenzaufnahmen in Abbildung 43 konnte eine deutliche Kolokalisation von beiden MHC I-Allel-Produkten mit Recycling-Kompartimenten nach der Infektion mit Chlamydien festgestellt werden. Somit finden sich in Übereinstimmung mit den in Abbildung 33 gezeigten Ergebnissen sowohl für H2-K<sup>b</sup> als auch H2-D<sup>b</sup> die zellulären Voraussetzungen für eine Beteiligung des endosomalen MHC I-Recyclings bei der Präsentation chlamydialer Antigene.

#### 4.2.6.10 Intrazelluläre Lokalisation von TAP in DCs

Der Proteinkomplex TAP ist als Bestandteil des Peptidbeladekomplexes im klassischen Präsentationsweg dafür zuständig, Peptide vom Zytosol in das ER-Lumen zu transportieren, wo diese auf neu synthetisierte MHCs geladen werden (Wright et al., 2004). Für die Kreuzpräsentation von Peptiden auf MHC I werden verschiedene Möglichkeiten, sowohl

TAP-unabhängige als auch TAP-abhängige, diskutiert. Dementsprechend wird für DCs auch die Lokalisation von TAP jenseits des ER in Endosomen beschrieben (Amigorena and Savina, 2010). Unter diesem Gesichtspunkt wurde untersucht, ob TAP in infizierten JAWSII möglicherweise auch in post-ER-Kompartimenten zu finden ist und unter Umständen an der vakuolaren Kreuzpräsentation chlamydialer Antigene beteiligt sein könnte.

Mittels Immunfluoreszenzanalysen wurde eine Kolokalisation von TAP mit dem ER und Cathepsin D-positiven Kompartimenten in JAWSII nach Infektion mit Chlamydien untersucht. Als geeigneter anti-TAP Antikörper wurde der monoklonale Antikörper Mac394 verwendet. Zur Detektion des ER und Cathepsin D-positiver Kompartimente wurde der anti-KDEL Antikörper (KDEL-1) sowie der Antikörper G-19 eingesetzt.



**Abbildung 44: Kolokalisation von TAP und Cathepsin D-positiven Kompartimenten in JAWSII**

Zur Klärung der intrazellulären Lokalisation von TAP in infizierten JAWSII wurden die Zellen (24 hpi) für Immunfluoreszenzanalysen mit spezifischen Antikörpern gegen TAP2 (Mac394) und Cathepsin D (G-19) sowie gegen den ER-Marker KDEL angefärbt.

Abbildung 44 zeigt das Ergebnis der durchgeführten Immunfluoreszenzanalyse. Erwartungsgemäß zeigt TAP eine nahezu vollständige Kolokalisation mit ER-Strukturen (Pearson-Wert: 0,92; siehe 3.3). Interessanterweise findet sich für TAP auch eine partielle Kolokalisation mit Cathepsin D-positiven Kompartimenten (Pearson-Wert: 0,49). Dies lässt annehmen, dass in infizierten DCs TAP nicht nur als Bestandteil des klassischen ER-

abhängigen MHC I-Weges fungiert, sondern möglicherweise auch eine wichtige Funktion außerhalb des ER bei der vakuolaren Kreuzpräsentation chlamydialer Antigene übernimmt.

### **4.2.7 Komponenten der MHC I-Präsentation chlamydialer Antigene**

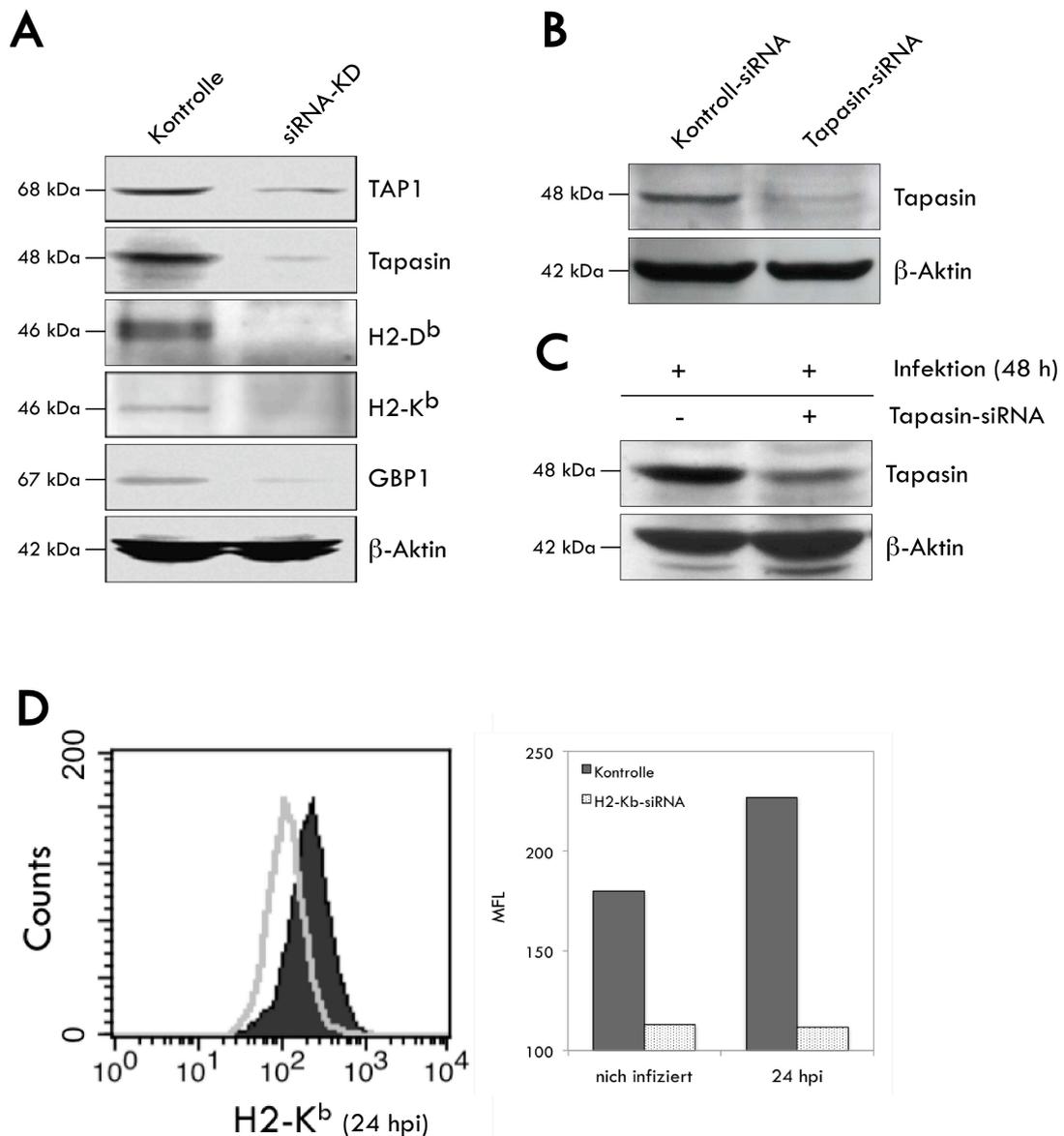
Die vorliegenden Daten dieser Arbeit belegen, dass MHC I-Moleküle in JAWSII nach Chlamydieninfektion in vakuolare Kompartimente gelangen (Abb. 42, Abb. 43) und während der Infektion verstärkt auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Abb. 40). Darüber hinaus werden antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die MHC I-vermittelte Präsentation chlamydialer Antigene zur IFN- $\gamma$ -Sekretion angeregt (Abb. 14). Um konkrete experimentelle Hinweise dafür zu erlangen, welche zellulären Transportwege und Prozessierungsmechanismen für die MHC I-vermittelte Antigenpräsentation von chlamydialen Antigenen eine funktionale Rolle spielen, wurden auf der Grundlage der Experimente in Abbildung 14, siehe Abschnitt 4.2.1.2, Antigenpräsentations-Assays durchgeführt. Bei diesen Assays wurde die Expression bzw. Funktionalität verschiedener Komponenten der MHC I-Beladung in antigenpräsentierenden JAWSII mittels siRNA-Transfektion oder durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren (sowie neutralisierender Antikörper) gezielt blockiert.

Die so unterschiedlich manipulierten DC-Populationen wurden mit *C. psittaci* infiziert und mit Chlamydien-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert. Die Beteiligung der verschiedenen Zellkomponenten an der chlamydialen Antigenpräsentation ließ sich über die Stimulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur IFN- $\gamma$ -Sekretion mittels ELISA direkt nachweisen.

#### **4.2.7.1 Überprüfung der siRNA-vermittelten Repression**

Zunächst wurde der Effekt der siRNA nach deren Transfektion in JAWSII-Zellen überprüft. Hierzu wurden die Zellen in unterschiedlichen Ansätzen mit siRNA für TAP1, Tapasin, H2-K<sup>b</sup>, H2-D<sup>b</sup>, Cathepsin D sowie GBP1 transfiziert und nach 24 Stunden lysiert. Mittels Western Blot-Analyse wurde der *knockdown*-Effekt auf die Expression durch den Vergleich mit nicht transfizierten Kontroll-Zelllysaten überprüft.

Für die Durchführung des Antigenpräsentations-Assays wurden die JAWSII-Zellen vor dem Kokultivierungsansatz infiziert. Da die Infektion mit Chlamydien zur Induktion der Antigenpräsentations-Komponenten, vor allem von Tapasin und MHC I führt (Abb. 34), wurde der reprimierende siRNA-Effekt für diese Proteine auch in infizierten Zellen ermittelt.



#### Abbildung 45: Überprüfung der siRNA-Stabilität

Mittels Western Blot-Analyse und Durchflusszytometrie wurde die Funktionalität der eingesetzten siRNAs überprüft. A) JAWSII-Zellen wurden 24 Stunden nach der siRNA-Transfektion lysiert und im Western Blot auf die Expression der einzelnen Komponenten hin untersucht. Der β-Aktin Blot stellt eine repräsentative Ladekontrolle dar. B) Um auszuschließen, dass die Transfektion an sich einen negativen Einfluss auf die Proteinbiosynthese in JAWSII-Zellen hat, wurde repräsentativ für die Expression von Tapasin die Wirkung einer entsprechenden Kontroll-siRNA (AllStars, Qiagen) überprüft. Der Western Blot zeigt den Effekt der Tapasin-siRNA-Transfektion im Vergleich zu einer Transfektion mit Kontroll-siRNA 24 Stunden nach der Transfektion. C) Die Repression von Tapasin durch die Transfektion mit spezifischer siRNA ist auch nach der Infektion mit Chlamydien nachzuweisen. D) Mittels Durchflusszytometrie konnte die Repression der H2-K<sup>b</sup>-Oberflächenexpression auch in Chlamydien-infizierten Zellen (24 hpi) nachgewiesen werden.

Abbildung 45 zeigt das Ergebnis der Überprüfung der siRNA-vermittelten Reprimierungseffekte. Für alle eingesetzten siRNAs konnte ein quantitativer Reprimierungseffekt zwischen 50 und 90 % nachgewiesen werden (Abb. 45A). Des

Weiteren belegen die Ergebnisse in Abbildung 45C und D, dass trotz infektionsbedingter Induktion von Tapasin und H2-K<sup>b</sup> eine deutliche Herunterregulation der Expression beider Proteine nach siRNA-Transfektion erfolgt. Somit scheinen die ausgewählten siRNA-Konstrukte zur gezielten Reprimierung von TAP1, Tapasin, H2-K<sup>b</sup>, H2-D<sup>b</sup> sowie GBP1 geeignet zu sein, um den nachfolgend beschriebenen Antigenpräsentations-Assay durchführen zu können.

### 4.2.7.2 Antigenpräsentations-Assay

Für den Antigenpräsentations-Assay wurden JAWSII-Zellen zunächst mit siRNA transfiziert, auf 96-wells ausgesät und nach 6 Stunden infiziert (*C. psittaci*, MOI 5). Mittels siRNA wurden die beiden MHC I-Moleküle H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> sowie der Transporter TAP, das Chaperon Tapasin und der zellautonome Resistenzfaktor GBP1 in ihrer Expression unterdrückt (Abb. 45A).

Zur Blockierung verschiedener Faktoren und zellulärer Transportwege in den dendritischen Zellen wurden zusätzlich zur siRNA-Transfektion in weiteren Experimenten enzymatische Inhibitoren verwendet. Um das MHC I-Oberflächen-Recycling der JAWSII-Zellen zu blockieren, wurde Primaquin zu den Zellen gegeben (siehe 4.2.6.4). Die Inhibition des Proteasom-Proteinkomplexes erfolgte durch die Zugabe des selektiven Inhibitors Lactacystin (Fenteany et al., 1995). Da die Infektion von JAWSII-Zellen sowohl zu einer vermehrten Expression neu synthetisierter MHC I-Moleküle als auch zu einer Zunahme der Menge an Oberflächen- sowie recycelter MHC I-Komplexe (Abb. 27, Abb. 28, Abb. 34) führt, wurde untersucht in welchem Maße nach Zellinfektion die induzierte MHC I-Neusynthese zur Präsentation chlamydialer Antigene beiträgt. Hierzu wurde der zelluläre Export der neu synthetisierten MHC I-Moleküle, unter Beibehaltung des endosomalen MHC I-Recyclings, durch den Einsatz des Sekretionsinhibitors H89 unterbunden. H89 inhibiert den ER-Golgi-Transport (Lee and Linstedt, 2000) und blockiert somit den frühen Transportweg neu synthetisierter MHC I-Moleküle über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran.

