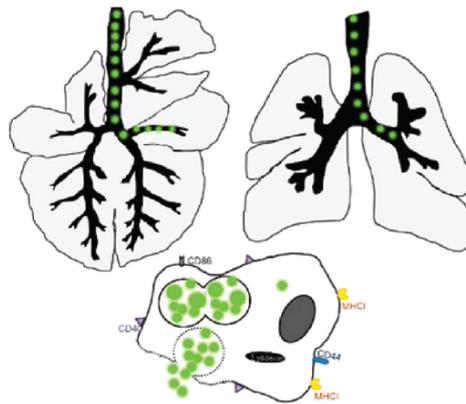


Aus dem Institut für molekulare Pathogenese  
des Friedrich-Loeffler-Instituts, Jena

Eingereicht über das Institut für Virologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

# Replikation, Immunstimulation und Wirtsadaptation verschiedener Chlamydienspezies in humanen und bovinen monozyten-gereiften Makrophagen



**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Kirstin Hillarius**  
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2018  
Journal-Nr.: 3999







**Aus dem Institut für molekulare Pathogenese des Friedrich-Loeffler-Instituts, Jena**

Eingereicht über das Institut für Virologie

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

**Replikation, Immunstimulation und Wirtsadaptation  
verschiedener Chlamydienspezies in humanen und  
bovinen monozyten-gereiften Makrophagen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Kirstin Hillarius

Tierärztin

aus Berlin

Berlin 2018

Journal-Nr.: 3999



Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: PD Dr. Michael Veit  
Zweiter Gutachter: PD Dr. Angela Berndt  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Marcus Fulde

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

man; bovidae; Chlamydophila pneumonia; Chlamydophila psittaci; Chlamydia muridarum; macrophages; immunology; host parasite relationships; electron microscopes; immunofluorescence; polymerase chain reaction; photometry

Tag der Promotion: 13.04.2018

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-896-2

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2018**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)



Für meinen Vater  
und  
meinen Sohn Bela

Maybe everything that dies someday comes back.

Bruce Springsteen



**INHALTSVERZEICHNIS**

INHALTSVERZEICHNIS ..... I

0. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... VI

1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN..... 1

    1.1 Die Familie *Chlamydiaceae* ..... 1

        1.1.1 Taxonomie ..... 1

        1.1.2 Eigenschaften des Genus *Chlamydia*..... 2

        1.1.3 Entwicklungszyklus..... 3

        1.1.4 Krankheitsbild und Behandlung ..... 5

        1.1.5. *C. pneumoniae* Stamm DC40 (TW-183)..... 6

        1.1.6 *C. psittaci* Stamm DC15 (Genotyp: A-6BC)..... 8

        1.1.7 *C. muridarum* Stamm DC39 (Nigg)..... 11

    1.2 Makrophagen ..... 13

        1.2.1. Stellung im Immunsystem..... 13

        1.2.2 Abwehrmechanismen ..... 15

        1.2.3 Polarisierung ..... 17

        1.2.4 Makrophagen und Chlamydien ..... 22

    1.3 Wirtsadaptation ..... 22

        1.3.1 Begriffsbestimmung ..... 22

        1.3.2 Wirtsadaptation von Chlamydien ..... 23

2. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT ..... 27

3. MATERIAL UND METHODEN ..... 28

    3.1 Verwendete Materialien ..... 28

        3.1.1 Geräte ..... 28

        3.1.2 Verbrauchsmaterial..... 29

        3.1.3 Chemikalien und Zusatzstoffe ..... 30

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.1.4	Kommerziell erhältliche Testsysteme und gebrauchsfertige Produkte .....	31
3.1.5	Antikörper und Fluorophore .....	32
3.1.6	Kulturmedien und Seren .....	33
3.1.7	Puffer und Lösungen .....	34
3.1.8	Bakterienstämme und bakterielle Stimulatoren .....	34
3.1.9	Blut von Menschen und Rindern.....	34
3.1.10	Software und Datenbanken .....	35
3.2	Versuchsaufbau .....	36
3.3	Kultivierung monozyten-gereifter Makrophagen .....	36
3.3.1	Isolierung von Monozyten aus humanem Buffy Coat .....	36
3.3.2	Kultivierung der isolierten humanen Monozyten zu Makrophagen .....	40
3.3.3	Isolierung von Monozyten aus Rinderblut.....	40
3.3.4	Kultivierung der isolierten bovinen Monozyten zu Makrophagen .....	41
3.4	Anzucht und Titerbestimmung der Chlamydien .....	42
3.4.1	Kultivierung der Anzuchtzellen .....	42
3.4.2	Chlamydienstammkonservierung .....	42
3.4.2.1	<i>Chlamydia pneumoniae</i> , DC40, TW-183 .....	42
3.4.2.2	<i>Chlamydia psittaci</i> , DC15, A-6BC .....	43
3.4.2.3	<i>Chlamydia muridarum</i> , DC39, Nigg .....	43
3.4.3	Bestimmung des Gehaltes an infektiösen Chlamydien mittels Titration .....	43
3.5	Inokulation der monozyten-gereiften Makrophagen mit Chlamydien.....	44
3.6	Kontaminationsausschluss .....	46
3.7	Visualisierung der monozyten-gereiften Makrophagen beziehungsweise der Chlamydien.....	46
3.7.1	Langzeitbeobachtungen der inokulierten monozyten-gereiften Makrophagen mit dem Lichtmikroskop .....	46

3.7.2	Chlamydiennachweis mittels direkter Immunfluoreszenz .....	47
3.7.3	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM).....	47
3.8	Stimulation der monozyten-gereiften Makrophagen mit Interferon gamma und/oder Lipopolysacchariden.....	48
3.9	Molekularbiologische Untersuchungen .....	48
3.9.1	DNA-Isolation.....	48
3.9.2	mRNA-Isolation.....	49
3.9.3	Photometrische Bestimmung der RNA/DNA-Konzentration .....	49
3.9.4	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	50
3.9.5	Quantitative <i>real-time</i> reverse Transkriptase (RT)-PCR.....	50
3.9.6	Quantifizierung der mRNA.....	51
3.10	Photometrische beziehungsweise fluorometrische Analysen .....	53
3.10.1	Nitrit-Nachweis mittels Griess-Reagenz .....	53
3.10.2	Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay.....	54
3.10.3	Bestimmung von freien Sauerstoffradikalen (ROS) und Superoxid (SOX).....	54
3.11	Durchflusszytometrie .....	55
3.12	Bestimmung der Infektiosität der Chlamydien nach Isolation aus monozyten- gereiften Makrophagen.....	56
3.13	Statistische Auswertungen.....	56
4.	ERGEBNISSE.....	58
4.1	Replikation und Überleben von <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> in humanen und bovinen monozyten-gereiften Makrophagen.....	58
4.1.1	Quantitative Bestimmung der Chlamydien mittels <i>realtime</i> PCR.....	58
4.1.2	Beschreibung und semi-quantitative Bestimmung der Chlamydien mittels Immunfluoreszenzfärbung .....	62
4.1.3	Überprüfung des Entwicklungsstadiums der Chlamydien mittels Transmissionselektronenmikroskopie .....	66

## INHALTSVERZEICHNIS

---

4.1.4	Infektiosität der Chlamydien nach Isolierung aus monozyten-gereiften Makrophagen .....	69
4.2	Wirtszellantwort auf eine Stimulation mit <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> .....	70
4.2.1	Überlebensfähigkeit monozyten-gereifter Makrophagen (MDM) .....	71
4.2.1.1.	Lichtmikroskopische Untersuchungen .....	71
4.2.1.2.	Laktat-Dehydrogenase-Assay .....	78
4.2.2	Das mRNA-Expressionsprofil der humanen und bovinen MDM .....	78
4.2.2.1.	mRNA-Expression der humanen MDM nach Stimulation mit Chlamydien	79
4.2.2.2.	mRNA-Expression der bovinen MDM nach Stimulation mit Chlamydien ..	82
4.2.2.3.	Vergleichende Analyse der Wirtsreaktion in bovinen und humanen MDM	86
4.2.3	Auslösung der respiratorischen Entladung und Nitritfreisetzung in Makrophagen .....	88
4.2.3.1.	Nitritfreisetzung durch humane und bovine MDM nach Stimulation mit Chlamydien .....	88
4.2.3.2.	Abgabe von freien Sauerstoffradikalen durch humane Makrophagen nach Stimulation mit Chlamydien .....	89
4.2.4	Einfluss verschiedener Chlamydien-Stämme auf die Expression der Oberflächenmarker von humanen Makrophagen .....	90
4.3	Die Expression chlamydialer Virulenzfaktoren durch <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> , bzw. <i>C. muridarum</i> in humanen und bovinen monozyten-gereiften Makrophagen ..	95
4.3.1.	Chlamydiale Virulenzfaktoren in der Chlamydienkonserve und in humanen bzw. bovinen MDM .....	95
4.3.2.	mRNA-Expression von chlamydialen Virulenzfaktoren in nicht immunkompetenten BGM .....	97
5.	DISKUSSION .....	98
5.1	Vergleich und Charakterisierung der primären monozyten-gereiften Makrophagen	98
5.2	Replikation und Immunstimulation von <i>C. pneumoniae</i> in humanen und bovinen Makrophagen .....	101

5.3	Replikation und Immunstimulation von <i>C. psittaci</i> in humanen und bovinen Makrophagen.....	109
5.4	Replikation und Immunstimulation von <i>C. muridarum</i> in humanen und bovinen Makrophagen.....	114
5.5	Vergleichende Modelle zur Infektiosität und Wirtsadaptation verschiedener Chlamydienpezies in humanen und bovinen MDM.....	118
6.	ZUSAMMENFASSUNG .....	123
7.	ANHANG.....	129
8.	LITERATURVERZEICHNIS .....	138
9.	PUBLIKATIONSLISTE .....	168
10.	DANKSAGUNG .....	170

### 0. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
Aqua dest	<i>Aqua destillata</i>
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
BGM	<i>Buffalo green monkey cells</i>
Bp	Basenpaare
B. subtilis	<i>Bacillus subtilis</i>
Bzw	beziehungsweise
C.	<i>Chlamydia</i>
CCL	<i>chemokine ligand</i>
CCR	<i>chemokine receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDS	<i>coding sequences</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cp.	<i>Chlamydophila</i>
CPD	Citrat-Phosphat-Dextrose
CT	<i>cycle threshold</i>
D	<i>days</i> = Tage
DAPI	4',6'-Diamino-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat

DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
Dpi	<i>day post inoculationem</i>
dsRNA	<i>double strain RNA</i>
EBE	Einschluss-bildende Einheit
E.coli	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	Enterohämorrhagischer Escherichia Coli
EK	Elementarkörperchen
et al.	und andere
F	Vorwärts-Primer ( <i>forward</i> )
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
FSC	<i>forward scatter</i>
x g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HPI	<i>hours post inokulationem</i>
HSP	Hitzeschockprotein

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

HuS	Humanes Serum
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IFT	Immunfluoreszenztest
IFU	<i>inclusion forming units</i>
ifu/cell	<i>inclusion forming unit per cell</i> – Einschlussbildende Einheit pro Zelle
ifu/2ml	<i>inclusion forming unit per 2ml</i> - Einschlussbildende Einheit pro 2ml Überstand
Ig	Immunoglobulin
IK	Intermediärkörperchen
IL	Interleukin
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-18	Interleukin-18
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRG	IFN $\gamma$ -regulierte Proteine
LCT	<i>large cytotoxins</i>
LDH	Laktat Dehydrogenase
LM	Lichtmikroskop
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Lymphozytenseparationsmedium
LVUA	Lebensmittel-, Veterinär- und Umweltuntersuchungsamt
$\mu$	Mikro (10 <sup>6</sup> )

µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
Mcl-1	<i>myeloid cell leukemia 1</i>
M-CSF	<i>macrophage stimulating factor</i>
MDM	<i>monocyte-derived-macrophages</i>
MEM	<i>Minimum Essential Media</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOMP	<i>outer membrane porin</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
n	Gruppengröße
NaCl	Natrium-Chlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Nb	nicht bestimmt
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
Ng	Nanogramm (10 <sup>9</sup> )
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
Nm	Nanometer (10 <sup>9</sup> )
nM	Nanomol (10 <sup>9</sup> )
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

NRL	Nationales Referenzlabor
NTP	Nucleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
OmcB	<i>outer membrane cysteine-rich outer membrane polypeptide</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PE	Phycoerythrin
Pgp3	<i>plasmid-encoded protein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrit
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pmp	polymorphe Membranproteine
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PZ	<i>plasticity zone</i>
qm	Quadratmeter
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real-time reverse transkriptase polymerase chain reaction</i>
R	Rückwärts-Primer ( <i>reverse</i> )
Rf	Referenz
RK	Retikularkörperchen
rRNA	ribosomale RNA
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>

ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RT	reverse Transkription
S2	Sicherheitsstufe 2
S3	Sicherheitsstufe 3
ScR	Scavanger-Rezeptoren
Sec	<i>seconds</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
ssRNA	<i>single strain RNA</i>
SOX	Superoxide
Spp	Subspezies
T <sub>A</sub>	Annealingtemperatur
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TH1	T-Helfer-Zellen 1
THP-1	<i>human monocytic cell line</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPI	<i>transmissible proliferative ileitis</i>
TRP	Tryptophan
T <sub>s</sub>	Schmelztemperatur der Amplifikate
T <sub>3</sub> S	Typ-III-Sekretionsmechanismus
TW-183	Isolat 183 aus Taiwan
U	Enzymeinheit (unit)

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

USA	United States of America
U-Test	Wilcoxon-Mann-Whitney-Test
UV	Ultraviolettes Licht
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs	<i>versus</i>
Yopi	<i>young, old, pregnant, immunodeficient</i>

## 1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### 1.1 Die Familie *Chlamydiaceae*

#### 1.1.1 Taxonomie

Chlamydien werden der Domäne Bakterien zugeordnet. Dort gehören sie dem Phylum *Chlamydiae*, der Klasse *Chlamydiae* und der Ordnung *Chlamydiales* an. Die Ordnung *Chlamydiales* enthält zurzeit neun Familien (Lagkouvardos, Weinmaier et al. 2014):

*Chlamydiaceae* (Corsaro, Feroldi et al. 2009; Corsaro and Venditti 2009)

*Parachlamydiaceae* (Corsaro, Feroldi et al. 2009; Corsaro and Venditti 2009)

*Rhabdochlamydiaceae* (Corsaro, Feroldi et al. 2009; Corsaro and Venditti 2009)

*Criblamydiaceae* (Corsaro, Feroldi et al. 2009; Corsaro and Venditti 2009)

*Simkaniaceae* (Everett, Bush et al. 1999)

*Waddliaceae* (Rurangirwa, Dilbeck et al. 1999)

*Piscichlamydiaceae* (Draghi, Popov et al. 2004)

*Clavochlamydiaceae* (Karlsen, Nylund et al. 2008)

*Parilichlamydiaceae* (Stride, Polkinghorne et al. 2013)

Im Jahr 1966 wurde der Genus *Chlamydia* (L.A. Page 1966) in die Familie *Chlamydiaceae* eingeführt. *Chlamydia (C.) trachomatis* und *C. psittaci* waren bis in die 1980er Jahre die einzigen zwei Spezies dieser Familie. Noch in der ersten Ausgabe 1984 des Bergeys Manual of Systematic Bacteriology wurde nur ein Genus (*Chlamydia*) in der Familie *Chlamydiaceae* beschrieben. 1999 war dann die Möglichkeit gegeben, taxonomische Untersuchungen mit Hilfe von 16S rRNA -Gensequenzen durchzuführen und die Aufteilung des Genus *Chlamydia* in die Genera *Chlamydia* und *Chlamydophila* wurde vorgeschlagen (Everett, Bush et al. 1999). Der neue Genus *Chlamydophila* beinhaltete demnach die sechs Spezies: *Chlamydophila (Cp.) abortus*, *Cp. caviae*, *Cp. felis*, *Cp. pecorum*, *Cp. pneumoniae* und *Cp. psittaci*. Dieser Vorschlag wurde von der wissenschaftlichen Gesellschaft nicht einheitlich akzeptiert. 2015 wurden alle bekannten Chlamydienpezies erneut detailliert untersucht und die Rückkehr zur Klassifizierung mit nur einem Genus ‚Chlamydia‘ gefestigt (Sachse, Bavoil et al. 2015).

Zu dem Genus *Chlamydia* werden derzeit folgende Spezies gezählt (Sachse, Laroucau et al. 2014):

*C. avium*

*C. gallinacea*

*C. abortus*

- C. psittaci
- C. caviae
- C. felis
- C. pecorum
- C. pneumoniae
- C. trachomatis
- C. muridarum (vorher zu C. trachomatis zugehörig)
- C. suis

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden *C. pneumoniae* Stamm DC40 (TW-183), *C. psittaci* Stamm DC15 (Genotyp: A-6BC) und *C. muridarum* Stamm DC39 (Nigg) eingesetzt.

### 1.1.2 Eigenschaften des Genus *Chlamydia*

Die Mitglieder des Genus *Chlamydia* sind kokkenähnliche, unbewegliche und obligat intrazelluläre Organismen. Sie haben einen Durchmesser von 0,2-1,5 µm. *Chlamydiae* parasitieren und vermehren sich im Zytoplasma von eukaryotischen Wirten innerhalb einer membran gebundenen Vakuole. Ihr Entwicklungszyklus ist einzigartig und beinhaltet drei Entwicklungsstufen der Chlamydien. Sie besitzen eines der kleinsten Genome der Prokaryoten mit  $1-1,3 \times 10^6$  Basenpaare (bp) und sind metabolisch eingeschränkt. Sie sind darauf angewiesen wesentliche Bausteine wie Nucleotide, Aminosäuren, Lipide und Ko-Faktoren von ihren Wirten zu beziehen (Parte 2012). Der Genus *Chlamydia* besitzt 59 einzigartige Proteine (Griffiths, Ventresca et al. 2006), die in keinem anderen Mikroorganismus gefunden werden.

*Chlamydiae* sind in der Lage persistente oder chronische Infektionen auszulösen. Sie überleben im Wirt, da sie die Fähigkeit haben eine Fusion von wirtseigenen Lysosomen und chlamydienhaltigen Vakuolen zu verhindern. Der chlamydiale Einschluss scheint dabei von den zellulären Reaktionswegen, die bei der Entwicklung von Endosomen zu Lysosomen essenziell sind, abgekoppelt zu sein (Scidmore, Fischer et al. 2003).

Chlamydien werden aufgrund der Anfärbbarkeit ihrer Zellwand zu den Gram(-) -Bakterien gezählt. Die Zellwände der Elementar- und Retikularkörperchen bestehen aus drei Teilen: die äußere Doppelmembran (Zellwand), ein mittlerer sehr schmaler periplasmatischer Raum und die Zytoplasmamembran. Sie nutzen den Typ-III-Sekretionsapparat der Gram(-)-Bakterien (Parte 2012). Lange Zeit war es Wissenschaftlern nicht möglich Peptidoglykan in Chlamydien nachzuweisen, obwohl es biochemische und genetische Hinweise auf Vorhandensein dieses Moleküls gab (Packiam, Weinrick et al. 2015). 2015 gelang es Packiam et al. (Packiam, Weinrick et al. 2015) erstmals Chlamydien mit einer neuen Zellwandfärbemethode anzufärben. Im weiteren Verlauf konnten sie mit einem ebenfalls neu entwickelten Verfahren zur Isolation von Muropeptiden Peptidoglycane isolieren und mittels Massenspektrometrie nachweisen. Damit und mit weiteren Studien zu diesem Thema konnte

das Problem der „Anomalie“ chlamydialen Peptidoglycans gelöst werden (Elwell, Mirrashidi et al. 2016).

Lipopolysaccharide (LPS) sind wichtige Bestandteile der Chlamydienzellwand und besitzen antigene Eigenschaften. Chlamydiales LPS besitzt die gleichen charakteristischen strukturellen Elemente, wie das LPS anderer Gram(-)-Bakterien. Es besitzt zwei wichtige antigene Komponenten, eines davon ist chlamydienpezifisch und das andere ist dem von anderen Gram(-)-Bakterien ähnlich. Beide Komponenten führen zur Ausbildung eines hohen Antikörpertiters im Wirt (Parte 2012). Des Weiteren weist chlamydiales LPS nur eine geringe Endotoxizität auf, was wahrscheinlich die intrazelluläre Lebensweise der Chlamydien unterstützt (Brade, Schramek et al. 1986). Zusätzliche antigene Eigenschaften besitzen das Hitzeschockprotein HSP-60, OmcB (nur in EK) und MOMP (*outer membrane porin*) (Parte 2012).

Einige Chlamydienpezies enthalten extrachromosomale Plasmide. Ihre vollständige Funktion ist nicht abschließend geklärt. Sie könnten einen Virulenzfaktor für die Chlamydien darstellen. So häufen plasmidhaltige *Chlamydia trachomatis*-Stämme während des Entwicklungszyklus vermehrt Glykogen an und es wurde nachgewiesen, dass plasmidlose *Chlamydia trachomatis* Stämme langsamer wachsen als plasmidhaltige (Wang, Kahane et al. 2013). Das Plasmidprotein Pgp3 soll in der Lage sein, eine pro-inflammatorische Reaktion in Makrophagen auszulösen, indem es sie zur Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen anregt (Li, Chen et al. 2008). Des Weiteren könnten Plasmide einen geeigneten Vektor darstellen, um zu Forschungszwecken Genkonstrukte in die Chlamydien zu schleusen (Wang, Kahane et al. 2011; Wang, Kahane et al. 2013).

Chlamydien können bis heute nicht in zellfreien Medien kultiviert werden und werden daher in Labortieren, Hühnerembryonen (Braukmann, Sachse et al. 2012) oder Zellkulturen (BGM; NRL FLI) vermehrt. Die Wachstumsrate in der Zellkultur ist abhängig von der Spezies und den Biovaren innerhalb der Spezies. Das Laborhandling muss mindestens unter S2-Bedingungen erfolgen. Einige Spezies und Stämme (aviäre *C. psittaci*-Stämme) können sogar nur in S3-Laboren gehandhabt werden.

### 1.1.3 Entwicklungszyklus

Anders als die meisten anderen Vertreter der Bakterien zeigen *Chlamydiae* einen Entwicklungszyklus, der durch morphologisch und physiologisch verschiedene Stadien charakterisiert ist. Die Art der Vervielfältigung innerhalb der zytoplasmatischen Vakuole ist durch die Neuorganisation von Elementarkörperchen (EK) in Retikularkörperchen (RK) gekennzeichnet. Zwischen diesen beiden Formen bildet sich kurzzeitig eine intermediäre Form (Intermediärkörperchen, IK) aus. Der Entwicklungszyklus ist beendet, wenn sich die neu gebildeten RK wieder in EK umwandeln, die in der Lage sind außerhalb der Zelle zu überleben, um dann neue Wirtszellen zu infizieren. Die zytoplasmatische Vakuole, in der die Vermehrung der Chlamydien stattfindet, wird chlamydialer Einschluss genannt. Befindet sich der Einschluss noch in einem frühen Entwicklungsstadium beinhaltet er nur Retikularkörperchen. Reife Einschlüsse beinhalten alle drei chlamydialen Entwicklungsformen (EK, IK, RK), denn der Entwicklungszyklus ist nicht synchronisiert (Parte 2012).

Elementarkörperchen (Parte 2012): EK haben einen Durchmesser von 0,2-0,4 µm. Sie besitzen elektronendichte DNA, die mit Proteinen und einigen Ribosomen kondensiert ist. Sie sind von einer starren, dreischichtigen Zellwand umgeben, die unempfindlich gegenüber Ultraschallbestrahlung ist. EK sind metabolisch inaktiv und infektiös.

Retikularkörperchen (Parte 2012): RK haben einen Durchmesser von 0,6-1,5 µm. Sie besitzen weniger dichtes, fibrilläres Kernmaterial mit mehr Ribosomen. Ihre dreischichtige Zellwand ist flexibel und anfällig für Ultraschallbestrahlung. Sie sind nicht infektiös, aber metabolisch aktiv. Sie vermehren sich durch Zweiteilung.

Intermediärkörperchen (Parte 2012): IK befinden sich im Übergang von RK zu EK. Ihre Größe ist variabel und sie besitzen kleine Areale kondensierter DNA in der Mitte ihres Zytoplasmas, mit einem charakteristischen zielscheibenartigen Aussehen. Es konnte bisher keine Infektiosität festgestellt werden.

Der Entwicklungszyklus kann grob in drei Phasen eingeteilt werden:

- 1) Anheftung und Eintritt der Elementarkörperchen in die Wirtszellen und ihre Umwandlung in Retikularkörperchen.
- 2) Vermehrung der Retikularkörperchen.
- 3) Umwandlung eines Großteils der Retikularkörperchen in die neue Elementarkörperchengeneration und ihre Freisetzung aus der Wirtszelle.

Da der Zyklus nicht synchronisiert ist, überlappen sich alle drei Phasen innerhalb einer Vakuole beziehungsweise Wirtszelle (Parte 2012).

1) Die initiale Phase der Interaktion zwischen Chlamydien und den Wirtszellen beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen der Elementarkörperchen und der Wirtszellwand, welche durch Kationen zustande kommen. Die Bindung wird weiterhin durch andere Liganden, wie hsp70, OmcB und MOMP, gesichert. Des Weiteren orientieren sich die Typ-III-Sekretionssysteme auf der Oberfläche der Elementarkörperchen in Richtung Wirtszellmembran. Die Elementarkörperchen leiten somit ihre Aktin-abhängige Aufnahme in endozytotische Vakuolen ein (Dumoux, Nans et al. 2014). Aufgenommene Elementarkörperchen betreten die Zellen innerhalb von Phagosomen. Phagosomen sind zytoplasmatische Vakuolen, umgeben von Membranen, die aus der Plasmamembran entstanden sind. Dabei treten bei Chlamydien ungewöhnlich viele verschiedene Änderungen der Wirtzellmembran auf, um die Aufnahme zu beginnen. Sie variieren zwischen phagozytotischen Vertiefungen („phagocytic cups“), Filopodien zum Einfangen der EKs und kräuseligen Membraneinstülpungen (Nans, Saibil et al. 2014). Wie bei den Eigenschaften erwähnt, greifen nun die chlamydialen Mechanismen, die eine Entwicklung von Phagosomen zu Phagolysosomen verhindern. Die chlamydienhaltigen Phagosomen werden innerhalb von Minuten in eine kernnahe Region innerhalb der Wirtszelle transportiert. Im Innern des chlamydialen Einschlusses bilden sich die Elementarkörperchen schnell in junge Retikularkörperchen um, welche wachsen und sich teilen. Das erst dichte Genmaterial löst sich in gleichmäßig verteilte, fibrilläre DNA auf. Ribosomen erhöhen ihre Anzahl und die Zellwand wird dünner und flexibler, aber auch fragiler. Die Vollendung der Umwandlung von

Elementarkörperchen zu Retikularkörperchen ist durch die Teilung der Retikularkörperchen gekennzeichnet. (Parte 2012)

2) Die Vermehrung der Chlamydien findet über binäre Zellteilung ohne sichtbare Septenbildung der Retikularkörperchen statt. Die Kernteilung wird durch die Abtrennung von zwei elektronendichten Zonen, die mit fibrillärem Material gefüllt sind, gekennzeichnet. Dabei bilden sich an der Trennebene Einkerbungen in der Zellwand. Die Vermehrung der Retikularkörperchen findet in einer expandierenden membran-gebundenen Vakuole statt, welche eine Erweiterung der phagozytotischen Vakuole ist, in der das Elternelementarkörperchen ursprünglich in die Wirtszelle gebracht wurde. Gegen Ende des Entwicklungszyklus kann ein Einschluss hunderte chlamydiale Zellen beinhalten und fast das gesamte Zytoplasma der Wirtszelle ausfüllen. (Parte 2012)

3) Der Beginn des Reifungsprozesses wird durch die Hoch-Regulation von Genen, die für nukleare Bindungsproteine kodieren, eingeleitet. Diese Gene produzieren Histonproteine, die denen von Eukaryoten ähnlich sind und nukleares Material in eine elektronendichte Masse kondensieren können. Diese Kondensation findet in der Mitte des Zytoplasmas statt. Dadurch bilden sich aus den Retikularkörperchen die Intermediärkörperchen. Die Retikularkörperchen fahren mit der Teilung und Umwandlung zu Elementarkörperchen fort, bis die Wirtszelle die Vermehrung der Chlamydien nicht mehr unterstützen kann. Elementarkörperchen teilen sich nicht. Es gibt kein klares Ende des Entwicklungszyklus, aber normalerweise ist 48 bis 72 Stunden nach der Infektion der Punkt erreicht, an dem das Maximum an infektiösen Elementarkörperchen gebildet wurde. Dies ist abhängig von Wirt, Chlamydienstamm und –spezies. An diesem Punkt existieren alle drei Entwicklungsformen der Chlamydien in einem Einschluss. (Parte 2012)

Wie die Chlamydien die Wirtszelle wieder verlassen, ist noch nicht hinreichend geklärt. Es werden zwei unabhängige Methoden der Freisetzung von chlamydialen Elementarkörperchen *in vitro* unterschieden:

1. Herausbringen („Extrusion“) des Einschlusses aus der infizierten Zelle ohne sie zu zerstören (Neeper, Patton et al. 1990; Hybiske and Stephens 2007)
2. Lyse des intrazellulären Einschlusses mit darauffolgender Zerstörung der Wirtszelle (Hybiske and Stephens 2007)

Die sogenannte „Extrusion“ läuft in drei Schritten ab: i) Ausstülpung des membrangebundenen Einschlusses, ii) Ausdünnung und Einkerbung des Einschlusses an der Nahtstelle und iii) Abtrennung des Einschlusses (Hybiske and Stephens 2007). Dieser Mechanismus ist von einer Aktinpolymerisation durch die Chlamydien abhängig. Die Möglichkeit die Zelle zu verlassen ohne sie zu zerstören könnte hilfreich für die Ausbildung einer chronischen beziehungsweise persistenten Infektion sein (Hybiske and Stephens 2007; Chin, Kirker et al. 2012).

#### 1.1.4 Krankheitsbild und Behandlung

Chlamydien bewirken eine Vielzahl von Krankheitssymptomen. Diese sind abhängig von der Chlamydienspezies und dem betroffenen Wirt. Es kann zu Atemwegserkrankungen

(Ornithose/Psittakose), Darmerkrankungen und zu Erkrankungen des Reproduktionstraktes (Hydrosalpinx) und des Auges (Trachom) kommen.

Chlamydiale Erkrankungen können mit Antibiotika behandelt werden. Dabei ist die Wahl des Antibiotikums sehr entscheidend. Das Wachstum der Chlamydien wird durch Tetrazykline, Makrolide, Azalide, Chloramphenicol, Rifampin und Fluorchinolone gehemmt. Keinen hemmenden Effekt haben Aminoglykoside, Bacitracin und Vancomycin. Penicillin bindet an Penicillin-bindende Proteine (PBPs) und inhibiert so die Synthese des Peptidoglykans und unterbricht damit den Entwicklungszyklus. Dies kann aber durch Absetzen des Medikaments wieder rückgängig gemacht werden. Die Medikamente der Wahl für chlamydiale Erkrankungen sind Tetrazykline, Makrolide und Azalide. Unter diesen wählt man die Präparate mit einer langanhaltenden Wirkung, wie Doxzyklin (Prohl, Lohr et al. 2014), oder solche die eine hohe intrazelluläre Konzentration erreichen, wie Azithromycin, aus.

### 1.1.5. *C. pneumoniae* Stamm DC40 (TW-183)

Im Jahre 1965 isolierten Grayston und seine Kollegen, während einer Studie zu Impfstoffen gegen Trachome in Taiwan, nach 182 anderen Isolationen, einen Stamm aus der Konjunktiva eines Kindes. Nach anfänglichen Bestimmungsschwierigkeiten wurde 1989 das erste Mal offiziell die neue Spezies *C. pneumoniae* beschrieben (Grayston, Kuo et al. 1989). *C. pneumoniae* Stamm TW-183 wird als Typstamm bezeichnet, da er das erste Isolat dieser Spezies war und nun als Referenz für alle weiteren zu untersuchenden Stämme gilt.

Zu der Spezies *C. pneumoniae* werden zurzeit drei(vier) Biovare gezählt:

- Boviar Human (TW-183, kein Plasmid))
  - Biovar Koala (Plasmid)
  - Biovar Pferd (Plasmid)
  - (Biovar Frosch) (Hotzel, Grossmann et al. 2001)
- 

Der Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae* ist nach circa 60 bis 92 Stunden abgeschlossen und neu gebildete Elementarkörperchen werden aus der Wirtszelle entlassen. Das ist deutlich länger als bei *C. trachomatis* (36 bis 48 Stunden) und zweimal so lang, wie bei *C. pneumoniae* Biovar Koala (Roulis, Polkinghorne et al. 2013).

*C. pneumoniae* kann eine Vielzahl von Zellen infizieren. Dazu gehören: Gefäßendothelzellen, glatte Muskelzellen, alveolare Epithelzellen, Fibroblasten, mononukleare Zellen, T-Zellen, dendritische Zellen und neuronale Gliazellen (Kern, Maass et al. 2009).

*C. pneumoniae* zeigt nur eine geringere Virulenz in Hühnerembryoen und in Mäusen, die intrazerebral, intranasal und intravenös inokuliert wurden. Vertreter der Spezies vor allem auch der hier verwendete Stamm TW-183 führten nicht zur Ausbildung einer Konjunktivitis nach Inokulation der Konjunktividen von Affen (Kuo, Chen et al. 1986). *Chlamydia pneumoniae* ist resistent gegenüber Sulfonamiden.

Die Spezies *C. pneumoniae* zeichnet sich durch ein breites Wirtsspektrum aus. Es existieren Isolate, die sowohl in Menschen, als auch in anderen Säugetieren, Beuteltieren, Reptilien und Amphibien gefunden wurden. Genetisch können diese Isolate in verschiedene Biovare

eingeteilt werden (siehe 1.1.1 Taxonomie). Der hier verwendete Stamm TW-183 wurde aus Menschen isoliert und zählt zum Biovar human.

*C. pneumoniae* ist ein Pathogen, das vor allem Erkrankungen im Respirationstrakt auslöst. Dabei kann es zu einer Pharyngitis, Bronchitis bis hin zu einer schweren Pneumonie kommen. Dies tritt nur sporadisch auf und ist meist auf einzelne Epidemien beschränkt. Meistens verläuft die Infektion beim Menschen sehr mild und wird daher oft nicht als Chlamydieninfektion erkannt. Ein einzelner Mensch kann im Laufe seines Lebens mehrmals ohne es zu merken mit *C. pneumoniae* infiziert gewesen sein. Die Seroprävalenz von *C. pneumoniae* im Menschen beträgt circa 80%.

Das Biovar Pferd wurde bisher nur sporadisch gefunden. Pferdeherden mit respiratorischen Symptomen wurden in mehreren Studien auf Chlamydien untersucht. Positive Befunde wurden vorerst dem Genus *C. psittaci* zugeordnet. Bei einer Studie, in der 300 Pferde untersucht wurden, wurden 15 positiv auf Chlamydien getestet. Ein Isolat aus einem drei Jahre alten Vollbluthengstfohlen mit serösem Nasenausfluss wurde N16 genannt. 1993 machte Storey den Vorschlag, unter Nennung mehrerer Anhaltspunkte das Isolat N16 zu dem Genus *C. pneumoniae* zu zählen, mit dem Zusatz, dass dieser deutlich verschieden zu dem humanen Biovar ist (Wills, Watson et al. 1990; Storey, Lusher et al. 1993).

Das Biovar Koala kann bei Koalas zu einer Konjunktivitis und zu respiratorischen Infektionen führen. Zu den respiratorischen Symptomen gehören Niesen, Husten, Nasenausfluss und Brustkorbverengung. Des Weiteren wurde *C. pneumoniae* Biovar Koala aus dem Urogenitaltrakt von Koalas, meist zusammen mit *C. pecorum*, isoliert. Krankheitssymptome traten nur während der Ko-Infektion beider Chlamydienspezies auf. *C. pneumoniae* alleine führte im Urogenitaltrakt nicht zu Symptomen (Jackson, White et al. 1999).

*Chlamydia pneumoniae* wurde in mehreren Fällen ebenfalls aus Fröschen isoliert. Die Frösche zeigten meist einen akuten Verlauf, der zu einem plötzlichen Tod führte. Untersuchungen ergaben einen schlechten Ernährungszustand, Leber- und Nierenschwellung, Splenomegalie und in einem Fall auch eine hämorrhagische Pneumonie. Genanalysen ergaben, dass die Froschisolate dem Biovar Koala sehr ähnlich sind, sich aber doch leicht in ihren *ompA* und *ompB* Genen unterscheiden. Die Gensequenzen der Froschisolate waren deutlich verschieden zum Biovar Mensch (TW-183) und Pferd, weshalb hier ein weiteres Biovar vorgeschlagen wird (Berger, Volp et al. 1999; Hotzel, Grossmann et al. 2001).

Nach der neuesten Genomschlüsselung des Stammes LPCoLN von Biovar Koala wird angenommen, dass sich die humanen Stämme von *C. pneumoniae* vor langer Zeit aus einem tierischen Stamm entwickelt haben. Die Genomanalyse zeigte, dass das Genom des Koala-Stammes deutlich größer ist (10 bis 12 kb), als das der vier bisher entschlüsselten humanen Stämme. Des Weiteren wurde im Koala-Genom ein Plasmid gefunden, das in den meisten humanen Stämmen, so wie in unserem TW-183- Stamm nicht vorhanden ist. Es wird also angenommen, dass sich der tierische Stamm im Laufe der Evolution an den Menschen als Wirt angepasst hat, indem es sein Genom fragmentierte und teilweise auflöste, wobei das Genprodukt dann entweder eingeschränkte Funktionen erhielt oder sich spezialisierte (Myers, Mathews et al. 2009; Mitchell, Hovis et al. 2010). Daraus folgernd kam es anscheinend zu zumindest einer zoonotischen Übertragung von *C. pneumoniae* von Tier zu Mensch in der Vergangenheit. Zusätzlich wurden zwei Isolate bei der indigenen

Bevölkerungsgruppe von Australien gefunden, welche Gemeinsamkeiten sowohl mit den humanen Stämmen, als auch dem Koala-Stamm aufwiesen (Mitchell, Hutton et al. 2010; Roulis, Polkinghorne et al. 2013). Direkte Übertragungen von Koala, Pferd oder Frosch auf den Menschen sind nicht bekannt.

### 1.1.6 *C. psittaci* Stamm DC15 (Genotyp: A-6BC)

Derzeit werden innerhalb der Spezies *C. psittaci* neun Genotypen unterschieden (Beeckman and Vanrompay 2009; Sachse, Laroucau et al. 2009)

Genotyp A	Papageienvögel, Tauben
Genotyp B	Papageienvögel, Tauben
Genotyp C	Enten, Gänse
Genotyp D	Puten
Genotyp E	Tauben, Enten, Puten, Mensch
Genotyp E/B	Enten, Puten, Tauben
Genotyp F	Papageienvögel, Puten, Sittiche
Genotyp WC	Rinder
Genotyp M56	Nagetiere

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Stamm DC15 wurde nach einer Einsendung der LVUA Stendal im Jahre 2002 im Referenzlabor für Chlamydiosen (FLI, Jena) isoliert. Die Probe wurde einem Rinderfetus, nachdem er abortiert worden war, entnommen. Nach serologischen und genomischen (ompA-Gensequenzierung, DNA-Microarray) Untersuchungen wurde der Stamm dem Serotyp A und dem Genotyp A-6BC zugeordnet (Sachse, Laroucau et al. 2008). *C. psittaci* Stamm 6BC ist der Typstamm (Parte 2012).

Bei einer Untersuchung der Genome von 20 verschiedenen *C. psittaci*-Stämmen besaßen alle außer einem (GR9) ein circa 8 kilobasen (kb) großes Plasmid (Read, Joseph et al. 2013).

*C. psittaci* besitzt 13 Gene, die keine signifikanten Homologien zu anderen Chlamydien-spezies aufweisen. Vier der 13 *C. psittaci*-Gene sollen Proteine für den Typ-III-Sekretionsmechanismus sein. *C. psittaci* fehlen einige wichtige Komponenten des Tricarbonsäurezyklus, wie Citrat-Synthase, Aconitase und Isocitrat-Dehydrogenase. Alle NTPs (Nucleotidtriphosphate) werden von *C. psittaci* von der Wirtszelle bezogen, denn es wurde über eine ATP/ADP-Translocase, welche die Retikularkörperchen befähigt sich mit ATP von der Wirtszelle zu versorgen, berichtet (Voigt, Schofl et al. 2012).

Während des ersten Tages der Replikation im Wirt formen sich lose verbundene Mikrokolonien, die den Anschein erwecken, dass sich *C. psittaci* im ganzen Zytoplasma der Wirtszelle verteilt, was bei *C. trachomatis* nicht zu sehen ist. Diese Mikrokolonien konnten

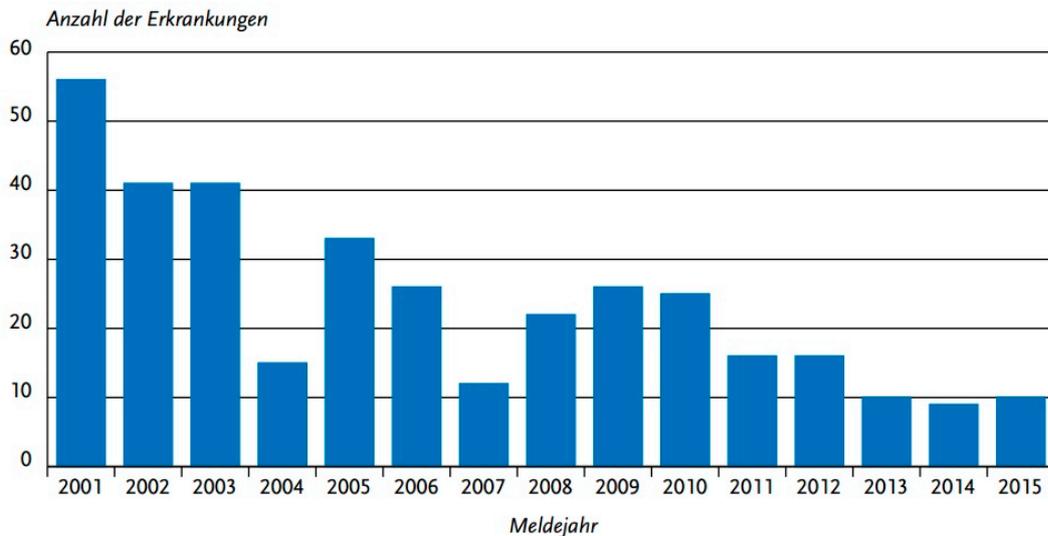
nicht mit der Iod-Färbung angefärbt werden, was bedeutet, dass sie kein Glykogen bilden. Die Vermehrung des Organismus kann mit Tetrazyklin gehemmt werden, aber nicht mit Sulfonamiden (L.A. 1968).

Seit der Isolation wurde der Stamm zu Forschungszwecken an viele andere Forschungsgruppen weitergegeben. Er wird häufig verwendet, da er nicht zu den aviären Stämmen zählt und daher unter S2-Bedingungen gehandhabt werden kann.

*C. psittaci* gehört zu den Chlamydienspezies, die ein sehr breites Wirtsspektrum haben. Vor allem ist der Erreger unter den Vögeln weit verbreitet, aber er kommt auch sehr häufig bei Menschen und anderen Säugetieren vor.

Infektionen mit *C. psittaci* wurden bis 2003 bei 465 Vogelspezies nachgewiesen, die zu 30 verschiedenen Vogelordnungen gehören. Vor allem sind die Ordnungen *Psittacidae* (Kakadu, Papagei, Sittich, Lori) und *Columbiformes* (Tauben) betroffen. Bei Kontrolluntersuchungen von Vögeln professioneller Züchter und Zoofachläden, die zwischen 1984 und 2000 durchgeführt wurden, wurde eine Prävalenz von 6 bis 15 Prozent festgestellt. Weitere Studien zeigten eine Isolationsrate von über 10 Prozent und über 30 Prozent positive Ergebnisse in der Serologie. Es gibt auch immer wieder Ausbrüche in wirtschaftlich geführten Geflügelfarmen. So wurde von Ausbrüchen in Puten-, Gänse und Entenfarmen berichtet. Hühnerfarmen scheinen gegen *C. psittaci*-Infektionen etwas resistenter zu sein (SCAHAW 2002). In Deutschland wurden in den Jahren 2009 bis 2015 1961 Chlamydiose-Erkrankungen gemeldet, davon überdurchschnittlich viele bei Rindern und Schafen. Die Zahlen sind seit 2009 leicht rückläufig bis konstant. 2009 war in dieser Auflistung das ausbruchreichste Jahr mit 488 Fällen (Tierseuchenbericht 2015, NRL-Chlamydiose, FLI).

In Deutschland wurden in den Jahren 1995 bis 2000 790 Fälle von Ornithosen (Psittakose bei Menschen) gemeldet. In derselben Zeit wurden von Veterinärbehörden 2217 Fälle bei Vögeln registriert (SCAHAW 2002). Das Infektionsepidemiologische Jahrbuch des Robert-Koch-Institutes 2015 gibt für das Jahr 2015 10 Ornithosen gemäß Referenzdefinition an. 2014 war mit 9 Ornithosen das Jahr mit der geringsten Anzahl seit 2001. Es wird von einem leicht rückläufigem Trend seit dem Jahr 2009 gesprochen (Abbildung 1). Sechs der betroffenen Personen hatten Kontakt zu Vögeln gehabt.



**Abbildung 1 Übermittelte Ornithosen nach Meldejahr, Deutschland, 2001 bis 2015**

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten 2015, Robert-Koch-Institut, Seite 176

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Genotyp A-6BC wurde bei einer Untersuchung von 98 klinischen Isolaten 15 mal (15%) isoliert. Die Isolate kamen zu 80% von Papageienvögeln, zu 13% von anderen Vogelarten und zu 6% von Schweinen (Sachse, Laroucau et al. 2009). Isoliert wurde der Stamm DC15 (A-6BC) aus einem Rind (Sachse, Laroucau et al. 2008). Es handelt sich also um einen vogeltypischen Stamm, der ab und zu bei Säugetieren vorkommt.

Vögel zeigen meist eine systemische Infektion, welche je nach Stamm und Wirt variiert. Klinische Symptome bei einem empfänglichen Wirt, der mit einem hochvirulenten Stamm infiziert ist, reichen von respiratorischen Symptomen, mukopurulentem Nasen- und Augenausfluss, Diarrhö, Polyurie bis Abgeschlagenheit. Stämme mit geringer Virulenz führen zu Symptomen, die ähnlich sind, aber nicht so schwerwiegend. Beide Stammvarianten können auch zu asymptomatischen Infektionen führen. Die Übertragung findet meist direkt über Fäzes und Nasenausfluss statt. Die Ausscheidung über die Fäzes verläuft meist intermittierend und wird durch Stressfaktoren, wie Transport, Überbelegung, Unterkühlung, Brüten und dem Umgang mit den Tieren ausgelöst. Der Erreger wird ebenfalls über Aerosole oder kontaminierten Staub übertragen. Es gibt auch einige Fälle, in denen es zu einer Übertragung von Elterntieren auf die Jungtiere kam und zwar durch das Hochwürgen von Futter oder die Verschmutzung des Nestes durch Fäzes. Echte vertikale Übertragungen sind selten, wurden aber für Hühner, Enten, Sittiche, Seemöwen und Schneegänse beschrieben. Dies passiert aber so selten, das nicht von einer Gefahr für tierische Produkte ausgegangen werden kann (SCAHAW 2002).

Die Symptome beim Menschen reichen von grippeähnlichen Syndromen bis hin zu schweren systemischen Erkrankungen, die mit einer Pneumonie und eventuell einer Enzephalitis einhergehen. Wenn sie schnell erkannt und richtig behandelt wird, endet die Erkrankung selten tödlich. Die schweren Verläufe kommen vor allem bei Yopis (young, old, pregnant, immunodeficient) vor. Patienten klagen über Kopfschmerzen, Fieber, Kältegefühl, Unwohlsein und Muskelschmerzen mit oder ohne respiratorische Beschwerden. Zu den respiratorischen

Symptomen gehört unproduktiver Husten und Schweratmigkeit. Zuweilen treten auch gastrointestinale Probleme auf, wie Diarrhö, Bauchschmerzen und Übelkeit. Bei schwangeren Frauen kann es zu Frühgeburten und dem Absterben des Fötus kommen. Die Übertragung findet direkt über den Kontakt mit kontaminierten Ausflüssen oder über die Luft statt (SCAHAW 2002; Beeckman and Vanrompay 2009).

Da *C. psittaci* ein so breites Wirtsspektrum hat, hat es ein sehr hohes zoonotisches Potential. Erkrankungen bei Menschen sind meistens mit einem engen Kontakt zu Vögeln assoziiert. Geflügelhalter, Vogelzüchter und Tierärzte sind die am Meisten gefährdetsten Personen. Es gibt aber auch Berichte über Infektionen von Menschen, die Vögel im Garten fütterten oder im Garten Arbeit verrichteten. Des Weiteren stellen auch Stadttauben ein gewisses Risiko dar. Die bisher aus Menschen isolierten Stämme gehörten vornehmlich zu den Genotypen A (hier verwendet), B und E/B (Sachse, Laroucau et al. 2009). Übertragungen von Mensch zu Mensch kommen eher selten vor, sind aber möglich. Im Jahr 2012 kam es in Schottland zur Übertragung von *C. psittaci* von einem Ausgangspatienten auf fünf weitere Personen (vier Familienmitglieder, ein medizinisches Personal). Anfang 2013 wurde von einem weiteren Fall von Mensch zu Mensch Übertragungen in Schweden berichtet. Hier kam es zu zehn Übertragungen (zwei Familienmitglieder, acht medizinisches Personal). Aufgrund epidemiologischer und diagnostischer Schwierigkeiten sind diese Fälle aber nicht 100%ig gesichert (Wallensten, Fredlund et al. 2014).

### 1.1.7 *C. muridarum* Stamm DC39 (Nigg)

*C. muridarum* wurde in den 1930er und 40er Jahren bei Experimenten zum Influenza-Virus erstmals isoliert. Einige der eingesetzten Labormäuse waren mit dem unbekanntem Erreger durchseucht und führten zu einer deutlichen Mortalitätssteigerung, in mehreren Influenza-Studien (James G. Fox 2006). 1938 und 1942 wurden detaillierte Beschreibungen des neu entdeckten Erregers veröffentlicht (Gordon, Freeman et al. 1938; Nigg 1942). Das Isolat von Gordon (Gordon, Freeman et al. 1938) wurde erst als das Chicago-Isolat bezeichnet, da es an der Universität von Chicago beschrieben wurde. Emilio Weiss, ein Student dieser Universität, veröffentlichte eine detaillierte Beschreibung des Isolates und Vergleiche zu anderen Chlamydienspezies (Weiss 1949). Als das Isolat dann für weitere Forschungen an andere Laboratorien weitergegeben wurde, wurde es als das Weiss-Isolat bekannt. Das in dieser Doktorarbeit verwendete Isolat von Clara Nigg (Nigg 1942) wurde in der „American Type Culture Collection“ hinterlegt, im Jahr 2000 sequenziert (Read, Brunham et al. 2000) und wird als das Nigg-Isolat bezeichnet. Heute werden beide Isolate abwechselnd eingesetzt und wurden lange als identisch angesehen. 2009 wurde von Ramsey et al. eine Vergleichsstudie mit den beiden Isolaten durchgeführt. Er fand einige Unterschiede in ihrem Virulenzverhalten. So schien das Weiss-Isolat etwas virulenter in Sachen Wachstum und Krankheitsverlauf (Ramsey, Sagar et al. 2009).

