

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene

***Chlamydophila pneumoniae* beeinflusst die Oberflächenexpression von
MHC Klasse II durch Zelltyp-spezifische Mechanismen**

GEORG H. PESCHEL

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Th.Chr. Miethke
2. Univ.-Prof. Dr. D. Busch
3. Univ.-Prof. Dr. U. Protzer

Die Dissertation wurde am 12.03.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.09.2012 angenommen.

Zusammenfassung

Chlamydomphila pneumoniae ist ein obligat intrazelluläres Bakterium, welches zu Erkrankungen des oberen Respirationstraktes führen kann. Als solches hat *Chlamydomphila pneumoniae* Strategien entwickelt, die Immunantwort des Wirtes zu umgehen. In Zellen wie Fibroblasten, welche den vollen Entwicklungszyklus von *Chlamydomphila pneumoniae* ermöglichen, konnte im Zytosol der infizierten Zellen die Protease CPAF (chlamydial protease-like activity factor) nachgewiesen werden, welche die IFN γ -induzierte Hochregulation von MHC Klasse II-Molekülen verhindert. Dies geschieht durch Degradierung des USF-1 (upstream stimulatory factor 1), welcher für die Transkription des MHC Klasse II in diesen Zellen notwendig ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in professionell antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, in denen die Entwicklung von *Chlamydomphila pneumoniae* nur eingeschränkt möglich ist, ein Toll-like Rezeptor-abhängiger, PAMP-gesteuerter Mechanismus ebenfalls eine IFN γ -induzierte Hochregulation von MHC Klasse II verhindern kann. In mit *Chlamydomphila pneumoniae* infizierten primären Knochenmarksmakrophagen verhindert sowohl lebendige als auch hitzeinaktivierte *Chlamydomphila pneumoniae* abhängig von MyD88 die IFN γ -induzierte Hochregulation von MHC Klasse II. Dies konnte sowohl für die Oberflächenexpression von MHC Klasse II, für den zytosolischen MHC Klasse II-Komplex als auch für die MHC Klasse II-mRNA demonstriert werden. Dieser Effekt wird teilweise durch die MAP-Kinase p38 vermittelt. Gleiche Effekte auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II konnten für die Stimulation von infizierten Makrophagen mit den TLR-Liganden LPS und CpG gezeigt werden.

Cpaf-mRNA konnte in den Makrophagen im Gegensatz zu Fibroblasten nicht nachgewiesen werden und USF-1 wurde nach Infektion mit *Chlamydomphila pneumoniae* nicht degradiert sondern vielmehr induziert. Nach Transfektion der Makrophagen mit rekombinantem CPAF-Protein wurde USF-1 hingegen degradiert. Somit konnte in primären Knochenmarksmakrophagen ein von CPAF unabhängiger, PAMP-gesteuerter und TLR-abhängiger Effekt auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II beschrieben werden.

In Fibroblasten (mouse embryonic fibroblasts), in denen sich Chlamydien zu ihrer metabolisch aktiven Form entwickelten, konnte *cpaf*-mRNA nachgewiesen und die vorbeschriebene Degradierung von USF-1 bestätigt werden. Die IFN γ -induzierte Oberflächenexpression von MHC Klasse II wurde ebenfalls verhindert. Allerdings konnte auch hier nach Stimulation der Zellen mit hitzeinaktivierten Chlamydien ein zusätzlicher MyD88-abhängiger Mechanismus beobachtet werden, der ebenfalls zu einer teilweisen Reduktion der IFN γ -induzierten Oberflächenexpression von MHC Klasse II führt.

So konnten für professionelle antigenpräsentierende Zellen und Fibroblasten zwei unterschiedliche Mechanismen beschrieben werden, wie *Chlamydomphila pneumoniae* einer Immunantwort durch den

Wirt entgeht: 1) ein Toll-like-vermittelter, PAMP-abhängiger Mechanismus in Makrophagen und 2) zusätzlich ein CPAF-vermittelter Effekt in Fibroblasten.

Schlagwörter:

Chlamydophila pneumoniae, MHC Klasse II, chlamydial protease-like activity factor,

Toll-like Rezeptor

Abstract

Chlamydomonas reinhardtii, an obligate intracellular bacterium, was shown to prevent IFN γ -inducible upregulation of MHC class II molecules by secreting chlamydial protease-like activity factor (CPAF) into the cytosol of those host cells, which support the complete bacterial replication cycle. CPAF acts by degrading upstream stimulatory factor 1 (USF-1).

We could demonstrate that in professional antigen presenting cells like bone marrow derived macrophages, in which chlamydial replication is restricted, a PAMP driven mechanism prevents IFN γ -inducible upregulation of MHC class II molecules. There, CPAF expression is barely detectable, the expression of USF-1 is induced by chlamydial infection, heat inactivated as well as living *Chlamydomonas reinhardtii* prevents IFN γ -inducible upregulation of MHC class II molecules and MyD88 is required. This was demonstrated for MHC expression on the cell surface, for cytosolic MHC class II complex and for MHC class II mRNA. Similar results for cell surface expression of MHC class II were obtained by stimulating cells with Toll-like receptor ligands CpG and LPS.

Infection of mouse embryonic fibroblasts with *Chlamydomonas reinhardtii*, which allows chlamydial replication, induces the expression of CPAF and decreases USF-1 and MHC class II expression. Treatment of these cells with heat inactivated *Chlamydomonas reinhardtii* reduces MHC class II expression to a much lower extent. Thus MHC class II expression is suppressed by two mechanisms in this cell type.

In summary, *Chlamydomonas reinhardtii* downregulates MHC class II by two cell type specific mechanisms which are either CPAF independent and MyD88 dependent as observed in bone marrow derived macrophages or CPAF dependent as observed in mouse embryonic fibroblasts.

Keywords:

Chlamydomonas reinhardtii, MHC class II, chlamydial protease-like activity factor,

Toll-like receptor

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Abstract	4
Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	12
1.1 Immunsystem	12
1.1.1 Angeborenes Immunsystem	12
1.1.2 Toll-like Rezeptoren	13
1.1.3 Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II	16
1.1.4 TH1- und TH2-Antwort	18
1.2 <i>Chlamydomonas pneumoniae</i>	19
1.2.1 Epidemiologie	19
1.2.2 Eigenschaften von <i>Chlamydomonas pneumoniae</i>	21
1.3 <i>Chlamydomonas</i> und Immunsystem	22
1.3.1 Wechselwirkungen zwischen Wirt und Erreger	22
1.3.2 Beeinflussung der Oberflächenexpression von MHC Klasse II durch Chlamydien	23
1.3.3 Chlamydien und TLRs	25
1.4 Ziele der Arbeit	25
2 Material	27
2.1 Geräte	27
2.2 Chemikalien	28
2.2.1 Allgemein	28
2.2.2 Klonierung von DNA	29
2.2.3 Stimulation von Zellen	30
2.3 Kommerzielle Kits	30
2.4 Zellmedien	31
2.4.1 Mouse Embryonic Fibroblasts	31

2.4.2	Bone Marrow Derived Macrophages	31
2.5	Lösungen und Puffer	31
2.6	Zellen	33
2.6.1	Chlamydien	33
2.6.2	<i>E. coli</i> Stämme	33
2.6.3	Mäuse	34
2.7	Nachweis von Proteinen	34
2.7.1	Durchflusszytometrie	34
2.7.2	Konfokale Mikroskopie	35
2.7.3	Western Blot	35
2.7.3.1	Primäre Antikörper	35
2.7.3.2	Sekundäre Antikörper	36
2.8	Nachweis von RNA/DNA	36
2.8.1	Klonierung	36
2.8.2	Reverse Transkriptase-PCR	36
2.9	Sonstige Materialien	37
3	Methoden	38
3.1	Gewinnung von BMDMs (Bone Marrow Derived Macrophages)	38
3.2	Gewinnung von MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts)	38
3.3	<i>Chlamydomophila pneumoniae</i>	39
3.3.1	Anzucht von <i>Chlamydomophila pneumoniae</i>	39
3.3.2	Inaktivierung von <i>Chlamydomophila pneumoniae</i>	40
3.3.3	Infektion von Zellen mit <i>Chlamydomophila pneumoniae</i>	40
3.4	Durchflusszytometrie/FACS (Fluorescence Activated Cell Staining)	41
3.5	Western Blot	42
3.6	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	44
3.7	Reverse Transkriptase-PCR und Echtzeit-PCR	45
3.7.1	RNA-Isolation	45
3.7.2	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	46
3.7.3	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion aus cDNA	48

3.8	Proteingewinnung und Transfektion von BMDMs	49
3.8.1	Proteingewinnung	49
3.8.2	Klonierung von CPAF aus <i>Chlamydomophila</i> -DNA	49
3.8.3	Expression und Purifikation von CPAF	51
3.8.4	Transfektion von CPAF in BMDMs mittels DOTAP als Träger	52
3.9	Konfokale Mikroskopie	53
3.10	Statistische Analysen	53
4	Ergebnisse	54
4.1	<i>Chlamydomophila pneumoniae</i> reduziert die Oberflächenexpression von MHC Klasse II in BMDMs	54
4.1.1	PAMPs von <i>Chlamydomophila pneumoniae</i> verhindern die IFN γ -induzierte Hochregulation der Oberflächenexpression von MHC Klasse II in BMDMs	54
4.1.2	<i>Chlamydomophila pneumoniae</i> verhindert die IFN γ -induzierte Hochregulation des MHC Klasse II-Proteinkomplexes im Zytosol	59
4.1.3	<i>Chlamydomophila pneumoniae</i> verhindert die IFN γ -induzierte Hochregulation der MHC Klasse II-mRNA	60
4.2	<i>Chlamydomophila pneumoniae</i> kann typische Inklusionen nur in MEFs ausbilden, nicht aber in BMDMs	61
4.3	Lebende <i>Chlamydomophila pneumoniae</i> verhindert die IFN γ -induzierte Stimulation von MHC Klasse II in MEFs	64
4.4	Durch eine Infektion mit <i>Chlamydomophila pneumoniae</i> wird USF-1 in MEFs degradiert, nicht aber in BMDMs	66
4.4.1	<i>Chlamydomophila pneumoniae</i> degradiert USF-1 in MEFs	66
4.4.2	<i>Chlamydomophila pneumoniae</i> induziert USF-1 in BMDM s	68
4.5	<i>Chlamydomophila pneumoniae</i> bildet <i>cpaf</i> -mRNA in MEFs, nicht aber in BMDMs	70
4.5.1	<i>Chlamydomophila pneumoniae</i> bildet keine <i>cpaf</i> -mRNA in WT BMDMs	70
4.5.2	<i>Chlamydomophila pneumoniae</i> bildet <i>cpaf</i> -mRNA in MEFs	71
4.6	Rekombinantes CPAF degradiert USF-1 in BMDMs	72
4.7	<i>Chlamydomophila pneumoniae</i> führt in MEFs, aber nicht in BMDMs, zur Sekretion des CXC-Chemokins MIG	74

4.7.1	<i>Chlamydomophila pneumoniae</i> induziert die Sekretion von MIG in MEFs	74
4.7.2	IFN γ induziert die Sekretion von MIG in BMDMs unabhängig von <i>Chlamydomophila pneumoniae</i>	75
5	Diskussion	77
5.1	Stoffwechsel von <i>Chlamydomophila pneumoniae</i> in Makrophagen	77
5.1.1	Bildung von <i>cpaf</i> -mRNA in Makrophagen	78
5.1.2	Einfluss von <i>Chlamydomophila pneumoniae</i> auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II in Makrophagen	79
5.1.3	Degradierung von USF-1 durch CPAF in Makrophagen	81
5.2	Einfluss von <i>Chlamydomophila pneumoniae</i> auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II in MEFs	82
5.3	Sekretion des CXC-Chemokins MIG	84
	Literaturverzeichnis	87
	Danksagung	96
	Eidesstattliche Erklärung	97

Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AK	Antikörper
AP-1	activator protein 1
APC	antigen presenting cells
BMDM	bone marrow derived macrophage
CAP	community acquired pneumonia
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CLIP	class II-associated invariant chain peptide
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CP	<i>Chlamydomytila pneumoniae</i>
CPAF	chlamydial protease-like activity factor
CpG	Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin
CIITA	class 2 transactivator
dsRNA	Doppelstrang-Ribonukleinsäure
EB	Elementarkörperchen
ER	endoplasmatisches Retikulum
HICP	hitzeinaktivierte <i>Chlamydomytila pneumoniae</i>
IB	Inklusionskörperchen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP10	interferon induced protein 10
IRF	Interferon regulatory factor

JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
MAP-Kinase	mitogenaktivierte Proteinkinase
Mbp	Megabasenpaar
MEF	mouse embryonic fibroblast
MHC	major histocompatibility complex
MIG	monokine induced by interferon gamma
Mock	Vergleichsprobe unbehandelter Zellen
MOI	multiplicity of infection
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
mRNA	messenger RNA
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OmpA	outer membrane protein A
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PI	Protease-Inhibitor
RB	Retikularkörperchen
16S rRNA	16 S ribosomale Ribonukleinsäure
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
TCR	T-cell receptor
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TRAF	TNF-receptor associated protein
TRAM	TRIF related adaptor molecule
TRIF	Toll-receptor associated activator of interferon
TNF	Tumornekrosefaktor

USF-1 upstream stimulatory factor 1

WT Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

Der menschliche Körper ist, wie jeder Vielzeller, ein komplexer Organismus, der durch Kontakt mit seiner Umwelt ständiger Fremdeinwirkung ausgesetzt ist, welche es abzuwehren gilt. Im Laufe der Evolution führte diese Konfrontation zur Entwicklung mehrerer Abwehrmechanismen, die zusammen das Immunsystem bilden. Die einzelnen Teile des Immunsystems findet man in allen Bereichen des Körpers, sie sind lernfähig und gegenüber sich selbst tolerant. Dieses Abwehrsystem lässt sich in 2 Kategorien unterteilen: die angeborene und die erworbene Immunität. Die angeborene Immunität wirkt sofort nach Eindringen des Fremdkörpers, ist jedoch relativ unspezifisch. Die erworbene Immunität wirkt etwas zeitversetzt, da antigenspezifische Zellen zunächst expandieren müssen, ist aber hochspezifisch und effizient.

1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Die angeborene Immunität dient dem Körper als Basisabwehr gegen eindringende Mikroorganismen. Erreger treffen nach dem Überwinden der äußeren und physikalischen Barrieren, wie Schleim und Schleimhäute, auf humorale Komponenten und auf die zellulären Träger der angeborenen Immunität [Janeway, 2002, 39-46]. Diese erkennen die Keime an pathogenassoziierten molekularen Mustern (PAMPs), die sich im Laufe der Evolution als typische Strukturen von Mikroorganismen erwiesen haben. Ist eine solche Struktur als körperfremd identifiziert, werden zuerst Fresszellen aktiviert, die den Erreger durch Phagozytose aufnehmen und eliminieren. Später kommt die antigenspezifische Abwehr zu tragen [Janeway, 2002, 72-73].

Die Zellen des Immunsystems werden im Knochenmark gebildet und lassen sich in lymphatische und myeloiden Vorläuferzellen unterteilen. Die angeborene Immunität bietet den frühen Schutz des Organismus vor eindringenden Keimen und wird durch mononukleäre Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten vermittelt.

Lymphozyten reifen im lymphatischen Gewebe aus und stellen die Zellen der erworbenen Immunität dar. Sie werden in zwei Subtypen gegliedert: B-Lymphozyten produzieren lösliche Antikörper, T-Lymphozyten reifen im Thymus und bilden die zelluläre Komponente der erworbenen, spezifischen Abwehr. Die T-Zellen unterteilen sich wiederum in verschiedene Untertypen: T-Helferzellen (CD4-T-

Zellen) kommunizieren mit professionellen antigenpräsentierenden Zellen und stimulieren die Immunantwort durch Wechselwirkung mit B-Lymphozyten. Zytotoxische T-Zellen (CD8-Zellen) erkennen von Viren befallene Zellen an spezifischen Bestandteilen des Virus (Antigene), welche von MHC Klasse I-Molekülen an der Oberfläche der befallenen Zelle präsentiert werden. Durch die Interaktion mit MHC Klasse I werden die zytotoxischen T-Zellen aktiviert und können den Zelltod (Apoptose) der befallenen Zelle auslösen [Janeway,2002, 29-31].

Makrophagen und dendritischen Zellen kommt eine besondere Rolle als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) zu. Sie sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität und können im aktivierten Zustand zur Beseitigung aufgenommener Pathogene führen. Die Besonderheit dieser Zellen besteht darin, dass sie Bestandteile des phagozytierten Pathogens über spezielle MHC-Rezeptoren nach außen präsentieren können. Diese Antigene können von den T-Zellen des erworbenen Immunsystems erkannt werden [Janeway, 2002, 174-175]. Durch die Wechselwirkung zwischen T-Zellen und APC werden beide Zelltypen aktiviert und geben Zytokine ab, welche das Immunsystem zu einer stärkeren Antwort gegen den Fremdkörper aktivieren. Zytokine sind Botenstoffe, die zur Kommunikation zwischen den unterschiedlichen Zellen des Immunsystems dienen. Somit stellen Makrophagen und dendritische Zellen eine zentrale Komponente zur Vermittlung zwischen angeborener und erworbener Immunität dar.

Neben der zellulären Immunantwort nützt der Organismus auch nicht-zelluläre, lösliche Stoffe im Blut, welche direkt zur frühen, unspezifischen Abwehr von eindringenden Mikroorganismen führen. Hochwirksame Faktoren sind das Komplementsystem, welches zur Bindung und Lyse von fremden Partikeln führt, und Zytokine wie die Gruppe der Interferone. Diese hemmen die Vermehrung von intrazellulären Mikroorganismen und verstärken die eingeleiteten Abwehrmechanismen.

1.1.2 Toll-like Rezeptoren

1997 wurden Proteine des angeborenen Immunsystems identifiziert, welche als spezielle signalgebende Mustererkennungsrezeptoren, über eine Signalkaskade zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen führen. Diese Familie von Proteinen ähnelt dem Toll-Rezeptor, welcher erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila* beschrieben wurde und gleicht diesem, sowie dem Interleukin 1(IL 1) Rezeptor in der sogenannten Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) -Domäne. Daher werden diese Proteine als Toll-like Rezeptoren (TLR) bezeichnet. Fremde Muster, PAMPs (pathogen associated molecular patterns), werden von TLRs erkannt. Dies führt über verschiedene Schritte zur Aktivierung von NFκB und zur Induktion von Genen im Zellkern, welche für Proteine der Entzündungs- und Immunantwort kodieren. TLRs sollen fremde Strukturen von körpereigenen Molekülen unterscheiden, und dabei ein möglichst großes Spektrum von mikrobiologischen Keimen erkennen. Für den Menschen wurden bis-

lang 10 relevante TLRs charakterisiert, die obwohl sie unterschiedliche Muster erkennen, bei der Signaltransduktion Gemeinsamkeiten aufzeigen. So besitzen alle TLRs eine spezifische extrazelluläre Bindungsstelle, welche im Gegensatz zu dem extrazellulären IL1-Rezeptor weniger dem IgG ähnelt, sondern leuzinreiche, sich wiederholende Abschnitte enthält, an die das entsprechende PAMP spezifisch bindet. Die am besten erforschten TLRs sind TLR4, 3 und 9, welche bakterielles LPS, virale dsRNA und CpG erkennen. CpG ist ein nicht-methyliertes Cytosin-Guanin-Dinukleotid, welches typischerweise in Bakterien weitaus häufiger vorkommt als in Vertebraten. Bindet ein passendes PAMP, wird die zytoplasmatische TIR-Domäne aktiviert, die bei TLR1, 2, 4, 5, 6, 7 und 9 nach ihrer Aktivierung an das Protein MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) bindet, welches für die weitere Signalübertragung entscheidend ist. Daraufhin wird eine Kaskade von zytoplasmatischen Proteinen aktiviert. Infolgedessen kommt es zur Aktivierung von NFκB und der p38/c-Jun N-terminalen Kinase (JNK). Transkriptionsfaktoren wie NFκB dringen schließlich in den Zellkern ein und bewirken die Expression von Genen, die für Zytokine, Chemokine und Interleukine kodieren. TLR3 funktioniert als einziger TLR vollkommen unabhängig von MyD88 über die Aktivierung des Moleküls TRIF und führt, wie in Abbildung 1.1 gezeigt, ebenfalls zur Transkription von Entzündungsmediatoren. Der am besten untersuchte TLR ist TLR4, welcher durch LPS stimuliert wird. Für ihn konnte erstmals ein MyD88-abhängiger und ein MyD88-unabhängiger Transduktionsweg beschrieben werden. Der MyD88-abhängige Weg führt zur Bildung von NFκB und aktiviert MAP-Kinasen, die wiederum AP-1 aktivieren. AP-1 ist, wie NFκB, ein Transkriptionsfaktor für die Bildung von proinflammatorischen Proteinen. Der TRIF-vermittelte, MyD88-unabhängige Weg führt zur Induktion des Transkriptionsfaktors IRF3 und zur Bildung von IFNβ (siehe Abbildung 1.1).

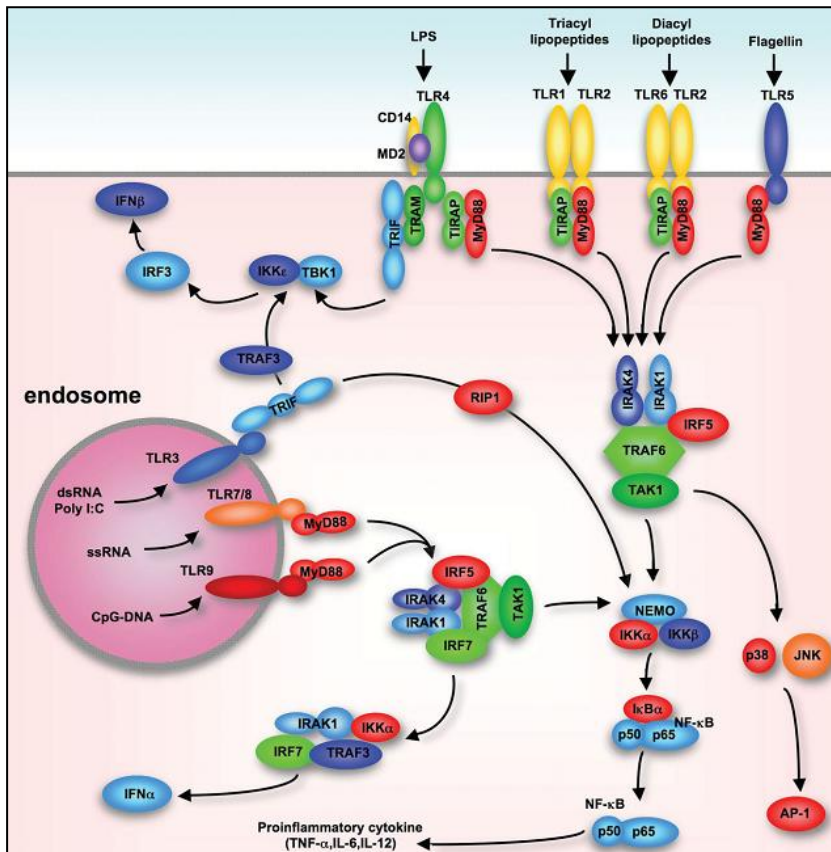


Abbildung 1.1 [Seki, 2008]

Abbildung 1.1

Schematische Darstellung der Signalwege von Toll-like Rezeptoren. TLR4, TLR5, TLR1/2 und TLR2/6 sind an der Zelloberfläche lokalisiert und erkennen LPS, Flagellin, Triacyl-Lipopeptide und Diacyl-Lipopeptide. TLR3, TLR7/8 und TLR9 werden am Endosom exprimiert und erkennen Flagellin, Einzelstrang-RNA und CpG-DNA. Alle TLRs außer TLR3 wirken über MyD88 und führen zur Bildung von NFκB und p38/JNK. TRIF wird durch TLR3 und TLR4/TRAM genützt und führt zur Aktivierung von IRF3, was zur Produktion von IFNβ führt.

Die Toll-like Rezeptoren TLR4, TLR5, TLR1/2 und TLR2/6 (letztere liegen als Heterodimere vor) werden an der Zelloberfläche exprimiert; TLR3, TLR7/8 und TLR9 an der Membran der Endosomen. TLRs werden vor allem auf den Zellen der angeborenen Immunität exprimiert. So findet man in Monozyten und Makrophagen mRNA für alle TLRs außer TLR3. In Makrophagen ist die Verteilung und Dichte der TLRs abhängig vom Reifestatus der Zelle. Auch Epithelzellen sind in der Lage TLRs an der Zelloberfläche zu exprimieren. Die Verteilung der TLRs im Organismus ist abhängig vom Immunstatus und wird durch Zytokine wie IFN γ reguliert. TLRs sind durch ihre Eigenschaft, fremde Muster zu erkennen und die Zelle zur Produktion von Botenstoffen zu stimulieren, ein wichtiger Be-

standteil der frühen Immunantwort, die sowohl zur Induktion der angeborenen als auch der adaptiven Immunität führt. Die angeborene Immunität wird über die NF κ B-abhängigen Zytokine aktiviert. Für den Einfluss der TLRs auf das adaptive Immunsystem sind dendritische Zellen und Makrophagen von entscheidender Bedeutung: Die durch TLR stimulierten dendritischen Zellen veranlassen CD4-Zellen zur Differenzierung in TH1- oder TH2-Zellen und fördern so die Aktivierung der erworbenen Abwehr [Faure,2001; Akira 2004].

1.1.3 Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II

Viele infektiöse Mikroorganismen brauchen Zellen eines Wirtes, um sich zu vermehren. Es ist somit von großer Bedeutung für die Abwehr pathogener Keime, dass Zellen in der Lage sind, dem Immunsystem fremde Peptide aus dem Zellinneren nach außen zu präsentieren. Dies ist die Aufgabe von MHC-Molekülen. Sie dienen der Präsentation von Antigenen an T-Zellen und sind damit entscheidend für die Auslösung einer Immunantwort. Nachdem auf diese Weise Antigene durch T-Zellen erkannt wurden, können zum Beispiel Makrophagen aktiviert werden, um Bakterien aufzunehmen und zu eliminieren. Außerdem werden B-Zellen zur Produktion von Antikörpern stimuliert. Grundsätzlich werden zwei Arten von MHC-Molekülen unterschieden. MHC-Moleküle der Klasse I präsentieren Antigene aus dem zytosolischen Kompartiment der Zelle an CD8-T-Zellen. Diese bewirken die Lyse der infizierten Zelle. MHC Klasse I wird auf allen kernhaltigen Zellen des Organismus präsentiert und im endoplasmatischen Retikulum mit zytosolischen Proteinen beladen. Auf diese Weise werden zum Beispiel virale Peptide, die den Metabolismus der Wirtszelle für sich nützen, nach außen an CD8-T-Zellen präsentiert. Durch die Interaktion mit MHC Klasse I werden die CD8-T-Zellen aktiviert und können unter anderem durch ein spezielles Protein, den Fas-Liganden, den Tod (Apoptose) der infizierten Zelle auslösen.

MHC-Moleküle der Klasse II präsentieren Peptide von Pathogenen aus dem Extrazellulärraum, welche durch Phagozytose aufgenommen wurden, oder Bestandteile von Erregern, die sich in endozytotischen Vesikeln innerhalb der Makrophagen vermehren, an CD4-T-Zellen. Die aktivierte CD4-T-Zelle stimuliert einerseits die Makrophagen, andererseits löst sie die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen aus. So werden Peptide aus dem Extrazellulärraum und Peptide von Erregern, die sich in endozytotischen Vesikeln vermehren und unzugänglich für Proteasen aus dem Zytosol sind, vom Immunsystem erkannt und abgewehrt.

MHC Klasse II-Moleküle sind polymorphe Transmembranglykoproteine, bestehend aus einer α - und einer β -Kette, welche beim Menschen auf dem Chromosom 6 lokalisiert sind, und deren Expression variabel ist. In dendritischen Zellen wird MHC Klasse II ständig an der Zelloberfläche exprimiert. In Makrophagen und in nicht-professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie Epithelzellen kann bei

Gefahr die Expression von MHC Klasse II an der Zelloberfläche gesteigert werden, um so die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass ein fremdes Peptid von CD4-T-Helferzellen erkannt wird [Peijnenburg 1997]. Der wichtigste Botenstoff, um die Zelle auf diese Weise in Alarmbereitschaft zu versetzen, ist IFN γ . Durch IFN γ wird die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT1 induziert. STAT1 bindet an die Promotor-E-Box des Klasse II Transaktivators (CIITA), einen essentiellen Transkriptionsfaktor für MHC Klasse II-mRNA. Im Zytosol werden die Bestandteile des MHC Klasse II-Moleküls in Protein übersetzt. Wie alle membranständigen Proteine wird auch MHC Klasse II im endoplasmatischen Retikulum (ER) prozessiert. Dort wird MHC Klasse II an eine invariante Kette, das CLIP-Fragment, gebunden. Dieses Protein verhindert, dass zelleigene Proteine an die Peptidbindungsgrube von MHC Klasse II binden. Im Golgi-Apparat wird der so blockierte MHC Klasse II in Vesikel verpackt. Antigenpräsentierende Zellen (APC), in denen MHC Klasse II hauptsächlich synthetisiert wird, können über spezielle Rezeptoren oder über Phagozytose Proteine aus dem intrazellulären Raum aufnehmen. Diese Proteine werden in Endosomen in ihre Peptid-Fragmente zersetzt. Die Endosome können demnach sowohl eigene als auch fremde Proteine enthalten. Im Zytoplasma der APC fusionieren die Endosome mit den MHC Klasse II-Vesikeln. Geschieht dies, löst sich das CLIP-Fragment vom MHC Klasse II-Protein und fremde Peptide aus dem Endosom können nun an die Peptidbindungsgrube von MHC Klasse II binden. Körpereigene Proteine, die an der Bindungsfurche des MHC Klasse II binden, können aufgrund von Toleranzmechanismen keine Immunantwort auslösen. Die Vesikel fusionieren schließlich mit der Zellwand, MHC Klasse II wird an der Zelloberfläche exprimiert, und das AG kann an CD4-T-Helfer-Zellen präsentiert werden [Janeway, 2002, 279-289] (siehe Abbildung 1.2).