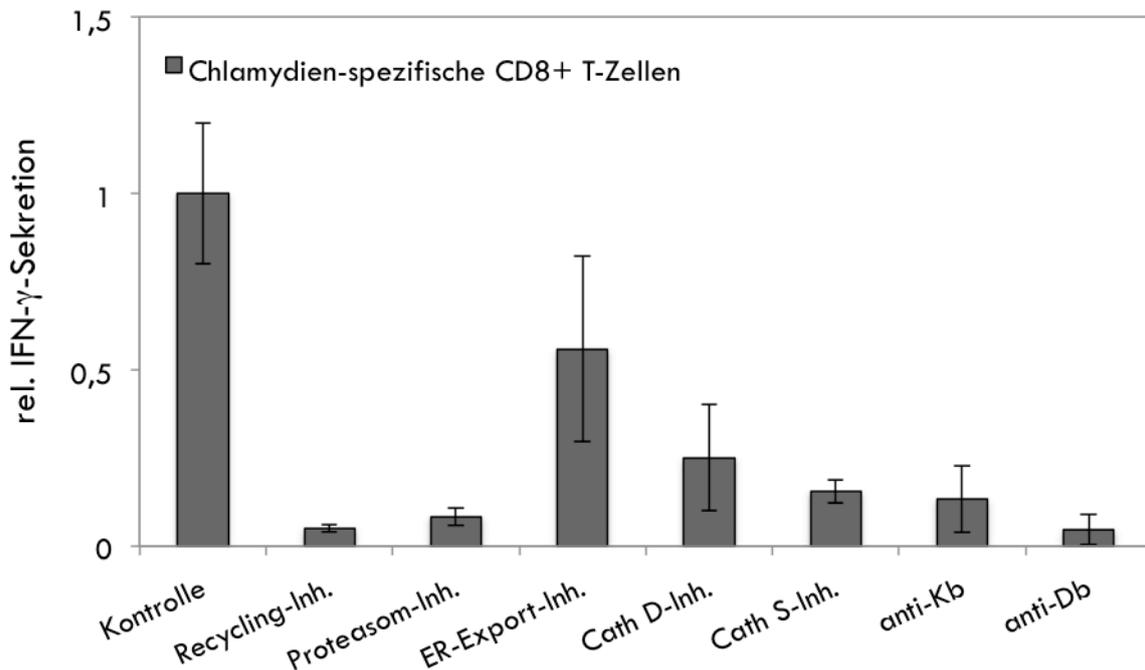
Die Cathepsine, die aufgrund ihrer relativ hohen Halbwertszeiten (Capony et al., 1989; Nissler et al., 1999) nicht siRNA-vermittelt herunterreguliert werden können, wurden ebenfalls durch die Zugabe entsprechender Inhibitoren blockiert. Durch Pepstatin A, einem spezifischen Inhibitor für Aspartyl-Proteasen, wurde Cathepsin D blockiert (Gacko et al.,

2007). Die Cystein-Protease Cathepsin S konnte durch Zugabe des Inhibitors Z-FA-FMK inhibiert werden (Bromme et al., 1989).

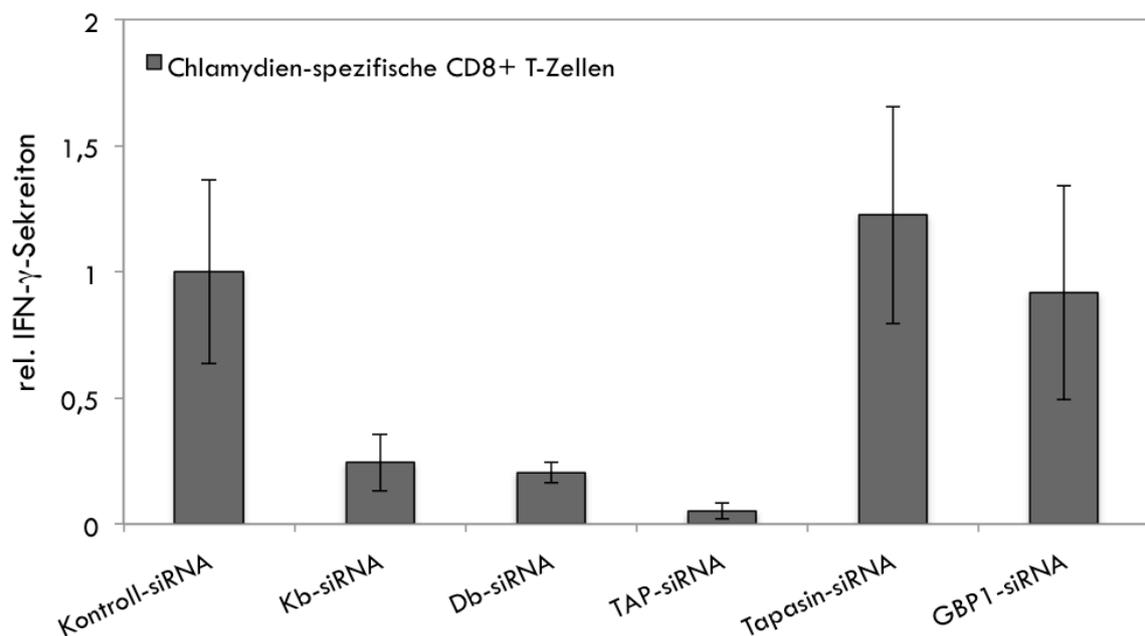
Um die MHC I-Allel-Produkte H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> zu blockieren, kam neben der siRNA-Transfektion eine weitere Methode zum Einsatz. In separaten Versuchsansätzen wurden zu den JAWSII-Zellen neutralisierende Antikörper hinzugefügt, was zur Maskierung der MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche führt (O'Neill, 1988). Die Antikörper für H2-K<sup>b</sup> (AF6-88.5) und H2-D<sup>b</sup> (KH95) wurden hierzu 24 Stunden nach der Chlamydieninfektion mit einer Konzentration von 1 µg/ml zusammen mit den CD8+ T-Zellen in den Kokultivierungsansatz gegeben.

Gemäß den Ergebnissen, die bereits in Abschnitt 4.2.1.2 (Abb. 14) beschrieben wurden, kann offensichtlich aus der Milz EB-immunisierter Mäuse ein höherer Anteil Chlamydien-spezifischer CD8+ T-Zellen isoliert werden. Daher wurden entsprechend generierte CD8+ T-Zellen für die folgenden Experimente eingesetzt. 48 Stunden nach der Zugabe der CD8+ T-Zellen wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und der IFN-γ-Gehalt mittels ELISA gemessen. Die Vitalität und Morphologie der kokultivierten Zellen wurde während des gesamten Versuchsablaufs täglich lichtmikroskopisch überprüft.

**A**



**B**



**Abbildung 46: Ergebnis der Antigenpräsentations-Assays**

JAWSII-Zellen wurden mit *C. psittaci* (MOI 5) infiziert und 24 Stunden nach der Infektion mit Chlamydien-spezifischen CD8+ T-Zellen kokultiviert. Nach 48 Stunden Kokultivierung wurde das sezernierte IFN- $\gamma$  im Überstand mittels ELISA gemessen. In A) wurden die Zellen mit Inhibitoren oder neutralisierenden Antikörpern gegen H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> behandelt. In B) wurde die Expression verschiedener Komponenten mittels siRNA reprimiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens drei Versuchsansätzen.

Abbildung 46 zeigt das Ergebnis des durchgeführten Antigenpräsentations-Assays. In Anwesenheit der neutralisierenden anti-MHC I Antikörper ist in den Kokultivierungsüberständen deutlich weniger IFN- $\gamma$  nachweisbar, als in den entsprechenden Kontrollversuchen ohne Antikörperzugabe. Hieraus lässt sich ableiten, dass beide MHC I-Moleküle der JAWSII-Zellen, sowohl H2-K<sup>b</sup> als auch H2-D<sup>b</sup>, für die Präsentation chlamydialer Antigene von entscheidender funktionaler Bedeutung sind. Zudem zeigen die Versuchsansätze, die in Anwesenheit des lysosomotropen Reagenz Primaquin durchgeführt wurden, dass die Präsentation chlamydialer Antigene in prädominanter Weise vom endosomalen Recycling der Oberflächen-MHC I-Moleküle abhängig ist.

Die H89-vermittelte Blockierung des ER-Golgi-Transports führt zu einer deutlich detektierbaren Verminderung der funktionalen MHC I-Präsentation chlamydialer Antigene, was darauf schließen lässt, dass nach Infektion die induzierten, neu synthetisierten MHC I-Moleküle zur Präsentation chlamydialer Antigene auf die Zelloberfläche transportiert werden und vermutlich zu dem erhöhten Anteil recycelter MHC I-Moleküle beitragen.

Interessanterweise ist die MHC I-vermittelte Präsentation von chlamydialen Antigenen auch in Anwesenheit beider Cathepsin-Inhibitoren nachhaltig beeinträchtigt, was als eindeutiger Hinweis auf eine Beteiligung von Cathepsin D und S an der vakuolaren MHC I-Kreuzpräsentation chlamydialer Antigene gedeutet werden kann. In nahezu vergleichbarem Maße wie bei den verwendeten Cathepsin-Inhibitoren wird die Antigenpräsentation vermindert, wenn die katalytische Funktion des Proteasoms durch Lactacystin blockiert ist. Dies lässt vermuten, dass dieser zytosolische Proteasekomplex ebenfalls entscheidend an der Generierung chlamydialer MHC I-bindender Antigene beteiligt ist.

Wie in Abbildung 40B zu sehen ist, kommt es durch die Transfektion von JAWSII-Zellen mit spezifischer siRNA für H2-K<sup>b</sup>, H2-D<sup>b</sup> sowie TAP1 zu einer deutlich geringeren IFN- $\gamma$ -Sekretion bei den kokultivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Hingegen ist ungeachtet der Expressionsreprimierung von Tapasin und GBP1 in JAWSII-Zellen die IFN- $\gamma$ -Konzentration der entsprechenden Kokultivierungsüberstände mit der des Kontrollansatzes vergleichbar. Zum einen untermauern diese Resultate die vorherige Schlussfolgerung, dass tatsächlich beide MHC I-Allel-Produkte der JAWSII-Zelllinie für die Antigenpräsentation nach Chlamydieninfektion genutzt werden. Zum anderen scheint der Proteinkomplex TAP eine wichtige funktionale Aufgabe bei der MHC I-Präsentation chlamydialer Antigene zu

übernehmen. Die Expression von Tapasin, als wichtiger akzessorischer Kofaktor der klassischen MHC I-Beladung im ER, sowie der zellautonome Resistenzfaktor GBP1 sind offensichtlich nicht essentiell für die erfolgreiche MHC I-Präsentation chlamydialer Antigene.

In Zusammenfassung lassen die abschließenden Ergebnisse dieser Arbeit die Schlussfolgerung zu, dass die proteolytischen Komponenten der vakuolaren Kreuzpräsentation wie die Cathepsine in funktionaler Kooperation mit dem zytosolischen Proteasom in infizierten JAWSII chlamydiale Peptid-Antigene generieren. Diese Antigene werden offensichtlich TAP-abhängig auf endosomal recycelte MHC I-Moleküle geladen, deren Population nach Infektion durch die TNF- $\alpha$ -vermittelte Induktion neu synthetisierter MHC I-Moleküle kontinuierlich aufgefüllt wird. Der experimentelle Befund, dass Tapasin bei diesen Prozessen unbeteiligt zu sein scheint, legt die Vermutung nahe, dass der klassische Präsentationsweg mit einer über das ER verlaufenden MHC I-Beladung keine Rolle bei der Präsentation chlamydialer Antigene spielt.

## 5 Diskussion

Chlamydien sind weltweit verbreitet und können zu schwerwiegenden Erkrankungen führen. Der humanpathogene Erreger *Chlamydia trachomatis* ist in der westlichen Welt die häufigste bakterielle Ursache sexuell übertragbarer Erkrankungen und führt bei Frauen oftmals zu Infertilität. In den tropischen Ländern stellt *Chlamydia trachomatis* die häufigste Ursache für Erblindung dar. *Chlamydophila pneumoniae* ist verantwortlich für ca. 10 % aller nicht klinisch erworbenen Lungenentzündungen und auch eine Infektion mit dem zoonotischen Erreger *Chlamydophila psittaci* kann zu ernsthaften organischen Schäden führen. *Chlamydophila abortus* verursacht Aborte bei Rindern und Schafen. Aufgrund dieser Verluste entsteht in der Landwirtschaft durch chlamydiale Infektionen zudem wirtschaftlicher Schaden (Rohde et al., 2010).

Chlamydien können als bakterielle Erreger mit Antibiotika behandelt werden. Da die Infektion allerdings häufig symptomlos verläuft und darüber hinaus eine unzureichende Antibiotikabehandlung die Umwandlung der Erreger in persistente Stadien innerhalb der Wirtszellen begünstigt, ist die Entwicklung präventiver Maßnahmen gegen Chlamydieninfektionen von besonderer Bedeutung.

Wichtige Erkenntnisse aus dem Bereich der Grundlagenforschung, die zu einem besseren Verständnis der Chlamydien-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort führen, können zur Entwicklung möglicher Impfstoffe und somit zur Prävention von Chlamydieninfektionen beitragen. Das Ziel dieser Arbeit war es, die intrazellulären Prozesse der MHC I-vermittelten Antigenpräsentation chlamydialer Antigene in APCs aufzuklären.

### 5.1 Chlamydien stimulieren die zelluläre Immunabwehr

Für die tierexperimentelle Untersuchung von Chlamydieninfektionen hat sich die Maus als Infektionsmodell bewährt (Jiang et al., 2008). Im Zusammenhang mit dem *C. psittaci*-Sicherheitsstamm DC15 ist diesbezüglich jedoch nur sehr wenig bekannt. Daher wurde für diese Arbeit zunächst die Eignung von C57BL/6-Mäusen als Infektionsmodell für DC15 überprüft.

Anhand von Infektionsstudien konnte gezeigt werden, dass die Infektion von C57BL/6-Mäusen mit *Chlamydophila psittaci* (DC15) nicht letal verläuft, aber durchaus zu klinischen Symptomen führt. Zunächst ist ein rascher Gewichtsverlust mit einem Maximum am vierten Tag nach Infektion festzustellen (Abb. 7). Darüber hinaus führt die Infektion zu Veränderungen im Spontanverhalten, Fellsträuben und Schnellatmung. Durch histologische Untersuchungen der Lunge konnte eine akut eitrige Bronchopneumonie diagnostiziert werden, die die Probleme bei der Atmung hervorruft (Abb. 8).

Zu Beginn der Infektion kommt es zur Aktivierung der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr, verbunden mit der Infiltration von neutrophilen Granulozyten, Alveolarmakrophagen und DCs in die Lunge, während zu späteren Zeitpunkten vermehrt Lymphozyten, sprich Immunzellen der adaptiven Immunität in das Lungengewebe einwandern. Die Untersuchung des Zytokinspiegels im Serum vier Tage nach Infektion ergab zudem eine Induktion zahlreicher T<sub>H1</sub>- und T<sub>H2</sub>-Zytokine. Durch eine vorherige EB-Immunisierung kommt es zur Modifikation des Immunstatus hin zu einer T<sub>H1</sub>-Immunantwort, da in diesem Fall am vierten Tag nach der *challenge*-Infektion vermehrt T<sub>H1</sub>-Zytokine im Serum nachgewiesen werden konnten (Abb. 11). Diese Experimente zeigten, dass C57BL/6-Mäuse ein geeignetes Infektionsmodell für *C. psittaci* (DC15) darstellen und dass die Infektion zu einer zellulären Immunantwort führt.