*C. muridarum* wird als Spezies mit zwei Stämmen beschrieben:

MoPn Mauspneumonitisstamm (Nigg, Weiss)(Plasmid: pMoPn)  
SFPD isoliert aus Hamster mit Ileitis (Stills, Fox et al. 1991).

Die „plasticity zone“ (PZ: sehr variable Genregion) des *C. muridarum*-Genoms enthält drei „open reading frames“ (ORF), die für Proteine kodieren, die denen der „large cytotoxins A

and B“ (LCTs) von *Clostridium difficile* sehr ähnlich sind. Es wird vermutet, dass diese Toxine die Funktion von GTP-bindenden Proteinen hemmt, wodurch die frühe Kooperation mit Wirtsendosomen gestört wird. Deswegen bleibt die Infektion auf die apikale Seite von Epithelzellen beschränkt und der Erreger wird nicht von Monozyten aufgenommen, die *C. muridarum* im Organismus verbreiten können. Dies unterstützt wiederum die Ausbildung einer persistenten Infektion in Zusammenhang mit einer chronischen, unterschweligen, entzündlichen Immunantwort (Read, Brunham et al. 2000). Des Weiteren ähnelt das Lymphostatin-Adhärenzfaktorgen von EHEC diesen chlamydialen Zytotoxinen (Read, Brunham et al. 2000; Voigt, Schofl et al. 2012). Um eine chronische, unterschwellige, entzündliche Immunantwort aufrecht zu erhalten, muss der Erreger dem Immunsystem des Wirtes teilweise entgegenwirken. Es wird angenommen, dass dafür ein immunsuppressiver Faktor gebraucht wird, der zum Beispiel die Aktivierung von Lymphozyten hemmt. Für das Lymphostatin-Protein von *E.coli* ist dies beschrieben (Belland, Scidmore et al. 2001).

*C. muridarum* (Nigg) besitzt mindestens drei Gene, die es von *C. trachomatis* unterscheiden. Dazu gehören ein Gen, das für eine DNA-Helicase kodiert und zwei weitere, die für eine Phosphoribosyl-Transferase (*upp*) kodieren (Read, Brunham et al. 2000).

*C. muridarum* wurde bisher nur aus Mitgliedern der Familie *Muridae*, zu der Mäuse und Hamster gehören, isoliert und das zum letzten Mal in den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts (Stills, Fox et al. 1991).

Labormäuse, die mit *C. muridarum* infiziert waren, zeigten keine klinischen Symptome. Symptome wurden erst während einer Sekundärinfektion mit einem anderen Erreger oder durch mehrmaliges Passagieren und die dadurch bewirkte Vermehrung des Erregers deutlich. Die natürliche Infektion der Mäuse verläuft daher subklinisch und kommt nur bei geschwächten Tieren zum Vorschein. Im Labor konnte eine Infektion mit  $10^4$  IFU („inclusion forming units“) *C. muridarum* pro Maus induziert werden, von der die Mäuse wieder genesen. Nach einer Genesung waren die Mäuse gegen eine weitere Infektion immun. Höhere Infektionsdosen führten meistens zu einem letalen Ausgang der Infektion. Klinische Symptome nach einer solchen Infektion beinhalten Gewichtsverlust, Lethargie, Atemnot, Tod. Pathologisch findet man eine deutliche Pneumonitis mit diversen mononukleären Infiltraten (James G. Fox 2006).

Mäuse werden auch als Model für Infektionen des Genitaltraktes genutzt. Da *C. muridarum* eine maustypische Chlamydienspezies ist, wird dieser Erreger anstatt von dem humanen *C. trachomatis*-Stamm angewandt. Nach einer Infektion mit  $10^2$  IFU *C. muridarum* pro Maus direkt in die Vagina konnten die Mäuse erfolgreich infiziert werden. Dies gelingt nicht während des Östrus, da in dieser Zeit die vermehrte Schleimbildung und die abgeschilferten Zellen eine natürliche Blockade bilden. Zu den Symptomen einer genitalen Infektion gehören Hydrosalpinx und daraus resultierende Infertilität (James G. Fox 2006).

Die Übertragung des Erregers erfolgt wahrscheinlich über die fäkal-orale Route. Wenn man infizierte Tiere und nicht infizierte Tiere zusammen hält, kommt es selten zu einer Übertragung. Bei Versuchen konnten aber Übertragungen durch die Aufnahme von infizierten Kadavern und Trinkwasser nachgewiesen werden. Bei der oralen Aufnahme gelangen die Erreger vermutlich durch Aspiration auch in das respiratorische System (Karr 1943). Bei weiteren Untersuchungen wurde der Erreger ebenfalls aus mesenterialen

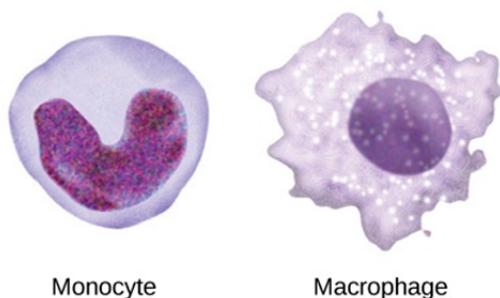
Lymphknoten isoliert, die den Darm versorgen. Mäuse sind dafür bekannt, dass sie koprophagisch sind. Es wird angenommen, dass sie schon als Jungtiere die Fäzes infizierter Mäuse aufnehmen, sie dann in den Respirationstrakt gelangen und dort eine subklinische Infektion ausbilden, da die Erregerlast auf diese Weise sehr gering ist. Daher wird der Darm als primäres Infektionsgewebe für *C. muridarum* spekuliert. Dazu passt auch, dass der einzig weitere Stamm von *C. muridarum* während einer Ileitis aus dem Darm eines Hamsters isoliert wurde (James G. Fox 2006).

Hamster bilden nach Infektion eine „transmissible proliferative ileitis“ (TPI) aus (Stills, Fox et al. 1991; Stills 1991; Fox, Stills et al. 1993).

*C. muridarum* wurde bisher nur aus Mäusen und Hamstern isoliert. Es gibt keine Berichte über eine Infektion von Menschen. Das zoonotische Potential ist sehr gering bis nicht vorhanden.

## 1.2 Makrophagen

Monozyten sind die Vorläuferzellen der Makrophagen. Sie stellen sich als 12-15 µm große Zellen dar, die einen exzentrischen bis zentrischen meist nierenförmigen Zellkern besitzen, der bis zu 50% des Zytoplasmas ausfüllen kann. Sie besitzen eine kräuselige Oberfläche, ohne prominente Pseudopodien und kleine sowie große Granuli und Vakuolen (Auger 1992). Makrophagen hingegen sind große, unregelmäßig geformte Zellen mit einem Durchmesser von 25-50 µm (Auger 1992). Ihr runder bzw. ovaler Zellkern liegt exzentrisch und bis zu 2 Nucleoli treten auf. Mitochondrien und Golgi-Apparat finden sich vor allem im Zentrum der Zellen (Auger 1992). Nach Sutton et al enthalten Makrophagen mehr Zytoplasma als Monozyten, Lysosomen vervielfältigen und vergrößern sich und es entwickeln sich Pseudopodien, die sehr breit sind und reichlich Vesikel enthalten (Sutton and Weiss 1966).



**Abbildung 2 Schematische Darstellung eines Monozyten und eines Makrophagen**  
Der Vergleich von Monozyt und Makrophage zeigt, dass Makrophagen einen unregelmäßigeren Rand mit Pseudopodien besitzen, mehr Vakuolen im Zytoplasma enthalten und einen eher runden Zellkern besitzen.

[http://courses.lumenlearning.net/biology/wp-content/uploads/sites/5/2014/02/Figure\\_17\\_02\\_04.jpg](http://courses.lumenlearning.net/biology/wp-content/uploads/sites/5/2014/02/Figure_17_02_04.jpg)

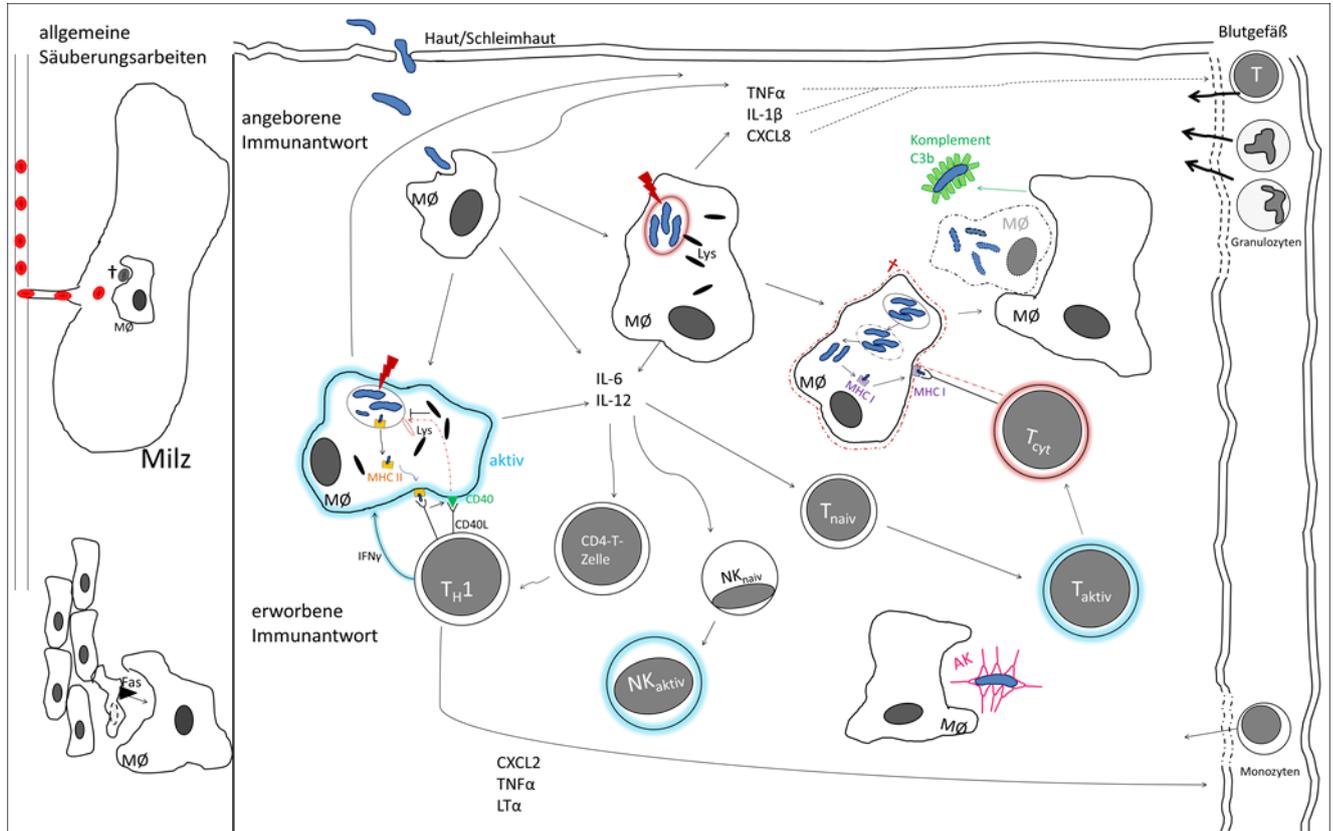
### 1.2.1. Stellung im Immunsystem

Alle Zellen des Immunsystems werden im Knochenmark gebildet. Aus einer pluripotenten Vorläuferzelle entwickeln sich drei Linien zur Weiterdifferenzierung, indem sich eine gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle, eine gemeinsame myeloide Vorläuferzelle und die Megakaryozyten-/Erythrozyten- Vorläuferzelle bildet. Aus der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle entwickeln sich die B-, T-, NK- (natürliche Killer-) und dendritischen Zellen, die dann in die lymphatischen Gewebe einwandern und dort geprägt werden. Die dendritische Zelle wandert ins Blut ein und kann bei Infektionen ins Gewebe eindringen. Bei Kontakt mit eingedrungenen Erregern werden sie aktiviert. Sie wandern in lymphatische

Gewebe ein, um aufgenommenes Antigen zu präsentieren. Die Makrophagen hingegen stammen aus der myeloiden Linie. Sie entwickeln sich aus der gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle über eine Granulozyten-/ Makrophagen- Vorläuferzelle, die ins Blut gelangt und sich dann je nachdem zu basophilen, eosinophilen oder neutrophilen Granulozyten, zu Monozyten oder einem Mastzellvorläufer weiterentwickeln. Für diese Aufteilung sind die Faktoren GM-CSF (*granulocyte-macrophage stimulating factor*) und M-CSF (*macrophage stimulating factor*) verantwortlich. Aus den Monozyten differenzieren sich die Makrophagen, wenn sie die Blutbahn verlassen und ins Gewebe einwandern (Kenneth M. Murphy 2009, S.7-9). Makrophagen werden kontinuierlich aus den Monozyten gebildet und kommen in großer Anzahl im Bindegewebe, in der Submucosa des Verdauungstraktes, in der Lunge (Interstitium, Alveolen), entlang bestimmter Blutgefäße in der Leber und in der Milz vor. Sie haben im Gewebe oft spezielle Namen, wie kupffersche Sternzellen in der Leber, Chondroklasten im Knorpelgewebe oder Histozyten im Bindegewebe.

Makrophagen bilden eine wichtige erste Abwehrlinie der angeborenen Immunität, nachdem ein Fremdorganismus die ersten Barrieren des Körpers, wie Säureschicht und Epithel überwunden hat. Makrophagen haben dann wichtige Funktionen in der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Sie sind ein bedeutender Bestandteil der zellulären Immunität. Makrophagen sind phagozytotisch aktiv, können Signalstoffe abgeben und Antigene präsentieren. Durch ihre vornehmlich phagozytotische Aktivität werden sie auch als „Fresszellen“ bezeichnet. Sie nehmen eingedrungene Mikroorganismen, tote oder apoptotische Zellen, gealterte Zellen, Zelltrümmer und opsonierte Erreger auf. In ihrem Inneren stehen dann Mechanismen zur Verfügung, um die aufgenommenen Partikel abzubauen. Sie spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Infektionserregern, sondern auch bei der Beseitigung von alten, nicht mehr funktionsfähigen oder fehlgeleiteten Zellen (Abbildung 3). Die eingedrungenen Mikroorganismen werden durch Rezeptoren (siehe 1.2.3 Polarisation) erkannt, die an allgemeine Antigene der Eindringlinge binden (Kenneth M. Murphy 2009, S.19). Durch die Aktivierung der Rezeptoren wird die Zelle dazu veranlasst die Mikroorganismen aufzunehmen. Zusätzlich kommt es dadurch zu einer Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, die zur Ausbildung einer Entzündung führen. Dabei werden Zellen und Moleküle des angeborenen Immunsystems aus dem Blut ins Gewebe gelockt (Abbildung 3). Es kommt zu einer direkten Zerstörung der eingedrungenen Erreger. Des Weiteren führt die eingeleitete Entzündungsreaktion zu einem erhöhten Zustrom der Lymphflüssigkeit. Dadurch gelangen Lymphozyten in das Entzündungsgebiet und werden dort aktiviert. Die adaptive Immunantwort mit zytotoxischen T-Zellen (siehe 1.2.2) und Antikörperbildung wird eingeleitet. Während der Entzündungsreaktion wird auch die Komplementkaskade ausgelöst, die durch bestimmte Oberflächenmoleküle auf den Bakterien eingeleitet wird. Dabei werden die Erreger von dem Komplementprotein C3b opsoniert und daraufhin von den Makrophagen beseitigt (Abbildung 3). Die vorherrschenden Zelltypen der ersten Phase der Entzündung sind Makrophagen und neutrophile Granulozyten, weswegen sie auch als Entzündungszellen bezeichnet werden. Die neutrophilen Granulozyten werden durch die von den Makrophagen freigesetzten Signalstoffe angelockt. Kurz darauf wandern weitere Monozyten ins Gewebe ein, um die angeborene Immunantwort zu stärken und aufrecht zu erhalten. Makrophagen nehmen die eingedrungenen Erreger mithilfe der Phagozytose (siehe 1.2.2) auf und zerstören sie bestenfalls (Kenneth M. Murphy 2009, Kapitel 2: Die angeborene Immunität). Einige Erreger können diesem Mechanismus aber entgehen und können nicht sofort zerstört werden. Dann

binden T<sub>H</sub>1-Zellen an ihrer Oberfläche und aktivieren die Makrophagen, sodass sie zu einer verstärkten Abwehrreaktion in der Lage sind. Dazu werden Antigene der Eindringlinge auf der Oberfläche der Makrophagen präsentiert (Abbildung 3, 1.2.2)(Kenneth M. Murphy 2009, S. 465-471)



**Abbildung 3 Übersicht über die Stellung der Makrophagen im Immunsystem und ihre Hauptaufgaben**

Makrophagen (MØ) bilden die erste Verteidigungslinie nach Eindringen von Fremdorganismen in den Körper. Sie phagozytieren den Erreger (blau) und töten ihn nach Bildung eines Phagolysosoms. Schafft der Makrophage es nicht die Bakterien zu töten, kann er durch T<sub>H</sub>1-Zellen aktiviert werden, was seine toxischen Eigenschaften erhöht. Er kann aber auch von zytotoxischen T-Zellen (T<sub>cyt</sub>) angegriffen werden. Dann werden die Erreger wieder freigesetzt und können von einer „frischen“ Makrophage aufgenommen werden. Nach der phagozytotischen Aufnahme der Erreger werden Signalstoffe freigesetzt, die weitere Immunzellen anlocken, aktivieren und die Gefäßendothelwand permeabler machen. Des Weiteren nehmen die Makrophagen opsonierte Erreger auf und bauen sie ab. Opsonierende Eigenschaften hat das Komplementprotein C3b (grün) und die von den B-Zellen gebildeten Antikörper (AK, pink). Makrophagen sind auch für allgemeine Säuberungsarbeiten zuständig. Sie phagozytieren z.B. alte Blutzellen in der Milz oder altersschwache Zellen, die den Fas-Liganden exprimieren (Kenneth M. Murphy 2009). NK: natürliche Killerzelle; Lys: Lysosom; T: T-Zelle

### 1.2.2 Abwehrmechanismen

Der initiale Mechanismus der Makrophagen zur Abtötung eingedrungener Fremdorganismen ist die Phagozytose. Bei der Phagozytose stülpt sich die Membran nach Bindung des Erre-

gers an die Makrophagenoberfläche ein. Dabei wird der Erreger nach und nach von der Makrophagenmembran umhüllt und befindet sich schließlich in einem abgeschlossenen Vesikel innerhalb der Makrophage. Dieses Vesikel wird als Phagosom bezeichnet. Das Phagosom wird dann angesäuert, wodurch viele Eindringlinge schon zerstört werden. Durch eine dicke Zellwand, wie bei Bakterien und Pilzen sind sie aber oft geschützt und der Makrophage muss weitere Anstrengungen unternehmen. Dazu besitzen Makrophagen die Lysosomen. Das sind Vesikel, die Enzyme, Proteine und Peptide enthalten, die die Erreger angreifen. Phagosom und Lysosom verschmelzen miteinander zu einem Phagolysosom, wodurch die Erreger mit dem Inhalt der Lysosomen in Kontakt kommen. Zu dem Inhalt der Lysosomen gehören proteolytische Enzyme, wie Elastase, saure Hydrolasen und Lysozym. Weitere Stoffe sind Defensine, kationische Proteine, Laktoferrin und ein Vitamin-B12-bindendes Protein.

Darüber hinaus verfügen Makrophagen über induzierbare Enzymsysteme zur Abtötung der Bakterien. Dazu gehört die respiratorische Entladung („respiratory burst“). Dabei wandelt eine aktivierte NADPH-Oxidase Sauerstoffmoleküle ( $O_2$ ) in Superoxid ( $O_2^-$ ) um und die Superoxid-Dismutase wandelt dann das Superoxid in Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) um. Peroxidasen und Eisen führen zur Umwandlung des gebildeten  $H_2O_2$  in Hypochloritionen, Hypobromit und Hydroxylradikale.

Ein weiterer Mechanismus ist die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin. Die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) katalysiert dafür folgende Reaktion:



NO reagiert dann als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) mit dem Superoxid der NADPH-Oxidase zu dem hochreaktiven Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) (Squadrito and Pryor 1998). Peroxynitrit reagiert mit stets vorhandenem  $CO_2$  zum kurzlebigen Nitrosoperoxy-carbonat-Ion, das in zwei hochreaktive Radikale zerfällt, die DNA-Schäden verursachen. Des Weiteren ist Peroxynitrit in der Lage, intrazellulär den Glutathionspiegel zu senken und dadurch die Apoptose herbeizuführen (Bauer, Dormann et al. 2000).

Ein dritter Abwehrmechanismus der Makrophagen (und anderer Zelltypen) ist die Tryptophanlimitierung durch Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO). Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von L-Tryptophan zu N-Formyl-L-Kynurenin. Als Substrat wird ebenfalls D-Tryptophan akzeptiert. Auch Superoxid kann unter bestimmten Umständen als Sauerstoffdonor agieren (Werner and Werner-Felmayer 2007). Indolamin-2,3-Dioxygenase wird durch IFN $\gamma$  induziert. Tryptophan ist für einige Bakterien eine essentielle Aminosäure und wichtig für deren Vermehrung. Die Tryptophanlimitierung führt zur Stagnierung der Proteinbiosynthese der Erreger und die Abbauprodukte, die durch IDO entstehen, führen zur Bildung regulatorischer T-Zellen (Chen, Liang et al. 2008).

Intrazelluläre Erreger, wie die hier untersuchten Chlamydien, sind in der Lage in den Phagosomen zu überleben und sich dort sogar zu vermehren. Dazu umgehen sie die eben beschriebenen Abwehrmechanismen indem sie die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom verhindern oder die Ansäuerung des Phagosoms unterbinden. Ein niedriger pH-Wert wird für die Aktivierung der lysosomalen Proteasen benötigt. Kann der Erreger nach der Phagozytose von den Makrophagen nicht getötet werden, kommt es zur

Makrophagenaktivierung durch  $T_H1$ -Zellen. Dafür werden Bakterienpeptide durch MHCII-Moleküle an der Makrophagenoberfläche präsentiert. Trifft nun eine  $T_H1$ -Effektorzelle, die für dieses bakterielle Peptid spezifisch ist, auf einen infizierten Makrophagen, so wird sie angeregt IFN $\gamma$  zu sezernieren und den CD40-Liganden (CD40L) zu exprimieren. Diese beiden neu synthetisierten  $T_H1$ -Proteine aktivieren dann zusammen den Makrophagen. In einem aktivierten Makrophagen verschmelzen Lysosom und Phagosom besser miteinander. Er steigert seine CD40-Expression und die der TNF-Rezeptoren. Sie werden stimuliert verstärkt TNF $\alpha$  freizusetzen (Abbildung 3). Unter Umständen kann der CD40L auf den  $T_H1$ -Zellen in seiner Funktion von TNF $\alpha$  oder LT- $\alpha$  ersetzt werden. TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  bewirken zusammen eine größere antibakterielle Wirkung des Makrophagen. Hierzu wird besonders die Bildung von NO und  $O_2^-$  gefördert. Aufgrund der Bindung an den CD40L der T-Zelle verstärkt der Makrophage außerdem die Expression seiner B7-Proteine (CD80/CD86) und seiner MHCII-Moleküle. Dies führt zur Aktivierung weiterer ruhender CD4-T-Zellen und zu einer erhöhten Antigenpräsentation (Kenneth M. Murphy 2009, S 465-471).

Chronisch infizierte Makrophagen, die nicht von CD4-Zellen aktiviert werden können, stellen eine Infektionsquelle dar. Aktivierte  $T_H1$ -Zellen exprimieren den Fas-Liganden, während Makrophagen den Fas-Rezeptor exprimieren. Wenn die  $T_H1$ -Zelle an Fas bindet, leitet sie die Apoptose des Makrophagen ein (Kenneth M. Murphy 2009, S.469-470). Auch zytotoxische T-Zellen können infizierte Makrophagen erkennen, wenn der Erreger das Phagosom verlassen konnte und dessen Peptide nun über MHC I präsentiert werden (Abbildung 3). Auch sie lösen den programmierten Zelltod aus (Apoptose). Wieder freigesetzte Erreger werden daraufhin von neuen Makrophagen aufgenommen (Kenneth M. Murphy 2009, S. 470).

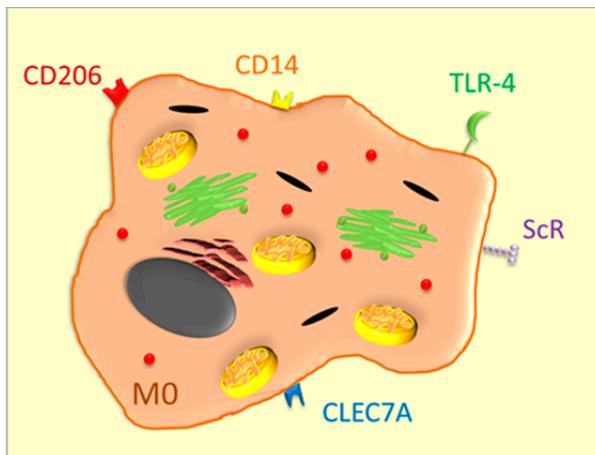
Apoptotische Zellen senden Signale aus, um von Makrophagen aufgenommen zu werden. Die Aufnahme der Apoptosevesikel führt zu einer verringerten Zytokinabgabe durch M1-Makrophagen. Dadurch wird eine inflammatorische in eine anti-inflammatorische Reaktion umgewandelt. Dies ist ein Mechanismus, der dazu beiträgt die Homöostase des Körpers wiederherzustellen (M.A. Vega 2006).

### 1.2.3 Polarisation

In der vorliegenden Doktorarbeit wird Polarisation der Makrophagen als das Aufteilen der Zelltypen in gegensätzliche Typen definiert. Je nachdem durch welches Signal die Makrophagen aktiviert werden, erhalten sie unterschiedliche Funktionen, Zytokin- und Antigen-Expressionsprofile. In Anlehnung an die T-Helfer-Zellnomenklatur kann man zwei bestimmte Makrophagentypen unterscheiden: Klassisch aktivierte Makrophagen (M1) und alternativ aktivierte Makrophagen (M2) (Serotec 2013). M2-Makrophagen werden von verschiedenen Stimuli aktiviert und bilden dadurch weitere Untergruppierungen aus (M2a, b, c, d, M4). Die Ausbildung zweier gegensätzlicher Makrophagentypen ist wichtig für die Wiederherstellung der Homöostase nach erfolgreicher Eliminierung von eingedrungenen Pathogenen. Wenn die Entzündungsreaktion nicht gestoppt werden könnte, würde es zu schwerwiegenden Schäden im Organismus kommen und eine Heilung der zerstörten Gewebe wäre unmöglich (Goerd, Politz et al. 1999).

M0-Makrophagen stehen für erste Abwehrvorgänge bereit. Sie zeichnen sich durch einen geringen Sauerstoffverbrauch, eine geringe Proteinsyntheserate und eine mäßige

Zytokinproduktion aus (Martinez, Helming et al. 2009). Auf ihrer Oberfläche findet man CD14, CD206, CLEC7A, Scavenger-Rezeptoren und Toll-like-Rezeptoren (TLR) (Abbildung 4).



**Abbildung 4 Naive Makrophage mit typischen Rezeptoren**

M1-Makrophagen führen zu einem pro-inflammatorischen Erscheinungsbild. Sie zeigen starke zytotoxische, mikrobizide und anti-proliferative Fähigkeiten, da sie ROS, RNS, NO und pro-inflammatorische Zytokine freisetzen (M.A. Vega 2006). Die Stimulantien, die zur Aktivierung von M1-Makrophagen führen und die exprimierten Oberflächenproteine, Zytokine und Enzyme wurden in Tabelle 1 und Tabelle 2 zusammengestellt.

M2-Makrophagen scheinen in Vorgänge zur Immunsuppression und für die Wundheilung involviert zu sein. Sie helfen bei der Parasitenbeseitigung, unterdrücken die Entzündung, fördern die Gewebeneubildung und haben immunregulatorische Funktionen. Außerdem wurden sie bei chronischen Infektionen, wie rheumatoide Arthritis und Psoriasis, und während asthmatischer Entzündungen gefunden (M.A. Vega 2006). Der M2a-Phänotyp wurde bisher am häufigsten beschrieben. Arginase 1 wird nicht wie bei M1-Makrophagen über iNOS zu NO metabolisiert, sondern für die Herstellung von Polyaminen und Prolin genutzt, die wichtig für die zelluläre Entwicklung und Kollagenproduktion sind (Kahnert, Seiler et al. 2006; M.A. Vega 2006). M2b-Makrophagen sind wichtig für die Aktivierung von  $T_H2$ -Zellen und für die Immunregulation. M2c-Makrophagen helfen vor allem bei der Immunregulation und der Gewebeneubildung (Mantovani, Sica et al. 2004; Serotec 2013). Die M2d-Makrophagen haben Ähnlichkeiten mit tumorassoziierten Makrophagen. (Serotec 2013) Im Jahre 2010 wurde die Entdeckung einer weiteren Makrophagen-Untergruppe (M4) postuliert (Gleissner, Shaked et al. 2010; Hristodorov, Mladenov et al. 2012). Sie zeigen erhöhte Mengen an CD86 und TNF $\alpha$  (M1), CD206, CCL18 und CCL20 (M2) und nur wenig Pentraxin, CD36, IL-10. Sie sind nur bedingt phagozytotisch aktiv (Hristodorov, Mladenov et al. 2012). Die Stimulantien, die zur Aktivierung von M2-Makrophagen führen und die exprimierten Oberflächenproteine, Zytokine und Enzyme wurden in Tabelle 1 und Tabelle 2 zusammengestellt.

Für die Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen *in vitro* können Stimulantien in die Zellkultur gegeben werden. Dabei muss beachtet werden, dass diese Faktoren die Makrophagen in eine bestimmte Polarisationsrichtung treiben. M-CSF (macrophage colony stimulating factor) und GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulationg factor) wurden von verschiedenen Autoren für diese Zwecke angewandt. Eine Vorbehandlung mit GM-CSF

zur Unterstützung der Differenzierung der Makrophagen störte eine spätere Stimulation für die M1/M2-Polarisation nicht. Der Effekt M1-Makrophagen auszubilden wurde eher noch verstärkt (Rey-Giraud, Hafner et al. 2012). Der Wachstumsfaktor M-CSF scheint Monozyten zur Ausbildung des M2-Phänotyps anzuregen. Makrophagen, die mithilfe von M-CSF kultiviert wurden, können durch Stimulation mit IFN $\gamma$  und/oder LPS zu M1-Makrophagen polarisiert werden, wobei eine Basismenge von CD206 erhalten bleibt ((Jaguin, Houlbert et al. 2013), Tabelle 1). In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Anwendung dieser Stimulantien verzichtet, um möglichst naive Makrophagen für die folgenden Infektionsversuche zu erhalten.



**Tabelle 2 Typische Zytokine, Chemokine, Enzyme und Radikale, die nach Stimulation von M1- und M2-Makrophagen sezerniert werden**

Die Tabelle gibt einen Überblick über die derzeit verwendeten und publizierten Marker der M1/M2-Einteilung. Hochgestellte Zahlen verweisen auf die Veröffentlichungen auf deren Basis die Tabelle erstellt wurde: 1: Serotec (2013), 2: M.A. Vega (2006), 3: Fehlings, Drobbe et al. (2012), 4: Ambarus, Krausz et al. (2012), 5: Hristodorov, Mladenov et al. (2012), 6: Mantovani, Sica et al. (2004), 7: Martinez, Gordon et al. (2006), 8: Kahnert, Seiler et al. (2006), 9: Porcheray, Viaud et al. (2005), 10: Stein, Keshav et al. (1992), 11: Goerdts, Politz et al. (1999), 12: Rey-Giraud, Hafner et al. (2012), 13: Jaguin, Houlbert et al. (2013), 14: Spiller, Anfang et al. (2014), 15: Gundra, Girgis et al. (2014)

Faktor für die Ausdifferenzierung der Makrophagen	M1		M2					
					M2a	M2b	M2c	M2d
	GM-CSF	IFN $\gamma$ /LPS	M-CSF	IL-4	IL-4/IL-13	LPS/IK	IL-10	IL-6/LIF/MCF
(-)		IL-1 $\beta$ <sup>1,6</sup> IL-6 <sup>1,2,5,6</sup> IL-10 $\uparrow$ <sup>(24h)8</sup> IL-10 $\downarrow$ <sup>6</sup> IL-12 $\uparrow$ <sup>1,2,5,6</sup> IL-18 $\uparrow$ <sup>(24h)8</sup> IL-23 <sup>1,2,6</sup> TNF $\alpha$ <sup>1,2,5,6,8</sup> iNOS <sup>1,2</sup> NO $\uparrow$ <sup>6</sup> ROS $\uparrow$ <sup>6</sup>		Arg1 $\uparrow$ <sup>8</sup>	IL-10 <sup>1,2,6</sup> Arg <sup>6</sup>	IL-1 <sup>1,6</sup> IL-6 $\uparrow$ <sup>1,2,6</sup> IL-12 $\downarrow$ <sup>6</sup> IL-10 $\uparrow$ <sup>1,2,6</sup> TNF $\alpha$ <sup>1,2,6</sup>	IL-10 <sup>1,2,6</sup> TGF $\beta$ <sup>6</sup> Arg <sup>6</sup>	IL-10 <sup>1</sup> IL-12 <sup>1</sup> TNF $\alpha$ <sup>1</sup>
M-CSF		IL-1 $\beta$ $\uparrow$ <sup>1,13,14</sup> IL-6 <sup>7</sup> IL-10 $\uparrow$ <sup>13</sup> IL-12 <sup>7,13</sup> IL-15 <sup>7</sup> IDO $\uparrow$ <sup>13</sup> TNF $\alpha$ $\uparrow$ <sup>14</sup> CCR7 $\uparrow$ <sup>14</sup>	IL-10 $\downarrow$ <sup>13</sup>	fibronectin $\uparrow$ <sup>7</sup>	CCL12 $\uparrow$ <sup>14</sup> CCL18 $\uparrow$ <sup>14</sup>		TNF $\alpha$ $\uparrow$ <sup>14</sup>	
GM-CSF	IL-1 $\beta$ $\uparrow$ <sup>12</sup> IL-6 $\uparrow$ <sup>12</sup> IL-12 $\uparrow$ <sup>12</sup> TNF $\alpha$ $\uparrow$ <sup>12</sup>	IL-1 $\beta$ $\uparrow$ <sup>13</sup> IL-10 $\downarrow$ <sup>13</sup> IL-12 $\uparrow$ <sup>13</sup> IDO $\uparrow$ <sup>13</sup> TNF $\alpha$ $\uparrow$ <sup>13</sup>	IL-10 $\uparrow$ <sup>12</sup>				IL-10 $\uparrow$ <sup>12</sup>	

### 1.2.4 Makrophagen und Chlamydien

Aufgrund ihrer zentralen und bedeutenden Stellung bei der Immunabwehr sind Makrophagen ein wertvolles Werkzeug zur Erforschung verschiedenster Krankheiten. Es werden monozyten-gereifte, knochenmark-gereifte, peritoneale und alveoläre Makrophagen eingesetzt. Die vornehmlich in der Makrophagenforschung eingesetzten Tierarten sind Mäuse, Rinder, Hühner und Schweine. Auch menschliche Makrophagen werden gewonnen und untersucht. Für die Grundlagenforschung bieten sich verschiedene Makrophagenzelllinien (THP-1, U-937) an. Die primären gereiften Zellen, wie sie in dieser Doktorarbeit verwendet wurden, bieten gegenüber den Zelllinien viele Vorteile. In ihnen sind die ursprünglichen vitalen Eigenschaften und Funktionen vorhanden und sie wurden nicht durch Passagieren oder Stimulationen aktiviert und verändert. Ergebnisse aus Untersuchungen mit primären gereiften Makrophagen können aus diesen Gründen besser auf „in vivo“-Versuche adaptiert werden, als Ergebnisse aus Studien mit immortalisierten Zelllinien.

Da Chlamydien mit vielen verschiedenen Krankheiten, wie zum Beispiel Alzheimer oder Arthritis assoziiert werden, stellt sich die Frage, wie Chlamydien von ihren Eintrittspforten (Respirations- und Genitaltrakt) in andere Gebiete des Körpers (Gehirn, Gelenke) gelangen. Blutmonozyten könnten als Transportgefäße dienen. Außerdem stellen Makrophagen die erste Abwehrlinie des Immunsystems dar und spielen dadurch eine bedeutende Rolle bei der Bekämpfung von Krankheitserregern. Daher wurden viele Studien mit Chlamydien und Monozyten/Makrophagen durchgeführt (Beagley, Huston et al. 2009). Dennoch bleiben weiterhin viele Fragen offen. Die meisten Untersuchungen beschränkten sich auf die Nutzung einer Chlamydienspezies in einem speziellen Wirt. Studien, die den Vergleich zwischen 3 verschiedenen Chlamydienspezies in verschiedenen Wirten anstellen sind rar.

### 1.3 Wirtsadaptation

#### 1.3.1 Begriffsbestimmung

Die Anpassung eines Pathogens an zelluläre und immunologische Prozesse des Wirts wird als **Wirtsadaptation** bezeichnet ([Wikipedia](#)).

Intrazelluläre Bakterien müssen gut an ihren Wirt adaptiert sein, da sie sonst nicht überleben könnten. Deshalb ist für einen intrazellulären Lebensstil eine Wirtsadaptation von zentraler Bedeutung. Wenn eine vollständige Adaptation erreicht wurde, überleben Wirt und eindringender Organismus und profitieren voneinander. Ein bekanntes Beispiel für so eine vollständige Adaptation sind die Mitochondrien, die vor Millionen Jahren von anderen Prokaryoten aufgenommen wurden und mit ihnen zur eukaryoten Zelle verschmolzen. Die Mitochondrien haben sich dabei so sehr spezialisiert und angepasst, dass sie zu einem wichtigen Zellorganell geworden sind (Endosymbiontentheorie, (Zimorski, Ku et al. 2014).

Die vollständige Adaptation entwickelt sich über mehrere Stufen: von extrazellulären Bakterien über obligat intrazelluläre Bakterien zu Organellen der Wirtszelle (z.B. Mitochondrien). Das frühe Stadium eines intrazellulären Lebensstils ist durch fakultativ intrazelluläre Bakterien (*Legionella spp*, *Francisella spp*, *Bartonella spp.*) gekennzeichnet. Sie haben sich durch schwerwiegende Veränderungen von Genen, die für

Oberflächenmoleküle kodieren entwickelt. Verantwortlich für diese Veränderungen waren horizontaler Gentransfer, wodurch neue Gene aufgenommen werden konnten, und eine schnelle Modifizierung dieser Gene durch Duplikation und Rekombination. Obligat intrazelluläre Bakterien (*Rickettsia spp.*, *Chlamydia spp.*, *Coxiella spp.*) stehen für ein erweitertes Stadium des intrazellulären Lebensstils. Sie haben die Fähigkeit verloren sich extrazellulär zu vermehren und sind oft auf ein beschränktes Wirtsspektrum spezialisiert. Dieses Stadium wird durch umfangreiche Genausschaltungen („pseudogenization“) und Genverlust gekennzeichnet. Es gibt einen wichtigen Zusammenhang zwischen der Genomgröße und den verschiedenen Stadien der Wirtsadaptation. Je größer der Grad der Abhängigkeit, desto kleiner das Genom (Toft and Andersson 2010). Der Vergleich der Genome, der in dieser Arbeit verwendeten Chlamydienspezies mit dem extrazellulären Erreger *Escherichia coli* (*E.coli*) zeigt, dass Chlamydien mit ihrem relativ kleinen Genom nach Toft und Andersson von ihrem Wirt vermehrt abhängig sind. Die Unterschiede zwischen den Chlamydienspezies sind sehr gering. Berücksichtigt man diese geringen Unterschiede, kann folgende Aussage getroffen werden:

*C. muridarum* ist am Besten an das intrazelluläre Leben angepasst, wobei *C. psittaci* und *C. pneumoniae* in der Reihenfolge weniger gut angepasst sind (Tabelle 3).

**Tabelle 3 Genomgrößen der verwendeten Chlamydienspezies und –stämme**  
Referenzstamm *E.coli* (O157:H7)

Spezies	Stamm	Genomgröße	GenBank-Nr.
<i>Escherichia coli</i>	O157:H7	5498,45 kb	BA000007.2
<i>C. pneumoniae</i>	TW-183	1225,9 kb	AE009440
<i>C. psittaci</i>	6BC Genotyp A	1172 kb	CP002586.1
<i>C. muridarum</i>	Nigg	1072,95 kb	AE002160

### 1.3.2 Wirtsadaptation von Chlamydien

Der Genus *Chlamydia* weist ein breites Wirtsspektrum auf. Dabei sind einige Vertreter auf einen bestimmten Wirt beschränkt und andere findet man in mehreren Wirtsspezies. Die Frage, wodurch dieser Wirtsspielraum zustande kommt, ist noch nicht ausreichend geklärt. Die Genome der einzelnen Chlamydienspezies geben Anhaltspunkte, in welchen Eigenschaften sie sich unterscheiden. Rekombinationen innerhalb der *Chlamydiaceae* führen zu Unterschieden zwischen den Spezies, die auch für ihre Wirtsadaptation wichtig sein könnten. Einige dieser Genunterschiede zwischen den in dieser Doktorarbeit eingesetzten Chlamydienspezies sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Das *guaAB-add*-Cluster findet sich in dem Genom von *C. pneumoniae*, *C. muridarum*, *C. felis*, *C. psittaci*, aber nachweislich nicht im Genom von *C. trachomatis* und *C. abortus* (Read, Joseph et al. 2013).

Der *C. psittaci* Stamm GPIC (jetzt *C. caviae* GPIC) enthält in seinem Genom die meisten Gene, die wichtig für eine Tryptophansynthese sind. Nur dieser Stamm enthält *kynU*, *prsA*, *trpD* und *trpC*. Ein Tryptophanmangel führt bei *C. caviae* GPIC zu einer Hochregulation des *trp*-Operons und die daraus resultierenden Proteine sind funktionstüchtig. Daher ist dieser Stamm gegen die Tryptophanlimitierung, die durch IFN $\gamma$ -induziertes IDO ausgelöst wird, resistent, denn aus den Abbauprodukten der IDO kann neues Tryptophan hergestellt werden (Tryptophan-Recycling) (Wood, Roshick et al. 2004). Die Genome von *C. pneumoniae* und *C. muridarum* weisen dieses *trp*-Operon nicht auf, *C. psittaci* nur in Teilen. Es ist möglich, dass diese Deletionen durch konvergente Evolution mit den Wirtszellen entstanden sind, um eine chronische Chlamydieninfektion herzustellen (Shaw, Christiansen et al. 2000).

Die Genregion VS4 ist wichtig für die chlamydiale Anhaftung an die Wirtszelle. In dieser Region gibt es eine hohe Rate an Rekombinationen. Dies zusammen spricht dafür, dass genetische Vielfalt in dieser Region für serovar-spezifische Unterschiede im Falle des Gewebetropismus sorgt (Millman, Tavaré et al. 2001). Serovar-spezifische Unterschiede gibt es auch bei dem Spektrum der möglichen Proteine für das Typ-III-Sekretionssystem, zum Beispiel zwischen *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*. *C. pneumoniae* fehlt das Phosphorylationsende des Aktin-Rekrutierungsproteins (Tyrosin-phosphorylierendes Protein). Diese Phosphorylation wird für die endozytotische Aufnahme von *C. trachomatis* als essentiell eingestuft. Das deutet darauf hin, dass es T3S-abhängige Unterschiede zwischen den chlamydialen Spezies gibt (Kern, Maass et al. 2009).

**Tabelle 4 Vergleich einiger Virulenzgene von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. muridarum***

Unterschiede in der Exprimierung bestimmter Virulenzgene können für die unterschiedliche Wirtsspezifität der Chlamydienspezies verantwortlich sein.

Hochgestellte Zahlen geben die Quellen an, aus der die Informationen stammen. 1: (Mitchell, Hovis et al. 2010), 2: (Roulis, Polkinghorne et al. 2013); 3: (Voigt, Schoffl et al. 2012); 4: (Read, Brunham et al. 2000)

Virulenzgene	<i>C. pneumoniae</i>	<i>C. psittaci</i>	<i>C. muridarum</i>	Bemerkungen
<i>Udk</i>	+ <sup>1</sup>	-	-	→ Uridinkinase: phosphoryliert Uridin/Cytidin zu Uridin/Cytiditinmonophosphat
Gene für Biotinsynthese	BiovarKoala <sup>2</sup>	+ <sup>3</sup>	unvollständig	wichtig bei Nährstoffarmut, ausgelöst durch Wirt
<i>trpABFCDR</i>	-	Unvollständig: kynU, prsA fehlen <sup>3</sup>	- <sup>4</sup>	Tryptophansynthese; <i>C. trachomatis</i> , <i>C. pecorum</i> , <i>C. caviae</i>
<i>Cpn1046</i> (phhA)	+ <sup>2</sup>	-	-	→ Aminosäurehydroxylase, kann Tryptophanmangel ausgleichen
<i>Incs</i>	92 35 spezifische	?	54 5 spezifische	→ Proteine der Einschlussmembran, deuten Gewebetropismus an
<i>IncA</i> , <i>IncB</i>	+ <sup>3</sup>	+ <sup>3</sup>	?	wichtig für Typ-III-Sekretionsmechanismus
<i>guaAB-add</i> Gencluster	+ <sup>3</sup>	+ <sup>3</sup>	+ <sup>3</sup>	→ Enzyme, die Purine umwandeln
<i>CDS</i> („coding sequences“) für Pmp	21 <sup>3</sup>	21 <sup>3</sup>	9 <sup>3</sup>	→ polymorphe Membranproteine; sehr variabel, Adhäsion der Elementarkörperchen an die Wirtszelle, molekularer Transport, zellwandabhängige Funktionen
<i>MAC/Perforin</i>	-	+ <sup>3</sup>	-	→ Membranperforationsproteine, strukturelles Mimikry

Eine wichtige Rolle bei der Wirtsadaptation wird den IRG-Proteinen der Wirte zugesprochen. Das ist eine Familie von IFN $\gamma$ -regulierten Proteinen, die eine wichtige Rolle bei der Resistenz gegen intrazelluläre Bakterien und Protozoen spielen (p47GTPases). Es wurden unterschiedliche Empfänglichkeiten zwischen Mensch und Maus entdeckt. In menschlichen Zellen wurden bisher nur zwei IRGs gefunden, wohingegen bei der Maus von 23 IRGs gesprochen wird. Die IRGs der Maus kommen in fast allen Geweben vor und in Leukozyten, wie Makrophagen, Neutrophilen und T- und B-Lymphozyten. Die beiden IRGs des Menschen werden unabhängig von IFN $\gamma$  exprimiert. Humanes IRGC ist dem *Irgc* von Mäusen sehr ähnlich, welches ebenfalls nicht von IFN $\gamma$  induziert wird und bei beiden Spezies in den Hoden vorkommt. Humanes IRGM wurde in menschlichen Makrophagenzelllinien gefunden. Die IRGs des Menschen scheinen einen Einfluss auf die Autophagie von infizierten Vakuolen zu haben (Coers, Starnbach et al. 2009). Die IRGs behindern bei Mäusen das Wachstum der intrazellulären Pathogene, indem sie die Bildung von pathogenenthaltenden Vakuolen regulieren. Sie greifen dabei in mindestens vier wichtige Prozesse ein: 1. in die Bildung von Vesikeln, 2. in die Fusion der Vesikel mit Lysosomen, 3. in die Autophagie der infizierten Vakuolen und 4. in den Lipidtransport zu den Vakuolen (Taylor, Feng et al. 2007). Es scheint also, dass das humane IRG-System die meisten Funktionen, die es bei Mäusen aufweist, verloren hat. Die IFN $\gamma$ -induzierte Resistenz gegen *C. trachomatis* benötigt IDO-abhängige Tryptophanzerlegung in humanen Zellen, aber IRG-Antworten in Mauszellen. Der an die Maus adaptierte Stamm *C. muridarum*, aber nicht sein naher Verwandter *C. trachomatis*, kann spezifisch der IRG-abhängigen Wirtsabwehr entkommen, indem es den Zugang für IRG-Proteine zu der Chlamydienvakuole blockiert. Humane *C. trachomatis* Stämme (genital: D-K), aber nicht *C. muridarum*, können Tryptophansynthase synthetisieren, welches exogenes Indol für die Synthese von Tryptophan nutzen kann. Damit können die Stämme D-K von *C. trachomatis* die IDO-abhängige Tryptophanlimitierung umgehen. Daran erkennt man, dass hauptsächlich an den Menschen angepasste Pathogene für antimikrobielle Wege, die in Mäusen, aber nicht in Menschen vorhanden sind, angreifbar sind und *vice versa* (Caldwell, Wood et al. 2003; Coers, Starnbach et al. 2009).

Auch die Zytokine und Enzyme, die während der Reaktion des Wirtes bei einer Chlamydieninfektion sezerniert werden, sind entscheidend für das Überleben oder Sterben der Chlamydien. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) spielt bei der Bekämpfung von Chlamydien im humanen Organismus eine untergeordnete Rolle (IDO-basiert). Mäuse hingegen scheinen unter anderem iNOS als anti-Chlamydia-Effektoren entwickelt zu haben (Miyairi, Tatireddigari et al. 2007). Bei Versuchen mit iNOS-Knockout-Mäusen konnte kein Effekt auf eine Infektion mit *C. pneumoniae* nachgewiesen werden, *C. muridarum* hingegen konnte eine deutlich stärkere Infektion etablieren (Rottenberg, Gigliotti-Rothfuchs et al. 2002). Mäuse und Menschen scheinen ihre Immunressourcen gegen vakuoläre Pathogene völlig unterschiedlich einzusetzen (Miyairi, Tatireddigari et al. 2007).