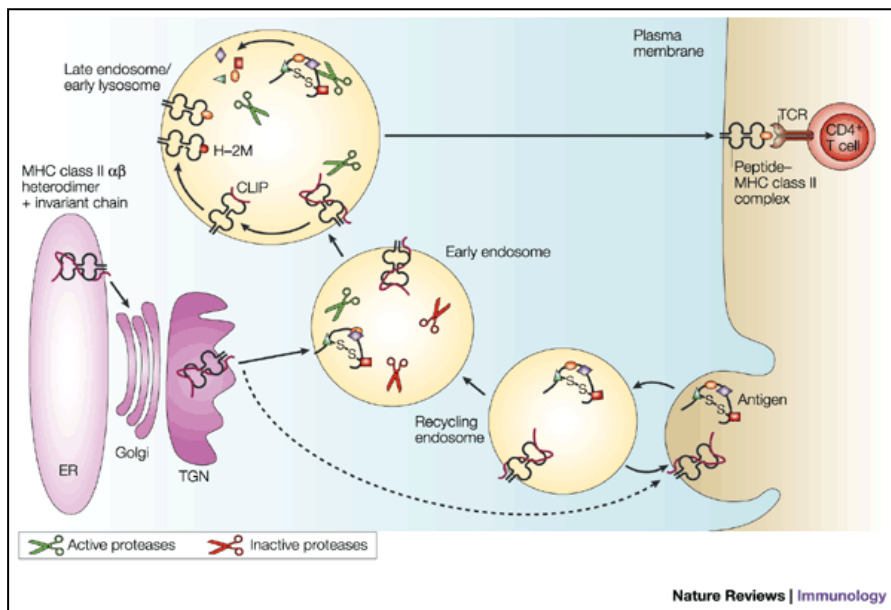


Abbildung 1.2 [Honey, 2003]

Abbildung 1.2

Exogene Peptide werden durch Makropinozytose von der Zelle aufgenommen und im Endosom durch Proteasen prozessiert. MHC Klasse II wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) mit der invarianten Kette (CLIP-Fragment) beladen und im Golgi-Apparat in Vesikel verpackt. Im gereiften Endosom kommen exogene Proteine und der MHC Klasse II-Komplex zusammen. Im dort herrschenden Milieu löst sich das CLIP-Fragment von der Peptidbindungsgrube des MHC Klasse II und die exogenen Peptidfragmente können binden. Die Vesikel verbinden sich mit der Zellwand und präsentieren das Peptidfragment durch MHC Klasse II an CD4-positive T-Zellen.

1.1.4 TH1- und TH2- Antwort

Die CD4-T-Helferzellen besitzen einen T-Zell-Rezeptor (TCR), mit dem das Epitop des von MHC Klasse II präsentierten Antigens erkannt werden kann. Der TCR ist homolog zu Immunglobulinen und besitzt eine konstante transmembranständige Region sowie eine extrazelluläre variable Region zur Antigenerkennung, welche tolerant gegen körpereigene Proteine ist. Die CD4-T-Zellen zirkulieren im Blut, gelangen ins lymphatische Gewebe und mustern dort die Antigene, welche von den APC präsentiert werden. Wird das AG vom TCR als körperfremd identifiziert, führt dies über kostimulierende Rezeptoren zur Proliferation der T-Zelle, diese entwickelt sich so zur bewaffneten T-Effektorzelle. Je nach Milieu, in dem sich die CD4-Zelle während ihrer Aktivierung befindet, entwickelt sie sich zu einer TH1- oder TH2-Zelle. In Gegenwart von $\text{IFN}\gamma$ und dem Zytokin IL12 entwickelt sich die naive T-Zelle zur TH1-Zelle, welche eine TH1-Antwort auslöst: Sie produziert unter anderem $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ und GM-CSF. Diese Zytokine aktivieren Makrophagen ($\text{IFN}\gamma$), veranlassen diese sich an der Infekti-

onsstelle zu sammeln (MCP1), lösen die Proliferation von T-Zellen aus, induzieren die Apoptose von chronisch infizierten Zellen (FAS-Ligand) und veranlassen B-Zellen, opsonierende AK herzustellen. In Gegenwart von IL-4 und IL-6 entwickelt sich die aktivierte T-Zelle hingegen zu einer TH2-Zelle, löst eine TH2-Antwort aus und gibt vor allem IL4 und IL5 ab. Diese Zytokine veranlassen B-Zellen dazu, zu Plasmazellen zu differenzieren, welche neutralisierende AK herstellen, und induzieren die Expression von MHC Klasse II auf der Zelloberfläche von Epithelzellen und dendritischen Zellen [Janeway, 2002, 29-31; Faure 2001; Janeway, 2002, 358-363].

1.2 *Chlamydomphila pneumoniae*

Chlamydomphila pneumoniae ist ein gramnegatives, obligat intrazelluläres Bakterium, welches beim Menschen atypische Pneumonien verursachen kann. *Chlamydomphila pneumoniae* gehört zur Familie der Chlamydien, deren bekanntester Vertreter *Chlamydia trachomatis* ist, ein Bakterium, das weltweit eines der wichtigsten Erreger von Infektionen des Genitaltraktes ist und bei ca. 5,9 Millionen Menschen zur Erblindung aufgrund von Trachomen führt [Kuper, 2003].

1.2.1 Epidemiologie

Chlamydomphila pneumoniae wurde vor relativ kurzer Zeit als eine dritte humanpathogene Chlamydien-Spezies entdeckt. 1965 wurde eine neue Chlamydienart, TWAR aus den Konjunktiven eines taiwanesischen Kindes isoliert. Im Jahre 1985 hatte man diesen Keim vermehrt mit Infektionen des Respirationstraktes in Verbindung gebracht und etablierte neben *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia psittaci* die dritte Art humanpathogener Chlamydien: *Chlamydia pneumoniae*. Nach gut 20 Jahren Forschung kristallisierten sich jedoch Eigenschaften von *Chlamydia pneumoniae* heraus, welche sich von denen ihrer Verwandten unterscheiden, und so beschloss man eine erneute Namensänderung, hin zu *Chlamydomphila pneumoniae* (*C. pneumoniae*) [Kuo, 1995].

C. pneumoniae ist ein häufiger Erreger von Infektionen des unteren Respirationstraktes. Durch *C. pneumoniae* verursachte, ambulant erworbene Pneumonien, CAP (community acquired pneumonia), kommen mit einer Häufigkeit von 100 Infektionen pro 100.000 Einwohner pro Jahr vor [Jackson, 2000]. Damit ist *C. pneumoniae* die Chlamydien-Spezies, welche die meisten Infektionen verursacht. Mit einem Alter von 20 Jahren zeigen schon 50 % der Bevölkerung Antikörper gegen *C. pneumoniae*. Obwohl nach Erstinfektion die Antikörperantwort nur 3-5 Jahre anhält, sind im höheren Alter 75 % der Bevölkerung seropositiv für AK gegen *C. pneumoniae* [Kuo, 1995]. Diese Daten sprechen dafür, dass die Mehrheit der Bevölkerung im Laufe ihres Lebens mehrmals mit *C. pneumoniae* infiziert

wird. Typische Atemwegssymptome, die durch *C. pneumoniae* verursacht werden, betreffen sowohl den unteren Respirationstrakt (z.B. akute Bronchitis, Exacerbation einer chronischen Bronchitis und Asthma sowie CAP) als auch die oberen Atemwege (z.B. Pharyngitis, Sinusitis und Otitis). Bei Erwachsenen verläuft diese Infektion meist asymptomatisch, nur in ca. 20 % der Infektionen kommt es zu klinisch manifesten Symptomen. So sind trotz der hohen Durchseuchung mit *C. pneumoniae* nur ca. 10 % der CAP und 5 % der Sinusitiden auf dieses Bakterium zurück zu führen. Der Schweregrad der Symptome variiert stark. Es kommen leichte, selbst-limitierende Pneumonien vor, aber auch schwere Verläufe, vor allem bei älteren Patienten mit koexistierenden kardiopulmonalen Erkrankungen [Blasi, 2005] oder zusätzlicher Pneumokokken-Pneumonie [Kuo, 1995].

Neben akuten Atemwegserkrankungen wurde *C. pneumoniae* in den letzten Jahren auch mit einer Reihe anderer Erkrankungen in Verbindung gebracht. So wird die Infektion mit *C. pneumoniae* als ein Risikofaktor für Arteriosklerose und deren Komplikationen diskutiert. *C. pneumoniae* kann bis zu 10 Tage lang in Monozyten in der Blutbahn zirkulieren [Gieffers, 2004] und wurde im Tiermodell mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Arteriosklerose in Verbindung gebracht [Dechend, 1999]. Im Menschen konnte *C. pneumoniae* in Atheromen bei Patienten mit schwerer koronarer Herzerkrankung nachgewiesen werden [Ericson, 2000]. Außerdem konnte in Fall-Kontroll-Studien eine gesteigerte Wahrscheinlichkeit für kardiovaskuläre Ereignisse mit erhöhten IgA- und IgG-Titern für *C. pneumoniae* in Verbindung gebracht werden [Siscovick, 2000]. In diesen Untersuchungen wurde in klinischen Studien zwar ein Zusammenhang zwischen Infektionen mit *C. pneumoniae* und Arteriosklerose festgestellt, eine direkte Kausalität konnte jedoch nur im Tiermodell gezeigt werden. So wurde in Apolipoprotein E-defizienten Mäusen nach Infektion mit *C. pneumoniae* chlamydiale DNA in den Plaques der arteriosklerotischen Gefäße nachgewiesen, und es zeigten sich vermehrt instabile Plaques [Ezzhari, 2003]. Beim Menschen konnte jedoch durch eine antibiotische Therapie gegen *C. pneumoniae* klinisch kein positiver Effekt auf das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen werden [Wells, 2004]. Der Einfluss von Infektionen mit *C. pneumoniae* auf Arteriosklerose und die koronare Herzerkrankung bleibt also umstritten. Ebenfalls wird der Einfluss von Infektionen von *C. pneumoniae* auf COPD diskutiert, bleibt aber kontrovers [Brand, 2005; Diederens, 2007].

Zusammenfassend ist *C. pneumoniae* ein wichtiger Auslöser von Atemwegserkrankungen, ob er bei großen Volkserkrankungen, wie Arteriosklerose und COPD eine Rolle als Risikofaktor spielt, ist ungeklärt.

1.2.2 Eigenschaften von *Chlamydomphila pneumoniae*

C. pneumoniae ist in vielerlei Hinsicht ein besonderer Erreger. Mit 1,234 Mbp besitzt er ein kleineres Genom als alle anderen Prokaryonten, abgesehen von *Mycoplasma*. Bei Chlamydien befindet sich kein Peptidoglykan in der Zellwand damit sind diese Bakterien relativ unempfindlich gegen β -Laktame und Glykopeptide [Stamm, 2005]. *C. pneumoniae* ist außerdem ein obligat intrazelluläres Bakterium und kommt in zwei unterschiedlichen Existenzformen vor: Außerhalb der Wirtszelle bildet *C. pneumoniae* infektiöse, aber metabolisch inaktive, Elementarkörperchen (EBs). Diese Form der Chlamydie wird durch Phagozytose oder Endozytose von der Wirtszelle aufgenommen und entwickelt sich in dieser zu Retikularkörperchen (RBs), welche die Energiereserven der Wirtszelle nutzen, um sich zu vermehren. Die Vermehrung des Erregers führt zu charakteristischen Inklusionen, IBs (inclusion bodies). In diesen IBs findet die gesamte Entwicklung der Chlamydien statt, wobei das Bakterium einige Stoffe selbst herstellen kann; andere Moleküle hingegen werden von der Wirtszelle bezogen. So stammen auch die Wandbestandteile der Inklusionen einerseits von den Chlamydien selbst, andererseits aber von der Wirtszelle. Besonders wichtig für die Entwicklung von *Chlamydia* ist hierbei der universale Energieträger Adenosin Triphosphat (ATP), der gänzlich aus dem Metabolismus der Wirtszelle bezogen werden muss. Ebenso ist *C. pneumoniae* unfähig, Nukleotide für die RNA- und DNA-Synthese selbst herzustellen, sondern ist vom Reservoir der Wirtszelle abhängig [Taraska, 1996]. Nach ca. 2 Tagen (*in vitro*) entwickeln sich die stoffwechselaktiven RBs wieder zurück zu EBs, die Wirtszelle wird lysiert, die infektiösen EBs werden freigegeben und können weitere Zellen infizieren. Danach kann der Replikationszyklus wieder von Neuem beginnen [Kuo, 1995] (siehe Abbildung 1.2). Diese Eigenschaften machen *Chlamydia* zu einem sehr speziellen, obligat intrazellulären Bakterium. Allerdings gibt es neben diesen allgemeinen Merkmalen auch Unterschiede in der Entwicklung der Chlamydien, je nach Spezies und Wirt bzw. Zelltyp, in denen sie sich vermehren [Moulder, 1991].

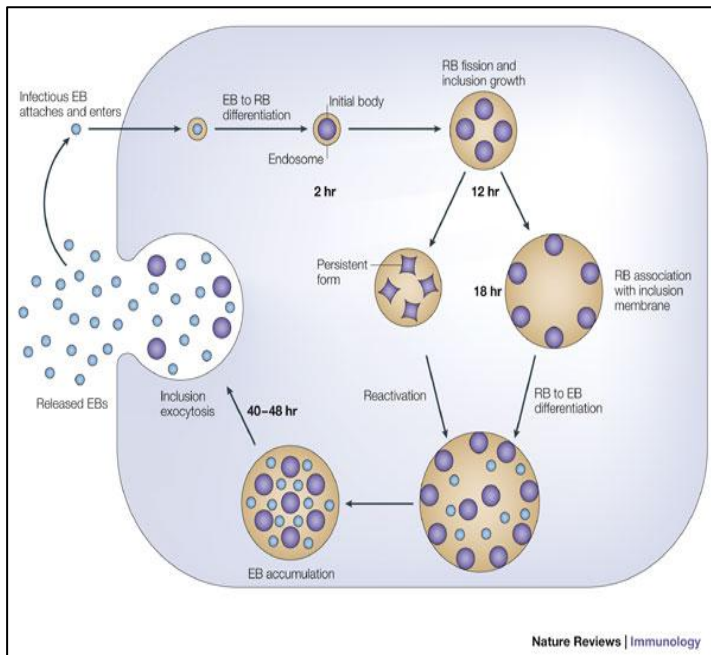


Abbildung 1.3

Entwicklungszyklus von *Chlamydia*:

Metabolisch inaktive, infektiöse Elementarkörperchen werden von Epithelzellen aufgenommen. Nach Aufnahme bilden sich Inklusionen, in denen sich die EBs zu größeren, metabolisch aktiven Retikularkörperchen entwickeln, welche sich vermehren. Je nach Zellmilieu kann sich auch eine persistierende Form bilden. Innerhalb von 40-48 h entwickeln sich wieder EBs, welche von der Wirtszelle abgegeben werden und wieder zur Infektion neuer Zellen führen können.

Abbildung 1.3 [Brunham, 2005]

1.3 *Chlamydophila* und Immunsystem

1.3.1 Wechselwirkungen zwischen Wirt und Erreger

Wie oben beschrieben, ist es für das Überleben von *C. pneumoniae* essentiell, Energiereserven aus dem Wirt zu beziehen, um zu gedeihen und sich zu vermehren. Um möglichst unerkannt in der Wirtszelle verweilen zu können, ist es für intrazelluläre Erreger wichtig, Strategien zu entwickeln, sich vor der Immunantwort des Wirtes zu verstecken. Neben Chlamydien ist von verschiedenen anderen intrazellulären Bakterien, wie zum Beispiel Shigellen, Listerien, Legionellen und Mykobakterien bekannt, dass sie Eigenschaften besitzen, das angeborene Immunsystem zu beeinflussen, um unentdeckt in der Wirtszelle verweilen zu können [Phalipon, 2007; Zahrt, 2003; Cazalet, 2004; Zwaferink, 2008]. Daher wurde die Immunantwort des Wirtes bei Infektionen mit *C. pneumoniae* untersucht und festgestellt, dass die Infektion von Mäusen mit *C. pneumoniae* zu einer entzündlichen Reaktion in der Lunge führt, bei der vor allem erhöhte Werte der proinflammatorischen Zytokine IL12, IL10, IFN γ und TNF gemessen wurden. Es konnte gezeigt werden, dass bei Infektion mit *C. pneumoniae* IFN γ eine entscheidende Rolle zur Auslösung einer TH1-Antwort spielt und dadurch einen wichtigen Faktor für die Kontrolle der Infektion darstellt [Geng, 2000; Netea, 2004]. So wurde

beispielsweise bei IFN γ -defizienten Mäusen eine schwerere Infektion mit Chlamydien festgestellt als bei Wildtyp Mäusen [Rottenberg, 1999]. Mehrere Mechanismen wurden spezifiziert, durch die IFN γ die Infektion von Chlamydien in der Wirtszelle beeinflusst. Zum Beispiel wird während der Infektion iNOS (inducible nitric oxid synthase) und damit die Bildung von NO *in vivo* und *in vitro* zum Schutz gegen Chlamydien induziert [Rodriguez, 2008; Ramsey, 2003]. Außerdem führt IFN γ zu einer vermehrten Bildung vonIDO (indoleamine 2,3 dioxygenase) in der Wirtszelle, wodurch dem chlamydialen Stoffwechsel weniger Tryptophan zur Verfügung steht und das Wachstum des Bakteriums gebremst wird [Taylor, 1991]. Es konnten noch weitere IFN γ -unabhängige Mechanismen, mit denen sich die Zelle gegen das intrazelluläre Bakterium schützt, beschrieben werden. So zeigten Paradkar et al., dass eine Verminderung von Eisenreserven in Makrophagen das Wachstum von Chlamydien bremst [Paradkar, 2008]. Wie für andere intrazelluläre Bakterien wurden auch für Chlamydien Mechanismen beschrieben, wie die T-Zell-vermittelten Immunantwort und damit die Abwehrmechanismen des Wirtes umgangen werden. So beeinflussen Chlamydien beispielsweise den Mechanismus der Apoptose: Einerseits konnte gezeigt werden, dass bei einer Infektion von Makrophagen mit Chlamydien der Zelltod von T-Zellen induziert und damit der Wirt in seiner Immunantwort gegen den Erreger geschwächt wird [Jendro, 2000]. Andererseits wird der natürliche Zelltod von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Epithelzellen, in denen sich Chlamydien vermehren, verzögert und somit den Bakterien eine ausreichende Vermehrung in der Wirtszelle ermöglicht [van Zandbergen, 2004]. Ein weiterer Mechanismus, wie Chlamydien sich vor der Immunantwort des Wirtes schützen, ist die Beeinflussung der Oberflächenexpression von MHC Klasse II auf der Wirtszelle [Zhong 1999].

1.3.2 Beeinflussung der Oberflächenexpression von MHC Klasse II durch Chlamydien

Die Präsentation von Antigenen via MHC Klasse II konnte als wichtiger Schritt zur Induktion einer protektiven Immunantwort gegen Infektionen mit Chlamydien charakterisiert werden. Diesen Vorgang versuchen Chlamydien zu beeinflussen. Wie Zongh et al. zeigen konnte, sezernieren Chlamydien eine Protease, CPAF (chlamydial protease-like activity factor), in das Zytosol der Wirtszelle, welche durch eine Degradierung des USF-1 (upstream stimulatory factor 1) die IFN γ -induzierte Stimulation der Oberflächenexpression von MH Klasse II verhindert [Weidang, 2008]. USF-1 ist ein Mitglied der Helix-Loop-Helix Leucin Zipper-Familie. Das ubiquitär vorkommende Protein bindet als Transkriptionsfaktor an den Promotor Typ IV, welcher die Transkription von CIITA ermöglicht. CIITA wiederum ist der entscheidende Faktor für die Regulation der Genexpression von MHC Klasse II. Die Expression dieser zwei Gene korreliert sowohl qualitativ als auch quantitativ miteinander

[Otten, 1998]. Die Oberflächenexpression von MHC Klasse II kann durch $\text{IFN}\gamma$ induziert werden. Dabei führt die Bindung von $\text{IFN}\gamma$ an den IFN -Rezeptor an der Zelloberfläche über eine Signalkaskade zur Freisetzung von Stat1 . Dieses Protein bindet an die E-Box des Typ IV Promotors für CIITA und benötigt als stabilisierenden Kofaktor USF-1 [Muhlethaler-Mottet, 1998; O'Keefe, 2001] (siehe Abbildung 1.4).

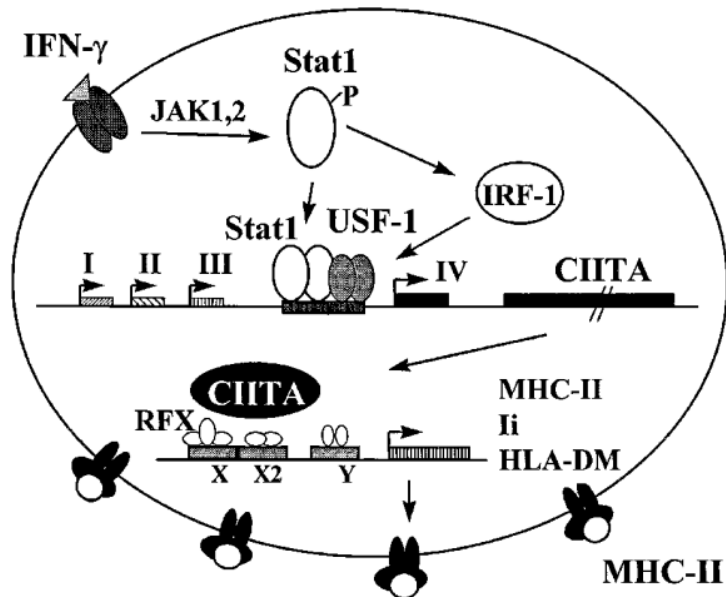


Abbildung 1.4 [Otten, 1998]

Abbildung 1.4

Aktivierung von CIITA durch $\text{IFN}\gamma$

$\text{IFN}\gamma$ führt zur Freisetzung von Stat1 , dieses bindet an die E-box des Typ IV Promotors für CIITA und benötigt als Kofaktor USF-1 . CIITA führt schließlich zur Bildung von MHC Klasse II.

Wird nun USF-1 degradiert, so führt $\text{IFN}\gamma$ nicht zur Bildung von CIITA , was wiederum die Translation von MHC Klasse II verhindert. Die von *C. pneumoniae* sezernierte Protease CPAF ist in der Lage, neben USF-1 einen weiteren Transkriptionsfaktor, RFX-5 , zu degradieren und somit auch die Oberflächenexpression von MHC Klasse I zu beeinflussen [Fan, 2002]. CPAF selbst ist eine von Chlamydien sezernierte Protease, welche im Zytosol der Wirtszelle durch Teilung in zwei Fragmente aktiviert wird. Nach Zongh et al. bilden die zwei Fragmente des CPAF ein intramolekulares Dimer und können in dieser Form Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle degradieren [Sharma, 2004].

CPAF ist also ein Virulenzfaktor von Chlamydien, der zur Degradierung von Transkriptionsfaktoren führt und damit die $\text{IFN}\gamma$ -stimulierte Induktion von MHC Klasse II verhindert. So entzieht sich das

Bakterium der Erkennung durch das Immunsystem des Wirtes und kann sich ungestört vermehren oder unerkannt im Wirt verweilen.

1.3.3 Chlamydien und TLRs

Mehrere Veröffentlichungen weisen auf die wichtige Rolle der TLRs bei der Erkennung einer Infektion mit Chlamydien durch den Wirt hin. In *in vivo* Experimenten konnte gezeigt werden, dass bei Versuchstieren, in denen das für die Signaltransduktion der TLRs wichtige MyD88 fehlt, die Sterblichkeit der infizierten Mäuse erhöht ist und die Infektion der Lunge mit *C. pneumoniae* schwerer verläuft [Naiki, 2005]. Diese Beobachtung wurde auch in unserer Arbeitsgruppe gemacht und eine besondere Beteiligung des TLR2 festgestellt [Rodriguez, 2006]. Auch die Induktion von IFN γ nach der Infektion mit *C. pneumoniae*, welches unerlässlich für die Kontrolle der Infektion ist, wird teilweise durch einen MyD88-abhängigen Mechanismus getriggert [Netea, 2004; Chen, 2008]. In unserer Arbeitsgruppe konnte außerdem die Beteiligung von einem chlamydialen Protein, das heat shock protein 60, an der Auslösung einer Immunantwort nach Infektion mit *C. pneumoniae* nachgewiesen werden. Die durch dieses Antigen hervorgerufene Immunantwort wird ebenfalls durch einen TLR-abhängigen Mechanismus gesteuert [Da Costa, 2004]. Aus diesen Daten wird deutlich, dass TLRs eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Kontrolle einer Infektion mit Chlamydien spielen.

1.4 Ziele der Arbeit

C. pneumoniae ist ein obligat intrazelluläres Bakterium, welches Strategien entwickelt hat, der Immunantwort des Wirtes zu entgehen, um so in der Wirtszelle zu persistieren. In Epithelzellen und Fibroblasten wurde die Protease CPAF charakterisiert, die eine IFN γ -induzierte Hochregulation von MHC Klasse II an der Zelloberfläche verhindert [Zhong, 1999]. MHC Klasse II wird vor allem an der Zelloberfläche von professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen exprimiert. In unserer Arbeitsgruppe konnte ein Einfluss von TLRs auf die Auslösung einer Immunantwort gegen *C. pneumoniae* nachgewiesen werden [Rodriguez, 2006]. Ziel dieser Arbeit ist es, an einem Modell mit MyD88^{-/-} BMDMs zu untersuchen, ob bei einer Infektion mit *C. pneumoniae* in professionellen antigenpräsentierenden Zellen die IFN γ -induzierte Oberflächenexpression von MHC Klasse II durch TLRs beeinflusst wird, und ob hier der in der Literatur beschriebene CPAF-abhängige Mechanismus beteiligt ist. Vergleichend soll auch in nicht-professionellen antigenpräsentierenden Zellen, wie Fibroblasten, ein Einfluss von TLRs auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II untersucht werden. Die dabei gewonnen Ergebnisse

sollen neue Erkenntnisse darüber liefern, wie eine Infektion mit *C. pneumoniae* die Immunantwort des Wirtes beeinflusst und so zu einem besseren Verständnis der Interaktion zwischen Wirt und Erreger beitragen.