Bisherige Studien zu *C. psittaci*-Infektionen bei der Maus haben die beschriebenen Aspekte bezüglich des Krankheitsverlaufs nicht untersucht. Die genannten Beobachtungen entsprechen allerdings den Ergebnissen aus Untersuchungen mit *Chlamydophila psittaci* (DC15) beim Kalb (Lambertz et al., 2011; Möhle et al., 2011). Nach der intrapulmonalen Infektion mit dem Erreger wurde bei den Kälbern eine Pneumonie festgestellt, die am 4. Tag nach Infektion am weitesten ausgedehnt war. Zu Beginn der Infektion konnten anhand histologischer Untersuchungen in der Lunge vorwiegend neutrophile Granulozyten, Makrophagen und DCs detektiert werden, während um Tag 10 pi eine spezifische Immunreaktion mit der Infiltration verschiedener Lymphozyten beobachtet werden konnte. Bis spätestens zum Tag 35 pi konnten die Erreger eliminiert werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Krankheitsverlauf in C57BL/6-Mäusen dem der Kälber stark ähnelt und dass sich die Mäuse ebenfalls sehr gut als Forschungsmodell eignen.

Für die Eliminierung intrazellulärer Pathogene sind  $T_{H1}$ -Abwehrreaktionen ein wichtiger Bestandteil. Die Initiation der zellulären Immunantwort ist entscheidend von der Antigenpräsentation der DCs abhängig.

## 5.2 DC-Reifung nach Chlamydieninfektion

Die immunologische Bedeutung der DC-Reifung nach der Infektion mit Chlamydien besteht in der Alarmierung des Immunsystems durch die Präsentation chlamydialer Antigene (Knight et al., 1995). Dies setzt zunächst die effiziente Aufnahme der Bakterien in die DCs voraus. Auch die Gewährung der Umwandlung von EBs in vermehrungsfähige RBs sowie der damit verbundenen chlamydialen Proteinexpression erscheint angesichts der Antigenpräsentation durch DCs sinnvoll, da somit ein möglichst breites Spektrum chlamydialer Antigene für die Präsentation zur Verfügung steht. In der vorliegenden Arbeit konnten JAWSII-Zellen, DCs einer murinen Zelllinie aus C57BL/6-Mäusen, erfolgreich mit *Chlamydomphila psittaci* (DC15) infiziert und eine intrazelluläre Vermehrung der Bakterien gewissen Umfangs beobachtet werden. Durch die Infektion mit Chlamydien kommt es zur funktionalen DC-Reifung, was mit der morphologischen Differenzierung, einer reduzierten Phagozytoseaktivität sowie der prädominanten Sekretion funktionsrelevanter  $T_{H1}$ -Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-12 einhergeht (Abb. 15-17). Darüber hinaus werden entscheidende DC-Oberflächenmarker wie CD11b, CD40, CD86 und MHC I induziert (Abb. 18, Abb. 40).

Die Beobachtungen zur Reifung Chlamydien-infizierter DCs, die in dieser Arbeit gemacht wurden, decken sich mit den experimentellen Befunden anderer Arbeitsgruppen. So konnte gezeigt werden, dass es nach der Infektion von murinen DCs mit *Chlamydia muridarum* zu charakteristischen zellulären Veränderungen kommt, die eine DC-Reifung anzeigen (Rey-Ladino et al., 2005). Auch die vermehrte Expression der für die DC-Funktion wichtigen Oberflächenmarker CD80, CD86 und CD40 sowie der Zytokine IL-12 und TNF- $\alpha$  konnte nach der Infektion mit infektiösen EBs beobachtet werden (Rey-Ladino et al., 2005). Zusätzlich ist zu erwähnen, dass auch die Infektion humaner DCs mit *C. trachomatis* zu einer DC-Aktivierung sowie einer IL-12- und TNF- $\alpha$ -Produktion führt (Matyszak et al., 2002).

Eine vergleichende Studie zwischen dem Infektionsverhalten primärer DCs und der DC-Zelllinie JAWSII kam zu dem Ergebnis, dass sich JAWSII-Zellen zur Untersuchung

immunologischer Fragestellungen in Infektionsstudien eignen und tatsächlich primäre Zellen als experimentelles Zellmodell ersetzen können (Jiang et al., 2008).

Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der JAWSII-Zellen im Vergleich zu Epithelzellen machte zunächst deutlich, dass sich die Morphologie der Chlamydieneinschlüsse in DCs von der in den üblichen, epithelialen Zielzellen stark unterscheidet (Abb. 19A). Anstatt eines großen, gegen Ende des Entwicklungszyklus nahezu die ganze Zelle ausfüllenden Einschlusses, liegen in infizierten DCs multiple, kleine, in der Peripherie der Zelle lokalisierte Einschlüsse vor. Zudem weisen IF- und vor allem TEM-Aufnahmen darauf hin, dass sich die Inklusionen in DCs offensichtlich in Auflösung befinden (Abb. 19B, Abb. 27). Weiterhin ergab sich in infizierten DCs eine verlangsamte Genexpression für die Chlamydien und anhand der durchgeführten Reinfektionsexperimente eine reduzierte Bakterienvermehrung sowie -freisetzung (Abb. 20, Abb. 21).

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden durch Studien der Gruppe von Brunham bestätigt (Rey-Ladino et al., 2007). So konnte hier ebenfalls das intrazelluläre Überleben von Chlamydien in *C. muridarum*-infizierten Maus-DCs beobachtet werden. Neben normal geformten Chlamydieninklusionen wurde in den untersuchten DCs auch die Ausbildung morphologisch atypischer Einschlüsse gefunden. Darüber hinaus konnte durch Rey-Ladino und Mitarbeiter gezeigt werden, dass Chlamydieninklusionen in DCs nur sehr wenige infektiöse EBs enthalten. Die Autoren postulierten auf Grundlage ihrer Ergebnisse, dass in infizierten DCs ein entscheidender Teil der Chlamydien in ein Persistenzstadium übergeht. Im Gegensatz hierzu geben die Untersuchungen dieser Arbeit keinen Hinweis auf Persistenz. Es zeigte sich vielmehr, dass die Bakterien durchaus metabolisch aktiv sind und ihre Vermehrung innerhalb der DCs lediglich eingeschränkt ist (Abb. 20, Abb. 21). Im Stadium der Persistenz wäre beides nicht zu erwarten (siehe 1.1.2). Dies deutet darauf hin, dass DCs die Chlamydieninfektion und anschließende intrazelluläre Vermehrung dahingehend kontrollieren, dass einerseits geringe Mengen an infektiösen EBs entstehen und freigesetzt werden und andererseits eine ausreichende Anzahl und Variabilität chlamydialer Antigene für die Prozessierung zur Verfügung stehen. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die geringere Produktivität der Chlamydien in DCs im Vergleich zu Epithelzellen auch nach Infektion von Mauszellen mit *C. trachomatis* festgestellt wurde (Steele et al., 2004).

In Epithelzellen als den natürlichen Zielzellen vermehren sich die Chlamydien nicht nur wesentlich effizienter, sie sind außerdem in der Lage, bestimmte Abwehrmechanismen der Zellen durch die Sekretion chlamydialer Proteasen aus der Inklusion in das Zytosol gezielt zu unterbinden. Die sezernierte Protease CPAF etwa ist dafür bekannt, dass sie unter anderem die MHC-Transkriptionsfaktoren RFX5 und USF-1 der Wirtszelle degradiert, was eine reduzierte MHC-Expression zur Folge hat (Zhong et al., 2001). Durch diesen Evasionsmechanismus entziehen sich die Chlamydien der Erkennung durch das Immunsystem. Untersuchungsergebnisse in der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass die chlamydiale Protease CPAF in JAWSII-DCs zwar exprimiert wird, jedoch auch 72 hpi nicht ins Zytosol der infizierten DCs gelangt (Abb. 22, Abb. 23). Untersuchungen zur MHC I-Expression mittels Western Blot zeigten zudem, dass MHC I in infizierten JAWSII nicht degradiert, sondern vielmehr induziert wird und somit der Antigenpräsentation zur Verfügung steht (Abb. 34). Folglich wird CPAF in DCs offensichtlich daran gehindert, seine zell- und immunsubversive Wirkung zu entfalten. Dem kann entweder ein Mechanismus der DCs zugrunde liegen, der die Sekretion von CPAF aus den Inklusionen verhindert, oder die Chlamydien selbst stellen die Sekretion möglicherweise aufgrund ungünstiger Vermehrungsbedingungen in den DCs ein.

Mithilfe des Antigenpräsentations-Assays konnte gezeigt werden, dass infizierte JAWSII-DCs tatsächlich in der Lage sind, der chlamydialen Immunevasion zu entgehen und Chlamydien-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen über MHC I-Präsentation funktional zur IFN- $\gamma$ -Sekretion zu stimulieren. Demnach werden Chlamydienantigene in den JAWSII effizient prozessiert und MHC I-vermittelt präsentiert (Abb. 14, Abb. 46).

In verschiedenen Studien konnte bereits die Stimulation CD8<sup>+</sup> und vor allem CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Kokultivierung mit Chlamydien-infizierten DCs in *in vitro*-Experimenten nachgewiesen werden (Jiang et al., 2008; Su et al., 1998). Zudem wurde auch gezeigt, dass durch die Präsentation chlamydialer Antigene eine schützende T<sub>H</sub>1-vermittelte Immunantwort in Mäusen initiiert wird (Lu and Zhong, 1999). Wie MHC I-Moleküle in DCs mit chlamydialen Peptid-Antigenen beladen werden, ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

### 5.3 Chlamydien-Antigenpräsentation durch Kreuzpräsentation

DCs sind wie alle Körperzellen in der Lage, endogene Peptide über den klassischen MHC I-Präsentationsweg unter Beteiligung des Proteasoms, des TAP-Transporters sowie Tapasin auf MHC I zu laden und auf der Plasmamembran zu präsentieren. Chlamydien halten sich während des gesamten Entwicklungszyklus innerhalb der membranumschlossenen Vakuole auf. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, wie chlamydiale Antigene Zugang zum MHC I-Präsentationsweg erhalten.

Es ist bekannt, dass von DCs auch alternative Präsentationswege genutzt werden. Diese sogenannten Kreuzpräsentationswege beschreiben einen Prozess, bei dem Peptide, die exogenen Ursprungs sind und die nicht von der Translationsmaschinerie der infizierten antigenpräsentierenden Zelle synthetisiert werden, auf der Zelloberfläche MHC I-vermittelt präsentiert werden (Blanchard and Shastri, 2010). Dadurch ist es möglich, spezifische CD8+ T-Zellen zu aktivieren, die bei der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene eine essentielle Rolle spielen (Blanchard and Shastri, 2010).

Bekannte Wege sind der vakuolare und der zytosolische Kreuzpräsentationsweg (Raghavan et al., 2008; Rock et al., 2010). Für den vakuolaren Präsentationsweg wird angenommen, dass die Antigenprozessierung sowie die Beladung der MHC I-Moleküle TAP- und Proteasom-unabhängig innerhalb membranumschlossener Vakuolen, die Proteasen wie Cathepsine beinhalten, stattfindet. Beim zytosolischen Kreuzpräsentationsweg wird hingegen postuliert, dass die Antigene aus dem Phagosom ins Zytosol transportiert und wie bei dem klassischen Präsentationsweg sowohl Proteasom- als auch TAP-abhängig im ER auf MHC I geladen werden. Die im Zytosol durch das Proteasom generierten Peptid-Antigene können auch über TAP zurück in das Phagosom gelangen und dort von MHC I gebunden werden. Ein weiterer Weg der Kreuzpräsentation wurde von Fonteneau et al. beschrieben (Fonteneau et al., 2003). Ihre Theorie geht davon aus, dass die Proteolyse der Proteine zunächst Cathepsin D-abhängig innerhalb saurer Kompartimente und später im Cytosol über das Proteasom stattfindet. Die generierten Peptide gelangen anschließend TAP-abhängig in das Lumen des ER und erlangen somit Zugang zum konventionellen MHC I-Weg.

Wege der Antigen-Kreuzpräsentation wurden bereits für mehrere intrazelluläre Erreger beschrieben (Blanchard and Shastri, 2010). Für *Leishmania major* etwa wurde ein TAP-

unabhängiger, vakuolarer Kreuzpräsentationsweg beobachtet (Bertholet et al., 2006), während für *Toxoplasma gondii* (Blanchard et al., 2008) und *Listeria monocytogenes* (Zwickey and Potter, 1999) Proteasom-abhängige Kreuzpräsentationswege vermutet werden.

Da Chlamydien auch in DCs innerhalb der Inklusionen lokalisiert sind und Bakterien-assoziierte, chlamydiale Proteine nicht frei im Zytosol vorliegen, liegt die Vermutung nahe, dass chlamydiale Antigene über einen der Kreuzpräsentationswege auf MHC I gelangen.

#### 5.4 Prozessierung chlamydialer Antigene

Um zu untersuchen, wie und vor allem wo die Prozessierung der chlamydialen Antigene in JAWSII-DCs abläuft, wurden infizierte Zellen zunächst mittels TEM und IF-Mikroskopie untersucht (Abb. 27, Abb. 28). In den TEM-Aufnahmen war zu erkennen, dass sich die Chlamydieneinschlüsse in den infizierten JAWSII teilweise auflösen und einzelne Chlamydien im Zytosol vorliegen (Abb. 27). Des Weiteren sind in räumlicher Nähe zu den Inklusionen zahlreiche multivesikuläre, endosomale Degradationskompartimente wiederzufinden, von denen einige offensichtlich chlamydiale Strukturen beinhalten (Abb. 27).

Anhand immunfluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen konnte zudem eine Kollokalisierung von Cathepsin D-positiven Endosomen und chlamydialen Strukturen festgestellt werden (Abb. 28). Endosomalen Proteasen wie Cathepsin D und S wird für die Antigenprozessierung der vakuolaren Kreuzpräsentation eine entscheidende Rolle zugesprochen (Fonteneau et al., 2003; Shen et al., 2004). Die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen legen nahe, dass die in infizierten DCs über die strukturelle Auflösung von Inklusionen freiwerdenden Chlamydien möglicherweise über den Weg der Autophagozytose (Al-Younes et al., 2004) in vakuolare Degradationskompartimente gelangen und innerhalb dieser Vakuolen durch Cathepsin D und S proteolytisch degradiert werden. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass kürzlich veröffentlichte Studien von Yasir et al. belegen, dass Autophagie möglicherweise eine wichtige Komponente der anti-chlamydialen Abwehrreaktion infizierter Zellen darstellt (Yasir et al., 2011).

Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren im Antigenpräsentations-Assay konnte die Relevanz verschiedener Komponenten für die MHC I-vermittelte Präsentation chlamydialer Antigene in JAWSII-DCs bestimmt werden (Abb. 46A). In Übereinstimmung mit den

Immunfluoreszenzstudien weisen die Ergebnisse dieses Experiments auf eine funktionale Beteiligung der Proteasen Cathepsin D und S hin. Ebenso scheint aber auch der im Zytosol befindliche Proteasom-Komplex an der Generierung von chlamydialen MHC I-Antigenen beteiligt zu sein. Dies weist darauf hin, dass chlamydiale Polypeptide nach der Aufnahme in endo-/lysosomale Kompartimente zunächst durch die proteolytische Aktivität von Cathepsin D und S präprozessiert werden und entsprechende Abbauprodukte anschließend ins Zytosol gelangen. Dort findet in einem weiteren Prozessierungsschritt durch das Proteasom die Spaltung in Peptid-Antigene statt. Man geht davon aus, dass endo-/lysosomale Proteasen im Gegensatz zum zytosolischen Proteasom nicht in der Lage sind, in direkter Weise MHC I-bindende Peptide von 8-11 Aminosäuren Länge zu generieren. Im Unterschied zum Proteasom besitzen jene Proteasen jedoch die Fähigkeit phagozytiertes Antigenmaterial proteolytisch abzubauen. Daher ermöglicht die oben beschriebene Prozessierung, unter Mitwirkung der Cathepsine und des Proteasoms, eine effektive MHC I-Peptidbeladung und Antigenpräsentation in Chlamydien-infizierten DCs.

Es wurden bereits Hypothesen dazu aufgestellt, wie Chlamydienantigene Zugang zum MHC I-Präsentationsweg erlangen könnten. Wie bereits oben erwähnt, sezernieren Chlamydien bestimmte Effektorproteine in das Zytosol der Wirtszelle, um zelluläre Prozesse zu ihren Gunsten zu verändern. Diese sezernierten Proteine liegen frei im Zytosol vor und könnten somit durchaus über den klassischen Weg abgebaut und präsentiert werden. Es werden allerdings auch Peptid-Antigene nicht sezernierter Proteine MHC I-vermittelt präsentiert und von CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt. So führen zum Beispiel präsentierte Epitope chlamydialer Proteine der Inklusionenmembran von *C. trachomatis*, wie CrpA und Cap1, nachweislich zur Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Blanchard and Shastri, 2010; Fling et al., 2001; Starnbach et al., 2003). Diese mit der Inklusionenmembran assoziierten Proteine besitzen zytosolische Domänen, die nach Ansicht der Autoren möglicherweise proteolytisch abgespalten und anschließend über das im Zytosol vorliegende Proteasom abgebaut werden können. Die bisher postulierten Modelle gehen davon aus, dass die Antigenprozessierung unter Beteiligung des Proteasoms über den konventionellen klassischen MHC I-Weg mit der MHC I-Beladung im ER verläuft. Interessanterweise zeigen jedoch verschiedene Untersuchungen zu immunodominanten Epitopen von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*, dass auch Peptid-Antigene Bakterien-assoziiierter Proteine zur CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung beitragen (Capo et al., 2005; Gervassi et al., 2004; Kim et al., 1999; Wizel et

---

al., 2002). Eine alleinige Beteiligung des klassischen MHC I-Weges kann die Antigenprozessierung dieser chlamydialen Proteine nicht erklären. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die ins Zytosol der Wirtszelle translozierten Chlamydienproteine nur eine Subpopulation bzw. Minderheit chlamydialer Expressionsprodukte ausmachen und somit der klassische MHC I-Weg tatsächlich nur einen Teil der Chlamydienantigene erfassen könnte. Bei intrazellulären Pathogenen werden im Verhältnis zum gesamten Genom nur sehr wenige Peptide MHC I-vermittelt präsentiert, die auch eine CTL-Antwort auslösen können (Blanchard and Shastri, 2010). Daher ist es umso entscheidender, dass das gesamte Spektrum chlamydialer Peptid-Antigene durch den Prozessierungs- und Präsentationsweg erreicht wird. Einen neuen und erweiterten Einblick in die Prozesse chlamydialer MHC I-Antigenpräsentation bieten die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

Über die Frage, wie die präprozessierten Antigene aus den vakuolaren Kompartimenten in das Zytosol gelangen, kann bislang nur spekuliert werden. Da bereits mehrfach eine Fusion zwischen Phagosomen und ER-Vesikeln beschrieben wurde, ist beispielsweise der Transport präprozessierter chlamydialer Antigene aus den vakuolaren Kompartimenten ins Zytosol über den Sec61-Kanal denkbar (siehe 1.2.6).

Hinweise aus vorhergehenden Studien stützen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Proteasom-abhängigen Prozessierung chlamydialer Antigene. So haben Gervassi und Kollegen CD8+ T-Zellen aus Patienten mit einer *C. trachomatis*-Infektion isoliert und mit infizierten DCs kokultiviert (Gervassi et al., 2003). Unter Einfluss entsprechender Inhibitoren stellte sich heraus, dass die beobachtete Stimulation der CD8+ T-Zellen von der Funktion des Proteasom-Komplexes abhängig ist.

Wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben, unterscheidet sich der Verlauf der Chlamydieninfektion in DCs von dem in Epithelzellen (Abb. 19A, Abb. 20, Abb. 21). Ein möglicher Grund hierfür könnte bereits in der unterschiedlichen Aufnahme der Bakterien liegen. Es gibt experimentelle Hinweise darauf, dass DCs Chlamydien ausschließlich durch Phagozytose und nicht wie bei Epithelzellen Rezeptor-vermittelt internalisieren (AG Knittler, unveröffentlichte Daten). Es ist denkbar, dass die durch Phagozytose aufgenommenen Chlamydien direkt, d.h. unmittelbar nach dem Eindringen in die Zelle, in endo-/lysosomale Kompartimente überführt werden. Interessanterweise zeigten jedoch die TEM-Aufnahmen in den infizierten DCs Chlamydieneinschlüsse in Auflösung sowie freiwerdende Bakterien im Zytosol (Abb. 27). Wie bereits oben erwähnt, werden diese „freien

Bakterien“ möglicherweise über Autophagozytoseprozesse (Al-Younes et al., 2004) in vakuolare Kompartimente überführt, in denen dann die ersten Schritte der weiteren Prozessierung über entsprechende Cathepsine stattfinden können (siehe oben). In Anlehnung an zellbiologische Befunde zu anderen intrazellulären Pathogenen, die ebenfalls parasitophore Vakuolen ausbilden, kann man annehmen, dass an der strukturellen Auflösung chlamydialer Inklusionen Komponenten der zellautonomen Immunität beteiligt sind (Howard, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Rolle von GBP<sub>1</sub> für die zellautonome Resistenz Chlamydien-infizierter DCs genauer untersucht.

### 5.5 IFN- $\gamma$ -unabhängige Induktion von GBP<sub>1</sub>

Einige Vertreter der GBPs, auch p65 GTPasen genannt, zählen zu den zellautonomen Resistenzfaktoren, die in Zellen hauptsächlich durch IFN- $\gamma$  induziert werden (Degrandi et al., 2007). In mehreren Studien konnte den GBPs eine funktionale Beteiligung an der Abwehr intrazellulärer Pathogene nachgewiesen werden (Degrandi et al., 2007; Kim et al., 2011a).

Welche Rolle die zellautonome Immunität in Chlamydien-infizierten dendritischen Zellen spielt, ist bisher noch nicht untersucht worden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Western Blot-Analysen zu GBP<sub>1</sub> konnten zeigen, dass GBP<sub>1</sub> nach Chlamydieninfektion in DCs IFN- $\gamma$ -unabhängig exprimiert wird (Abb. 24A). Mit zunehmender Infektionsdauer wurde ein Anstieg in der Induktion von GBP<sub>1</sub> beobachtet (Abb. 24B). Es ist bekannt, dass die Expression muriner GBPs auch durch die Stimulation mit LPS induziert werden kann (Nguyen et al., 2002). Dies scheint auch für GBP<sub>1</sub> in Chlamydien-infizierten DCs zuzutreffen. Um die intrazelluläre Lokalisierung von GBP<sub>1</sub> zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzstudien durchgeführt. Dabei konnte eine deutliche Kollokalisierung zwischen GBP<sub>1</sub> und den Inklusionen beobachtet werden (Abb. 25). Darüber hinaus konnte über die Messung chlamydialer mRNA in infizierten Zellen nach Transfektion spezifischer siRNA für GBP<sub>1</sub> auch ein anti-chlamydialer Effekt nachgewiesen werden (Abb. 26). Untersuchungen zu humanem GBP<sub>1</sub> und 2 nach der Infektion von HeLa-Zellen mit *C. trachomatis* führten zu vergleichbaren Ergebnissen (Tietzel et al., 2009). So konnte ebenfalls die Lokalisation von GBP<sub>1</sub> und 2 um die Inklusionen sowie ein anti-chlamydialer Effekt beobachtet werden, der nach Stimulation der Zellen mit IFN- $\gamma$  verstärkt nachzuweisen war.

Aus den Untersuchungen lässt sich ableiten, dass der anti-chlamydiale Effekt möglicherweise daher rührt, dass GBP1-Moleküle mit der Inklusionenmembran interagieren und dadurch zur strukturellen Zerstörung der Membran beitragen. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, dass die Inklusionen oder ihre Auflösungsprodukte durch GBP1 lediglich markiert werden, um die Einschlüsse für Autophagosomen kenntlich zu machen. Es bleibt also zu klären, ob die beobachtete GBP1-Interaktion Ursache oder Folge der strukturellen Auflösung der Inklusionen ist. Für die nur im murinen System exprimierte p47 GTPase Irga6 konnte bereits gezeigt werden, dass die Akkumulation der Moleküle um die Inklusionen in *C. trachomatis*-infizierten Fibroblasten tatsächlich zur Fusion mit Autophagosomen und letztlich zur Elimination der Pathogene führt (Al-Zeer et al., 2009). Man kann also davon ausgehen, dass an den anti-chlamydialen Prozessen in DCs außer GBP1 möglicherweise noch weitere Komponenten der zellautonomen Immunität beteiligt sind.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass der negative Effekt von GBP1 auf die bakterielle Vermehrung darin begründet liegt, dass GBP1 durch die Anlagerung an die Inklusionenmembran die Sekretion, beispielsweise von CPAF, und die Aufnahme wichtiger Stoffwechsel-Komponenten verhindert und somit die bakterielle Entwicklung nachhaltig stört. In jedem Fall scheint der zellautonome Resistenzfaktor GBP1 in DCs in erster Linie eine anti-chlamydiale Funktion zu erfüllen, möglicherweise über einen der oben beschriebenen Mechanismen. Für die Antigenpräsentation spielt GBP1 hingegen offenbar keine entscheidende Rolle, da das Ausschalten von GBP1 durch die Transfektion spezifischer siRNA keinen nachweisbaren Einfluss auf die Stimulation der CD8+ T-Zellen im Antigenpräsentations-Assay hatte (Abb. 46B). Es wäre daher von großem Interesse zu untersuchen, welchen Einfluss weitere Komponenten der zellautonomen Resistenz (z.B. die Autophagozytose-vermittelnde p47 GTPase Irga6) auf die chlamydiale Antigenpräsentation haben.

## 5.6 Beladung der MHC I-Moleküle

Im Gegensatz zu Epithelzellen zeigen Chlamydien-infizierte DCs eine ausgeprägte Induktion der MHC I-Maschinerie. Das Expressionsmuster der Komponenten TAP, Tapasin und MHC I des PLC entspricht nach der Infektion mit Chlamydien dem Expressionsmuster nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  (Abb. 29, Abb. 34). Da eine Chlamydieninfektion in DCs die

Sekretion von TNF- $\alpha$  hervorruft, liegt es nahe, anzunehmen, dass die Komponenten des PLC TNF- $\alpha$ -vermittelt induziert werden. Experimente mit neutralisierenden anti-TNF- $\alpha$  Antikörpern bestätigten diese Vermutung (Abb. 36). Zudem konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  zur Aktivierung des NF $\kappa$ B-Weges und zur Translokation der p65 Untereinheit in den Zellkern führt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der beschriebene TNF- $\alpha$  Effekt mit der Lokalisation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B in Zusammenhang steht (Abb. 37).

JAWSII-DCs exprimieren die beiden MHC I-Moleküle H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> (Abb. 30). Durch Immunfluoreszenzstudien konnte gezeigt werden, dass H2-K<sup>b</sup> im *steady-state* vorwiegend in post-ER Kompartimenten lokalisiert ist, während H2-D<sup>b</sup> hauptsächlich im ER vorliegt (Abb. 31). Nach der Infektion der Zellen mit Chlamydien zeigte sich in Immunfluoreszenzexperimenten eine zunehmende Kolo­kalisierung von H2-K<sup>b</sup> mit Cathepsin D-positiven Kompartimenten (Abb. 42). Auch im Falle von H2-D<sup>b</sup> konnte nach Chlamydieninfektion eine zwar schwächere, aber dennoch gut detektierbare Kolo­kalisierung mit Cathepsin D beobachtet werden (Daten zum Experiment hier nicht gezeigt). Somit zeigen die Studien dieser Arbeit erstmalig, dass insbesondere post-ER lokalisierte Moleküle während der Chlamydieninfektion in Kompartimente der Kreuzpräsentationswege überführt werden. Die Vermutung, dass in diesem endo-/lysosomalen Kompartiment auch die Beladung der MHC I-Moleküle mit chlamydialen Peptiden stattfindet ist naheliegend, zumal in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass diese vakuolaren Kompartimente auch TAP-positiv sind (Abb. 44). Bereits mehrere Gruppen haben über die Lokalisation von TAP außerhalb des ER berichtet (Guernonprez et al., 2003; Houde et al., 2003) und damit zur Aufklärung der TAP-abhängigen Wege der Kreuzpräsentation beigetragen. Das Ergebnis des Antigenpräsentations-Assays in dieser Arbeit ergab in Übereinstimmung mit den Immunfluoreszenzanalysen eine eindeutige funktionale Beteiligung des Transporters TAP an der Chlamydien-Antigenpräsentation in DCs (Abb. 44, Abb. 46B).