## 2. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Chlamydien spielen eine bedeutende Rolle im Bereich der zoonotischen Erkrankungen. Bis zu 80% der Deutschen sind schon mal mit dem humanen Stamm von *C. pneumoniae* in Kontakt getreten und tragen Antikörper gegen diesen Erreger. Auch 47% der hier verwendeten Spenderproben enthielten in ihrem Plasma Antikörper gegen *C. pneumoniae*. *C. psittaci* tritt hauptsächlich bei Vögeln auf und führt beim Wirtschaftsgeflügel immer wieder zu Leistungseinbußen. Tierhalter oder Tierärzte, die mit Geflügel arbeiten, leiden oft unter chronischen Atemwegserkrankungen und verminderter Leistungsfähigkeit. Auch andere Säugetiere können sich mit *C. psittaci* infizieren und chronische Atemwegserkrankungen entwickeln. *C. muridarum* wurde bisher nur aus Mäusen und Hamstern isoliert und führte dort im Zusammenspiel mit anderen Infektionen zu schweren Krankheitsverläufen. *C. pneumoniae* und *C. muridarum* zeigen also ein eher enges Wirtsspektrum, wohingegen *C. psittaci* ein sehr breites Wirtsspektrum zeigt. Mechanismen, die für solche Unterschiede in der Wirtsspezifität verantwortlich sein können, wurden im vorhergehenden Kapitel eingehend besprochen. Dennoch sind die Gründe für eine Wirtsadaptation von Chlamydien in der Forschung nicht abschließend geklärt und es besteht weiterhin intensiver Forschungsbedarf.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen nun folgende Fragen in einem synchronisierten System geklärt werden:

Wie unterscheidet sich das Wachstum und die Überlebensfähigkeit von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. muridarum* in humanen und bovinen Makrophagen?

Wie reagieren die humanen und bovinen Makrophagen auf eine Konfrontation mit den verschiedenen Chlamydienpezies?

Wie lange überleben sie?

Welche Abwehrmechanismen werden in Gang gesetzt?

Werden sie aktiviert und polarisiert?

Exprimieren die Chlamydien unterschiedliche Virulenzgene?

Spielt der Wirt eine Rolle bei der Virulenzgenexpression?

Diese Fragestellungen sollen zusammen eine Antwort darauf geben, wie gut die hier untersuchten Chlamydienpezies an die hier eingesetzten Wirte und das intrazelluläre Leben adaptiert sind.

Dazu wurden primäre Makrophagen aus dem Blut von Mensch und Rind isoliert, angezüchtet und mit Chlamydien mit engem Wirtsspektrum (*C. pneumoniae* (TW-183, humanes Isolat), *C. muridarum* (Nigg, murines Isolat)) beziehungsweise mit solchen mit breitem Wirtsspektrum (*C. psittaci* (A-6BC, bovines Isolat)) konfrontiert. Die Proben wurden für eine Bestimmung der Wachstumskinetik der Chlamydien zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen. Geeignete molekulare und fotometrische Methoden sollen die Fragestellungen im Detail beantworten.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Verwendete Materialien

##### 3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Abzug AZ1200	C+P Möbelservice, Breidenbach, DE
Assi-Stepper	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Rhön, DE
Axiolab Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, DE
BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg, DE
Branson 450D Sonifyer	Branson, Danbury, USA
CO <sub>2</sub> -Brutschrank Heracell 150	Kendro Laboratory Products, Hanau, DE
DFC420C, Kamera zu CK40	Leica, Wetzlar, DE
DP71 Kamera zu DM RBE und DM IRB	Olympus, Münster, DE
Eppendorf Research plus (adjustable, multichannel) Pipette	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorfcentrifuge Mini Spin Plus	Eppendorf, Hamburg, DE
FACSCanto Durchflusszytometrie-System	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Fluoreszenzmikroskop DM IRB	Leica, Wetzlar, DE
Fluoreszenzmikroskop Leitz DM RBE	Leica, Wetzlar, DE
Heißluftsterilisator SUT 6200	Kendro Laboratory Products, Hanau, DE
Heraeus Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Hettichzentrifugen, Rotanta 96 RS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Hettichzentrifugen, Rotanta 96 RS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
IKA-Schüttler MTS4	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, DE
Lichtmikroskop CK40	Olympus, Münster, DE
Lichtmikroskop RX41	Olympus, Münster, DE
Magnetrührer mit Heizplatte SLK4	Schott, Jena, DE
Modulare und aufrüstbare Multifunktionsreader-Plattform, Modell INFINITE 200 PRO	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, DE
Mx3000PTM <i>real-time</i> PCR-System	Agilent, Böblingen, DE
pH-Meter CG 840	Schott, Jena, DE
Pipetten Eppendorf <i>Research</i> 3110	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettierhilfe PIPETBOY acu2	IBS Integra Biosciences GmbH, Fernwald, DE
Reinstwasseranlage Maxima	USF Elga, Ransbach-Baumbach, DE

<b>Sicherheitswerkbank</b>	(HeraSafe) HSP 12 Kendro Laboratory Products, Hanau, DE
<b>Standard-Präzisionswaage</b>	BP 2100 S Sartorius, Göttingen, DE
<b>SW23 Schüttelwasserbad</b>	JULABO GmbH, Seelbach, DE
<b>Tecan Sunrise - Mikroplatten Absorptionsreader mit 12-Kanal-Optik</b>	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, DE
<b>Transferpette®</b>	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
<b>Transferpette® electronic</b>	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
<b>Transmissions-Elektronen-Mikroskop, TECNAI 12,</b>	FEI, Eindhoven, NLD
<b>VACUBOY Handoperator</b>	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Konstanz, DE
<b>Vortexer, VIBROFIX VF1</b>	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, DE
<b>Vortexer, Vortex Genie 2</b>	SI Scientific Industries Inc., New York, USA

### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Adapter für Dispenser-Spitzen</b>	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Rhön, DE
<b>CELL CULTURE FLASK, RED STANDARD SCREW CAP, CLEAR, CELLSTAR® TC, STERILE, T25</b>	Greiner, Kremsmünster, AT
<b>Corning® CellBIND® Surface cell culture flasks, T25</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
<b>Corning® Rectangular Cell Culture Flask with Canted Neck &amp; Plug Seal Cap, T25</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
<b>Cryoröhrchen 1,2 ml; steril</b>	Dr. Ilona Schubert – Laborfachhandel, Leipzig, DE
<b>Deckgläser</b>	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
<b>Deckgläser, 14 mm Durchmesser, Nr. 1001/14</b>	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Rhön, DE
<b>Deckglasröhrchen 129 AX/1</b>	Bibby Sterilin Ltd., Staffordshire, UK
<b>Einmalpipetten 25/50ml</b>	Greiner, Kremsmünster, AT
<b>Eppendorftubes 1,5/2 ml</b>	Eppendorf, Hamburg, DE
<b>FACS-Röhrchen</b>	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
<b>Filterspitzen</b>	Starlab, Ahrensburg, DE
<b>Formvar/Kohle-Film-Netzchen</b>	Plano, Wetzlar, DE
<b>Glasflaschen mit Deckel, verschiedene Größen</b>	VWR International, Darmstadt, DE
<b>Glaspipetten</b>	FLI, Jena
<b>Glasröhrchen, 12-15 ml</b>	VWR International, Darmstadt, DE
<b>Glasstäbe</b>	FLI, Jena
<b>Latex-Handschuhe Diamond Grip Plus,</b>	Starlab GmbH, Ahrensburg, DE

## MATERIAL UND METHODEN

<b>puderfrei</b>	
<b>Mini Cell Scrapers</b>	BioNuclear Scandinavia AB, Bromma, SWE
<b>Neubauer Zählkammer</b>	Neolab, Heidelberg, DE
<b>Objektträger</b>	Thermo Electron, Dreieich, DE
<b>Parafilm</b>	Neolab, Heidelberg, DE
<b>Pasteurpipetten</b>	Neolab, Heidelberg, DE
<b>PCR-Streifen</b>	Biodeal Edelman, Markkleeberg, DE
<b>PCR-Tubes, verschiedene Größen</b>	Biodeal Edelman, Markkleeberg, DE
<b>Pinzetten, gebogen</b>	Hartenstein, Würzburg, DE
<b>Präzisionsdispenser-Spitzen unsteril</b>	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Rhön, DE
<b>QIAshredder</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Reaktionsgefäße, verschiedene Größen</b>	VWR International, Darmstadt, DE
<b>Sangofix N Transfusionsgerät</b>	Braun, Meisungen, DE
<b>TPP Zellkulturflasche 25 - 75 cm<sup>2</sup>, VENT bzw. Filter</b>	Trasadingen, CH
<b>UVette® 220-1600 nm</b>	Eppendorf, Hamburg, DE
<b>XCEED Nitril-Handschuhe</b>	Starlab GmbH, Ahrensburg, DE
<b>Zellkulturflaschen T25/75 Corning® cell culture flasks, canted neck, cap (phenolic-style)</b>	Corning, Schiphol-Rijk, NLD
<b>Zellkulturflaschen, Falcon®, T12,5</b>	VWR International, Darmstadt, DE
<b>Zellkulturplatten, 6/24 Well</b>	Greiner, Kremsmünster, AT
<b>Zellkulturplatten, 96 Well</b>	Greiner, Kremsmünster, AT
<b>Zellkulturplatten, Advanced TC, 6/24 Well</b>	Greiner, Kremsmünster, AT
<b>Zellkulturplatten, Advanced TC, 96 Well, schwarz mit Deckel</b>	Greiner, Kremsmünster, AT
<b>Zellkulturschaber</b>	Greiner, Kremsmünster, AT
<b>Zentrifugenröhrchen 15/50ml</b>	Greiner, Kremsmünster, AT

### 3.1.3 Chemikalien und Zusatzstoffe

<b>Chemikalien und Zusatzstoffe</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Diethylpyrocarbonat (DEPC)</b>	Roth, Karlsruhe, DE
<b>Dinatriumhydrogenphosphat</b>	VWR International, Darmstadt, DE
<b>EDTA</b>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
<b>Ethanol (&gt; 99 %; v/v)</b>	Berkel AHK, Berlin, DE
<b>Flüssiger Stickstoff</b>	Air Liquide, Erfurt, DE
<b>Formaldehyd (4 %; m/V)</b>	Merck, Darmstadt, DE
<b>Glutaraldehyd (25 %; v/v)</b>	Serva, Heidelberg, DE
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b>	Merck, Darmstadt, DE
<b>Magnesiumchlorid</b>	Genaxxon, Ulm, DE
<b>2-Mercaptoethanol</b>	Merck, Darmstadt, DE

<b>Methanol</b>	Roth, Karlsruhe, DE
<b>Natriumcacodylat</b>	Serva, Heidelberg, DE
<b>Natriumchlorid</b>	Merck, Darmstadt, DE
<b>Paraffin</b>	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
<b>M-CSF, Wachstumsfaktor</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
<b>Sodium nitrite</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
<b>N,N-Dimethylformamide anhydrous, 99.8%</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
<b>Zitronensäure</b>	Merck KGaA, Darmstadt, DE
<b>Natriumzitat</b>	VEB Laborchemie, Apolda, DE
<b>Glucose- D</b>	Difco, heute BD Biosciences, Heidelberg, DE
<b>Silikonöl</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE

### 3.1.4 Kommerziell erhältliche Testsysteme und gebrauchsfertige Produkte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>(10x) Trypsin 0,05%/EDTA 0,02% in PBS w/o:Ca 2+ ,Mg 2+</b>	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
<b>Accutase ready-to-use Cell detachment solution</b>	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
<b>Entellan, Mikoskopierkleber</b>	VWR International, Darmstadt, DE
<b>Escherichia coli LPS, O111:B4</b>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
<b>Griess reagent (modified)</b>	Th. Geyer, Renningen, DE
<b>HemaDiff-Schnellfärbung</b>	bioanalytic GmbH, Freiburg, DE
<b>High Pure PCR Template Preparation Kit</b>	Roche Diagnostik, Mannheim, DE
<b>Hs_ACTB_1_SG QuantiTect Primer Assay</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Hs_IDO1_1_SG QuantiTect Primer Assay</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Hs_IFNG_1_SG QuantiTect primer assay</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Hs_IL10_1_SG QuantiTect primer assay</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Hs_IL12B_1_SG QuantiTect primer assay</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Hs_IL18_1_SG QuantiTect primer assay</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Hs_IL1B_1_SG QuantiTect primer assay</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Hs_IL6_1_SG QuantiTect primer assay</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Hs_LOC642272_1_SG QuantiTect primer assay</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Hs_MCL1_1_SG QuantiTect Primer Assay</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Hs_TNF_1_SG QuantiTect Primer Assay</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Imagen TM Chlamydia</b>	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, DE
<b>LDH Cytotoxicity Assay Kit</b>	Biomol GmbH, Hamburg, DE
<b>LSM 1077</b>	PAA, Laboratories, Cölbe, DE
<b>Pancoll human , density/Dicht 1,077 g/ml</b>	PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach, DE
<b>PCR-H2O, RNase- &amp; DNase-frei</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
<b>QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR</b>	Qiagen, Hilden, DE

## MATERIAL UND METHODEN

<b>recombinant human IFN GAMMA</b>	AbD Serotec, Puchheim, DE
<b>RNase-Free DNase Set (2,7 U/µl)</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>RNeasy® Mini Kit</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Sodium nitrite, NaNO<sub>2</sub>, ReagentPlus®, ≥99.0%</b>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
<b>TaqDNA-Polymerase (5 U/µl)</b>	Genaxxon, Ulm, DE
<b>TaqMan Universal Master Mix Applied</b>	Biosystems, Weiterstadt, DE
<b>TE - Puffer (1X) pH 8,0 für die Molekularbiologie</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Total ROS/Superoxide detection kit for microscopy, flow cytometry and microplates</b>	Enzo Life Sciences GmbH, Lausen, CH
<b>Trypsin EDTA</b>	PAA Laboratories, Cölbe, DE

### 3.1.5 Antikörper und Fluorophore

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Anti-Human CD284 (TLR4) PE</b>	eBioscience, San Diego, USA
<b>CD3-PE, Klon UCHT1, Isotyp IgG1</b>	BD Biosciences, Heidelberg, DE
<b>CD11c-FITC, Klon 3.9, Isotyp IgG1kappa</b>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE
<b>CD14-FITC, Klon 61D3, Isotyp IgG1</b>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE
<b>CD19-FITC, Klon HIB19, Isotyp IgG1</b>	BD Biosciences, Heidelberg, DE
<b>CD163-PE, Klon GHI/61, Isotyp IgG1kappa</b>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE
<b>CD1a-PE, Klon HI149, Isotyp IgG1kappa</b>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE
<b>CD206-PE, Klon 19.2, Isotyp IgG1</b>	BD Biosciences, Heidelberg, DE
<b>CD40-FITC, Klon 5C3, Isotyp IgG1</b>	BD Biosciences, Heidelberg, DE
<b>CD44-PE, Klon 515, Isotyp IgG1</b>	BD Biosciences, Heidelberg, DE
<b>CD64-PE, Klon 10.1, Isotyp IgG1kappa</b>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE
<b>CD68-FITC, Klon KiM7, Isotyp IgG1</b>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE
<b>CD80-FITC, Klon MEM-233, Isotyp IgG1</b>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE
<b>CD86-FITC, Klon BU63, Isotyp IgG1</b>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE
<b>DAPI 5mg</b>	Th. Geyer, Renningen, DE
<b>Fixable Viability Dye eFluor 660 (Red633)</b>	eBioscience, San Diego, USA
<b>HLA-A,B,C-FITC, Klon G46-2.6, Isotyp IgG1</b>	BD Biosciences, Heidelberg, DE
<b>HLADR-PE, Klon 423L, Isotyp IgG2a</b>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE
<b>IgG1-FITC ctrl, Klon MOPC-22, Isotyp IgG1 kappa</b>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE
<b>IgG1-PE ctrl, Klon MOPC-21, Isotyp IgG1</b>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE

<b>IgG2a-PE ctrl, Klon MOPC-173, Isotyp IgG2a kappa</b>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE
<b>Isotypkontrolle: Mouse IgG2a, FITC, Clone: G155-178</b>	BD Biosciences, Heidelberg, DE

### 3.1.6 Kulturmedien und Seren

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Fetales Kälberserum (FKS)</b>	PAA Laboratories, Cölbe, DE
<b>Fetales Kälberserum (FKS), clone</b>	PAA Laboratories, Cölbe, DE
<b>Human serum from male AB plasma, sterile-filtered, 050M0668</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
<b>Human serum from male AB plasma, sterile-filtered, 070M0613</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
<b>Human Serum off the clot Lot.-Nr.: C02010-1129/DE1200555</b>	PAA Laboratories, Cölbe, DE
<b>Human Serum off the clot Lot.-Nr.: C029009-3054/DE1120428</b>	PAA Laboratories, Cölbe, DE
<b>IPLA-Ser, Pooled Normal Human Serum</b>	Dunn Labor Technik GmbH, Asbach, DE
<b>IPLA-SERAB, human AB serum</b>	Patricell Limited, Nottingham, UK
<b>Iscove's Modified Dulbecco's Medium, ohne Phenolrot</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>MEM Eagle EBSS w/o L-Gln 500ml, Lonza</b>	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE
<b>Pooled Normal Human AB serum</b>	Innovative Research, Novi, USA
<b>RPMI 1640, ohne Phenolrot, mit L-Glutamin,</b>	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
<b>Ultra-MDCK, serum-free medium, Lonza</b>	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE

### 3.1.7 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>CPD-Puffer</b>	3,27g Zitronensäure, 26,3g Natriumzitat, 2,51g Natriumdihydrogenphosphat, 25,5g Glucose- D, in 1l Aq. dest lösen, sterilfiltrieren
<b>DEPC-H2O</b>	1 ml in 1 l Reinstwasser, 2 h bei RT gerührt, autoklaviert, Lagerung bei -20 °C
<b>Glutaraldehyd-Lösung (2,5 %)</b>	Glutaraldehyd (25 %; v/v) 1:10 in Natrium-Cacodylat-Puffer
<b>Lyse-Puffer</b>	8,26 g NH <sub>4</sub> Cl, 1,09 g NaHCO <sub>3</sub> , 0,037 g Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O, ad 1 l A.dest, autoklavieren
<b>NaCl (0,9 %)</b>	9 g/l NaCl in Reinstwasser gelöst
<b>Natrium-Cacodylat-Puffer (0,1 M)</b>	2,14 g Cacodylat-Natriumsalz in 100 ml Reinstwasser, 1 g Saccharose, (pH 7,2)
<b>PBS-EDTA-Puffer (1x)</b>	3,7 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O, 0,43 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 7,2 g NaCl, ad 1 l mit Reinstwasser, steril, (pH 7,2) + 2ml EDTA 0,5 M
<b>PBS-Puffer (1x)</b>	3,7 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O, 0,43 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 7,2 g NaCl, ad 1 l mit Reinstwasser, steril, (pH 7,2)
<b>SPGA-Konservierungsmedium für Chlamydien</b>	74,6 g Saccharose, 0,52 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,25 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,92 g L-Glutaminsäure (Natriumsalz), ad 1 l Reinstwasser, 1 g bovines Serumalbumin (Fraktion V)

### 3.1.8 Bakterienstämme und bakterielle Stimulatoren

Die in dieser Studie verwendeten Chlamydienstämme von *C. pneumoniae* (DC40, TW-183), *C. psittaci* (DC15, A-6BC) und *C. muridarum* (DC39, Nigg) wurden von dem Nationalen Referenzlabor für Chlamydiosen des Friedrich-Loeffler-Institutes, Jena, unter der Leitung von Dr. Konrad Sachse bereit gestellt. Sie werden im Einleitungsteil eingehend beschrieben.

### 3.1.9 Blut von Menschen und Rindern

Für die hier vorliegende Arbeit wurde menschlicher Buffy Coat von gesunden Spendern durch das Institut für Transfusionsmedizin Jena, unter der Leitung von Frau Prof. Dagmar Barz zur Verfügung gestellt. Der Buffy Coat wurde in kommerziellen Blutkonservenbeuteln bereitgestellt und vor jeder Isolation frisch bezogen. Die Blutkonserven waren anonymisiert und mit einem individuellen Barcode, zur lückenlosen Rückverfolgung ausgestattet. Bei auffälligen Testergebnissen wurden wir vom Institut für Transfusionsmedizin informiert und

das entsprechende Spenderblut wurde verworfen. Die Buffy Coats wurden bei Ankunft im FLI auf Sterilität überprüft. Des Weiteren wurden die verwendeten Buffy Coats und die daraus isolierten Zellen auf Chlamydien-DNA, Chlamydien-Antikörper und Mykoplasmen-DNA getestet. Für die Untersuchungen unter Nutzung humaner Blutkonserven liegt ein Ethik-Votum (308-02/11) ausgestellt von der Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena vor.

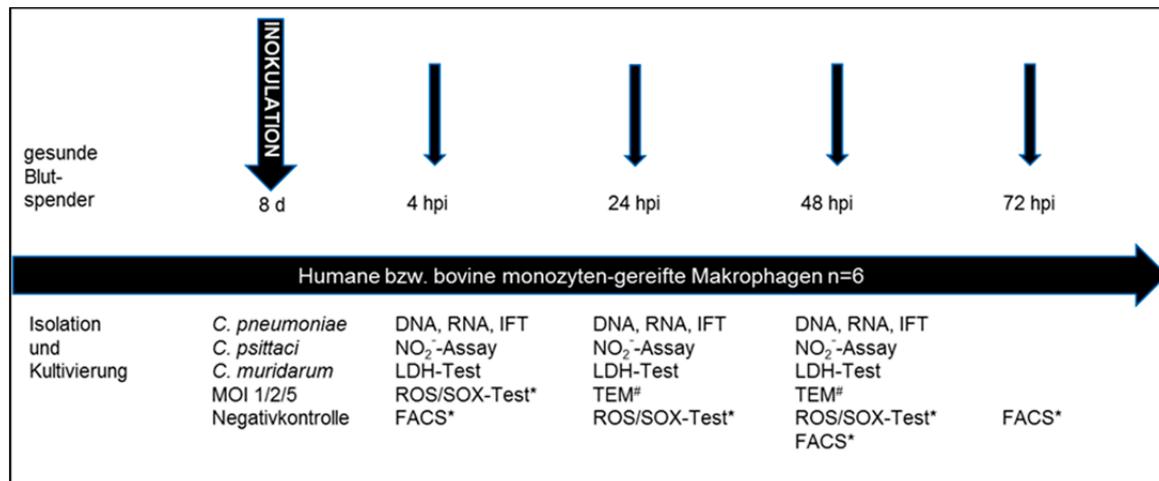
Das Rinderblut wurde von männlichen Holstein-Friesian-Rindern gewonnen. Diese Rinder stammten von einer Farm, die keine Vorgeschichte zu Chlamydien-assoziierten Gesundheitsproblemen besaß. Des Weiteren wurde von gesunden Rindern des Agrarunternehmens "Wöllmisse" Schlöben eG, Stadtroda, Blut gewonnen. Das gewonnene Blut wurde auf Sterilität, Chlamydien-Antikörper und Mykoplasmen-DNA überprüft. In dem Bestand waren ebenfalls keine Chlamydieninfektionen bekannt. Die Blutentnahmen wurden als Tierversuch der zuständigen Behörde angezeigt (Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz, Az. 22-2684-04-04-102/13 vom 04.02.2013).

### 3.1.10 Software und Datenbanken

Software	Hersteller
<b>CELL* imaging system</b>	Olympus, Münster, DE
<b>FACS-Diva Software</b>	BD Software, Heidelberg, DE
<b>IBM SPSS Statistics 22</b>	SPSS, München, DE
<b>ImageJ</b>	<a href="http://imagej.nih.gov/ij/">http://imagej.nih.gov/ij/</a>
<b>Leica Application Suite (LAS) Version 3.7.0</b>	Leica, Wetzlar, DE
<b>Magellan 7.1 SP1</b>	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, DE
<b>Microsoft Office 2003, 2010</b>	Microsoft, Unterschleißheim, DE
<b>MxPro4TM real-time PCR Software</b>	Agilent, Böblingen, DE
<b>Paint</b>	Microsoft, Albuquerque, USA
<b>R Studio</b>	<a href="http://www.r-project.org/">http://www.r-project.org/</a>
<b>Rx64 3.1.0.</b>	<a href="http://www.r-project.org/">http://www.r-project.org/</a>
<b>Windows Movie Maker 2012</b>	<a href="http://windows.microsoft.com/de-de/windows/get-movie-maker-download">http://windows.microsoft.com/de-de/windows/get-movie-maker-download</a>

### 3.2 Versuchsaufbau

Zur Sicherung der Übersichtlichkeit der komplexen Versuchsreihen wurde der Inokulations- und Untersuchungsverlauf in einem vereinfachten Schema dargestellt.



**Abbildung 5 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus**

d: Tage nach der Isolation; hpi: Stunden post inoculationem; MOI: multiplicity of infection; IFT: Immunfluoreszenztest; TEM: Transmissionselektronenmikroskopie; #: angepasste Konzentration; FACS: durchflusszytometrische Untersuchungen; \*: gilt nur für humane Makrophagen; n: Anzahl der verwendeten Blutproben pro Versuch

### 3.3 Kultivierung monozyten-gereifter Makrophagen

#### 3.3.1 Isolierung von Monozyten aus humanem Buffy Coat

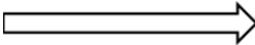
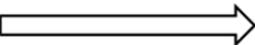
Zu Beginn meiner Arbeit am Friedrich-Loeffler-Institut stand keine Methode zur Verfügung, mit der humane Makrophagen erfolgreich aus Buffy Coat isoliert und kultiviert werden konnten. Daher wurden umfangreiche Testreihen durchgeführt, die in Tabelle 5 aufgelistet sind. In jeder neuen Testreihe wurde das vorherige Verfahren als Vergleich stets mitgeführt.

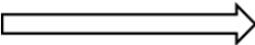
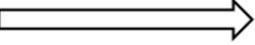
Schließlich wurde für die Infektionsversuche mit den Chlamydien folgende Methode zur Isolierung von Monozyten aus humanem Buffy Coat angewandt:

Blutkonservenbeutel mit Buffy Coat von gesunden Spendern wurden am Tag der Isolation aus dem Institut für Transfusionsmedizin, Jena, abgeholt. Diese waren standardmäßig mit CPD-Puffer befüllt (Anhang 3). Unter einer Sterilbank wurde der Blutkonservenbeutel mit einem sterilen Transfusionsbesteck (Braun) verbunden und so aufgehängt, dass ein Gefälle entstand. Die Beutel enthielten je nach Spender 15-40 ml Buffy Coat. Dieser wurde mithilfe des Transfusionsbesteckes in ein steriles Becherglas (100 ml) überführt und 1:1 mit PBS vermischt. Das Buffy Coat-PBS-Gemisch wurde dann vorsichtig auf Lymphozytenseparationsmedium (LSM 1077, Paa) geschichtet. Dabei sollte immer mindestens gleichviel oder mehr LSM als Buffy Coat-PBS verwendet werden. Die Schichtung erfolgte in 50 ml Röhren (Greiner). Nach dem Aufsichten wurden die Röhren für 45 min bei 250xg zentrifugiert. Danach wurde das Plasma (oberste Schicht) vorsichtig aus den Röhren entfernt und bei -20°C gelagert. Mit einer 1000µl-Pipette wurde dann die Interphase sorgfältig aufgenommen und in ein anderes 50 ml Falcon überführt. Die

Falcons wurden nur soweit mit der Interphase befüllt, dass sie noch reichlich mit PBS-EDTA aufgefüllt werden konnten (höchstens 20 ml). Nach dem dies geschehen war, wurden die Falcons 25 min bei 1000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation mit einem Vakuumsauger abgesaugt und verworfen. Es wurde erneut PBS-EDTA dazugegeben. Das entstandene Pellet wurde mit dem Puffer resuspendiert und es schloss sich eine weitere Zentrifugation an (25 min, 340xg). Um das EDTA besser auszuwaschen, wurde schon im nächsten Schritt nur noch PBS verwendet. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Röhrchen mit PBS aufgefüllt. Nach der Resuspension des Pellets wurde das Röhrchen für 25 min bei 290xg zentrifugiert. Ein letztes Mal wurde nun der Überstand abgesaugt, PBS dazugegeben und 25 min bei 160xg zentrifugiert. Nach diesem letzten Waschgang wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet in 10 ml RPMI 1640 + 5% FKS + 5% HuS von Sigma Aldrich Lot: 070M0613 + 10000 U/ml Penicillin/10000µg/ml Streptomycin aufgelöst. Von dieser Suspension wurden dann 100µl 1:1000 mit PBS verdünnt und die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer und einem Lichtmikroskop bestimmt. Es wurden jeweils 4 Großquadrate ausgezählt. Von den erhaltenen vier Werten wurde der Mittelwert bestimmt. Die ausgezählte Zahl der Zellen wurde wegen der Verdünnung mit 1000 multipliziert. Dann erhält man die Zellzahl pro µl. Für eine Zellzahl pro ml mussten die ausgezählten Zellen nochmal mit 1000 multipliziert werden. Je nach Spender wurden 30 bis  $100 \times 10^6$  Zellen pro ml isoliert.

**Tabelle 5 Testreihen zur Etablierung einer Methode zur erfolgreichen Isolierung und Kultivierung monozyten-gereifter Makrophagen aus humanem Buffy Coat**

Testphase	Methode	Ergebnis
<b>1. Phase: Isolierverfahren</b>	Isolierverfahren nach einer Methode zur Isolierung von aviären Monozyten aus Vollblut	nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen war kein dichter Zellrasen entstanden, die Zellen zeigten keine makrophagen-typische Morphologie
	Isolierverfahren angepasst an Pinet et.al (Pinet, Dupont et al. 2003) mit wenigen Modifikationen	nach 12 Tagen in der Zellkulturflasche in verschiedenen Konzentrationen war kein dichter Zellrasen entstanden, die Zellen zeigten keine makrophagen-typische Morphologie
	Austestung der geeigneten Aussaatdichte	
	Testung der geeigneten Adhärenzzeit	
	Einsatz eines Erythrozytenlyse-puffers	Humane MDM reagierten sehr empfindlich auf den in der bovinen Isolierung angewandten Erythrozytenlyse-puffer
 <b>Modifizierungen des Isolierverfahrens brachten keinen Erfolg, Adhärenz der Zellen muss erhöht werden</b>		
<b>2. Phase: verschiedene Zellkulturflaschen und -platten</b>	Vergleich zwischen Glaspetrischale und Advanced TC 6 Well-Platten	In der Glaspetrischale war die Adhärenz gegenüber der 6 Well-Platte leicht erhöht
	Austestung 6 verschiedener Zellkulturflaschen T25	Es waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Zellkulturflaschen zu erkennen, Morphologie und Zelldichte waren für die Infektionsversuche nicht ausreichend
 <b>Adhärenz besser auf Glasuntergrund, Glaspetrischalen für den Versuchsaufbau unpraktisch, eine makrophagentypische Morphologie der Zellen soll erreicht werden</b>		
<b>3. Phase: verschiedene Seren und Zusätze</b>	Vergleich verschiedener FKS in unterschiedlichen Konzentrationen	Mit 10% inaktiviertem FKS von Paa im RPMI 1640 wurde eine annehmbare Dichte und eine makrophagen-typische Zellstruktur erreicht
	Einsatz von spendereigenem Plasma	spendereigenes Plasma in Kombination mit FKS führte zu unerwünschten Interaktionen, die Dichte und Morphologie der Zellen war sehr heterogen, die Zellen zeigten eine blasige Morphologie
	Einsatz von spendereigenem Plasma mit Zusatz von D-Glucose und/oder HEPES	Die blasige Struktur der Zellen konnte mit einer erhöhten Nährstoffzufuhr (D-Glucose) oder mit einer pH-Wert-Stabilisierung (HEPES) nicht verbessert werden

	Vergleich 6 verschiedener humaner Seren	Die Zellen zeigten mit dem Human serum from male AB plasma, sterile-filtered, 070M0613 von Sigma Aldrich eine sehr gute Dichte und eine makrophagentypische Morphologie
	Einsatz des Wachstumsfaktors M-CSF	Mit M-CSF konnte die Morphologie und Dichte der Zellen nicht weiter verbessert werden
 <b>Humanes Serum, Charge: 070M0613 von Sigma Aldrich im Medium führte zu einer für die Versuche geeigneten Dichte und makrophagentypischen Struktur der Zellen</b>		
<b>4. Phase: Endversuche</b>	Glaspetrischale versus 6 Well-Platte	in Advanced TC 6 Well-Platten erreichten die Zellen eine Dichte von 90-100% Flächendeckung und zeigten dabei eine makrophagen-typische Gestalt
	Zusätzliche Aussaat der nicht adhärenen Zellen im Überstand nach der vorgegebenen Adhärenzzeit	Die Aussaat der nicht adhärenen Zellen nach 60 bis 90 Minuten zeigte vergleichbare Ergebnisse
 <b>Advanced TC 6 Well-Platten sind für die Isolierung und Kultivierung von humanen Makrophagen sehr gut geeignet, die zusätzliche Aussaat von nicht adhärenen Zellen im Überstand nach der Adhärenzzeit führt zu einer erhöhten Zellausbeute</b>		

Die gewünschte Zellkonzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen pro ml wurde mithilfe folgender Formel eingestellt:

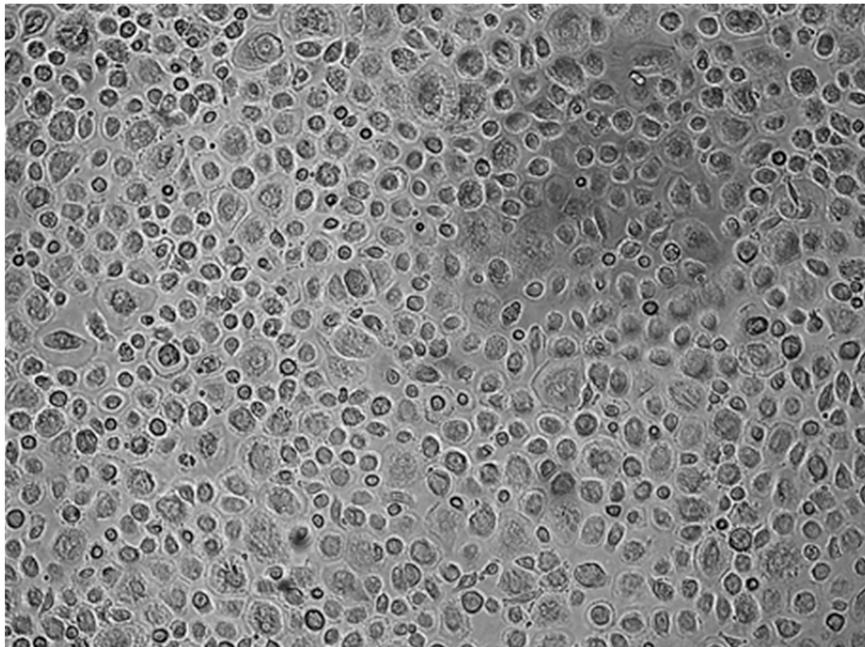
$$\frac{\text{gewünschtes Gesamtvolumen} \times \text{gewünschte Zellkonzentration}}{\text{gemessene Zellkonzentration}} = \text{benötigte Menge Zellsuspension}$$

$$\text{Gewünschtes Gesamtvolumen} - \text{benötigte Menge Zellsuspension} = \text{benötigte Menge Medium}$$

Jedes Advanced TC 6 Well enthielt 2 ml Endvolumen. Als Medium wurde RPMI 1640 + 5% FKS + 5% humanes Serum von Sigma Aldrich Lot: 070M0613 + 10000 U/ml Penicillin/10000µg/ml Streptomycin eingesetzt. Die eingesäten Zellen wurden für 60 bis 90 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach den 60 bis 90 min wurde der Überstand in neue Advanced TC 6 Wells überführt, um den nicht adhärenen Zellen eine 2. Adhärenzphase zu gewähren. Die Zellen, die nach 60 bis 90 min adhären waren wurden zweimal mit PBS gewaschen und neues Medium wurde hinzugefügt. Die Zellen der 2. Adhärenzphase wurden nach circa 16 Stunden zweimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

### 3.3.2 Kultivierung der isolierten humanen Monozyten zu Makrophagen

Um die isolierten Monozyten zu Makrophagen ausreifen zu lassen, wurden sie für sechs bis acht Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Vorversuche mit Phenolrot im Medium zeigten, dass auch nach vier Tagen ohne Mediumwechsel keine Veränderungen im pH-Wert vorlagen. Nach sechs Tagen wurden die Zellen lichtmikroskopisch überprüft und es wurde entschieden, ob sie für einen Infektionsversuch geeignet sind (Abbildung 6).



**Abbildung 6 Lichtmikroskopische Aufnahme von monozyten-gereiften Makrophagen 8 Tage nach der Isolation**

Makrophagen, die eine ähnliche Dichte und Morphologie erreichten, waren für die Infektionsversuche mit Chlamydien geeignet. Gezeigt wird eine repräsentative Makrophagen- Kultur aus mehreren Kultivierungsversuchen.

---

### 3.3.3 Isolierung von Monozyten aus Rinderblut

Die bovinen monozyten-gereiften Makrophagen wurden im Rahmen einer Kooperationsvereinbarung von Katharina Sobotta (FLI, Jena) zur Verfügung gestellt. Die Methode zur Isolierung und Kultivierung von humanen monozyten-gereiften Makrophagen führte nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Die Isolierung der bovinen Monozyten erfolgte nach einer Methode, die zuvor beschrieben wurde (Adler, Peterhans et al. 1994; Werling, Howard et al. 1998). Von gesunden Spendertieren wurde Vollblut aus der Vena jugularis entnommen und 1:5 mit 3,8% Na-Citrat verdünnt. Das Na-Citrat-Blut wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und 20 min bei 2380xg zentrifugiert. Danach wurde ein Drittel des Plasmas (oberste Phase) verworfen. Die Interphase wurde vorsichtig mit einer 1000 µl-Pipette entnommen und in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurde nur so viel Interphase in die Röhrchen gegeben, dass sie noch mit PBS-EDTA aufgefüllt werden konnten. Die Röhrchen wurden dann 10 min bei 800xg zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde mit PBS-EDTA resuspendiert, mit dem das Röhrchen aufgefüllt worden war. Darauf folgte wieder eine Zentrifugation für 10 min bei 800xg. Dieser

Waschschritt wurde noch einmal wiederholt (insgesamt 3 Waschschritte). Nach Entnahme des Überstands wurde das Röhrchen mit Erythrozyten-Lyse-Puffer aufgefüllt. Das Pellet wurde resuspendiert und für höchstens 10 min inkubiert. Danach schloss sich eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 300xg an. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Röhrchen mit PBS-EDTA aufgefüllt und zentrifugiert (10 min, 300xg). Es folgten 2 weitere Waschgänge nach diesem Schema. Nach dem letzten Waschgang wurde das Pellet in 25 ml PBS-EDTA resuspendiert und auf Lymphozytenseparationsmedium (LSM 1077, Paa) geschichtet. Die aufgeschichteten Zellen wurden dann 45 min bei 800xg zentrifugiert. Die entstandene obere Phase wurde wieder verworfen und die Interphase vorsichtig in ein weiteres 50 ml Röhrchen überführt. Dieses wurde dann mit 0,89% NaCl aufgefüllt und 8 min bei 600xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets erneut mit 0,89% NaCl resuspendiert. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 300xg wurde der Überstand wieder verworfen. Das Röhrchen wurde mit 0,89% NaCl aufgefüllt und das Pellet resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 300xg. Das entstandene Pellet wurde nach Verwurf des Überstandes in 10 ml 0,89% NaCl resuspendiert. Es wurde ein Aliquot zur Zellbestimmung entnommen. Die Zellzahl wurde in gleicher Weise, wie bei der Isolation der humanen Monozyten bestimmt, nur das noch Trypanblau zugefügt wurde. Die restlichen Zellen wurden dann bei 300xg für 10 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Anzuchtmedium (IMDM Medium + 20 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % Amphotericin B + 0.05 % 100 mM 2- $\beta$ -mercaptoethanol) resuspendiert. Die Zellzahl wurde auf  $4 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. 25 ml der Zellsuspension ( $1 \times 10^8$  Zellen/25 ml) wurden mit einer sterilen 30 ml Spritze in einen Teflonbeutel (VueLife Bags, American Fluoroseal Corp., Gaithersburg, USA) überführt. Der Teflonbeutel wurde desinfiziert und für sieben Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

### 3.3.4 Kultivierung der isolierten bovinen Monozyten zu Makrophagen

Nach sieben Tagen der Kultivierung wurden die Teflonbeutel aus dem Brutschrank genommen und für 20 min in den Kühlschrank (4°C) gelegt. Danach wurden die Teflonbeutel unter der Sicherheitsbank von beiden Seiten mit den Fingern beklopft. Mit einer 60 ml Spritze wurde die Zellsuspension in dem Teflonbeutel mehrmals angesaugt und wieder eingespritzt, um weitere Zellen von der Teflonwand zu lösen und sie zu durchmischen. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt. Der Teflonbeutel wurde dann mit 20 ml gekühlter 0,89% NaCl-Lösung gespült. Die Spüllösung wurde ebenfalls in das Röhrchen mit der Zellsuspension überführt. Der Spülvorgang wurde nochmal mit 10 ml NaCl wiederholt. Das Röhrchen wurde dann bei 300xg für 10 min zentrifugiert und ein weiterer Waschvorgang mit 0,89% NaCl (300xg, 10 min) schloss sich an. Danach wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden in 1-5 ml Kulturmedium (IMDM + 2 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % Amphotericin B + 0,05 % 100 mM 2- $\beta$ -mercaptoethanol) resuspendiert. Nun wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellkonzentration auf  $6-8 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt. Die Zellen wurden dann in unbeschichtete 24 Well-Platten von Greiner ausgesät. Jedem Well wurde ein Volumen von 1 ml zugeordnet. Nach 18 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit 0,89% NaCl gewaschen und das Kulturmedium für nachfolgende Infektionen (IMDM + 2 % FKS + 0,05 % 100 mM 2- $\beta$ -mercaptoethanol) wurde hinzugegeben. Nach weiteren 24 Stunden im Brutschrank waren die Zellen für die Infektionsversuche einsatzbereit.

### 3.4 Anzucht und Titerbestimmung der Chlamydien

#### 3.4.1 Kultivierung der Anzuchtzellen

Für die Anzucht der Chlamydien wurden nicht immunkompetente Buffalo Green Monkey Kidney Cells (BGM) verwendet. Es handelt sich um eine gut erforschte Zelllinie, die einfach zu kultivieren ist. Bei dieser Arbeit wurden kultivierte BGM in T75-Zellkulturflaschen (TPP, VENT) verwendet. Diese Zellen wurden passagiert und die benötigte Menge an zu infizierenden Zellkulturflaschen wurde hergestellt. Dazu wurde das Medium aus der Ausgangs T75-Zellkulturflasche mit einem Vakuumsauger abgesaugt. Die adhären Zellen wurden dann mit 10 ml PBS gespült. Zum Ablösen der Zellen wurden 5 ml Trypsin-EDTA auf den Zellrasen gegeben und 5-10 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach 5 min wurden die Zellen auf ihre Adhärenz überprüft. Durch Schwenken der und Klopfen an die Zellkulturflasche wurde die Ablösung der Zellen unterstützt. Um die Wirkung des Trypsins zu neutralisieren wurden 5 ml MEM (Minimum Essential Medium Eagle) + 2 mmol/ml Glutamin + 5% FKS zugeben. Das enthaltene Serum ist in der Lage die Reaktion von Trypsin abzustoppen. Die Suspension wurde dann aus der Flasche in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen übertragen und 12 min bei 400xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 4 ml MEM + 2 mmol/ml Glutamin + 5% FKS resuspendiert. Die Zellen wurden dann in gewünschter Dichte und Zellkulturflaschenanzahl ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert.

#### 3.4.2 Chlamydienstammkonservierung

##### 3.4.2.1 *Chlamydia pneumoniae*, DC40, TW-183

Sobald sich der Zellrasen der vorbereiteten BGM geschlossen hat, konnten sie mit Chlamydien infiziert werden. Die *Chlamydia (C.) pneumoniae*-Stammkonserve wies einen vergleichsweise geringen Titer ( $1-5 \times 10^6$  EBE/ml) auf, sodass eine Vorkultur angelegt wurde, um die Ausbeute und den Titer der neuen Konserven zu erhöhen. Dazu wurden zwei T25 (Red Standard, Greiner) Zellkulturflaschen, mit geschlossenem BGM-Zellrasen, mit je einer Chlamydienkonserve (500 µl) infiziert. Die Flaschen wurden anschließend eine Stunde bei 37°C und 3400xg in einer aerosoldichten Zentrifuge zentrifugiert. Danach wurden die infizierten BGM für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach den zwei Stunden wurde der Überstand abgesaugt und 5 ml Ultra-MDCK-Medium wurde hinzugefügt. Die BGM wurden dann unter Beobachtung 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Mit einer Ultraschallbehandlung sollten die Chlamydien aus den BGM befreit werden. Sie wurden zehn Sekunden im Intervall mit UV-bestrahlt. Um die BGM zu entfernen wurden die isolierten Chlamydien 10 min bei 400xg in einer aerosoldichten Zentrifuge zentrifugiert. Mit dem Überstand wurden dann 4 T25 (Red Standard, Greiner) Zellkulturflaschen und 9 Deckglasröhrchen, mit geschlossenem BGM-Zellrasen, infiziert. Dazu wurden 1,8 ml des Überstands in je 1 Flasche und 112,5 µl in je 1 Röhrchen gegeben. Diese wurden dann 1 Stunde bei 37°C und 2000xg zentrifugiert und anschließend für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde dann verworfen und mit 5 ml beziehungsweise 1ml Ultra-MDCK-Medium ersetzt. Nach weiteren drei Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die infizierten BGM wieder geerntet, mit Ultraschall behandelt und weitere 8 T25-Flaschen (Red Standard, Greiner), mit geschlossenem BGM-Zellrasen, wurden infiziert. Auch diese

infizierten Flaschen wurden drei Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden dann 24 T25-Flaschen (Red Standard, Greiner), mit geschlossenem BGM-Zellrasen, in 2 Ansätzen á 12 T25 Flaschen infiziert. Nach dem diese Ansätze drei Tage inkubiert worden waren, wurden die infizierten BGM geerntet und kryokonserviert. Dazu wurden 3 ml SPGA-Puffer in 1 der T25-Flaschen, die infizierte BGM enthielten gegeben. Mit einem Zellkulturschaber wurden die Zellen von dem Flaschenboden gelöst und mit dem SPGA zusammen in die nächste Flasche überführt. Dann wurde wieder geschabt und so weiter. Am Ende wurde die Suspension in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Die Flaschen wurden am Ende mit 3 ml SPGA gespült und diese Spüllösung wurde mit der ersten Suspension vereint. Es wurden je 0,5 ml der Infektionssuspension in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

#### **3.4.2.2 *Chlamydia psittaci*, DC15, A-6BC**

*Chlamydia (C.) psittaci*-Stammkonserven waren in ausreichender Konzentration (circa  $1 \times 10^9$  EBE/ml) vorhanden, sodass das Anlegen einer Vorkultur nicht nötig war. T75 Zellkulturflaschen (TPP, VENT) wurden mit BGM beimpft. Sobald der Zellrasen geschlossen war, wurden die Zellen mit  $3 \times 10^7$  einschlussbildenden Einheiten (EBE) pro ml einer *C. psittaci*-Konserve infiziert. Die Chlamydien suspension wurde mit 15 ml Ultra-MDCK-Medium in die Zellkulturflaschen gegeben. Die Flaschen wurden dann bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Flaschen lichtmikroskopisch überprüft. Wenn sehr viele Einschlüsse mit hoher Brown'scher Molekularbewegung und sich ablösende Zellen zu sehen waren, konnten die mit Chlamydien infizierten BGM geerntet und kryokonserviert werden. Dies geschah nach derselben Methode, wie bei der Vermehrung von *C. pneumoniae* (siehe 3.4.2.1).

#### **3.4.2.3 *Chlamydia muridarum*, DC39, Nigg**

Die *Chlamydia (C.) muridarum*-Stammkonserven wiesen Titer ( $1-5 \times 10^8$  EBE/ml) auf, die eine Vorkultur nötig machten, aber keine Aufzentrifugation. Es wurden zwei mit BGM beimpfte T75 Zellkulturflaschen (TPP, VENT) und 4 Deckglasröhrchen mit *C. muridarum* in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  EBE/ml infiziert. Die Chlamydien suspension wurde mit 15 ml Ultra-MDCK-Medium in die Zellkulturflaschen und mit 1ml des Mediums in die Deckglasröhrchen gegeben. Die Flaschen und Röhrchen wurden dann bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Infektion der BGM mittels Immunfluoreszenzfärbung der Zellen in den Deckglasröhrchen überprüft (siehe 0). Die Infektion war noch nicht ausreichend und so wurden die infizierten Zellen nach 48 Stunden als Vorkultur geerntet. Die Ernte fand wieder mit Zellkulturschabern und SPGA statt. Mit der erhaltenen Vorkultur wurden dann 10 T75-Zellkulturflaschen, mit geschlossenem BGM-Zellrasen, infiziert. Je 0,5 ml der Vorkultur wurden mit 14,5 ml Ultra-MDCK-Medium in die vorbereiteten BGM-Zellkulturflaschen gegeben. Nach 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die infizierten BGM lichtmikroskopisch überprüft, geerntet und kryokonserviert. Die Kryokonservierung erfolgte nach der in 3.4.2.1 beschriebenen Methode.

### **3.4.3 Bestimmung des Gehaltes an infektiösen Chlamydien mittels Titration**

Zur Bestimmung des Chlamydientiters der angelegten Kryokonserven wurden in sechs Deckglasröhrchen BGM zu einem geschlossenen Zellrasen kultiviert. Es wurde eine

Verdünnungsreihe der zu bestimmenden Chlamydienkonserve im Bereich von  $1:10^3$  bis  $1:10^6$  in PBS angelegt. Davon wurden je 0,2 ml Suspension auf die BGM in den Deckglasröhrchen gegeben. Pro Verdünnungsstufe wurden 2 Deckglasröhrchen infiziert. Diese wurden dann bei  $37^\circ\text{C}$  und  $3400\text{g}$  für eine Stunde in einer aerosoldichten Zentrifuge zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und 1 ml des Ultra-MDCK-Medium wurde zugefügt. Die Inkubationsdauer bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{ CO}_2$  wurde je nach Entwicklungszyklus des untersuchten Stammes ausgewählt. War dieser unbekannt, wurden die ersten infizierten Deckglasröhrchen nach 24 Stunden gefärbt. Gegebenenfalls wurde das 2. Röhrchen der Verdünnungsstufe nach 48 Stunden ausgewertet. Die Deckgläser aus den Deckglasröhrchen wurden mit dem IMAGEN-Chlamydienkit gefärbt (siehe 0) und anschließend mit dem Axiolab Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Deckgläser der Verdünnungsstufe, die eine moderate Anzahl von chlamydialen Einschlüssen vorwies, wurden ausgewertet. Es wurden 20 Gesichtsfelder mit dem 20er oder 40er Objektiv ausgezählt. Die Konzentration der Chlamydien (EBE/ml) wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\overline{x}_{20} \times \text{Verdünnungsstufe} \times \text{Objektivfaktor} \times 5 = \text{EBE/ml}$$

$\overline{x}_{20}$  = Mittelwert aus 20 gezählten Gesichtsfeldern  
Verdünnungsstufe:  $1:10^3 = 1000$ ;  $1:10^4 = 10000$  und so weiter  
Objektivfaktor für Mikroskop Axiolab: 20er Objektiv: 212; 40er Objektiv: 854,7  
Faktor 5: 0,2 ml Chlamydien suspension eingesetzt;  $0,2 \text{ ml} \times 5 = 1 \text{ ml} \Rightarrow \text{EBE/ml}$

Ergänzung:

Von *C. pneumoniae* wurde eine umfangreiche Vorkultur mit BGM angelegt. Die Zellen wurden vor der Kryokonservierung nicht entfernt. Der Gehalt an Elementarkörperchen von *C. pneumoniae* in der Konserve blieb weiterhin im Vergleich zu den anderen Chlamydien spezien gering. Daher mussten größere Mengen der Chlamydien suspension eingesetzt werden, wodurch auch mehr BGM auf die monozyten-gereiften Makrophagen gelangten. Diese wurden von den BGM nachweislich negativ beeinflusst. Vor der Titerbestimmung wurde die Suspension aus der *C. pneumoniae*-konserve in ein steriles 1 ml Eppendorf-Tube umgefüllt, kräftig gevortext und für 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Dann wurde das Tube für 10 min bei  $500\text{g}$  zentrifugiert. Der von BGM-Zellen befreite Überstand wurde für die Titerbestimmung verwendet.