2 Material

2.1 Geräte

Material	Hersteller
• Blotkammer	Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, München, Deutschland
• Brutschrank	Hera cell 240, Heraeus, Langenselbold, Deutschland
• Durchflusszytometer	FACS-Calibur, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA
• Entwickler	AGFA Curix60, Röntgen Bender, Augst, Schweiz
• ELISA-Microplate Reader Sunrise	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
• Filmkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
• Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen, Deutschland
• Gelanalysator	Bio-Rad Lab GmbH, München, Deutschland
• Gelkammer	PeqLab Biotech GmbH, Erlangen, Deutschland
• Heizblöcke	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
• Kühlzentrifuge	Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland Multifuge 3 S-R, Heraeus, Hanau, Deutschland
• Mikroskope	Axiovert 100, Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen, Deutschland
• NanoDrop	G.Kisker GbR, Steinfurt, Deutschland
• pH-Meter	pH-Meter526, WTW, Weilheim, Deutschland
• Plattenschüttler	Rocky, Rothaar & Schröder Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland
• Sterilbank	LaminAir, HLB247265, Heraeus, Hanau, Deutschland
• Tischzentrifugen	Zentrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
• Überkopfschüttler	Mixing Rotor, Variotim, Renner GmbH, Darmstadt, Deutschland
• Ultrazentrifuge	Sorvall RC 26 Plus, Sorvall über Kendro, Langenselbold, Deutschland
• Vortex	MS2 Minishaker, IKA, USA
• Waage	610-E2, Sartorius, Göttingen, Deutschland
• Wasserbad	GFL, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland

- Zentrifuge Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland

2.2 Chemikalien

2.2.1 Allgemein

Material	Hersteller
• 2-Mercaptoethanol	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
• Acrylamid 30 %	Biorad Laboratories GmbH, München, Deutschland
• Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
• Akutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
• BSA (Rinderserum)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
• Cyclohexamid	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
• DEPC-Treated Water	Ambion, Huntingdon, UK
• DMEM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
• DOTAP	Carl Roth GMBH, Karlsruhe, Deutschland
• DTT (Dithiotrethiol)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
• ECL-Lösung Western Lightning	PerkinElmer über NEN, Köln, Deutschland
• Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
• Ethidiummonoazid	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
• Ethidiumbromid	Carl Roth GMBH, Karlsruhe, Deutschland
• FCS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
• Gen ruler	Fermentas GMBH, Leon-Rot, Deutschland
• Gentamycin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
• Glycine	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
• Isoton. Natriumchlorid-Lösung	Deltaselect GmbH, Pfullingen, Deutschland
• Magermilchpulver	Fluka, Steinheim, Deutschland
• MEM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

- Methanol Carl Roth GMBH, Karlsruhe, Deutschland
- OptEiA Substrate A BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
- Opt EiASubstrate B BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
- Page ruler Fermentas GMBH, Leon-Rot, Deutschland
- PBS low-tox Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
- S.O.C.-Medium Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Sodium Orthovanadat Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
- Streptavidin-HRP R&D Systems, Oxon, UK
- Sucrose Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
- TEMED Perbio Science, Bonn, Deutschland
- Tris Ultra Carl Roth GMBH, Karlsruhe, Deutschland
- Trypsin EDTA PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Tween20 Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
- Vancomycin Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland

2.2.2 Klonierung von DNA

- | Material | Hersteller |
|--------------------------|---|
| • BamHI | Fermentas GMBH, Leon-Rot, Deutschland |
| • dNTP | Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland |
| • Hind III | Fermentas GMBH, Leon-Rot, Deutschland |
| • Oligo (DT), pd(T)12-18 | GE Healthcare GmbH, Freiburg, Deutschland |
| • PFU-Polymerase | Fermentas GMBH, Leon-Rot, Deutschland |
| • Random Primers | Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| • TAQ-Polymerase | Fermentas GMBH, Leon-Rot, Deutschland |
| • pASK-IBA45+ Vektor | IBA, Göttingen, Deutschland |

2.2.3 Stimulation von Zellen

- CpG TIB MolBiol GmbH, Berlin, Deutschland
- IFN γ (315-05) Peprotech Inc., New Jersey, USA
- LPS (*E.coli*) Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
- SB 203580, p38-Inhibitor Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.3 Kommerzielle Kits

- AffinityScript Multiple Temperature RT Stratagene, La Jolla, CA, USA
- DuoSet ELISA , mouse CXCL9/MIG R&D Systems, Oxon, UK
- ELISA Reaktionsreagenz, BD optEia BD Bioscience, Bedford, MA, USA
- LightCycler FastStart DNA MasterPLUS Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
SYBR Green
- Plasmid Maxiprep Qiagen, Hilden, Deutschland
- Protease Inhibitor Cocktail–Complete Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- Qiasm DNA Mini Kit Qiagen, Hilden, Deutschland
- RNeasy Plus Mini Kit Qiagen, Hilden, Deutschland
- RNase-Free DNase Set Qiagen, Hilden, Deutschland
- RNase Block Ribonuclease Inhibitor Stratagene, La Jolla, CA, USA
- Western lightning-Chemiluminescence Reagent PerkingElmer, Boston, MA, USA

2.4 Zellmedien

2.4.1 Mouse Embryonic Fibroblasts

- Zuchtmedium MEM: 500 ml, FCS: 10 %, Gentamycin 10µg/ml, Vancomycin: 100 µg/ml, β-Mercaptoethanol: 1,25 mM
- Infektionsmedium MEM: 500 ml, Gentamycin 10µg/ml, Vancomycin: 100 µg/ml, β-Mercaptoethanol: 1,25 mM

2.4.2 Bone Marrow Derived Macrophages

- Zuchtmedium DMEM: 500 ml, FCS: 50 ml, Gentamycin 10µg/ml, Vancomycin: 100 µg/ml, 2-Mercaptoethanol: 12,5 mM, M-CSF: 6%
- Infektionsmedium DMEM: 500 ml, Gentamycin 10µg/ml, Vancomycin: 100 µg/ml, β-Mercaptoethanol: 12,5 mM

2.5 Lösungen und Puffer

- RIPA-Lysepuffer ad PBS: 200 ml, Tris 20 mM, Sodiumdeoxycholat: 2 g, SDS: 0,1 %, EDTA: 0,5 M, Sodiumfluorid: 0,42 g, NP40: 1 %, pH7,5
- UGB Tris 25 mM: 30 g, SDS: 2 g, H₂O: ad 500 ml, pH 8,8
- LGB Tris 25 mM: 182 g, SDS: 4 g, H₂O: ad 1 l, pH 8,8
- Laufpuffer / 10 x Tankpuffer Tris 25 mM: 60,56 g, Glycine 0,2 M: 288 g, SDS 10 %, H₂O: ad 2 l

- Transferpuffer Tris 25 mM: 11,64 g, Glyzin: 5,86 g, SDS 10 %, Methanol: 40%, H₂O ad 1 l
- 1 M DTT DTT: 1,54 g, 0,01 M Na-Azetat: ad 10 ml, pH 5,2
- Ammoniumchlorid-Lysepuffer NH₄CL: 8,02 g
KCO₃: 1 g, Na 2 EDTA: 37,2 g, ddH₂O: ad 800 ml, pH 7,2-7,4
- 4 x Lämmli-Puffer Tris-HCl: 62,5 mM, SDS: 2 g, Glycerol: 50 g, EDTA: 58,44 g, Bromphenolblau: 100 ng, ddH₂O: ad 100 ml
- TBST NaCl: 8,8 g, KCl: 0,2 g, Tris: 3 g, ddH₂O: ad 800 ml, Tween 20: 0,6 %, pH 7,4
- ELISA-Waschpuffer PBS 95,5 g, ddH₂O: ad 10 l, Tween 20: 0,5 %
- Trenngel 10 % LGB: 2,5 ml, Acrylamid 30 %: 3,3 ml, H₂O: 4,2 ml, APS: 60 µl, Temed: 10 µl
- Sammelgel UGB: 1,9 ml, Acrylamid 30 %: 1,2 ml, H₂O: 6,9 ml, APS: 35 µl, Temed: 15 µl
- Triton-Lysepuffer Triton X-100 Gradient von 1 % zu 0,05 % in TL-Puffer = Tris/HCl pH 8,0: 50 mM, NaCl: 100 mM, N-Lauroylsarcosin: 0,1 % (v/v), Triton X-100: 0,05-1 % (v/v), EDTA: 1 mM frisch dazu: 1 mg /ml Lysozym, Roche PI 1:30

- SAC-Puffer Tris/HCL pH 8,0: 100 mM, NaCl: 150 mM, EDTA: 1 mM, PI
- Dialysepuffer Tris/HCl pH 8,0: 200 mM, EDTA: 10 mM, L-Arginin: 500 mM, Cysteamin: 6,5 mM, Cystamin: 3,7 mM, PI
- SPG-Puffer Sucrose: 0.22 M, Na₂HPO₄: 8.6 mM, KH₂PO₄: 3.8 mM, Glutaminsäure: 5 mM, 0.2 µm gefiltert, pH 7.4

2.6 Zellen

2.6.1 Chlamydien

Chlamydophila pneumoniae CM-1 VR-1360, American type Culture Collection, Manassas, VA

2.6.2 *E. coli* Stämme

- *E. coli* Top 10 Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- BL21-Codon Plus®-RIL Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.6.3 Mäuse

- Wildtyp Mäuse C57BL/6 Mäuse von Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland
- MyD88^{-/-} Mäuse C57BL/6 MyD88^{-/-} Mäuse wurden von Dr. S. Akira (Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt und 10 x mit C57BL/6 Mäusen rückgekreuzt.

Die Versuchstiere wurden im Tierstall des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene gezüchtet. Die Experimente wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern ausgeführt (Aktendnummer: 55.2-1-54-2531-59-06).

2.7 Nachweis von Proteinen

2.7.1 Durchflusszytometrie

Antikörper	Markierung	Hersteller
anti-IA/IE-MHCII	PE	Bd Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
anti-CD 86	FITC	Bd Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
anti-CD 11b	APC	Bd Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
FC-Block	rat anti mouse CD16/32	Caltag, Bayshore, Canada

2.7.2 Konfokale Mikroskopie

Antikörper	Markierung	Hersteller
mAK gegen Chlamydia	FITC	Progen, Heidelberg, Deutschland

2.7.3 Western-Blot

2.7.3.1 Primäre Antikörper

Antikörper		Verdünnung	Hersteller
anti-USF-1	polyclonal rabbit IgG	1:400	Santa Cruz Biotechnology, California, USA
anti-MHC-class-II β -chain	polyclonal rabbit IgG	1:1000	Dr. José A. Villadangos (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Australia)
anti-MHC-class-II α -chain	polyclonal rabbit IgG	1:1000	Dr. José A. Villadangos (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Australia)
anti-GAPDH	monoclonal mouse IgG	1:5000	Sigma-Aldrich, Deutschland
anti-HIS	monoclonal mouse IgG	1:1000	Sigma-Aldrich, Deutschland
anti- β -Actin	monoclonal mouse IgG	1:1000	Sigma-Aldrich, Deutschland

2.7.3.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper			Hersteller
peroxidase conjugated F(ab)2	donkey anti-rabbit IgG	1:7000	Jackson ImmunoResearch Newmarket, UK
peroxidase conjugated F(ab)2	goat anti-mouse IgG	1:10000	Jackson ImmunoResearch Newmarket, UK

2.8 Nachweis von DNA/RNA

Die Primer wurden mit Hilfe der Software von Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Deutschland entworfen und von diesem Unternehmen hergestellt.

2.8.1 Klonierung

cpaf-fw 5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCCAAAAAAGGGAAATTAGGAGCCATAG-3'

cpaf-rev 5'-ATGGTAGGTCTCAGGCCCAAAGCAGAAGTCGTTGTGGGAT-3'

2.8.2 Reverse Transkriptase-PCR

cpaf-fw 5'-TTGTAGTCGACGTACAGACTAGCCAAGGGGATA-3'

cpaf-rev	5'-GTCCTACTTCAGTCGAGCCGAAACGTGAC-3'
ompA-fw	5'-CCTTATGGGAATGCGGT-3'
ompA-rev	5'-TCACGGTATGTAACCTCA-3'
16S-rRNA-fw	5'-CGCCTCTCTCCTATAGAT-3'
16S-rRNA-rev	5'-CGACATAAAGATGTCAACAGT-3'
MHC-class-II-fw	5'-AGACGCCGAGTACTGGAACAGCCAGC-3'
MHC-class-II-rev	5'-CAGAGTGTGTTGGTGGTTGAGGGCCTC-3'
β-actin-fw	5'ACCCACACTGTGCCCATCTAC-3'
β-actin-rev	5'-AGCCAAGTCCAGACGCAGG-3'

2.9 Sonstige Materialien

- Fotopapier Fuji, Tokyo, Japan
- Eppendorfer Gefäß Josef Peske GmbH, Aindling, Deutschland
- Gel-Blotting-Papier Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland
- Maxisorp-Platte eBioscience, Frankfurt, Deutschland
- MicroAmp-Platte Applied Biosystems, Carlsbad, USA
- Nitrozellulosemembran Protan BA85 Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland
- Sammelröhrchen Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
- Zellschaber BD Bioscience, Bedford, MA, USA
- Zellsieb BD Bioscience, Bedford, MA, USA

3 Methoden

3.1 Gewinnung von BMDMs (Bone Marrow Derived Macrophages)

Prinzip: Aus Vorläuferzellen des roten Knochenmarks von Mäusen, können Zellen gewonnen werden, welche nach Zugabe von Wachstumsfaktoren zu Makrophagen ausdifferenzieren.

Die Mäuse werden durch Genickbruch getötet, mit 70 % Ethanol abgesprüht, Humerus, Femur sowie Tibia frei-präpariert und der Knochen nochmals mit 70 % Ethanol gereinigt. Unter sterilen Bedingungen im „laminar flow“, wird der Knochen an den Enden geöffnet und das rote Knochenmark mit dem Zellmedium aus einer Spritze in eine Petrischale gespült. Alle gewonnenen Zellen aus den langen Röhrenknochen einer Maus werden gepoolt, durch mehrmaliges Pipettieren in eine Einzelzellsuspension überführt und anschließend 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen 3 min in 1 ml Ammoniumchlorid-Lysepuffer bei Raumtemperatur gelöst, der Lysepuffer mit 9 ml Medium verdünnt und die Zellen abzentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums werden die Zellen in 10 ml Zuchtmedium mit 15 % M-CSF aufgenommen und über Nacht bei 37° C und 6 % CO₂ in einer Petrischale bebrütet. Am Folgetag wird die Menge der erhaltenen Zellen in der Zählkammer bestimmt, auf 5 x 10⁶ Zellen in 10 ml Zuchtmedium pro Platte verteilt und am Tag 4 noch einmal mit 5 ml Medium versetzt. Am Tag 6 sind die Zellen expandiert und können für Versuche ausplattiert werden. Hierzu werden die Makrophagen mit Akutase / PBS (1:4) für 10 min gelöst, in Zuchtmedium aufgenommen, in ein Falcon-Gefäß überführt und 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Die Zellzahl wird in der Zählkammer bestimmt und je nach Bedarf ausplattiert: Für 6-Well-Platten werden 1,5 x 10⁶ BMDMs, für 12-Well-Platten 1 x 10⁶ Zellen pro Well verwendet.

3.2 Gewinnung von MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts)

Prinzip: Aus 12-14 Tage alten Embryonen entwickeln sich embryonale Fibroblasten.

Eine im 12.-14. Tag schwangere Maus wird durch Genickbruch getötet und mit 70 % Ethanol gut desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen wird das Bauchfell und anschließend das Peritoneum

geöffnet. Die Embryos liegen perlschnurartig im Unterleib. Die Embryonenkette wird gelöst und in eine mit Medium gefüllte Schale gelegt. Nun wird Embryo für Embryo aus der Fruchtblase und dem Dottersack gelöst und in eine neue, mit Medium gefüllte Schale gelegt. Kopf und Leber werden mit einer sterilen Pinzette entfernt. Je zwei Embryos werden zerkleinert, durch ein Zellsieb (100 µm) in Kulturmedium gepresst und in 10 ml Medium bei 37° C bebrütet. Aus runden, schwimmenden Zellen werden spindelförmige, adhärente Fibroblasten, die nach Belieben expandiert werden können. Dazu werden die Zellen mit Trypsin-EDTA schonend gelöst, 5 min bei 800 x g zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und die Zellen in Kulturmedium aufgenommen. Die anschließende Zählung wird mit einer Zählkammer durchgeführt und eine definierte Zellzahl in Kultur gehalten, für Experimente verwendet oder in 90 % FCS und 10 % DMSO bei -80° C eingefroren. Die eingefrorenen MEFs können zu weiteren Versuchen wieder in Kultur gebracht werden.

3.3 *Chlamydomytila pneumoniae*

3.3.1 Anzucht von *Chlamydomytila pneumoniae*

Prinzip: Zur Multiplikation des Bakteriums werden HEp-2-Zellen mit Chlamydien angeimpft. Die Bakterien vermehren sich innerhalb von 48 h und der Infektionsgrad der Wirtszellen wird durch Fluoreszenz-Mikroskopie bestimmt. Nach einem weiteren Tag werden die Zellen lysiert und neue HEp-2-Zellen mit den gezüchteten Chlamydien infiziert. Dieser Infektionszyklus wird 4 mal wiederholt. Abschließend werden die Chlamydien mittels eines Sucrose-Urographin-Gradienten aufgereinigt.

0,5 x 10⁶ HEp-2-Zellen pro Well werden in einer 6-Well-Platte ausgesät und am Tag 2 mit *C. pneumoniae* angeimpft. Der Monolayer aus HEp-2-Zellen wird mit Zuchtmedium, welches chlamydiale Elementarkörperchen und 1µg/ml Cyclohexamid enthält, bei 1200 x g für 35 min bei 37° C zentrifugiert und anschließend bebrütet. Am Tag 2 der Infektion werden die Chlamydien mittels konfokaler Mikroskopie (siehe Kapitel 3.9) abgebildet. Auf Basis der Anzahl der sich in der Wirtszelle befindenden chlamydialen Einschlusskörperchen wird die Verdünnung für den nächsten Infektionszyklus bestimmt. Am Tag 3 der Infektion werden die Wirtszellen mit dem Zellschaber gelöst, in je 300 µl Infektionsmedium gesammelt und in einem 50 ml Sammelröhrchen für 3 min zusammen mit 7 Löffel Glasperlen am Vortex geschüttelt. Die Chlamydien werden dadurch aus den Zellen freigesetzt und wieder auf neue HEp-2-Zellen verteilt. Dieser Zyklus wird so oft wiederholt, bis 36 Platten mit HEp-2-Zellen infiziert sind. Anschließend werden die Bakterien aufgereinigt.

Zur Ernte der Bakterien werden die infizierten Zellen gelöst und die Chlamydien durch Schütteln mit Glasperlen aus der Wirtszelle freigesetzt. Die Elementarkörperchen werden über einen Sucrose-Urografen-Gradienten durch 90 minütiges Zentrifugieren bei 3000 x g und 4° C aufgereinigt (Grundsicht 50 % w/v Sucroselösung, Deckschicht 30 % w/v Urografen in 30 mM Tris-HCL gelöst, pH 7,4). Nach einmaligem Waschen mit 0,2 µM gefiltertem PBS (pH 7,4) können die aufgereinigten Chlamydien bis zur Verwendung im Experiment in einem SPG-Puffer bei -80° C gelagert werden. Um die Anzahl der gelösten Elementarkörperchen zu quantifizieren, werden die chlamydialen Inklusionen nach 48 h Infektion in den HEP-2-Zellen mittels konfokaler Mikroskopie abfotografiert (siehe Kapitel 3.9) und die Anzahl der Inklusionen (IFU = inclusion forming units) ausgezählt. Eine Kontamination durch Mykoplasmen wird durch eine Mykoplasmen-PCR ausgeschlossen.

3.3.2 Inaktivierung von *Chlamydomphila pneumoniae*

Aufgereinigte Chlamydien werden bei 95° C für 15 min hitzeinaktiviert. Nach kurzem Zentrifugieren werden inaktivierte Chlamydien in gleicher Konzentration wie lebende Chlamydien für in vitro Experimente verwendet.

3.3.3 Infektion von Zellen mit *Chlamydomphila pneumoniae*

Prinzip: Adhärente Zellen werden mit *C. pneumoniae* infiziert und bebrütet, bis sich die Chlamydien von Elementarkörperchen (EBs) zu Retikularkörperchen (RBs) entwickeln und Inklusionen bilden.

Zellen werden, wie oben beschrieben, gezüchtet und für die Infektion mit Chlamydien in eine einphasige Zellschicht (Monolayer) mit definierter Zellzahl gebracht. Dazu werden Makrophagen (BMDMs) in Zuchtmedium aufgenommen und je $1,5 \times 10^6$ Zellen in einem Loch einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37° C und 10 % CO₂ sind die Zellen adhärent, haben einen Monolayer gebildet und können infiziert werden. Um einen solchen Monolayer aus Fibroblasten (MEFs) zu erhalten, können aufgrund ihrer Größe nur $0,5 \times 10^6$ bis $0,75 \times 10^6$ Zellen pro Well verwendet werden. 24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen werden diese mit *Chlamydomphila pneumoniae* infiziert. Dazu wird in BMDMs ein MOI (multiplicity of infection) von 10 und in MEFs ein MOI von 7 bzw. 20 verwendet. Um die entsprechende Konzentration an Chlamydien pro Well zu

erzielen, wird die Zellzahl pro Well mit der gewünschten MOI multipliziert und durch die Konzentration der chlamydialen Einschlusskörperchen geteilt. Die ermittelte Menge an benötigten Chlamydien (Volumen in μl) wird in Infektionsmedium gelöst und die Zellen mit 2 ml Medium pro Well bei 37°C für 48 h bebrütet. BMDMs sind aufgrund ihrer Eigenschaft, Fremdpartikel zu phagozytieren, selbst in der Lage, die Chlamydien in den Intrazellulärraum aufzunehmen. Die MEFs hingegen müssen nach Infektion 35 min bei $1200 \times g$ und 37°C zentrifugiert werden, damit die obligat intrazellulären Bakterien in das Zytoplasma gelangen. Nach 24 h Infektionszeit werden $200 \mu\text{l}$ FCS pro Well hinzugefügt und die Zellen je nach Versuchsaufbau mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert. Dazu werden in BMDMs $10 \mu\text{g/ml}$, in MEFs $30 \mu\text{g/ml}$ $\text{IFN}\gamma$ verwendet. Nach 48 h Infektionszeit haben sich die EBs zu RBs entwickelt und bilden Inklusionen. Die Zellen können nun für weitere Experimente verwendet werden.

3.4 Durchflusszytometrie/FACS (Fluorescence Activated Cell Staining)

Prinzip: Zellstrukturen werden mit fluoreszierenden Antikörpern markiert. Diese Zellen fließen nacheinander durch eine Kammer, in der sie mit einem Laser angestrahlt werden. Das Licht wird an der Zelloberfläche gebrochen und das Streulicht sowie das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht detektiert. Aufgrund dieser Messungen kann auf Zellzahl, Zellgröße und Zelltyp geschlossen werden.

Die zu untersuchenden Zellen werden mit $600 \mu\text{l}$ Trypsin-EDTA (MEFs, 5 min) oder Akutase (BMDMs, 30 min) von der Platte gelöst und die Zellen eines jeden Wells in je einem $1,5 \text{ ml}$ Eppendorfergefäß gesammelt. Die 6-Well-Platten werden vorsichtig mit einem Zellschaber und $300 \mu\text{l}$ Medium nachgereinigt und die gesammelten Zellen 5 min bei $1200 \times g$ zentrifugiert. Die folgenden Schritte werden, zum Schutz der Zellintegrität, auf Eis bei 4°C durchgeführt. Der Überstand der zentrifugierten Zellen wird abgesaugt, die Zellen erneut in PBS-3 %-FCS resuspendiert, auf eine 96-Well-Platte übertragen, wieder zentrifugiert ($1200 \times g / 5 \text{ min}$) und in $96 \mu\text{l}$ einer 0,1 prozentigen Ethidium-Monoazid- (EMA) Lösung aufgenommen, in der sie 30 min im Dunkeln belassen werden. Das EMA lagert sich in der DNA von Zellen mit Membranperforation ein. So können in der Durchflusszytometrie lebende von toten Zellen unterschieden werden. Anschließend werden freie Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit CD 16/32 AK blockiert (MEFs: $2 \mu\text{l/Well}$, BMDMs: $4 \mu\text{l/Well}$). Dieser Schritt erfolgt bei Zimmerbeleuchtung, damit das EMA aktiviert wird. Hiernach werden die Zellen erneut zentrifugiert und mit PBS-3 %-FCS gewaschen. Nun werden die Zellproben

mit dem fluoreszierenden Antikörper markiert. Die Antikörper gegen MHCII (I-A/I-E-PE) und CD11c-APC (siehe Kapitel 2.7.1) werden in einer Verdünnung von 1:100 in PBS-3 %-FCS gelöst und die Zellen mit 50 µl dieser Lösung 30 min bei 4° C im Dunkeln inkubiert. Zum Abschluss wird nicht gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen von der Zelloberfläche entfernt. Ein „Waschschritt“ bezeichnet das Pelletieren der Zellen mit nachfolgendem, mehrmaligem Resuspendieren in PBS-3 %-FCS. Das Zentrifugieren wird für 5 Minuten bei 1200 x g durchgeführt, sodass die Zellen als Pellet im Well haften, der Überstand wird anschließend schwungvoll abgekippt. Nach Zugabe von 150 µl PBS-3 %-FCS wird mit einer Pipette 3 mal resuspendiert, um die Zellen erneut in Suspension zu bringen. Abschließend werden die markierten Zellen in den Proben mit 200 µl 2 % Paraformaldehyd-Lösung fixiert.

Nach der Färbung der Zellen erfolgt die Durchflusszytometrie im FACS-Messgerät (fluorescence activated cell sorter). Die mit fluoreszierenden Antikörpern beladenen Zellen können als Markerpositiv erkannt und gezählt werden. Neben diesen analytischen Eigenschaften des FACS, aus Zellpopulationen nur Antikörper-markierte Zellen zu erkennen, kann das Gerät auch deren Größe (FSC, forward scatter) und Granularität (SSC, side scatter) erfassen.

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten am FACS-Calibur. Zur FACS-Steuerung, Datenerhebung und Speicherung diente CellQuest Version 3.2.1 (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). Nach reichlichem Spülen des Systems mit PBS wurden bei einer Flussrate von 500 events/sec etwa 100.000 events aufgenommen.

Mittels der Software FlowJow wurden die Daten evaluiert. Mit Hilfe des Dot Plots von EMA konnten lebende Zellen selektiert werden. Diese Population wurde in einem Dot Plot von MHCII zu FCS dargestellt, die MHCII-positiven Zellen gated und deren Anzahl in Prozent definiert.

Die Messwerte wurden in den Computerprogrammen Microsoft Excel und SigmaPlot (Version 10.0) ausgewertet.

3.5 Western-Blot

Prinzip: Proteine aus Zellen werden durch Elektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt, spezifische Proteine durch Antikörper markiert, diese durch Chemolumineszenz dargestellt. Somit kann die Proteinmenge von bestimmten Zellproteinen aus einem Proteingemisch semiquantitativ zur Darstellung gebracht werden.

Zur Gewinnung der Zellextrakte müssen die Proteine aus dem Zytosol durch Zelllyse freigesetzt werden. Hierzu werden die adhären Zellen mit PBS gewaschen und mit 120 µl RIPA Puffer, dem Protease-Inhibitor (PI = 1:20) und Natrium-Orthovanadat (1:100) zugegeben wurde, gelöst. Der Lyseprozess wird für eine Dauer von 30 min bei 4° C auf Eis durchgeführt. Hiernach wird das Zelllysate durch Sonografie gereinigt, verbliebene DNA durch Zentrifugieren abgetrennt und die Proben bei -80° C eingefroren.

Zur Durchführung des Western-Blots wird ein SDS-Page Gel (10 % Acrylamid) vorbereitet, die Proteine werden im Gel durch Elektrophorese aufgetrennt und durch Blotting vom Gel auf eine Zellulosemembran übertragen. Aufgetragene Proteine werden mit spezifischen AK gefärbt, diese via Chemolumineszenz visualisiert.

Auftrennung durch Gelelektrophorese

Das Gel besteht aus zwei Phasen, einem Sammel- und einem Trenngel. Das 10 prozentige Acrylamid-Trenngel (siehe Kapitel 2.5) wird in die hierfür vorhandene Gelkammer gefüllt. Nachdem das Gel unter Lichteinwirkung polymerisiert ist, wird ein Sammelgel (siehe Kapitel 2.5) auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Das Sammelgel wird ebenfalls fest, durch Herausziehen des Kammes verbleiben Kammern, in die das zu analysierende Proteingemisch eingefüllt werden kann. Ist das Gel fest, wird die Gelkammer mit Laufpuffer (Tris-Glycin-Puffer) aufgefüllt. Während des Polymerisierens des Gels werden die Proteine vorbereitet: Die mit RIPA-Puffer lysierten Proteingemische werden langsam aufgetaut und eine entsprechende Menge Protein in 4x Lämmli-Puffer mit 10 % DTT gegeben und 5 min bei 96° C erhitzt. Danach wird 2 min bei 10000 x g zentrifugiert, um in den Proben enthaltene DNA-Reste von den gelösten Proteinen zu trennen. Die Proben sowie ein Marker (page ruler), anhand dessen die Proteingröße bestimmt werden kann, werden in die Kammern des Sammelgels gefüllt und die Proteine bei 120 mV und 130 mA für ca. 1½ h aufgetrennt.

Blotting auf Zellulose

Hat der kleinste Marker den unteren Rand des Gels erreicht, wird die Elektrophorese gestoppt, das Gel auf eine Zellulosemembran gelegt und unterhalb sowie oberhalb mit Blotting-Papier abgedeckt. Der mehrschichtige Stapel wird mit Transferpuffer durchtränkt und bei 25 mV und 200 mA für 1 h und 50 min im Blotter geblotet. Ist nach Abschluss dieses Vorgangs der farbige Marker auf der Zellulosemembran zu erkennen, so kann man davon ausgehen, dass auch die in den Proben enthaltenen Proteine auf die Membran übertragen worden sind.

Markieren der Proteine mit AK

Nach dem Übertragen der Proteine wird die Membran bei Raumtemperatur für 2 Stunden mit einer 5 prozentigen Milchpulver-TBST-Lösung geblockt. Daraufhin werden nicht gebundene Proteine mit TBST-Lösung abgewaschen, dann der erste Antikörper (anti-USF-1, anti-MHC-II, anti- β -actin oder anti-GAPDH, siehe Kapitel 2.7.3.1) in TBST-5 %-Milchpulver gelöst und die Membran damit über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Morgen wird wieder mit TBST gewaschen und der zweite Antikörper (goat anti-mouse oder anti-rabbit, Peroxidase-gekoppelt, siehe Kapitel 2.7.3.2) in TBST-Milch gelöst und die Membran für 1½ Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Antikörper bindet an den ersten und kann zur Fluoreszenz angeregt werden. Anschließend wird noch einmal gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen. Zuletzt wird die Membran eine Minute mit einer Illuminationslösung behandelt und in einer Filmkammer mit Fotopapier befestigt. Nun kann das vom fluoreszierenden Antikörper auf der Fotofolie erzeugte Bild entwickelt werden. Die Dicke der abgebildeten Banden korreliert mit der Menge des in der Probe enthaltenen Proteins und kann mithilfe der Software von ImageJ Launcher (Version 1.4.3.67, Broken Symmetry Software) densitometrisch bestimmt werden. Die Banden der spezifischen Antikörper (anti-MHCII, anti-USF-1, anti-HIS) werden zur Ladekontrolle (anti-GAPDH) in Relation gesetzt. So kann das Verhältnis der Proteinmenge in den einzelnen Proben annäherungsweise bestimmt und graphisch dargestellt werden.

3.6 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Prinzip: Mit Hilfe des ELISA können Antigene von z.B. sezernierten Proteinen, Viren, Bakterien oder Hormonen in einer Probe nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zunutze, die an einem Epitop des nachzuweisenden Stoffes binden. Die verwendeten Antikörper sind mit einem Enzym markiert. Dieses Enzym katalysiert eine Reaktion, welche einen Farbumschlag bewirkt und somit als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens dient. Die Signalstärke des Farbumschlags ist eine Funktion der Antigenkonzentration, sodass der ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann.

Der hier verwendete ELISA entspricht dem DuoSet von R&D Systems. Alle Antikörper, Enzyme, Standards und Substrate wurden nach Angaben des Herstellers in Lösung gebracht und aliquotiert. Zuerst wird eine speziell beschichtete 96-Loch Maxisorp-Platte über Nacht bei Raumtemperatur mit dem ersten (capture-)Antikörper (0,8 μ g /ml PBS) inkubiert. Dieser Antikörper bindet am Boden der Platte. Am nächsten Morgen wird überschüssiger AK mit ELISA-Waschpuffer entfernt und die Platte eine Stunde mit Blocklösung (1 % BSA, 5 % Sucrose in PBS) versetzt, um unspezifische Bindungen

zu reduzieren. Hiernach muss die Platte wieder gewaschen werden. Dann können die zu analysierenden Proben, in diesem Falle Überstand aus dem Infektionsmedium der mit CP infizierten Zellen, hinzugefügt werden. Die Proben werden, um technische Messfehler auszuschließen, doppelt bestimmt, zusätzlich wird eine Standardverdünnung des nachzuweisenden Antigens angefertigt. Während der zweistündigen Inkubationszeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte wieder gewaschen, um ungebundene Bestandteile der Probe zu entfernen. Im nächsten Schritt wird ein Detektionsantikörper (detection)-Antikörper in PBS mit 1 % BSA gelöst und für zwei Stunden zugegeben. Nach erneutem Waschen wird ein mit Peroxidase gebundener Streptavidin-Antikörper in PBS gelöst, dieser Antikörper bindet während der 20 minütigen Inkubationszeit an den Detektionsantikörper. Ein letztes Mal wird die Platte gewaschen und ein Wasserstoffperoxid-haltiges Reaktionsreagenz (Lösung A und B, je 50 µl pro Loch) auf die Platte gegeben. Diese wird 10-20 min im Dunkeln inkubiert, bis sich ein Farbumschlag ins Blaue zeigt. Die Reaktion wird mit 50 µl Schwefelsäure pro Well gestoppt.