Wie bereits erwähnt, weisen die Untersuchungen dieser Arbeit darauf hin, dass chlamydiale Peptide über einen sequentiellen Cathepsin-, Proteasom- und TAP-abhängigen Weg prozessiert und auf MHC I-Moleküle geladen werden, die sich wie im Falle von H2-K<sup>b</sup> nach Infektion und DC-Reifung vorwiegend in Cathepsin D-positiven Beladungskompartimenten befinden (Abb. 42). Damit bleibt die Frage zu klären, wie MHC I-Moleküle in diese endosomalen Kompartimente gelangen. Mittels Durchflusszytometrie konnte nach

vorheriger Zugabe des lysosomotropen Inhibitors Primaquin für beide MHC I-Allel-Produkte endosomales Recycling nachgewiesen werden. Der Anteil der recycelten MHCs steigt nach Infektion für H2-K<sup>b</sup> sogar um das Doppelte an (Abb. 33). Auch mittels Immunfluoreszenzanalyse zeigte sich die Lokalisation beider MHC I-Allel-Produkte innerhalb endosomaler Recycling-Kompartimente (Abb. 43). Dass diese recycelten MHC I-Moleküle für die Chlamydien-Antigenpräsentation tatsächlich genutzt werden, konnte anhand des Antigenpräsentations-Assays unter Verwendung von Primaquin gezeigt werden (Abb. 46A). Die funktionale Bedeutung internalisierter MHC I-Moleküle für die Kreuzpräsentation in DCs wurde so auch von Basha und Kollegen postuliert (Basha et al., 2008). Innerhalb des endo-/lysosomalen Beladekompartiments muss es anschließend für eine entsprechende Neubeladung der recycelten MHC I-Moleküle zum Peptidaustausch kommen. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass in sauren Kompartimenten ein solcher Peptidaustausch tatsächlich stattfinden kann (Basha et al., 2008), allerdings darf der pH-Wert auch nicht zu niedrig sein, da eine stabile Peptidbindung der MHC I-Moleküle sonst nicht möglich ist (Rock et al., 2010). In DCs sind Phagosomen und Endosomen bekanntermaßen weniger sauer als dies beispielsweise bei Makrophagen der Fall ist (Amigorena and Savina, 2010; Jancic et al., 2007; Savina et al., 2006).

Neu synthetisierte MHC I-Moleküle scheinen ebenfalls eine wichtige Rolle für die Antigenpräsentation Chlamydien-infizierter JAWSII-DCs zu spielen. Wird der anterograde ER-Golgi-Transport durch H89 blockiert, können Chlamydien-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht mehr so effizient zur IFN- $\gamma$ -Sekretion angeregt werden (Abb. 46A). Gervassi und Kollegen kamen mit Hilfe eines ähnlichen Assays unter Verwendung des Inhibitors Brefeldin A zu einem vergleichbaren Ergebnis (Gervassi et al., 2003). Die Brefeldin A-Experimente zur MHC I-Oberflächenstabilität, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigen, dass sich ohne die Zufuhr neu synthetisierter MHC I-Moleküle aus dem ER der Pool an Oberflächen-MHC I sehr schnell reduziert (Abb. 32). Durch H89 und/oder BFA wird der Transport aller MHC I-Moleküle aus dem ER Richtung Plasmamembran blockiert. Damit bleibt auch der Nachschub an MHC I für den Pool an Recycling-MHC I-Molekülen aus und der Anteil recycelter Moleküle wird zwangsläufig geringer. Des Weiteren können auch neu synthetisierte MHC I-Moleküle vom Golgi in den endozytotischen Weg eingeschleust werden (Basha et al., 2008).

Das Ergebnis des Antigenpräsentations-Assays zeigt klar, dass der MHC I-Präsentationsweg chlamydialer Antigene unabhängig von Tapasin abläuft, obwohl die Tapasin-Expression in infizierten JAWSII nach Infektion mit Chlamydien induziert wird (Abb. 34, Abb. 46B). Dies lässt sich mit dem grundlegenden TNF- $\alpha$ -Induktionsmechanismus erklären, aus dem die infizierten DCs diejenigen Komponenten funktional an der Antigenpräsentation beteiligen, die unabhängig von der Induktion für die jeweilige Prozessierung aufgenommener Pathogene tatsächlich benötigt werden. Für die effiziente Beladung der MHC I-Moleküle im klassischen Weg ist Tapasin von besonderer Bedeutung, da es die Komponenten des PLC zum TAP-Transporter rekrutiert und somit für die korrekte Zusammensetzung des PLC verantwortlich ist (Rufer et al., 2007). Des Weiteren unterstützt Tapasin in seiner Funktion als akzessorisches Chaperon die Bildung stabiler MHC I-Peptid-Komplexe, indem es die MHC I-Peptidbindetasche strukturell so modifiziert, dass nur Peptide mit optimalen Bindungseigenschaften einen stabilen Komplex mit MHC I bilden können. Es übt also eine Art Qualitätskontrolle bei der Peptidbeladung der MHC I-Moleküle im ER aus, die dafür sorgt, dass die MHC I-Peptid-Komplexe aufgrund ihrer Stabilität vor der Dissoziation in den sauren Kompartimenten während des Exports Richtung Zelloberfläche geschützt sind. Die Arbeiten von Garbi et al. (Garbi et al., 2003) zeigen, dass im klassischen Weg sowohl H2-K<sup>b</sup> als auch H2-D<sup>b</sup> im ER in Tapasin-abhängiger Weise beladen werden. Experimente mit Tapasin-defizienten Zellen zeigten, dass zwar beide MHC I-Moleküle (H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup>) auch ohne entsprechende Qualitätskontrolle aus dem ER exportiert und auf der Zelloberfläche präsentiert werden, jedoch sind die MHC I-Peptid-Komplexe wesentlich instabiler und aufgrund ihrer verkürzten Oberflächenhalbwertszeit für die funktionale Antigenpräsentation ungeeignet. Ursache hierfür ist die ausbleibende MHC I-Stabilitätsprüfung durch Tapasin, wodurch die im ER beladenen MHC I-Moleküle vorwiegend Peptidliganden mit suboptimalen Bindungseigenschaften rekrutieren. Die Beobachtung, dass Tapasin für die funktionale Präsentation chlamydialer Antigene offensichtlich entbehrlich ist (Abb. 46B), bestätigt die weiteren experimentellen Hinweise dieser Arbeit, die dafür sprechen, dass die MHC I-Beladung mit chlamydialen Antigenen nicht über den klassischen MHC I-Weg im ER abläuft. Dies deckt sich auch mit Befunden, die belegen, dass MHC I-Beladungsprozesse in post-ER-Organellen, bei denen ein MHC I-Peptidaustausch in sauren Kompartimenten stattfindet, unabhängig von der durch Tapasin vermittelten Qualitätskontrolle ablaufen kann (Leonhardt et al., 2010).

Abschließend stellt sich die Frage, ob chlamydiale Antigene auch von Nicht-Immunzellen MHC I-vermittelt präsentiert werden können. Die  $T_H1$ -Immunantwort spielt bei der Bekämpfung einer Chlamydieninfektion, insbesondere durch IFN- $\gamma$ -induzierte Reaktionen, eine zentrale Rolle (Wizel et al., 2008). CD8+, zytotoxische T-Zellen sind nach Antigenkontakt bedeutende IFN- $\gamma$ -Produzenten und damit für die Aktivierung und Rekrutierung anderer Immunzellen mitverantwortlich. Ob die Zytotoxizität der CD8+ T-Zellen bei Chlamydieninfektionen auch eine Rolle spielt, hängt von der Präsentation chlamydialer Antigene auf MHC I-Molekülen von Nicht-Immunzellen ab. Hierzu gibt es in der Literatur einige Hinweise. So konnte die Lyse Chlamydien-infizierter Fibroblasten (Beatty and Stephens, 1994) sowie Epithelzellen (Steele et al., 2004) durch aktivierte Chlamydien-spezifische CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden. Zu möglichen Kreuzpräsentationswegen in Chlamydien-infizierten Epithelzellen finden sich bislang jedoch noch keine Hinweise, vielmehr sind in TEM-Untersuchungen verschiedene chlamydiale Antigene in unmittelbarer Nähe des ER lokalisiert worden (Giles and Wyrick, 2008). Auf Grundlage dieser Studien wurde von den Autoren postuliert, dass in epithelialen Wirtszellen chlamydiale Antigene vermutlich dem konventionellen klassischen MHC I-Präsentationsweg zugeführt werden. Ob die beobachtete räumliche Nähe zwischen chlamydialen Proteinen und dem ER möglicherweise auch auf autophagozytotische Prozesse zurückzuführen ist, wurde jedoch bisher nicht untersucht. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass bei der Makroautophagozytose, die möglicherweise eine wichtige Aufgabe bei der Prozessierung chlamydialer Antigene spielt (siehe oben), ein Teil der ER-Membranen Strukturen umschließt, die für den Abbau markiert sind. Diese Vesikel werden im Anschluss mit lysosomalen Kompartimenten vereinigt (Marino and Lopez-Otin, 2004). Um die Prozesse der MHC I-vermittelten Antigenpräsentation Chlamydien-infizierter Epithelzellen vollständig zu verstehen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Interessanterweise weisen neuere Studien darauf hin, dass auch Nicht-Immunzellen die Fähigkeit zur Phagozytose-abhängigen MHC I-Kreuzpräsentation besitzen (Giodini et al., 2009).

## 5.7 Postuliertes Arbeitsmodell

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte ein Arbeitsmodell zu den intrazellulären Abläufen der MHC I-Antigenpräsentation in Chlamydien-infizierten dendritischen Zellen

erstellt werden. Nach der Aufnahme der EBs (vermutlich vorwiegend durch Phagozytose) kommt es zur Umwandlung in RBs, die sich innerhalb der Einschlüsse in kontrolliertem Maße vermehren können. In DCs gelangen Chlamydien in Cathepsin-positive endo-/lysosomale Kompartimente, in denen die Bakterien proteolytisch abgebaut werden. Ob die Bakterien durch Fusion des Phagosoms mit Endosomen direkt in diese Kompartimente gelangen, oder ob einzelne, aus dem Einschluss ausgetretene Chlamydien über Autophagozytose in vakuolare Strukturen überführt werden, bedarf noch weiterer detaillierter Untersuchungen. Im Anschluss an den proteolytischen Abbau innerhalb der Verdauungskompartimente gelangen die Produkte dieser antigenischen Präprozessierung ins Zytosol. Hierbei könnte, wie von anderen Gruppen postuliert, der Sec61-Translokation-Komplex beteiligt sein (Blanchard and Shastri, 2010; Wizel et al., 2008). Nach der Überführung ins Zytosol werden in einem nachfolgenden Schritt chlamydiale Peptid-Antigene durch das Proteasom generiert und über TAP zurück in das Endo-/Lysosom transportiert, wo sie letztlich auf MHC I geladen werden. Bei den MHC I-Molekülen handelt es sich überwiegend um präexistierende Formen, die nach ihrer Oberflächenpräsentation über endosomales Recycling zurück in die Zelle transportiert werden und in den vakuolaren Kompartimenten mit den chlamydialen Peptid-Antigenen in Kontakt kommen. Die nach Peptidaustausch neu beladenen MHC I-Moleküle gelangen über vesikulären Transport wieder auf die Zelloberfläche, wo die präsentierten Antigene von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit spezifischem TCR erkannt werden. Neu synthetisierte MHC I-Moleküle aus dem ER füllen den Pool recycelter MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche kontinuierlich auf und werden möglicherweise auch in direkter Weise vom sekretorischen Weg in die Beladekompartimente der vakuolaren Kreuzpräsentation geleitet.

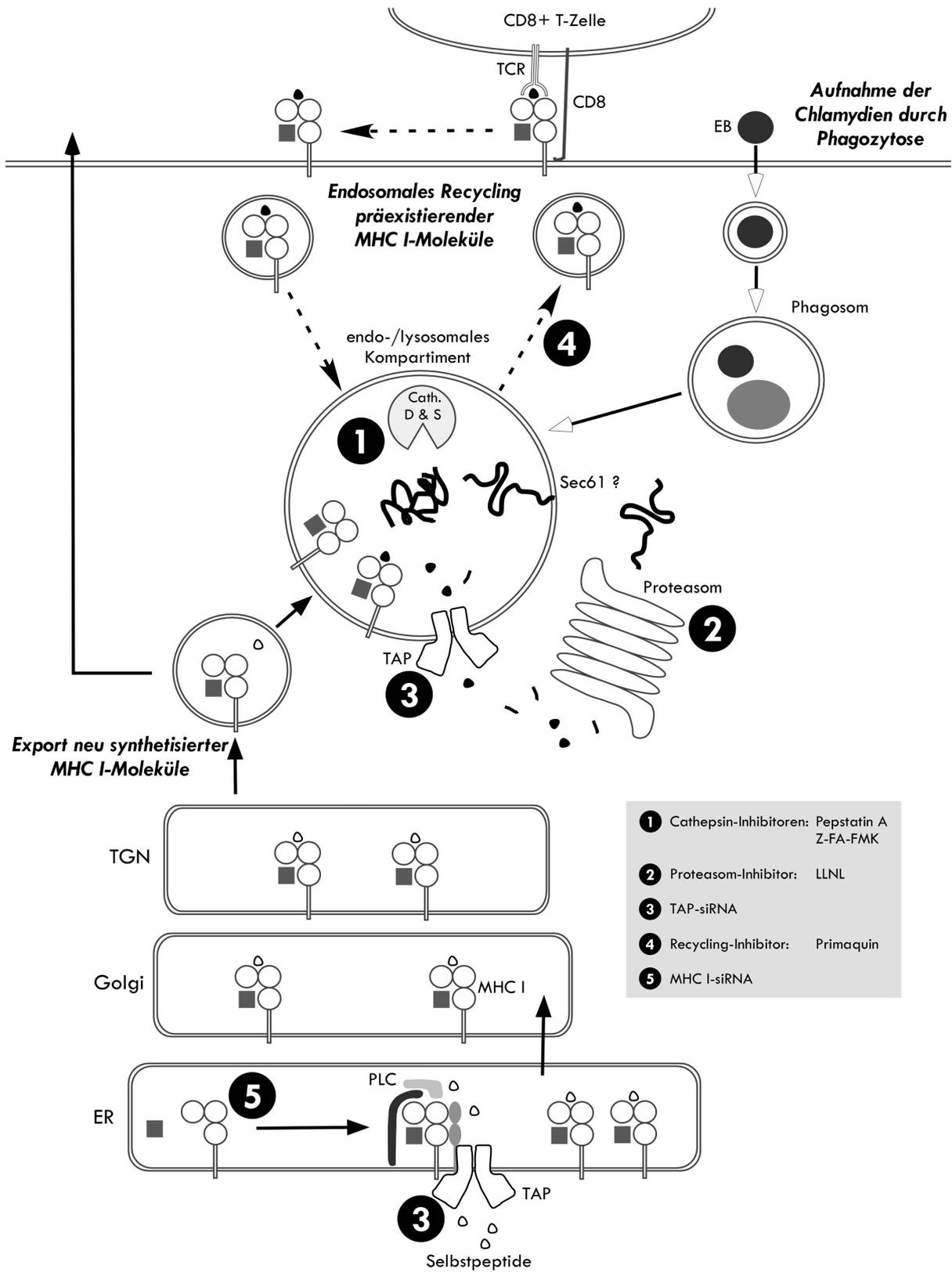


Abbildung 47: Arbeitsmodell zu den intrazellulären Prozessen der MHC I-Antigenpräsentation in Chlamydien-infizierten DCs