### 3.5 Inokulation der monozyten-gereiften Makrophagen mit Chlamydien

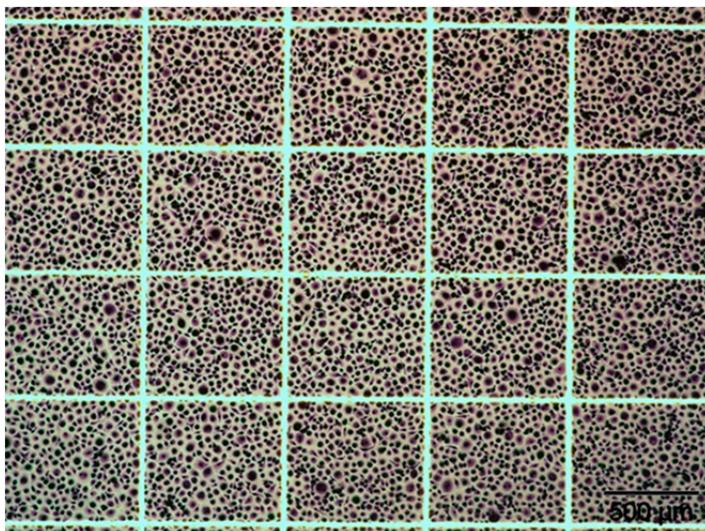
Die monozyten-gereiften Makrophagen wurden nach lichtmikroskopischer Überprüfung nach sechs bis acht Tagen für die Infektionsversuche eingesetzt. Für die Inokulationen wurden die Konserven, der im Vorfeld angezüchteten Chlamydien (*C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. muridarum*) verwendet.

Zur Bestimmung der Zellzahl monozyten-gereifter Makrophagen wurde für jeden Infektionsversuch ein extra Zähl-Well auf einer separaten Advanced TC 6 Well-Platte mit ausgesät. Den für die Inokulation geeigneten Zellen wurde das Medium entzogen. Nach einer Waschung mit PBS wurden die monozyten-gereiften Makrophagen mit der HemaDiff-Schnellfärbung gefärbt. Dafür wurde 1 ml der Lösung 1 für fünf Sekunden, 1 ml der Lösung 2

für drei Sekunden und 1 ml der Lösung 3 für sechs Sekunden in je 1 Well gegeben. Die Wells wurden dann mit destilliertem Wasser gewaschen. Die gefärbten Wells wurden mit einem eingeschobenen Raster mit definierter Kästchengröße bei einer 5-fachen Vergrößerung fotodokumentiert (Abbildung 7). Vier nicht zusammenhängende Kästchen wurden ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Zellzahl der monozyten-gereiften Makrophagen wurde anhand folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{Wellgröße in } \mu\text{m}^2}{\text{Größe des Rasterkästchens in } \mu\text{m}^2 \times \text{Mittelwert der gezählten Zellen}} = \text{Zellzahl pro Well}$$

Wellgröße:	24 Well-Platte:	200000000 $\mu\text{m}^2$
	6 Well-Platte:	961625000 $\mu\text{m}^2$
Rasterkästchengröße:		70000 $\mu\text{m}^2$



**Abbildung 7 HemaDiff-Schnellfärbung von monozyten-gereiften Makrophagen mit definiertem Raster.**

Lichtmikroskop. (5x)

Gezeigt wird eine repräsentative Makrophagen-Kultur aus mehreren Versuchsreihen.

Die Multiplicity of Infection (MOI) ist eine Konzentrationsangabe, bei der eine MOI 1 bedeutet, dass eine infektiöse Einheit (hier chlamydiale Einschlussbildende Einheit) auf eine zu infizierende Zelle trifft (hier Makrophage). Eine MOI 2 bedeutet demnach, dass 2 infektiöse Einheiten auf eine zu infizierende Zelle treffen und so weiter. Die MOI wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl pro Well in ml}}{\text{Chlamydientiter in EBE/ml}} = \text{MOI 1}$$

Da die Werte sehr gering waren bot sich eine Umrechnung in  $\mu\text{l}$  an. Dazu wurde der errechnete Wert mit 1000 dividiert und dann mit der Anzahl der zu infizierenden Wells multipliziert. Für die in dieser Arbeit zusätzlich eingesetzten MOI 2 und 5 wurde der errechnete Wert mit 2 beziehungsweise 5 multipliziert.

Für die Chlamydieninokulation wurde das Medium der monozyten-gereiften Makrophagen verworfen und die Zellen mit PBS gespült. Die Chlamydienkonserven wurden schonend bei Raumtemperatur aufgetaut und gevortext. Konserven mit *C. pneumoniae* wurden zusätzlich

mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert (siehe 3.4.3). Die errechnete Menge Chlamydien suspension wurde zu der benötigten Menge Medium gegeben und gut vermischt. Dann wurden je 2 ml der Chlamydien-Medium suspension in ein 6 Well beziehungsweise 1 ml in ein 24 Well gegeben. Die inokulierten Zellen wurden dann für 4, 24, 48 beziehungsweise 72 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Inokulationsmedium für humane Makrophagen: RPMI 1640 + 5% FKS + 2% HuS  
Inokulationsmedium für bovine Makrophagen: IMDM + 2 % FKS + 0,05 % 100 mM 2-β-mercaptoethanol.

Als Positivkontrolle für die Infektionsfähigkeit und das Wachstum der Chlamydien wurden Buffalo Green Monkey-Zellen (BGM) ebenfalls mit Chlamydien inokuliert. Die BGM wurden in 24 Well-Platten ausgesät und zu einem konfluenten Zellrasen kultiviert. Dieser wurde genau wie die monozyten-gereiften Makrophagen mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* beziehungsweise *C. muridarum* inokuliert. Es wurden die gleichen Konzentrationen (MOI) und Probenentnahmezeiten gewählt. Für jede Chlamydien spezie wurden die Inokulationen in je 6 Versuchsreihen (n=6) durchgeführt. Als Inokulationsmedium für BGM-Zellen wurde RPMI 1640 + 5% FKS gewählt.

### 3.6 Kontaminationsausschluss

Die infizierten Spenderproben wurden stichprobenartig auf Mykoplasmen getestet. Das Plasma aller Spender wurde auf Chlamydienantikörper und –DNA überprüft. Diese Tests wurden von validierten Laboren durchgeführt (NRL).

### 3.7 Visualisierung der monozyten-gereiften Makrophagen beziehungsweise der Chlamydien

Zellen und Bakterien können auf vielfache Weise sichtbar gemacht werden. Unterschiedliche Methoden geben dabei Einblicke in die Verteilung, Größe, Morphologie und Menge der Zellen beziehungsweise Bakterien. Im Folgenden wurden die mit Chlamydien stimulierten MDM mit dem Lichtmikroskop, mittels Immunfluoreszenzmikroskop und einem Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

#### 3.7.1 Langzeitbeobachtungen der inokulierten monozyten-gereiften Makrophagen mit dem Lichtmikroskop

Humane und bovine monozyten-gereifte Makrophagen wurden mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* beziehungsweise *C. muridarum* in einer MOI von 5 inokuliert. In die Langzeitbeobachtungen wurden 3 verschiedene Spender einbezogen. Es wurde jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt. Die ersten Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop CK40 von Olympus wurden nach 4, 24 und 48 Stunden gemacht. Der Bereich der ersten Aufnahme wurde markiert. Folgend wurde jeden Tag zur gleichen Zeit an möglichst der gleichen Stelle ein Bild aufgenommen. Die Beobachtung wurde fortgeführt bis die inokulierten Zellen zu einem Großteil zerstört waren.

### 3.7.2 Chlamydiennachweis mittels direkter Immunfluoreszenz

Zum Nachweis von Chlamydien in einschichtigen Zellkulturen wurde ein direkter Immunfluoreszenztest durchgeführt. Dazu wurde das kommerziell erhältliche IMAGEN Chlamydien-Kit (Oxoid) verwendet. Der Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierte, gattungsspezifische monoklonale Antikörper richtet sich gegen das auf der Oberfläche aller bekannten Chlamydienstämme vorkommende Lipopolysaccharid und wird mit blauem Licht sichtbar gemacht. Bestandteile des Zytoplasmas wurden mit dem enthaltenen Evans Blue-Farbstoff gegengefärbt und leuchten rot, wenn sie mit grünem Licht angeregt werden.

Während der Anzucht der Chlamydien wurden zur Infektionskontrolle und für die Titerbestimmung infizierte BGM, die in Deckgläsern kultiviert worden waren, mittels Immunfluoreszenzfärbung überprüft. Zum Bestimmungszeitpunkt wurde das Medium aus den Röhren entfernt und 1 ml Methanol zur Fixierung hinzugegeben. Nach 10 Minuten Einwirkzeit wurde das Deckglas mit einer gebogenen Pinzette aus dem Röhren entnommen. Dieses wurde mit dem Mikroskopierkleber Entellan auf einen Objektträger geklebt. Die infizierten BGM-Zellen wurden dann nach Anweisung des Herstellers mit dem IMAGEN Chlamydien-Kit gefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop bewertet.

Humane und bovine monozyten-gereifte Makrophagen wurden in 24 Well-Platten kultiviert und mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* beziehungsweise *C. muridarum* infiziert (MOI 1, 2, 5). Es wurde immer eine nicht-inokulierte Negativkontrolle mitgeführt. Nach 4, 24 und 48 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS pro Well gespült. Zur Fixierung der Zellen wurde 1 ml Methanol pro Well hinzugefügt und 10 min inkubiert. Das Methanol wurde entfernt und die Zellen wurden nach Anweisung mit dem IMAGEN-Chlamydien-Kit gefärbt. Zusätzlich wurde der Zellkern mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht. DAPI bindet an AT-reiche Regionen der DNA und fluoresziert nach Anregung mit ultraviolettem Licht blau. 50 µl einer 1:500 verdünnten DAPI-Lösung wurden auf die Zellen gegeben und für 2 bis 3 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden dann mit PBS gespült und zeitnah mit einem Fluoreszenzmikroskop fotodokumentiert und ausgewertet. Es wurde eine semiquantitative Auswertung vorgenommen. Dazu wurde das gesamte Deckglas systematisch betrachtet und eine prozentuale Einschätzung der Fluoreszenzsignale pro Zelle vorgenommen.

### 3.7.3 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM)

Für die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie wurden humane und bovine monozyten-gereifte Makrophagen in einer Konzentration inokuliert, die eine gute Infektionsrate zu den Probenahmezeitpunkten 24 und 48 Stunden versprach. Dazu wurden die unterschiedlichen Entwicklungsgeschwindigkeiten der einzelnen Chlamydienspezies in den verschiedenen Wirtszellen beachtet. *C. psittaci* und *C. muridarum* konnten in Vorversuchen bei einer Konzentration von MOI 5 mittels IFT detektiert werden. *C. pneumoniae* wurde mittels IFT bei MOI 5 nicht detektiert, daher galten hier die Konzentrationen, die zur Vermehrung der Chlamydien in BGM verwendet wurden (3.4.2) als Orientierung. Für die Auswertung wurden ebenfalls Negativkontrollen eingereicht. 24 und 48 Stunden nach der Inokulation wurde das Medium abgesaugt und mit 4 ml Glutaraldehyd (2,5% in Cacodylatpuffer, 0,1 M, pH 7,2) pro 6 Well ersetzt. Die Zellen wurden dann zum Fixieren 2 Stunden verschlossen bei 4°C inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden die Makrophagen vorsichtig von ihrem Untergrund

gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde in passende Zentrifugenröhrchen gefüllt und 5 min bei 1500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Pellet in 1ml Cacodylatpuffer resuspendiert und anschließend 5 min bei 1500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 1ml frischer Cacodylatpuffer auf das Pellet gegeben. Die Aufbewahrung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei 4°C.

Die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte durch die Arbeitsgruppe Pathologie und Elektronenmikroskopie des Friedrich-Loeffler-Instituts unter Leitung von Prof. Liebler-Tenorio. Die zugrunde liegende Methode stelle ich nun kurz dar.

Es folgte eine Einbettung der Zellen in Agarose und das Zuschneiden des entstandenen Pellets für die Araldite-Einbettung. Von den bei der Einbettung entstandenen Blöckchen wurden zunächst Semidünnschnitte angefertigt und lichtmikroskopisch die geeigneten Areale für die Untersuchung im Elektronenmikroskop ausfindig gemacht. Von diesen Bereichen wurden Ultradünnschnitte angefertigt, kontrastiert und anschließend im Transmissions-Elektronenmikroskop betrachtet und fotodokumentiert. Die Aufnahmen wurden anschließend besprochen und mir dann zur Verfügung gestellt. Die grafische Aufarbeitung erfolgte ebenfalls durch die Arbeitsgruppe von Prof. Liebler-Tenorio.

### **3.8 Stimulation der monozyten-gereiften Makrophagen mit Interferon gamma und/oder Lipopolysacchariden**

Humane und bovine monozyten-gereifte Makrophagen wurden mit Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) und E.coli Lipopolysaccharid O111:B4 (LPS) stimuliert, um zu ermitteln ob und inwiefern die Makrophagen in der Lage sind auf immunogene Reize zu reagieren. Dazu wurden 50, 100 und 200 Units (U) IFN $\gamma$  und 0,1, 1, 5, 10, 50 und 100  $\mu$ g/ml LPS in das Medium der humanen Makrophagen gegeben. Des Weiteren wurde ein Gemisch aus IFN $\gamma$  und LPS eingesetzt (50/10, 50/50, 50/100; 100/10, 100/50, 100/100; 200/10, 200/50, 200/200). Die Substanzen wirkten zwei und 24 Stunden bei 37°C und 5% CO $_2$  ein. Von diesen Proben wurde ein NO-Assay gemacht. Die reaktivsten Konzentrationen wurden für eine durchflusszytometrische Analyse eingesetzt (IFN $\gamma$  50 U, LPS 10  $\mu$ g/ml, 50/10, 50/100). Mit 5  $\mu$ g/ml LPS wurden humane Makrophagen für eine folgende mRNA-Analyse stimuliert. Hier wurden äquivalent zu dem Versuchsdesign nach 4, 24 und 48 Stunden Proben für die quantitative real-time reverse Transkriptase (RT)-qPCR genommen.

Bovine Makrophagen wurden mit 6  $\mu$ g/ml LPS stimuliert und Proben für die Quantitative *real-time* reverse Transkriptase (RT)-qPCR wurden nach 3 und 24 Stunden genommen [K.Sobotta].

### **3.9 Molekularbiologische Untersuchungen**

#### **3.9.1 DNA-Isolation**

Mit *Chlamydia (C.) pneumoniae*, *C. psittaci* beziehungsweise *C. muridarum* inokulierte humane und bovine Makrophagen und BGM wurden nach 4, 24 und 48 Stunden für die Quantifizierung der chlamydialen DNA in den Zellen und im Überstand geerntet. Dazu wurde das Medium abgenommen, in sterile Eppis gefüllt und bei -20°C eingefroren. Um eventuelle Chlamydieneinschlüsse nicht zum Platzen zu bringen, wurde auf eine Waschung der adhärennten Zellen verzichtet. Zu den Makrophagen wurden 0,5 (24 Well) bis 1 (6 Well) ml

Accutase gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurden die Zellen mit einem Zellschaber von ihrer Unterlage gelöst und in Accutase aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann 5 min bei 3500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bei -20°C eingefroren.

Um eine DNA zu erhalten, die frei von störenden Faktoren wie Proteinen, Enzymen und Salzen ist, wurde die DNA mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) gereinigt und isoliert. Das Kit wurde wie im mitgelieferten Handbuch beschrieben angewendet. Die isolierten Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

### 3.9.2 mRNA-Isolation

Für die Untersuchung des Zytokinprofils der inokulierten humanen und bovinen Makrophagen wurde mRNA gewonnen. Sie wurde ebenfalls zur Untersuchung auf chlamydiale Virulenzfaktoren genutzt. Es wurden bei jedem Versuch eine nicht inokulierte Negativkontrolle und mock-Inokulationen mitgeführt. Für die mock-Inokulation wurde eine Chlamydienanreicherung ohne Chlamydien durchgeführt und die daraus resultierende Suspension bei -20°C eingefroren. In den Versuchen wurden dann äquivalent zum Studiendesign Konzentrationen (MOI1, 2, 5) der mock-Suspensionen eingesetzt. Der Überstand der inokulierten humanen und bovinen Makrophagen wurde nach 4, 24 und 48 Stunden verworfen. Zu den Zellen wurden 350 µl RLT-Puffer aus dem RNeasy-Mini Kit (Quiagen) mit Merkptoethanol (10 µl ME auf 1 ml RLT) gegeben. Die Suspension aus Zellen und RLT-Puffer wurde in Eppendorftubes überführt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Auch die mRNA wurde von Proteinen, Salzen, Zellresten und Enzymen gereinigt. Dazu wurde das RNeasy-Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die gereinigten Proben wurden zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

### 3.9.3 Photometrische Bestimmung der RNA/DNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Nukleinsäuren wurde mittels spektrophotometrischer Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge ( $\lambda$ ) von 260 nm bzw. 230 nm und 280 nm bestimmt. Bezogen auf eine Küvettschichtdicke von 1 cm entsprach eine Absorption von 1 OD bei 260 nm ca. 40 µg/ml einzelsträngige RNA (ssRNA) bzw. 50 µg/ml doppelsträngige DNA (dsDNA). Zur Bestimmung der Konzentration wurden 2 µl der Probe in destilliertem, RNase-freiem Wasser gemessen. Die RNA- bzw. DNA-Konzentrationen für die jeweiligen Proben wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\mu\text{g Nukleinsäure/ml} = \text{Absorption } 260\text{nm} \times \text{Verdünnung} \times K$$

(K = Konstante für optische Dichte, 1 OD = 40 µg/ml für ssRNA oder 50 µg/ml für dsDNA)

Da Proteine bei 280 nm absorbieren, kann man die Reinheit der isolierten RNA anhand des Absorptions-Verhältnisses A260/A280 kontrollieren. Der Quotient sollte bei reiner RNA ca. 2,0 betragen. Eine hohe Absorption bei 230 nm reflektiert Verunreinigungen durch Kohlenhydrate, Peptide, Phenole oder andere aromatische Verbindungen. Bei einer reinen Probe sollte der Quotient A260/A230 größer 2,0 sein. Es wurden ausschließlich Proben mit einer mRNA-Reinheit von 1,8-2,2 (A260/A280) und über 2 (A260/A230) verwendet.

### 3.9.4 Quantitative *real-time* PCR

Die Quantifizierung der *Chlamydiaceae* 23S rRNA erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR, anhand einer FAM-gekoppelten Sonde gegen das 23S rRNA-Gen (Tabelle 8) nach (Ehrlich, Slickers et al. 2006). Die PCR wurde in 25 µl Reaktionsansätzen mit je 300 nM Primer F und Primer R sowie 200 nM der 23S-Sonde unter Verwendung des TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems), entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Als interne Amplifikationskontrolle (IC) diente eine HEXmarkierte Sonde (Hoffmann, Depner et al. 2006). Für die Amplifikationskontrolle wurden pro Ansatz 0,25 µl IC Template-DNA sowie je 100 nM IC Primer F und Primer R und 50 nM IC Sonde mitgeführt.

Die Quantifizierung erfolgte nach dem in Tabelle 6 dargestellten Temperaturprofil mittels einer Standardkurve, die für jede Chlamydienspezies (*C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. muridarum*) individuell ermittelt wurde. Dafür wurden Verdünnungsreihen aus Chlamydienkonserven der eingesetzten Spezies mit bekanntem Titer angelegt und bei jeder PCR mitgeführt. Für die erhaltenen *threshold cycle* (Ct)-Werte wurden mit Hilfe dieses Standards und des jeweiligen Zellstandards (BGM, human, bovin) die Einschlussbildenden Einheiten (inclusion forming units, IFU) pro Zelle bestimmt. Für die Zellstandards wurden ebenfalls aus Proben mit bekannter Zellzahl Verdünnungsreihen angelegt. Die Werte aus den Überständen wurden ohne Zellstandard berechnet.

**Tabelle 6 Temperaturprofile für die quantitative *real-time* PCR zum Nachweis der *Chlamydiaceae* 23S rRNA**

Schritt	Zeit	Temperatur
Uracil-N-Glykosylase-Inkubation	2 min	50 °C
Aktivierung der Taq DNA-Polymerase	10 min	95 °C
Denaturierung	15 sec	95 °C
Annealing & Elongation	1 min	60 °C

} 45x

### 3.9.5 Quantitative *real-time* reverse Transkriptase (RT)-PCR

Die RT-PCR ist für die Quantifizierung der mRNA-Expression die Technik der Wahl. Von großem Vorteil ist, dass sie eine hohe Sensitivität besitzt und damit den Nachweis selbst kleinster Transkriptmengen erlaubt. Zur Erstellung des Zytokinprofils wurden für die humanen monozyten-gereiften Makrophagen QuantiTect Primer Assays von Qiagen verwendet. Sie zeichneten sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus und machten zeitaufwendige Primeraustestungen unnötig. Die QuantiTect Primer Assays enthielten lyophilisierte forward and reverse Primer für ein bestimmtes Gen. Die Primer wurden in TE-Puffer (pH 8,0) gelöst, um eine 10x Primerlösung zu erhalten. Es wurde das QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit verwendet. Die isolierten Proben wurden nach Anweisung des Herstellers verdünnt. Pro Reaktionsansatz wurden 25 µl Mastermix, 5 µl 10x QuantiTect Primer Assay, 0,5 µl QuantiTect RT Mix, unter 10 ng RNA-Probe und x µl RNase freies Wasser verwendet. Es wurden insgesamt 50 µl eingesetzt. Die Amplifikation und Detektion der spezifischen Produkte erfolgte im Mx3000P Thermocycler System (Agilent) (Tabelle 7).

Die detektierten Fluoreszenzsignale wurden als sigmoidaler Amplifikationsplot in Abhängigkeit von der Zykluszahl im Programm MxPro4 dargestellt.

**Tabelle 7 Temperaturprofil für eine one-step RT-PCR unter Verwendung des QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit**

Schritt	Zeit	Temperatur
Reverse Transkription	30 min	50°C
Aktivierung HotStarTaq DNA Polymerase, Ende der reversen Transkription, Denaturierung von cDNA	15 min	95°C
Denaturierung	15 sec	94°C
Annealing	30 sec	55°C
Extension	30 sec	72°C
Schmelzkurvenanalyse	1 min	95°C
	30 sec	55°C
	30 sec	95°C

### 3.9.6 Quantifizierung der mRNA

Die Quantifizierung der mRNA erfolgte mit den Ct-Werten. Der Ct-Wert ist die Zykluszahl, bei der der Schwellenwert (threshold) erreicht ist. Dieser wurde für jedes Transkript nach Pfaffl bestimmt (Pfaffl 2001). Der Schwellenwert ist eine definierte Fluoreszenzintensität, die deutlich über der Hintergrundfluoreszenz des ungebundenen Farbstoffes liegt. Der threshold cycle (Ct-Wert) kann als Grundlage für die relative Quantifizierung verwendet werden, da er mit der Menge der eingesetzten Ziel-mRNA-Moleküle korreliert (Wilhelm and Pingoud 2003). Die Ergebnisse der quantitativen *real-time* RT-PCR wurden mit der relativen Quantifizierung ausgewertet. Dabei wird das Zielgen mit einem endogenen Standard normalisiert. Als endogener Standard dienen Gene, die während des Experiments nicht reguliert werden und in allen Zelltypen vorkommen. Für die humanen monozyten-gereiften Makrophagen wurden die Referenzgene GAPDH und  $\beta$ -Aktin eingesetzt. Für sie wird postuliert, dass sie in allen Geweben vorkommen und dass sie sehr stabil sind, wobei GAPDH eine höhere Streuung aufweist. Aus den Ct-Werten der beiden Referenzgene wurde der Mittelwert gebildet. Sie wurden nicht reguliert, da die Ct-Werte der Mock-Kontrolle sich nicht signifikant von den mit Chlamydien stimulierten Makrophagen unterschieden (Anhang 1). Für die bovinen monozyten-gereiften Makrophagen wurde das Referenzgen GAPDH verwendet. Wie in Anhang 2 zu sehen, wurde GAPDH während der Chlamydienstimulation nicht reguliert. Mit der Differenz zwischen den Ct-Werten des Targetgens und der endogenen Kontrolle wurde der delta Ct-Wert bestimmt. Relative Expressionsunterschiede der infizierten Zellen zu der Mock-Kontrolle wurden mit der 2-Ct-Methode nach Pfaffl berechnet (Pfaffl 2001; Schmittgen and Livak 2008). Dazu wurde der  $\Delta\Delta Ct$  bestimmt, indem der Ct-Wert der Mock-Kontrolle von dem Ct-Wert der stimulierten Probe abgezogen wurde. Dieser Wert wurde für die Formel nach Pfaffl herangezogen:

$$\text{Formel nach Pfaffl: } 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

Zur Darstellung relativer Expressionsunterschiede wurden die Werte der mock-Kontrolle 1 gesetzt und mit dem Ergebnis aus der Formel dividiert.

Das bakterielle Expressionsniveau pro Chlamydie wurde mit dem 16S-Gen normalisiert. Expressionsveränderungen der chlamydialen Proteine (Tabelle 8) wurden gegenüber einer gleichwertigen BGM-Infektion beziehungsweise gegenüber dem Inokulum ermittelt.

## MATERIAL UND METHODEN

Zur Kontrolle der Spezifität der entstandenen Produkte wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Effizienz der verwendeten humanen Primer (siehe 3.1.4) wurde vom Hersteller (Qiagen) garantiert.

**Tabelle 8 Übersicht der verwendeten chlamydialen Primer für die quantitative real-time RT-PCR**

Es werden die forward (F)- und reverse (R)-Primer der jeweiligen Gene angegeben. TA: Annealingtemperatur; TS: Schmelztemperatur der Amplifikate; bp: Basenpaare; Rf: Referenz; nb: nicht bestimmt

Gen	Sequenz (5'→3')	Accession Rf, NCBI-Nr	T <sub>A</sub> (°C)	Länge (bp)	T <sub>S</sub> (°C)
23S rRNA	<b>F:</b> CTGAAACCAGTAGCTTATAAGCGGT <b>R:</b> ACCTCGCCGTTTAACTTAACTCC	(Goellner, Schubert et al. 2006)	58		nb
16S rRNA	<b>F:</b> CTTGTACACACCGCCCGTC <b>R:</b> GCCCAACCTAGTCAAACCGTC	(Goellner, Schubert et al. 2006)	58	201	nb
groEL	<b>F:</b> CAACAGGTAGCAGAATCCGGA <b>R:</b> CTCTTCGCTGATAAGTTGGCAA	(Goellner, Schubert et al. 2006)	58	201	80
IncA	<b>F:</b> CATGTGGAGGAAAGTCGCG <b>R:</b> CCCTGATCTGCCGTTTCTGT	(Goellner, Schubert et al. 2006)	58	251	nb
cpaf	<b>F:</b> CGCACCCCTGAGCATCGTTA <b>R:</b> AAGACAAAACCCCGCTCCT	(Goellner, Schubert et al. 2006)	57	151	nb
ftsw	<b>F:</b> TTGTTCCCTGCGTCGCTATC <b>R:</b> AAAAGCTATTACGGCTGCGGA	(Goellner, Schubert et al. 2006)	57	151	nb
rpoN	<b>F:</b> AATAAGACACTGGCAGGCCCT <b>R:</b> ATTGGATGCCCTGCTGTGA	NC_004552	57	187	78

Die Effizienz der bovinen Primer (Tabelle 9) wurde mit einer seriellen Verdünnungsreihe kontrolliert. Die Ct-Werte wurden dann in einer Standardkurve gegenüber den eingesetzten RNA-Mengen aufgetragen. Der Anstieg der Regressionsgeraden korreliert mit der Effizienz der PCR-Reaktionen und sollte möglichst gleichmäßig und zwischen den verschiedenen Primern parallel verlaufen.

**Tabelle 9 Übersicht der verwendeten bovinen Primer für die quantitative real-time RT-PCR**

Es werden die forward (F)- und reverse (R)-Primer der jeweiligen Gene angegeben. T<sub>A</sub>: Annealingtemperatur; T<sub>S</sub>: Schmelztemperatur der Amplifikate; bp: Basenpaare

Gen	Sequenz (5'→3')	Accession NCBI-Nr.	T <sub>A</sub> (°C)	Länge (bp)	T <sub>S</sub> (°C)
GAPDH	<b>F:</b> ATCTCTGCACCTTCTGCCGAT <b>R:</b> TGGACGGTGGTCATAAGTCCCT	EU195062	58	176	85
IL-1 $\beta$	<b>F:</b> CGTACCTGAACCCATCAACGA <b>R:</b> CAGGTGTTGGATGCAGCTCTT	EU276067	56	106	79
IL-6	<b>F:</b> AGCAAGGAGACACTGGCAGAA <b>R:</b> CTGATCAAGCAAATCGCCTG	EU276071	56	101	78
IL-12p40	<b>F:</b> AGCCTGCTTATTGAGGTCGTG <b>R:</b> GGTTTGATGATGTCCCTGATGA	EU276076	55	92	80
iNOS	<b>F:</b> CACGATCCTCTTTGCAACAGAG <b>R:</b> GATCCATGCAGAGAACCTTGG	DQ676956	56	104	85
TNF $\alpha$	<b>F:</b> TAGCCACGTTGTAGCCGA <b>R:</b> TGGTTGTCTTCCAGCTTCA	EU276079	56	103	86

### 3.10 Photometrische beziehungsweise fluorometrische Analysen

#### 3.10.1 Nitrit-Nachweis mittels Griess-Reagenz

Ein wichtiger Abwehrmechanismus von Makrophagen ist die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthese. Die genaue Reaktion wurde bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben. Ein dominantes Produkt dieser Reaktion ist Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) und kann mit der Griess-Reaktion leicht nachgewiesen werden. Das Griess Reagenz von Sigma Aldrich enthält N-2-Aminoethyl-1-naphthylamine Dihydrochlorid. Dieses Reagenz färbt sich rot, wenn es mit NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in Berührung kommt. Für die Bestimmung des Nitritgehaltes in unseren Proben wurde eine Standardkurve aus Natriumnitrit erstellt. Verdünnungsstufen von 0 bis 100  $\mu$ M wurden eingesetzt. Überstände aus den Infektionsversuchen und der IFN $\gamma$ /LPS-Stimulation wurden auf Nitrite überprüft. Dazu wurde das Griess Reagenz nach Herstelleranweisung in destilliertem Wasser gelöst. Die Überstände wurden aufgetaut, gevortext und 50  $\mu$ l für je eine Reaktion verwendet. Jede Probe wurde doppelt bestimmt. Nach dem auch der Standard auf eine 96 Well-Platte aufgetragen worden war, wurden je 50  $\mu$ l Griess Reagenz pro Well zugefügt. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption mit dem Tecan Sunrise Absorptionsreader bei 540 nm gemessen und mit der Magellan-Software ausgewertet. Für die Proben von humanen und bovinen Makrophagen wurde je eine gemittelte Standardkurve berechnet, da mehrere Platten gemessen werden mussten. Die Negativkontrolle wurde abgezogen, um eine Erhöhung der Nitritwerte zu erkennen. Die Ergebnisse wurden in NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pro ml angegeben.

### 3.10.2 Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay

Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein lösliches Enzym, das sich im Zytosol der Zelle befindet. Bei einem Zellschaden oder der Zellyse wird es in das umgebene Medium freigesetzt. Diese Prozesse treten während der Apoptose und der Nekrose auf. Die LDH-Aktivität im Medium kann als Indikator für die Zellmembranintegrität eingesetzt werden. Damit kann die Zytotoxizität der Chlamydien in Bezug auf die humanen und bovinen Makrophagen überprüft werden. Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurde das LDH Cytotoxicity Assay Kit von Biomol verwendet. Ein Zellstandard wurde nach dem Protokoll des Herstellers hergestellt. Die Proben aus den Infektionsversuchen mit den humanen und bovinen Makrophagen wurden aufgetaut, gevortext und je 100 µl in Dreifachbestimmung auf eine 96 Well-Platte aufgetragen. Die verschiedenen Reaktionskomponenten wurden nach Herstellerangaben hinzugefügt. Die Platte wurde dann 30 min auf einem Schüttler inkubiert und die Absorption wurde mit dem Tecan Sunrise Absorptionsreader bei 490 nm gemessen. Die Daten wurden mit der Magellan-Software ausgewertet. Für die Proben von humanen und bovinen Makrophagen wurde je eine gemittelte Standardkurve berechnet, da mehrere Platten gemessen werden mussten. Die totale LDH-Aktivität in µU/ml wurde berechnet. Für alle Proben existieren lichtmikroskopische Aufnahmen. Als Positivkontrolle (100% der Zellen sind Tot) wurde der Wert genommen, bei dem lichtmikroskopisch alle Zellen zerstört waren. Alle weiteren Ergebnisse wurden dazu ins Verhältnis gesetzt.

### 3.10.3 Bestimmung von freien Sauerstoffradikalen (ROS) und Superoxid (SOX)

Makrophagen können als Abwehrreaktion gegen Eindringlinge, wie Bakterien, den „respiratory burst“ auslösen (siehe 1.2.2). Zu den Produkten dieser Reaktion gehören freie Sauerstoffradikale (ROS), wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), Hydroxylradikale ( $HO\cdot$ ), Stickstoffmonoxid (NO), Peroxyradikale ( $ROO\cdot$ ) und Superoxid ( $O_2\cdot^-$ ). Diese ROS können mit dem Total ROS/Superoxide detection kit for microplates von Enzo bestimmt werden. ROS werden mit einem grün-fluoreszierenden Farbstoff und Superoxid (SOX) mit einem orange-fluoreszierenden Farbstoff markiert. Dafür wurden humane monozyten-gereifte Makrophagen in einer schwarzen Advanced TC 96 Well-Platte mit klarem Boden und Deckel kultiviert. Nach 6-8 Tagen der Kultivierung wurden die Makrophagen von je 6 unterschiedlichen Spendern mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* beziehungsweise *C. muridarum* inokuliert (MOI1, 2, 5, Negativkontrolle MOI0, Doppelbestimmung). Messungen fanden 4, 24 und 48 Stunden nach der Inokulation statt. Für alle Zeitpunkte wurden separate Zellen in Doppelbestimmung kultiviert und inokuliert. Die Färbungen wurden nach den Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden immer 2 extra Negativkontrollen (ROS-Hemmer mit und ohne Infektion) und eine Positivkontrolle (ROS-Auslöser) mitgeführt. Die Fluoreszenzsignale wurden mit dem INFINITE 200 PRO-Multifunktionsreader von Tecan ausgelesen. ROS wurden bei einer Extinktion von 488 nm und einer Emission von 520 nm bestimmt. Für die Messung von SOX wurden die Einstellungen Extinktion 550 nm und Emission 610 nm vorgenommen. Die Daten wurden mit der Magellan-Software ausgewertet. Der „fluorescence mean“ der nicht-infizierten Zellen wurde 1 gesetzt und das Verhältnis der Werte der infizierten Zellen dazu wurde bestimmt.

### 3.11 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können Zellen vereinzelt auf Fluoreszenzsignale überprüft werden. Fluoreszenzmarkierte spezifische Antikörper binden mit den spezifischen Antigenen auf der Zelle und führen nach Stimulation mit einem Laser zu einem Signal. Somit kann man zum Beispiel das Antigen-Expressionsprofil bestimmter Zellen bestimmen und sie daraufhin charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die unstimulierten humanen monozyten-gereiften Makrophagen anhand ihres Antigen-Expressionsprofils charakterisiert. Daraufhin wurde überprüft, ob sich dieses Antigen-Expressionsprofil während einer Stimulation mit IFN $\gamma$  und/oder LPS verändert. Hierfür wurden die Proben mit 50 U IFN $\gamma$ , 10  $\mu$ g/ml LPS, einem Gemisch aus 50 U IFN $\gamma$  und 10  $\mu$ g/ml LPS und einem Gemisch aus 50 U IFN $\gamma$  und 100  $\mu$ g/ml LPS stimuliert und nach einer Stimulationszeit von 24 Stunden analysiert. Im Zentrum der durchflusszytometrischen Untersuchungen stand die Erstellung des Antigen-Expressionsprofils der humanen monozyten-gereiften Makrophagen, die mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* beziehungsweise *C. muridarum* inokuliert worden waren. Die Inokulation erfolgte wieder mit den Konzentrationen MOI0, 1, 2 und 5. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte 4, 48 und 72 Stunden nach der Inokulation. Folgende fluoreszenzmarkierte Antikörper kamen zum Einsatz:

**Tabelle 10** Liste der in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper.

CD: Cluster of Differentiation, PE: Phycoerythrin, FITC: Fluorescein-Isothiocyanat

Antigen	Farbstoff
CD1a	PE
CD3	PE
CD44	PE
CD64	PE
CD163	PE
CD206	PE
MHCII	PE
TLR-4	PE
CD11c	FITC
CD14	FITC
CD19	FITC
CD40	FITC
CD68	FITC
CD80	FITC
CD86	FITC
MHCI	FITC

Zur Überprüfung der Spezifität der positiven Signale wurden spezifische Isotypkontrollen eingesetzt. Als Isotypkontrollen werden Antikörper bezeichnet, die den gleichen Subtyp aufweisen, wie der markierende Antikörper. Er wurde in der gleichen Spezies generiert, bindet aber nicht das spezifische Antigen auf der Zielzelle. Folgende Isotypkontrollen wurden eingesetzt: IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG2a-FITC, IgG2a-PE. Um nur die lebenden Zellen in die Auswertung miteinzubeziehen, wurde jede Probe zusätzlich mit einem Lebend/Tod-Farbstoff gefärbt. Dazu wurde der Fixable Viability Dye von eBioscience eingesetzt. Die zu testenden

Zellen wurden mit Accutase, 4°C kaltem PBS und einem Zellschaber vorsichtig von ihrem Untergrund gelöst. Die Zellsuspension wurde in silikonisierte Glasröhrchen überführt und zwei Mal mit PBS gewaschen (10 min, 300xg). Die Zellen wurden dann in 1 ml PBS gelöst und in 1 spezielles Röhrchen (BD) für die Durchflusszytometrie überführt. 1 µl Fixable Viability Dye wurde in einer 1:1-Verdünnung zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4°C wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen (5 min, 300xg). Die Zellen wurden in 1 ml PBS aufgenommen. Davon wurden je 100 µl in höchstens 10 spezielle Röhrchen überführt. Als nächstes wurde je 1 markierter Antikörper in 1 Röhrchen pipettiert und 30 min, bei Raumtemperatur, im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden wieder mit PBS gewaschen und dann mit je 1 ml 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min, bei Raumtemperatur, im Dunkeln wurden die Zellen ein letztes Mal mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Röhrchen wurden für die durchflusszytometrische Analyse mit 100µl PBS aufgefüllt. Vor der Messung wurde das Gerät FACSCanto mit markierten Zellen für jede Farbstoffkombination kompensiert. Die Auswertung erfolgte mit der FACSDiva-Software. Die geomean-Werte der nicht-stimulierten Proben wurden 100% gesetzt und die der stimulierten Makrophagen dazu in Bezug genommen. Für die Charakterisierung der unstimulierten humanen Makrophagen wurden Histogramme der passenden Isotypkontrollen denen der markierten Antikörper gegenübergestellt.

### **3.12 Bestimmung der Infektiosität der Chlamydien nach Isolation aus monozyten-gereiften Makrophagen**

Humane und bovine monozyten-gereifte Makrophagen von je 3 Spendern wurden mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* beziehungsweise *C. muridarum* in den Konzentrationen MOI1, 2 und 5 inokuliert. Nach 48h der Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Medium abgenommen und in ein steriles Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Makrophagen wurden in 1 ml Medium mit einem Zellschaber von ihrem Untergrund gelöst. Die Zellsuspension wurde ebenfalls in ein steriles Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden dann gründlich gevortext und 10 sec in Intervallschaltung mit Ultraschall behandelt, um die Chlamydien aus den Zellen zu isolieren. 100 bis 250 µl Zellsuspension und 50 bis 150 µl der Überstandssuspension wurden in Deckglasröhrchen gegeben, deren Deckgläser konfluent mit BGM bewachsen waren. Die eingesetzte Menge richtete sich nach den Ergebnissen der quantitativen Chlamydienbestimmung mittels *real-time* PCR aus den Versuchen mit monozyten-gereiften Makrophagen. Für schlechter wachsende Chlamydien wurde mehr eingesetzt als für die gut wachsenden. Die inokulierten Deckglasröhrchen wurden 1 Stunde bei 37°C bei 3400xg zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und 1 ml RPMI 1640 + 5% FKS wurde zugefügt. Die Röhrchen wurden für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die Deckglasröhrchen wurden dann mit dem IMAGEN-Chlamydien-Kit gefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop Leitz DM RBE von Leica ausgewertet. Es wurde eine semiquantitative Auswertung vorgenommen. Dazu wurde das gesamte Deckglas systematisch betrachtet und eine prozentuale Einschätzung der Fluoreszenzsignale pro Zelle vorgenommen.

### **3.13 Statistische Auswertungen**

Für die statistischen Analysen wurden die Softwareprogramme Microsoft Office Excel 2010, SPSS 22.0 und „R“ verwendet. Mit dem Statistikprogramm „R“ wurden die Boxplotgrafiken erstellt, alle anderen Grafiken mit Excel 2010. Es wurde eine Signifikanzgrenze von  $p \leq 0,05$

festgelegt. Das entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Für die Auswertung der Ergebnisse aus der quantitativen *realtime* RT-PCR wurde die Statistikberatung des Instituts für Biometrie und Informationsverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin in Anspruch genommen.

Die Verteilung der jeweiligen Daten wurde für einen ersten Eindruck mit einem Quantil-Quantil-Plot überprüft, in den die Residuen und die beobachteten Werte aufgetragen wurden. Ergab sich dabei eine Gerade, waren die Daten normalverteilt. Die Verteilung der Daten wurde zusätzlich mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Die Nullhypothese besagt bei diesem Test, dass eine Normalverteilung vorliegt. Die Alternativhypothese besagt, dass keine Normalverteilung vorliegt. Das bedeutet: kann bei diesem Test eine Signifikanz ( $p < 0,05$ ) festgestellt werden, so liegt keine Normalverteilung vor.

Normalverteilte ungepaarte Daten wurden mit einer Univariaten Varianzanalyse (ANOVA) auf signifikante Unterschiede überprüft. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass viele Werte auf einmal betrachten werden können und Korrelationen zwischen den Einflussfaktoren aufgezeigt werden. Wenn im Test für Zwischensubjekteffekte bereits Signifikanzen zu erkennen waren, wurde eine Post Hoc - Analyse in Verbindung mit Tukey's HSD test angeschlossen, um zu überprüfen zwischen welchen Gruppen der Einflussfaktoren die Signifikanzen auftraten. Für den Einflussfaktor Stamm zum Beispiel wurden immer 3 Gruppen miteinander verglichen: *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. muridarum*. Der Tukey-Test ist ein eher konservativer Test.

Einfache Analysen, wie der Unterschied zur Negativkontrolle wurden bei Normalverteilung mit dem Einstichproben t-Test untersucht. Es wurde immer ein 2 seitiger Test verwendet. Normalverteilte gepaarte Daten wurden ebenfalls mit dem T-Test auf signifikante Unterschiede überprüft.

Nicht-Normalverteilte ungepaarte Daten wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test auch U-Test genannt auf signifikante Unterschiede überprüft. Gepaarte Daten wurden erst mit dem Friedmann-Test auf Gruppensignifikanzen untersucht. Traten hier signifikante Unterschiede auf wurde ein paarweiser U-Test angeschlossen, um zu überprüfen zwischen welchen Gruppen der Einflussfaktoren diese Signifikanzen auftraten. Um die Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen zu neutralisieren, wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Daten, die für den Vergleich zwischen den Zeitpunkten eingesetzt wurden als gepaarte Daten angesehen. Für die Berechnung des Unterschieds zur Negativkontrolle wurden ebenfalls gepaarte Daten angenommen. Die Daten für die Vergleiche zwischen den bovinen und humanen Zellen, den Konzentrationen (MOI) und den Chlamydienspezies wurden als ungepaarte Daten eingestuft.

4. ERGEBNISSE

4.1 Replikation und Überleben von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* in humanen und bovinen monozyten-gereiften Makrophagen

Zunächst sollte überprüft werden, ob die 3 Chlamydienspezies die Fähigkeit besitzen sich in humanen beziehungsweise bovinen Makrophagen zu replizieren. Dazu wurden die einschlussbildenden Einheiten pro Zelle beziehungsweise 2 ml Überstand mittels quantitativer *realtime* PCR bestimmt. Der Chlamydiengehalt im Überstand gibt Auskunft darüber, ob die Chlamydien in der Lage waren ihren Entwicklungszyklus vollständig zu durchlaufen und neu gebildete Elementarkörperchen aus der Zelle zu entlassen. Mittels Immunfluoreszenz konnte eine prozentuale Einschätzung des Infektionsgrades der Makrophagen mit Chlamydien durchgeführt werden. Des Weiteren war eine Beschreibung der Morphologie und Lage der chlamydialen Einschlüsse möglich. Mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie wurden tiefere Einblicke in die Chlamydienstruktur und die Bestimmung des vorliegenden Entwicklungsstadiums möglich. Auch die Lage der chlamydialen Einschlüsse innerhalb der Makrophagen und der zelleigenen Organellen konnte genauer bestimmt werden. Um die Infektiosität der Chlamydien nach der Re-Isolierung aus den Makrophagen zu evaluieren, wurden die Isolate auf BGM gegeben und die Replikation der Chlamydien mittels Immunfluoreszenz überprüft (Abbildung 8).

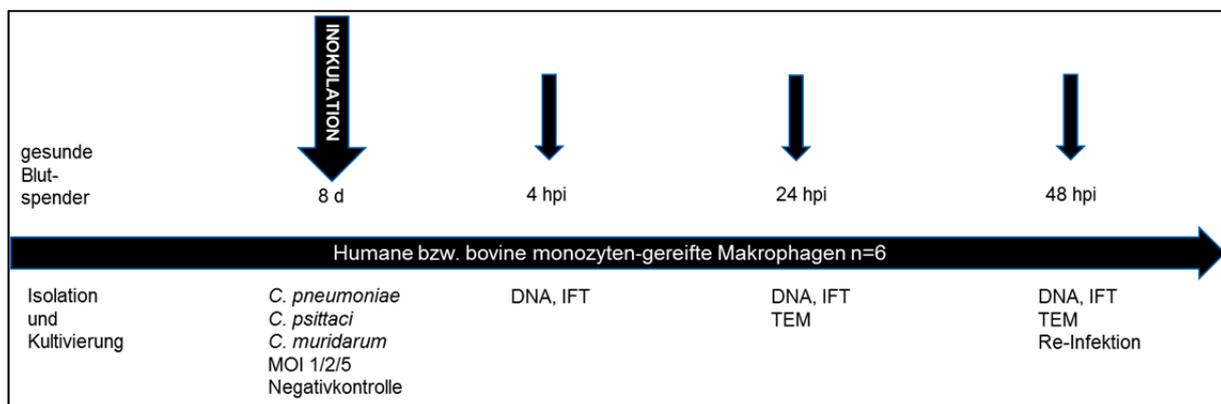


Abbildung 8 Schematische Darstellung des Versuchsverlaufes zum Thema Wachstum und Überleben der Chlamydien in humanen und bovinen Makrophagen

d: Tage nach der Isolation; hpi: Stunden nach der Inokulation; MOI: multiplicity of infection; IFT: Immunfluoreszenztest; TEM: Transmissionselektronenmikroskopie

4.1.1 Quantitative Bestimmung der Chlamydien mittels *realtime* PCR

Die Ergebnisse der *realtime* PCR wurden unter 4 Gesichtspunkten ausgewertet: 1. Die Replikation der Chlamydien in einem Zeitraum von 48 Stunden, 2. Vergleich der gebildeten ifu/cell von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. muridarum*, 3. Vergleich der chlamydialen ifu/cell in humanen und in bovinen MDM, 4. Vergleich der Replikation von Chlamydien in MDM mit der Replikation in nicht-immunkompetenten BGM.

1. In humanen und bovinen monozyten-gereiften Makrophagen (MDM), die mit *C. pneumoniae* inokuliert worden waren, konnte kein signifikanter Anstieg der einschlussbildenden Einheiten pro Zelle (inclusion forming units: ifu/cell) innerhalb von 48 h nach der Inokulation (hpi) beobachtet werden. Vielmehr stellte sich bei den humanen MDM eine Tendenz zur Verringerung der ifu/cell von 4 zu 24 zu 48 hpi dar. Es gab keinen Hinweis darauf, dass sich *C. pneumoniae* in humanen beziehungsweise bovinen MDM replizieren konnte (Abbildung 9).