In einem ELISA-Lesegerät wird nun die Absorption bei 450 nm gemessen, und die optische Dichte (OD) des Reaktionsreagenzes als Zahlenwert angezeigt. Als Referenz dient die Absorption bei 570 nm. Durch die Standardserie mit bekannten Antigenkonzentrationen können absolute Proteinmengen in ng/ml errechnet werden. Hierzu dienen die Softwareprogramme SigmaPlot und Microsoft Excel.

3.7 Reverse Transkriptase-PCR und Echtzeit-PCR

3.7.1 RNA-Isolation

RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen aus Zelllysaten gewonnen und aufgereinigt. Dabei wurde nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll für die RNA-Aufreinigung für tierisches Zellmaterial vorgegangen. Für MEFs wurde ein Monolayer von $0,75 \times 10^6$ Zellen, für BMDMs ein Monolayer von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Well verwendet.

Die Zellen werden kurz mit Trypsin EDTA (MEFs) oder Akutase (BMDMs) vom Boden der Platte gelöst, dieser wird mit PBS und einem Zellschaber nachgereinigt. Die Zellen werden für jeden Probentyp getrennt in einem 50 ml Röhrchen gesammelt und bei $300 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Der hier verwendete Lysepuffer RLT muss vor Verwendung mit 10 µl/ml β -Mercaptoethanol gemischt werden. Das Zellpellet im Sammelröhrchen wird in 350 µl des Lysepuffers gelöst. Der Lyseprozess wird durch fünfmaliges Aufziehen des Puffers durch eine 20-Gauge Nadel unterstützt. Das so

homogenisierte Lysat wird in eine Eliminations-Säule für genomische DNA übertragen und bei 8000 x g für 30 sec zentrifugiert. Das von DNA gereinigte, RNA-haltige Lysat befindet sich nun im 2 ml Sammelröhrchen, es wird mit 350 µl 70 % Ethanol gemischt, in eine Aufreinigungssäule (RNeasy spin column) übertragen und 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Das Lysat wird so durch den Filter der Säule gepresst, die RNA bleibt jedoch auf der Säule haften. Im nächsten Schritt wird die gebundene RNA mit 350 µl des Puffers RW1 gewaschen. Nach Zentrifugieren für 15 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit wird der Durchfluss verworfen und die RNA noch einmal von DNA-Resten gereinigt. Hierzu wird 80 µl einer Mischung aus DNase und eines speziellen Puffers des Qiagen RNase-Free DNase Sets auf die Säule aufgetragen und 15 min bei Raumtemperatur belassen. Danach wird die RNA mit 350 µl des RW1 Puffers gewaschen, und die Säule zweimal mit 500 µl des RPE Puffers nachgereinigt. Abschließend muss die aufgereinigte RNA wieder von der Säule gelöst werden. Dies geschieht durch Auftragen von 40 µl RNase-freiem Wasser auf die Säule und Zentrifugieren für 1 min bei 8000 x g. Der Durchfluss der in einem 1,5 ml Eppendorfergefäß gesammelt wird, enthält die aufgereinigte RNA, deren Konzentration im NanoDrop gemessen werden kann.

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

Prinzip: RNA wird durch Verwendung des Enzyms reverse Transkriptase in eine DNA-Kopie (cDNA) übersetzt. Anschließend wird der zu bestimmende DNA-Abschnitt mit Hilfe eines spezifischen Primers in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt und kann auf einem Ethidiumbromid-Gel zur Darstellung gebracht werden.

Zur RT-PCR wurde hier das Affinity Script Set von Stratagene verwendet. Hierzu werden je Probe 0,5 µg RNA in ein RNase-freies, auf 4° C gekühltes Eppendorfer Gefäß gegeben und das Volumen mit RNase-freiem Wasser auf 11,5 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Zu jeder Probe gibt man 1 µl random Primer oder Oligo (dt), welche sich durch 5 minütiges Erhitzen bei 65° C an der mRNA anlagern und als Startpunkt für die reverse Transkriptase dienen. Bei Raumtemperatur werden je Probe 4 µl Affinity Script Puffer, 2 µl 10 molare dNTPs und 0,5 µl RNase Block hinzugegeben, durch kurzes Pipettieren gemischt und 5 min bei 25° C erhitzt. Anschließend gibt man in jede zweite Probe 1 µl reverse Transkriptase von Affinity Script. Zusätzlich gibt man in die Kopie einer jeden Probe 1 µl Wasser anstelle der Transkriptase, um eine Kontamination der RNA durch zelluläre DNA auszuschließen. Die Proben werden nun weitere 5 min bei 25° C und anschließend für eine Stunde bei 45° C inkubiert. Abschließend wird das Enzym bei 70° C für 15 min inaktiviert. In unseren Experimenten wurden unbehandelte Zellproben aus BMDMs oder MEFs (Mock) mit Zellen verglichen, die mit *C. pneumoniae* infiziert wurden. Zusätzlich wurde aus der RNA der infizierten Zellen eine Kontrollprobe

(control) angefertigt, bei der keine reverse Transkriptase verwendet wurde. Aus dieser Probe wird keine cDNA gebildet, wenn die aufgereinigte mRNA frei von Zell-DNA ist. Somit zeigt eine negative PCR-Reaktion der Kontrollprobe die Reinheit der verwendeten RNA-Probe an.

Die zu cDNA umgewandelte mRNA kann nun durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt werden.

Dazu werden je Probe bei 4° C 5 µl PFU-Puffer, 5 µl cDNA, 8 µl dNTP-Nukleotide, 1 µl Primer für *ompA*, *16S RNA* und *cpaf* in einem 0,5 ml Eppendorfergefäß gemischt. Die spezifischen Primer (siehe Kapitel 2.8.2) wurden mittels der Software von Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, erstellt. Anschließend wird je 1 µl PFU- und Tag-Polymerase hinzugegeben und die Proben in einem PCR Gerät nach einem bestimmten Zyklus immer wieder gekühlt und erhitzt, sodass sich die hitzeresistenten Polymerasen wiederholt an dem cDNA-Strang anlagern, diesen kopieren, sich von der Kopie und dem Original lösen und sich anschließend erneut anlagern. Auf diese Weise werden wenige cDNA-Stränge exponentiell vermehrt. Bei den für die hier verwendeten Primer optimalen Konditionen werden die Proben initial für 2 min auf 95° C erhitzt, anschließend wird folgender Zyklus 33 mal wiederholt: die Proben werden 30 sec bei 95° C, 1 min bei 59° C und 1,5 min bei 72° C erhitzt. Abschließend werden die Proben 15 min bei 72° C belassen und bei 1,5° C gelagert.

Nach einer gelungenen PCR ist der für die verwendeten Primer spezifische cDNA-Abschnitt so oft vervielfältigt, dass die DNA im Ethidiumbromid-Gel zur Darstellung gebracht werden kann. Die Anzahl der somit detektierten Kopien ist proportional zu der in der Ausgangsprobe befindlichen mRNA. So kann eine semiquantitative Aussage über den mRNA-Gehalt in der Ausgangsprobe getroffen werden und verschiedene Zellproben können in einem Experiment miteinander verglichen werden. Zur Bereitung des Gels, in dem die DNA-Kopien aufgetragen werden, werden 1,5 g Agarose in 150 ml TAE-Puffer aufgeköcht und gelöst. Das flüssige Gel wird in eine Gelkammer gefüllt, mit 1,5 µl Ethidiumbromid gemischt (1 % Agarosegel), ein Kamm eingesetzt und eine halbe Stunde zum Polymerisieren stehen gelassen, bis das Gel fest ist. Nachdem der Kamm entfernt und das Gel mit Laufpuffer bedeckt wurde, können die Proben der PCR in die Gel-Taschen gefüllt werden. Die DNA wird nun 1 h bei 170 mA und 140 V aufgetrennt und anschließend in einem Gerät für Gelanalyse zur Darstellung gebracht und fotografiert. Die Größe der zu erwartenden DNA-Stränge kann mit der ebenfalls aufgetragenen Kontrollmischung (gene ruler) geprüft werden.

3.7.3 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion aus cDNA

Prinzip: Während der Polymerase-Kettenreaktion lagert sich ein fluoreszierender Marker in die DNA-Stränge ein, welche durch spezifische Primer vervielfältigt werden. Die durch einen Laser angeregte Lichtemission verhält sich proportional zu der Anzahl der DNA-Kopien. Die Menge an cDNA korreliert mit der Ausgangsmenge von mRNA. So kann die in den Proben vorhandene Menge an mRNA quantitativ miteinander verglichen werden.

Für die hier ausgeführte Echtzeit-PCR kam das LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green-Set von Roche zur Verwendung. Nach Herstellerangaben werden je Probe 2 µl cDNA (aus 0,5 µg RNA), 10 µl 480SYBR Green I Master Mix von Roche Applied Science, je 1 µl (0,5 µM) 5' und 3' Primer und 5 µl H₂O gemischt. Jede Probe wird in einem technischen Replikat 2 mal auf einer MicroAmp 96-Loch Platte aufgetragen, außerdem wird eine Kontrollprobe ohne cDNA analysiert. Anschließend wird zu jeder Probe 1 µl SYBR Green (1:50) pro Well hinzugefügt. Die Primer-Sequenzen wurden mittels eines Programms der Thermo Fisher Scientific GmbH in Ulm erstellt. Als Referenz-Gen wurde β-Aktin verwendet. Der LightCycler480 (Roche Applied Science) wird wie folgt programmiert: die Proben werden initial für 15 min auf 95° C erhitzt, anschließend wird dieser Zyklus 45 mal wiederholt: die Proben werden 15 sec bei 95° C, 15 sec bei 60° C und 25 sec bei 72° C erhitzt.

Die relative Menge der analysierten Genabschnitte wurde mittels der $\Delta\Delta CT$ - (comparative threshold cycle) Methode ermittelt. Zuerst wurde ΔCT berechnet, indem die Ziel CT-Werte von β-Aktin CT-Werten subtrahiert wurden. Die ΔCT -Werte von unbehandelten Proben (Mock) wurden anschließend von den zuvor ermittelten $-\Delta CT$ Werten abgezogen und so die normalisierten $\Delta\Delta CT$ -Werte berechnet. Mittels der Formel $FC=2^{\Delta\Delta CT}$ wurde die FC (fold change) der mRNA-Expression, also das Verhältnis der Genexpression im Bezug auf das Grundniveau berechnet. Um die FC von verschiedenen Experimenten vergleichen zu können, wurde der höchste FC-Wert, z.B. der von IFN γ stimulierten Zellen, mit 100 % bezeichnet und die restlichen Werte in Bezug zu diesem Wert normalisiert. Aus je 2 Wertepaaren einer Probe wird mit Microsoft Excel der Mittelwert bestimmt und mit SigmaPlot als FC (%) grafisch dargestellt.

3.8 Proteingewinnung und Transfektion von BMDMs

3.8.1 Proteingewinnung

Prinzip: Eine zu klonierende DNA-Sequenz (*cpaf*) aus dem Chlamydien-Genom wird mit spezifischen Primern durch PCR vervielfältigt, in einen pASK-IBA-45+ HIS-markierten Vektor kloniert und das Plasmid in *E. coli* Top10-Zellen vervielfältigt. Das CPAF-Protein-Konstrukt wird von BL-21-Codon Plus®-RIL *E. coli* Bakterien als Einschlussprotein produziert und in drei Stufen rückgefaltet: Die Aufreinigung erfolgt zuerst durch Affinitäts-Chromatographie unter Verwendung einer Streptavidin-Sepharose-Säule, im zweiten Schritt mittels Gel-Filtration und zuletzt mit Hilfe einer PD10-Entsalzungssäule.

3.8.2 Klonierung von CPAF aus *Chlamydomophila*-DNA

Prinzip: Die DNA von *cpaf* wird mit Hilfe des Qiapm DNA Mini Kits von Qiagen aus *C. pneumoniae* kloniert.

C. pneumoniae wird in 180 µl ALT Puffer und 20 µl Proteinase K für 1 h bei 56° C lysiert. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert, und das Pellet in 150 µl des Puffers AL 10 min bei 70° C inkubiert, das Lysat zentrifugiert, das Pellet in 200 µl Ethanol gelöst und auf eine Qiapm-Spin-Säule übertragen. Die DNA ist nun auf der Säule fixiert und wird mit je 500 µl der Puffer AW1 und AW2 gewaschen. Die DNA wird mit Puffer AE von der Säule gelöst und durch 1 minütiges Zentrifugieren bei 8.000 x g in ein Eppendorfergefäß übertragen. Der zu klonierende DNA-Abschnitt wird nun durch spezifische Primer vervielfältigt. Mit Hilfe der Software von Thermo Electron GmbH wurden Primer für *cpaf* designed, welche am N-Terminus mit einem 10 Aminosäuren langen Strep-tag-II-Peptid und am C-Terminus mit einem für hexa-HIS kodierenden Aminosäureabschnitt endigen. Diese Primer kommen in einer PCR zur Anwendung, bei der 4 µl DNA mit 7 µl dNTPs, 5 µl PFU-MgSO₄-Puffer, 30 µl ddH₂O, je 1 µl der 5'- und 3'-Primer und je 1 µl der PFU- und der TAG-Polymerase zusammengefügt werden. Die PCR wird bei einer Schmelztemperatur von 58° C durchgeführt. Die DNA-Sequenz für das rekombinante *cpaf* wird so vervielfältigt, und das Amplifikat (1860 bp) zur Größenkontrolle auf einem Agarose-Gel zur Darstellung gebracht und fotografiert. Hiernach wird die DNA wieder mit Hilfe des Qiaquick-Sets aus dem Gel gelöst. Dazu wurden Reagenzien, wie vom Anbieter empfohlen eingesetzt, und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Anschließend wird das Insert, also der DNA-Abschnitt des rekombinanten *cpaf*, in einen pASK-IBA-45+ Vektor kloniert. Dazu wird sowohl das Insert als auch der Vektor mit je 2 µl der Verdauungsenzyme Hind III und BamHI, H₂O und 6 µl Tango+-Puffer in einem Endvolumen von 30 µl für eine Stunde bei 37° C und leichtem Schütteln geschnitten, und anschließend werden die Enzyme bei 65° C für 15 min hitzeinaktiviert. Auf einem 1 prozentigen Agarose-Gel wird der geschnittene Vektor aufgetragen, abgebildet, und die DNA mit dem Qiaquick-Set wieder aus dem Gel gelöst. Im nächsten Schritt, der Ligation, wird das Insert in den Vektor eingefügt, so dass sich wieder ein geschlossenes Plasmid bildet. Hierbei werden 5 µl des Vektors, 9 µl des Inserts und je 2 µl von T₄-Ligase, Puffer und H₂O eine Stunde bei 22° C und anschließend 3 Stunden bei 37° C inkubiert, die Größe des erhaltenen DNA Abschnittes auf einem Agarose-Gel überprüft und die DNA anschließend herausgelöst.

Als nächstes folgt die Transformation, bei der das Plasmid in Bakterien vervielfältigt wird. *E. coli* Top 10-Bakterien werden auf Eis aufgetaut, 5 µl des Plasmids hinzugefügt und 30 min zur Anlagerung des Plasmids an die Zellen belassen. Zur Kontrolle wird derselbe Bakterienstamm mit einem leeren Plasmid ohne Insert beimpft. Dann werden die Bakterien durch einen 45 sec dauernden Hitzeschock von 45° C geöffnet, wodurch das Plasmid in die Zelle gelangt. Anschließend werden 700 µl S.O.C.-Medium (Nährmedium) hinzugefügt und die Zellen für eine Stunde bei 37° C am Schüttler inkubiert. Danach werden sie auf einer Antibiotika-haltigen Nährplatte ausplattiert und 12-16 Stunden bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Versuchs- und Kontrollplatte verglichen, wobei auf der Platte mit funktionsfähigen, Insert-haltigen Plasmiden antibiotikaresistente Kulturen zu sehen sind, auf der Kontrollplatte hingegen lediglich einige wenige durch Spontanmutation entstandene Kulturen. Die Plasmid-haltigen Kulturen müssen nun vervielfältigt und die Plasmid-DNA muss aus den Zellen isoliert werden. Dazu wird das Miniprep Kit von Qiagen verwendet und die Puffer nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Zuerst werden einzelne Kolonien der *E. coli* Top10-Bakterien über Nacht bei 37° C unter ständiger Bewegung in 10 ml LB-Medium vervielfältigt. Am nächsten Morgen werden 2 ml der Übernachtskultur zentrifugiert, das Pellet in dem Lysepuffer P1 resuspendiert und anschließend Puffer P2 und N2 hinzugefügt. Die Reste der lysierten Bakterien werden danach abzentrifugiert und der DNA-haltige Überstand auf eine spezielle Säule gebunden. Dort wird die DNA mit den Puffern PB und PE gereinigt, mit Puffer EB gelöst und in einem 1,5 ml Eppendorfer Gefäß gesammelt. Kleine Proben der gewonnenen Plasmide werden zur Kontrolle noch einmal mit den Verdauungsenzymen HindIII und BamHI geschnitten und auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Von den Übernachtskulturen, welche für das Miniprep verwendet wurden, wurden kleine Anteile in Glycerin konserviert. Diese werden nun für ein Maxiprep von Qiagen verwendet und nach dem gleichen Prinzip des Minipreps größere Mengen des Plasmids hergestellt. Zur abschließenden Kontrolle der Klonierung werden nun die gewonnenen Plasmide noch einmal geschnitten, auf Gel aufgetragen, das Insert aufgereinigt und zur endgültigen Bestätigung der richtigen Aminosäureabfolge durch die GATC Biotech AG in Konstanz, Deutschland, sequenziert.

3.8.3 Expression und Purifikation von CPAF

Prinzip: Das Plasmid wird in BL-21-Codon Plus®-RIL *E. coli*-Bakterien transformiert: die Bakterien produzieren rekombinantes CPAF-Protein, welches am C'-Ende mit HIS und am N'-Ende mit Strep markiert ist.

Die Plasmide werden durch Hitzeschock (s.o.) in BL-21-Codon Plus®-RIL *E. coli*-Bakterien eingeschleust und die Bakterien in 100 ml LB-Nährmedium, welches mit Ampicillin und Chloramphenicol versetzt ist, über Nacht bei 30° C bebrütet. Am nächsten Morgen werden Bakterien aus der Übernachtskultur in einem Liter Nährmedium bei 25° C bebrütet, und alle 20 min wird die optische Dichte (OD) gemessen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 werden 250 µl des Induktors Anhydrotetracyclin in den Kolben gegeben und somit die Proteinexpression induziert. Für 2-3 Stunden werden die Bakterien zur Proteinproduktion im Inkubator belassen. Eine Lyse der Zellen muss jedoch durch regelmäßige OD-Kontrolle ausgeschlossen werden. Zum Zeitpunkt der Ernte soll der OD-Wert 0,7 betragen. Die Zellen werden auf Eis zügig in 6 Zentrifugenbecher verteilt und 15 min bei 1500 x g und 4° C zentrifugiert. Die Nährlösung wird entfernt und die Pellets in je 10 ml PBS und Protease-Inhibitor gelöst. Die Zellen werden im Ultraschall vorbehandelt, mehrmals mit einem Homogenisator lysiert und danach wieder zentrifugiert. Abschließend werden die Lysate 3 mal in einer 1 prozentigen Tritonlösung, einmal mit einer 0,05 prozentigen Tritonlösung gewaschen, also gegen einen Triton X-100-Gradienten verdünnt und abschließend mit einem SAC-Puffer gewaschen.

Das Protein ist nun von den Zellresten der *E.coli*-Bakterien gereinigt, liegt aber noch in Form von Inklusionen vor. Im nächsten Schritt wird das Protein in Lösung gebracht und denaturiert, um dann wieder rückgefaltet zu werden. Somit wird das Protein von den funktionslosen Inklusionen in die funktionsfähige Tertiärstruktur gebracht.

Dazu wird das Protein in einem 6-molaren Guanidin-Hydrochlorid-Puffer aufgeschlossen. Anschließend wird zentrifugiert und das Protein in einem Dialysepuffer für 2 Tage bei 4° C gegen einen Gradienten rückgefaltet.

Schließlich muss das Protein aufgereinigt werden: dazu werden eine Streptavidin-Affinitätschromatographie und eine Gelfiltration verwendet.

Bei der Affinitätschromatographie bindet das Streptavidin am N-Terminus des rekombinanten CPAF an ein spezielles Säulensystem. Hier wurde die MacroPrep® 50 Cartridge von IBA (Göttingen, Deutschland) verwendet. Die nötigen Puffer wurden wie vom Hersteller empfohlen eingesetzt. Wegen der proteolytischen Aktivität des CPAF muss eine hohe Konzentration von Protease-Inhibitoren, eine

Tablette pro 50 ml Puffer, verwendet werden. Abschließend wird das Protein noch einmal durch Gelfiltration mit einer Superdex 10/300 GL (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) gereinigt und der Endotoxingehalt des rekombinanten Proteins durch die ACILA AG (Mörfelden, Deutschland) bestimmt.

Nun kann das Protein CPAF (711,80 kDa, pI = 5,811) in der Zellkultur zur Anwendung kommen.

3.8.4 Transfektion von CPAF in BMDMs mittels DOTAP als Träger

Prinzip: Das rekombinante und aufgereinigte CPAF-Protein wird mit DOTAP gemischt, es bilden sich Mizellen, in denen das Protein eingeschlossen ist. Makrophagen nehmen diese auf. Durch die hohe Konzentration von CPAF wird das Protein im Cytosol freigesetzt und kann als Protease auf zelleigene Proteine wirken.

1×10^6 Makrophagen werden pro Well in einer 6-Loch Platte ausplattiert und einen Tag bei 37°C und 10 % CO_2 in 2 ml einer 10 prozentigen FCS-Lösung bebrütet. 2 Stunden vor Transfektion wird der FCS-Gehalt auf 5 %, eine Stunde zuvor auf 0 % reduziert. 100 μl DOTAP (1 mM in einer 1:4 Verdünnung) werden zu 100 μl Protein (100 μg) gegeben und durch wiederholtes Invertieren eines Eppendorfergefäßes für 20 min auf Eis vermischt, sodass das Trägermedium DOTAP das CPAF-Protein mizellenartig umschließt. DOTAP wurde also in einer 10 mal höheren molaren Konzentration als CPAF eingesetzt. Anschließend werden in das Zuchtmedium der Makrophagen je Well 200 μl des Transfektionsmediums hinzugefügt, sodass die Transfektion mit 50 μg CPAF/ml für 1×10^6 Makrophagen erfolgt. Im Mikroskop beobachtet man Mizellen, die sich an die Zelloberfläche anlagern. Zur Kontrolle werden zusätzlich Makrophagen nur mit DOTAP ohne Protein versetzt. Nach 3 h Inkubationszeit wird die Transfektion abgebrochen, die Zellen werden für 3 min mit Trypsin-EDTA leicht gelöst, damit freies Protein auf den Zellen verdaut wird, und anschließend 3 mal mit PBS-3 % FCS gewaschen. Die transfizierten Zellen werden nun mit 120 μl RIPA-Puffer, zu welchem Proteaseinhibitor (1:20) und Ortho-Vanadat (1:1000) beigemischt sind, bei 4°C eine halbe Stunde lysiert (siehe Kapitel 3.5). Das Proteingemisch wird im Western Blot unter Verwendung des anti-HIS-tag von CPAF analysiert.

3.9 Konfokale Mikroskopie

1×10^6 BMDMs und $0,5 \times 10^6$ MEFs werden in eine 12-Well-Platte ausgesät, auf deren Boden sich ein rundes Deckgläschen befindet. Nach eintägiger Inkubationszeit werden die adhärenen Zellen mit *C. pneumoniae* infiziert und 48 h bebrütet. Das Infektionsmedium wird entfernt und die Zellen mit Methanol-Aceton-Lösung (1:1 w/v) für 5 min fixiert, mit PBS gewaschen, kurz getrocknet, das runde Deckgläschen mit den fixierten Zellen entfernt und auf einen Objektträger aufgeklebt.

Zur Färbung der Chlamydien werden ca. 30 µl einer 1:3 Lösung aus fluoreszierendem Anti-CP-Antikörper und Evens Blue (ACI-FITC) und PBS auf die Zellen aufgetragen und 35 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wird der Antikörper vorsichtig abgewaschen, die Zellen kurz getrocknet, mit Glycerin/PBS (50 %) fixiert und mit einem Deckglas geschützt. Die Zellen können nun im Fluoreszenzmikroskop (Konfokale Mikroskop LSM 510, Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen, Deutschland) betrachtet und fotografiert werden.

3.10 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit der Software von SPSS durchgeführt. Je nach Anzahl der Variablen wurden die Mittelwerte der Proben mit einer ein-faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) in Kombination mit einem post-hoc Verfahren und einer Korrektur nach Holm-Sidak verglichen, oder es wurde ein T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Nullhypothese wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ abgelehnt.

4 Ergebnisse

4.1 *Chlamydomphila pneumoniae* reduziert die Expression von MHC Klasse II in BMDMs

4.1.1 PAMPs von *Chlamydomphila pneumoniae* verhindern die IFN γ -induzierte Hochregulation der Oberflächenexpression von MHC Klasse II in BMDMs

In Epithelzellen oder Fibroblasten kann *C. pneumoniae* *in vitro* die IFN γ -induzierte Stimulation von MHC Klasse II an der Zelloberfläche durch die Sekretion eines Protease-ähnlichen Aktivitätsfaktors verhindern [Zhong, 1999]. Da *C. pneumoniae* *in vivo* auch in Makrophagen und APC nachgewiesen werden konnte [Gieffers, 2004], untersuchten wir den Effekt von *C. pneumoniae* auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II in infizierten Makrophagen im *in vitro* Modell. Hierzu wurden primäre BMDMs für 48 h mit *C. pneumoniae* infiziert und nach 24 h mit IFN γ stimuliert. Anschließend analysierten wir die Oberflächenexpression von MHC Klasse II in der Durchflusszytometrie. Hier zeigte sich, dass die Infektion mit *C. pneumoniae* zu einer Reduktion der basalen Expression von MHC Klasse II auf der Oberfläche von nativen WT BMDMs führt. Nach 24 Stunden Stimulation mit dem Zytokin IFN γ beobachtet man auf nicht infizierten Zellen einen deutlichen Anstieg des Oberflächenproteins im FACS. Diese Stimulation kann durch Infektion mit *C. pneumoniae* vollständig unterdrückt werden. Jedoch kommt dieser Effekt nur ganz zu tragen, wenn die Stimulation mit dem Zytokin 24 Stunden nach der Infektion erfolgt, nicht aber wenn gleichzeitig infiziert und stimuliert wird (siehe Abbildung 4.1 und 4.2). Aus diesem Grund wurde in den folgenden Experimenten immer erst 24 Stunden nach Infektion oder Zugabe eines Antigens zu den Zellen mit IFN γ stimuliert.

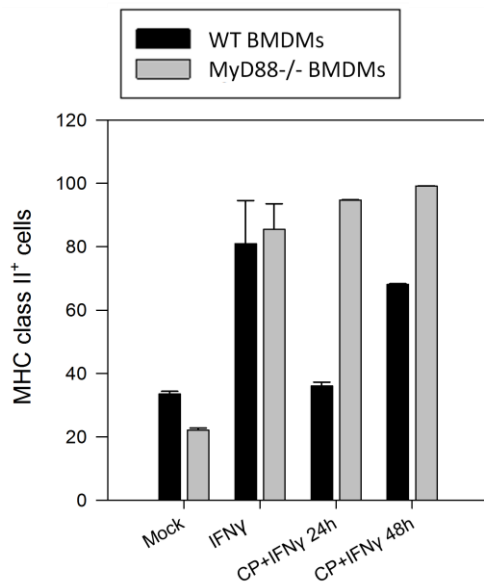


Abbildung 4.1

Abbildung 4.1

C. pneumoniae verhindert die IFN γ -induzierte Stimulation der Oberflächenexpression von MHC Klasse II abhängig von MyD88.

Wildtyp BMDMs (schwarze Säulen) und MyD88^{-/-} BMDMs (graue Säulen) wurden unbehandelt verwendet (Mock), mit 10 ng/ml IFN γ für 24 h stimuliert (IFN γ) oder mit *C. pneumoniae* (CP) bei einem MOI von 10 für 48 h infiziert und dabei für 24 h (CP+IFN γ 24h) bzw. 48 h (CP+IFN γ 48h) mit IFN γ stimuliert. Die Zellproben wurden in der Durchflusszytometrie analysiert und die Oberflächenexpression von MHC Klasse II bestimmt. Die Graphik zeigt die MHC Klasse II-positiven Zellen in Prozent. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei verschiedenen Experimenten.

Zur Überprüfung, ob ein von lebenden Chlamydien sezernierter Faktor für diesen Effekt verantwortlich ist, führten wir denselben Versuchsaufbau wie oben beschrieben durch, verwendeten jedoch anstatt lebender hitzeinaktivierte Chlamydien. Überraschenderweise sind tote genauso wie lebende Chlamydien in der Lage, das basale Niveau von MHC Klasse II zu reduzieren und die Induktion von MHC Klasse II durch IFN γ in WT BMDMs vollständig zu verhindern (siehe Abbildung 4.2).