## 5.8 Ausblick für weitere Forschungsarbeiten

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse geben erstmalig ein erweitertes Verständnis zu Abläufen der DC-vermittelten MHC I-Immunabwehr gegen Chlamydien und liefern dadurch auch erste wichtige Grundlagen für zukünftige immunologische Behandlungsansätze. Weiterführende Forschungsarbeiten zur Identifizierung und Charakterisierung immunrelevanter MHC I-Chlamydienantigene werden detaillierte Einblicke in die Prozesse der zellulären Immunabwehr gegen Chlamydien erlauben und gezielte Eingriffe in die anti-chlamydiale Immunreaktion ermöglichen. Die eigentlichen Zielzellen der Chlamydien sind Epithelzellen (Rasmussen et al., 1997). Ob die lytischen Eigenschaften der aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Immunantwort eine Rolle spielen, hängt auch davon ab, inwiefern die entsprechenden chlamydialen Peptide ebenfalls von Epithelzellen generiert und auf MHC I-Molekülen präsentiert werden können. Trotz einiger Hinweise ist für Epithelzellen nicht abschließend geklärt, ob und wenn ja, auf welche Art und Weise die MHC I-vermittelte Präsentation stattfindet. Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten System ließe sich die Fragestellung für Epithelzellen aus C57BL/6-Mäusen möglicherweise beantworten. Des Weiteren wird für die anti-chlamydiale CTL-Immunantwort auch eine Beteiligung nicht klassischer MHC I-Moleküle in Betracht gezogen. Die Bedeutung dieser sogenannten „MHC class Ib“-Moleküle (Gervassi et al., 2003) könnte für die Entwicklung einer Vakzine von großem Interesse werden, da diese MHC-Moleküle nicht polymorph sind und somit von diesen Molekülen präsentierte Antigene in einer Population dieselbe immunologische Bedeutung haben dürften.

Interessant wären zudem weiterführende Untersuchungen zu den in dieser Arbeit erstmals beobachteten zellulären Gegenstrategien, die die Unterwanderung der MHC I-Antigenpräsentation durch die Chlamydien in DCs verhindern. Möglicherweise sind zellautonome Resistenzfaktoren ursächlich an der unterschiedlichen Lokalisation von CPAF in Epithelzellen und DCs beteiligt. Weiterhin wäre zu untersuchen, ob tatsächlich Autophagozytoseprozesse für die funktionale MHC I-Antigenpräsentation von Bedeutung sind, und ob möglicherweise Vertreter der p47 GTPasen hierfür mitverantwortlich sind.

# Literaturverzeichnis

Abdel Motal, U.M., Zhou, X., Joki, A., Siddiqi, A.R., Srinivasa, B.R., Stenvall, K., Dahmen, J., and Jondal, M. (1993). Major histocompatibility complex class I-binding peptides are recycled to the cell surface after internalization. *Eur J Immunol* 23, 3224-3229.

Abdelrahman, Y.M., and Belland, R.J. (2005). The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol Rev* 29, 949-959.

Agrawal, T., Vats, V., Wallace, P.K., Salhan, S., and Mittal, A. (2008). Role of cervical dendritic cell subsets, co-stimulatory molecules, cytokine secretion profile and beta-estradiol in development of sequelae to *Chlamydia trachomatis* infection. *Reprod Biol Endocrinol* 6, 46.

Al-Younes, H.M., Brinkmann, V., and Meyer, T.F. (2004). Interaction of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 with the host autophagic pathway. *Infect Immun* 72, 4751-4762.

Al-Zeer, M.A., Al-Younes, H.M., Braun, P.R., Zerrahn, J., and Meyer, T.F. (2009). IFN-gamma-inducible Irga6 mediates host resistance against *Chlamydia trachomatis* via autophagy. *PLoS One* 4, e4588.

Amellem, O., Stokke, T., Sandvik, J.A., and Pettersen, E.O. (1996). The retinoblastoma gene product is reversibly dephosphorylated and bound in the nucleus in S and G<sub>2</sub> phases during hypoxic stress. *Exp Cell Res* 227, 106-115.

Amigorena, S., and Savina, A. (2010). Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 22, 109-117.

Barchet, W., Cella, M., and Colonna, M. (2005). Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Semin Immunol* 17, 253-261.

Barron, A.L., Olshevsky, C., and Cohen, M.M. (1970). Characteristics of the BGM line of cells from African green monkey kidney. Brief report. *Arch Gesamte Virusforsch* 32, 389-392.

Basha, G., Lizee, G., Reinicke, A.T., Seipp, R.P., Omilusik, K.D., and Jefferies, W.A. (2008). MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells. *PLoS One* 3, e3247.

Beatty, P.R., and Stephens, R.S. (1994). CD8<sup>+</sup> T lymphocyte-mediated lysis of *Chlamydia*-infected L cells using an endogenous antigen pathway. *J Immunol* 153, 4588-4595.

Beatty, W.L., Morrison, R.P., and Byrne, G.I. (1994). Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* *58*, 686-699.

Bedson, S.P., and Bland, J.O.W. (1932). A morphological study of psittacosis virus, with the description of a developmental cycle. *Brit. J. Exptl. Pathol.* *13*, 461-466.

Beeckman, D.S., and Vanrompay, D.C. (2009). Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect* *15*, 11-17.

Bekpen, C., Hunn, J.P., Rohde, C., Parvanova, I., Guethlein, L., Dunn, D.M., Glowalla, E., Leptin, M., and Howard, J.C. (2005). The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol* *6*, R92.

Bertholet, S., Goldszmid, R., Morrot, A., Debrabant, A., Afrin, F., Collazo-Custodio, C., Houde, M., Desjardins, M., Sher, A., and Sacks, D. (2006). Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *J Immunol* *177*, 3525-3533.

Blanchard, N., Gonzalez, F., Schaeffer, M., Joncker, N.T., Cheng, T., Shastri, A.J., Robey, E.A., and Shastri, N. (2008). Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol* *9*, 937-944.

Blanchard, N., and Shastri, N. (2010). Cross-presentation of peptides from intracellular pathogens by MHC class I molecules. *Ann N Y Acad Sci* *1183*, 237-250.

Blanco, P., Palucka, A.K., Pascual, V., and Banchereau, J. (2008). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* *19*, 41-52.

Boehm, U., Guethlein, L., Klamp, T., Ozbek, K., Schaub, A., Futterer, A., Pfeffer, K., and Howard, J.C. (1998). Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J Immunol* *161*, 6715-6723.

Bouvier, M., and Wiley, D.C. (1994). Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science* *265*, 398-402.

Bromme, D., Steinert, A., Friebe, S., Fittkau, S., Wiederanders, B., and Kirschke, H. (1989). The specificity of bovine spleen cathepsin S. A comparison with rat liver cathepsins L and B. *Biochem J* *264*, 475-481.

- Brunner, C., Seiderer, J., Schlamp, A., Bidlingmaier, M., Eigler, A., Haimerl, W., Lehr, H.A., Krieg, A.M., Hartmann, G., and Endres, S. (2000). Enhanced dendritic cell maturation by TNF- $\alpha$  or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol* *165*, 6278-6286.
- Burton, M.J., and Mabey, D.C. (2009). The global burden of trachoma: a review. *PLoS Negl Trop Dis* *3*, e460.
- Bush, R.M., and Everett, K.D. (2001). Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* *51*, 203-220.
- Caldwell, H.D., Kromhout, J., and Schachter, J. (1981). Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* *31*, 1161-1176.
- Campbell, L.A., and Kuo, C.C. (2004). *Chlamydia pneumoniae*--an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nat Rev Microbiol* *2*, 23-32.
- Capo, S., Nuti, S., Scarselli, M., Tavarini, S., Montigiani, S., Mori, E., Finco, O., Abrignani, S., Grandi, G., and Bensi, G. (2005). *Chlamydia pneumoniae* genome sequence analysis and identification of HLA-A2-restricted CD8<sup>+</sup> T cell epitopes recognized by infection-primed T cells. *Vaccine* *23*, 5028-5037.
- Capony, F., Rougeot, C., Montcourrier, P., Cavailles, V., Salazar, G., and Rochefort, H. (1989). Increased secretion, altered processing, and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res* *49*, 3904-3909.
- Christian, J., Vier, J., Paschen, S.A., and Hacker, G. (2010). Cleavage of the NF- $\kappa$ B family protein p65/RelA by the chlamydial protease-like activity factor (CPAF) impairs proinflammatory signaling in cells infected with *Chlamydiae*. *J Biol Chem* *285*, 41320-41327.
- Coles, A.C. (1930). Micro-organisms in psittacosis. *Lancet* *1*, 1011-1012.
- Costes, S.V., Daelemans, D., Cho, E.H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., and Lockett, S. (2004). Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J* *86*, 3993-4003.
- Debierre-Grockiego, F., Molitor, N., Schwarz, R.T., and Luder, C.G. (2009). *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols up-regulate major histocompatibility complex (MHC) molecule expression on primary murine macrophages. *Innate Immun* *15*, 25-32.
- Degrandi, D., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Kresse, A., Wurthner, J., Kurig, S., Beer, S., and Pfeffer, K. (2007). Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *J Immunol* *179*, 7729-7740.

Dong, F., Sharma, J., Xiao, Y., Zhong, Y., and Zhong, G. (2004). Intramolecular dimerization is required for the chlamydia-secreted protease CPAF to degrade host transcriptional factors. *Infect Immun* 72, 3869-3875.

Everett, K.D. (2000). Chlamydia and Chlamydiales: more than meets the eye. *Vet Microbiol* 75, 109-126.

Everett, K.D., and Andersen, A.A. (1999). Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 2, 803-813.

Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H.G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296.

Fan, P., Dong, F., Huang, Y., and Zhong, G. (2002). Chlamydia pneumoniae secretion of a protease-like activity factor for degrading host cell transcription factors required for [correction of factors is required for] major histocompatibility complex antigen expression. *Infect Immun* 70, 345-349.

Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J., and Schreiber, S.L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268, 726-731.

Fields, K.A., and Hackstadt, T. (2002). The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 221-245.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Fitzgerald, D.C., Meade, K.G., McEvoy, A.N., Lillis, L., Murphy, E.P., MacHugh, D.E., and Baird, A.W. (2007). Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor kappaB (NFkappaB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 116, 59-68.

Fling, S.P., Sutherland, R.A., Steele, L.N., Hess, B., D'Orazio, S.E., Maisonneuve, J., Lampe, M.F., Probst, P., and Starnbach, M.N. (2001). CD8+ T cells recognize an inclusion membrane-associated protein from the vacuolar pathogen *Chlamydia trachomatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1160-1165.

Fonteneau, J.F., Kavanagh, D.G., Lirvall, M., Sanders, C., Cover, T.L., Bhardwaj, N., and Larsson, M. (2003). Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* 102, 4448-4455.

- Friis, R.R. (1972). Interaction of L cells and *Chlamydia psittaci*: entry of the parasite and host responses to its development. *J Bacteriol* *110*, 706-721.
- Gacko, M., Minarowska, A., Karwowska, A., and Minarowski, L. (2007). Cathepsin D inhibitors. *Folia Histochem Cytobiol* *45*, 291-313.
- Garbi, N., Tiwari, N., Momburg, F., and Hammerling, G.J. (2003). A major role for tapasin as a stabilizer of the TAP peptide transporter and consequences for MHC class I expression. *Eur J Immunol* *33*, 264-273.
- Gervassi, A.L., Grabstein, K.H., Probst, P., Hess, B., Alderson, M.R., and Fling, S.P. (2004). Human CD8+ T cells recognize the 60-kDa cysteine-rich outer membrane protein from *Chlamydia trachomatis*. *J Immunol* *173*, 6905-6913.
- Gervassi, A.L., Probst, P., Stamm, W.E., Marrazzo, J., Grabstein, K.H., and Alderson, M.R. (2003). Functional characterization of class Ia- and non-class Ia-restricted *Chlamydia*-reactive CD8+ T cell responses in humans. *J Immunol* *171*, 4278-4286.
- Giles, D.K., and Wyrick, P.B. (2008). Trafficking of chlamydial antigens to the endoplasmic reticulum of infected epithelial cells. *Microbes Infect* *10*, 1494-1503.
- Giodini, A., Rahner, C., and Cresswell, P. (2009). Receptor-mediated phagocytosis elicits cross-presentation in nonprofessional antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 3324-3329.
- Goellner, S. (2007). Molekulare Charakterisierung des Persistenzstadiums von *Chlamydophila psittaci*. Jena, Biol.-Pharm. Fak. Friedrich-Schiller-Universität, Diss.
- Goellner, S., Schubert, E., Liebler-Tenorio, E., Hotzel, H., Saluz, H.P., and Sachse, K. (2006). Transcriptional response patterns of *Chlamydophila psittaci* in different in vitro models of persistent infection. *Infect Immun* *74*, 4801-4808.
- Goldberg, A.L., and Rock, K.L. (1992). Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* *357*, 375-379.
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A., and Kuby, J. (2003). Immunology. W.H. Freeman and Company *5th ed.*, 1-17.
- Guermónprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* *425*, 397-402.
- Guex, N., and Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* *18*, 2714-2723.

Hackstadt, T., Scidmore, M.A., and Rockey, D.D. (1995). Lipid metabolism in Chlamydia trachomatis-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4877-4881.

Halberstaedter, L., and von Prowazek, S. (1907). Zur Aetiologie des Trachoms. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 33, 1285-1287.

Haller, O., and Kochs, G. (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 3, 710-717.

Han, B.H. (1999). Interferon-gamma and lipopolysaccharide induce mouse guanylate-binding protein 3 (mGBP3) expression in the murine macrophage cell line RAW264.7. *Arch Pharm Res* 22, 130-136.

Hatch, T.P. (1975). Utilization of L-cell nucleoside triphosphates by Chlamydia psittaci for ribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol* 122, 393-400.