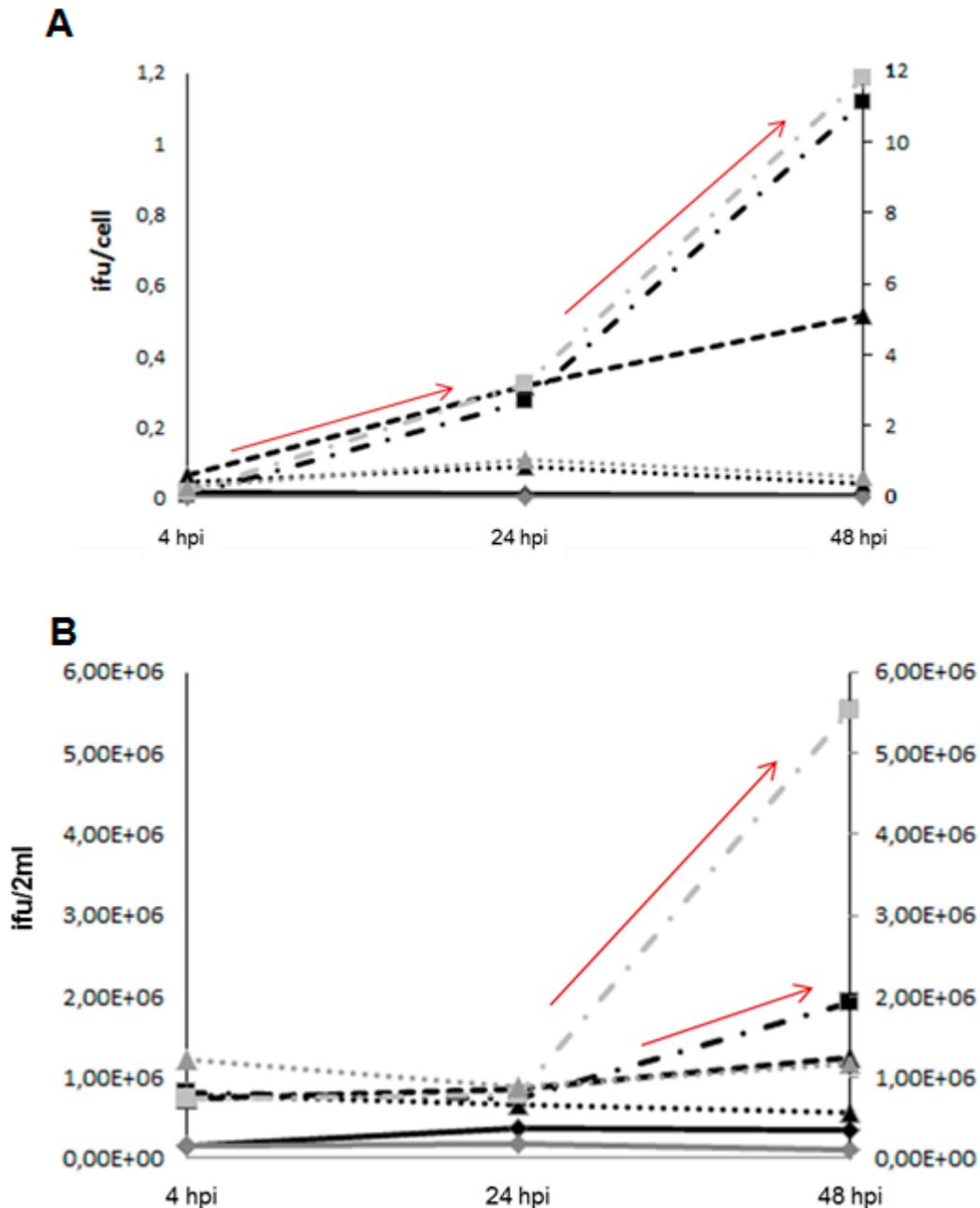
Im *C. psittaci*-Infektionsversuch konnte ein signifikanter Anstieg der ifu/cell für alle MOI zwischen 4 und 48 Stunden in humanen sowie in bovinen MDM gefunden werden ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 9A). Im Überstand der humanen beziehungsweise bovinen MDM, die mit *C. psittaci* inokuliert worden waren, wurde 48 Stunden nach der Inokulation ein signifikanter Anstieg der ifu/2 ml beobachtet (Abbildung 9B). Dies deutet darauf hin, dass *C. psittaci* dazu in der Lage war sich in den Makrophagen zu replizieren und Elementarkörperchen in den Überstand abzugeben.

Untersuchungen humaner MDM, die mit *C. muridarum* inokuliert worden waren, führten zu heterogeneren Daten. Daher, wurden die 8 Proben in 2 Gruppen aufgeteilt. Die *C. muridarum* low-Gruppe ( $n=4$ ), mit weniger ifu/cell und keinem signifikanten Anstieg der ifu/cell von 4 zu 24 zu 48 hpi. Und die *C. muridarum* high-Gruppe ( $n=4$ ), mit höheren ifu/cell und einem signifikanten Anstieg der ifu/cell von 4 zu 24 und 48 hpi ( $p < 0,1$ ). Zwischen 24 und 48 hpi konnte kein signifikanter Anstieg der ifu/cell berechnet werden. In bovinen MDM, die mit *C. muridarum* inokuliert worden waren, konnte kein signifikanter Anstieg der ifu/cell verzeichnet werden (Abbildung 9).

2. Die Inokulation von humanen MDM mit *C. pneumoniae*- und *C. muridarum* führte zu signifikant höheren ifu/cell nach 4 hpi, als die Inokulation mit *C. psittaci*. Im Gegensatz dazu wurden 24/48 hpi signifikant mehr ifu/cell in humanen MDM gefunden, die mit *C. psittaci* inokuliert worden waren, als in Zellen, die mit *C. pneumoniae* bzw. *C. muridarum* low inokuliert wurden. Es wurden signifikant weniger ifu/cell in humanen MDM, die mit *C. pneumoniae* inokuliert worden waren gemessen, als in Zellen, die mit *C. muridarum* inokuliert waren (außer *C. muridarum* low, 4 hpi).

In bovinen MDM wurden signifikant weniger ifu/cell von *C. pneumoniae* als von *C. psittaci* und *C. muridarum* gefunden. *C. psittaci* bildete in bovinen MDM signifikant mehr ifu/cell (48 hpi,  $p < 0,05$ ) als *C. muridarum* (Abbildung 10).

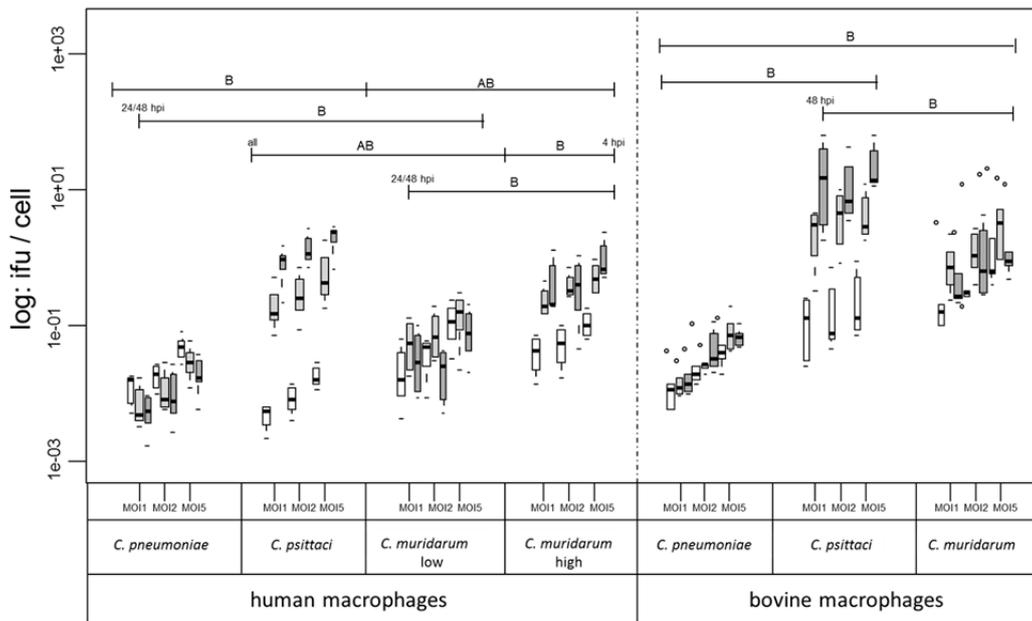
3. Der Gehalt der ifu/cell von *C. pneumoniae* in humanen und bovinen MDM schien auf den ersten Blick vergleichbar, war aber in bovinen MDM 24 und 48 hpi signifikant höher ( $p < 0,05$ ). *C. psittaci* konnte in bovinen MDM ungefähr 10 mal mehr ifu/cell ausbilden, als in humanen MDM ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 9). *C. muridarum* low zeigte in humanen MDM signifikant weniger ifu/cell als in bovinen MDM. *C. muridarum* high bildete vergleichbare Mengen an ifu/cell in humanen und bovinen MDM. Dennoch waren die ifu/cell in bovinen MDM 4 und 24 hpi signifikant höher als in humanen MDM (Abbildung 11).



**Abbildung 9 Replikationsdynamiken von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* in humanen und bovinen MDM**

Einschlussbildende Einheiten pro Zelle (ifu/cell) von *C. psittaci* waren 24 und 48 Stunden nach der Inokulation (hpi) signifikant ( $p < 0.05$ ) erhöht (rote Pfeile, A). Ifu/cell von *C. muridarum* high waren 24 hpi signifikant erhöht. (roter Pfeil, A). *C. pneumoniae* und *C. muridarum* (low, bovine MDM) zeigten kein signifikantes Wachstum in monozyten-gereiften Makrophagen. In den Überständen zeigte nur *C. psittaci* einen signifikanten Anstieg der ifu/2 ml (rote Pfeile, B). Die multiplicities of infection (MOI 1, 2, 5) wurden zu einem Wert zusammengefasst, nachdem statistische Analysen bestätigten, dass keine Korrelation zwischen Konzentration, Spezies, dem Zelltyp und die Zeitpunkte bestand (ANOVA). **Schwarze Linien: humane MDM, primäre y-Achse; Graue Linien: bovine MDM, sekundäre y-Achse; n=4-6**

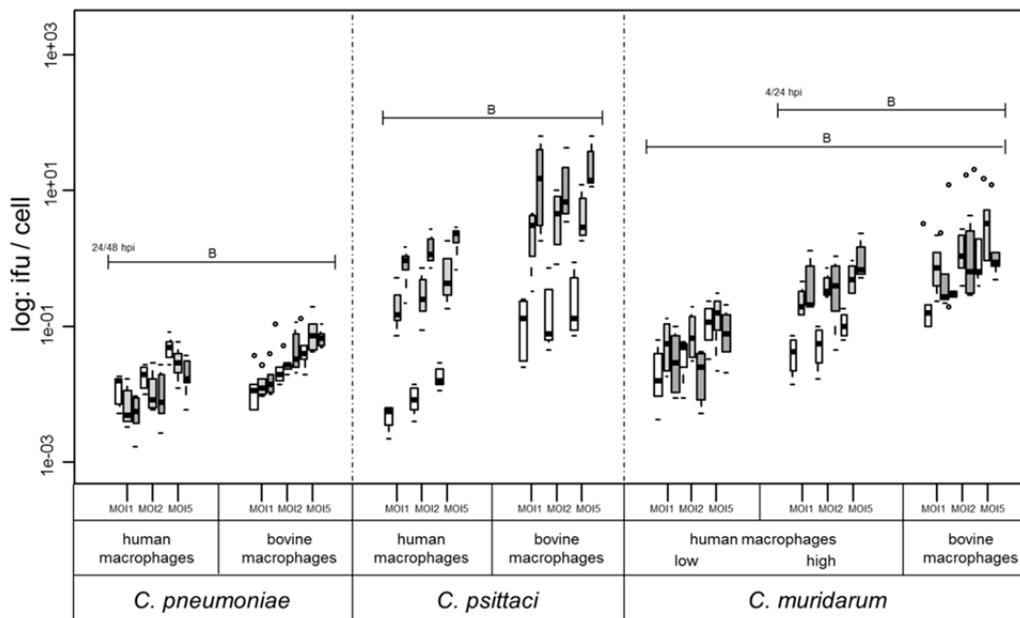
—◆— *C. pneumoniae*    —■— *C. psittaci*    ···▲··· *C. muridarum* low    -▲- *C. muridarum* high



**Abbildung 10** Einschussbildende Einheiten pro Zelle (ifu/cell) von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. muridarum* in humanen bzw. bovinen monozyten-gereiften Makrophagen (MDM)

Die Daten wurden mit quantitativer realtime PCR erstellt. Die Boxplots stellen die Daten mithilfe einer logarithmierten y-Achse dar. In jedem Infektionsversuch wurden 4-6 Spender involviert. A: p<0,1; B: p<0,05; AB: p<0,1 and p<0,05, °: einzelne Ausreißer, hpi: hours post inoculation

□: 4 hpi, ▤: 24 hpi, ▥: 48 hpi ;



**Abbildung 11** Vergleich der einschussbildenden Einheiten pro Zelle (ifu/cell) von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* in humanen und bovinen monozyten-gereiften Makrophagen (MDM)

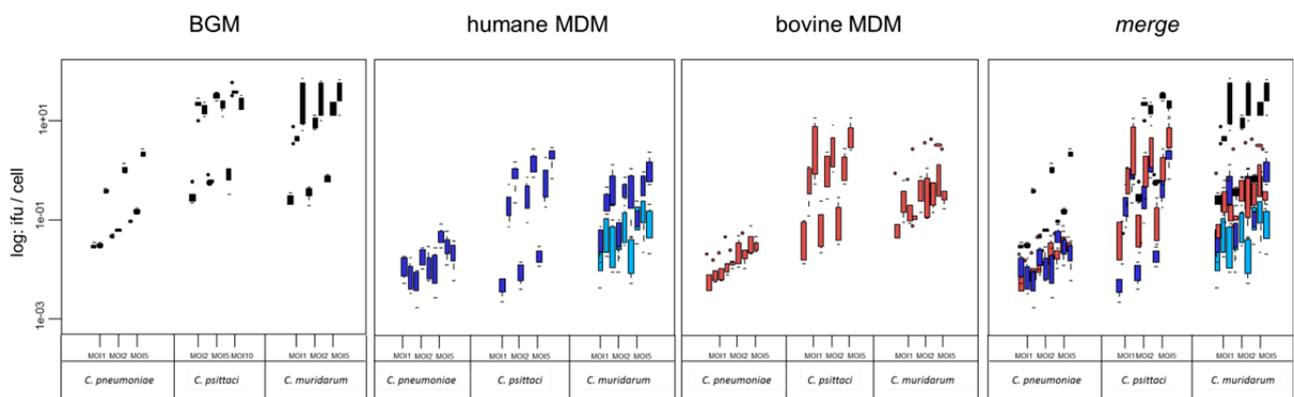
Die Daten wurden mit quantitativer realtime PCR erstellt. Die Boxplots stellen die Daten mithilfe einer logarithmierten y-Achse dar. In jedem Infektionsversuch wurden 4-6 Spender involviert. A: p<0,1; B: p<0,05; AB: p<0,1 and p<0,05, °: einzelne Ausreißer, hpi: hours post inoculation

□: 4 hpi, ▤: 24 hpi, ▥: 48 hpi ;

## ERGEBNISSE

4. Die einschlussbildenden Einheiten pro Zelle in chlamydieninokulierten BGM waren zu allen Zeitpunkten (4, 24, 48 hpi) und in allen Konzentrationen (MOI1, 2, 5) signifikant höher als in chlamydieninokulierten humanen MDM ( $p < 0.01$ ).

*C. pneumoniae* zeigte in bovinen MDM zu allen Zeitpunkten (4, 24, 48 hpi) und in allen MOI (1, 2, 5) signifikant weniger ifu/cell als in BGM. *C. psittaci* und *C. muridarum* erreichten 4 hpi vergleichbare Mengen an ifu/cell in bovinen MDM und in BGM. Nach 24 und 48 Stunden hatte *C. muridarum* signifikant mehr ifu/cell in BGM gebildet, als in bovinen MDM. *C. psittaci* erreichte nach 24 Stunden ebenfalls signifikant höhere ifu/cell in BGM, als in bovinen MDM. Wegen der Verringerung der ifu/cell in BGM nach 48 Stunden, die mit einer Erhöhung der ifu/2 ml in den Überständen einherging, gab es zu diesem Zeitpunkt keinen signifikanten Unterschied zwischen den ifu/cell in BGM und in bovinen MDM (Abbildung 12).



**Abbildung 12 Vergleich des Wachstums von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. muridarum* in BGM mit ihrem Wachstum in humanen bzw. bovinen MDM**

Die getesteten Chlamydien vermehrten sich am Besten in nicht-immunkompetenten BGM, gefolgt von bovinen MDM und humanen MDM. *C. pneumoniae* vermehrte sich im untersuchten Zeitraum nur in den BGM. Die Y-Achse der Boxplots wurde logarithmiert. Die Zeitpunkte 4, 24 und 48 hpi sind als 3 nebeneinanderliegende Balken dargestellt. **schwarz**: BGM; **blau**: humane MDM, **hellblau**: *C. muridarum* low; **rot**: bovine MDM; n=4-6

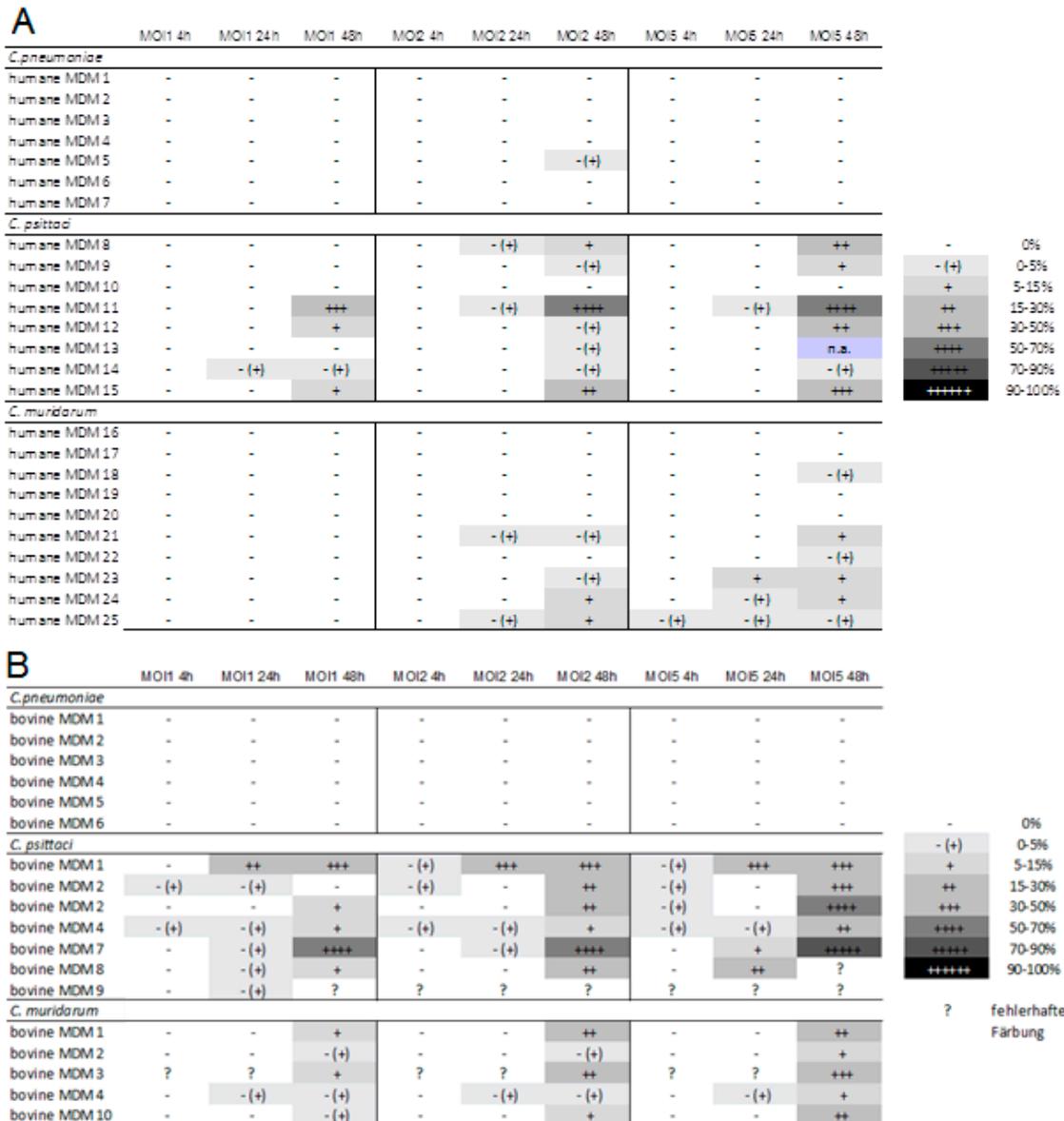
### 4.1.2 Beschreibung und semi-quantitative Bestimmung der Chlamydien mittels Immunfluoreszenzfärbung

*C. pneumoniae*-Immunfluoreszenzsignale konnten innerhalb von 48 Stunden weder in humanen noch in bovinen MDM gefunden werden (Abbildung 13).

In humanen MDM, die mit *C. psittaci* inokuliert worden waren, wurden die ersten Fluoreszenzsignale nach 24 Stunden gesichtet (MOI5). Nach 48 Stunden waren in bis zu 50 Prozent der humanen Zellen deutliche Fluoreszenzsignale zu sehen. In bovinen MDM, die mit *C. psittaci* inokuliert worden waren, wurden die ersten Fluoreszenzsignale nach 4 Stunden gesichtet (MOI1<MOI2<MOI5). Nach 48 Stunden waren in bis zu 90 Prozent der bovinen Zellen chlamydiale Einschlüsse zu finden (MOI1<MOI2<MOI5) (Abbildung 13).

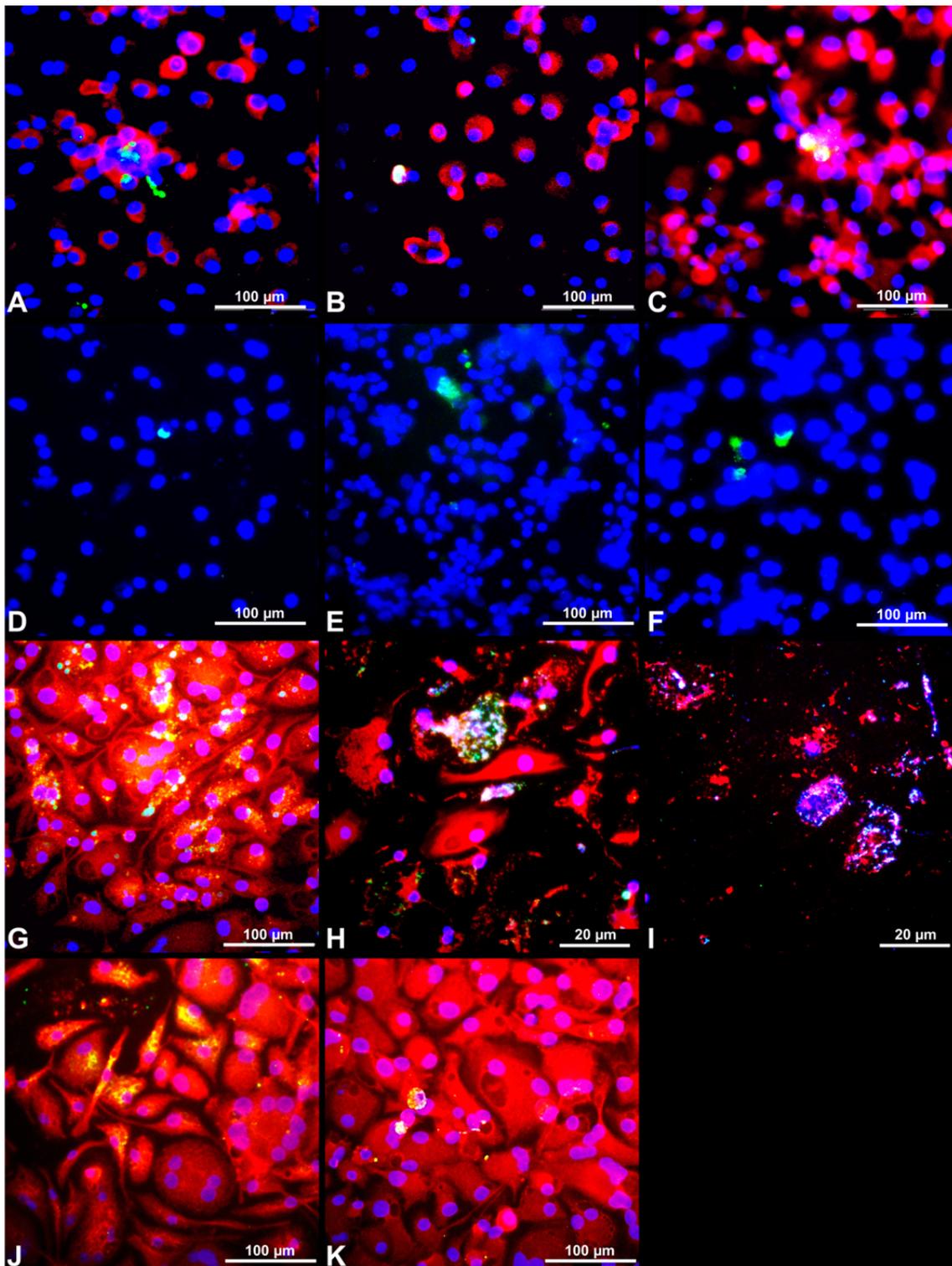
Nach 24 Stunden waren nur sporadisch (in 0-15% der Zellen) ein paar undeutliche Immunfluoreszenzsignale von *C. muridarum* in humanen MDM zu finden. Nach 48 Stunden wurden wenig mehr positive Chlamydiensignale sichtbar (in 5-15% der Zellen, MOI5). In

bovinen MDM konnten nach 48 Stunden in bis zu 50 Prozent der Zellen Signale von *C. muridarum* gefunden werden (MOI1<MOI2<MOI5) (Abbildung 13).



**Abbildung 13** Semi-quantitative Analyse von humanen und bovinen monozytengereiften Makrophagen (MDM), die mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* inokuliert wurden

Die inokulierten humanen und bovinen MDM wurden nach 4, 24 und 48 h mit FITC-konjugierten chlamydialen Antikörpern gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. *C. pneumoniae* zeigte keine eindeutigen Fluoreszenzsignale innerhalb von 48 Stunden. *C. psittaci* konnte früher und deutlicher angefärbt werden, als *C. muridarum*. **A:** humane MDM; **B:** bovine MDM; MOI: multiplicity of infection; %: Chlamydien-positive Zellen;



**Abbildung 14 Nachweis von *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* in humanen und bovinen MDM mittels Immunfluoreszenzmikroskopie**

**Humane MDM:** **A:** *C. psittaci*, 48 hpi, MOI5; **B:** *C. psittaci*, 48 hpi, MOI5; **C:** *C. psittaci*, 48 hpi, MOI5; **D:** *C. muridarum*, 24 hpi, MOI5; **E:** *C. muridarum*, 48 hpi, MOI2; **F:** *C. muridarum*, 48 hpi, MOI2; **Bovine MDM:** **G:** *C. psittaci*, 24 hpi, MOI5; **H:** *C. psittaci*, 48 hpi, MOI5; **I:** *C. psittaci*, 48 hpi, MOI5; **J:** *C. muridarum*, 48 hpi, MOI5; **K:** *C. muridarum*, 48 hpi, MOI5; Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen aus n=6 Versuchsreihen.

rot: Zytoplasma, blau: Zellkern, grün: *C. psittaci/muridarum*

Die Einschlüsse von *C. psittaci* erschienen in humanen MDM als kleine, gut umschriebene Punkte, die sich in der Nähe des Zellkernes anordneten (Abbildung 14A,B,C). Im Gegensatz dazu schienen sie in bovinen MDM das gesamte Zytoplasma auszufüllen. Die Einschlüsse in bovinen MDM waren groß, rund und enthielten mehrere kleinere, grüne Fluoreszenzsignale. Viele der Zellen waren zerstört und die Zellkerne waren fragmentiert (Abbildung 14G,H,I).

Einschlüsse von *C. muridarum* erschienen in humanen MDM als kleine Gebilde mit variabler Struktur, die sich an den Zellkern schmiegt (Abbildung 14D,E,F). In bovinen MDM füllten die chlamydialen Einschlüsse entweder die ganze Zelle aus (Abbildung 14J) oder es bildeten sich in der Nähe des Zellkerns mit Chlamydien gefüllte Vakuolen (Abbildung 14K).

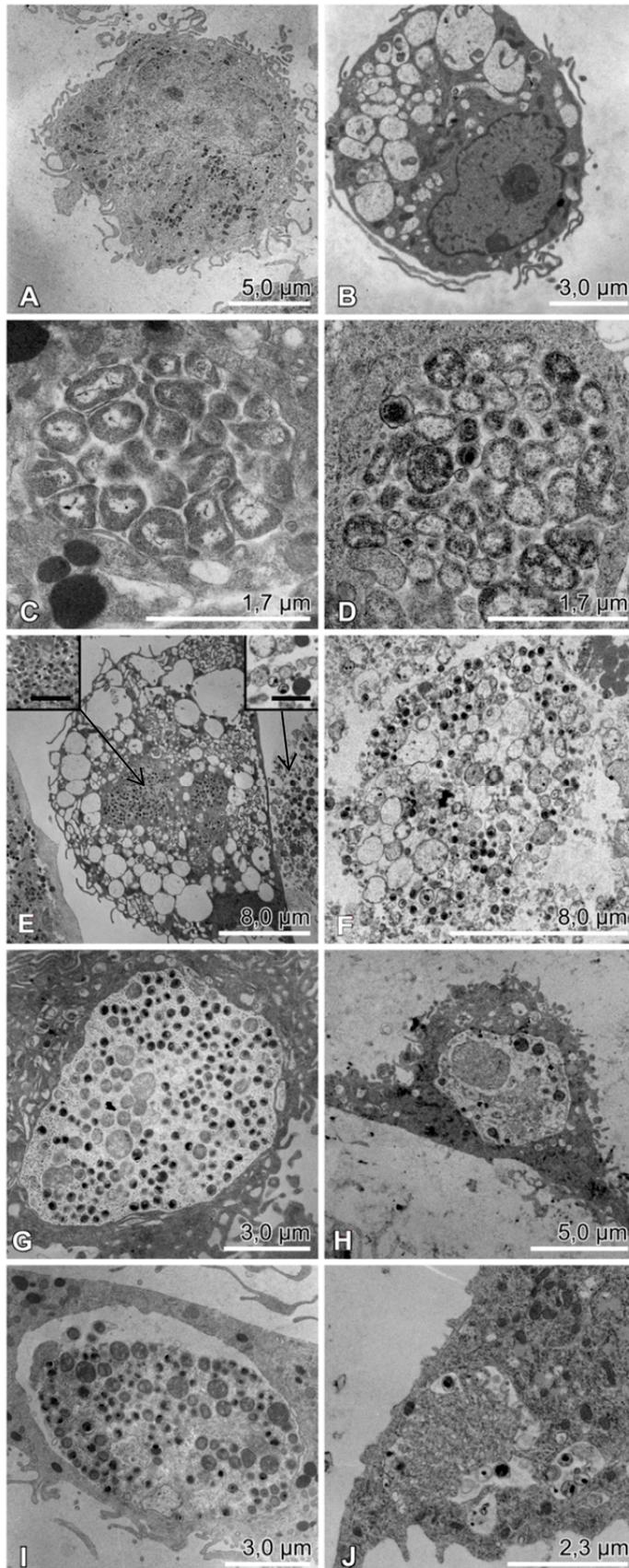
### 4.1.3 Überprüfung des Entwicklungsstadiums der Chlamydien mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Die humanen MDM zeigten in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) eine makrophagentypische Gestalt. Sie enthielten zahlreiche Organellen, Vesikel, Phagolysosomen und besaßen einen Durchmesser von bis zu 32 µm (Abbildung 15E). Kleinere Makrophagen mit einem Durchmesser von ca. 17,5 µm (Abbildung 15A) traten ebenfalls auf. Ihre Zellform stellte sich teils rund und teils länglich dar. Auf ihrer Oberfläche waren zahlreiche Pseudopodien zu sehen (Abbildung 15A). Die bovinen MDM zeigten in der TEM ebenfalls eine makrophagentypische Gestalt und hatten einen Durchmesser von bis zu 40 µm (Abbildung 16B). Sie waren hochgradig vakuolisiert. Nur wenige Organellen und Zytoplasma waren sichtbar. Ihre Form war polygonal, es traten sowohl runde als auch spindelförmige Zellen auf, die viele Mikropodien besaßen (Abbildung 15B). Der Zellkern der humanen und bovinen MDM lag exzentrisch und zeigte eine runde bzw. ovale Form. Bis zu 2 Nucleoli waren deutlich zu erkennen. Mitochondrien und Golgi-Apparat waren vor allem im Zentrum lokalisiert (Abbildung 15 und 16).

*C. pneumoniae* konnte weder in den humanen noch in den bovinen Makrophagen mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM) gefunden werden. Makrophagen aus den nicht infizierten Negativkontrollen hatten eine vergleichbare Morphologie.

*C. psittaci* konnte 24 hpi in fast jeder humanen Makrophagenzelle dargestellt werden. Sie enthielten multiple kleine Einschlüsse, die zum Teil ineinander übergingen. In den Einschlüssen waren vor allem Retikularkörperchen zu finden (Abbildung 15C). 48 Stunden nach der Inokulation waren die meisten Zellen zerfallen. Die multiplen Einschlüsse in den Zellen enthielten vor allem Elementarkörperchen und waren etwas größer als 24 hpi. Des Weiteren waren in den Einschlüssen auch Retikularkörperchen und Intermediärkörperchen zu finden. Die Einschlüsse waren von Mitochondrien umgeben. In den Trümmern der zerfallenen Zellen waren regelmäßig Chlamydien in verschiedenen Stadien zu finden (Abbildung 15E). Bei den bovinen Makrophagen fiel auf, dass sie 24 hpi während der Infektion mit *C. psittaci* etwas weniger vakuolisiert wirkten. Sie enthielten ebenfalls multiple Einschlüsse, die oft in der Peripherie lagen. Die Einschlüsse waren dicht gefüllt und enthielten überwiegend Retikularkörperchen, aber auch schon einige Elementarkörperchen (Abbildung 15D). 48 Stunden nach der Inokulation von bovinen MDM mit *C. psittaci* waren die meisten Zellen zerfallen. In den Resten der zerfallenen Zellen waren wie bei den humanen Makrophagen alle 3 Entwicklungsstadien der Chlamydien zu finden (Abbildung 15F).

Die Retikularkörperchen von *C. psittaci* wurden auch im Zytoplasma der humanen und bovinen MDM entdeckt. Dort lagen sie vereinzelt vor und umgaben sich mit wichtigen Zellorganellen, wie Mitochondrien und Golgi-Bestandteilen. An der Stelle des möglichen Chlamydienaustritts schien die Einschlussmembran weniger abgegrenzt zu sein (Abbildung 16A,B).



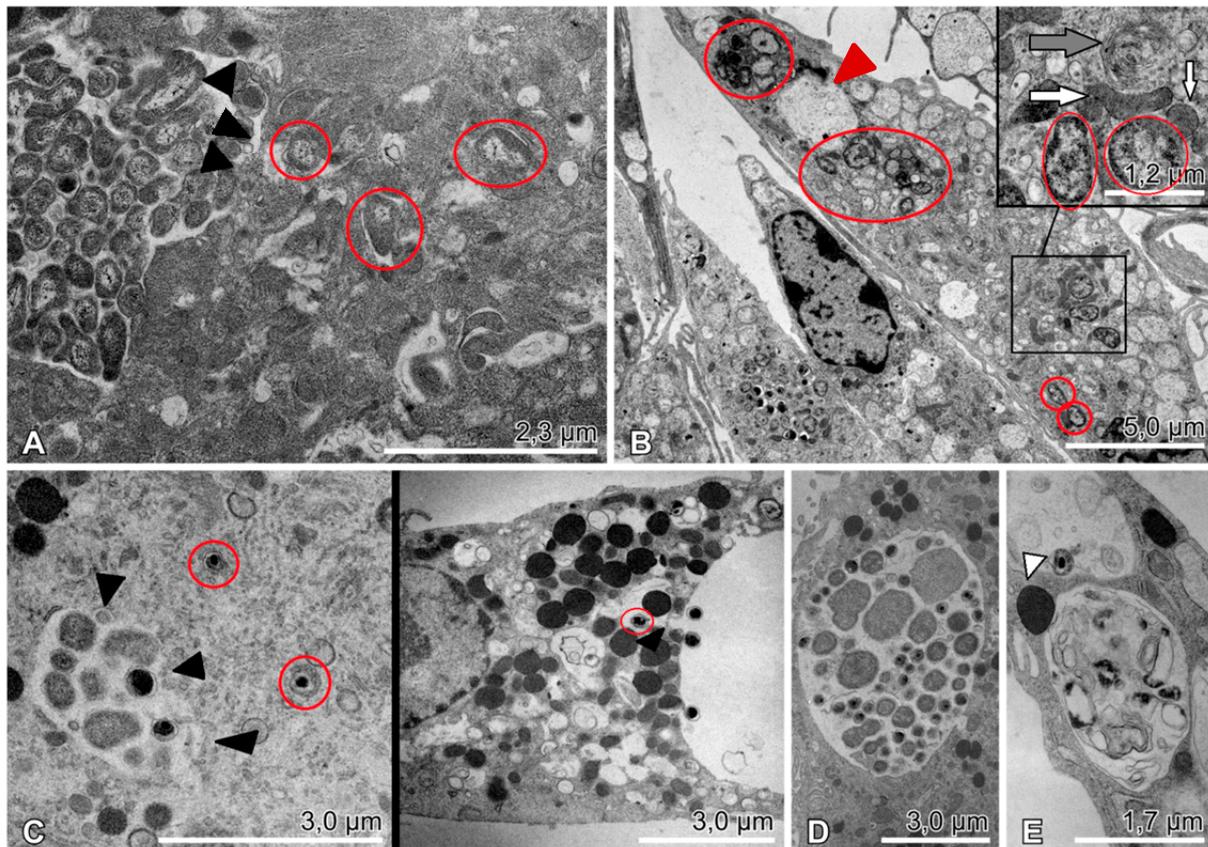
**Abbildung 15 Nachweis von *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* in humanen und bovinen MDM mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie**

Humane und bovine MDM unterschieden sich darin, dass bovine MDM deutlich mehr Vakuolen enthielten, die sie aber während einer Infektion zu verlieren schienen. *C. psittaci* und *C. muridarum* zeigten zu den verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Entwicklungsstadien. *C. psittaci* schien die Zellen nach 48 Stunden zu zerstören und Elementarkörperchen in die Umgebung zu entlassen. Für *C. muridarum* konnte dies nicht beobachtet werden.

**A:** humane Makrophage, uninfiziert; **B:** bovine Makrophage, uninfiziert; **C:** humane Makrophage, *C. psittaci*, 24 hpi; **D:** bovine Makrophage, *C. psittaci*, 24 hpi; **E:** humane Makrophage, *C. psittaci*, 48 hpi, rechtes Inlay: Messbalken = 1,7 µm, linkes Inlay: Messbalken = 1,15 µm; **F:** bovine Makrophage, *C. psittaci*, 48 hpi; **G:** humane Makrophage, *C. muridarum*, 24 hpi; **H:** bovine Makrophage, *C. muridarum*, 24 hpi; **I:** humane Makrophage, *C. muridarum*, 48 hpi; **J:** bovine Makrophage, *C. muridarum*, 48 hpi; Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen aus n=3 Versuchsreihen.

Von *C. muridarum* konnten ebenfalls in mehreren humanen Makrophagen Einschlüsse entdeckt werden. Im Gegensatz zu *C. psittaci* war meist nur ein Einschluss von *C. muridarum* pro Zelle zu finden, der deutlich größer war. Die Einschlüsse enthielten 24 hpi vor allem Elementarkörperchen und weniger Retikularkörperchen. Sie schienen beinahe die ganze Zelle auszufüllen. Die Entwicklungsstadien von *C. muridarum* lagen in den Einschlüssen nicht so dicht wie die von *C. psittaci*. Die Einschlüsse waren von Mitochondrien umgeben (Abbildung 15G). 48 Stunden nach der Inokulation mit *C. muridarum* waren die Einschlüsse in den humanen Makrophagen etwas kleiner als 24 hpi. Nun waren auch mehrere Einschlüsse pro Zelle zu finden, die eine Mischung aus den 3 Entwicklungsstadien der Chlamydien enthielten. In den Einschlüssen befanden sich außer den Chlamydien viele Vesikel und anderes zelluläres Material. Teilweise waren auch fast leere Einschlüsse zu finden (Abbildung 15I). Intermediär- beziehungsweise Elementarkörperchen von *C. muridarum* wurde in humanen Makrophagen auch außerhalb des chlamydialen Einschlusses gefunden (Abbildung 16C). Neben den üblichen Entwicklungsformen der Chlamydien zeigte *C. muridarum* (48 hpi) in den humanen MDM auch aberrante Retikularkörperchen. Diese aberranten Körperchen waren 2,2-fach größer als normale Retikularkörperchen und zeigten ein pleomorphes Erscheinungsbild. Sie waren weitgehend elektronendicht und stellten sich daher im elektronenmikroskopischen Bild homogen gräulich dar (Abbildung 16D). Im Zytoplasma von humanen Makrophagen, die mit *C. muridarum* infiziert waren, befanden sich mehrere Vesikel, die mit Membranansammlungen und elektronenendichtem Material gefüllt waren, die typisch für Autophagosomen sind. Sie traten mit Lysosomen in Kontakt, was zu einer Ausbildung von Autophagolysosomen führen kann (Abbildung 16E).

Auch in den bovinen Makrophagen, die mit *C. muridarum* infiziert worden waren, waren 24 hpi große Einschlüsse zu finden, die vor allem Elementarkörperchen enthielten (Abbildung 15H). 48 Stunden nach der Inokulation mit *C. muridarum* schienen im Vergleich zur Negativkontrolle weniger Vakuolen in den Makrophagen vorhanden zu sein. Vereinzelt auftretende Einschlüsse enthielten meist Elementarkörperchen und viel zelluläres Material (Abbildung 15J).



**Abbildung 16 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* in humanen und bovinen Makrophagen**

**A:** Im Zytosol von humanen Makrophagen wurden Retikularkörperchen von *C. psittaci* (rote Kreise) gefunden. **B:** In bovinen Makrophagen fanden sich ebenfalls Retikularkörperchen von *C. psittaci* (rote Kreise) im Zytosol, wo sie sich mit Mitochondrien (weiße Pfeile) und Golgi-Membranen (grauer Pfeil) umgaben. Roter Pfeilkopf: Autophagosom. **C:** Elementarkörperchen von *C. muridarum* (rote Kreise) gelangten über eine in ihrem Zusammenhalt gestörte Einschlussmembran (schwarze Pfeilspitzen) in das Zytosol von humanen Makrophagen. **D:** Von *C. muridarum* waren 48 hpi in humanen MDM aberrante Retikularkörperchen zu finden. **E:** In humanen Makrophagen, die mit *C. muridarum* infiziert waren, fielen Vakuolen mit Membranansammlungen auf, die typisch für Autophagosomen sind. Weiße Pfeilspitze: Lysosom; Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen aus n=3 Versuchsreihen.

#### 4.1.4 Infektiosität der Chlamydien nach Isolierung aus monozyten-gereiften Makrophagen

Nach der Isolation aus den humanen und bovinen monozyten-gereiften Makrophagen (MDM) und den dazugehörigen Überständen waren alle 3 Chlamydienspezies noch in der Lage sich in den BGM zu vermehren (Abbildung 17). *C. psittaci* und *C. muridarum* aus humanen MDM und deren Überständen zerstörten den BGM-Zellrasen und entwickelten deutliche Immunfluoreszenz-Signale. Nachdem diese beiden Stämme aus bovinen MDM und deren Überständen isoliert wurden, blieb der BGM-Monolayer dagegen intakt. *C. pneumoniae* replizierte sich nach Isolation aus humanen und bovinen MDM und deren Überständen nicht

## ERGEBNISSE

so gut in den BGM, wie die oben genannten Spezies. Der BGM-Zellrasen blieb jeweils intakt. *C. psittaci* und *C. muridarum*, die aus humanen MDM und deren Überständen isoliert worden waren, füllten nahezu die gesamte BGM-Zelle aus (Abbildung 18A,B). *C. pneumoniae* zeigte nach Isolation aus humanen MDM und deren Überständen sehr kleine und weit verteilte Immunfluoreszenzsignale. *C. psittaci* und *C. pneumoniae* bildeten Einschlüsse, die sich um den BGM-Zellkern anordneten, wenn sie aus bovinen MDM und deren Überständen isoliert worden waren (Abbildung 18C,E). Die Einschlüsse von *C. muridarum* (aus bovinen MDM und Überständen) hingegen verteilten sich diffus in der BGM-Zelle (Abbildung 18D).

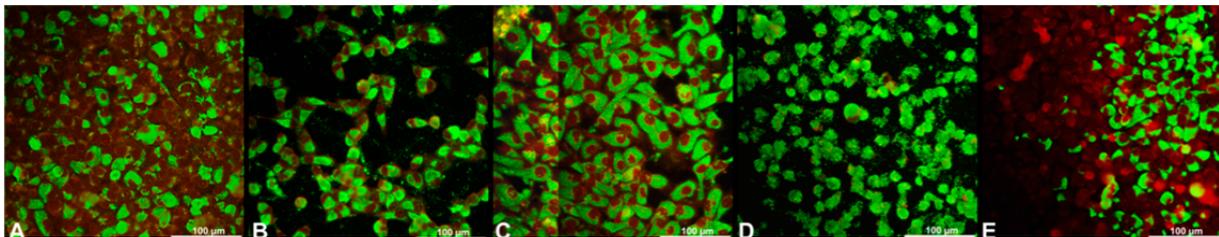
	Humane Makrophagen						Bovine Makrophagen						
	MDM			Überstand			MDM			Überstand			
	MOI1	MOI2	MOI5	MOI1	MOI2	MOI5	MOI1	MOI2	MOI5	MOI1	MOI2	MOI5	
<i>C. pneumoniae</i>	-	-	-	+	+	+	+	++++	+++	- (+)	- (+)	- (+)	-
<i>C. pneumoniae</i>	+	++	+++	++	++	++++	-	+++	++++	- (+)	+	+	- (+)
<i>C. pneumoniae</i>	+	+	++	- (+)	- (+)	++	+	+++	++++	- (+)	- (+)	+	+
<i>C. psittaci</i>	+++++	++++	+++++	+++++	+++	+++++	+++	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	++
<i>C. psittaci</i>	++++	++++	+++++	+++	+++++	+++++	+++	+++	+++++	+++	++++	+++++	+++
<i>C. psittaci</i>	+++	+	++++	++++	+++++	+++++	++	+++	++++	+++	+++	+++++	++++
<i>C. muridarum</i>	+++++	++++	+++	+++++	+++++	+++++	+++	+++	+++	++++	+++++	++++	++++
<i>C. muridarum</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++	+++	++++	+++	+++++	+++++	+++++
<i>C. muridarum</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++	++++	++++	+++	++++	+++++	+++++

-	0%
- (+)	0-5%
+	5-15%
++	15-30%
+++	30-50%
++++	50-70%
+++++	70-90%
+++++	90-100%

**Abbildung 17 Überlebensfähigkeit von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* in humanen und bovinen MDM**

MDM und Überstände aus den chlamydialen Infektionsversuchen wurden nach 48 h gesammelt, aufbereitet und auf BGM-Zellen gegeben. Die inokulierten BGM-Zellen wurden nach 48 h mit FITC-konjugierten Anti-Chlamydia Antikörpern gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.



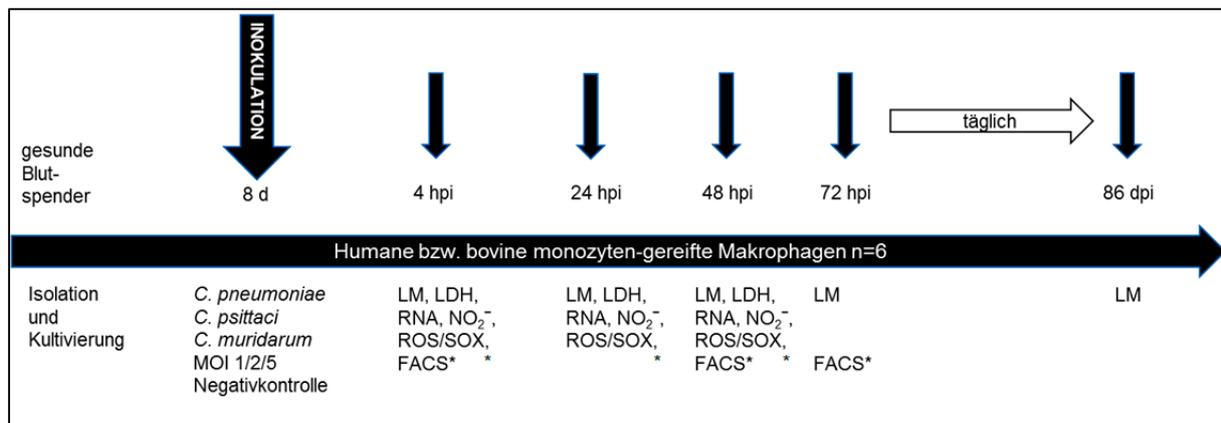
**Abbildung 18 Nachweis von *C. psittaci*, *C. muridarum* bzw. *C. pneumoniae* in BGM, nachdem sie aus humanen und bovinen MDM isoliert wurden. Immunfluoreszenz**

Alle Chlamydienpezies ließen sich nach der Isolation aus humanen und bovinen MDM und deren Überständen gut in BGM anzüchten. **A:** *C. psittaci* aus humanen MDM; **B:** *C. muridarum* aus humanen MDM; **C:** *C. psittaci* aus bovinen MDM; **D:** *C. muridarum* aus bovinen MDM; **E:** *C. pneumoniae* aus bovinen MDM; Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen aus n=3 Versuchsreihen.

### 4.2 Wirtszellantwort auf eine Stimulation mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum*

Im Folgenden Versuchsabschnitt wurde überprüft inwieweit die humanen und bovinen MDM auf die Stimulation mit Chlamydien reagieren. Dazu wurde eine Langzeituntersuchung durchgeführt, die lichtmikroskopisch begleitet wurde. Makrophagen, zu denen *C. pneumoniae*, *C. psittaci* beziehungsweise *C. muridarum* in einer Konzentration von MOI5 gegeben wurden, wurden nach dem anfänglichen Intervall von 4, 24, 48 hpi täglich an derselben Stelle fotodokumentiert, um den Zeitpunkt festzustellen an dem die Makrophagen zu Grunde gehen. Beobachtungen wie Veränderung der Zellmorphologie und Entstehung

von chlamydialen Einschlüssen konnten ebenfalls gemacht werden. In den ersten 48 Stunden wurde die Überlebensfähigkeit der Makrophagen zudem mit einem LDH-Assay bestimmt. Laktat-Dehydrogenase (LDH) wird von Zellen freigesetzt, die beschädigt sind oder durch apoptotische beziehungsweise nekrotische Prozesse absterben. Um die Reaktion der Makrophagen auf die Chlamydien detaillierter zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression wichtiger Zytokine und Enzyme der Immunantwort des Gesamtorganismus bestimmt. Zu den makrophagentypischen Abwehrmechanismen gehört die Freisetzung von Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und die respiratorische Entladung, bei der freie Radikale entstehen, die Fremdorganismen, wie Bakterien abtöten können. Dazu wurden die Überstände aus den Infektionsversuchen auf Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Superoxid (SOX) untersucht. Makrophagen reagieren auf äußere Einflüsse mit der Anpassung ihrer Oberflächenmoleküle. Es handelt sich hauptsächlich um Rezeptoren, die die Makrophagen für bestimmte Reaktionen zugänglicher oder wieder empfänglich machen. In dieser Arbeit wurden gezielt Oberflächenproteine mittels Durchflusszytometrie untersucht, um Aussagen über den Aktivierungsgrad der humanen Makrophagen zu treffen (Abbildung 19).