Aus diesen Beobachtungen schlossen wir, dass in BMDMs kein aktiver Faktor wie eine Protease, sondern eher ein PAMP die MHC Klasse II-Expression auf der Zelloberfläche beeinflusst. Um dieser Theorie nachzugehen, verwendeten wir MyD88-defiziente (MyD88^{-/-}) BMDMs. Da MyD88 essentieller Bestandteil der Signalkaskade bei der Stimulation von TLRs durch PAMPs ist, besteht die Möglichkeit mit diesen Knockout Mäusen eine Abhängigkeit von PAMPs nachzuweisen. Wir untersuchten die Oberflächenexpression von MHC Klasse II, wie oben beschrieben, bei nativen Zellen, nach Stimulation mit IFN γ sowie nach Infektion mit *C. pneumoniae* bzw. hitzeinaktivierten Chlamydien jeweils mit und ohne Induktion durch IFN γ . Es wurden Wildtyp (WT) mit MyD88^{-/-} Makrophagen verglichen. Bei den MyD88^{-/-} BMDMs konnte im Gegensatz zu den Zellen aus WT Mäusen die Induktion von MHC Klasse II auf der Zelloberfläche durch IFN γ weder durch lebende noch durch hitzeinaktivierte Chlamydien verhindert werden. Diese Beobachtungen sprechen für einen MyD88-abhängigen PAMP-Effekt von *C. pneumoniae*, der die Oberflächenexpression von MHC Klasse II auf BMDMs beeinflusst (siehe Abbildung 4.1 und 4.2).

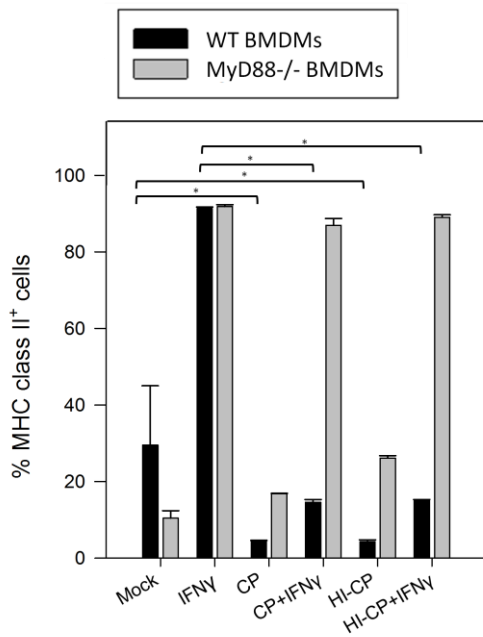


Abbildung 4.2

Abbildung 4.2

C. pneumoniae und hitzeinaktivierte Chlamydien verhindern die IFN γ -induzierte Stimulation der Oberflächenexpression von MHC Klasse II, abhängig von MyD88.

Wildtyp BMDMs (schwarze Säulen) und MyD88^{-/-} BMDMs (graue Säulen) wurden unbehandelt verwendet (Mock), mit 10 ng/ml IFN γ für 24 h stimuliert (IFN γ) oder für 48 h mit *C. pneumoniae* (CP) bzw. hitzeinaktivierten Chlamydien (HI-CP) bei einem MOI von 10 infiziert. Des Weiteren wurden Zellen für 48 h mit *C. pneumoniae* oder hitzeinaktivierten Chlamydien infiziert und zusätzlich für 24 h mit IFN γ stimuliert (CP+IFN γ , HI-CP+IFN γ). Die Zellproben wurden in der Durchflusszytometrie analysiert und die Oberflächenexpression von MHC Klasse II bestimmt. Die Graphik zeigt die MHC Klasse II-positiven Zellen in Prozent. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei verschiedenen Experimenten. * $P < 0.001$ ANOVA post hoc Holm-Sidak.

Zur Untermauerung dieser Interpretation verglichen wir den Effekt von typischen PAMPs, wie LPS und CpG, mit den Ergebnissen, die wir mit *C. pneumoniae* erzielten. Zuerst überprüften wir die Fähigkeit von LPS und CpG, das basale Niveau von MHC Klasse II an der Zelloberfläche zu reduzieren und beobachteten in der Durchflusszytometrie, dass dies in WT Zellen nach 24 h Stimulation möglich ist. *C. pneumoniae* bewirkt nach 24 h Infektionszeit noch keine Reduktion des basalen Niveaus von MHC Klasse II (siehe Abbildung 4.3).

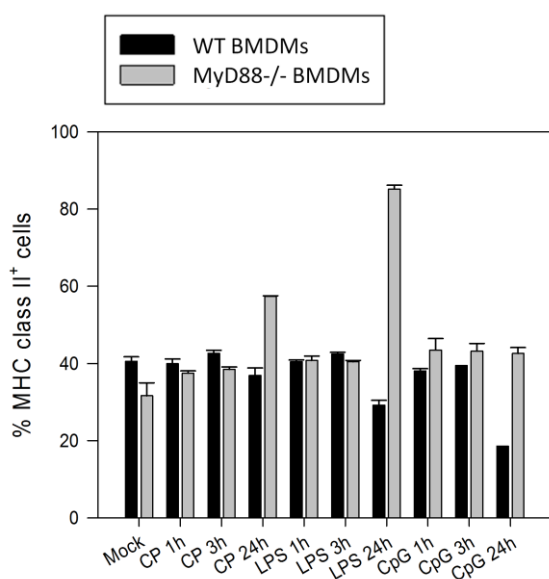


Abbildung 4.3

Abbildung 4.3

LPS und CpG reduzieren nach 24 h die Oberflächenexpression von MHC Klasse II, abhängig von MyD88.

Wildtyp BMDM (schwarze Säulen) und MyD88^{-/-} BMDM (graue Säulen) wurden unbehandelt verwendet (Mock), für 1 h, 3 h oder 12 h mit *C. pneumoniae* (CP) bei einem MOI von 10 infiziert, mit 1 ng/ml LPS oder mit 1 mM/ml CpG stimuliert. Die Zellproben wurden in der Durchflusszytometrie analysiert und die Oberflächenexpression von MHC Klasse II bestimmt. Die Graphik zeigt die MHC Klasse II-positiven Zellen in Prozent. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei verschiedenen Experimenten.

Danach untersuchten wir den Effekt der PAMPs auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II nach Induktion durch $\text{IFN}\gamma$. Wir stimulierten WT und $\text{MyD88}^{-/-}$ BMDMs für 48 h mit LPS bzw. CpG und optional nach 24 h zusätzlich mit $\text{IFN}\gamma$. In WT Makrophagen wird die $\text{IFN}\gamma$ -vermittelte Induktion von MHC Klasse II durch lebende *C. pneumoniae*, hitzeinaktivierte *C. pneumoniae*, LPS sowie CpG verhindert, nicht jedoch in $\text{MyD88}^{-/-}$ Zellen (siehe Abbildung 4.4). Diese Beobachtungen bestätigen: Die Wirkung von lebenden *C. pneumoniae* auf die Oberflächen-expression von MHC Klasse II entspricht der eines MyD88 -abhängigen PAMP und ist unabhängig von der Fähigkeit der Chlamydien, eigene Faktoren zu produzieren oder zu sezernieren.

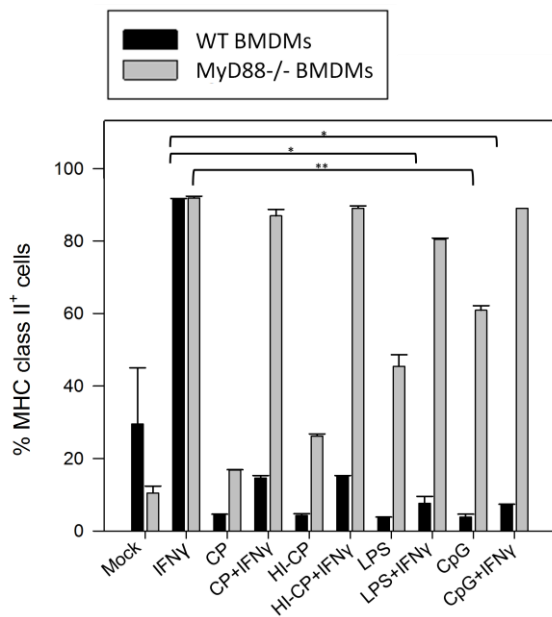


Abbildung 4.4

Abbildung 4.4

LPS und CpG verhindern ebenso wie *C. pneumoniae* und hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Oberflächenexpression von MHC Klasse II auf BMDMs, abhängig von MyD88 .

Wildtyp (schwarze Säulen) und $\text{MyD88}^{-/-}$ BMDMs (graue Säulen) wurden unbehandelt verwendet (Mock), für 24 h mit 10 ng/ml $\text{IFN}\gamma$ stimuliert, für 48 h mit *C. pneumoniae* (CP) oder hitzeinaktivierten Chlamydien (HI-CP) bei einem MOI von 10 infiziert oder mit 1 ng/ml LPS (LPS) bzw. mit 1 μM CpG (CpG) stimuliert. Außerdem wurden Zellen zusätzlich für 24 h mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert (CP+ $\text{IFN}\gamma$, HI-CP+ $\text{IFN}\gamma$, LPS+ $\text{IFN}\gamma$, CpG+ $\text{IFN}\gamma$). Die Zellproben wurden in der Durchflusszytometrie analysiert und die Oberflächenexpression von MHC Klasse II bestimmt. Die Graphik zeigt die MHC Klasse II-positiven Zellen in Prozent. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei verschiedenen Experimenten. * $P < 0.001$, ** $P < 0.05$, ANOVA post hoc Holm-Sidak und T-Test für unabhängige Stichproben.

Die TLR-Signalkaskade führt nicht nur zur Aktivierung von NFκB, sondern auch zur Induktion der MAP-Kinasen, darunter p38. Um eine Abhängigkeit unserer Beobachtungen von diesem Teil der Signalkaskade nachzuweisen, ergänzten wir unsere Versuchsreihe durch einen Inhibitor für p38. Auch in diesem Versuch wurden WT und MyD88^{-/-} BMDMs mit IFN γ stimuliert. Zu *C. pneumoniae*, hitzeinaktivierten Chlamydien und durch LPS (48 h) stimulierten Zellen wurde optional für 48 Stunden der p38-Inhibitor SB203580 hinzugefügt. Zusätzlich wurde wahlweise nach 24 h mit IFN γ stimuliert. Im FACS zeigte sich, dass in den WT Zellen die Hochregulation von MHC Klasse II durch IFN γ nach Zugabe des p38-Inhibitors trotz Vorbehandlung der Zellen mit *C. pneumoniae*, hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* oder LPS wieder teilweise möglich ist. In MyD88^{-/-} BMDMs wurden nach Zugabe des p38 Inhibitors keine Reduktion der Stimulation von MHC Klasse II gesehen (siehe Abbildung 4.5). Da die Unterdrückung der Oberflächenexpression von MHC Klasse II durch *C. pneumoniae*, hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* und LPS nach Zugabe des p38-Inhibitors gleichermaßen aufgehoben wird, ist dieser Versuch ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von TLRs, im Speziellen des TLR4, bei der Beeinflussung der Oberflächenexpression von MHC Klasse II durch *C. pneumoniae*.

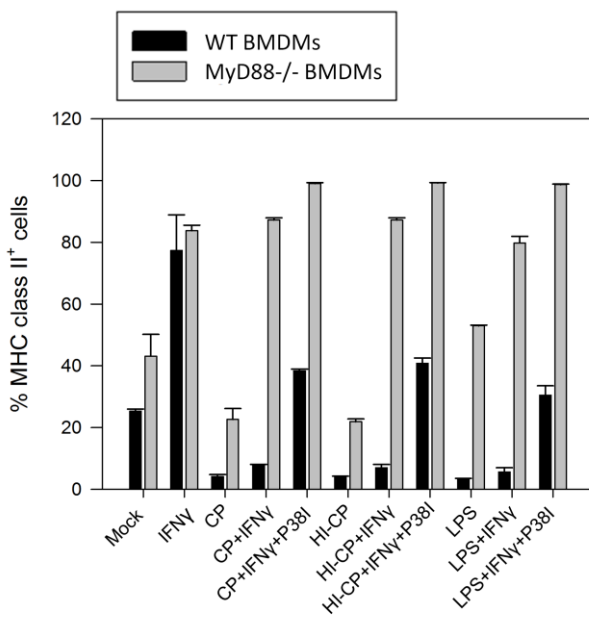


Abbildung 4.5

Abbildung 4.5

Der p38-Inhibitor SB203580 kann die Unterdrückung der IFN γ -induzierten Oberflächenexpression von MHC Klasse II in WT BMDMs durch LPS, *C. pneumoniae* und hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* teilweise aufheben.

Wildtyp BMDMs (schwarze Säulen) und MyD88^{-/-} BMDMs (graue Säulen) wurden unbehandelt verwendet (Mock), für 24 h mit 10 ng/ml IFN γ stimuliert (IFN γ), für 48 h mit *C. pneumoniae* (CP) oder hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* (HI-CP) bei einem MOI von 10 infiziert oder mit 1 ng/ml LPS stimuliert. Außerdem wurden Zellen zusätzlich für 24 h mit IFN γ stimuliert (CP+IFN γ , HI-CP+IFN γ , LPS+IFN γ). Des Weiteren wurde für 48 h der p38-Inhibitor hinzugefügt (CP+IFN γ +P38I, HI-CP+IFN γ +P38I, LPS+IFN γ +P38I). Die Zellproben wurden in der Durchflusszytometrie analysiert und die Oberflächenexpression von MHC Klasse II bestimmt. Die Graphik zeigt die MHC Klasse II-positiven Zellen in Prozent. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei verschiedenen Experimenten.

4.1.2 *Chlamydomophila pneumoniae* verhindert die IFN γ -induzierte Hochregulation des MHC Klasse II-Proteinkomplexes im Zytosol

Unsere bisherigen Beobachtungen bezogen sich nur auf die Expression des MHC Klasse II-Proteins an der Zelloberfläche. Um zu untersuchen, in welchem Zellkompartiment *C. pneumoniae* die IFN γ -induzierte Bildung von MHC Klasse II in BMDMs unterbindet, fertigten wir Western Blots aus Zelllysaten von BMDMs an und untersuchten diese auf die Expression der α - bzw. β -Kette von MHC Klasse II. WT und MyD88^{-/-} Makrophagen wurden wie in vorhergehenden Experimenten entweder unbehandelt verwendet oder für 24 h mit IFN γ stimuliert. Außerdem wurden die Zellen mit lebender bzw. hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* für 48 h infiziert und optional zusätzlich mit IFN γ aktiviert. Die Ergebnisse korrelierten mit den bisherigen Beobachtungen: In WT BMDMs wird im Zytosol die Hochregulation der α - und der β -Kette von MHC Klasse II durch IFN γ von lebenden als auch von hitzeinaktivierten Bakterien vollständig unterdrückt. Dieser Effekt ist in MyD88-defizienten Zellen nicht zu beobachten (siehe Abbildung 4.6a-c). Demzufolge wirkt der MyD88-abhängige PAMP-Effekt von *Chlamydomophila pneumoniae* nicht nur auf der Zelloberfläche, sondern auch schon im Zytosol auf den MHC Klasse II-Proteinkomplex.

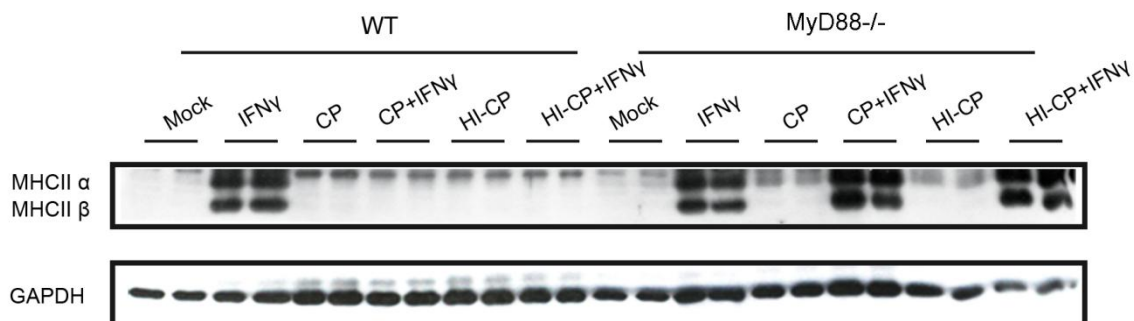


Abbildung 4.6a

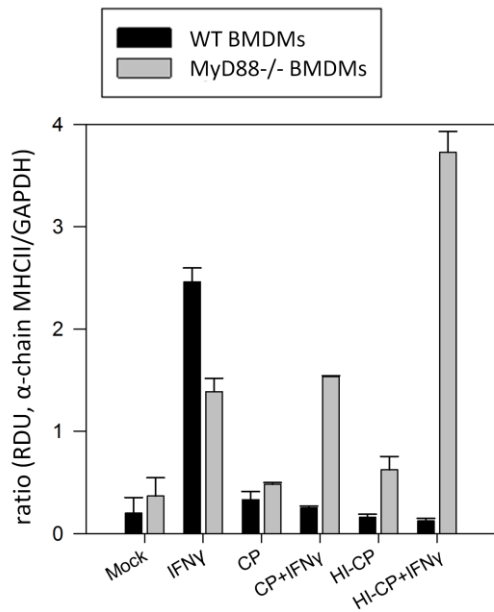


Abbildung 4.6b

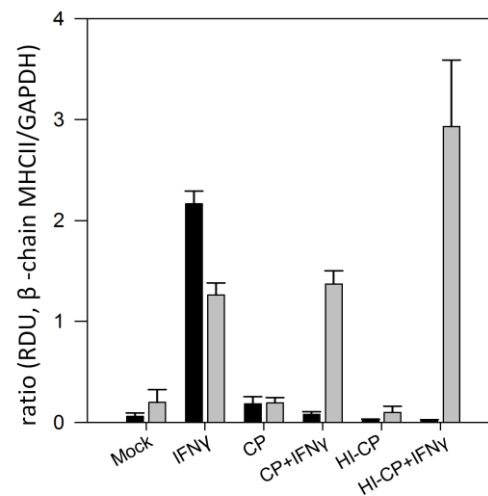


Abbildung 4.6c

Abbildung 4.6

C. pneumoniae und hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* verhindern die IFN γ -induzierte Stimulation des MHC Klasse II-Proteinkomplexes im Zytosol von BMDMs in Abhängigkeit von MyD88.

4.6a zeigt einen Western Blot von WT und MyD88^{-/-} BMDMs bei dem unbehandelte Proben (Mock) verwendet wurden oder Zellen für 48 h mit *C. pneumoniae* (CP) bzw. hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* (HI-CP) bei einem MOI von 10 infiziert wurden. Optional wurden Zellen für 24 h mit 10 ng/ml IFN γ stimuliert (IFN γ , CP+IFN γ , HI-CP+IFN γ). Die Zellproben wurden lysiert und die α - sowie die β -Kette des MHC Klasse II-Proteinkomplexes im Western Blot bestimmt. Als Referenzprotein diente GAPDH.

Die Graphik in 4.6b und 4.6c zeigen das Verhältnis der Bandenstärke der α - bzw. β -Kette von MHC Klasse II zu GAPDH. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei verschiedenen Experimenten.

4.1.3 *Chlamydomphila pneumoniae* verhindert die IFN γ -induzierte Hochregulation der MHC Klasse II-mRNA

Verfolgt man den Syntheseweg des MHC Klasse II-Proteins zurück, interessiert als nächster Schritt vor der Translation des Protein-Komplexes, ob die Transkription der MHC Klasse II-mRNA ebenfalls unter dem Einfluss von IFN γ und *Chlamydomphila pneumoniae* steht. Um dieser Fragestellung nachzugehen, führten wir eine quantitative Echtzeit-PCR durch, in der wir die Bildung der MHC Klasse II-mRNA in WT und MyD88^{-/-} BMDMs untersuchten. Die Stimulation der Zellen erfolgte wie in den vorhergehenden Experimenten mit IFN γ , *C. pneumoniae* und hitzeinaktivierter *C. pneumoniae*. Die Beobachtungen ließen erkennen, dass das Grundniveau der mRNA von MHC Klasse II nicht

vermindert wird. Die Stimulation durch IFN γ kann jedoch sowohl durch hitzinaktivierte als auch durch lebende Chlamydien in Abhängigkeit von MyD88 reduziert werden (siehe Abbildung 4.7). Diese Ergebnisse zeigen, dass *Chlamydomphila pneumoniae* die IFN γ -induzierte Stimulation der Oberflächenexpression von MHC Klasse II auf mRNA-Ebene durch einen MyD88-abhängigen PAMP-Effekt unterbindet.

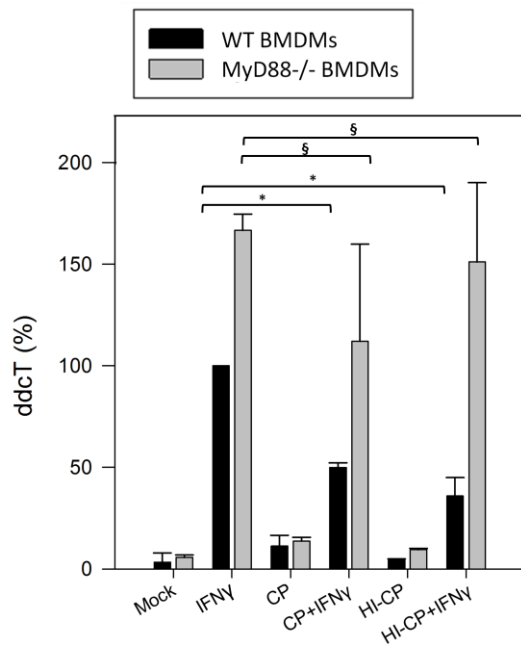


Abbildung 4.7

C. pneumoniae und hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* verhindern die IFN-induzierte Stimulation der mRNA von MHC Klasse II in BMDMs abhängig von MyD88.

Wildtyp (schwarze Säulen) und MyD88^{-/-} BMDMs (graue Säulen) wurden unbehandelt verwendet (Mock), mit 10 ng/ml IFN γ für 24 h stimuliert oder für 48 h mit *C. pneumoniae* (CP) bzw. hitzeinaktivierten Chlamydien bei einem MOI von 10 infiziert. Aus den Zellproben wurde die RNA aufgereinigt, cDNA angefertigt und die Menge für jede Zellprobe im Light Cycler mit SYBRgreen bestimmt. Die so ermittelten CT-Werte wurden nach der ddcT Methode ermittelt und die FC (fold change) in % graphisch dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei verschiedenen Experimenten.

* $P < 0,001$, § $P > 0,05$ ANOVA post hoc Holm-Sidak.

Abbildung 4.7

4.2 *Chlamydomphila pneumoniae* kann typische Inklusionen nur in MEFs ausbilden, nicht aber in BMDMs

Unsere Ergebnisse über den Einfluss von *C. pneumoniae* auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II in BMDMs stehen im Kontrast zu den bisherigen Beobachtungen in Epithelzellen und Fibroblasten. Für diese nicht-professionellen antigenpräsentierenden Zellen wurde der aktiv sezernierte Faktor CPAF beschrieben, welcher die Stimulation von MHC Klasse II durch IFN γ verhindert (siehe Kapitel 1.3.2). In den BMDMs sind aber sowohl lebende als auch hitzeinaktivierte Chlamydien in der Lage, die Oberflächenexpression von MHC Klasse II zu beeinflussen. Um dieser Diskrepanz nachzugehen, überprüften wir zunächst die Fähigkeit von *C. pneumoniae* sich in den verschiedenen Zelltypen zu entwickeln.

Zuerst überprüften wir mittels konfokaler Mikroskopie die Fähigkeit der *C. pneumoniae*, sich in den MEFs zu vermehren. In der Fluoreszenzmikroskopie kann man in WT und MyD88^{-/-} MEFs die für Chlamydien typischen großen Inklusionen erkennen, was einen vollen Replikationszyklus sowie einen funktionsfähigen chlamydialen Stoffwechsel nahelegt (siehe Abbildung 4.8a).

In WT BMDMs kann *C. pneumoniae* keine typischen Inklusionen bilden. Hitzeinaktivierte Chlamydien werden von den Phagozyten jedoch effizient aufgenommen und es bilden sich „Pseudo-Inklusionen“. In MyD88^{-/-} Makrophagen hingegen bildet *C. pneumoniae* viele, sehr kleine, nicht-typische Inklusionen (Abbildung 4.8b).

Die aus atypischen Inklusionen der MyD88^{-/-} Zellen gewonnenen Chlamydien erlauben keine effiziente Infektion von weiteren Zellen (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass nur wenige infektiöse EBs in MyD88^{-/-} Makrophagen gebildet werden.

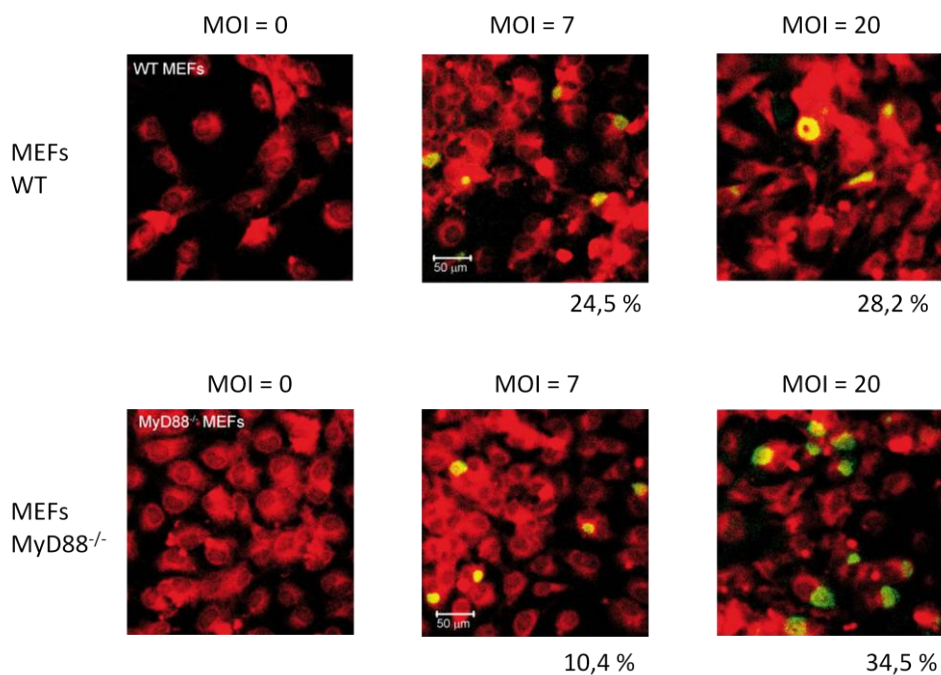


Abbildung 4.8a

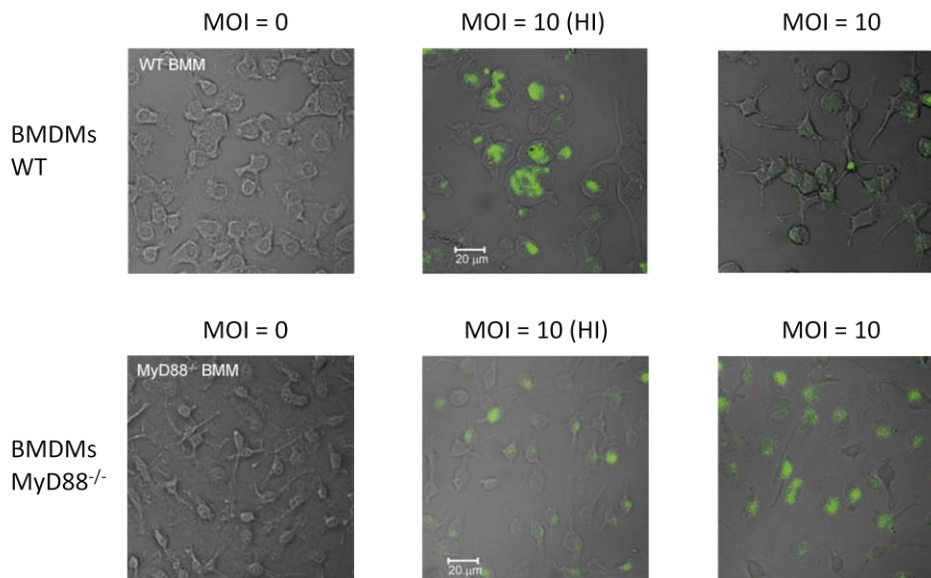


Abbildung 4.8b

Abbildung 4.8

Inklusionskörperchen von *C. pneumoniae* in MEFs und BMDMs.

4.8a WT und MyD88^{-/-} MEFs wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 10 oder MOI = 20) für 48 h infiziert, anschließend fixiert und permeabilisiert. Inklusionen von *C. pneumoniae* wurden intrazellulär mit einem Antikörper gegen chlamydiales LPS gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie abgebildet. Nicht-infizierte Zellen (Mock) dienen als Negativkontrolle. Die Zahlen unterhalb der Grafiken geben die Infektionsrate in Prozent an.

4.8b WT und MyD88^{-/-} BMDMs wurden mit hitzeinaktivierter (HI) oder lebender *C. pneumoniae* (MOI = 10) infiziert. *C. pneumoniae* wurden wie in 4.8a beschrieben dargestellt.

4.3 Lebende *Chlamydomphila pneumoniae* verhindert die IFN γ -induzierte Stimulation von MHC Klasse II in MEFs

Zur Analyse des Einflusses von *Chlamydomphila pneumoniae* auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II in den Fibroblasten übertrugen wir denselben Versuchsaufbau, den wir für die BMDMs verwendeten, auf MEFs. WT und MyD88^{-/-} MEFs wurden optional mit IFN γ stimuliert und mit lebender oder hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* infiziert. Es ist festzustellen, dass auch in den MEFs eine Stimulation der Oberflächenexpression von MHC Klasse II durch IFN γ möglich ist, wenn auch nicht im selben Ausmaß wie in professionellen antigenpräsentierenden Zellen (siehe Abbildung 4.9).