Heuer, D., Brinkmann, V., Meyer, T.F., and Szczepek, A.J. (2003). Expression and translocation of chlamydial protease during acute and persistent infection of the epithelial HEp-2 cells with Chlamydia (Chlamydia) pneumoniae. *Cell Microbiol* 5, 315-322.

Heuer, D., Rejman Lipinski, A., Machuy, N., Karlas, A., Wehrens, A., Siedler, F., Brinkmann, V., and Meyer, T.F. (2009). Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction. *Nature* 457, 731-735.

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., and Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.

Howard, J.C. (2007). Introduction: cell-autonomous immunity. *Microbes Infect* 9, 1633-1635.

Hunn, J.P., Feng, C.G., Sher, A., and Howard, J.C. (2011). The immunity-related GTPases in mammals: a fast-evolving cell-autonomous resistance system against intracellular pathogens. *Mamm Genome* 22, 43-54.

Igietseme, J.U., Magee, D.M., Williams, D.M., and Rank, R.G. (1994). Role for CD8+ T cells in antichlamydial immunity defined by Chlamydia-specific T-lymphocyte clones. *Infect Immun* 62, 5195-5197.

Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., and Steinman, R.M. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 178, 479-488.

Jancic, C., Savina, A., Wasmeier, C., Tolmachova, T., El-Benna, J., Dang, P.M., Pascolo, S., Gougerot-Pocidallo, M.A., Raposo, G., Seabra, M.C., and Amigorena, S. (2007). Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat Cell Biol* 9, 367-378.

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2002). *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH 5. Auflage, 119.

Jendro, M.C., Fingerle, F., Deutsch, T., Liese, A., Kohler, L., Kuipers, J.G., Raum, E., Martin, M., and Zeidler, H. (2004). Chlamydia trachomatis-infected macrophages induce apoptosis of activated T cells by secretion of tumor necrosis factor-alpha in vitro. *Med Microbiol Immunol* 193, 45-52.

Jensen, P.E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* 8, 1041-1048.

Jiang, X., Shen, C., Rey-Ladino, J., Yu, H., and Brunham, R.C. (2008). Characterization of murine dendritic cell line JAWS II and primary bone marrow-derived dendritic cells in Chlamydia muridarum antigen presentation and induction of protective immunity. *Infect Immun* 76, 2392-2401.

Kawana, K., Quayle, A.J., Ficarra, M., Ibane, J.A., Shen, L., Kawana, Y., Yang, H., Marrero, L., Yavagal, S., Greene, S.J., et al. (2007). CD1d degradation in Chlamydia trachomatis-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity. *J Biol Chem* 282, 7368-7375.

Kim, B.H., Shenoy, A.R., Kumar, P., Das, R., Tiwari, S., and MacMicking, J.D. (2011a). A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science* 332, 717-721.

Kim, H.M., Yu, Y., and Cheng, Y. (2011b). Structure characterization of the 26S proteasome. *Biochim Biophys Acta* 1809, 67-79.

Kim, S.K., Angevine, M., Demick, K., Ortiz, L., Rudersdorf, R., Watkins, D., and DeMars, R. (1999). Induction of HLA class I-restricted CD8+ CTLs specific for the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis in human genital tract infections. *J Immunol* 162, 6855-6866.

Kloetzel, P.M. (2004). The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta* 1695, 225-233.

Knight, S.C., Iqbal, S., Woods, C., Stagg, A., Ward, M.E., and Tuffrey, M. (1995). A peptide of Chlamydia trachomatis shown to be a primary T-cell epitope in vitro induces cell-mediated immunity in vivo. *Immunology* 85, 8-15.

Kuo, C.C., Jackson, L.A., Campbell, L.A., and Grayston, J.T. (1995). Chlamydia pneumoniae (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 8, 451-461.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lambertz, J., Ostermann, C., Reinhold, P., Schubert, E., Sachse, K., and Liebler-Tenorio, E.M. (2011). Lungenveränderungen bei Kälbern nach intrapulmonaler Inokulation mit Chlamydia psittaci (C. psittaci). 54. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Pathologie, A3.

Lampe, M.F., Wilson, C.B., Bevan, M.J., and Starnbach, M.N. (1998). Gamma interferon production by cytotoxic T lymphocytes is required for resolution of Chlamydia trachomatis infection. *Infect Immun* 66, 5457-5461.

Lee, T.H., and Linstedt, A.D. (2000). Potential role for protein kinases in regulation of bidirectional endoplasmic reticulum-to-Golgi transport revealed by protein kinase inhibitor H89. *Mol Biol Cell* 11, 2577-2590.

Leonhardt, R.M., Fiegl, D., Rufer, E., Karger, A., Bettin, B., and Knittler, M.R. (2010). Post-endoplasmic reticulum rescue of unstable MHC class I requires proprotein convertase PC7. *J Immunol* 184, 2985-2998.

Lipscomb, M.F., and Masten, B.J. (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 82, 97-130.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25, 402-408.

Loch, S., and Tampe, R. (2005). Viral evasion of the MHC class I antigen-processing machinery. *Pflugers Arch* 451, 409-417.

Lu, H., and Zhong, G. (1999). Interleukin-12 production is required for chlamydial antigen-pulsed dendritic cells to induce protection against live Chlamydia trachomatis infection. *Infect Immun* 67, 1763-1769.

MacKay, V.L., and Moore, E.E. (1997). Immortalized Dendritic cells. United States Patent 5648219.

MacMicking, J.D. (2004). IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends Immunol* 25, 601-609.

Madden, D.R., Garboczi, D.N., and Wiley, D.C. (1993). The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* 75, 693-708.

- Magee, D.M., Williams, D.M., Smith, J.G., Bleicker, C.A., Grubbs, B.G., Schachter, J., and Rank, R.G. (1995). Role of CD8 T cells in primary Chlamydia infection. *Infect Immun* 63, 516-521.
- Manavi, K. (2006). A review on infection with Chlamydia trachomatis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 20, 941-951.
- Manders, E.M., Stap, J., Brakenhoff, G.J., van Driel, R., and Aten, J.A. (1992). Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci* 103 ( Pt 3), 857-862.
- Marino, G., and Lopez-Otin, C. (2004). Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci* 61, 1439-1454.
- Matyszak, M.K., Young, J.L., and Gaston, J.S. (2002). Uptake and processing of Chlamydia trachomatis by human dendritic cells. *Eur J Immunol* 32, 742-751.
- McClarty, G. (1994). Chlamydiae and the biochemistry of intracellular parasitism. *Trends Microbiol* 2, 157-164.
- Miyairi, I., and Byrne, G.I. (2006). Chlamydia and programmed cell death. *Curr Opin Microbiol* 9, 102-108.
- Möhle, K., Lambertz, J., Ostermann, C., Reinhold, P., Schubert, E., Sachse, K., and Liebler-Tenorio, E.M. (2011). Untersuchungen von Wirts-Erreger-Interaktionen im Respirationstrakt von Kälbern nach experimenteller aerogener Infektion mit Chlamydia psittaci (C. psittaci). 54. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Pathologie, A4.
- Morelli, A.E., Zahorchak, A.F., Larregina, A.T., Colvin, B.L., Logar, A.J., Takayama, T., Falo, L.D., and Thomson, A.W. (2001). Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood* 98, 1512-1523.
- Moulder, J.W. (1966). The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses. *Annu Rev Microbiol* 20, 107-130.
- Moulder, J.W. (1991). Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev* 55, 143-190.
- Nguyen, T.T., Hu, Y., Widney, D.P., Mar, R.A., and Smith, J.B. (2002). Murine GBP-5, a new member of the murine guanylate-binding protein family, is coordinately regulated with other GBPs in vivo and in vitro. *J Interferon Cytokine Res* 22, 899-909.
- Nissler, K., Strubel, W., Kreuzsch, S., Rommerskirch, W., Weber, E., and Wiederanders, B. (1999). The half-life of human procathepsin S. *Eur J Biochem* 263, 717-725.

- Njau, F., Wittkop, U., Rohde, M., Haller, H., Klos, A., and Wagner, A.D. (2009). In vitro neutralization of tumor necrosis factor-alpha during *Chlamydia pneumoniae* infection impairs dendritic cells maturation/function and increases chlamydial progeny. *FEMS Immunol Med Microbiol* *55*, 215-225.
- Nuchtern, J.G., Bonifacino, J.S., Biddison, W.E., and Klausner, R.D. (1989). Brefeldin A implicates egress from endoplasmic reticulum in class I restricted antigen presentation. *Nature* *339*, 223-226.
- O'Neill, H.C. (1988). Restricted blocking of cytotoxic T-cell function by anti-H-2K/D antibodies. *Immunology* *63*, 241-246.
- Ojcius, D.M., Bravo de Alba, Y., Kanellopoulos, J.M., Hawkins, R.A., Kelly, K.A., Rank, R.G., and Dautry-Varsat, A. (1998). Internalization of *Chlamydia* by dendritic cells and stimulation of *Chlamydia*-specific T cells. *J Immunol* *160*, 1297-1303.
- Osborne, A.R., Rapoport, T.A., and van den Berg, B. (2005). Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol* *21*, 529-550.
- Perfettini, J.L., Darville, T., Gachelin, G., Souque, P., Huerre, M., Dautry-Varsat, A., and Ojcius, D.M. (2000). Effect of *Chlamydia trachomatis* infection and subsequent tumor necrosis factor alpha secretion on apoptosis in the murine genital tract. *Infect Immun* *68*, 2237-2244.
- Peters, J., Wilson, D.P., Myers, G., Timms, P., and Bavoil, P.M. (2007). Type III secretion in *Chlamydia*. *Trends Microbiol* *15*, 241-251.
- Pirbhai, M., Dong, F., Zhong, Y., Pan, K.Z., and Zhong, G. (2006). The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *J Biol Chem* *281*, 31495-31501.
- Pospischil, A., Thoma, R., Hilbe, M., Grest, P., and Gebbers, J.O. (2002). Abortion in woman caused by caprine *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). *Swiss Med Wkly* *132*, 64-66.
- Raghavan, M., Del Cid, N., Rizvi, S.M., and Peters, L.R. (2008). MHC class I assembly: out and about. *Trends Immunol* *29*, 436-443.
- Rammensee, H.G., Falk, K., and Rotzschke, O. (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* *11*, 213-244.
- Rasmussen, S.J., Eckmann, L., Quayle, A.J., Shen, L., Zhang, Y.X., Anderson, D.J., Fierer, J., Stephens, R.S., and Kagnoff, M.F. (1997). 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.

- Reid, P.A., and Watts, C. (1990). Cycling of cell-surface MHC glycoproteins through primaquine-sensitive intracellular compartments. *Nature* *346*, 655-657.
- Rejman Lipinski, A., Heymann, J., Meissner, C., Karlas, A., Brinkmann, V., Meyer, T.F., and Heuer, D. (2009). Rab6 and Rab11 regulate *Chlamydia trachomatis* development and golgin-84-dependent Golgi fragmentation. *PLoS Pathog* *5*, e1000615.
- Renart, J., Reiser, J., and Stark, G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 3116-3120.
- Rey-Ladino, J., Jiang, X., Gabel, B.R., Shen, C., and Brunham, R.C. (2007). Survival of *Chlamydia muridarum* within dendritic cells. *Infect Immun* *75*, 3707-3714.
- Rey-Ladino, J., Koochesfahani, K.M., Zaharik, M.L., Shen, C., and Brunham, R.C. (2005). A live and inactivated *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis strain induces the maturation of dendritic cells that are phenotypically and immunologically distinct. *Infect Immun* *73*, 1568-1577.
- Roan, N.R., and Starnbach, M.N. (2008). Immune-mediated control of *Chlamydia* infection. *Cell Microbiol* *10*, 9-19.
- Rock, K.L., Farfan-Arribas, D.J., and Shen, L. (2010). Proteases in MHC class I presentation and cross-presentation. *J Immunol* *184*, 9-15.
- Rockey, D.D., Fischer, E.R., and Hackstadt, T. (1996). Temporal analysis of the developing *Chlamydia psittaci* inclusion by use of fluorescence and electron microscopy. *Infect Immun* *64*, 4269-4278.
- Rohde, G., Straube, E., Essig, A., Reinhold, P., and Sachse, K. (2010). Chlamydial zoonoses. *Dtsch Arztebl Int* *107*, 174-180.
- Rossi, M., and Young, J.W. (2005). Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* *175*, 1373-1381.
- Rufer, E., Leonhardt, R.M., and Knittler, M.R. (2007). Molecular architecture of the TAP-associated MHC class I peptide-loading complex. *J Immunol* *179*, 5717-5727.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* *182*, 389-400.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2002). The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res 4 Suppl 3*, S127-132.

Saper, M.A., Bjorkman, P.J., and Wiley, D.C. (1991). Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 219, 277-319.

Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I.C., Lennon-Dumenil, A.M., Seabra, M.C., Raposo, G., and Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 126, 205-218.

Scidmore, M.A., Fischer, E.R., and Hackstadt, T. (2003). Restricted fusion of *Chlamydia trachomatis* vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. *Infect Immun* 71, 973-984.

Shaw, E.I., Dooley, C.A., Fischer, E.R., Scidmore, M.A., Fields, K.A., and Hackstadt, T. (2000). Three temporal classes of gene expression during the *Chlamydia trachomatis* developmental cycle. *Mol Microbiol* 37, 913-925.

Shen, L., and Rock, K.L. (2006). Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 18, 85-91.

Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M., and Rock, K.L. (2004). Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21, 155-165.

Shortman, K., and Liu, Y.J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-161.

Staeheli, P., Haller, O., Boll, W., Lindenmann, J., and Weissmann, C. (1986). Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* 44, 147-158.

Starnbach, M.N., Loomis, W.P., Owendale, P., Regan, D., Hess, B., Alderson, M.R., and Fling, S.P. (2003). An inclusion membrane protein from *Chlamydia trachomatis* enters the MHC class I pathway and stimulates a CD8<sup>+</sup> T cell response. *J Immunol* 171, 4742-4749.

Steele, L.N., Balsara, Z.R., and Starnbach, M.N. (2004). Hematopoietic cells are required to initiate a *Chlamydia trachomatis*-specific CD8<sup>+</sup> T cell response. *J Immunol* 173, 6327-6337.

Su, H., Messer, R., Whitmire, W., Fischer, E., Portis, J.C., and Caldwell, H.D. (1998). Vaccination against chlamydial genital tract infection after immunization with dendritic cells pulsed ex vivo with nonviable *Chlamydiae*. *J Exp Med* 188, 809-818.

Taylor, G.A., Feng, C.G., and Sher, A. (2004). p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* 4, 100-109.