**Abbildung 19 Schematische Darstellung des Versuchsverlaufes zum Thema Wirtszellantwort auf die Stimulation mit Chlamydien**

d: Tage nach der Isolation; hpi: Stunden nach der Inokulation; MOI: multiplicity of infection; dpi: Tage nach der Inokulation; LM: Lichtmikroskopie; LDH: Laktat-Dehydrogenase-Assay;  $\text{NO}_2^-$ : Nitrit; ROS: freie Sauerstoffspezies; SOX: Superoxid; FACS: Durchflusszytometrie; \*: nur humane MDM

#### 4.2.1 Überlebensfähigkeit monozyten-gereifter Makrophagen (MDM)

##### 4.2.1.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen

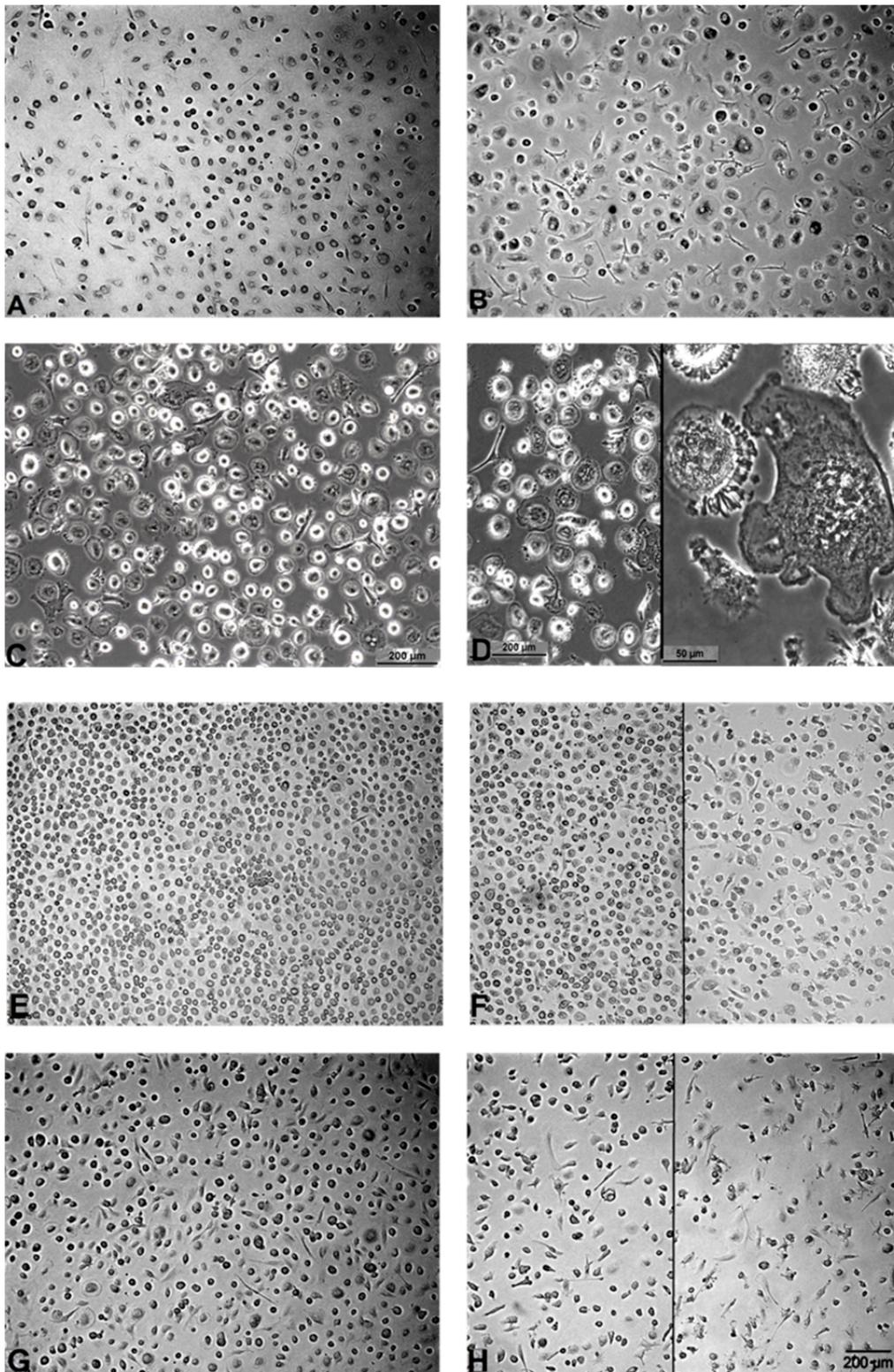
Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden die humanen und bovinen Makrophagen mikroskopisch beobachtet und charakterisiert. Dabei ging es um die allgemeine Lebensdauer der Makrophagen ohne und mit Chlamydien und um eventuelle Unterschiede zwischen den 3 Chlamydienpezies.

Humane MDM lebten 28 bis 40 Tage ohne offensichtliche morphologische Veränderungen zu zeigen (Abbildung 20A,B). Nach dieser Zeit fingen die Zellen an sich abzuflachen und Fortsätze auszubilden. Mehr und mehr Lücken im Zellrasen wurden sichtbar. Einige der Zellen bekamen eine kugelige und einige eine längliche Form.

Im Infektionsversuch mit *C. pneumoniae* (MOI5) haben sich die humanen Makrophagen nach 48 h morphologisch nicht verändert. Nach 8 bis 9 Tagen fielen die ersten Veränderungen, wie Abflachung der Zellen oder vereinzelte Trümmer zwischen den Zellen, auf. Nach 13 Tagen kam es zu einem ersten leichten Rückgang der Konfluenz. Des Weiteren traten vermehrt längliche Zellen auf und es kam zu einer Ausbildung von fortsatzähnlichen Gebilden (Abbildung 20D). Zwischen dem 23. und 28. Tag traten vereinzelt kreisförmige, schwarz pigmentierte Objekte auf, in denen hohe Motilität herrschte. Diese werden von Experten des nationalen Referenzlabors für Chlamydien als Chlamydieneinschlüsse bezeichnet (Abbildung 21A,B, weiße Pfeile). Im Laufe der Beobachtungszeit fiel immer wieder eine „Bläschenbildung“ im Randgebiet der Zellen auf, dessen Auftreten mit fortschreiten der Zeit häufiger und deutlicher wurden, wie am Tag 29. (Abbildung 21C, schwarze Pfeile). Diese Bläschen veränderten im Sekundenrhythmus ihre Gestalt ([Video 1](#)). Zwischen dem 36. und 44. Tag nahm dann die Konfluenz der Zellen stark ab, was aber ebenfalls in der nicht-infizierten Kontrolle der Fall war (Abbildung 21D,E; Abbildung 22A).

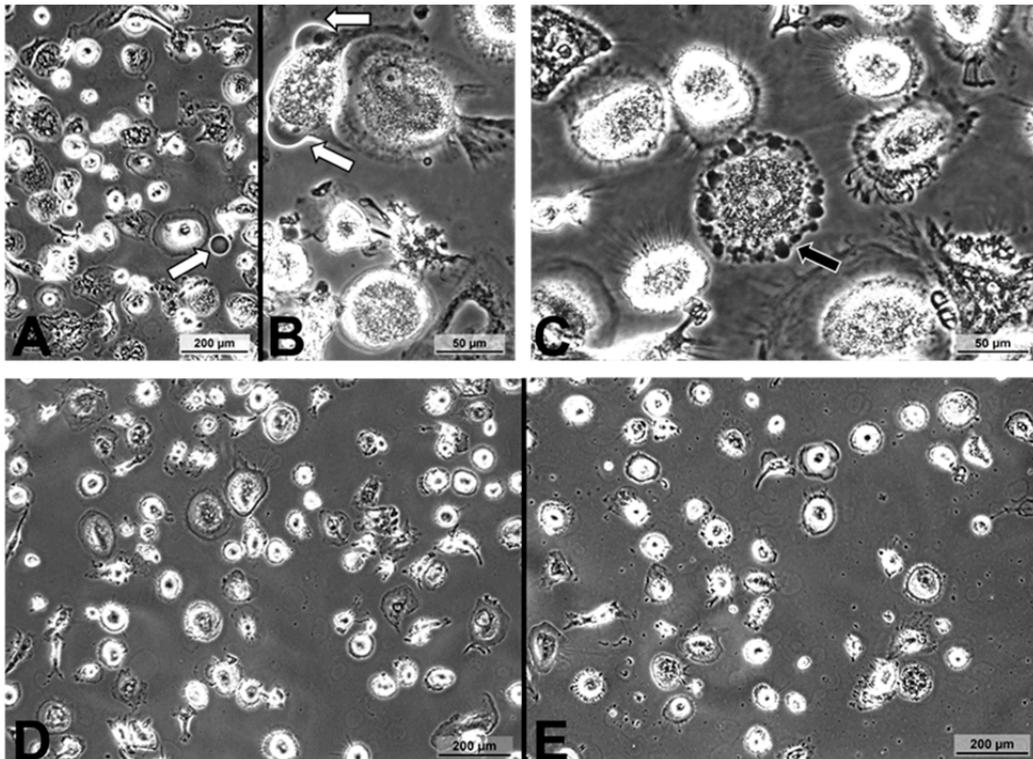
Im Infektionsversuch mit *C. psittaci* (MOI5) konnten innerhalb von 48 h keine morphologischen Veränderungen beobachtet werden. Nach 5 Tagen begannen die Zellen kugelig zu werden und sich abzulösen. Wenig Zelltrümmer waren im Überstand zu sehen. Ab dem 9. Tag wurden die Zellen blasig, bildeten Fortsätze und flachten sich ab. Die Konfluenz der Zellen wurde nach 20 Tagen deutlich verringert (Abbildung 20E,F). Nach einer Beobachtungszeit von 36 Tagen waren die Zellen stark fragmentiert. Die Zellen verloren ihre Form und viele Zelltrümmer waren im Überstand zu sehen (Abbildung 22B).

Im Infektionsversuch mit *C. muridarum* (MOI5) wurden ebenfalls keine Veränderungen der Morphologie nach 48 h gefunden. Nach 5-6 Tagen war die Konfluenz des Zellrasens aufgelöst und die Zellen wurden länglich oder kugelig (Abbildung 20G,H). Nach einem Beobachtungszeitraum von 86 Tagen hatten einige Zellen immer noch eine normale Morphologie. Die anderen verloren ihre typische Gestalt und es war kein Zytoplasma mehr zu sehen. Die Zellen waren klein und länglich, aber nicht so fragmentiert, wie bei der Infektion mit *C. psittaci* (Abbildung 22C).



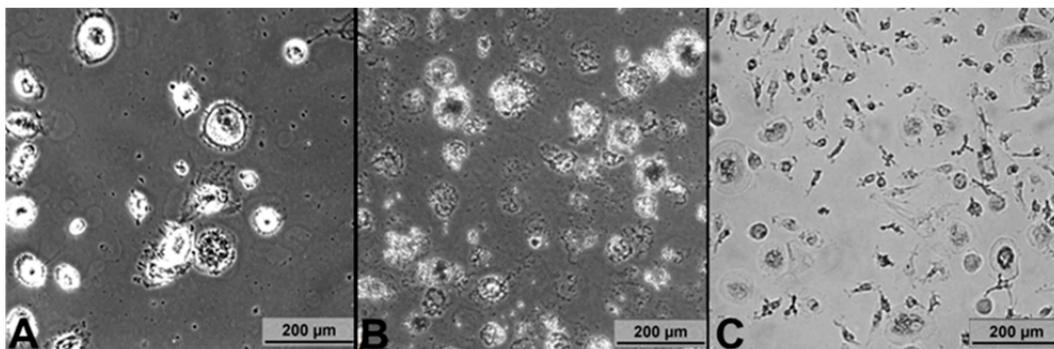
**Abbildung 20** Lebensfähigkeit humaner MDM, die mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* inokuliert wurden. Lichtmikroskopie.

**A:** humane MDM 4 hpi, uninfiziert; **B:** humane MDM 28 dpi, uninfiziert; **C:** humane MDM 4 hpi, inokuliert mit *C. pneumoniae*; **D:** humane MDM 13 dpi (20x/40x), inokuliert mit *C. pneumoniae* **E:** humane MDM 4 hpi, inokuliert mit *C. psittaci*; **F:** humane MDM 5/20dpi, inokuliert mit *C. psittaci*; **G:** humane MDM 4 hpi, inokuliert mit *C. muridarum* **H:** humane MDM 5/6 dpi, inokuliert mit *C. muridarum*; Die Abbildungen stammen jeweils von einer repräsentativen Kultur aus n=3 Buffy Coats.



**Abbildung 21** Humane MDM, die mit *C. pneumoniae* inokuliert wurden

**A:** 28 dpi, weißer Pfeile: „isolierter“ chlamydialer Einschluss; **B:** 28 dpi, weißer Pfeil: kernnahe chlamydiale Einschlüsse; **C:** 29 dpi, schwarzer Pfeil: zellrandständige Bläschen; **D:** 44 dpi, Negativkontrolle; **E:** 44 dpi, humane MDM inokuliert mit *C. pneumoniae*; Die Abbildungen stammen jeweils von einer repräsentativen Kultur aus n=3 Buffy Coats.



**Abbildung 22** Humane MDM, die mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* inokuliert wurden

**A:** humane MDM, 44 dpi, inokuliert mit *C. pneumoniae*; **B:** humane MDM, 36 dpi, infiziert mit *C. psittaci*; **C:** humane MDM 86 dpi, infiziert mit *C. muridarum*; Die Abbildungen stammen jeweils von einer repräsentativen Kultur aus n=3 Buffy Coats.

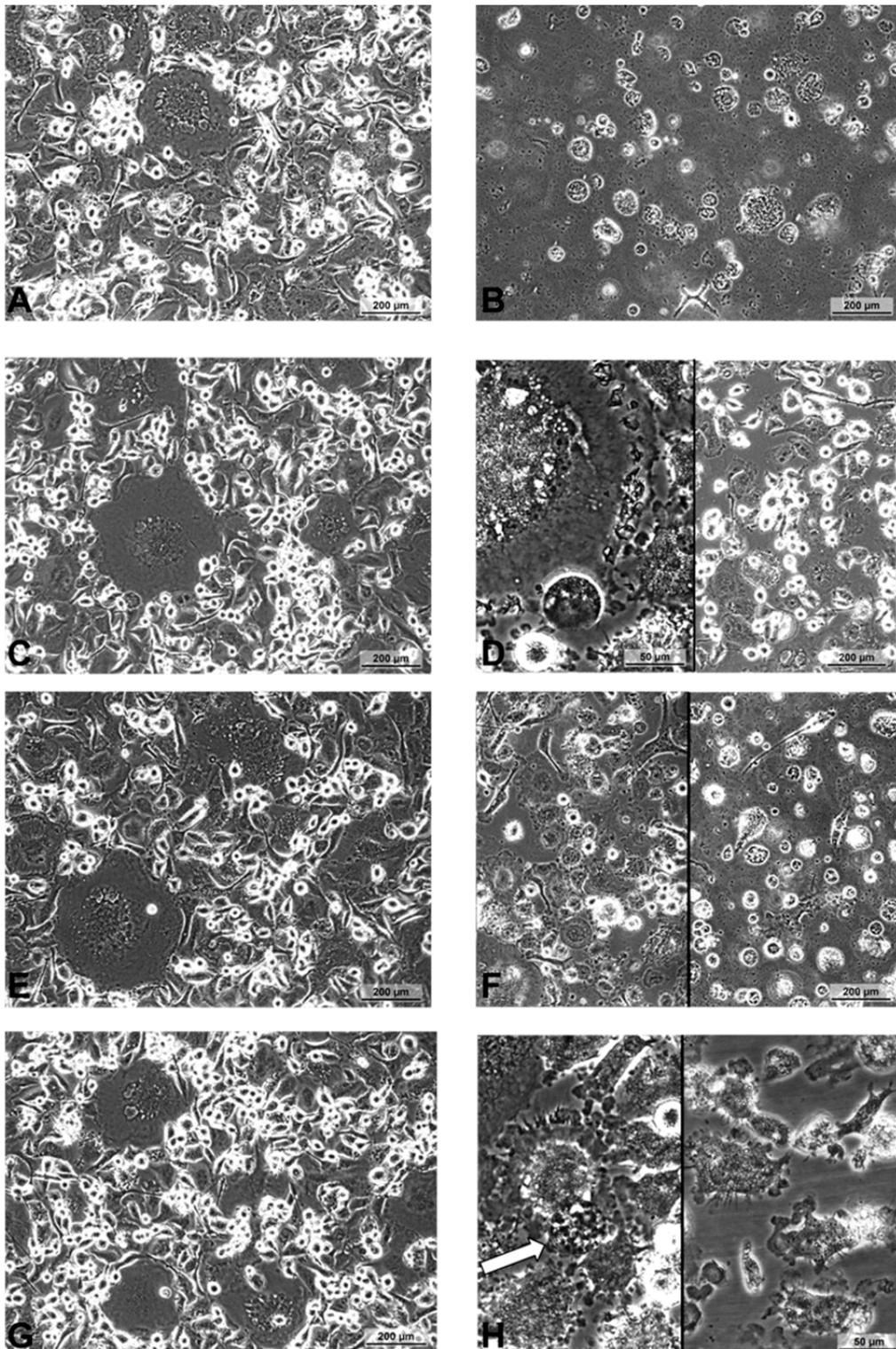
Bovine MDM wurden ebenfalls über einen längeren Zeitraum lichtmikroskopisch beobachtet, um ihre Lebensfähigkeit mit und ohne Chlamydien zu überprüfen und zu vergleichen. Schon nach 8 Tagen zeigten die bovinen Makrophagen erste Zeichen der Veränderung, wie vermehrte Trümmerbildung, Verkleinerung und Formveränderung. Nach 9 Tagen nahm die

Konfluenz stark ab. Es waren nur noch zerstörte Zellen und viele Trümmer zu sehen (Abbildung 23B).

Wenn die bovinen MDM mit *C. pneumoniae* stimuliert worden waren, konnten nach 24 h erste Veränderungen beobachtet werden. Die Zellen wurden kleiner, der Zellrand war unregelmäßig gelappt und es waren vereinzelt Einschlüsse zu sehen, die auf Chlamydien hindeuten (Abbildung 23D, [Video 2](#)). 5 Tage nach Beobachtungsbeginn nahm die Konfluenz der bovinen MDM deutlich ab und man sah zerstörte Zellen, viele Trümmer und nur noch wenig makrophagentypische Zellen. Erstaunlich war, dass die wenigen makrophagentypischen Zellen schon am nächsten Tag flacher und breiter wirkten und daher die Konfluenz bis zum 7. Tag wieder auf circa 50% Flächenbedeckung zunahm. Nach 9 Tagen, als die nicht-behandelten Zellen schon zerstört waren, sah man im Infektionsversuch mit *C. pneumoniae* noch makrophagentypische Zellen, die sehr breitflächig, aber unregelmäßig geformt waren. (Abbildung 24). Nach 12 Tagen waren auch die mit *C. pneumoniae* behandelten Zellen komplett zerstört (Abbildung 25A).

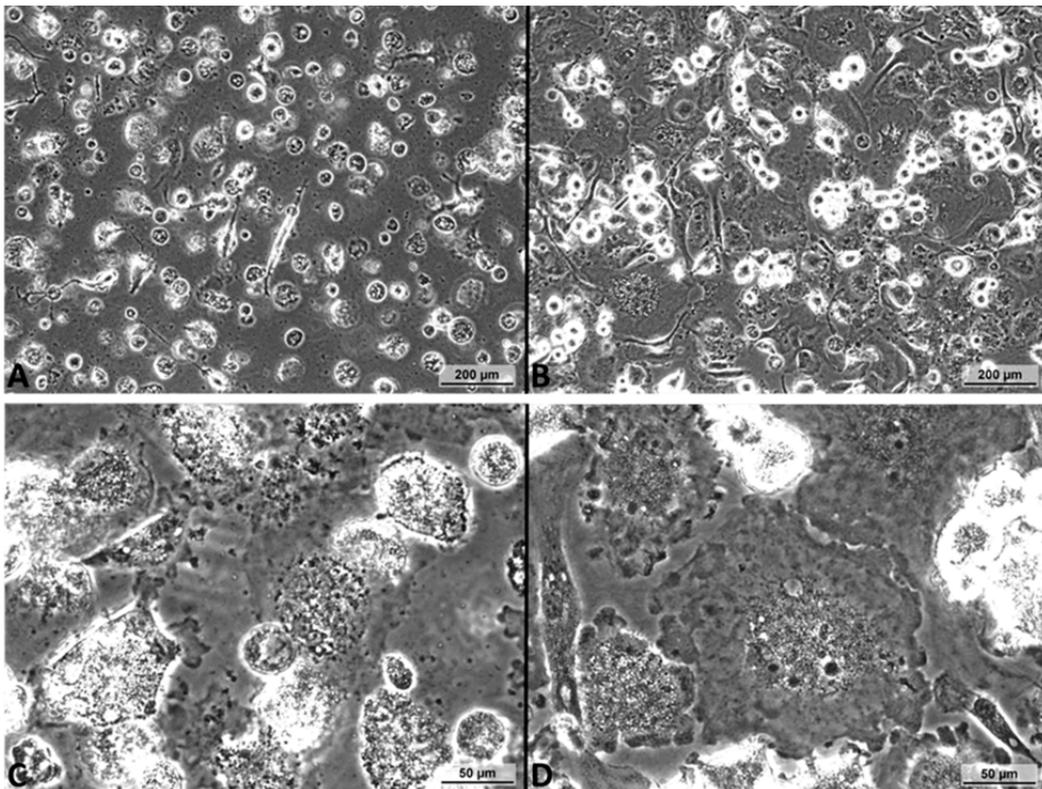
Im Infektionsversuch mit *C. psittaci* konnten nach 24 h ebenfalls erste Veränderungen beobachtet werden. Allerdings waren diese weitaus gravierender. Die Konfluenz nahm deutlich ab und es waren viele Zelltrümmer und Zellen in Auflösung zu sehen. Die MDM waren zum Teil länglich und reich verzweigt. Es gab kaum noch makrophagentypische Zellen, die dann oft Einschlüsse mit relativ schneller brownischer Molekularbewegung beinhalteten (Abbildung 23F, [Video 3](#)). Nach 48 h waren alle Zellen zerstört und viele Zelltrümmer schwammen im Überstand. Die Konfluenz war komplett aufgelöst. Zum Teil waren Vesikel mit starker Molekularbewegung im Überstand zu finden (Abbildung 23H; Abbildung 25B).

Bovine MDM, die mit *C. muridarum* behandelt worden waren, zeigten nach 24 h kaum Veränderungen. Es waren vereinzelt Einschlüsse, die auf Chlamydien hinweisen zu finden, die eine relativ langsame Molekularbewegung aufwiesen (Abbildung 23H, [Video 4](#)). Nach 48 h verringerte sich die Konfluenz leicht und die Zellen wurden kugelig oder lösten sich ab. Die Zellen wiesen vermehrt Vakuolen auf und es waren Trümmer und Vesikel im Überstand zu finden (Abbildung 23H). 5 Tage nach der Behandlung mit *C. muridarum* waren kaum noch makrophagentypische Zellen zu finden. Die Konfluenz war komplett aufgelöst und es waren sehr viele Zelltrümmer zu finden. Es gab einige längliche und verzweigte Zellen (Abbildung 25C).

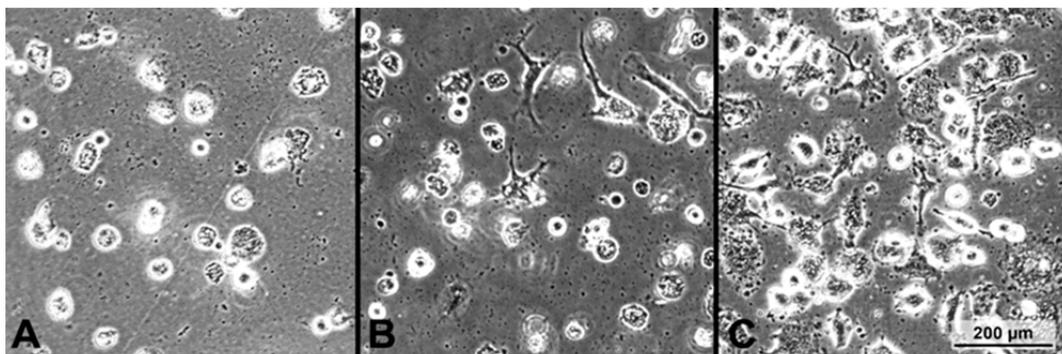


**Abbildung 23 Lebensfähigkeit boviner MDM, die mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* inokuliert wurden. Lichtmikroskopie.**

**A:** bovine MDM 4 hpi, uninferiert; **B:** bovine MDM 9 dpi, uninferiert, 10-fach vergrößert (10x); **C:** bovine MDM 4 hpi, inokuliert mit *C. pneumoniae*, (10x); **D:** bovine MDM 24/5 hpi/dpi, inokuliert mit *C. pneumoniae*, (40x/10x); **E:** bovine MDM 4 hpi, inokuliert mit *C. psittaci*, (10x); **F:** bovine MDM 24/48 hpi, inokuliert mit *C. psittaci*, (10x); **G:** bovine MDM 4 hpi, inokuliert mit *C. muridarum*, (10x); **H:** bovine MDM 24/48 hpi, inokuliert mit *C. muridarum* (40x); Die Abbildungen stammen jeweils von einer repräsentativen Kultur aus n=3 Blutentnahmen.



**Abbildung 24 Bovine monozyten-gereifte Makrophagen, 9 dpi. Lichtmikroskopie**  
**A:** Negativkontrolle, (10x); **B:** inokuliert mit *C. pneumoniae*, (10x); **C:** Negativkontrolle, (40x);  
**D:** inokuliert mit *C. pneumoniae*, (40x); Die Abbildungen stammen jeweils von einer repräsentativen Kultur aus n=3 Blutentnahmen.

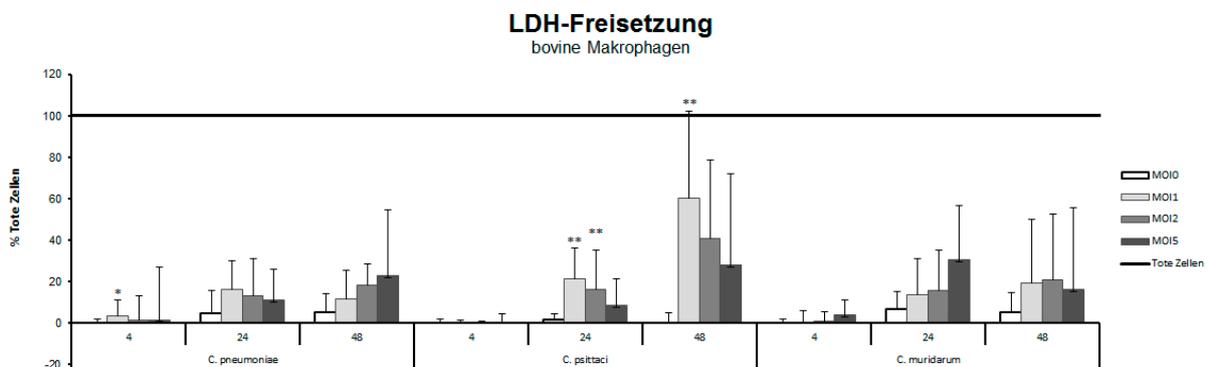


**Abbildung 25 Bovine MDM, die mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* inokuliert wurden. Lichtmikroskopie**  
**A:** bovine MDM, 12 dpi, inokuliert mit *C. pneumoniae*; **B:** bovine MDM, 48 hpi, inokuliert mit *C. psittaci*;  
**C:** bovine MDM, 5 dpi, inokuliert mit *C. muridarum*; Die Abbildungen stammen jeweils von einer repräsentativen Kultur aus n=3 Blutentnahmen.

#### 4.2.1.2. Laktat-Dehydrogenase-Assay

In unseren Infektionsversuchen wurde von den humanen MDM, die mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* beziehungsweise *C. muridarum* inokuliert worden waren, zwischen 4 und 48 hpi kein LDH freigesetzt. In jedem LDH-Assay funktionierte der mitlaufende LDH-Standard einwandfrei.

LDH wurde von bovinen MDM konstant freigesetzt, sogar von den nicht-infizierten MDM. Das Meiste LDH wurde 48 Stunden nach der Inokulation mit *C. psittaci* in den Überstand abgegeben (Abbildung 26). Es schien, als seien bovine MDM unter den vorliegenden Kulturbedingungen sehr angreifbar, was durch eine Inokulation mit Chlamydien noch verstärkt wurde. Die hohen Standardabweichungen zeigten, dass einige bovine Spender empfindlicher als andere reagierten.

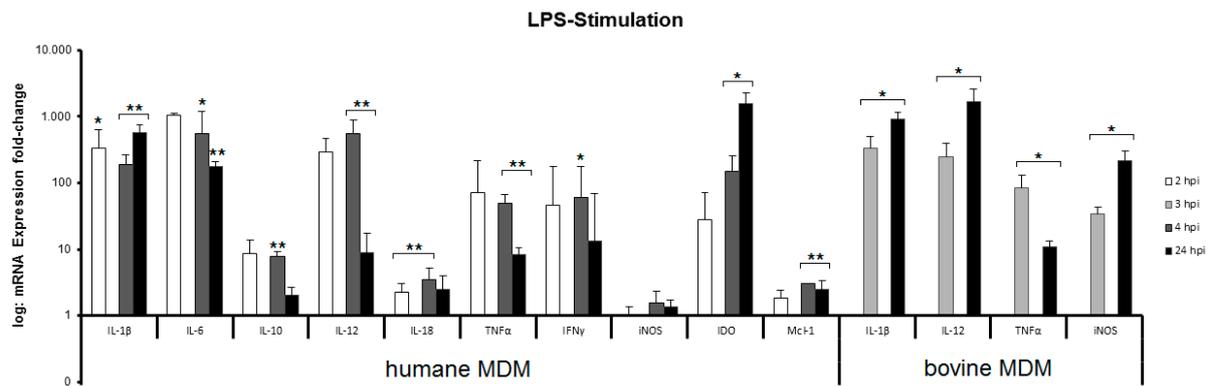


**Abbildung 26 Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase (LDH) durch bovine MDM, die mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* inokuliert wurden**

Jeder Überstand aus den Infektionsversuchen mit bovinen MDM wurde auf die Freisetzung von LDH getestet. Die Konzentration des LDH wurde anhand einer LDH-Standardkurve ermittelt. Die Totalaktivität von LDH wurde in  $\mu\text{U/ml}$  gemessen und mit den Werten einer Probe in Bezug gesetzt, bei der lichtmikroskopisch keine lebenden Zellen mehr zu sehen waren. \*:  $p < 0,1$ ; \*\*:  $p < 0,05$ ;  $n = 6$

#### 4.2.2 Das mRNA-Expressionsprofil der humanen und bovinen MDM

In einem Vorversuch wurden die Zellen mit *Escherichia coli* (*E. coli*)-LPS stimuliert. Dadurch wurde die Stimulierbarkeit der humanen und bovinen MDM durch bakterielle Reagenzien überprüft. Das LPS führte zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IDO und Mcl-1 in humanen MDM und von IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF $\alpha$  und iNOS in bovinen MDM (Abbildung 27).



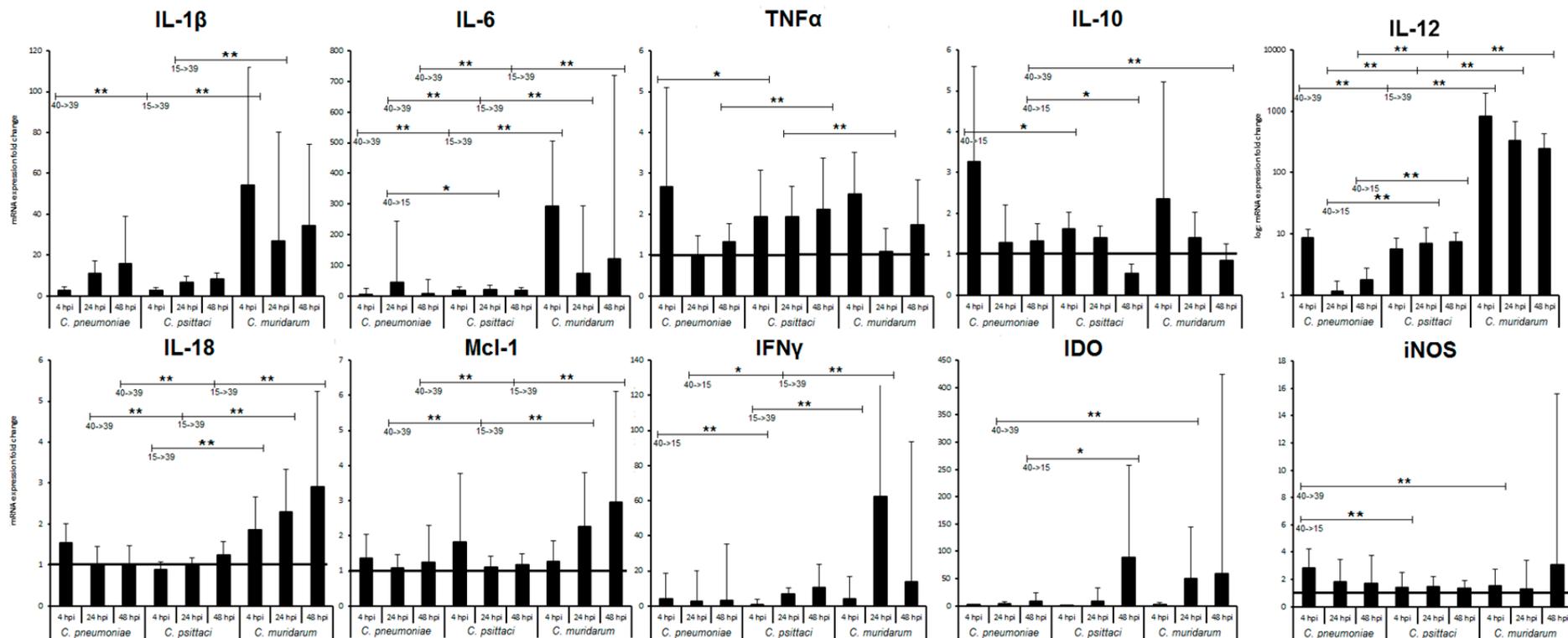
**Abbildung 27 Das mRNA-Expressionsprofil humaner und boviner MDM nach Stimulation mit LPS**

Dargestellt ist die Erhöhung zur Negativkontrolle mit logarithmischer Skaleneinteilung. Humane MDM wurden mit 5µg/ml und bovine MDM mit 6 µg/ml *E.coli*-LPS stimuliert. \*: p<0,1; \*\*: p<0,05; n=6

#### 4.2.2.1. mRNA-Expression der humanen MDM nach Stimulation mit Chlamydien

*C. muridarum* konnte die Expression der Zytokine und Enzyme der humanen MDM am deutlichsten stimulieren. Die mRNA-Expression von IL-12 und IL-6 war zu allen 3 Zeitpunkten signifikant höher, als die aus den *C. psittaci*- und *C. pneumoniae*-Infektionsversuchen (Abbildung 28). Alle 3 Chlamydienpezies waren in der Lage die Expression dieser Zytokine gegenüber der mock-Kontrolle um das 50 bis 1000-fache signifikant zu erhöhen (Abbildung 29). 4 hpi war auch die mRNA-Expression von IL-1β im *C. muridarum*-Infektionsversuch signifikant höher als in den Infektionsversuchen mit den anderen beiden Chlamydienpezies. Nach 24 Stunden war die mRNA-Expression dann nur noch gegenüber der mRNA-Expression aus dem *C. psittaci*-Infektionsversuch signifikant erhöht (Abbildung 28). Auch IL-1β wurde gegenüber der mock-Kontrolle von allen 3 Chlamydienpezies signifikant erhöht und zwar um das 10 bis 100-fache (Abbildung 29). Die mRNA-Expression von TNFα wurde während der Stimulation mit den Chlamydien in den humanen MDM im Median nur um das 2 bis 3-fache erhöht (Abbildung 29). 4 Stunden nach der Inokulation war die mRNA-Expression von TNFα im *C. pneumoniae*-Infektionsversuch signifikant höher, als die im *C. psittaci*-Infektionsversuch. Nach 24 Stunden war die mRNA-Expression im *C. psittaci*-Infektionsversuch dann höher, als die aus dem *C. muridarum*-Infektionsversuch und 48 hpi war sie signifikant höher, als die aus dem *C. pneumoniae*-Infektionsversuch (Abbildung 28). Die mRNA-Expression von IL-10 wurde nur durch *C. pneumoniae* (MOI 5, 4hpi) und *C. psittaci* um das 2 bis 3-fache signifikant erhöht (Abbildung 29). Da es 48 hpi zu einem deutlichen Abfall der mRNA-Expression im *C. psittaci*-Infektionsversuch kam, ist sie zu diesem Zeitpunkt signifikant geringer, als die in den *C. pneumoniae*- beziehungsweise *C. muridarum*-Infektionsversuchen (Abbildung 28). Die mRNA-Expression von IL-18 wurde nur im *C. muridarum*-Infektionsversuch im Vergleich zur mock-Kontrolle um das 2 bis 3-fache signifikant erhöht (Abbildung 29). Daher war sie auch zu allen 3 Zeitpunkten signifikant höher, als die aus dem *C. psittaci*-Infektionsversuch. Nach 24 und 48 Stunden war sie ebenfalls gegenüber der mRNA-Expression im *C. pneumoniae*-Infektionsversuch signifikant erhöht (Abbildung 28). Die mRNA-Expression von Mcl-1 wurde

ebenfalls nur im *C. muridarum*-Infektionsversuch gegenüber der mock-Kontrolle um das 2 bis 3-fache erhöht (Abbildung 29). Daher ist sie auch 24 und 48 Stunden nach der Inokulation signifikant höher, als die aus dem *C. psittaci*- beziehungsweise *C. pneumoniae*-Infektionsversuch (Abbildung 28). Die mRNA-Expression von IFN $\gamma$  war im *C. pneumoniae*-Infektionsversuch 4 hpi und im *C. psittaci*- und *C. muridarum*-Infektionsversuch 24 und 48 hpi signifikant um das 10 bis 60-fache gegenüber der mock-Kontrolle erhöht (Abbildung 29). 4 Stunden nach der Inokulation war daher die mRNA-Expression von IFN $\gamma$  im *C. psittaci*-Infektionsversuch signifikant niedriger als die aus den *C. pneumoniae*- und *C. muridarum*-Infektionsversuchen. Nach 24 Stunden war sie im *C. muridarum*-Infektionsversuch gegenüber der mRNA-Expression in den *C. pneumoniae*- und *C. psittaci*-Infektionsversuchen dann deutlich erhöht (Abbildung 28). Die mRNA-Expression von iNOS wurde nur im *C. pneumoniae*-Infektionsversuch 4 Stunden nach der Inokulation signifikant zur mock-Kontrolle um das 2 bis 3-fache erhöht (Abbildung 29). Deswegen war sie zu diesem Zeitpunkt auch gegenüber der mRNA-Expression in den *C. psittaci*- und *C. pneumoniae*-Infektionsversuchen signifikant erhöht (Abbildung 28). Da die mRNA-Expression von iNOS in den humanen MDM kaum stimuliert wurde, wurde die mRNA-Expression von IDO überprüft.



**Abbildung 28 Vergleich der mRNA-Expressionsprofile in humanen MDM nach Stimulation mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. muridarum***

Dargestellt ist die mRNA-Expression in Bezug auf die mock-Kontrolle. Die Werte der mock-Kontrolle wurden 1 gesetzt. Statistische Analysen mit ANOVA haben ergeben, dass die MOI keinen Einfluss auf die mRNA-Expressionslevel hat, weder innerhalb des überprüften Zeitraums noch im Vergleich mit den eingesetzten Stämmen. Daher wurde der Median der MOI für die Auswertung herangezogen. \*:  $p < 0,1$ ; \*\*:  $p < 0,05$ , 40: *C. pneumoniae*; 15 *C. psittaci*; 39: *C. muridarum*; n=6

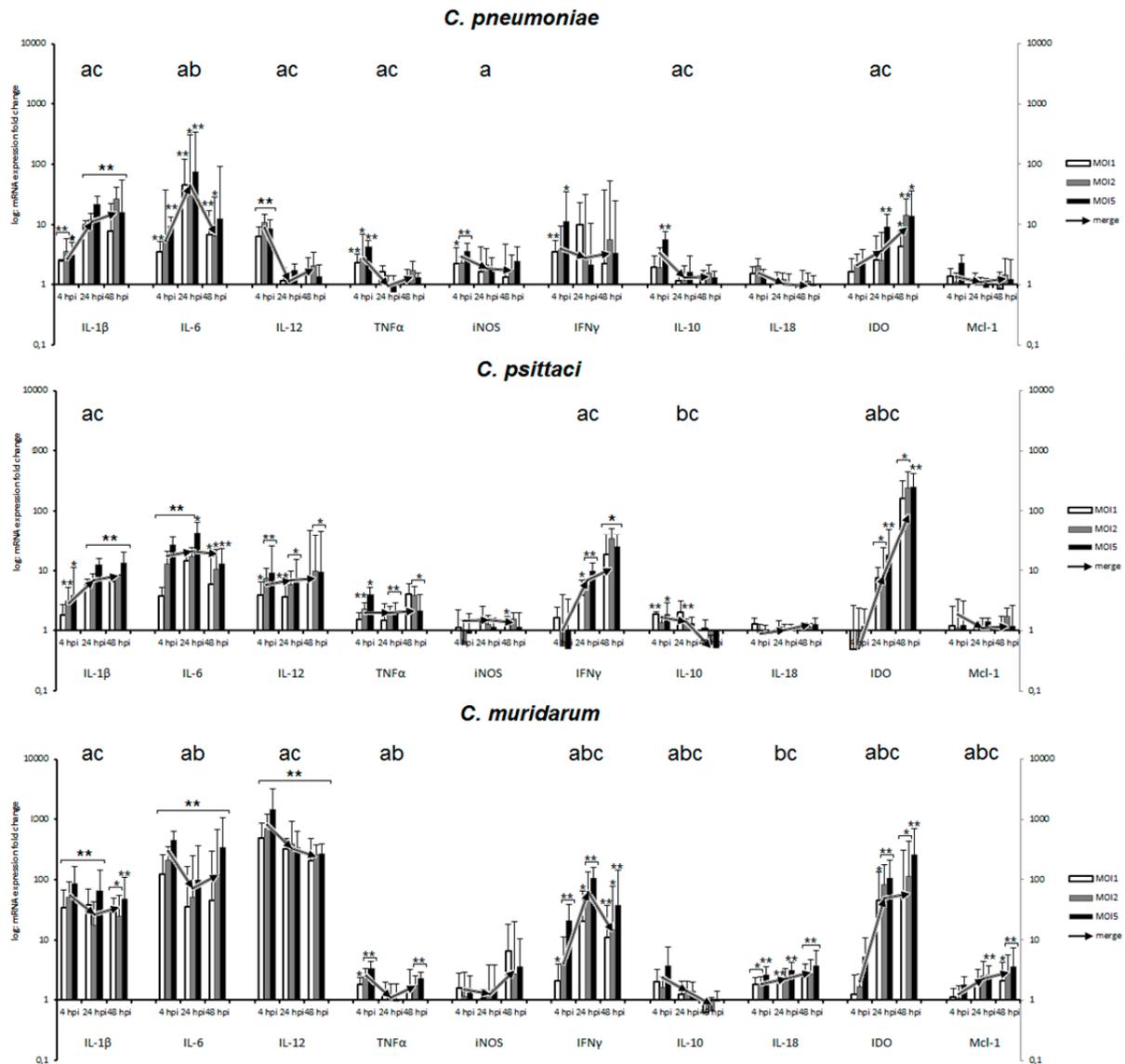
Diese wurde 24 und 48 hpi von allen 3 Chlamydienspezies gegenüber der mock-Kontrolle um das 10 bis 100-fache signifikant erhöht (Abbildung 29). Nach 24 Stunden war die mRNA-Expression vonIDO aus dem *C. muridarum*-Infektionsversuch gegenüber der aus dem *C. pneumoniae*-Infektionsversuch signifikant erhöht und nach 48 Stunden war die mRNA-Expression aus dem *C. psittaci*-Infektionsversuch signifikant höher, als die aus dem *C. pneumoniae*-Infektionsversuch (Abbildung 28).

Die Dynamik der mRNA-Expression der untersuchten Zytokine und Enzyme, also der Anstieg bzw. Abfall dieser innerhalb von 48 Stunden, verhielt sich während der Stimulation der humanen MDM mit den verschiedenen Chlamydienspezies unterschiedlich. Während des *C. pneumoniae*-Infektionsversuches steigerte sich die IL-1 $\beta$  und IDO mRNA-Expression signifikant von 4 zu 24 beziehungsweise 48 hpi. Im Gegensatz dazu fiel die mRNA-Expression von IL-10, IL-12 und TNF $\alpha$  von 4 zu 24 beziehungsweise 48 hpi signifikant ab. Die mRNA-Expression von IL-6 stieg erst von 4 zu 24 hpi signifikant an und sank von 24 zu 48 hpi wieder ab. Die iNOS mRNA-Expression verringerte sich signifikant nach 4 Stunden. Ein stetiger signifikanter Anstieg der mRNA-Expression innerhalb von 48 Stunden konnte während des *C. psittaci*-Infektionsversuches nur bei IDO beobachtet werden. Die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  und IFN $\gamma$  stieg von 4 zu 24 beziehungsweise 48 hpi signifikant an und die von IL-10 sank von 4 beziehungsweise 24 zu 48 hpi signifikant ab. Ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression innerhalb von 48 Stunden während des *C. muridarum*-Infektionsversuches konnte bei IDO und Mcl-1 beobachtet werden. Die mRNA-Expression von IFN $\gamma$  stieg von 4 zu 24 hpi signifikant an und sank von 24 zu 48 hpi wieder ab, aber nicht unter den Wert nach 4 Stunden. Die mRNA-Expression von IL-18 stieg von 4 beziehungsweise 24 zu 48 hpi signifikant an. Für die mRNA-Expression von IL-6 und TNF $\alpha$  wurde erst ein Abfall von 4 zu 24 hpi und dann ein Anstieg von 24 zu 48 hpi festgestellt. Die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  und IL-12 sank hingegen signifikant von 4 zu 24 beziehungsweise 48 hpi ab.

Für die Berechnung der zeitlichen Abhängigkeit (Dynamik,  $\rightarrow$ ) wurden die MOI zusammengefasst, da die ANOVA ergab, dass keine Korrelation zwischen MOI und Zeit bestand (Abbildung 29).

#### **4.2.2.2. mRNA-Expression der bovinen MDM nach Stimulation mit Chlamydien**

*C. psittaci* und *C. muridarum* stimulierten die Expression der Zytokine und Enzyme der bovinen MDM am besten. Ihre mRNA-Expression von IL-12 und IL-6 war zu allen 3 Zeitpunkten signifikant höher, als die aus den *C. pneumoniae*-Infektionsversuchen. Die mRNA-Expression von IL-6 im *C. muridarum*-Infektionsversuch war zudem 4 und 24 hpi signifikant gegenüber der im *C. psittaci*-Infektionsversuch erhöht. Das gleiche galt für die mRNA-Expression von IL-12, wo diese Erhöhung außerdem noch 48 hpi auftrat (Abbildung 30). Alle drei Chlamydienspezies waren dazu in der Lage die Expression dieser Zytokine gegenüber der mock-Kontrolle um das 10 bis 1000-fache signifikant zu steigern, wobei *C. pneumoniae* dies für die mRNA-Expression von IL-12 nur 4 hpi gelang (Abbildung 31).



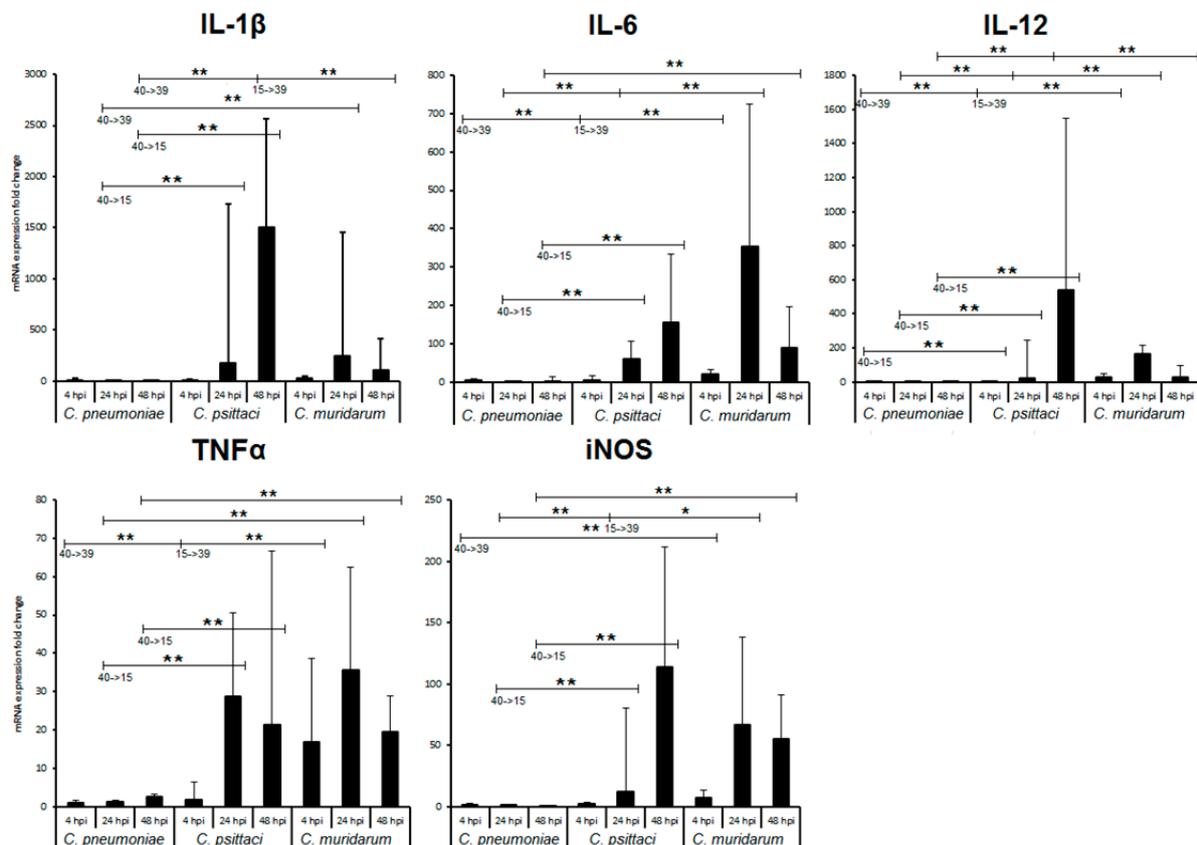
**Abbildung 29** Höhe und Dynamik der mRNA-Expression ausgewählter Zytokine und Enzyme humaner MDM nach Stimulation mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum*

Dargestellt ist die Erhöhung zur mock-Kontrolle mit logarithmischer Skaleneinteilung. Die mock-Kontrolle wurde 1 gesetzt. Für die Darstellung der Dynamik der mRNA-Expression (  $\rightarrow$  ) wurde der Median der MOI (merge) berechnet, da die ANOVA keine Korrelation zwischen MOI und Zeit zeigte. a: 4 vs 24 hpi, b: 24 vs 48 hpi, c: 4 vs 48 hpi; p<0,05; \*: Unterschied zur mock-Kontrolle, p<0,1; \*\*: Unterschied zur mock-Kontrolle, p<0,05; n=6

Die mRNA-Expression von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  im *C. psittaci*- beziehungsweise *C. muridarum*- Infektionsversuch war 24 und 48 hpi gegenüber der im *C. pneumoniae*-Infektionsversuch signifikant erhöht. 4 Stunden nach der Inokulation war die mRNA-Expression von TNF $\alpha$  im *C. muridarum*-Infektionsversuch zusätzlich gegenüber der aus den *C. pneumoniae*- und *C. psittaci*-Infektionsversuchen und 48 hpi war die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  im *C. psittaci*-Infektionsversuchen gegenüber der im *C. muridarum*-Infektionsversuch signifikant erhöht

## ERGEBNISSE

(Abbildung 30). *C. muridarum* konnte die mRNA-Expression von TNF $\alpha$  zu allen 3 Zeitpunkten gegenüber der mock-Kontrolle um das 20 bis 100-fache signifikant erhöhen.