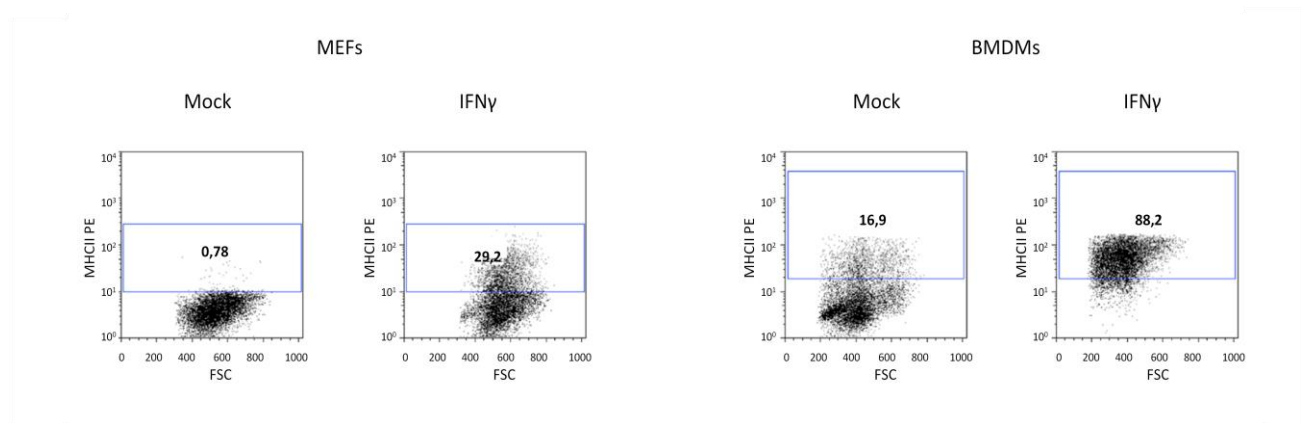


Abbildung 4.9

Abbildung 4.9

In MEFs kann die Oberflächenexpression von MHC Klasse II durch IFN γ nicht in dem Maße induziert werden wie in BMDMs.

Wildtyp BMDMs und MEFs wurden unbehandelt verwendet (Mock) und BMDMs mit 10 ng/ml IFN γ bzw. MEFs mit 30 ng/ml IFN γ für 24 h stimuliert. Die Zellproben wurden in der Durchflusszytometrie analysiert und die Oberflächenexpression von MHC Klasse II bestimmt. Die Graphik zeigt den Dot-Plot der MHC Klasse II-positiven Zellen in Prozent.

C. pneumoniae ist in der Lage, in WT MEFs das Grundniveau von MHC Klasse II an der Zelloberfläche zu reduzieren und die Stimulation durch IFN γ sowohl in WT als auch in MyD88^{-/-} MEFs vollständig zu unterdrücken. Hitzeinaktivierte Chlamydien hingegen können die Stimulation durch IFN γ in WT Zellen nur teilweise, in MyD88^{-/-} Zellen jedoch überhaupt nicht inhibieren (siehe Abbildung 4.10a). Diesen Beobachtungen zufolge sind in Fibroblasten zwei unterschiedliche Mechanismen von *C. pneumoniae* wirksam, die eine Induktion der Oberflächenexpression von MHC Klasse II durch IFN γ inhibieren: Einerseits sind dazu lebende Chlamydien notwendig, andererseits spielt aber wie in Makrophagen auch ein MyD88-abhängiger PAMP-Effekt eine Rolle. Auch LPS kann in WT MEFs die Stimulation der Oberflächenexpression durch IFN γ unterdrücken (siehe Abbildung 4.10b).

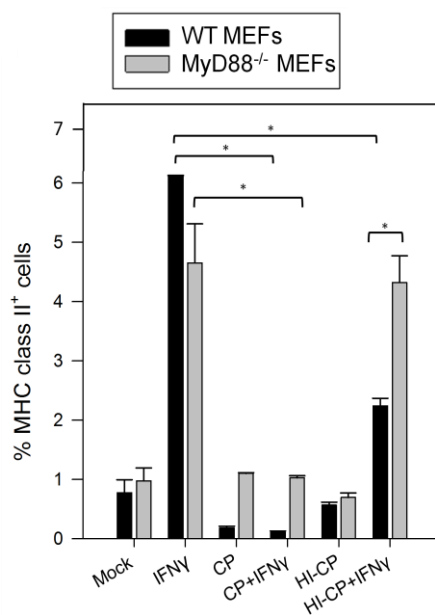


Abbildung 4.10a

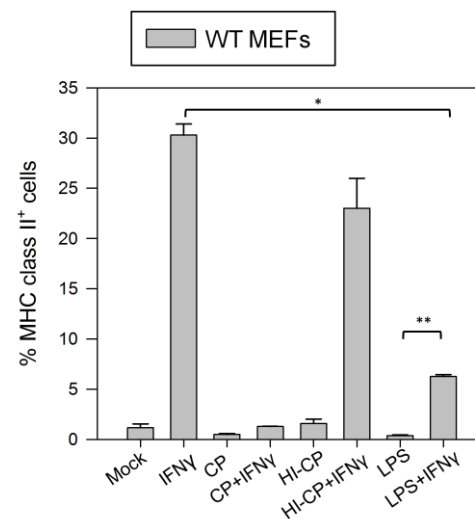


Abbildung 4.10b

Abbildung 4.10

4.10a. *C. pneumoniae* verhindert die IFN γ -induzierte Stimulation der Oberflächenexpression von MHC Klasse II unabhängig von MyD88 in MEFs. Hitzeinaktivierte Chlamydien können die Stimulation durch IFN γ in WT Zellen nur teilweise, in MyD88^{-/-} Zellen jedoch überhaupt nicht inhibieren.

Wildtyp (schwarze Säulen) und MyD88^{-/-} MEFs (graue Säulen) wurden nicht stimuliert (Mock), mit 30 ng/ml IFN γ für 24 h stimuliert (IFN γ) oder für 48 h mit *C. pneumoniae* (CP) bzw. hitzeinaktivierten Chlamydien (HI-CP) bei einem MOI von 20 infiziert. Optional wurden Zellen für 24 h mit 30 ng/ml IFN γ stimuliert (CP+IFN γ , HI-CP+IFN γ). Die Zellproben wurden in der Durchflusszytometrie analysiert und die Oberflächenexpression von MHC Klasse II bestimmt. Die Graphik zeigt die MHC Klasse II-positiven Zellen in Prozent. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei verschiedenen Experimenten. * $P < 0.001$ ANOVA post hoc Holm-Sidak.

4.10b. WT MEFs wurden nicht stimuliert (Mock), mit 30 ng/ml IFN γ für 24 h stimuliert (IFN γ) oder für 48 h mit *C. pneumoniae* (CP) bzw. hitzeinaktivierten Chlamydien (HI-CP) bei einem MOI von 20 infiziert. Außerdem wurden Zellen für 48 h mit 1 ng/ml LPS stimuliert. Optional wurden Zellen für 24 h mit 30 ng/ml IFN γ stimuliert (CP+IFN γ , HI-CP+IFN γ , LPS+IFN γ). In WT Zellen kann LPS die Induktion von MHC Klasse II durch IFN γ teilweise verhindern. * $P < 0.001$, ** $P < 0.05$, T-Test für unabhängige Stichproben.

4.4 Durch eine Infektion mit *Chlamydomphila pneumoniae* wird USF-1 in MEFs degradiert, nicht aber in BMDMs

USF-1 (Upstream stimulatory factor 1) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in die Familie der Helix-Loop-Helix Leucin Zipper einzuordnen ist. USF-1 spielt neben STAT1 und IRF-1 eine Rolle in der durch IFN γ induzierbaren Transkription des CIITA (class II transactivators), welcher wiederum für die Bildung von MHC Klasse II-mRNA notwendig ist [Muhlethaler-Mottet, 1998]. In Zellen wie Fibroblasten und Epithelzellen wird USF-1 nach Infektion mit *Chlamydomphila pneumoniae* durch CPAF degradiert [Zhong, 1999]. Diese Erkenntnisse sollten für unser Modell in WT und MyD88^{-/-} Zellen überprüft werden, wobei die Reaktionen auf lebende und hitzeinaktivierte Chlamydien verglichen wurden (siehe Kapitel 1.3.1).

4.4.1 *Chlamydomphila pneumoniae* degradiert USF-1 in MEFs

MEFs wurden, wie in vorangegangenen Experimenten, optional mit IFN γ stimuliert und mit lebenden Chlamydien infiziert oder mit hitzeinaktivierten Chlamydien versetzt. Anschließend wurde ein Western Blot angefertigt, wobei USF-1 und GAPDH bestimmt wurden. In WT MEFs kann USF-1 durch IFN γ stimuliert werden, durch lebende Chlamydien wird das Grundniveau vermindert und die Induktion durch IFN γ vollständig verhindert. Durch hitzeinaktivierte Chlamydien kann diese Induktion nicht unterbunden werden (siehe Abbildung 4.11a und b).

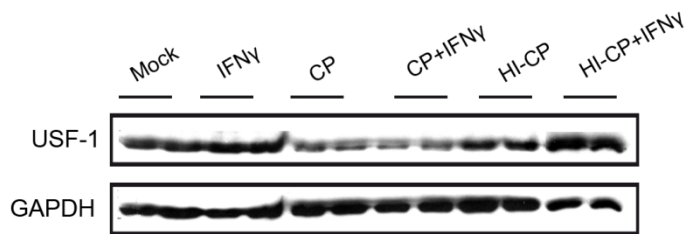


Abbildung 4.11a

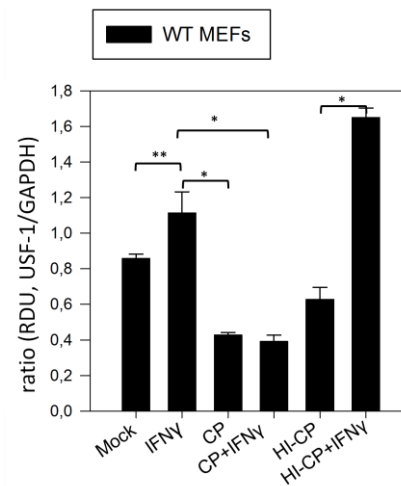


Abbildung 4.11b

Abbildung 4.11

4.11 *C. pneumoniae* verhindert die IFN γ -induzierte Stimulation von USF-1 in WT MEFs, hitzeinaktivierte Chlamydien jedoch nicht.

4.11a zeigt einen Western Blot, bei dem Wildtyp MEFs nicht stimuliert (Mock), mit 30 ng/ml IFN γ für 24 h stimuliert (IFN γ , CP+IFN γ , HI-CP+IFN γ) oder für 48h mit *C. pneumoniae* (CP) bzw. hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* (HI-CP) bei einem MOI von 20 infiziert wurden. Die Zellproben aus WT und MyD88 MEFs wurden lysiert und USF-1 im Western Blot bestimmt. Als Referenzprotein diente GAPDH.

Die Graphik 4.11b zeigt das Verhältnis der Bandenstärke von USF-1 zu GAPDH. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei verschiedenen Experimenten. * $P < 0.005$, ** $P < 0,05$, ANOVA post hoc Holm-Sidak.

In MyD88^{-/-} MEFs ist eine Stimulation durch das Zytokin IFN γ ebenfalls möglich, diese wird durch lebende Chlamydien unterdrückt, durch hitzeinaktivierte Chlamydien jedoch nicht (siehe Abbildung 4.12a und b). In MEFs wird USF-1 von lebenden Chlamydien degradiert und eine Stimulation durch IFN γ verhindert. Hitzeinaktivierte Chlamydien sind dazu nicht in der Lage.

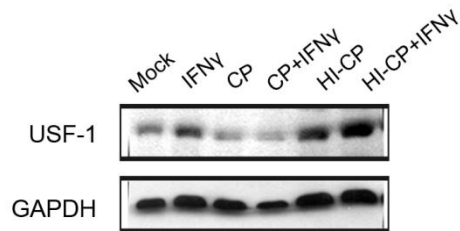


Abbildung 4.12a

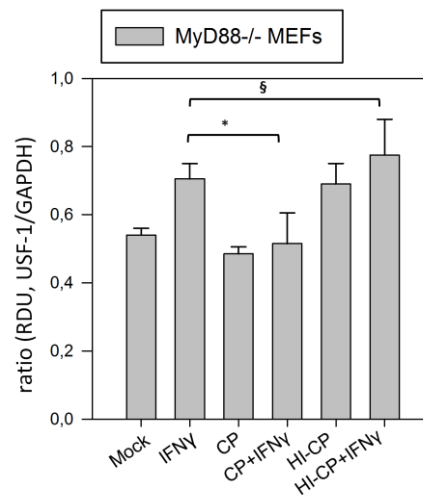


Abbildung 4.12b

Abbildung 4.12

4.12 *C. pneumoniae* verhindert die IFN γ -induzierte Stimulation von USF-1 in MyD88^{-/-} MEFs, hitzeinaktivierte Chlamydien jedoch nicht.

4.12a zeigt einen Western Blot, bei dem Wildtyp MEFs nicht stimuliert (Mock), mit 30 ng/ml IFN γ für 24 h stimuliert (IFN γ , CP+IFN γ , HI-CP+IFN γ) oder für 48 h mit *C. pneumoniae* (CP) bzw. hitzeinaktivierten Chlamydien (HI-CP) bei einem MOI von 20 infiziert wurden. Die Zellproben aus WT und MyD88 MEFs wurden lysiert und USF-1 im Western Blot bestimmt. Als Referenzprotein diente GAPDH.

4.12b zeigt das Verhältnis der Bandenstärke von USF-1 zu GAPDH. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei verschiedenen Experimenten. * $P < 0.05$, § $P > 0.05$, T-Test für unabhängige Stichproben.

4.4.2 *Chlamydomphila pneumoniae* induziert USF-1 in BMDMs

In den vorangegangenen Experimenten konnten wir zeigen, dass die Regulation von MHC Klasse II in BMDMs durch einen PAMP-abhängigen Mechanismus beeinflusst wird. In Fibroblasten wird USF-1 durch CPAF degradiert [Zhong, 1999]. In Korrelation hierzu konnten wir zeigen, dass USF-1 in MEFs nur durch lebende Chlamydien, nicht aber durch hitzeinaktivierte Chlamydien degradiert wird (siehe Kapitel 4.4.1). Wir untersuchten nun, ob der oben beschriebene PAMP-abhängige Mechanismus in BMDMs auch zu einer Degradierung des Transkriptionsfaktors USF-1 führt.

Hierzu wurden BMDMs, wie in vorangegangenen Experimenten, optional mit IFN γ stimuliert sowie mit lebenden Chlamydien infiziert oder mit hitzeinaktivierten Chlamydien versetzt. Zellen wurden lysiert, im Western Blot USF-1 sowie GAPDH bestimmt und in Relation zueinander gesetzt. Wir konnten beobachten, dass in diesem Zelltyp die Expression von USF-1 sowohl durch IFN γ , durch *C. pneumoniae* als auch durch hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* gesteigert wird. In MyD88^{-/-} Makrophagen wird dieser Effekt durch die Kombination von Chlamydien und IFN γ im Vergleich zur

Stimulation mit IFN γ allein leicht verstärkt (siehe Abbildung 4.13). Chlamydien können in Makrophagen im Gegensatz zu Fibroblasten USF-1 weder herunterregulieren noch eine Stimulation durch IFN γ verhindern. Vielmehr führen sie zu einer Induktion des Transkriptionsfaktors. Hitzeinaktivierte Chlamydien führen in BMDMs genauso wie lebende Chlamydien zu einer Steigerung der Expression von USF-1.

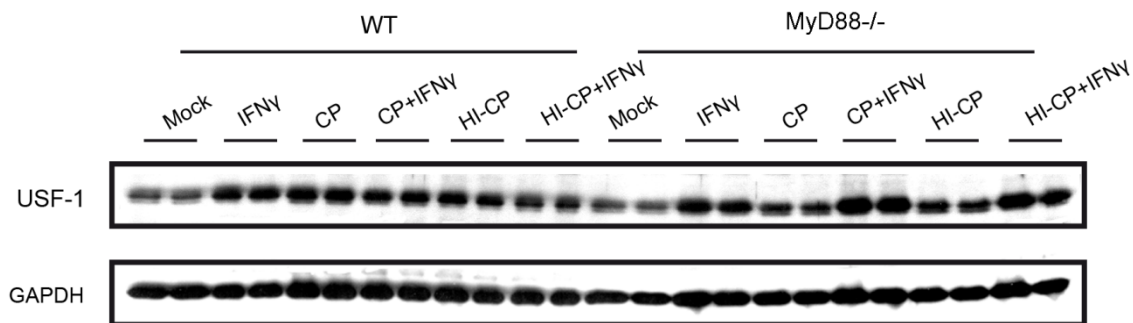


Abbildung 4.13a

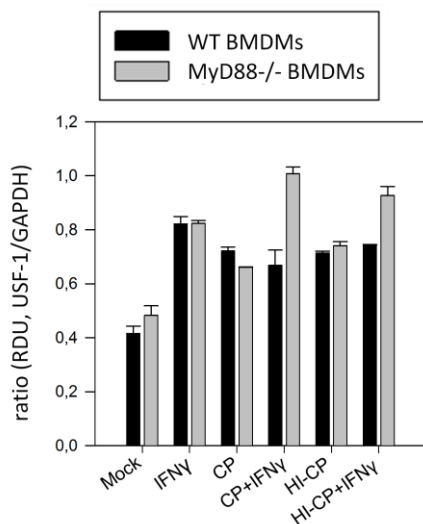


Abbildung 4.13b

Unsere Beobachtungen zur Degradierung von USF-1 in den MEFs bestätigen die Ergebnisse betreffend der Oberflächenexpression von MHC Klasse II, die in der Literatur in Versuchen mit Epithelzellen beschrieben sind [Zhong, 1999]: In MEFs sind lebende Chlamydien notwendig, um die Induktion von MHC Klasse II durch IFN γ zu verhindern. USF-1 wird dabei degradiert. In infizierten Makrophagen hingegen, ist ein MyD88-abhängiger PAMP-Effekt für die Beeinflussung der Oberflächenexpression durch *C. pneumoniae* verantwortlich und von der Expression von USF-1 unabhängig.

Abbildung 4.13

C. pneumoniae und hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* induzieren USF-1 in WT und MyD88^{-/-} BMDMs.

4.13a zeigt einen Western Blot, bei dem Wildtyp und MyD88^{-/-} BMDMs die nicht stimuliert (Mock), mit 10 ng/ml IFN γ für 24 h stimuliert (IFN γ) oder für 48 h mit *C. pneumoniae* (CP) bzw. hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* (HI-CP) bei einem MOI von 10 infiziert wurden. Optional wurden infizierte Zellen zusätzlich mit IFN γ stimuliert (CP+IFN γ , HI-CP+IFN γ). Die Zellproben aus WT und MyD88 BMDMs wurden lysiert und USF-1 im Western Blot bestimmt. Als Referenzprotein diente GAPDH.

4.13b. Die Graphik zeigt das Verhältnis der Bandenstärke von USF-1 zu GAPDH. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei verschiedenen Experimenten.

4.5 *Chlamydomphila pneumoniae* bildet *cpaf*-mRNA in MEFs, nicht aber in BMDMs

Die Degradierung von USF-1 in Fibroblasten geschieht durch die von Chlamydien sezernierte Protease CPAF (chlamydial protease-like activity factor) [Zhong, 1999; Shaw, 2002]. Da nach unseren Beobachtungen in MEFs funktionsfähige Chlamydien notwendig sind, um USF-1 zu degradieren, in BMDMs jedoch die Regulation von MHC Klasse II an der Zelloberfläche unabhängig von USF-1 ist, bestimmten wir *cpaf*-mRNA in MEFs und in Makrophagen.

4.5.1 *Chlamydomphila pneumoniae* bildet keine *cpaf*-mRNA in WT BMDMs

Um die mRNA von *cpaf* in BMDMs nachzuweisen, wurden WT und MyD88^{-/-} Makrophagen infiziert, mRNA isoliert, eine reverse Transkriptase-PCR durchgeführt und das PCR-Produkt im Ethidiumbromid-Gel semiquantitativ dargestellt. Es kamen Primer für *cpaf* (chlamydial protease-like activity factor), *ompA* (outer membrane protein A) und *16s rRNA* zur Anwendung. *OmpA* wird abhängig vom Entwicklungsstatus von *Chlamydomphila pneumoniae* reguliert [Hogan, 2003]. *16s rRNA* diente als Kontrolle der Infektion, da sie als für Prokaryonten spezifische ribosomale RNA in allen Entwicklungsstufen der Chlamydien gleichermaßen vorhanden ist.

In WT BMDMs bestätigt zwar die Gegenwart von *16s rRNA* die Infektion mit *C. pneumoniae*, es sind jedoch weder die PCR-Produkte von *ompA* noch von *cpaf* als Bande nachweisbar. In MyD88^{-/-} Zellen hingegen kann das PCR-Produkt für *ompA* deutlich dargestellt werden, auch *cpaf* zeigt sich als leichte Bande (siehe Abbildung 4.14). Demnach kann in den WT BMDMs, in denen USF-1 nicht degradiert wird (siehe Kapitel 4.4.2), keine *cpaf*-mRNA nachgewiesen werden. Die Abwesenheit von MyD88 scheint die metabolischen Bedingungen für *Chlamydomphila pneumoniae* in Makrophagen zu begünstigen (vergleiche Kapitel 4.2), da hier sowohl *ompA*- als auch *cpaf*-mRNA gebildet werden kann. Allerdings ist in den Makrophagen die Protease CPAF nicht in der Lage, USF-1 zu degradieren.

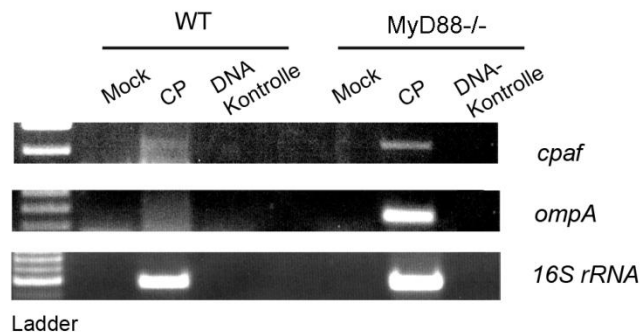


Abbildung 4.14

Abbildung 4.14

cpaf-mRNA in BMDMs

CpaF-mRNA (*cpaf*) wurde nach mRNA-Isolation aus infizierten BMDMs mittels reverse Transkriptase-PCR vervielfältigt. Es wurden nicht-infizierte Zellen (Mock) und mit *C. pneumoniae* (MOI=10) infizierte Zellen (CP) verwendet. Als Negativkontrolle (DNA-Kontrolle) wurden RNA-Proben verwendet, die ohne reverse Transkription aufbereitet wurden. Die Amplifikation von *ompA* korreliert mit der Replikationsfähigkeit von *C. pneumoniae*, die der *16s rRNA* mit der Infektionsrate der Zellen.

4.5.2 *Chlamydomphila pneumoniae* bildet *cpaf*-mRNA in MEFs

In MEFs konnten wir zeigen, dass USF-1 durch lebende Chlamydien degradiert wird (siehe Kapitel 4.4.1). Der Literatur nach geschieht dies in Fibroblasten durch die chlamydale Protease CPAF, ein Nachweis von *cpaf*-mRNA in MEFs ist also zu erwarten. Wie in den Makrophagen bestimmten wir in infizierten MEFs mittels einer reversen Transkriptase-PCR die Expression der mRNA von *cpaf*, *ompA* und *16s rRNA*. Sowohl in WT als auch in MyD88^{-/-} Zellen sind alle drei mRNAs deutlich nachzuweisen. Wie in den BMDMs erscheint das vom chlamydialen Stoffwechsel abhängige PCR-Produkt, die *cpaf*-mRNA, in den MyD88-deletierten Zellen deutlicher als in den Wildtyp Zellen (siehe Abbildung 4.15a). Diese Ergebnisse korrelieren mit den vorangegangenen Experimenten: In den Fibroblasten wird also *cpaf*-mRNA gebildet, USF-1 wird nur von lebender nicht aber von hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* degradiert, und auch die Oberflächenexpression von MHC Klasse II ist abhängig vom funktionierenden Metabolismus des Bakteriums.

Die Expression der mRNA von *cpaf* ist in den MEFs als auch in den MyD88^{-/-} BMDMs nachweisbar. Im direkten Vergleich zwischen den MEFs und BMDMs wird die mRNA von *cpaf* in den WT MEFs, bei gleicher Ausgangsmenge von aufgereinigter Gesamt-RNA, deutlich stärker exprimiert als in den

MyD88^{-/-} Makrophagen (siehe Abbildung 4.15b). Dies spricht dafür, dass *C. pneumoniae* in den Fibroblasten ihren Metabolismus besser entwickeln kann als in den MyD88^{-/-} BMDMs. Für den Einfluss auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II in BMDMs ist wie oben beschrieben (siehe Kapitel 4.1.1) kein aktiver Metabolismus von *C. pneumoniae* notwendig.

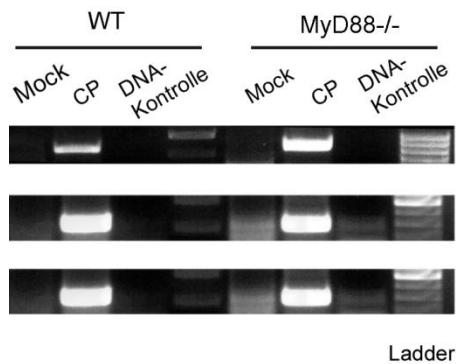


Abbildung 4.15a

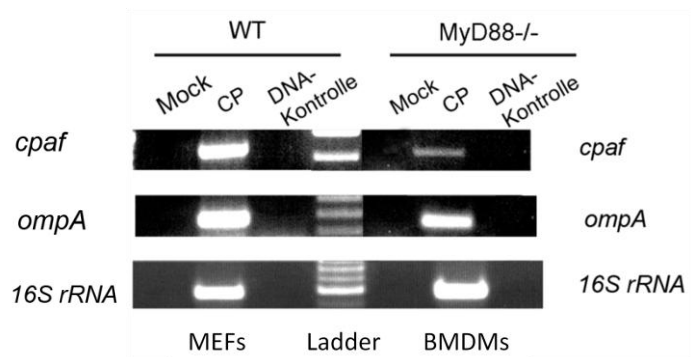


Abbildung 4.15b

Abbildung 4.15

Cpaf-mRNA in MEFs

4.15a Die mRNA von *cpaf* (*cpaf*) wurde nach RNA-Isolation aus infizierten MEFs mittels reverse-Transkriptase-PCR vervielfältigt. Es wurden nicht infizierte Zellen (Mock) und mit *C. pneumoniae* (MOI=20) infizierte Zellen (CP) verwendet. Als Negativkontrolle (DNA-Kontrolle) wurden RNA-Proben, welche ohne reverse Transkription aufbereitet wurden verwendet. Die Amplifikation von *ompA* korreliert mit der Replikationsfähigkeit von *C. pneumoniae*, die der *16s rRNA* mit der Infektionsrate der Zellen.

4.15b *Cpaf*-mRNA aus infizierten WT MEFs (MOI=20) und infizierten MyD88^{-/-} BMDMs (MOI=10) wurde wie oben beschrieben aufbereitet und die Expression bei gleicher Ausgangsmenge von RNA dargestellt.

4.6 Rekombinantes CPAF degradiert USF-1 in BMDMs

In antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen kann *C. pneumoniae* nur kleine Inklusionen bilden, welche EBs und atypische RBs enthalten (siehe Kapitel 4.2) [Haranaga, 2003; Rodriguez, 2005]. Wie oben beschrieben wird in infizierten WT Makrophagen keine *cpaf*- oder *ompA*-mRNA gebildet und USF-1 nicht degradiert. Wir vermuteten, dass der Grund hierfür darin liegt, dass sich *C. pneumoniae* in den Makrophagen nur unzureichend entwickeln kann und ihre Stoffwechselaktivität nicht dazu ausreicht, Proteine wie OmpA oder CPAF zu produzieren. Nun stellten wir uns die Frage, ob rekombinantes CPAF in Makrophagen in der Lage wäre, USF-1 zu degradieren. Aus diesem Grund produzierten wir aufgereinigtes, rekombinantes Protein, transfizierten BMDMs und bestimmten USF-1 im Western Blot.

Da HEK-Zellen (human embryonic kidney) nach Transfektion mit *cpaf*-DNA das entsprechende Protein nicht produzierten, klonierten wir *cpaf*-DNA in einen pASK-IBA45+ Vektor, einen bakteriellen Expressionsvektor, wobei N-Terminal ein aus 10 Aminosäuren bestehendes Strep-tag und C-Terminal ein Hexa-HIS-tag angehängt wurden. CPAF-Protein wurde von *E. coli* in Inklusionen exprimiert, zurückgefaltet und aufgereinigt. Das rekombinante CPAF zeigte bei Raumtemperatur eine autoproteolytische Aktivität und musste deshalb bis zum letzten Aufreinigungsschritt mit Proteaseinhibitoren vor dem Selbstverdau geschützt werden. Für die Transfektion wurde DOTAP als Träger benutzt und Zellen für 3 h mit der Protease versetzt. Vor der Zellyse wurden die Makrophagen mehrfach mit Trypsin-EDTA gewaschen, um extrazelluläres CPAF zu entfernen. Im Western Blot konnte sowohl in WT als auch in MyD88^{-/-} BMDMs eine Degradierung von USF-1 beobachtet werden und das rekombinante CPAF mittels HIS-AK, welche gegen den N-Terminus des Proteins gerichtet sind, nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle verwendeten wir GAPDH (siehe Abbildung 4.16). CPAF ist nach diesen Beobachtungen zu urteilen, in der Lage USF-1 in BMDMs zu degradieren. Dies geschieht unabhängig von MyD88.

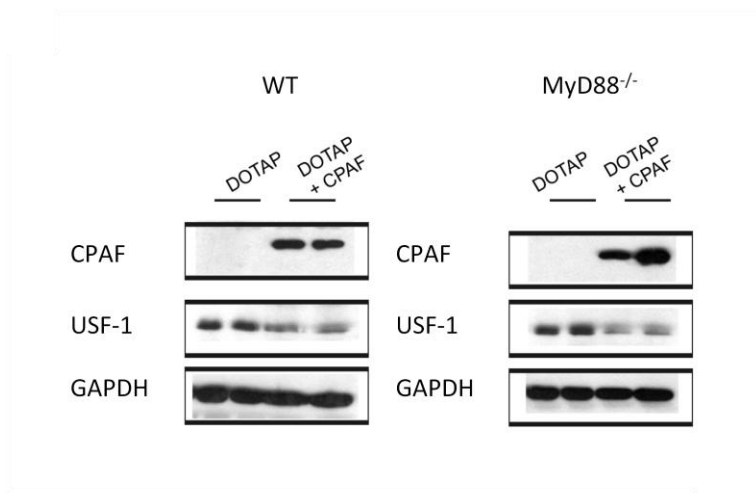


Abbildung 4.16

Abbildung 4.16

Transfektion von BMDMs mit CPAF

WT und MyD88^{-/-} BMDMs wurden mittels DOTAP als Träger mit aufgereinigtem rekombinanten CPAF-HIS-tag (50 µg) versetzt. Vor der Zellyse wurden die Makrophagen mehrfach mit Trypsin-EDTA (250 µg/Well) gewaschen, um extrazelluläres CPAF zu entfernen. Während der Zellyse wurden Proteaseinhibitoren zugefügt. Als Negativkontrolle dienten Makrophagen, die nur mit DOTAP versetzt wurden. Mittels Western Blot wurden USF-1 und HIS-tag-CPAF nachgewiesen, als Ladekontrolle diente GAPDH.