- Tietzel, I., El-Haibi, C., and Carabeo, R.A. (2009). Human guanylate binding proteins potentiate the anti-chlamydia effects of interferon-gamma. *PLoS One* *4*, e6499.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 4350-4354.
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M., and Parton, R.G. (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* *135*, 913-924.
- Valdivia, R.H. (2008). Chlamydia effector proteins and new insights into chlamydial cellular microbiology. *Curr Opin Microbiol* *11*, 53-59.
- van den Elsen, P.J., and Gobin, S.J. (1999). The common regulatory pathway of MHC class I and class II transactivation. *Microbes Infect* *1*, 887-892.
- van Ooij, C., Kalman, L., van, I., Nishijima, M., Hanada, K., Mostov, K., and Engel, J.N. (2000). Host cell-derived sphingolipids are required for the intracellular growth of *Chlamydia trachomatis*. *Cell Microbiol* *2*, 627-637.
- Vanrompay, D., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F. (1992). Diagnosis of avian chlamydiosis: specificity of the modified Gimenez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures. *Zentralbl Veterinarmed B* *39*, 105-112.
- Vanrompay, D., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F. (1995). *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet Microbiol* *45*, 93-119.
- Vestal, D.J. (2005). The guanylate-binding proteins (GBPs): proinflammatory cytokine-induced members of the dynamin superfamily with unique GTPase activity. *J Interferon Cytokine Res* *25*, 435-443.
- Wizel, B., Nystrom-Asklin, J., Cortes, C., and Tvinnereim, A. (2008). Role of CD8(+)T cells in the host response to *Chlamydia*. *Microbes Infect* *10*, 1420-1430.
- Wizel, B., Starcher, B.C., Samten, B., Chroneos, Z., Barnes, P.F., Dzuris, J., Higashimoto, Y., Appella, E., and Sette, A. (2002). Multiple *Chlamydia pneumoniae* antigens prime CD8+ Tc1 responses that inhibit intracellular growth of this vacuolar pathogen. *J Immunol* *169*, 2524-2535.
- Wright, C.A., Kozik, P., Zacharias, M., and Springer, S. (2004). Tapasin and other chaperones: models of the MHC class I loading complex. *Biol Chem* *385*, 763-778.
- Yamamoto, K. (1994). Microbial endoglycosidases for analyses of oligosaccharide chains in glycoproteins. *J Biochem* *116*, 229-235.

Yasir, M., Pachikara, N.D., Bao, X., Pan, Z., and Fan, H. (2011). Regulation of Chlamydial Infection by Host Autophagy and Vacuolar ATPase-bearing Organelles. *Infect Immun.*

Zhong, G. (2009). Killing me softly: chlamydial use of proteolysis for evading host defenses. *Trends Microbiol* *17*, 467-474.

Zhong, G., Fan, P., Ji, H., Dong, F., and Huang, Y. (2001). Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J Exp Med* *193*, 935-942.

Zhong, G., Fan, T., and Liu, L. (1999). Chlamydia inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *J Exp Med* *189*, 1931-1938.

Zhong, G., Liu, L., Fan, T., Fan, P., and Ji, H. (2000). Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I expression in chlamydia-infected cells. *J Exp Med* *191*, 1525-1534.

Zuniga, E.I., McGavern, D.B., Pruneda-Paz, J.L., Teng, C., and Oldstone, M.B. (2004). Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat Immunol* *5*, 1227-1234.

Zwickey, H.L., and Potter, T.A. (1999). Antigen secreted from noncytosolic *Listeria monocytogenes* is processed by the classical MHC class I processing pathway. *J Immunol* *162*, 6341-6350.

# Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung des Chlamydientiters	42
---	----

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gegenüberstellung der alten und neuen Systematik	2
Tabelle 2: Zytokine und Chemokine des Zytokin-Arrays	74
Tabelle 3: Zytokine und Chemokine des Bio-Plex Assays	83

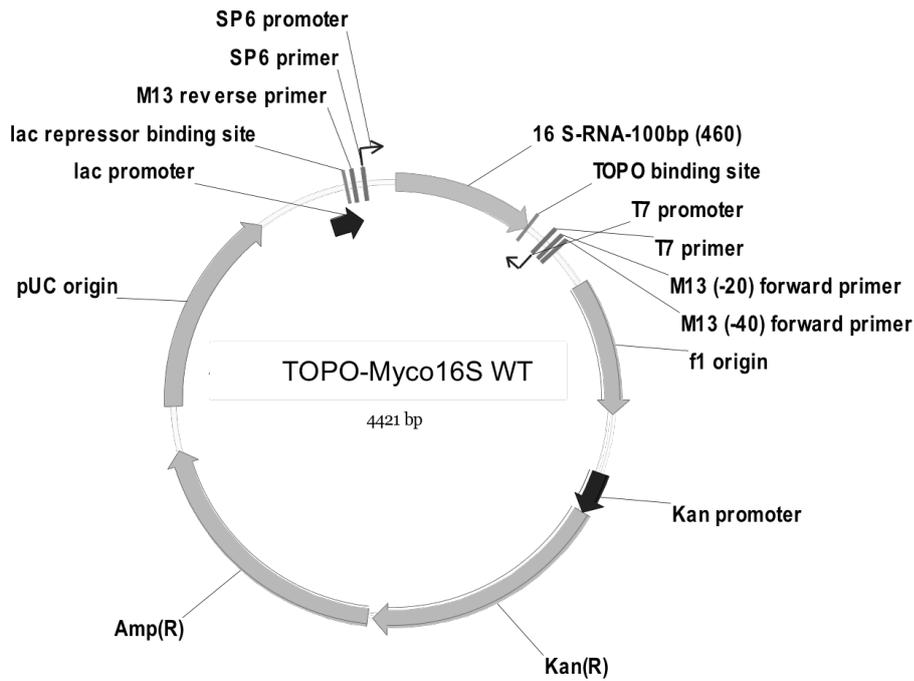
# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklungszyklus der Chlamydien	4
Abbildung 2: Struktur des MHC I-Moleküls	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der klassischen MHC I-Antigenpräsentation	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung der MHC I-Kreuzpräsentation dendritischer Zellen	20
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Antigenpräsentations-Assays	60
Abbildung 6: Immunisierungsschema	63
Abbildung 7: Gewichtsverlauf nach Chlamydieninfektion von C57BL/6-Mäusen	67
Abbildung 8: Histologische Untersuchungen der Lunge 4 Tage nach der Infektion mit Chlamydien	69
Abbildung 9: Expressionslevel verschiedener Zytokine und Chemokine im Serum nach Infektion	70
Abbildung 10: Gewichtsverlauf nach EB-Immunisierung von C57BL/6-Mäusen	72
Abbildung 11: Expressionslevel verschiedener Zytokine und Chemokine im Serum nach EB- Immunisierung	73
Abbildung 12: Reinheit der CD8+ T-Zellen aus der Milz	76
Abbildung 13: Lichtmikroskopische Aufnahme des Antigenpräsentations-Assays	76
Abbildung 14: IFN- $\gamma$ -Sekretion verschiedener CD8+ T-Zellpopulationen nach Kokultivierung mit DCs	77
Abbildung 15: Morphologische Differenzierung der DCs nach Infektion mit Chlamydien	79
Abbildung 16: Reduktion der Phagozytoseaktivität von DCs nach Chlamydieninfektion	80
Abbildung 17: Von DCs sezernierte Zytokine nach Chlamydieninfektion in der Zellkultur	81
Abbildung 18: Regulation der DC-Oberflächenmarker nach Infektion mit Chlamydien in JAWSII	84

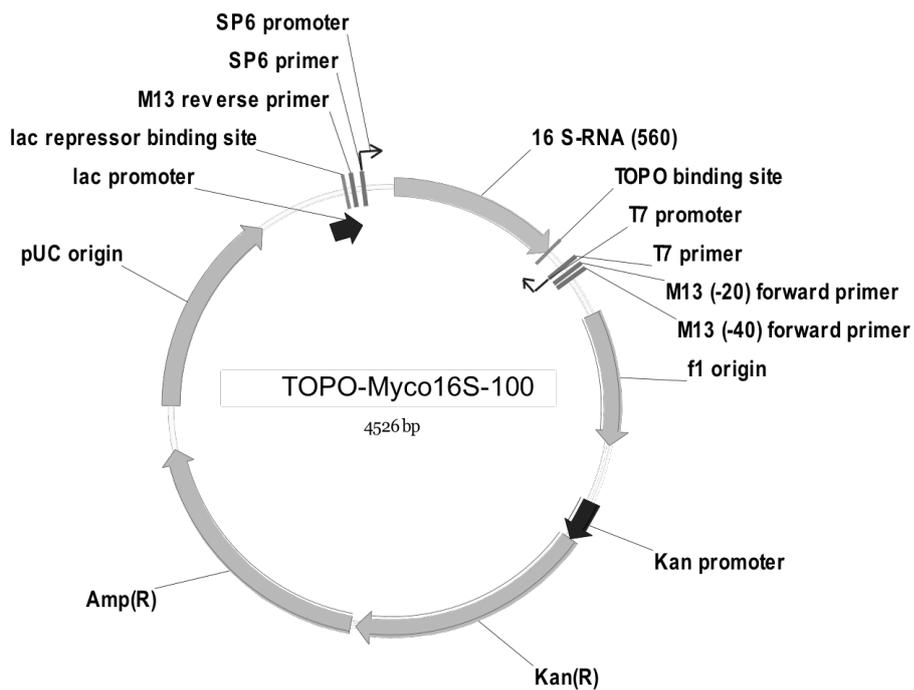
Abbildung 19: Morphologie der Einschlüsse in DCs und Epithelzellen	86
Abbildung 20: Transkriptmenge chlamydialer Gene in JAWSII und MN-R	88
Abbildung 21: Vermehrung der Chlamydien in DCs und Epithelzellen	89
Abbildung 22: Expression von CPAF in JAWSII und MN-R	90
Abbildung 23: Lokalisation von CPAF in JAWSII und MN-R	91
Abbildung 24: Expression von GBP1	93
Abbildung 25: Kolokalisation von GBP1 mit Chlamydieneinschlüssen	95
Abbildung 26: Transkription von groEL nach GBP1-siRNA-Transfektion	96
Abbildung 27: TEM-Aufnahme einer infizierten JAWSII-Zelle	98
Abbildung 28: Kolokalisation von Chlamydien mit endosomalen Kompartimenten	99
Abbildung 29: Expression der Komponenten der MHC I-Antigenpräsentation in JAWSII	100
Abbildung 30: Expressionsmuster der beiden MHC I-Moleküle in JAWSII	101
Abbildung 31: Lokalisation der beiden MHC I-Moleküle in JAWSII	102
Abbildung 32: MHC I-Oberflächenstabilität	104
Abbildung 33: MHC I-Recycling	105
Abbildung 34: Expression der Komponenten des MHC I-Beladekomplexes nach Infektion in JAWSII	107
Abbildung 35: Expression der Komponenten des MHC I-Beladekomplexes nach Infektion in MN-R	108
Abbildung 36: Auswirkungen der Neutralisation von TNF- $\alpha$ auf den MHC I-Beladekomplex	109
Abbildung 37: Effekt von TNF- $\alpha$ auf die zelluläre Lokalisation von NF $\kappa$ B	110
Abbildung 38: Lokalisation der MHC I-Moleküle nach Infektion in JAWSII	112
Abbildung 39: Deglykosylierung mit PNGase F	113
Abbildung 40: MHC I-Oberflächenexpression in JAWSII nach Infektion mit Chlamydien	114
Abbildung 41: H2-K <sup>b</sup> -Oberflächenexpression von JAWSII nach Chlamydieninfektion	116
Abbildung 42: Kolokalisation von H2-K <sup>b</sup> -Molekülen mit Endosomen nach Infektion mit Chlamydien	118
Abbildung 43: Kolokalisation von H2-K <sup>b</sup> und H2-D <sup>b</sup> mit Recycling-Kompartimenten nach Chlamydieninfektion	120
Abbildung 44: Kolokalisation von TAP und Cathepsin D-positiven Kompartimenten in JAWSII	121
Abbildung 45: Überprüfung der siRNA-Stabilität	123
Abbildung 46: Ergebnis der Antigenpräsentations-Assays	126
Abbildung 47: Arbeitsmodell zu den intrazellulären Prozessen der MHC I-Antigenpräsentation in Chlamydien-infizierten DCs	145

# Anhang

## Mykoplasmentest: Positivkontrolle



## Mykoplasmentest: Interne Kontrolle



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben, herzlich bedanken.

Herrn **Prof. Dr. Lothar Stitz** danke ich dafür, dass er mir die Möglichkeit gab diese Arbeit am Friedrich-Loeffler-Institut Tübingen, Institut für Immunologie, durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **PD Dr. Michael Knittler** für die großartige Betreuung dieser Arbeit. Danke für deine Begeisterungsfähigkeit, dein großes Engagement und deine Offenheit gegenüber allen Fragen und Anregungen.

Herrn **Prof. Dr. Friedrich Götz** danke ich für die freundliche Unterstützung, sein Interesse an der Arbeit und für die Bereitschaft die vorliegende Dissertation zu begutachten.

Für die gute Zusammenarbeit bei den histologischen Untersuchungen sowie den TEM-Aufnahmen danke ich ganz herzlich Frau **Prof. Dr. Elisabeth Liebler-Tenorio**. Auch Herrn **Dr. Konrad Sachse** sei für die Bereitstellung der Chlamydienstämme und Zelllinien herzlich gedankt.

Ganz besonders möchte ich mich bei **Tanja Weißer** für die tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken. Danke auch für deine beispiellos unkomplizierte Art, die so mancher brenzlichen Situation einfach den Wind aus den Segeln nimmt.

**Elke Rufer** gilt mein besonderer Dank für die freundliche Einarbeitung in zahlreiche Methoden und für die vielen hilfreichen Kniffe, die mir den Laboralltag erleichtert haben.

Allen „**Knittler-Damen**“, Antje, Corina, Madeleine, Tanja und Elke, danke ich für die oftmals lautstarke „Riesengaudi“ innerhalb und auch außerhalb der Anstalt. Wir hatten wirklich eine super Zeit zusammen, an die ich mich immer gern erinnern werde.

Außerdem danke ich allen **Mitarbeitern des FLI Tübingen** für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die außerordentliche Hilfsbereitschaft bei allen praktischen Hindernissen und theoretischen Fragen.

Meiner **Familie** und allen „**Rote-Kringel**“-**Menschen** danke ich ganz herzlich für die liebevolle Unterstützung während der letzten Jahre, für Energiepakete und aufbauende Worte. Außerdem danke ich euch dafür, dass ihr an mich glaubt, meine Erfolge mit mir feiert und immer wieder für den nötigen Ausgleich sorgt.