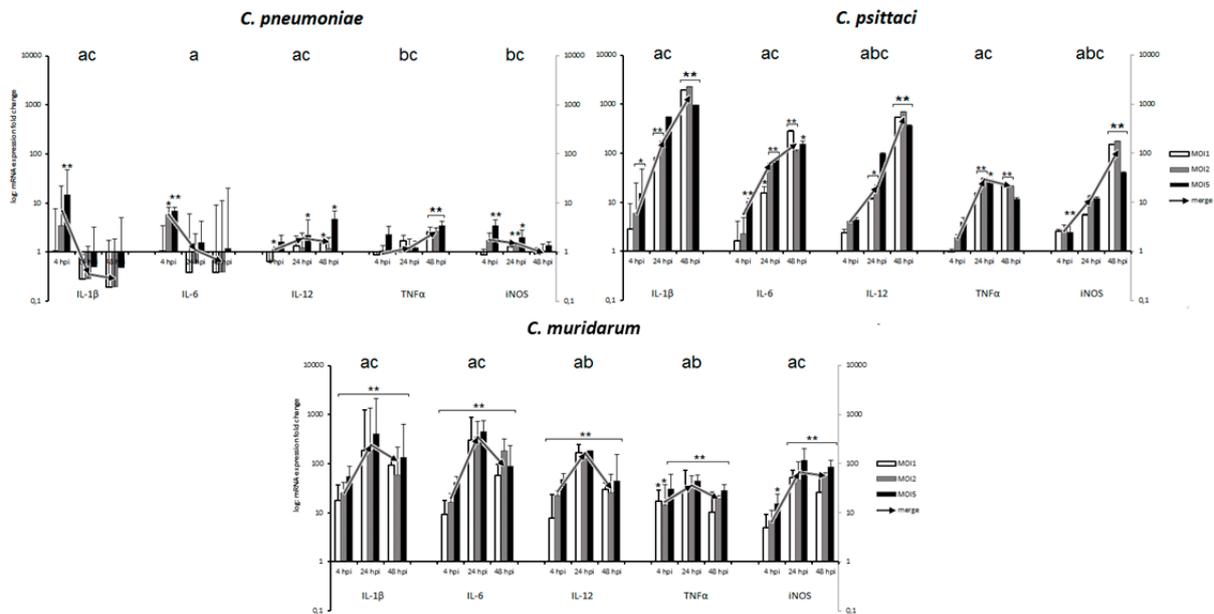


**Abbildung 30 Vergleich der mRNA-Expressionssteigerung ausgewählter Zytokine und Enzyme in bovinen MDM durch Stimulation mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. muridarum***

Dargestellt ist die mRNA-Expression in Bezug auf die mock-Kontrolle. Die Werte der mock-Kontrolle wurden 1 gesetzt. Statistische Analysen mit ANOVA haben ergeben, dass die MOI keinen Einfluss auf die mRNA-Expressionslevel hat, weder innerhalb des überprüften Zeitraums noch im Vergleich mit den eingesetzten Stämmen. Daher wurde der Median der MOI für die Auswertung herangezogen. 40: *C. pneumoniae*; 15: *C. psittaci*; 39: *C. muridarum*; \*:  $p < 0,1$ ; \*\*:  $p < 0,05$ ;  $n = 6$

*C. psittaci* gelang dies 24 und 48 hpi um das 20 bis 30-fache und *C. pneumoniae* nur 48 hpi um das 17 bis 35-fache (Abbildung 31). Die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  wurde von *C. psittaci* und *C. muridarum* zu allen 3 Zeitpunkten gegenüber der mock-Kontrolle um das 5 bis 1500-fache signifikant erhöht (Abbildung 30). *C. pneumoniae* konnte die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  nur mit MOI5 und 4 hpi signifikant gegenüber der mock-Kontrolle um das 6-fache steigern (Abbildung 31). In den *C. psittaci*- und *C. muridarum*-Infektionsversuchen war die mRNA-Expression von iNOS 24 und 48 hpi signifikant gegenüber der im *C. pneumoniae*-Infektionsversuch erhöht. Im *C. muridarum*-Infektionsversuch war sie zudem 4 hpi signifikant höher als im *C. pneumoniae*-Infektionsversuch (Abbildung 30). Die mRNA-Expression von iNOS konnte von *C. pneumoniae* 4 und 24 hpi um das 1,5 bis 2-fache, von *C. psittaci* 4 und

48 hpi um das 2 bis ca. 170-fache und von *C. muridarum* 24 und 48 hpi um das 6 bis 55-fache signifikant gegenüber der mock-Kontrolle gesteigert werden (Abbildung 31).



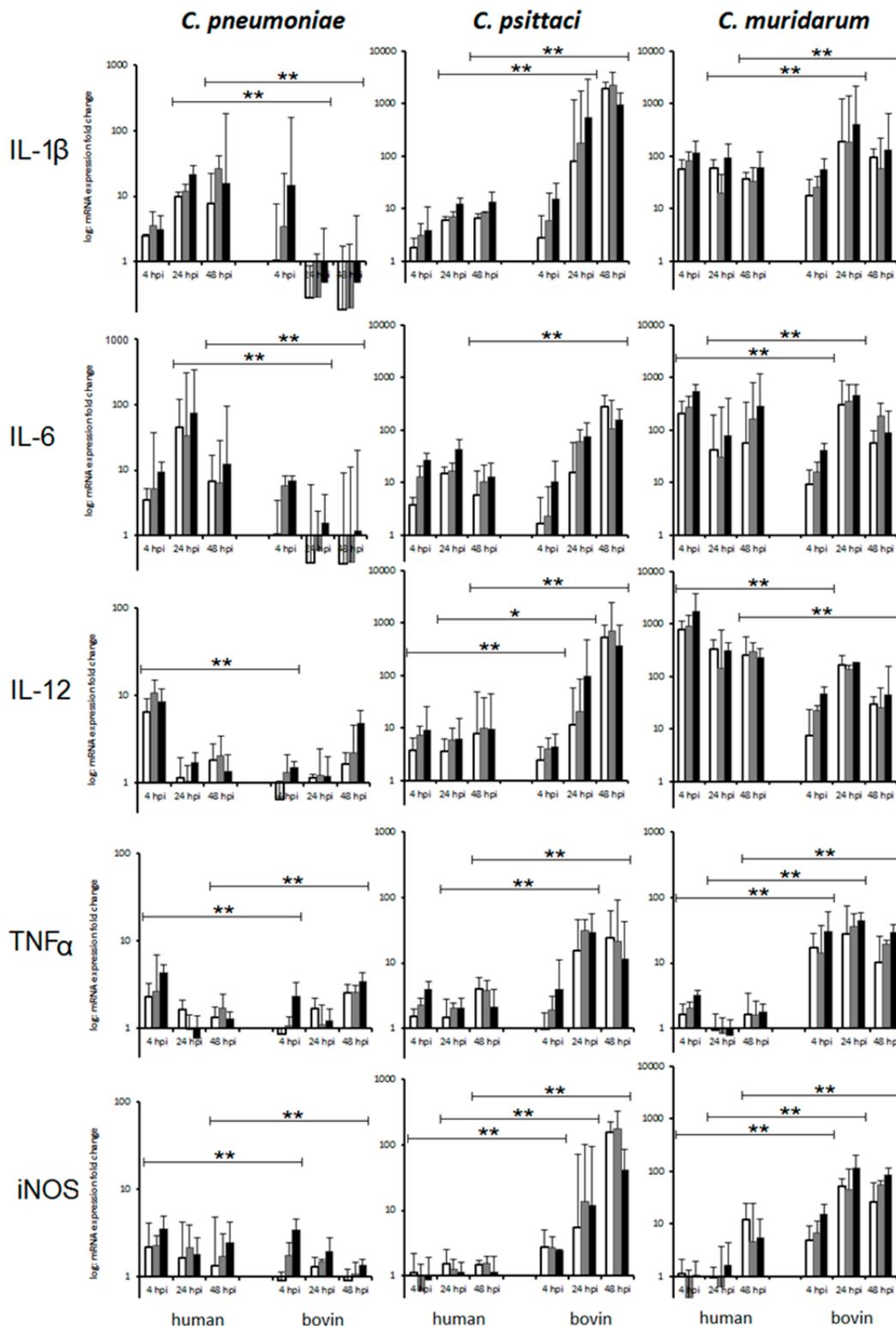
**Abbildung 31 Höhe und Dynamik der mRNA-Expression ausgewählter Zytokine und Enzyme boviner MDM nach Stimulation mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum***

Dargestellt ist die Erhöhung zur mock-Kontrolle mit logarithmischer Skaleneinteilung. Die mock-Kontrolle wurde 1 gesetzt. Für die Darstellung der Dynamik der mRNA-Expression ( → ) wurde der Median der MOI (merge) berechnet, da die ANOVA keine Korrelation zwischen MOI und Zeit zeigte. a: 4 vs 24 hpi, b: 24 vs 48 hpi, c: 4 vs 48 hpi; p<0,05; \*: Unterschied zur mock-Kontrolle, p<0,1; \*\*: Unterschied zur mock-Kontrolle, p<0,05; n=6

Die Dynamik der mRNA-Expression der untersuchten Zytokine und Enzyme verhielt sich während der Stimulation der bovinen MDM mit den verschiedenen Chlamydienpezies sehr unterschiedlich. Während des *C. pneumoniae*-Infektionsversuches steigerte sich nur die mRNA-Expression von IL-12 und TNFα signifikant von 4 zu 48 hpi. Für IL-12 erfolgte ebenfalls ein Anstieg von 4 zu 24 hpi und für TNFα von 24 zu 48 hpi. Im Gegensatz dazu fiel die mRNA-Expression von IL-1β und IL-6 von 4 zu 24 hpi und für IL-1β zusätzlich zu 48 hpi signifikant ab. Die mRNA-Expression von iNOS verringerte sich von 4 beziehungsweise 24 zu 48 hpi. *C. psittaci* konnte die mRNA-Expression von allen Zytokinen und iNOS von 4 zu 24 beziehungsweise 48 hpi signifikant steigern. Die mRNA-Expression von IL-12 und iNOS wurde zusätzlich von 24 zu 48 hpi gesteigert. Eine Stimulation der bovinen MDM mit *C. muridarum* führte zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression aller Zytokine und iNOS von 4 zu 24 hpi. Die mRNA-Expression von IL-1β und IL-6 wurde zusätzlich von 4 zu 48 hpi gesteigert, obwohl es zu einem leichten Abfall von 24 zu 48 hpi kam. Die mRNA-Expression von IL-12 und TNFα fiel signifikant von 24 zu 48 hpi ab (Abbildung 31).

**4.2.2.3. Vergleichende Analyse der Wirtsreaktion in bovinen und humanen MDM**

Die mRNA-Expression aller untersuchten Zytokine und Enzyme war für alle 3 Chlamydienpezies in humanen und bovinen MDM signifikant verschieden. Die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  war in humanen MDM im *C. pneumoniae*-Infektionsversuch 24 und 48 hpi signifikant gegenüber der in den bovinen MDM erhöht. *C. psittaci* und *C. muridarum* hingegen führten 24 und 48 hpi zu einer signifikant höheren mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  in den bovinen MDM. Auch die mRNA-Expression von IL-6 war im *C. pneumoniae*-Infektionsversuch 24 und 48 hpi in den humanen MDM gegenüber der in den bovinen MDM signifikant erhöht. *C. psittaci* führte 48 hpi in bovinen MDM zu einer signifikant höheren IL-6-Expression und im *C. muridarum*-Infektionsversuch war sie 4 hpi in den humanen MDM und 24 hpi dann in den bovinen MDM signifikant höher. Die mRNA-Expression von IL-12 wurde von allen 3 Chlamydienpezies 4 hpi in den humanen MDM signifikant gegenüber der in den bovinen MDM erhöht, sowie nach 48 hpi im *C. muridarum*-Infektionsversuch. 24 und 48 hpi war die mRNA-Expression von IL-12 im *C. psittaci*-Infektionsversuch dann in den bovinen MDM signifikant höher als in den humanen. Die Expression von TNF $\alpha$  wurde durch die bovinen MDM im *C. muridarum*-Infektionsversuch 4, 24 und 48 hpi, im *C. psittaci*-Infektionsversuch 24 und 48 hpi und im *C. pneumoniae*-Infektionsversuch 48 hpi signifikant gegenüber der Expression in humanen MDM gesteigert. Im Gegensatz dazu konnte *C. pneumoniae* die Expression von TNF $\alpha$  4 hpi in den humanen MDM gegenüber der in den bovinen MDM stärker erhöhen. iNOS wurde zu allen 3 Zeitpunkten im *C. psittaci* und *C. muridarum*-Infektionsversuch in den bovinen MDM stärker erhöht als in den humanen MDM. *C. pneumoniae* führte in beiden Wirtszellen zu einer eher schwachen Expression von iNOS, wodurch die berechneten Expressionsunterschiede zwischen den Zellen wechselhaft und minimal waren (Abbildung 32).



**Abbildung 32 Vergleich der mRNA-Expressionsprofile humaner und boviner MDM nach Stimulation mit Chlamydien**

Dargestellt ist die Erhöhung zur mock-Kontrolle mit logarithmischer Skaleneinteilung. Die mock-Kontrolle wurde 1 gesetzt. Für alle 3 Chlamydienpezies waren Unterschiede der Expressionsmuster in den humanen und bovinen MDM zu erkennen. \*: Unterschied zur mock-Kontrolle,  $p < 0,1$ ; \*\*: Unterschied zur mock-Kontrolle,  $p < 0,05$ ; weiß: MOI1; grau: MOI2; schwarz: MOI5;  $n=6$

### 4.2.3 Auslösung der respiratorischen Entladung und Nitritfreisetzung in Makrophagen

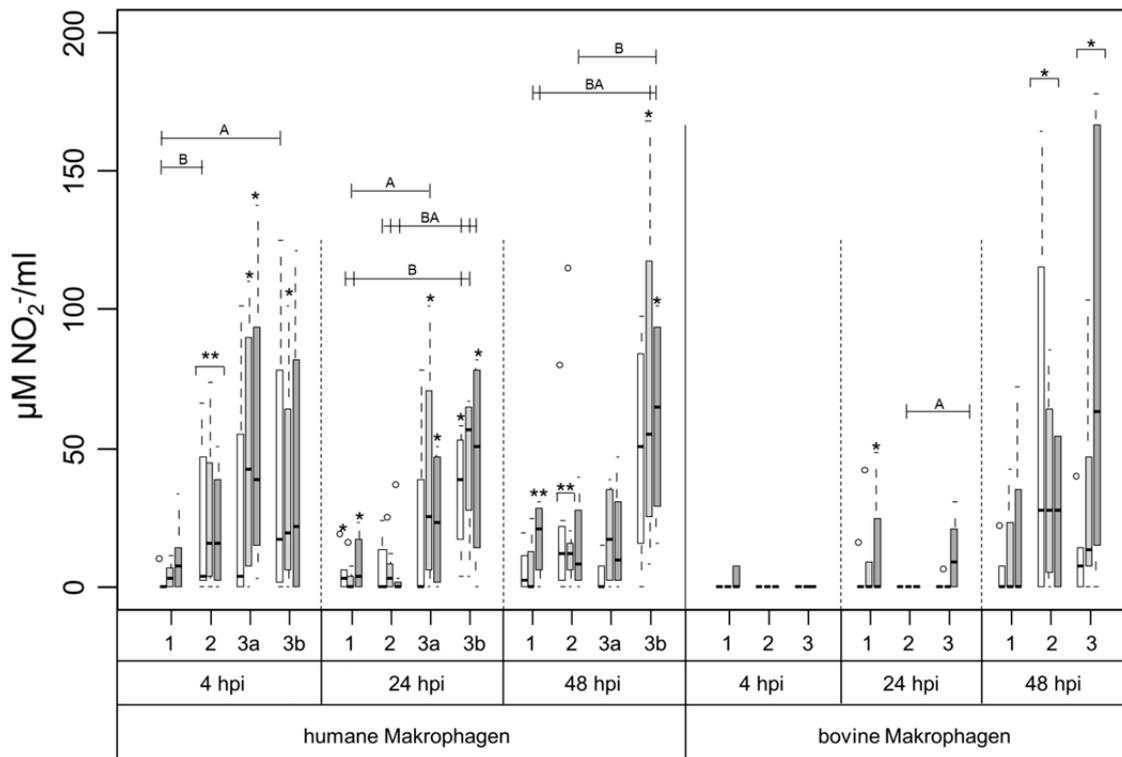
Eine weitere Komponente der Wirtszellimmunantwort ist die Auslösung der respiratorischen Entladung. Dabei werden freie Sauerstoffradikale gebildet, die mittels fluometrischer Verfahren nachgewiesen werden können. Bei der durch iNOS katalysierten Reaktion entsteht nicht nur NO sondern als Nebenprodukt auch  $\text{NO}_2^-$ , das ebenfalls als freies Sauerstoffradikal wirkt und Fremdorganismen abtöten kann. Es wird mittels Griess-Reagenz nachgewiesen.

#### 4.2.3.1. Nitritfreisetzung durch humane und bovine MDM nach Stimulation mit Chlamydien

Die humanen Makrophagen, die mit *C. muridarum* inokuliert worden waren, setzten 48 hpi signifikant mehr  $\text{NO}_2^-$  frei, als solche, die mit *C. psittaci* bzw. *C. pneumoniae* inokuliert worden waren. *C. psittaci* führte zu einer signifikanten Erhöhung von  $\text{NO}_2^-$  nach 4 h und 48 h. *C. pneumoniae* konnte die humanen Makrophagen 24 und 48 hpi zu einer Abgabe von  $\text{NO}_2^-$  anregen. *C. muridarum* führte zu allen Zeitpunkten zu einer signifikanten Abgabe von  $\text{NO}_2^-$  (Abbildung 33).

Die  $\text{NO}_2^-$  - Freigabe in den Überstand der bovinen MDM stieg von 4 zu 48 hpi und von 24 zu 48 hpi signifikant an. 48 Stunden nach der Inokulation der bovinen Zellen mit *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* wurde der  $\text{NO}_2^-$  -Gehalt im Überstand der bovinen Makrophagen signifikant gesteigert. *C. pneumoniae* bewirkte zu diesen Zeitpunkten keine signifikante Nitritabgabe (Abbildung 33).

Im Vergleich zu den Infektionsversuchen mit den humanen MDM war die  $\text{NO}_2^-$  -Abgabe der bovinen MDM nicht signifikant verschieden, was durch die hohen Standardabweichungen zu erklären ist. Auffällig war, dass sich die Freisetzung von  $\text{NO}_2^-$  durch die bovinen Makrophagen über die Zeit steigerte, wohingegen die humanen MDM eine kontinuierliche Freisetzung zeigten (Abbildung 33).



**Abbildung 33 Freisetzung von Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) durch humane und bovine MDM nach Stimulation mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum***

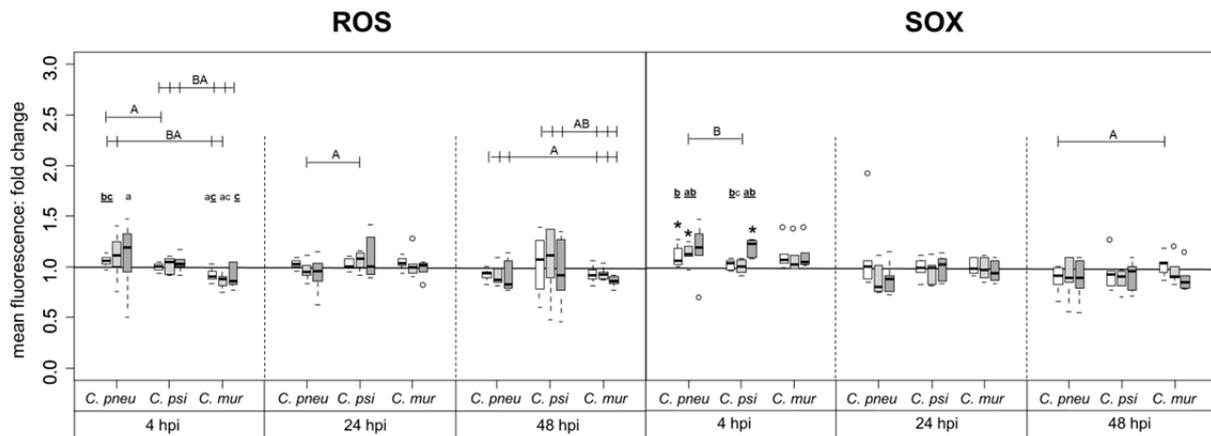
Die NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-Konzentration wurde mittels Griess Reagenz und einer Standardkurve photometrisch ermittelt. Die Werte der negativen Kontrollen wurden von den Werten der inokulierten Zellen abgezogen. 1: *C. pneumoniae*, 2: *C. psittaci*, 3: *C. muridarum* (a: low, b: high);

□: MOI1, ▒: MOI2, ■: MOI5; A: p<0,1; B: p<0,05; AB: p<0,1 and p<0,05; n=4-6

#### 4.2.3.2. Abgabe von freien Sauerstoffradikalen durch humane Makrophagen nach Stimulation mit Chlamydien

Humane Makrophagen setzen während der respiratorischen Entladung Stoffe wie Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), Hydroxyl Radikale (HO), und Peroxy Radikale (ROO) frei. Diese werden unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zusammengefasst. Superoxid (SOX) spielt eine wichtige Rolle bei der Abtötung von Bakterien durch Oxidation. Da die Expression der iNOS, die zur Bildung von Nitrit führt in den humanen MDM sehr gering bis nicht vorhanden war, wurden die MDM auf weitere potentielle Abwehrmechanismen getestet.

Die Abgabe von ROS und SOX durch die humanen MDM war gering. ROS konnte von keiner der 3 Chlamydienpezies signifikant erhöht werden. Dennoch zeigte sich hier, das eine Stimulation mit *C. muridarum* 4 und 48 hpi zu signifikant weniger ROS-Abgabe durch die humanen MDM geführt hat, als eine Stimulation mit *C. pneumoniae* beziehungsweise *C. psittaci*. Die Superoxidabgabe wurde 4 hpi nur von *C. pneumoniae* und *C. psittaci* signifikant erhöht (Abbildung 34).



**Abbildung 34 Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Superoxid (SOX) durch humane MDM, die mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* stimuliert wurden**

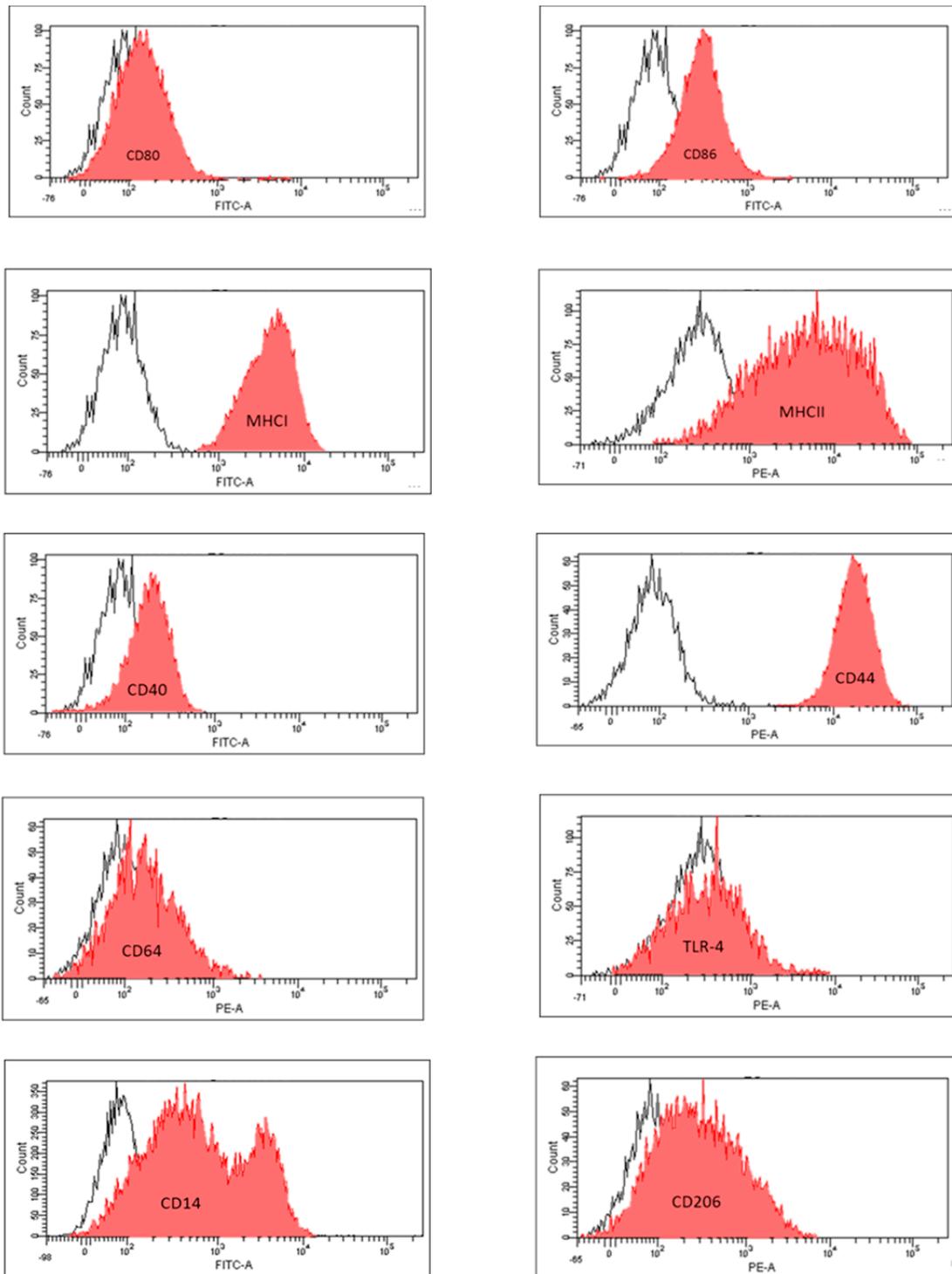
Es wurde die Erhöhung des Fluoreszenz-Mean der stimulierten Proben zu dem Fluoreszenz-Mean der unstimulierten Kontrollen berechnet. Die unstimulierten Kontrollen wurden 1 gesetzt. a: 4/24 hpi, b: 4/48 hpi, c: 24/48 hpi, p<0,1, fett und unterstrichen: p<0,05; A: p<0,1, B: p<0,05; \*: p<0,05; *C. pneu*: *C. pneumoniae*, *C. psi*: *C. psittaci*, *C. mur*: *C. muridarum*; □: MOI1, ◻: MOI2, ◼: MOI5; n=6

#### 4.2.4 Einfluss verschiedener Chlamydien-Stämme auf die Expression der Oberflächenmarker von humanen Makrophagen

Die Expression der Oberflächenmoleküle kann Auskunft über die Interaktion der Makrophagen mit anderen Immunzellen (CD80, CD86, CD40), über ihre Fähigkeit Antigene zu präsentieren (MHC I/II), über ihren Aktivierungsgrad (CD40, CD64, TLR-4, CD14, CD206) und über ihre Phagozytoseaktivität (CD44) geben.

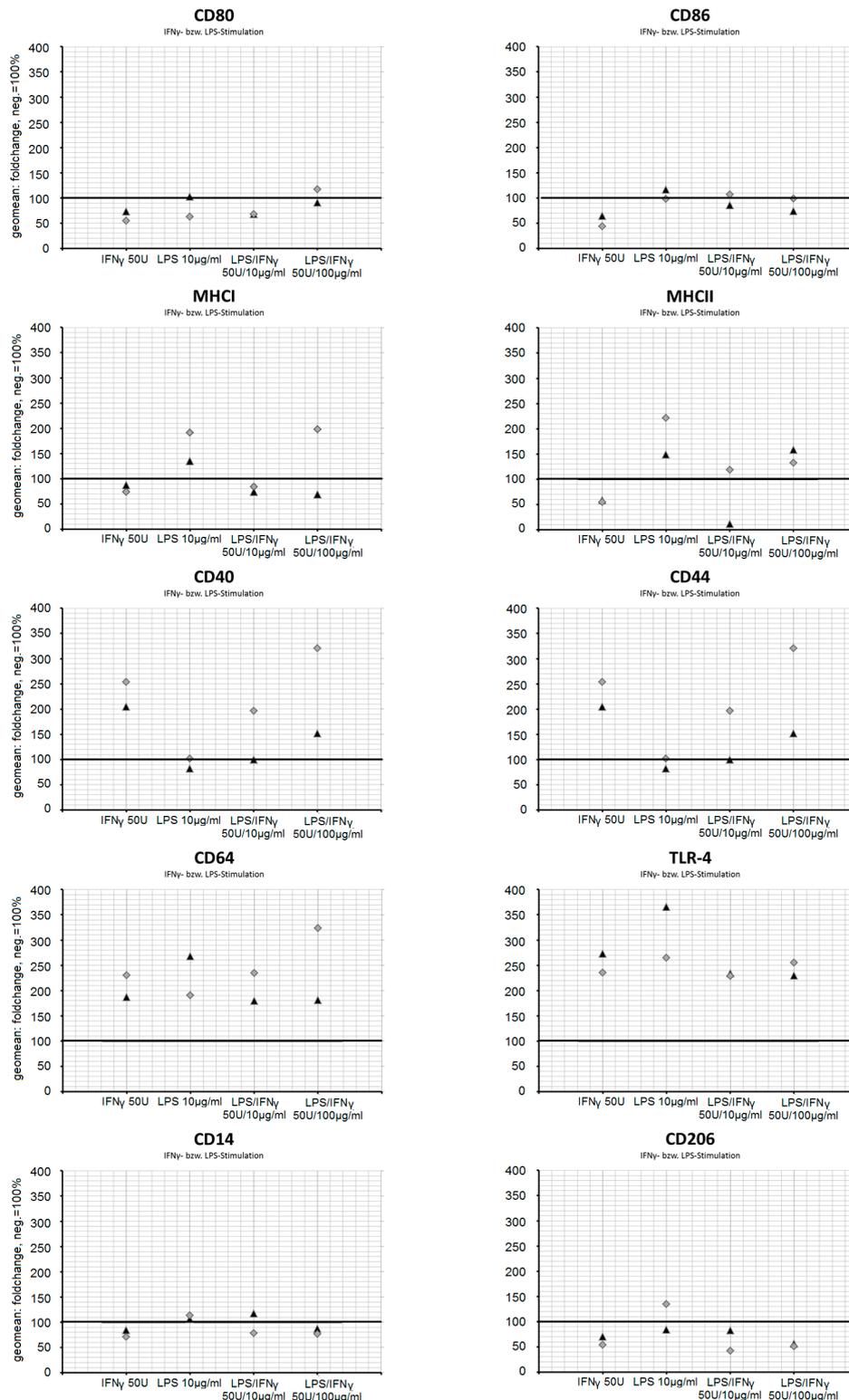
Zunächst wurde das Oberflächenexpressionsprofil der humanen MDM vor der Stimulation mit Chlamydien bestimmt. Die Oberflächenmoleküle CD80, CD64, TLR-4 und CD206 wurden nur zu sehr geringen Anteilen auf den humanen Makrophagen exprimiert. CD86 und CD40 wurden in mittelmäßiger Anzahl auf den Makrophagen exprimiert. Die Marker MHC I/II, CD44 und CD14 wurden vergleichsweise stark bis sehr stark auf der Oberfläche der Zellen exprimiert (Abbildung 35).

Die unstimulierte Makrophagenzellkultur wurde ebenfalls auf Marker untersucht, die B-Zellen, T-Zellen und dendritische Zellen kennzeichnen. In der Kultur wurden im Median von 4 unstimulierten Proben die Marker CD19 (B-Zellen) zu 12,65%, CD3 (T-Zellen) zu 5,65% und CD1a (dendritische Zellen) zu 8,5% exprimiert, die spezifisch auf der Oberfläche der in Klammern stehenden Zellen exprimiert werden.



**Abbildung 35 Expression der Oberflächenmarker von humanen monozyten-gereiften Makrophagen (MDM) vor der Stimulation mit Chlamydien**

Gezeigt werden repräsentative Histogramme mit den jeweiligen Isotyp-Kontrollen und den dazugehörigen Oberflächenmarkern. Durchflusszytometrie.



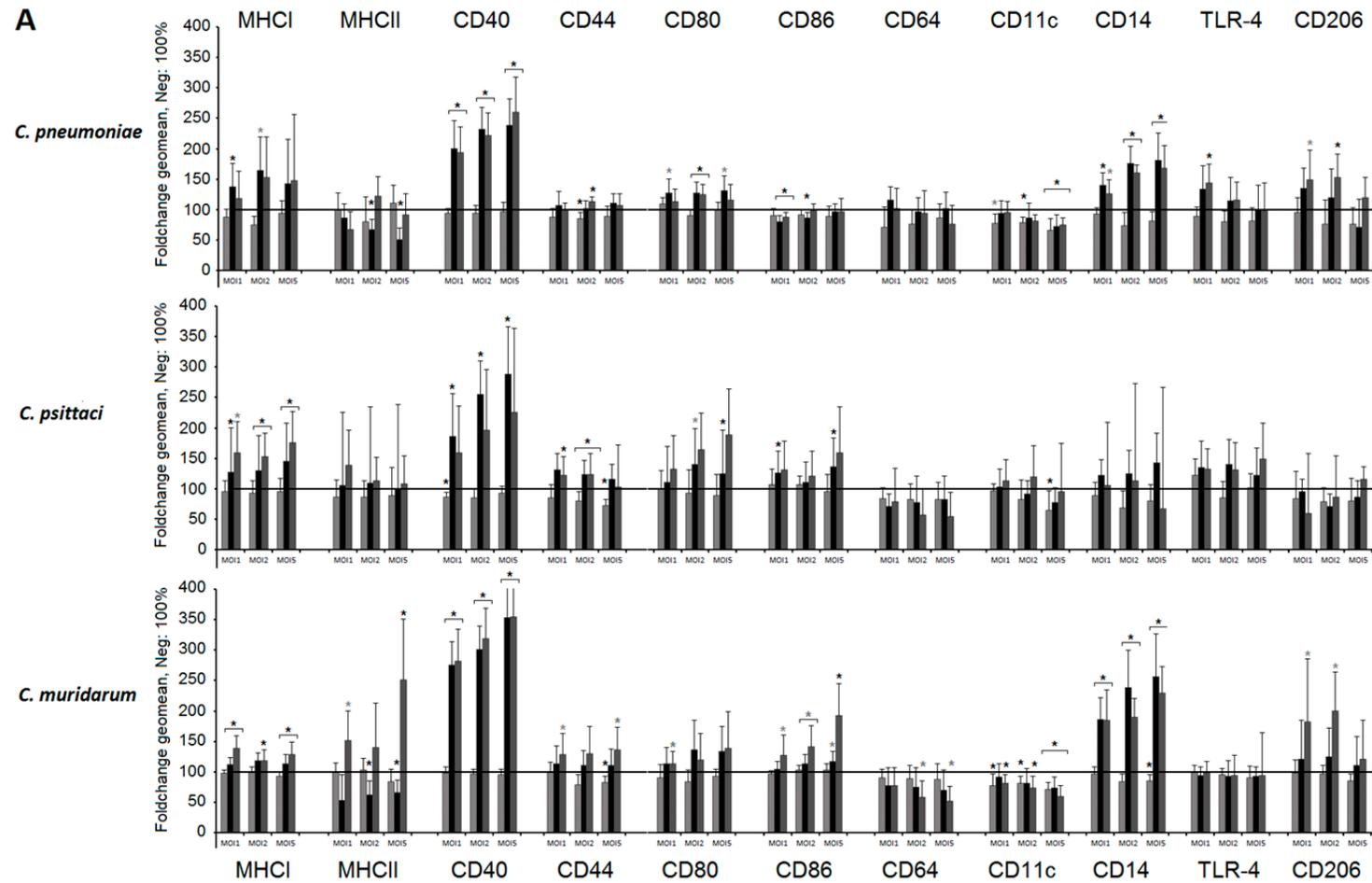
**Abbildung 36 Expression der Oberflächenmarker humaner monozyten-gereifter Makrophagen (MDM) nach Stimulation mit IFN $\gamma$  und/oder LPS. 24 hpi**

Humane MDM wurden mit 50 U IFN $\gamma$ , 10  $\mu$ g/ml LPS, einem Gemisch aus 50 U IFN $\gamma$  und 10  $\mu$ g/ml LPS und einem Gemisch aus 50 U IFN $\gamma$  und 100  $\mu$ g/ml LPS stimuliert und 24 hpi durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind Punktdiagramme aus n=2 Versuchsreihen. Die Erhöhung des Geomeans der stimulierten Zellen zu dem der nicht-stimulierten Zellen wurde ermittelt. Die nicht-stimulierten Zellen wurden 100% gesetzt.

Zur Untersuchung der Stimulierbarkeit der humanen MDM wurde die Expression der Oberflächenmoleküle nach IFN $\gamma$ - und/oder LPS- Gabe überprüft. Nach alleiniger IFN $\gamma$ -Stimulation (50U) der humanen MDM wurde die Expression von CD40, CD44, CD64 und TLR-4 gesteigert. MHCI, MHCII, CD64, TLR-4, CD14 und CD206 wurden nach LPS-Stimulation (10 $\mu$ g/ml) vermehrt exprimiert. Wenn man IFN $\gamma$  und LPS als ein Gemisch eingesetzt hat, wurde die Expression von MHCII, CD40, CD44, CD64 und TLR-4 gesteigert (Abbildung 36).

*C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. muridarum* waren nicht in der Lage eine signifikant vermehrte Expression von CD64, CD11c und TLR-4 (nur von *C. pneumoniae* nach 72 h bei MOI1 leicht erhöht) in den humanen Makrophagen hervorzurufen. CD64 und vor allem CD11c wurden teilweise sogar gegenüber der Negativkontrolle signifikant erniedrigt. Die Expression von MHCI wurde von allen 3 Chlamydienpezies in den humanen MDM gesteigert. Der Anstieg erfolgte nach Stimulation mit *C. psittaci* und *C. muridarum* nach 48 h und hielt bis 72 h nach der Inokulation an. *C. pneumoniae* führte zu einer signifikanten Erhöhung nach 48 h für MOI1 und 2. Zwischen den Spezies gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Expression von MHCII dagegen wurde erst nach 72 h signifikant erhöht und zwar nur von *C. muridarum* (MOI1 und 2). Nach 48 h kam es zunächst zu einer signifikanten Erniedrigung der Expression von MHCII durch *C. muridarum*. Die Expression des Oberflächenmarkers CD40 wurde von allen 3 Chlamydienpezies in den humanen MDM 48 h und 72 h (ohne *C. psittaci*) nach der Inokulation signifikant erhöht. Die Erhöhung erfolgte von 4 zu 48 hpi und zu 72 hpi, aber nicht von 48 hpi zu 72 hpi. *C. muridarum* konnte die Exprimierung von CD40 signifikant am besten steigern. *C. pneumoniae* (MOI2), *C. psittaci* (MOI1, 2) und *C. muridarum* (MOI 1, 5) führten 72 hpi zu einer signifikant erhöhten Oberflächenexpression von CD44, die bei allen Chlamydienpezies sehr gering war. Die Expression des Oberflächenmarkers CD80 wurde ebenfalls in geringem Maß und nur sporadisch signifikant von den Chlamydien erhöht. CD86 hingegen wurde nur durch *C. psittaci* und *C. muridarum* signifikant vermehrt exprimiert. *C. psittaci* erhöhte die Expression von CD86 48 hpi um bis zu 30% und *C. muridarum* erhöhte die Expression von CD86 72 hpi um 30 bis 100%. Dennoch gab es aufgrund der hohen Standardabweichungen kaum einen signifikanten Unterschied zwischen den *C. psittaci*- und *C. muridarum*-Infektionsversuchen. Die Stimulation der humanen Makrophagen mit *C. pneumoniae* bzw. *C. muridarum* führte zur signifikanten Erhöhung der Oberflächenexpression von CD14. Die Erhöhung erfolgte von 4 h zu 48 h und zu 72 h. Zwischen den Zeitpunkten 48 hpi und 72 hpi gab es keinen signifikanten Unterschied. Auch hier konnte *C. muridarum* mit circa 150% die signifikant höchste Erhöhung hervorrufen. Die Expression des Oberflächenmarkers CD206 wurde erst nach 72 h (MOI1 und 2) durch die Stimulation der Makrophagen mit *C. muridarum* bzw. *C. pneumoniae* signifikant erhöht. *C. psittaci* bewirkte keine erhöhte Expression dieses Markers in humanen MDM (Abbildung 37).

# ERGEBNISSE



**B**

<i>C. pneumoniae</i> zu <i>C. psittaci</i>				
Zeit	MOI	OM	p	
4 hpi	1	CD40	0,06345	
4 hpi	2	CD86	0,02597	
48 hpi	1	CD14	0,02597	
48 hpi	2	CD14	0,06494	
48 hpi	1	CD86	0,00217	
48 hpi	2	CD86	0,00866	
48 hpi	5	CD86	0,00433	
48 hpi	2	MHCII	0,01732	
48 hpi	5	MHCII	0,02597	
72 hpi	1	CD206	0,02118	
72 hpi	2	CD206	0,01193	
72 hpi	1	MHCII	0,01291	

<i>C. pneumoniae</i> zu <i>C. muridarum</i>				
Zeit	MOI	OM	p	
48 hpi	1	CD14	0,02597	
48 hpi	1	CD40	0,0169	
48 hpi	2	CD40	0,00526	
48 hpi	5	CD40	0,0044	
48 hpi	1	CD86	0,00866	
48 hpi	2	CD86	0,00866	
48 hpi	5	CD86	0,06494	
72 hpi	1	CD14	0,00433	
72 hpi	2	CD14	0,06494	
72 hpi	5	CD14	0,01515	
72 hpi	1	CD40	0,0048	
72 hpi	2	CD40	0,0075	
72 hpi	5	CD40	0,0144	
72 hpi	1	CD86	0,04113	
72 hpi	2	CD86	0,02597	
72 hpi	5	CD86	0,00866	
72 hpi	1	MHCII	0,00866	
72 hpi	5	MHCII	0,04113	

<i>C. psittaci</i> zu <i>C. muridarum</i>				
Zeit	MOI	OM	p	
48 hpi	1	CD14	0,00217	
48 hpi	2	CD14	0,02597	
48 hpi	5	CD14	0,02597	
48 hpi	1	CD40	0,03392	
48 hpi	2	CD40	0,05565	
48 hpi	1	CD86	0,02597	
48 hpi	1	MHCII	0,04113	
48 hpi	2	MHCII	0,0303	
72 hpi	1	CD14	0,06508	
72 hpi	2	CD14	0,06508	
72 hpi	5	CD14	0,06508	
72 hpi	1	CD40	0,0147	
72 hpi	2	CD40	0,0661	
72 hpi	5	CD40	0,0782	
72 hpi	1	CD206	0,01945	
72 hpi	2	CD206	0,01945	

## Abbildung 37 Expression von Oberflächenantigenen auf humanen monozyten-gereiften Makrophagen (MDM) nach Stimulation

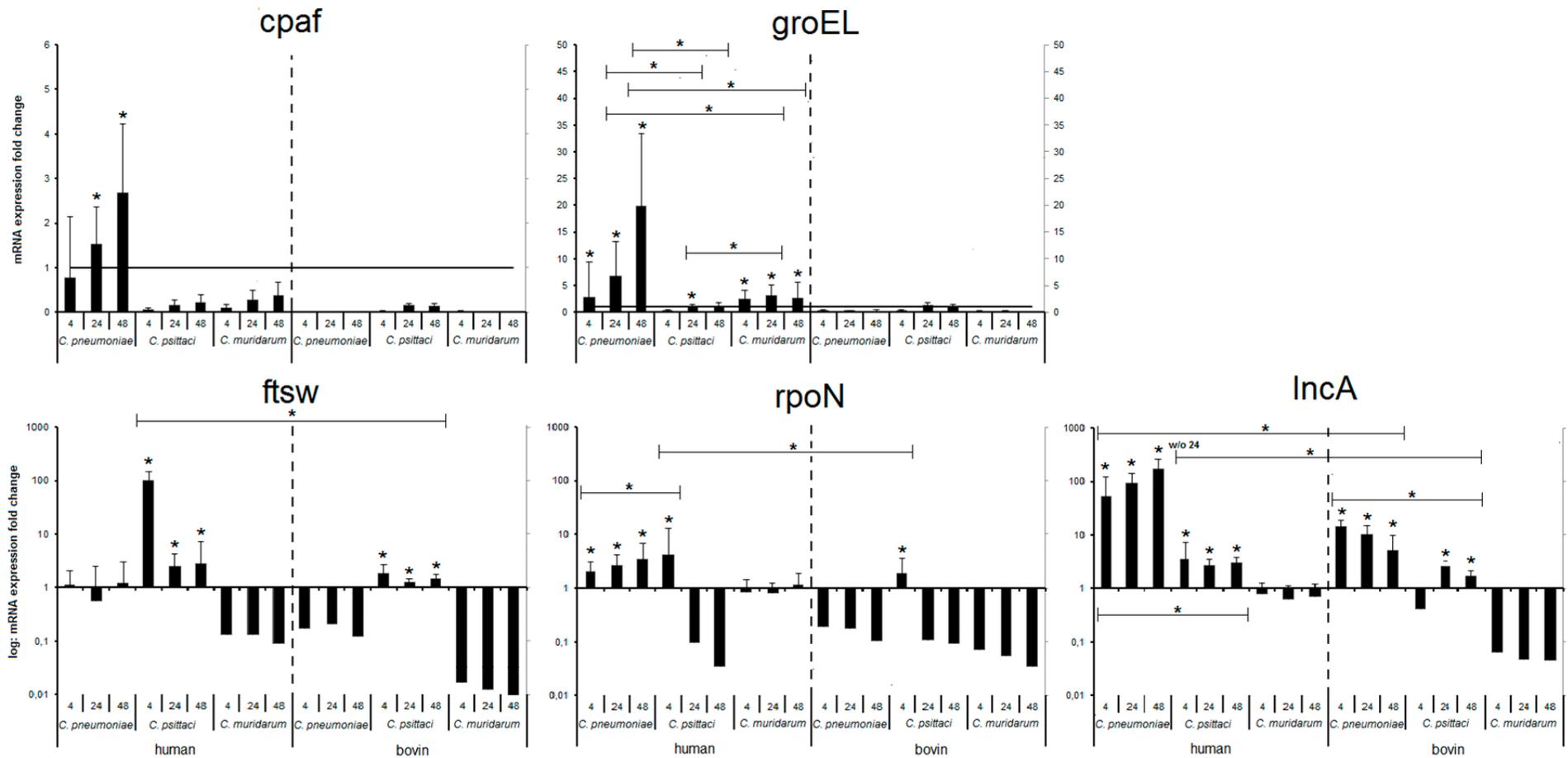
**A:** Humane MDM wurden mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* stimuliert (MOI1, 2, 5) und nach 4, 48 und 72 h mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind Säulendiagramme mit n=6 Versuchsreihen. Die Erhöhung des Geomean der stimulierten Zellen zu dem der nicht-stimulierten Zellen wurde ermittelt. Die nicht-stimulierten Zellen wurden 100% gesetzt. ■: 4 hpi, ■: 48 hpi; ■: 72 hpi, —: Negativkontrolle; \*: Signifikanz zur Kontrolle, p<0,05; \*\*: Signifikanz zur Kontrolle, p<0,1; **B:** Signifikanzen zwischen den verschiedenen Chlamydienpezies; n=6

### 4.3 Die Expression chlamydialer Virulenzfaktoren durch *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, bzw. *C. muridarum* in humanen und bovinen monozyten-gereiften Makrophagen

Auch Chlamydien haben die Möglichkeit auf das Zusammentreffen mit ihren Wirtszellen mit der Expression verschiedener Proteine zu reagieren. So wird zum Beispiel mit cpaf auf das Apoptosevermögen, das Transkriptionsvermögen und den Vesikeltransport eingewirkt. Mit groEL kann ein Hitzeschockprotein abgegeben werden, das die Entzündungsreaktion im Wirt unterstützt. Ftsw gehört zu den Zellteilungsproteinen und tritt vermehrt während der Replikationsphase auf. Zur Stickstoff-Assimilierung wird vor allem der Transkriptionsfaktor rpoN benötigt und IncA trägt zur Fusion chlamydialer Vesikel bei. Die mRNA-Expression dieser Proteine in humanen beziehungsweise bovinen MDM wurden im Vergleich zu den jeweiligen zellfreien Chlamydienkonserven und zu ihrer Expression in nicht immunkompetenten BGM bestimmt.

#### 4.3.1. Chlamydiale Virulenzfaktoren in der Chlamydienkonserve und in humanen bzw. bovinen MDM

Die mRNA-Expression von cpaf wurde nur von *C. pneumoniae* in humanen MDM gegenüber der *C. pneumoniae*-Konserve 24 und 48 hpi signifikant um das 1,5 bis 2,5-fache erhöht. *C. pneumoniae* (20-fach) und *C. muridarum* (3-fach) exprimierten signifikant mehr groEL in humanen Makrophagen als in ihrer zugehörigen zellfreien Konserve. 24 und 48 hpi war die Expression von groEL durch *C. pneumoniae* in humanen MDM signifikant höher als die Expression durch *C. muridarum* beziehungsweise *C. psittaci*. In bovinen MDM wurde die Expression von groEL nicht erhöht. Nur *C. psittaci* erhöhte seine mRNA-Expression von ftsw in humanen (100-fach) und bovinen (1,8-fach) MDM gegenüber der Konservenkontrolle. Diese war in humanen MDM signifikant höher als in bovinen MDM. Die mRNA-Expression von rpoN wurde von *C. pneumoniae* (3,4-fach) in humanen MDM und 4 hpi von *C. psittaci* in humanen (4-fach) und bovinen (1,9-fach) MDM signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Expression von *C. psittaci* 4 hpi war in humanen MDM signifikant höher als die Expression von *C. pneumoniae* und die Expression in bovinen MDM zu diesem Zeitpunkt. IncA wurde von *C. pneumoniae* und *C. psittaci* in humanen und bovinen MDM exprimiert. *C. pneumoniae* und *C. psittaci* (4 und 48 hpi) exprimierten signifikant mehr IncA in humanen als in bovinen MDM. In beiden Zellspezies war die Expression durch *C. pneumoniae* (10 bis 100-fach) signifikant höher, als die von *C. psittaci* (bis 5-fach) (Abbildung 38).