4.7 *Chlamydomphila pneumoniae* führt in MEFs, aber nicht in BMDMs, zur Sekretion des CXC-Chemokins MIG

CXC-Chemokine, wie MIG (CXCL 9) und IP10 (CXCL 10), führen zu einer Anregung der TH1-Immunantwort durch Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen [Loetscher, 1996]. Diese Chemokine werden bei Infektion mit Chlamydien induziert [Maxion, 2001]. In den vorangegangenen Experimenten konnten wir beschreiben, wie die Expression von MHC Klasse II auf der Zelloberfläche in mit *C. pneumoniae* infizierten Zellen durch Zelltyp-spezifische Mechanismen verhindert wird. MHC Klasse II präsentiert Antigene an CD4-T-Zellen, was zur Aktivierung der T-Zellen führt. Von Interesse war daher die Frage, ob unsere Beobachtung bezüglich der Reduktion der MHC Klasse II Expression für dieses Gen spezifisch ist. Wir untersuchten deshalb die die Sekretion des T-Zell-aktivierenden Chemokins MIG nach Infektion von MEFs und BMDMs mit *C. pneumoniae*.

4.7.1 *Chlamydomphila pneumoniae* induziert die Sekretion von MIG in MEFs

Mittels ELISA bestimmten wir in den Überständen von infizierten WT und MyD88^{-/-} MEFs, welche optional zusätzlich für 24 h mit IFN γ stimuliert wurden, die Sekretion des MIG-Proteins. IFN γ allein kann die Abgabe des Chemokins in den nativen Fibroblasten kaum stimulieren. Eine Infektion der Zellen mit *C. pneumoniae* führt jedoch zur Sekretion von MIG. Dieser Effekt ist abhängig von MyD88. Durch Stimulation der infizierten Zellen mit IFN γ wird die Sekretion von MIG noch weiter gesteigert. In Zellen, die mit hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* infiziert werden, wird die Sekretion von MIG kaum stimuliert (siehe Abbildung 4.17).

Eine Infektion mit *C. pneumoniae* führt in MEFs also zu einer MyD88-abhängigen Stimulation der Sekretion von MIG.

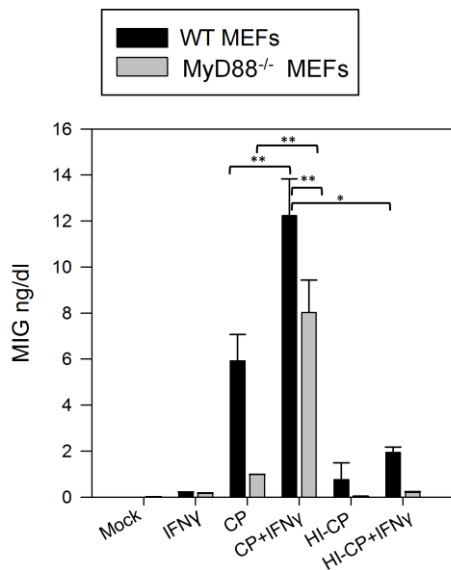


Abbildung 4.17

Abbildung 4.17

Sekretion von MIG in infizierten MEFs

WT und MyD88^{-/-} MEFs wurden unbehandelt verwendet (Mock), mit 30 ng/ml IFN γ für 24 h stimuliert oder für 48 h mit *C. pneumoniae* (CP) bzw. hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* (HI-CP) bei einem MOI von 20 infiziert. Optional wurden infizierte Zellen zusätzlich mit IFN γ stimuliert (CP+IFN γ , HI-CP+IFN γ). Aus dem Überstand des Zellmediums wurde mittels ELISA die Menge von MIG (ng/dl) bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei verschiedenen Experimenten. ** $P < 0.05$, * $P < 0.001$ ANOVA post hoc Holm-Sidak.

4.7.2 IFN γ induziert die Sekretion von MIG in BMDMs unabhängig von *Chlamydomphila pneumoniae*

Im Überstand von Makrophagen, welche mit lebender oder hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* infiziert und wahlweise mit IFN γ stimuliert wurden, bestimmten wir ebenfalls die Sekretion des Chemokins MIG. In den BMDMs zeigte sich, dass IFN γ in der Lage ist, in nativen Zellen die Sekretion von MIG anzuregen. Eine Infektion mit *C. pneumoniae* führt im Gegensatz zu MEFs jedoch zu keiner vermehrten Sekretion von MIG. Die Induktion von MIG durch IFN γ kann in WT Zellen durch lebende oder hitzeinaktivierte Chlamydien nicht beeinflusst werden. Überraschender Weise führt in MyD88^{-/-} BMDMs eine Infektion mit lebender als auch mit hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* nach einer

Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ zu einer stärkeren Induktion der Sekretion von MIG als in WT Zellen (siehe Abbildung 4.18). Wie dieses Ergebnis erklärt wird ist augenblicklich unklar.

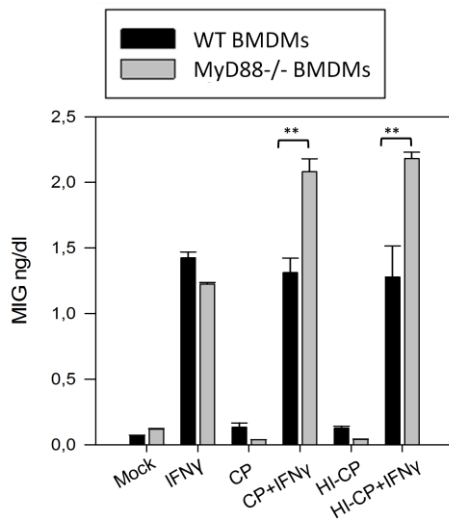


Abbildung 4.18

Abbildung 4.18

Sekretion von MIG durch infizierte BMDMs

WT und MyD88^{-/-} BMDMs wurden unbehandelt verwendet (Mock), mit 10 ng/ml $\text{IFN}\gamma$ für 24 h stimuliert ($\text{IFN}\gamma$) oder für 48 h mit *C. pneumoniae* (CP) bzw. hitzeinaktivierter *C. pneumoniae* (HI-CP) bei einem MOI von 10 infiziert. Optional wurden infizierte Zellen zusätzlich mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert (CP+ $\text{IFN}\gamma$, HI-CP+ $\text{IFN}\gamma$). Aus dem Überstand des Infektionsmediums wurden mittels ELISA die Menge von MIG (ng/dl) bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei verschiedenen Experimenten. ** $P < 0.05$, T-Test für unabhängige Stichproben.

5 Diskussion

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass *C. pneumoniae* die IFN γ -induzierte MHC Klasse II-Expression auf der Zelloberfläche in BMDMs und MEFs auf unterschiedliche Weise beeinflusst. Während in BMDMs ein MyD88-abhängiger, PAMP-gesteuerter Mechanismus die Expression von MHC Klasse II unabhängig von USF-1 reguliert, ist in MEFs zusätzlich ein Faktor aktiv, der nur nach einer Infektion mit lebenden, funktionsfähigen Chlamydien USF-1 degradiert und so die Induktion der Oberflächenexpression von MHC Klasse II durch IFN γ verhindert.

5.1 Stoffwechsel von *Chlamydomphila pneumoniae* in Makrophagen

Obwohl sich Chlamydien besonders in Epithelzellen vermehren, wurde das Bakterium auch in peripheren Monozyten des Blutes, in dendritischen Zellen von arteriosklerotischen Plaques und in Alveolarmakrophagen nachgewiesen [Gieffers, 2004; Boman, 1998; Gieffers, 2001]. Um die Wechselwirkungen zwischen Chlamydien und ihrem Wirt besser zu verstehen, kommen deshalb in der experimentellen Forschung neben Epithelzellen auch immer häufiger professionelle antigenpräsentierende Zellen als Wirt zur Anwendung. Von Makrophagen und dendritischen Zellen ist bekannt, dass bei Infektion im *in vitro* Modell der Entwicklungszyklus von Chlamydien im Gegensatz zu Epithelzellen nur eingeschränkt möglich ist [Gieffers, 2001]. So konnten auch wir zeigen, dass sich *C. pneumoniae* in Makrophagen nur schlecht vermehren und kleine, atypische Inklusionen bilden. Es ist außerdem beschrieben, dass sowohl chlamydiale Antigenen, wie chlamydiales LPS, als auch Proteine der Wirtszelle in den Inklusionen von infizierten Makrophagen anders verteilt sind als in den Inklusionen von z.B. infizierten HeLa-Zellen [Wolf,2005]. Obwohl die Entwicklung des Bakteriums selbst in Makrophagen gehemmt ist, vermittelt es sowohl in diesem Zelltyp als auch in Epithelzellen einen lebensverlängernden, antiapoptotischen Effekt [Arienne, 2002]. Diese Daten zeigen, dass Beobachtungen aus Experimenten mit *C. pneumoniae* je nach Zelltyp differenziert betrachtet werden müssen.

Der Einfluss von Chlamydien auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II wurde bislang nur in Epithelzellen und Fibroblasten untersucht. Dort konnte CPAF (chlamydial protease-like activity

factor) als ein von Chlamydien sezerniertes Protein beschrieben werden, welches eine IFN γ -induzierte Stimulation der Oberflächenexpression von MHC Klasse II verhindert [Fan, 2002]. Da MHC Klasse II ein typisches Oberflächenprotein von professionellen antigenpräsentierenden Zellen ist, sollte in dieser Arbeit der Einfluss von *C. pneumoniae* auf die Expression von MHC Klasse II in Makrophagen überprüft werden. Wir konnten zeigen, dass im Gegensatz zu den beschriebenen Beobachtungen in Epithelzellen CPAF in Wildtyp Makrophagen mittels reverse Transkriptase-PCR nicht nachweisbar ist und USF-1 nicht degradiert wird. Die Induktion der Oberflächenexpression von MHC Klasse II durch IFN γ wird aber dennoch verhindert. Dies geschieht jedoch in diesen professionellen antigenpräsentierenden Zellen nicht durch CPAF, sondern durch einen MyD88-abhängigen PAMP-Effekt.

5.1.1 Bildung von *cpaf*-mRNA in Makrophagen

Wie oben erwähnt, wurde von Wolf et al. eine Hemmung des Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae* in humanen Makrophagen beschrieben. Unsere Beobachtungen betreffs der Expression von mRNA in murinen BMDMs korrelieren mit diesen Ergebnissen. Zwar konnte eine Infektion der Zellen mit Chlamydien anhand der Expression von ribosomaler *16S RNA*-mRNA nachgewiesen werden, in WT Makrophagen waren jedoch weder *cpaf*- noch *ompA*-mRNA vorhanden. In MEFs hingegen konnten die Expression der Gene eindeutig nachgewiesen werden. Wolf et al. verglich in seinen Experimenten ebenfalls die Expression von chlamydialen Genen in Makrophagen und Epithelzellen und beschrieb in den Phagozyten eine verminderte Bildung von Hsp60 und LPS [Wolf, 2005].

Interessanterweise konnten wir in MyD88^{-/-} Makrophagen *ompA*- und *cpaf*-mRNA nachweisen. Die Banden des PCR-Produktes waren zwar in semiquantitativer Analyse in den Proben aus BMDMs deutlich schwächer ausgeprägt als in denen der MEFs, aber spezifisch für die entsprechende mRNA. In MyD88^{-/-} Zellkulturen können diese Proteine also möglicherweise gebildet werden. Demnach scheinen *C. pneumoniae* in MyD88^{-/-} Makrophagen ihren Stoffwechsel besser entwickeln zu können als in WT Zellen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass in Knockout-Zellen eine geringere Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen beschrieben wurde. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Infektion von Monozyten und Makrophagen mit Chlamydien die Sekretion von Zytokinen wie TNF, IL18 und IFN γ abhängig von MyD88 erfolgt. IFN γ wiederum ist für die Kontrolle der Infektion durch den Wirt entscheidend und inhibiert das Wachstum der Bakterien *in vitro* [Netea, 2004; Rothfuchs, 2004]. Werden nun von MyD88^{-/-} Zellen *in vitro* weniger proinflammatorische Zytokine produziert, so sind möglicherweise die Wachstumsbedingungen für Chlamydien in diesen Kulturen besser als in den WT Kulturen. *C. pneumoniae* scheint also in Zellen, in denen die Fähigkeit zu einer adäquaten

Auslösung der Immunantwort durch die Wirtszelle beeinträchtigt ist, ein günstigeres Milieu vorzufinden. Dies kann ein Grund für unsere Beobachtung sein, dass von den MyD88^{-/-} Makrophagen geringe Mengen mRNA für *ompA* und *cpaf* gebildet werden, in WT-Kulturen jedoch nicht.

Trotz des Nachweises der mRNA für *cpaf* in den MyD88^{-/-} Makrophagen, wird in unseren Experimenten USF-1 im Western Blot nicht degradiert. Diese Beobachtung überrascht, da Zongh et al. zeigen konnte, dass CPAF für die Degradierung von USF-1 verantwortlich ist [Zhong, 1999]. Wie in Kapitel 4.3 beschrieben, konnten wir dieses Phänomen in MEFs entsprechend bestätigen. Ebenso konnte rekombinantes CPAF USF-1 in Makrophagen degradieren. Dass dies in den infizierten MyD88^{-/-} Makrophagen, in denen wir *cpaf*-mRNA nachweisen konnten, jedoch nicht der Fall ist, kann entweder daran liegen, dass aus der mRNA gar kein funktionsfähiges Protein entsteht oder eine zu geringe Menge von CPAF gebildet wird, um USF-1 zu degradieren. In unseren Western Blots aus Makrophagen konnten wir sogar eine gegensätzliche Wirkung von *C. pneumoniae* auf USF-1 beobachten: Die Bildung von USF-1 wurde sowohl nach Infektion mit lebenden Chlamydien als auch durch hitzeinaktivierte Bakterien gesteigert, und eine verstärkte Expression von USF-1 durch IFN γ konnte durch den Erreger nicht verhindert werden. Diese Induktion von USF-1 wirkt einer möglichen Degradierung durch CPAF geradezu entgegen.

Da also in Wildtyp Makrophagen der Metabolismus der Chlamydien nur eingeschränkt arbeitet, wird keine *cpaf*-mRNA gebildet, und der in der Literatur beschriebene Effekt auf USF-1 tritt in diesen antigenpräsentierenden Zellen nicht ein.

5.1.2 Einfluss von *Chlamydomphila pneumoniae* auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II in Makrophagen

In der Literatur wurde lediglich die Protease CPAF als Einflussfaktor auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II in Epithelzellen und Fibroblasten beschrieben [Zhong, 1999]. Obwohl, wie in Kapitel 5.1.1 aufgezeigt, in unseren Experimenten CPAF nicht für die Beeinflussung der Oberflächenexpression von MHC Klasse II in BMDMs verantwortlich sein kann, beobachteten wir an der Zelloberfläche denselben Effekt der für Epithelzellen beschrieben ist: Eine Induktion durch IFN γ wird nach Infektion mit *C. pneumoniae* verhindert. Allerdings kann in Makrophagen der Entwicklungszyklus der Chlamydien keine Rolle spielen, denn in diesen Zellen haben tote, hitzeinaktivierte Chlamydien denselben Effekt auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II wie lebende Chlamydien. In Makrophagen benötigt *C. pneumoniae* zur Modulation von MHC Klasse II also keinen funktionsfähigen Metabolismus. Damit unterscheidet sich der Mechanismus zur

Beeinflussung der Oberflächenexpression in Makrophagen deutlich von den Beobachtungen in MEFs, bei denen nur der lebende Organismus die Induktion von MHC Klasse II durch $\text{IFN}\gamma$ vollständig zu verhindern vermag. Die in Makrophagen beobachtete Abhängigkeit von MyD88 legt nahe, dass in diesem Zelltyp PAMPs die Oberflächenexpression von MHC Klasse II durch die Bindung an TLRs beeinflussen. Diese Theorie konnten wir dadurch erhärten, dass wir mit gereinigten TLR-Liganden wie CpG und LPS denselben MyD88-abhängigen Effekt auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II beobachteten wie mit lebenden oder hitzeinaktivierten Bakterien. Auch die Tatsache, dass nach Inhibition der MAP-Kinase p38 die Suppression von MHC Klasse II durch *C. pneumoniae* in WT Zellen teilweise aufgehoben wird, unterstützt diese These.

Als wichtigster Regulator für die Bildung von MHC Klasse II-Molekülen gilt CIITA (class II transactivator), dessen Expression durch $\text{IFN}\gamma$ induziert wird und der ein entscheidender Koaktivator für die Transkription des MHC Klasse II-Gens ist. Allerdings gibt es für die Expression von CIITA drei verschiedene Promotoren, welche je nach Zelltyp unterschiedlich stark durch $\text{IFN}\gamma$ induzierbar sind. So konnte anhand von Knockout-Mäusen gezeigt werden, dass in Makrophagen vor allem der Promotor Typ I, in Epithelzellen hingegen vorwiegend der Promotor Typ IV, die Oberflächenexpression von MHC Klasse II reguliert [Pai, 2002]. Von verschiedenen intrazellulären Erregern, wie Mykobakterien, Varizellen und Toxoplasmen, ist bekannt, dass sie die Induktion von CIITA durch $\text{IFN}\gamma$ und damit die Expression von MHC Klasse II verhindern können [LeibundGut-Landmann, 2004]. Für *Mycobacterium tuberculosis* konnte beispielsweise ein Mechanismus in Makrophagen beschrieben werden, der die Induktion der Oberflächenexpression von MHC Klasse II ebenfalls durch ein PAMP und über die Aktivierung von TLRs unterdrückt. Das obligat intrazelluläre Bakterium bildet ein 19 kDa-Lipoprotein, welches die Induktion von CIITA durch $\text{IFN}\gamma$ in Abhängigkeit von TLR2 und MAP-Kinasen verhindert. Normalerweise führt $\text{IFN}\gamma$ hier zu einer Azetylierung von den Histonen H3 und H4 am MHC2TA-Gen, welches den CIITA-Promotor Typ IV reguliert. Dieser Mechanismus wird in Makrophagen durch das Lipoprotein verhindert [Pennini, 2006]. In Makrophagen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass aufgereinigtes LPS über TLR2 die Induktion von CIITA Typ I und Typ IV durch $\text{IFN}\gamma$, in Abhängigkeit von MyD88 und MAP-Kinasen wie p38, verhindern kann [Yao, 2006].

Der Effekt von Chlamydien auf CIITA wurde bislang nur in Epithelzellen und Fibroblasten untersucht. In Epithelzellen wird die Oberflächenexpression von MHC Klasse II durch den Promotor Typ IV gesteuert. Dieser benötigt USF-1 als Kofaktor [Muhlethaler-Mottet, 1998]. Zongh et al. konnte zeigen, dass in Fibroblasten die chlamydiale Protease CPAF USF-1 degradiert und somit die Expression von CIITA via Typ IV Promotor und folglich auch die Bildung von MHC Klasse II verhindert [Zhong, 1999] (siehe Kapitel 1.3.2). In Makrophagen hingegen gibt es Hinweise, dass auch der Promotor Typ I durch $\text{IFN}\gamma$ aktiviert wird [Yao, 2006]. Für den CIITA-Promotor Typ I ist jedoch keine Abhängigkeit von USF-1 beschrieben. Dies wäre eine mögliche Erklärung, warum in unseren

Experimenten mit Makrophagen *C. pneumoniae* eine Unterdrückung von MHC Klasse II an der Zelloberfläche bewirkt, obwohl USF-1 in den infizierten Zellen nicht vermindert, sondern sogar vermehrt gebildet wird.

Der von uns beschriebene TLR-abhängige Mechanismus zur Regulation von MHC Klasse II an der Zelloberfläche von BMDMs wird also entweder durch den von USF-1 unabhängigen Promotor Typ I vermittelt, oder die Expression des Typ IV Promotors wird, wie bei einer Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*, direkt durch z.B. eine verminderte Histon-Acetylierung beeinflusst. Den genauen Mechanismus gilt es durch weitere Untersuchungen zu klären.

Um zu überprüfen, ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der Präsentation von MHC Klasse II an der Zelloberfläche und der CIITA-gesteuerten Transkription des MHC Klasse II-Gens besteht, untersuchten wir das Verhalten des intrazellulär nachweisbaren MHC Klasse II und dessen mRNA. Es stellte sich heraus, dass mRNA und intrazelluläres Protein ebenso wie die Oberflächenexpression von MHC Klasse II TLR-abhängig supprimiert werden. Da die Expression des CIITA- und MHC Klasse II-Gens qualitativ und quantitativ miteinander korrelieren [Otten, 1998], kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass sich die mRNA des CIITA genauso wie die des MHC Klasse II verhält. So kann eine Parallele zwischen unseren Beobachtungen von MHC Klasse II an der Zelloberfläche und der in der Literatur beschriebenen TLR-abhängigen Beeinflussung von CIITA in Makrophagen gezogen werden. Diese Daten lassen darauf schließen, dass *C. pneumoniae* in Makrophagen, ähnlich wie andere intrazelluläre Erreger, einen PAMP-vermittelten, TLR-abhängigen Mechanismus nutzt, um die Stimulation von CIITA durch IFN γ zu verhindern und somit die Oberflächenexpression von MHC Klasse II zu ihren Gunsten zu beeinflussen. Die Frage, ob dabei nun der Promotor Typ IV oder Typ I die entscheidende Rolle spielt, sowie der spezifische Nachweis, ob dies über die Azetylierung von Histonen am MHC2TA-Gen geschieht, bedürfen weiterer Abklärung.

5.1.3 Degradierung von USF-1 durch CPAF in Makrophagen

In infizierten MEFs war in unseren Experimenten sowohl cpaf-mRNA als auch eine Degradierung von USF-1 nachweisbar. Hitzeinaktivierte Chlamydien hingegen konnten keinen Abbau von USF-1 bewirken. Dies entspricht den Beobachtungen von Zongh et al., wo gezeigt wurde, dass CPAF für die Degradierung von USF-1 und RFX-5 verantwortlich ist [Fan, 2002]. Um zu überprüfen, ob CPAF grundsätzlich dazu in der Lage ist, USF-1 in Makrophagen zu beeinflussen, produzierten wir CPAF als rekombinantes Protein, reinigten dieses auf und transferierten es mittels DOTAP in Makrophagen. Es konnte sowohl das rekombinante HIS-tag-CPAF als auch ein Abbau von USF-1 im Western Blot aus Zelllysaten nachgewiesen werden. Diese Beobachtung bestätigte Zonghs Untersuchungen, die CPAF

für einen Abbau der Transkriptionsfaktoren verantwortlich machen. Zongh leitet aus der Degradierung von USF-1 durch CPAF in Epithelzellen einen Einfluss auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II her. Er erklärt, der Promotor für CIITA Typ IV würde dadurch destabilisiert und die Induktion von MHC Klasse II durch IFN γ auf diese Weise verhindert. Wie oben beschrieben, kann die Protease jedoch in unseren Experimenten mit WT Makrophagen wegen des eingeschränkten Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae* nicht gebildet werden. In Makrophagen ist nach Pai et al. vor allem der Promotor Typ I für die Regulation von CIITA verantwortlich, welcher unabhängig von USF-1 reguliert wird [Otten, 1998, Pai, 2002]. Nach unseren Beobachtungen ist die Degradierung von USF-1 durch CPAF in BMDMs zwar ebenso wie in Epithelzellen grundsätzlich möglich, jedoch wird das Protein in den professionellen antigenpräsentierenden Zellen nicht gebildet. Dafür können Chlamydien in Makrophagen mit Hilfe von PAMPs über einen USF-1-unabhängigen Mechanismus ebenfalls den gewünschten Effekt, die Verhinderung einer Induktion von MHC Klasse II, herbeiführen.

C. pneumoniae konnte in vivo in Alveolarmakrophagen der Lunge und in zirkulierenden Monozyten nachgewiesen werden und induziert die Bildung von Schaumzellen in arteriosklerotischen Plaques. Makrophagen spielen also sowohl bei respiratorischen als auch bei vaskulären mit *C. pneumoniae*-assoziierten Erkrankungen eine Rolle. Es wird angenommen, dass Phagozyten dabei den Erreger zwischen respiratorischem und kardiovaskulärem System transportieren [Gieffers, 2004; Blessing, 2002]. Da die Bedeutung von antigenpräsentierenden Zellen wie Phagozyten als Wirt für den obligat intrazellulären Erreger *C. pneumoniae* erst kürzlich erkannt wurde, ist bislang weitgehend ungeklärt, wie sich das Bakterium und Makrophagen gegenseitig beeinflussen. Die hier gewonnenen Erkenntnisse zur Oberflächenexpression von MHC Klasse II in mit *C. pneumoniae* infizierten BMDMs können einen Beitrag zu diesem Thema leisten und beschreiben eine Möglichkeit, wie *C. pneumoniae* unentdeckt in den antigenpräsentierenden Zellen verweilen und eine Induktion einer Immunreaktion verhindern kann.

5.2 Einfluss von *Chlamydophila pneumoniae* auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II in MEFs

In Epithelzellen ist ein USF-1-abhängiger Mechanismus zur Beeinflussung der Oberflächenexpression von MHC Klasse II durch Chlamydien beschrieben [Zhong, 1999]. In MEFs konnten wir Zonghs Beobachtungen zur Regulierung der Oberflächenexpression von MHC Klasse II nach Infektion mit *C. pneumoniae* jedoch nur teilweise bestätigen. In unseren Experimenten wird zwar ebenfalls cpaf-

mRNA gebildet, USF-1 nur durch lebende, nicht aber durch hitzeinaktivierte Chlamydien degradiert und die IFN γ -induzierte Oberflächenexpression von MHC Klasse II verhindert. Zusätzlich konnten wir aber in MEFs auch den PAMP-vermittelten TLR-abhängigen Mechanismus entdecken, welchen wir für BMDMs beschrieben haben. *C. pneumoniae* kann in MEFs, im Gegensatz zu Makrophagen, eine Induktion durch IFN γ sowohl in WT als auch in MyD88^{-/-} Zellen vollständig verhindern. Da in infizierten MEFs cpaf-mRNA gebildet wird und USF-1 durch lebende, nicht aber durch hitzeinaktivierte Chlamydien degradiert wird, wäre zu erwarten, dass durch hitzeinaktivierte Chlamydien keine Reduktion der Oberflächenexpression von MHC Klasse II erreicht wird, da kein CPAF gebildet werden kann. Dies ist jedoch nur bei MyD88^{-/-} Zellen der Fall: Hier haben tote Chlamydien überhaupt keinen Effekt auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II, und nach Stimulation mit IFN γ werden gleiche Werte wie bei Stimulation von nativen Zellen erreicht. In WT MEFs kann die Oberflächenexpression von MHC Klasse II durch hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* jedoch immer noch teilweise supprimiert werden.

Nach diesen Beobachtungen muss auch in MEFs neben dem CPAF-vermittelten Mechanismus ein PAMP-getriggertes, TLR-abhängiger Mechanismus angenommen werden. Dieser scheint jedoch weniger effektiv als in Makrophagen, da hitzeinaktivierte Chlamydien in den antigenpräsentierenden Zellen die IFN γ -induzierte Oberflächenexpression von MHC Klasse II ganz, in MEFs aber nur teilweise supprimieren können. Dass ein Einfluss von PAMPs auf TLRs und damit auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II in nicht-professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie MEFs ebenfalls möglich ist, konnten wir dadurch zeigen, dass LPS, in gleicher Weise wie hitzeinaktivierte Chlamydien in WT Zellen, die IFN γ -induzierte MHC Klasse II-Expression teilweise, aber eben nicht vollständig verhindern kann. Gerade MEFs eignen sich besonders gut für Untersuchungen der Aktivität von TLRs in nicht-professionellen antigenpräsentierenden Zellen, da sie im Gegensatz zu anderen Zelllinien alle TLRs exprimieren und gut auf eine Aktivierung durch Liganden für TLRs reagieren [Kurt-Jones, 2004]. Im *in vivo* Mausmodell konnte sowohl in unserer Arbeitsgruppe als auch in anderen Arbeitsgruppen ein entscheidender Einfluss von TLRs auf die Kontrolle einer Infektion mit Chlamydia nachgewiesen werden. Dabei gelten professionelle antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen als Vermittler für die TLR-abhängige Aktivierung von T-Zellen, was zu einer Reduzierung der bakteriellen Last in den mit Chlamydien infizierten Organen führt [Naiki, 2005; Roan, 2008]. In letzter Zeit weisen verschiedene Veröffentlichungen auf die wichtige Rolle von TLRs bei entzündlichen Prozessen der Mukosa des Gastrointestinaltraktes, der Atemwege und der Harnwege hin und legen eine Beteiligung der Epithelien selbst an der Immunabwehr nahe [Gribar, 2008]. So führt IFN γ beispielsweise in renalen Epithelzellen und in humanen Endothelzellen zu einer Induktion von TLR2 und TLR4 [Faure, 2001; Wolfs, 2002]. Aufgrund dieser Erkenntnisse werden Epithelien zunehmend nicht mehr nur als mechanische Barriere gegen Erreger gesehen, sondern scheinen aktiv an der Immunabwehr teilzunehmen. Um eine starke antiinflammatorische Reaktion des Wirtes gegen *C. pneumoniae* zu

verhindern, ist es denkbar, dass die Bakterien in Epithelzellen der Atemwege oder der Endothelien versuchen, die Aktivierung der Immunabwehr durch TLRs zu vermindern. Nach unseren Beobachtungen existieren in MEFs, welche als Modell für nicht-professionelle antigenpräsentierende Zellen herangezogen werden können, neben dem CPAF-abhängigen Mechanismus ein TLR-abhängiger Mechanismus der die Expression von MHC Klasse II an der Zelloberfläche verhindert. Im Vergleich zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen ist der TLR-abhängige Effekt in Fibroblasten jedoch geringer ausgeprägt.

Nach diesen Beobachtungen muss die Rolle von CPAF als Regulator für die Oberflächenexpression von MHC Klasse II in Infektionen mit *C. pneumoniae* neu bewertet werden. Da der PAMP-vermittelte Mechanismus sowohl in den professionellen antigenpräsentierenden Zellen als auch in den nicht-professionellen antigenpräsentierenden Zellen zu beobachten ist, könnte dieser als der primäre Mechanismus angesehen werden. Den CPAF-vermittelten Mechanismus könnte man als eine weitere Abwehrstrategie für solche Zellen sehen, bei denen die TLR-Aktivität weniger stark ausgeprägt ist. Diese Theorie wird durch die in Kapitel 5.1.1 diskutierte Beobachtung unterstützt: In MyD88^{-/-} Makrophagen, in denen die TLR-Aktivität reduziert ist, kann sich *C. pneumoniae* besser entwickeln als in Wildtyp Zellen. Die Bedeutung der TLRs für die Wechselwirkung zwischen Wirt und Erreger in von *C. pneumoniae* infizierten Zellen der Epithelien des Respirationstraktes und der Endothelien bedarf sicherlich weiterer Untersuchungen *in vivo*.

5.3 Sekretion des CXC-Chemokins MIG

Es ist bekannt, dass IFN γ eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle einer Infektion mit *C. pneumoniae* spielt und dass es dabei zu einer Induktion der TH1-Antwort gegen den Erreger kommt [Geng, 2000]. In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass *C. pneumoniae* durch zwei unterschiedliche Mechanismen die IFN γ -induzierte Expression von MHC Klasse II an der Zelloberfläche verhindert. Dadurch wird die Präsentation von Antigenen an der Zelloberfläche gestört. Da MHC Klasse II für die Aktivierung von CD4-T-Zellen notwendig ist, könnte sich der obligat intrazelluläre Erreger unerkannt vom Immunsystem des Wirtes in der Wirtszelle entwickeln. Neben der Präsentation von Antigenen kommt es während bakterieller Infektionen zur Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen. Von Interesse war daher die Frage, ob die in dieser Arbeit gezeigten Mechanismen auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II beschränkt sind oder *C. pneumoniae* die Sekretion von IFN γ -induzierbaren Chemokinen auf ähnliche Weise beeinflusst.

Wichtige Chemokine, welche die Aktivierung der TH1-Antwort durch IFN γ vermitteln, sind die CXC3-Chemokine MIG (monokine induced by IFN γ) und IP 10 (interferon inducible protein 10). Sie bewirken eine Chemotaxis von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen, haben jedoch keinen Einfluss auf ruhende T-Zellen [Loetscher, 1996]. Zwar sind beide Zytokine durch IFN γ induzierbar und zeigen mit 37 % eine hohe Übereinstimmung in der Gensequenz, das Ausmaß der Stimulation ist jedoch vom Zelltyp und dessen Umfeld abhängig. So ist die Induktion der Chemokine in Tumorzelllinien und in transformierten Zelllinien schwächer ausgeprägt als in primären Zellen [Sauty, 1999]. Eine Induktion der Chemokine konnte unter anderem in Epithelzellen des respiratorischen Systems, in Monozyten und in Fibroblasten nachgewiesen werden. Bei verschiedenen Erkrankungen, die mit einer Induktion von IFN γ einhergehen, konnten erhöhte Konzentrationen der Chemokine im Mausmodell nachgewiesen werden. Darunter sind sowohl chronische Erkrankungen wie Psoriasis und Arteriosklerose als auch Infektionserkrankungen wie Tuberkulose, Toxoplasmose und die Klebsiellenpneumonie [Faber, 1997]. Auch bei Infektionen mit *Chlamydia trachomatis* und *C. pneumoniae* konnte eine Induktion der Chemokine gezeigt werden [Nagarajan, 2005; Högdahl, 2008]. Für *Chlamydia trachomatis* konnte *in vitro* eine Induktion von IP10 nach Infektion von Makrophagen und Fibroblasten nachgewiesen werden, welche abhängig von MyD88 ist und nur durch eine Infektion mit lebenden Chlamydien, nicht aber nach Stimulation mit deaktivierten Bakterien erreicht wird [Nagarajan, 2005].

Wir beobachteten in Makrophagen und Fibroblasten eine unterschiedliche Stimulierbarkeit der Chemokine durch *C. pneumoniae*. In infizierten MEFs, wo sich *C. pneumoniae* regelrecht entwickelt (siehe Kapitel 4.2), beobachteten wir eine Induktion von MIG, welche von MyD88 abhängig ist. Eine alleinige Stimulation mit IFN γ führt zu keiner gesteigerten Sekretion des Chemokins. Bei infizierten Zellen ist die Sekretion von MIG durch IFN γ noch weiter induzierbar. Anscheinend bedarf es in diesem Zelltyp einer Aktivierung durch ein Pathogen, bevor eine Stimulation von MIG durch IFN γ möglich wird. Dies entspricht Erkenntnissen über die Sekretion von MIG und IP10 in Keratinozyten: Pathologisch veränderte, aktivierte Zellen aus psoriatischen Läsionen zeigten eine intensivere Sekretion der Chemokine als ruhende Keratinozyten [Goebeler, 1998]. In den BMDMs hingegen führt eine Infektion mit *C. pneumoniae* zu keiner Sekretion von MIG.

Bei Nagarajan et al. konnten sowohl in Fibroblasten als auch in Makrophagen nur lebende Chlamydien eine Induktion von IP10 hervorrufen, inaktivierte Chlamydien jedoch nicht. In unseren Experimenten konnten hitzeinaktivierte Chlamydien in MEFs ebenfalls keine deutliche Induktion von MIG bewirken. Der von Nagarajan verwendete *Chlamydia trachomatis*-Stamm entwickelte sowohl in Fibroblasten als auch in Makrophagen gleichartige Inklusionen, was einen funktionierenden Stoffwechsel in beiden Zelltypen nahelegt [Nagarajan, 2005]. In unseren Versuchen ist die Entwicklung von *C. pneumoniae* in BMDMs jedoch eingeschränkt (siehe Kapitel 4.2). Unter diesen

Bedingungen bewirkt *C. pneumoniae* in den WT BMDMs keine Induktion von MIG, und eine Induktion der Sekretion durch IFN γ ist unabhängig von *C. pneumoniae* möglich.

Bei *in vitro* Experimenten mit CXC-Chemokinen ist kritisch zu betrachten, dass die Induktion der Chemokine in verschiedenen Zelllinien stark variiert [Sauty, 1999]. Unseren Beobachtungen zufolge führen also nur Chlamydien, welche Inklusionen mit Retikularkörperchen und damit einen funktionierenden Metabolismus ausbilden, zur Induktion von MIG. Dies entspricht den Beobachtungen von Rank et al., in denen *Chlamydia trachomatis* nach Infektion der Endocervix von Mäusen erst nach der Konversion von EBs in RBs eine Stimulation von IP10 und MIG bewirken kann [Rank, 2010].

In MEFs führt eine Infektion mit *C. pneumoniae* zu einer MyD88-abhängigen Induktion des CXC-Chemokins MIG und steigert damit die proinflammatorische Reaktion des Immunsystems. Der von uns beschriebene MyD88-abhängige Mechanismus und der vorbeschriebene CPAF-abhängige Mechanismus verhindern die Oberflächenexpression von MHC Klasse II in MEFs und wirken einer Auslösung der Immunantwort des Wirtes damit entgegen. Der Einfluss von *C. pneumoniae* auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II und auf die Sekretion des CXC-Chemokins MIG führen in ihrer Wirkung auf das Immunsystem also zu gegensätzlichen Effekten. Damit kommt dem Einfluss von *C. pneumoniae* auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II eine herausragende Bedeutung dabei zu, wie bei einer Infektion mit Chlamydien eine Auslösung der Immunantwort durch den Wirt umgangen werden kann.

Der in dieser Arbeit neu beschriebene PAMP-getriggerte TLR-abhängige Mechanismus, der die Oberflächenexpression von MHC Klasse II verhindert, wirkt sowohl in professionellen antigenpräsentierenden Zellen als auch in Fibroblasten, und er funktioniert, im Gegensatz zu dem durch CPAF herbeigeführten vorbeschriebenen Mechanismus, unabhängig vom Reifestadium der Chlamydien. Damit gelang die Beschreibung eines neuen Escape-Mechanismus der eine Möglichkeit darstellt, wie Chlamydien in infizierten Wirtszellen persistieren und der Immunantwort des Wirtes entgehen können. So leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag dazu, die Wechselwirkung zwischen *Chlamydomphila pneumoniae* und ihrem Wirt besser zu verstehen.

Literaturverzeichnis

Akira, S., Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.*, 4(7) (2004) 499-511

Arienne, S., Surcel, H.-M., Tuukkanen, J., Leinonen, M., Saikku, P. *Chlamydia pneumoniae* Inhibits Apoptosis in Human Epithelial and Monocyte cell lines. *Scand. J. Immunol.*, 55(4) (2002) 390-98

Blasi, F., Tarsia, P., Aliberti, S., Cosentini, R., Allegra, L. *Chlamydia pneumoniae* and *mycoplasma pneumoniae*. *Semin Respir Crit Care Med*, 26(6) (2005) 617-624

Blessing, E., Kuo C.C., Lin T.M., Campbell L.A., Bea F., Chesebro B., Rosenfeld M.E. Foam Cell Formation Inhibits Growth of *Chlamydia pneumoniae* but Does Not Attenuate *Chlamydia pneumoniae*-Induced Secretion of Proinflammatory Cytokines. *Circulation*, 105(6) (2002) 1976-82

Boman, J., Söderberg, S., Forsberg, J., Birgander, L.S., Allard, A., Persson, K., Jidell, E., Kumlin, U., Juto, P., Waldenström, A., Wadell, G. High Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* DNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Cardiovascular Disease and in Middle-Aged Blood Donors. *J Infect Dis.*, 178(1) (1998) 274-77

Brand, E., Koyi, H., Gnarpe, J., Gnarpe, H., Tornling, G. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection is a risk factor for the development of COPD. *Respir Med*, 99(2005) 20-26

Brunham, R. C., Rey-Ladino, J. Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Nature Reviews Immunology*, 5(2005) 149-161

Cazalet, C., Rusniok, C., Brüggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L., Tichit, M., Jarraud, S., Bouchier, C., Vandenesch, F., Kunst, F., Etienne, J., Glaser, P., Buchrieser, C. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet.*, 36(11) (2004) 1165-73

Chen, S., Sorrentino, R., Shimada, K., Bulut, Y., Doherty, T., Crother, T., Arditi, M. *Chlamydia pneumoniae*-Induced Foam Cell Formation Requires MyD88-Dependent and -Independent Signaling and Is Reciprocally Modulated by Liver X Receptor Activation. *J. Immunol.*, 181(11) (2008) 7186-93

Da Costa, C. U., Wantia, N., Kirschning, C.J., Busch, D.H., Rodriguez, N., Wagner, H., Miethke, T. Heat shock protein 60 from *Chlamydia pneumoniae* elicits an unusual set of inflammatory responses via Toll-like receptor 2 and 4 in vivo. *Eur J Immunol.*, 34(10) (2004) 2874-2884

Dechend, R., Maass, M., Gieffers, J., Dietz, R., Scheidereit, C., Leutz, A., Gulba, D.C. *Chlamydia pneumoniae* infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kB and induces tissue factor and PAI-1 expression: A potential link to accelerated arteriosclerosis. *Circulation*, 100(13) (1999) 1369-73

Diederens, B. M., van der Valk, P.D., Kluytmans, J.A., Peeters, M.F., Hendrix, R. The role of atypical respiratory pathogens in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 30(2) (2007) 240-4

Ericson, K., Saldeen, T.G., Lindquist, O., Pahlson, C., Mehta, J.L. Relationship of *Chlamydia pneumoniae* infection to severity of human coronary atherosclerosis. *Circulation*, 101(22) (2000) 2568-71

Ezzhari, R., Strassen F., Kurvers H., van Paul M., Kitslaar P., Bruggenan C. *Chlamydia pneumoniae* infection induces an unstable atherosclerotic plaque phenotype in LDL-receptor, ApoE double knockout mice. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 26(11) (2003) 88-95

Faber, J. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukocyte Biol.*, 61(3) (1997) 246-257

Fan, P., Dong, F., Huang, Y., Zong, G. *Chlamydia pneumoniae* Secretion of a Protease-Like Activity Factor for Degrading Host Cell Transcription Factors Is Required for Major Histocompatibility Complex Antigen Expression. *Infect. Imm.*, 70(1) (2002) 345-349

Faure, E., Thomas, L., Xu, H., Medvedev, A., Equils, O., Arditi, M. Bacterial lipopolysaccharide and IFN- γ induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kB activation. *J Immunol.*, 166(3) (2001) 2018-24

Geng, Y., Berencsi, K., Gyulai, Z., Valyi-Nagy, T., Gonczol, E., Trinchieri, G. Roles of Interleukin-12 and Gamma Interferon in Murine *Chlamydia pneumoniae* Infection. *Infect Immun*, 68(4) (2000) 2245-2253

- Gieffers, J., Füllgraf, H., Jahn, J., Klinger, M., Dalhoff, K., Katus, H.A., Solbach, W., Maass, M. *Chlamydia pneumoniae* infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation* 104(13) (2001) 351-6
- Gieffers, J., van Zandbergen, G., Rupp, J., Sayk, F., Krüger, S., Ehlers, S., Solbach, W., Maass, M. Phagocytes transmit *Chlamydia pneumoniae* from the lungs to the vasculature. *Eur Respir J*, 23(4) (2004) 506-10
- Goebeler, M., Toksoy, A., Spandau, U., Engelhardt, E., Brocker, E. B., Gillitzer, R. The C-X-C chemokine Mig is highly expressed in the papillae of psoriatic lesions. *J Pathol*, 184(1) (1998) 89-95
- Gribar, S., Richardson, W., Sodhi, C., Hackam, D. No Longer an Innocent Bystander: Epithelial Toll-Like Receptor Signaling in the Development of Mucosal Inflammation. *Mol Med*, 14(9-10) (2008) 645-659
- Haranaga, S., Yamaguchi, H., Ikejima, H., Friedman, H., Yamamoto, Y. *Chlamydia pneumoniae* Infection of Alveolar Macrophages: A Model. *J. Infect Dis.*, 187(7) (2003) 1107-
- Högdahl, M., Söderlund, G., Kihlström, E. Expression of chemokines and adhesion molecules in human coronary artery endothelial cells infected with *Chlamydia (Chlamydochila) pneumoniae*. *APMIS*, 116(12) (2008) 1082-1088
- Hogan, R. J., Mathews, S.A., Kutlin, A., Hammerschlag, MR., Timms, P. Differential expression of genes encoding membrane proteins between acute and continuous *Chlamydia pneumoniae* infections. *Microb Pathog*, 34(1) (2003) 11-16
- Honey, K., Rudensky A.Y. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nature Reviews Immunology* 3(2003) 472-482
- Jackson, L. A., Grayston, J.T., Dolin R. *Chlamydia pneumoniae*. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5(2000) 2007-14
- Janeway, C. Die Aktivierung von Toll-Rezeptoren löst die Produktion von entzündungsfördernden Cytokinen und Chemokinen, sowie die Expression kostimulierender Moleküle aus. In: "Immunologie", Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2002, Vol. 5, 72-73.

Janeway, C. Die Aktivierung von Makrophagen durch bewaffnete CD4-TH1-Zellen. In: "Immunologie", Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2002, Vol. 5, 358-363.

Janeway, C. Die vorderste Frontlinie der Immunabwehr. In: "Immunologie", Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2002, Vol. 5, 39-46.

Janeway, C. Entwicklung und Überleben von Lymphocyten. In: "Immunologie", Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2002, Vol. 5, 279-289.

Janeway, C. Peptide, die von MHC-II-Molekülen präsentiert werden, entstehen in angesäuerten endocytotischen Vesikeln. In: "Immunologie", Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2002, Vol. 5, 174-175.

Janeway, C. T-Zellen erkennen fremde Antigene in Form von Peptidfragmenten, die an Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes gebunden sind. In: "Immunologie", Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (Hrsg.), Spektrum, Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2002, Vol. 5, 29-31.

Jendro, M., Deutsch, T., Körber, B., Köhler, L., Kuipers, J., Krause-Opatz, B., Westermann, J., Raum, E., Zeidler, H. . Infection of Human Monocyte-Derived Macrophages with *Chlamydia trachomatis* Induces Apoptosis of T Cells: a Potential Mechanism for Persistent Infection. *Infect Immun*, 68(12) (2000) 6704-11

Kuo, C.-C., Jackson, L., Campbell, L., Grayston, T. *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Microbiol rev*, 8(4) (1995) 451-61

Kurt-Jones, A. Use of murine embryonic fibroblasts to define Toll-like receptor activation and specificity. *Journal of Endotoxin Research*, 10(6) (2004) 419-424

Kuper, H., Solomon, A., Buchan, J., Zondervan, M., Foster, A., Mabey, D. A critical review of the SAFE strategy for the prevention of blinding trachoma. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(6) (2003) 372-381

- LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J.M., Krawczyk, M., Otten, L., Suter, T., Fontana, H., Reith, W. Mini review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur J Immunol*, 34(6) (2004) 1513-25
- Loetscher, B., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, S.A., Piali, L., Baggiolini, M., Moser B. Chemokine receptor specific for IP10 and Mig: structure, function and expression in activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med*, 184(1996) 963-969
- Maxion, H. K., Kelly, K.A. Chemokine Expression Patterns Differ within Anatomically Distinct Regions of the Genital Tract during *Chlamydia trachomatis* Infection. *Infect Immun.*, 70(3) (2001) 1538-1546
- Moulder, J. W. Interaction of Chlamydia and host cell in vitro. *Microbiol Rev.*, 55(1) (1991) 143-90
- Muhlethaler-Mottet, A., Di Bernardino, W., Otten, L.A., Mach, B. Activation of MHCII transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity.*, 8(2) (1998) 157-166
- Naiki, Y., Michelsen, K., Schröder, N., Alsabeh, R., Slepkin, A., Zhang, W., Chen, S., Weil, B., Bulut, Y., Wong, M., Peterson, E., Arditi, M. MyD88 is pivotal for the early inflammatory response and subsequent bacterial clearance and survival in a model of *Chlamydia pneumoniae*. *J Biol Chem*, 280(32) (2005) 29242-29
- Nagarajan, U. M., Ojcius, D.M., Stahl, L., Rank, R.G., Darville, T. *Chlamydia trachomatis* Induces Expression of IFN-Inducible Protein 10 and IFN-Independent of TLR2 and TLR4, but Largely Dependent on MyD88. *J Immunol.*, 175(1) (2005) 450-46
- Netea, M. G., Kullberg, B.J., Jacobs, L.E., Verver-Jansen, T.J., van der Ven-Jongekrijg, J., Galama, J.M., Stalenhoef, A.F., Dinarello, C.A., Van der Meer, J.W. *Chlamydia pneumoniae* Stimulates IFN gamma Synthesis through MyD88-Dependent, TLR2- and TLR4-Independent Induction of IL-18 Release. *J Immunol.*, 173(2) (2004) 1477-1482
- O'Keefe, G. M., Nguyen, V.T., Ping Tang, L.L., Benveniste, E.N. IFN-g Regulation of Class II Transactivator Promoter IV in Macrophages and Microglia: Involvement of the Suppressors of Cytokine Signaling-1 Protein. *J Immunol.*, 166(4) (2001) 2260-69

- Otten, L., Steimle, V., Bontron, S., Mach, B. Quantitative control of MHC class II expression by the transactivator CIITA. *J Immunol.*, 28(2) (1998) 473-478
- Pai, R. K., Askew, D., Boom, W.H., Harding, C.V. Regulation of Class II MHC Expression in APCs: Roles of Type I, III and IV Class II Transactivator. *J Immunol.*, 169(3) (2002) 1326-33
- Paradkar, P., De Domenico, I., Durchfoert, N., Zohn, I., Kaplan, J., Mc Vey Ward, D. Iron depletion limits intracellular bacterial growth in macrophages. *Blood*, 112(3) (2008) 866-874
- Peijnenburg, A., Gobin, S.J., van Eggermond, M.C., Godthelp, B.C., van Graafeiland, N., van den Elsen, P. J. Introduction of exogenous class II trans-activator in MHC class II-deficient ABI fibroblasts results in incomplete rescue of MHC class II antigen expression. *J Immunol*, 159(6) (1997) 2720-7
- Pennini, M. E., Pai, R.K., Schultz, D.C., Boom, W.H., Harding, C.V. Mycobacterium tuberculosis 19-kDa Lipoprotein Inhibits IFN-Gamma-Induced Chromatin Remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK Signaling. *J Immunol.*, 176(7) (2006) 4323-30
- Phalipon, A., Sansonetti, P. Shigella's ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? *Immunol Cell Biol*, 85(2) (2007) 119-29
- Rank, R., Lacy, M., Goodwin, A., Nagarajan, M. . Host Chemokine and Cytokine Response in the Endocervix within the First Developmental Cycle of *Chlamydia muridarum*. *Infect Immun*, 78(1) (2010) 536-544
- Ramsey, K. H., Sigar, I.M., Rana, S.V., Gupta, J., Holland, S.M., Byrne, G.I., Morrow, J.D. Inducible Nitric Oxide Synthase Regulates Production of Isoprostanes In Vivo during Chlamydial Genital Infection in Mice. *Infect Immun*, 71(12) (2003) 7183-87
- Roan, N., Starnbach, M. Immune-mediated control of *Chlamydia* infection. *Cell Microbiol*, 10(1) (2008) 9-19
- Rodriguez, N., Fend, F., Jennen, L., Schiemann, M., Wantia, N., Prazeres da Costa, C.U., Dürr, S., Heinzmann, U., Wagner, H., Miethke, T. Polymorphonuclear Neutrophils Improve Replication of *Chlamydia pneumoniae* In Vivo upon MyD88-Dependent Attraction. *J Immunol.*, 174(8) (2005) 4836-44

- Rodriguez, N., Lang, R., Wantia, N., Cirl, C., Ertl, T., Dürr, S., Wagner, H., Miethke, T. Induction of iNOS by *Chlamydomphila pneumoniae* requires MyD88-dependent activation of JNK. *J Leukocyte Biol.*, 84(6) (2008) 1585-93
- Rodriguez, N., Wantia, N., Fend, F., Dürr, S., Wagner, H., Miethke, T. Differential involvement of TLR2 and TLR 4 in host survival during infection with *Chlamydia pneumonia*. *Eur J Immunol*, 36(5) (2006) 1145-55
- Rothfuchs, A., Trumsted, C., Wigzell, H., Rottenberg, M. . Intracellular Bacterial Infection-Induced IFN-g Is Critically but Not Solely Dependent on Toll-Like Receptor 4-Myeloid Differentiation Factor 88-IFN- a-beta-STAT1-Signaling. *J Immunol.*, 172(10) (2004) 6345-6353
- Rottenberg, M. E., Rothfuchs, A.C., Gigliotti, D., Svanholm, C., Bandholtz, L., Wigzell, H. Role of Innate and Adaptive Immunity in the Outcome of Primary Infection with *Chlamydia pneumoniae*, as Analyzed in Genetically Modified Mice. *J Immunol.*, 162(5) (1999) 2829-2836
- Sauty, A., Dziejman, M., Taha, R.A., Iarossi, A.S., Neote, K., Garcia-Zepeda, E.A., Hamid, Q., Luster, A.D. The T Cell-Specific CXC Chemokines IP-10, Mig, and I-TAC Are Expressed by Activated Human Bronchial Epithelial Cells. *J Immunol.*, 162(6) (1999) 3549-3558
- Seki, E., Brenner D.A. Toll-like Receptors and Adaptor Molecules in Liver Disease: Update. *Hepatology*, 48(1) (2008) 324
- Sharma, J., Dong, F., Pirbhai, M., Zongh, G. Intramolecular dimerization is required for the Chlamydia-secreted protease CPAF to degrade Host Transcriptional factors. *Infect Immun*, 72(7) (2004) 3869-75
- Shaw, A. C., Vandahl, B.B., Larsen, M.R., Roepstorff, P., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Christiansen, G., Birkelund, S. Characterization of a secreted Chlamydia protease. *Cell Microbiol.*, 4(7) (2002) 411-24
- Siscovick, D. S., Schwartz, S.M., Corey, L., Grayston, J.T., Ashley, R., Wang, S.P., Psaty, B.M., Tracy, R.P., Kuller, L.H., Kronmal, R.A. *Chlamydia pneumoniae*, *herpes simplex virus type 1* and *cytomegalovirus*: incident of myocardial infarction and coronary heart disease death in older adults: the cardiovascular health study. *Circulation* 102(19) (2000) 2335-40

Stamm, W. E., Jones, R.B., Batteiger, B.E. Introduction to Chlamydial diseases and *Chlamydia trachomatis* (trachoma, perinatal infections, lymphogranuloma venereum, and other genital infections). Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., eds. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 6(2) (2005) 2236-2239

Taraska, T., Ward, D.M., Ajioka, R., Wyrick, P., Davis-Kaplan, S., Davis, C., Kaplan, J. The late chlamydial inclusion membrane is not derived from the endocytic pathway and is relatively deficient in host proteins. *Infect Immun*, 64(9) (1996) 3713-3727

Taylor, M. W., Feng, G.S. . Relationship between interferon gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan catabolism. *FASEB J*, 5(11) (1991) 2516-22

van Zandbergen, G., Gieffers, J., Kothe, H., Rupp, J., Bollinger, A., Aga, E., Klinger, M., Brade, H., Dalhoff, K., Maass, M., Solbach, W., Laskay, T. *Chlamydia pneumoniae* Multiply in Neutrophil Granulocytes and Delay their Spontaneous Apoptosis. *J Immunol.*, 172(3) (2004) 1768-76

Weidang L., A., K., Neal, G., Seshu, J., Forsthuber, G., Zhong, G., Arulanandam, B.P. Antigen-Specific CD4 T Cells Produce Sufficient IFN gamma to Mediate Robust Protective Immunity against Genital *Chlamydia muridarum* Infection. *J. Immunol.*, 180(5) (2008) 3375-3382

Wells, B. J., Mainous, A.G., Dickerson, L.M. Antibiotics for the secondary prevention of ischemic heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med*, 164(19) (2004;) 2156-61

Wolf, K., Fischer, E., Hackstadt, T. Degradation of *Chlamydia pneumoniae* by Peripheral Blood Monocytic Cells. *Infect Immun*, 73(8) (2005) 4560-70

Wolfs, T. G., Buurman, W.A., van Schadewijk, A., de Vries, B., Daemen, M.A., Hiemstra, P.S., van 't Veer, C. In Vivo Expression of Toll-Like Receptor 2 and 4 by Renal Epithelial Cells: IFN-gamma and TNF-alpha Mediated Up-Regulation During Inflammation. *J Immunol.*, 168(3) (2002) 1286-93

Yao, Y., Xu, Q., Kwon, M.J., Matta, R., Liu, Y., Hong, S.C., Chang, C.H. ERK and p38 MAPK Signaling Pathways Negatively Regulate CIITA Gene Expression in Dendritic Cells and Macrophages *J Immunol.*, 177(1) (2006) 70-76

Zahrt, T. C. Molecular mechanisms regulating persistent Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbes and Infection* 5(2) (2003) 159-167

Zhong, G., Fan, T., Liu, L. Chlamydia Inhibits Interferon γ -inducible Major Histocompatibility Complex Class II Expression by Degradation of Upstream Stimulatory Factor 1 *J. Exp. Med.*, 189(12) (1999)

Zwaferink, H., Stockinger, S., Hazemi, P., Lemmens-Gruber, R., Decker, T. IFN-beta increases listeriolysin O-induced membrane permeabilization and death of macrophages. *J Immunol.*, 180(6) (2008) 4116-23

Danksagung

Hiermit möchte ich meinem Doktorvater Univ. Prof. Dr. med. Thomas Miethke für die intensive Betreuung danken. In seiner Arbeitsgruppe konnte ich die erforderlichen Techniken im Labor erlernen. Ebenfalls wies er mich durch ausführliche Gespräche über die Ergebnisse meiner Experimente in die wissenschaftliche Denkweise ein.

Bei Univ. Prof. Dr. med. Wagner bedanke ich mich für die Ermöglichung meiner Doktorarbeit in seinem Institut sowie für die Bereitstellung der Geräte und Reagenzien.

Besonderen Dank möchte ich meiner Betreuerin Dr. Nuria Rodriguez für die intensive Unterstützung aussprechen. Dr. Nuria Rodriguez wies mich in die Labortechniken ein, stand mir über drei Jahre hinweg bei kleinen und großen Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite und führte mich in das wissenschaftliche Denken ein.

Ebenso wäre mir die Durchführung dieser Arbeit nicht ohne die Unterstützung meiner weiteren Kollegen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Thomas Miethke möglich gewesen. Hier gilt mein Dank Dr. Christine Cirl, Dr. med. Nina Wantia, Tanja Ertl, Susanne Dürr und Lavinia Kernschmidt.

Auch danke ich aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Hermann Wagner Inge Hensel, Monika Hammel und Dr. med. Tobias Haas für die intensive Zusammenarbeit.

Für die Bereitstellung der MHC Klasse II Antikörper danke ich Herrn Dr. José Villadangos aus Madrid.

Für die Motivation zur Laborarbeit während meines Studiums danke ich meinen Freunden, insbesondere Julia Roider und Steffen Müller.

Zuletzt möchte ich noch meinen Eltern Christian und Sonja Peschel danken, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung mein Studium überhaupt ermöglichten und dieses als auch meine Doktorarbeit immer mit Anteilnahme und Interesse verfolgten.

Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, die Experimente für diese Arbeit, die Auswertung der Ergebnisse, die Datenerhebung, Literaturrecherche und die schriftliche Ausarbeitung eigenständig durchgeführt zu haben.

Georg Peschel