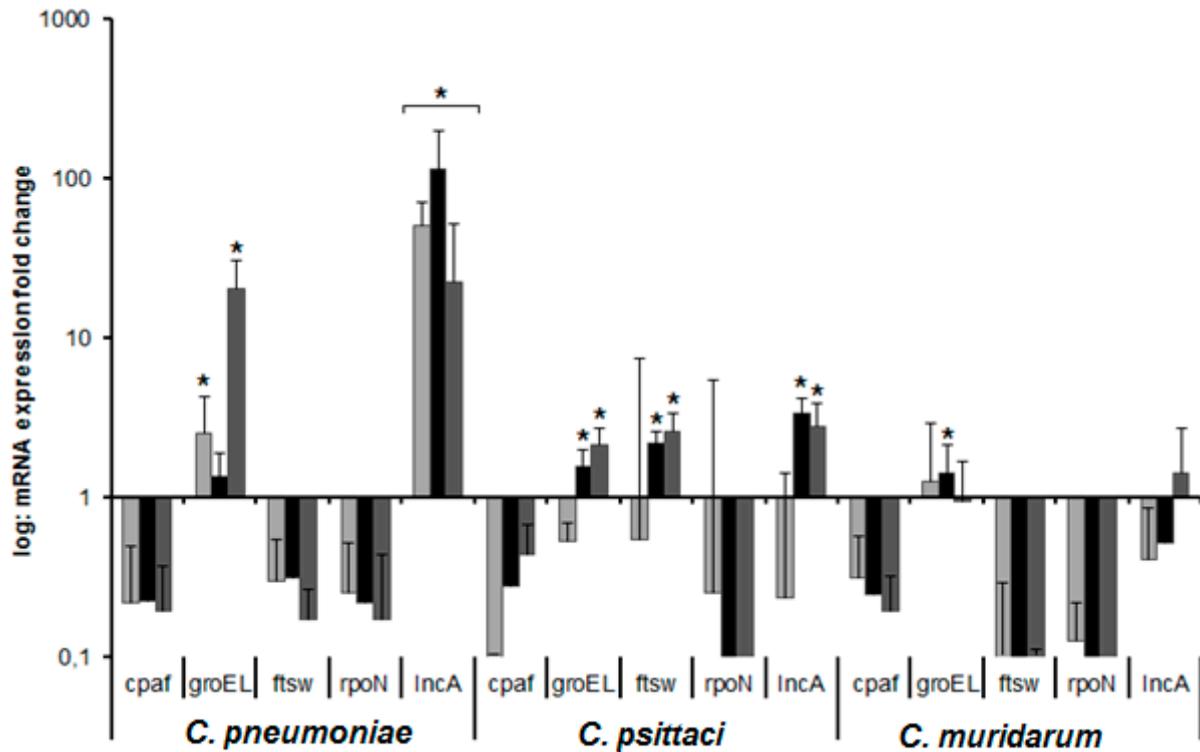


**Abbildung 38 mRNA-Expression chlamydialer Virulenzfaktoren in humanen und bovinen MDM**

Dargestellt wird die Erhöhung der chlamydialen mRNA-Expression in humanen und bovinen MDM gegenüber der mRNA-Expression in den Chlamydienkonserven. Aus den Werten der Konzentration (MOI) wurde der Median gebildet, nachdem die ANOVA ergab, dass keine Korrelation zwischen MOI und Zeit bzw. Stamm bestand. Die Werte aus den Chlamydienkonserven wurden 1 gesetzt. 4: 4 hpi; 24: 24 hpi; 48: 48 hpi; \*:  $p < 0,05$ ;  $n=6$

**4.3.2. mRNA-Expression von chlamydialen Virulenzfaktoren in nicht immunkompetenten BGM**

In den BGM erhöhten alle 3 Chlamydienspezies signifikant die Expression von groEL gegenüber der Konservenkontrolle. Die mRNA-Expression von IncA wurde signifikant von *C. pneumoniae* und *C. psittaci* erhöht. Die Expressionserhöhung, die dabei durch *C. pneumoniae* erreicht wurde, war signifikant höher. Die Expression von ftsw wurde einzig von *C. psittaci* signifikant nach 24 und 48 h erhöht. Alle 3 Chlamydienspezies waren nicht in der Lage in BGM die Expression von cpaf zu erhöhen (Abbildung 39).



**Abbildung 39 Die mRNA-Expression der Virulenzfaktoren von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. muridarum* in BGM**

Gezeigt wird die Erhöhung der chlamydialen mRNA-Expression in BGM zur mRNA-Expression in den zellfreien Chlamydienkonserven. Aus den Werten der Konzentration (MOI) wurde der Median gebildet, nachdem die ANOVA ergab, dass keine Korrelation zwischen MOI und Zeit bzw. Stamm bestand. Die Werte aus den Chlamydienkonserven wurden 1 gesetzt. Die Y-Achse wurde logarithmisch skaliert. \*:  $p < 0,05$ ; ■: 4hpi; ■: 24 hpi; ■: 48 hpi; n=6

## 5. DISKUSSION

Der Genus *Chlamydia* gehört zur Familie der *Chlamydiaceae* und enthält 11 verschiedene Spezies, die entweder auf einen Wirt beschränkt sind oder Wirte unterschiedlicher Art infizieren können. Vergleichende Genomanalysen haben sich mit dem Phänomen dieser unterschiedlichen Anpassungsgrade beschäftigt und einige mögliche Faktoren offengelegt, die für ein enges oder breites Wirtsspektrum verantwortlich sind (Read, Brunham et al. 2000; Millman, Tavare et al. 2001). Studien mit Chlamydien waren bisher sehr artifiziell, da sie *in vitro* und meistens in Zelllinien durchgeführt wurden (Gaydos, Summersgill et al. 1996; Heinemann, Susa et al. 1996; Yamaguchi, Haranaga et al. 2002). Infektionsversuche, die die Immunabwehr des Wirtes und das Replikationsverhalten von Chlamydien untersuchen sollen, wurden vornehmlich nur mit einer Chlamydienpezies und in einem Wirt durchgeführt (Yong, Chi et al. 1987; Gerard, Kohler et al. 1998). In dieser Arbeit wurden erstmals gleichzeitig 3 verschiedene Chlamydienpezies in einem System mit primären monozyten-gereiften Makrophagen untersucht. Diese Versuchsreihe wurde in 2 verschiedenen Wirten (Mensch, Rind) durchgeführt. Damit entstand eine komplexe Versuchsreihe, die möglichst viele Aspekte der Wirtsadaptation im direkten Vergleich beleuchten sollte. Der Einsatz von primären Zellen führte zur Verringerung der Nachteile, die bei der Nutzung von Zelllinien entstehen (<http://www.lonza.com/products-services/bio-research/primary-cells/primary-cells-vs-cell-lines.aspx>; (Pan, Kumar et al. 2009)). Die primären Zellen, die für diese Arbeit verwendet wurden, hatten den Vorteil, dass sie für jeden Versuch frisch isoliert und nicht stimuliert oder manipuliert wurden. Sie wurden direkt dem *in vivo*-System entnommen und dann *in vitro* herangezüchtet. Bei den Infektionsversuchen wurde besonderen Wert auf immunologische Prozesse des Wirtes und das Verhalten der Erreger gelegt. Makrophagen wurden gewählt, um Immunprozesse zu untersuchen, da sie bei einer Infektion zu den ersten Immunzellen gehören. Des Weiteren können sie nachweislich von Chlamydien infiziert werden (Beagley, Huston et al. 2009).

### 5.1 Vergleich und Charakterisierung der primären monozyten-gereiften Makrophagen

Die Isolierung und Differenzierung von monozyten-gereiften Makrophagen aus Vollblutspenden ist anspruchsvoll und von verschiedenen Faktoren abhängig. Oft kann eine Methode, die bei einer Spenderspezies sehr gut funktioniert hat, nicht auf eine andere Spezies übertragen werden. So führte die etablierte Isolationstechnik zur Gewinnung von monozyten-gereiften Makrophagen aus Hühnerblut (Malkwitz, Berndt et al. 2013) nicht zum gewünschten Erfolg, als der Versuch unternommen wurde humane MDM aus Spenderblut zu gewinnen. Erst nach langwierigen Modifizierungen des Plattenadhäsionsverfahrens konnten charakteristische MDM aus humanem Spender-Buffy Coat gewonnen werden (Tabelle 5). Die Übertragung dieser modifizierten Methode auf die Isolierung und Differenzierung von bovinen MDM aus Spenderblut führte ebenfalls nicht zu dem gewünschten Erfolg. Bovine MDM wurden daraufhin nach dem etablierten Teflon-Beutel-Verfahren (Sobotta, Hillarius et al. 2016) isoliert und kultiviert. Das Plattenadhäsionsverfahren und das Teflon-Beutel-Verfahren sind die jeweiligen Standardmethoden für die hier verwendeten Spezies.

Die Anfänge der Monozyten-Isolation aus humanem Spenderblut lassen sich bis in das Jahr 1925 zurückverfolgen (Lewis 1925). 1979 stellte Zuckerman (Zuckerman, Ackerman et al. 1979) eine Liste der bisherigen Verfahren zusammen, die allesamt auf Adhärenz der Zellen

beruhten (Boyum 1968). Die Modifizierungen des Plattenadhäsionsverfahrens für die Gewinnung der humanen MDM beruhten auf der Arbeit von Pinet et al. (Pinet, Dupont et al. 2003). Bei dem hier angewendeten Verfahren zur Gewinnung von humanen MDM handelt es sich dementsprechend um ein lang etabliertes und immer wieder verbessertes Verfahren. Versuche das Teflon-Beutel-Verfahren auf humane MDM zu adaptieren wurden publiziert (van der Meer, van de Gevel et al. 1982; Schwager and Jungi 1994). Durch erhebliche Varianzen in der Durchführung konnte sich diese Methode allerdings nicht als Standardverfahren etablieren. Zur Isolierung von bovinen MDM wurde das Teflon-Beutel-Verfahren erstmals 1996 (Jungi, Thony et al. 1996) angewandt. Seit dem wurde immer wieder erfolgreich auf diese Methode zurückgegriffen (Adler, Adler et al. 1996; Janagama, Jeong et al. 2006; Menge, Loos et al. 2015).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden die Makrophagen als konfluente Zellrasen in Zellkulturplatten mit 6, 24 und 96 Wells benötigt. Die beiden Isolationsverfahren für humane und bovine MDM führten zu einem Unterschied im Differenzierungsgrad der MDM bei Aussaat in die Zellkulturplatten. Während humane MDM noch als Monozyten auf die Wells gebracht wurden und weitere 6-8 Tage reifen mussten, waren die bovinen MDM durch die Reifung im Teflon-Beutel bei Ausplattierung bereits zu Makrophagen ausdifferenziert. Die humanen Monozyten zeigten erst nach Aussaat auf einen speziell entwickelten Untergrund eine ausreichende Adhärenz. Die verbesserte Adhärenz ist auf Modifikationen der Polymere der Plastikoberfläche zurückzuführen, die die primäre Adhärenz und die Langzeitadhärenz von Zellen verbessern (Greiner 2013). Zusätzlich wurde die Differenzierung zu Makrophagen durch ein speziell ausgewähltes humanes Serum unterstützt (Tabelle 5). Grundlage hierzu ist der Umstand, dass Monozyten durch Serumproteine, wie Immunglobulin G und M, Albumin, Fibrinogen und Fibronectin bei der Makrophagenreifung unterstützt werden (Akiyama, Griffith et al. 1988). Die ausdifferenzierten bovinen Makrophagen heften sich hingegen schnell an Oberflächen, auch ohne spezielle Oberflächenmodifikationen (Salthouse 1984).

Die in dieser Arbeit generierten humanen und bovinen MDM zeigten charakteristische Merkmale von Makrophagen und ließen sich von Monozyten abgrenzen (siehe Abschnitt 1.2.). Mit den beschriebenen Verfahren generierte humane MDM besaßen einen deutlich höheren Durchmesser (Abbildung 15E,  $\sim 32 \mu\text{m}$ ) als Monozyten. Kleinere Makrophagen traten ebenfalls auf (Abbildung 15A), was auf die hohe Konfluenz der Zellkulturen zurückzuführen ist, wodurch weniger Fläche zum Größenwachstum vorhanden war. Bovine MDM hatten einen etwas höheren Durchmesser als humane MDM (Abbildung 16B,  $\sim 40 \mu\text{m}$ ). Die hier verwendeten humanen und bovinen Zellen zeigten deutliche Vesikel, Lysosomen und ausgeprägte Pseudopodien waren zu erkennen. Bovine MDM besaßen mehr Vesikel, als humane MDM, was auf eine stärkere Aktivierung der bovinen MDM hindeutet. Bei Aktivierung von Makrophagen, die u.a. von Kleinstpartikeln und Zytokinen ausgelöst werden kann, lagern sich mehr Lysosomen, Mitochondrien und pinocytotische Vesikel im Zytoplasma ein (Sacco 2009). Bei der Isolationsmethode der bovinen MDM wurde durch mehrmaliges Waschen die Anzahl anderer Blutimmunzellen verringert, aber nicht vollständig eliminiert. Zytokine von B- und T-Zellen und Partikel abgestorbener Zellen können zu einer verstärkten Aktivierung der Makrophagen geführt haben. Auch autogene Zytokine der kultivierten Makrophagen kommen in Frage (Sacco 2009).

Als wichtige Zellen des Immunsystems sind Makrophagen nach Stimulation durch Pathogene dazu in der Lage bestimmte Zytokine zu exprimieren, die den inflammatorischen Reaktionsweg kennzeichnen (Kenneth M. Murphy 2009). Nach Stimulation mit E.coli-LPS kam es zu einer erhöhten Expression von IL-1 $\beta$ -, IL-6-, IL-10-, IL-12-, IL-18-, TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ - mRNA in den humanen MDM. Wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben ist dieses mRNA-Expressionsprofil typisch für den M1-Makrophagenaktivierungstyp (Tabelle 2). Zusätzlich wurde die mRNA-Expression vonIDO und Mcl-1 erhöht.

In den humanen Makrophagen der vorliegenden Studie konnte nach Stimulation mit E. coli-LPS keine signifikante Expression von iNOS nachgewiesen werden. Der Grund dafür könnte eine untergeordnete Rolle der iNOS bei der Bekämpfung von Chlamydien und anderen Bakterien im humanen Organismus sein (Miyairi, Tatireddigari et al. 2007). In der Literatur wird sogar diskutiert, ob humane Makrophagen überhaupt iNOS exprimieren können (MacMicking, Xie et al. 1997). Unter normalen Aktivierungsbedingungen bilden humane Makrophagen kein NO aus. Es gibt einige Studien, die über eine Induktion von iNOS beziehungsweise NO berichtet haben. Die Aktivierungsbedingungen über die berichtet wurde, konnten aber nicht wiederholt werden oder waren eingeschränkter, als die für Makrophagen aus Nagetieren (Adler, Adler et al. 1996). Die hier untersuchten humanen MDM setzten nach Stimulation mit Chlamydien geringe Mengen an NO $_2^-$  frei. Die Freisetzung verlief unregelmäßig und war wenig aussagekräftig. Ähnliche Werte wurden nach Stimulation mit LPS/IFN $\gamma$  ermittelt (Daten nicht aufgeführt). Die Freisetzung von NO $_2^-$  durch bovine MDM nach Stimulation mit Chlamydien war nicht signifikant gegenüber der von humanen MDM erhöht, erfolgte aber regelmäßiger und war damit besser interpretierbar. Das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) spielt im humanen Organismus bei der Bekämpfung von Chlamydien eine zentrale Rolle. Es gibt Hinweise dafür, dass die Aktivität der iNOS im humanen Organismus geringer ist, als bei Mäusen, die unter anderem dieses Enzym für die Bekämpfungen der Chlamydien nutzen. Dafür fehlt Mäusen wiederum eine entsprechende IDO-Aktivität (Miyairi, Tatireddigari et al. 2007). IDO-Aktivität wurde in epithelialen Zelllinien und in humanen Monozyten beziehungsweise Makrophagen nachgewiesen. Die Aktivität von IDO in humanen Makrophagen ist deutlich höher als in humanen Monozyten (Carlin, Borden et al. 1989). Die mRNA-Expression der IDO wurde in der vorliegenden Studie nach LPS-Stimulation in humanen MDM 24 hpi um das 1500-fache gesteigert. Da die IDO-Expressionserhöhung durch IFN $\gamma$  induziert wird, wurde auch die mRNA-Expression von IFN $\gamma$  nach Stimulation mit LPS untersucht. Eine Steigerung der IFN $\gamma$  mRNA-Expression um das circa 100-fache wurde ermittelt. Die Eigenproduktion von IFN $\gamma$  durch Makrophagen ist umstritten. Dennoch gibt es Studien, die eine solche Produktion nach Stimulation mit Bakterien, IL-12, IL-12 und IL-18 oder INF $\gamma$  belegen (Frucht, Fukao et al. 2001). Murine knochenmark-gereifte Makrophagen zeigten leichte Anstiege des IFN $\gamma$ -Proteins und seiner mRNA ohne das T- oder NK-Zellen in der Kultur nachgewiesen werden konnten (Rothfuchs, Gigliotti et al. 2001). In den hier vorgestellten Makrophagenkulturen wurden mittels FACS-Analyse unter den gemessenen Zellen 5,65% CD3-markierte T-Zellen gefunden. Das ist ein verschwindend geringer Anteil an der Gesamtpopulation. Die hier angezüchteten Makrophagen haben nach Stimulation also entweder autokrines IFN $\gamma$  freigesetzt oder die wenigen vorhandenen T-Zellen haben sehr geringe Mengen an IFN $\gamma$  freigesetzt, welches die Makrophagen dazu anregte weiteres zu induzieren.

Die Stimulation mit E.coli-LPS führte in bovinen MDM zu einer mRNA-Expressionssteigerung von IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF $\alpha$  und iNOS. Auch dieses mRNA-Expressionsprofil ist typisch für den M1-Makrophagenphänotyp. Im Gegensatz zu humanen MDM produzieren Bovine MDM ohne Zweifel NO $_2^-$ , wenn sie mit bakteriellem LPS stimuliert werden (Adler, Adler et al. 1996), was bei den hier vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden konnte. Die bovinen MDM zeigten nach E. coli-LPS-Stimulation eine Erhöhung der iNOS mRNA-Expression um das circa 200-fache.

Das Oberflächenprofil der humanen MDM dieser Studie zeigte nach Kultivierung auf Zellkulturplatten einen M0-Makrophagenphänotyp. Dies bestätigt, dass die Zellen nur aufgrund der Isolations- und Kultivierungstechnik nicht aktiviert worden sind. Die Oberflächenmarker CD80, CD64, TLR-4 und CD206 wurden schwach exprimiert. CD86 und CD40 wurden in mittelmäßiger Intensität exprimiert und MHCII, CD44 und CD14 wurden sehr stark exprimiert (Abbildung 35).

Die Stimulierbarkeit der humanen und bovinen MDM wurde durch die Zugabe von E.coli-LPS bzw. IFN $\gamma$  untersucht. Nach alleiniger IFN $\gamma$ -Stimulation (50U) der humanen MDM wurde CD40, CD44, CD64 und TLR-4 vermehrt auf der Oberfläche exprimiert. MHCII, MHCII, CD64, TLR-4, CD14 und CD206 wurden nach LPS-Stimulation (10 $\mu$ g/ml) vermehrt exprimiert. IFN $\gamma$  und LPS als Gemisch führte zur Steigerung der Oberflächenexpression von MHCII, CD40, CD44, CD64 und TLR-4 (Abbildung 36). Dies geht mit der Literatur konform, in der beschrieben ist, dass eine Stimulation mit LPS und IFN $\gamma$  zur Ausbildung des M1-Makrophagenphänotyps führt (Martinez, Gordon et al. 2006). Die bovinen MDM exprimierten nach Stimulation mit E.coli-LPS vermehrt CD40 und CD80. Die Expression von CD86 und MHCII/II wurde hingegen nur leicht beeinflusst (Sobotta, Hillarius et al. 2016). Durch diese Ergebnisse konnte kein eindeutiger Rückschluss auf die Polarisation der MDM nach Stimulation mit LPS gezogen werden. Sie zeigen aber, dass die hier generierten bovinen MDM durch bakterielle Stimuli aktiviert werden konnten. Die Kombination mit IFN $\gamma$  wäre für die bovinen MDM eine informative Stimulationsalternative.

Die Untersuchung des Reinheitsgrades beider Zellkulturen zeigte, dass 81% der bovinen MDM-Kulturen (Sobotta, Hillarius et al. 2016) und 81,9% der humanen MDM-Kulturen den CD14-Marker exprimierten, der vornehmlich auf Monozyten und Makrophagen anzutreffen ist. In der humanen Kultur exprimierten im Median von 4 unstimulierten Proben 12,65% der Zellen den CD19-Marker (B-Zellen), 5,65% den CD3-Marker (T-Zellen) und 8,5% den CD1a-Marker (dendritische Zellen). Da Lymphozyten bekanntlich eine sehr kurze Lebensspanne von 12 h bis maximal 15 Tagen besitzen, ist ihr Einfluss auf die MDM-Kultur als gering einzuschätzen. Auch nur wenige der B- und T-Lymphozyten (Gedächtniszellen) sind in der Lage die maximale Lebensdauer zu erreichen (Coassin and Kline 1957; Sprent 1993). Der Anteil der CD1a-positiven Zellen ist mit 8,5% ebenfalls sehr gering. Zudem wurden die MDM-Kulturen mehrmals gewaschen, um nicht adhärente Lymphozyten zu entfernen. Der Einfluss CD14-negativer Zellen konnte dadurch entscheidend minimiert werden.

## **5.2 Replikation und Immunstimulation von *C. pneumoniae* in humanen und bovinen Makrophagen**

Zu der Spezies *C. pneumoniae* gehören 3 bzw. 4 Biovare, die jeweils auf eine bestimmte Wirtsspezies spezialisiert sind beziehungsweise nur aus dieser isoliert wurden. In dieser

Arbeit wurde der Typstamm TW-183 von Biovar human genauer untersucht. Wie in Abschnitt 1.1.5 beschrieben ist *C. pneumoniae* ein Erreger der vornehmlich den Respirationstrakt befällt und dort zu Bronchitis, Pharyngitis oder zur Ausbildung einer Pneumonie führt. Erkrankungen wie Artherosklerose, Asthma, Alzheimer, Multiple Sklerose und koronare Herzgefäßerkrankungen werden mit *C. pneumoniae* assoziiert. Dies wird in der Wissenschaft sehr kontrovers diskutiert und muss durch weitere Studien belegt werden (Grayston 2000; Roulis, Polkinghorne et al. 2013). Der Erreger wurde von verschiedenen Forschergruppen bereits aus dem menschlichen Gehirn, atherosklerotischem Gewebe der Herzkranzgefäße und anderer Blutgefäße, aus menschlicher arthritischer Synovia und aus Lymphknoten, Leber und Milz infizierter Kinder isoliert (Grayston 1994; Grayston 2000; Dreses-Werringloer, Bhuiyan et al. 2009; Carter and Hudson 2010; Deniset, Cheung et al. 2010). Moazed et al konnten in ihrer Studie nachweisen, dass sich *C. pneumoniae* (AR-39) in murinen Alveolar- und Peritonealmakrophagen vermehren kann. Nach intranasaler Inokulation konnte sich der Erreger im Körper der Mäuse verbreiten und wurde aus Lunge, Thymus, Milz und Lymphknoten isoliert. Moazed et al gehen davon aus, dass *C. pneumoniae* sowohl von Alveolarmakrophagen als auch von interstitiellen Makrophagen im Körper verbreitet werden kann (Moazed, Kuo et al. 1998). Eine schwache immunologische Stimulation der Wirtszellen, die eine Elimination des Erregers verhindert, eine Apoptosehemmung und eine verzögerte Replikation, die erst im Zielgewebe vervollständigt wird, wäre bei einer solchen Verbreitung im Körper sicherlich von Vorteil. Im Folgenden werden diese Punkte anhand der Versuchsreihe mit *C. pneumoniae* in humanen und bovinen monozyten gereiften Makrophagen aufgezeigt und besprochen.

In den hier durchgeführten Versuchen konnte sich *C. pneumoniae* innerhalb von 48 Stunden im humanen und bovinen Wirt nicht vermehren. Es konnte kein signifikanter Anstieg der ifu/cell oder ifu/2ml festgestellt werden. Im Immunfluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskop konnten 24 und 48 hpi keine Erreger in den Makrophagen gefunden werden. Nach Parte et al ist der Entwicklungszyklus der Mitglieder des Genus *Chlamydia* allgemein nach 48-72 h abgeschlossen (Parte 2012). Wann der maximale Peak für die Freisetzung der Elementarkörperchen erreicht ist, ist allerdings speziesabhängig. Roulis et al beschreiben die Länge des Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae* zum Beispiel mit 60 bis 96 Stunden (Roulis, Polkinghorne et al. 2013). So fanden auch Airene et al bei einer Infektion von humanen Monozyten mit *C. pneumoniae* Stamm KJ6 erst 7 Tage nach der Infektion chlamydiale mRNA (Airene, Surcel et al. 1999). Der Immunfluoreszenztest zur semi-quantitativen Bestimmung der Chlamydien in der vorliegenden Studie wurde mit dem IMAGEN Chlamydia-Kit von Oxoid durchgeführt. Dieses Kit wurde mittels klinischen Proben aus dem Urogenitaltrakt, den Konjunktiven und mit infizierten McCoy-Zellen validiert. Es wurden demnach epitheliale Zellen und eine Zelllinie verwendet, die nachweislich sehr gut zur Vermehrung von *C. trachomatis* geeignet sind. Der Test wird als positiv bewertet, wenn 10 apfelgrüne Fluoreszenzsignale eindeutig von der gegengefärbten Umgebung abgegrenzt werden konnten (OXOID 2013). Vor allem bei Proben der hier verwendeten humanen MDM, die in den Advanced TC 24-Well Platten angefärbt worden sind, ergaben sich Probleme verursacht durch reichlich unspezifische Färbungen, die durch den speziellen Untergrund der adhärenzfördernden Zellkulturplatten bedingt waren. Die Interpretation der Testergebnisse wurde dadurch erschwert. Die Daten aus der quantitativen realtime PCR ergaben zudem oft Werte unter einer ifu/cell. Zusammen mit dem Umstand, dass der Test für mononukleäre Zellen des peripheren Blutes nicht

validiert ist und die Zellkultursensitivität mit einer Zelllinie getestet wurde, in der sich *C. trachomatis* besonders gut repliziert, ergibt sich eine eingeschränkte Sensitivität des Testes für die hier durchgeführten Replikationsversuche mit *C. pneumoniae* (OXOID 2013). Ein ähnliches Problem ergab sich für die Untersuchung mit dem Transmissionselektronenmikroskop. Die eingeschränkte und zögerliche Replikation von *C. pneumoniae* in humanen und bovinen MDM führte trotz modifizierter MOI zu einer sehr geringen Infektionsrate, was ein Auffinden einzelner Elementarkörperchen mit diesem Verfahren erschwerte.

Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass der Erreger in die Zellen aufgenommen wurde. In den humanen Makrophagen waren nach 4 Stunden mehr ifu/cell von *C. pneumoniae* als von *C. psittaci* gemessen worden und in bovinen MDM wurden signifikant mehr ifu/cell gefunden, als in den humanen Zellen. Außerdem konnte der Erreger nachdem er 48 Stunden mit den primären MDM in Kultur war und schonend isoliert wurde, in nicht-immunkompetenten BGM wieder angezüchtet werden. Demnach wurde *C. pneumoniae* in den Makrophagen weder inaktiviert, noch komplett zerstört. In BGM dagegen kam es zu einer signifikanten Replikation von *C. pneumoniae*. Dies geht konform mit ähnlichen Versuchen, die mit *C. pneumoniae* und Monozyten/Makrophagen durchgeführt wurden. Dort war das Wachstum von *C. pneumoniae* in den Monozyten/Makrophagen ebenfalls geringer, als in epithelialen Zelllinien, die normalerweise zur Vermehrung genutzt werden (Gaydos, Summersgill et al. 1996). Die Chlamydien waren in den Makrophagen lebensfähig und auch metabolisch aktiv, produzierten aber wenige bis keine neuen Elementarkörperchen (Beagley, Huston et al. 2009). Um zu ermitteln, ob *C. pneumoniae* zu einer frühzeitigen Zerstörung der Makrophagen führt und ob dessen Replikation verzögert ist, wurde der Versuch verlängert und lichtmikroskopisch begleitet. Die humanen Makrophagen waren nach 40-44 Tagen komplett zerstört, wenn sie nicht stimuliert worden waren. Mit *C. pneumoniae* stimulierte Zellen, waren ebenfalls erst nach 44 Tagen komplett zerstört. Das liegt entweder daran, dass *C. pneumoniae* nicht in die Zellen gelangte und damit keine Schäden verursachte oder daran, dass *C. pneumoniae* dazu in der Lage ist den programmierten Zelltod zu hemmen (Geng, Shane et al. 2000), der oft eine Reaktion der Zelle auf eine Infektion mit Chlamydien ist. Dazu wirkt *C. pneumoniae* auf den Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF $\alpha$ ), Nuklearfaktor kappa B (NF- $\kappa$ B) und mitochondriale Signalwege für die Apoptose ein (Roulis, Polkinghorne et al. 2013). Außerdem kann *C. pneumoniae* proapoptotische BH3-only Proteine sehr effizient verringern. Auch eine reduzierte Caspase-3 Aktivität wurde experimentell nachgewiesen (Kern, Maass et al. 2009). Für eine Apoptosehemmung und eine verzögerte Replikation von *C. pneumoniae* in dieser Arbeit spricht, das in den humanen Zellen nach ca. 23-28 Tagen im Lichtmikroskop kreisförmige, schwarz pigmentierte Objekte, in denen hohe Motilität herrschte, zu sehen waren. Diese wurden morphologisch als chlamydiale Einschlüsse identifiziert (NRL Chlamydien, FLI, Jena). Die Motilität deutet auf eine erhöhte Brown'sche Molekularbewegung der chlamydialen Elementarkörperchen hin (Neeper, Patton et al. 1990). In den bovinen Makrophagen wurden Vesikel mit erhöhter Brown'sche Molekularbewegung vereinzelt schon nach 24 Stunden im Lichtmikroskop sichtbar und die mit *C. pneumoniae* stimulierten bovinen Makrophagen lebten im Schnitt 3 Tage länger, als die nicht stimulierten. Für eine verzögerte Replikation von *C. pneumoniae* in humanen MDM spricht ebenfalls, dass die Expression des chlamydialen Virulenzfaktors rpoN nach 48 h noch nicht seinen Peak erreicht hatte. Der Virulenzfaktor rpoN soll eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Retikularkörperchen zu Elementarkörperchen spielen (Mathews, Volp et al.

1999). Eine Expressionssteigerung von *rpoN* deutet demnach auf eine stattfindende Replikation hin und wird vermehrt am Ende des Replikationszyklus exprimiert. In Versuchen mit *C. trachomatis* erreichte *rpoN* einen Expressionspeak bereits nach 30 h und fiel bis 48 hpi wieder ab (Mathews, Volp et al. 1999). Der Entwicklungszyklus von *C. trachomatis* ist nach 48 h abgeschlossen und es kommt zur Freisetzung von Elementarkörperchen (Brunham and Rey-Ladino 2005). Der Umstand, dass die Expression von *rpoN* durch *C. pneumoniae* in humanen MDM bis 48 hpi nicht wieder abfiel, ist somit ein Indiz für eine verzögerte Replikation. Einige der in dieser Studie untersuchten humanen MDM zeigten an ihren Rändern schwarze Bläschen, die sich ständig veränderten. Im Beobachtungszeitraum von einigen Minuten führte dies aber nicht zur Zerstörung der Zelle ([Video 1](#)). Vergleicht man die Aufnahmen mit anderen Videos zur Apoptose, so könnte es sich um einen beginnenden Apoptoseprozess handeln („membrane blebbing“), der nicht vollständig abgeschlossen werden konnte ([Video 5](#); (Coleman, Sahai et al. 2001)). Um diese Beobachtungen auch molekular nachzuweisen, wurde die Expression von Mcl-1 durch die humanen Makrophagen untersucht. Mcl-1 wird als Schlüsselregulator der Apoptosehemmung in Zellen bezeichnet, die experimentell mit *C. trachomatis* infiziert worden waren (Rajalingam, Sharma et al. 2008). In humanen Neutrophilen Granulozyten konnte Mcl-1 während einer Infektion mit *C. pneumoniae* nachgewiesen werden (Sarkar, Moller et al. 2015). Es gilt speziell als wichtiger Regulator der Lebensdauer von Makrophagen (Marriott, Bingle et al. 2005). Humane Makrophagen dieser Studie, die mit *C. pneumoniae* stimuliert wurden, zeigten gegenüber der nicht-stimulierten Kontrolle keine erhöhte Mcl-1 mRNA-Expression. Die primären humanen Makrophagen waren generell dazu in der Lage Mcl-1 mRNA zu exprimieren, wie sich nach einer LPS-Stimulation zeigte. Das bedeutet, dass entweder keine Apoptosehemmung vorlag oder dies in den humanen Makrophagen, die mit *C. pneumoniae* stimuliert worden waren, über einen anderen Mechanismus bewerkstelligt wird. Eine Möglichkeit wäre der Virulenzfaktor CPAF, der nach Fischer et al. in der Lage ist das BH3-only Protein Bim im Wirt zu verringern (Fischer, Vier et al. 2004). Bim ist ein wichtiger Bestandteil des Apoptosereaktionsweges. Bei der Stimulation von humanen MDM mit *C. pneumoniae* in dieser Studie wurde 24 und 48 hpi eine erhöhte CPAF-mRNA-Expression gemessen.

*C. pneumoniae* konnte die untersuchten Abwehrmechanismen der humanen und bovinen Makrophagen kaum aktivieren. Die  $\text{NO}_2^-$ - Abgabe war in beiden Wirten gegenüber den anderen untersuchten Chlamydienspezies gering, wobei die humanen MDM 24 und 48 Stunden nach der Inokulation eine erhöhte Freisetzung zeigten und die bovinen Zellen dies nur 24 hpi bei MOI5 schafften. Die mRNA-Expression von iNOS, das Enzym, das die  $\text{NO}_2^-$ -Freisetzung katalysiert, war nach Stimulation mit *C. pneumoniae* 4 hpi in beiden Wirten nur leicht erhöht und innerhalb der untersuchten 48 Stunden sogar leicht rückläufig. Nach Stimulation der bovinen MDM mit *C. pneumoniae* konnte die mRNA-Expression von iNOS ebenfalls nur leicht erhöht werden und senkte sich innerhalb des Untersuchungszeitraums immer weiter ab. Die Expressionssteigerung in humanen und bovinen MDM war deutlich geringere als nach Stimulation mit E.coli-LPS (200-fach). Dazu passt, dass *C. pneumoniae* in murinen primären Makrophagen zu einer verminderten NO-Produktion geführt haben soll (Gold, Simmons et al. 2004). Da es zu keiner signifikanten Erhöhung der iNOS kam, wurde ein weiteres wichtiges Enzym für die Pathogenabwehr der humanen MDM untersucht.IDO führt über einen chemischen Reaktionsweg (siehe 1.2.2) zur Limitierung von Tryptophan, eine essentielle Aminosäure für Bakterien. Nach Stimulation der humanen MDM mit *C. pneumoniae*, kam es zu einer 10-fachen Erhöhung der IDO mRNA-Expression. Da IDO von

IFN $\gamma$  induziert wird, wurde auch die mRNA-Expression von IFN $\gamma$  in den humanen MDM untersucht. Nach Stimulation mit *C. pneumoniae* wurde 4 hpi eine signifikante Erhöhung der IFN $\gamma$ -mRNA um das circa 10-fache nachgewiesen. *C. pneumoniae* erhöhte auch die mRNA-Expression von IFN $\gamma$  in murinen bone marrow derived macrophages (BMM) (Rothfuchs, Gigliotti et al. 2001).

Ein wichtiger Aspekt der Immunstimulation der MDM durch *C. pneumoniae* ist die Veränderung des Zytokinprofils. Die Analyse des Zytokinprofils der hier untersuchten humanen Zellen zeigt, dass es zu einer anfänglichen leichten Aktivierung der Zellen mit damit einhergehender mRNA-Expressionssteigerung von inflammatorischen Zytokinen kam (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ ). Die Expression von IL-1 $\beta$  und IL-6 wurde nur leicht erhöht und fiel noch innerhalb des Untersuchungszeitraums von 48 h wieder ab. Während die mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF $\alpha$  nur anfänglich minimal erhöht wurde, stieg die mRNA-Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 um ungefähr die gleiche Menge an. Nach diesen Ergebnissen ist die Aktivierung der humanen Makrophagen nicht eindeutig in inflammatorisch und antiinflammatorisch zu differenzieren. Die mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine in den bovinen MDM nach Stimulation mit *C. pneumoniae* war durchgehend geringer als die in den humanen MDM (außer TNF $\alpha$ , 48 hpi).

Bei dem Versuch die humanen MDM nach ihrem Antigen-Expressionsprofil zu charakterisieren, wurden keine eindeutigen Ergebnisse erzielt. Nach Stimulation mit *C. pneumoniae* wurden kaum typische M1-Makrophagenaktivierungsmarker (CD64, CD86, TLR-4, MHCII) vermehrt exprimiert. Dafür wurde die Expression von CD206 (M2) 72 hpi leicht erhöht, sowie die mRNA-Expression von IL-10 (4 hpi, M2). MHC I und CD80 als M1-Marker wurden nur leicht und sehr sporadisch vermehrt auf der Oberfläche exprimiert. Eine signifikante Steigerung der Oberflächenexpression wurde bei CD40 und CD14 festgestellt. Eine erhöhte CD40-Expression könnte für die Bereitschaft der Makrophagen stehen, von den T<sub>H</sub>1-Zellen aktiviert zu werden. Dies geschieht, wenn die Makrophagen nicht in der Lage sind den eingedrungenen intrazellulären Erreger allein zu eliminieren. T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren nach Bindung an MHCII-gekoppelte Antigene und CD40, IFN $\gamma$  (Abbildung 3), wodurch die Makrophagen aktiviert werden (Kenneth M. Murphy 2009). Die erhöhte CD40-Expression auf den hier untersuchten humanen Makrophagen könnte demnach im Zusammenhang mit der schon erwähnten erhöhten IFN $\gamma$ -Expression in der Makrophagenkultur stehen. Eine weitere Möglichkeit ist die Erhöhung der CD40-Expression über die Erkennung von bakteriellem LPS durch TLR-4. Es wurde nachgewiesen, dass LPS, das als TLR-4-Stimulator gilt, Mausmakrophagen zu einer erhöhten CD40-Oberflächenexpression anregte (Chandel, Pandey et al. 2014). Davon ist hier nicht auszugehen, da TLR-4 nur 72 hpi bei MOI1 signifikant gegenüber der Negativkontrolle erhöht war und auch nur um 50%. Der CD40-Ligand auf T<sub>H</sub>1-Zellen kann durch freigesetztes TNF $\alpha$  ersetzt werden (siehe 1.2.1). Da in den hier vorliegenden Versuchen TNF $\alpha$  durch humane MDM exprimiert wurde, könnte dies zu einer Erhöhung der Oberflächenexpression von CD40 geführt haben. Der T-Zellgehalt war in der MDM-Kultur verschwindend gering. Die deutliche Erhöhung der CD40-Expression lässt auf eine Teilaktivierung der Makrophagen schließen, da nachweislich keine erhöhte mikrobizidale Wirkung erzielt wurde. Die Aktivierung der Makrophagen über CD40 führt laut Kenneth et al zu einer vermehrten Oberflächenexpression von CD80/86 und MHCII (Kenneth M. Murphy 2009). In den hier durchgeführten Versuchen wurde einzig die Expression von

CD80 leicht erhöht, was die Theorie der Teilaktivierung unterstützt. CD14 ist ein Rezeptor, der nach Bindung von chlamydialem LPS, das an LBP (LPS-bindendes Protein) oder freies sCD14 gebunden ist, Signale in die Makrophage weiterleitet, die zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6) führen. Dabei dient TLR-4 als Ko-Rezeptor (Jiang, Akashi et al. 2000; Poikonen, Lajunen et al. 2008; Tsutsumi-Ishii, Shimada et al. 2008; Soares 2012). CD14 übernimmt bei diesem Signalweg die Bindung des LPS-LPB (PAMPs) und die Präsentation der gebundenen PAMPs für TLR-4. TLR-4 leitet das erhaltene Signal als Transmembranprotein in die Zelle weiter (Rider, Furusho et al. 2016). Die Oberflächenexpression von CD14 auf den hier verwendeten humanen MDM erhöhte sich nach Stimulation mit *C. pneumoniae* 24 und 48 hpi um circa das 2-fache. Die mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 war nur anfänglich (4 bzw. 24 hpi) erhöht. Eine Erhöhung der CD14-Expression kam erst zustande, nachdem die mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine wieder zurückgegangen war. Die Aktivierung der Makrophagen durch eine Bindung des chlamydialen LPS an CD14 war demnach unvollständig, was mit der geringen Expression des Ko-Faktors TLR-4 zusammenhängen kann. Die Konzentration von frei löslichem sCD14 im Serum männlicher Probanden war in Versuchen von Poikonen et al. negativ mit der Empfänglichkeit von humanen MDM für *C. pneumoniae* über CD14 korreliert (Poikonen, Lajunen et al. 2008). Da die hier verwendeten Blutspenden anonymisiert waren, ist nicht auszuschließen, dass der sCD14-Gehalt männlicher Probanden auch hier eine Rolle gespielt haben könnte.

Die Virulenzgenexpression durch die Chlamydien ist ein Ausdruck für die Reaktion der Chlamydien auf die Abwehrmechanismen des Wirtes und ist entscheidend für die Wirtsadaptation. Die Chlamydial protease like activity factor (CPAF) mRNA-Expression war in der vorliegenden Arbeit durch *C. pneumoniae* in humanen MDM ab 24 hpi signifikant erhöht (1,5 bis 2-fach) und stieg bis 48 hpi auf das 2,6 bis 4,8-fache ( $p < 0,05$ ) an. Für CPAF wurden seit Anfang des 21. Jahrhunderts viele Funktionen postuliert. Es handelt sich um eine Serin-Protease, die auf 16 Wirtsproteine und 9 chlamydiale Proteine einwirken soll. Im Jahr 2012 wurden Untersuchungen gemacht, die diese Substratvielfalt anzweifeln (Chen, Johnson et al. 2012). In neueren Studien wurde bestätigt, dass *C. trachomatis* durch CPAF keine Verminderung der MHCI-Expression auf der Oberfläche von epithelialen Zellen und Fibroblasten bewirkt (Kagebein, Gutjahr et al. 2014), wie es zuvor beschrieben wurde (Zhong, Fan et al. 2001). Außerdem wird die These unterstützt, dass CPAF in der Lage ist BH3-only-Proteine zu verringern und damit eine Apoptosehemmung zu bewirken (Fischer, Vier et al. 2004; Pirbhai, Dong et al. 2006). Es besteht die Möglichkeit, dass CPAF eine Rolle bei der Fragmentierung des Golgi-Apparates spielt, die während der Infektion von epithelialen Zellen mit *C. trachomatis* beobachtet wurde und Sphingolipide für die Chlamydien zugänglich machen soll. Dies geschieht durch die Spaltung von Golgin-84 durch CPAF (Heuer, Rejman Lipinski et al. 2009). Die in der vorliegenden Studie gezeigte Erhöhung der CPAF-Expression durch *C. pneumoniae* Stamm TW-183 in humanen MDM stimmt mit Untersuchungen überein, die besagen, dass CPAF von diesem Stamm produziert wird (Dong, Zhong et al. 2005).

Chlamydiales groEL (HSP60) gehört zu den Hitzeschockproteinen und hat ein molekulares Gewicht von 57 bis 60 kD (Morrison, Belland et al. 1989). Es ist ein Homolog zu dem groEL von *E. coli* und wurde in *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* und *C. muridarum* gefunden (Bavoil, Stephens et al. 1990; Chen, Wilson et al. 2011). GroEL wirkt als

Chaperon. Chaperone unterstützen die ordentliche Faltung und den richtigen Zusammenbau von Proteinen. Damit spielen sie eine wichtige Rolle beim Zusammenbau der chlamydialen Zellwand im fortgeschrittenen Entwicklungszyklus, wenn erste Abwehrmechanismen des Wirtes greifen (Bavoil, Stephens et al. 1990; Zügel and Kaufmann 1999). Chlamydiales groEL ist in der Lage seine eigene Synthese zu regulieren (Chen, Wilson et al. 2011), ist sehr immunogen und induziert die Sekretion inflammatorischer Zytokine durch Endothelzellen und Makrophagen von Maus und Mensch. So führte eine Stimulation humaner MDM mit groEL zur Erhöhung von IL-6, NF $\kappa$ B (Kol, Bourcier et al. 1999) und in peritonealen Mausmakrophagen zur Erhöhung von TNF $\alpha$  (Kol, Sukhova et al. 1998; Kol, Bourcier et al. 1999). In der hier vorgestellten Studie kam es in humanen Makrophagen zu allen Untersuchungszeitpunkten nach Stimulation mit *C. pneumoniae* zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression von groEL (circa 20-fach). Die frühe und stetige Erhöhung von groEL wurde in ähnlichen Studien ebenfalls festgestellt. Shaw et al infizierten HeLa-Zellen mit *C. trachomatis* L2 und beobachteten eine gesteigerte groEL-Expression in einem Zeitraum von 2 bis 20 Stunden nach der Infektion (Shaw, Christiansen et al. 2000). Im Zusammenhang mit der immunogenen Wirkung von groEL konnten in den hier vorgestellten Versuchen erhöhte mRNA-Expressionen von IL-6 und TNF $\alpha$  gemessen werden. IL-6 wurde länger und deutlicher erhöht, TNF $\alpha$  nur geringfügig und nur 4 hpi. Die geringe Expression von TNF $\alpha$ -mRNA spricht nicht gegen die Ergebnisse von Kol et al, denn dessen Versuche fanden in Mausmakrophagen statt (Kol, Sukhova et al. 1998). Für groEL wurde postuliert, dass es seine immunogene Wirkung über die Bindung mit CD14 erreicht. Dabei wird darauf hingewiesen, dass CD14 für die Wirkung von groEL notwendig, aber nicht ausreichend sei (Kol, Lichtman et al. 2000). Als möglicher Korezeptor käme hier TLR-4 in Frage. Dies wurde bisher nur in Mauszellen untersucht und führte dort zu positiven Ergebnissen (Binder, Vatner et al. 2004). In den humanen Makrophagen dieser Arbeit hingegen, kam es nicht zu einer erhöhten TLR-4 Expression. Weiterhin wird groEL auch als Indikator für Persistenz beschrieben, denn in Versuchen zur induzierten Persistenz von Chlamydien nach IFN $\gamma$ -Gabe wurde es vermehrt gefunden und löste T-zellabhängige Immunantworten aus (Kinnunen, Paavonen et al. 2001; Molestina, Klein et al. 2002; Bulut, Shimada et al. 2009). In den vorliegenden Versuchen, wurde in den humanen MDM eine leichte Erhöhung der IFN $\gamma$ -mRNA nach Stimulation mit *C. pneumoniae* festgestellt, die demnach zu der erhöhten groEL mRNA-Expression beigetragen haben könnte.

Das Gen rpoN kodiert für den Sigmafaktor 54, welcher wiederum die Transkription einer Vielzahl von Genen initiiert. RpoN wurde in einer Studie mit *C. trachomatis* in Hep-2-Zellen erst 12 Stunden nach der Infektion detektiert (Mathews, Volp et al. 1999). In anderen Bakterien, wie *E. coli* und *B. subtilis* wird Sigma 54 vornehmlich bei Stickstoffmangel aktiviert (Douglas and Hatch 2000). Da rpoN in den Versuchen mit *C. trachomatis* nach 30 Stunden seinen Expressions-Peak erreicht hat, wird es zu den „late-stage“-Genen im chlamydialen Entwicklungszyklus gezählt und mit der Umwandlung von Retikularkörperchen in Elementarkörperchen in Verbindung gebracht (Mathews, Volp et al. 1999; Douglas and Hatch 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA von rpoN durch *C. pneumoniae* in humanen MDM schon 4 Stunden nach der Inokulation gering, aber signifikant gegenüber der Chlamydienkonserve erhöht. Ein leichter, von 4 zu 48 hpi signifikanter Anstieg der mRNA-Expression wurde beobachtet. Wie schon beschrieben deutet dies auf einen verzögerten Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae* in humanen MDM hin.

Im Genom von *C. pneumoniae* wurden 107 mögliche Inc-Proteine gefunden, von denen IncA das Bekannteste ist. Inc-Proteine zeichnen sich durch einen 2-lappigen hydrophoben Bereich aus, der es ihnen ermöglicht sich in Vesikelmembranen zu verankern (Delevoye, Nilges et al. 2004). IncA wurde in chlamydialen Einschlussmembranen der Retikularkörperchen nachgewiesen (Rockey, Heinzen et al. 1995) und trägt dort zur Verschmelzung spezieseigener Einschlussmembranen und zur Fusion mit Zellendosomen bei. Des Weiteren wird IncA eine Rolle bei der Erzeugung neuer Einschlüsse zugeschrieben (Delevoye, Nilges et al. 2004; Suchland, Rockey et al. 2005; Peters, Wilson et al. 2007). Daher werden Proteine der Inc-Gruppe als wichtige Virulenzfaktoren der Chlamydien angesehen (Gauliard, Ouellette et al. 2015). In den hier vorgestellten Versuchen wurde die mRNA von IncA in humanen und bovinen MDM, die mit *C. pneumoniae* stimuliert worden waren bereits 4 hpi nachgewiesen. Auch in Hep-2-Zellen, die mit *C. pneumoniae* (AR39) infiziert waren, wurde IncA-mRNA zu einem sehr frühen Zeitpunkt (2 hpi) nachgewiesen (Lugert, Kuhns et al. 2004). IncA mRNA weist daraufhin, dass Retikularkörperchen vorliegen und damit der Entwicklungszyklus der Chlamydien gestartet wurde. Sie beweist nicht, dass IncA-Protein bereits in die Einschlussmembran integriert wurde und damit zur Bildung weiterer Einschlüsse beiträgt oder eine Fusion unterstützt. Die ifu/cell und die Immunfluoreszenz- bzw. Elektronenmikroskopaufnahmen von *C. pneumoniae* in humanen und bovinen MDM lassen in der vorliegenden Arbeit nicht auf einen abgeschlossenen Entwicklungszyklus und eine Vermehrung der aufgenommenen Chlamydien innerhalb von 48 h schließen. Wie am Anfang des Abschnitts dargestellt wurde, ist aber nicht auszuschließen, dass *C. pneumoniae* in die Zellen aufgenommen wurde und metabolisch aktiv ist. Vielmehr deuten mehrere Aspekte auf einen verzögerten Entwicklungszyklus hin.

### 5.3 Replikation und Immunstimulation von *C. psittaci* in humanen und bovinen Makrophagen

*C. psittaci* ist ein ubiquitärer Erreger, der aus vielen verschiedenen Spezies isoliert werden konnte. Dabei werden unterschiedliche Sero- und Genotypen beschrieben. In dieser Arbeit wurde der Stamm mit dem Genotyp A-6BC (DC15), der aus einem Rind isoliert wurde, verwendet.

In der Literatur ist beschrieben, dass *C. psittaci* in der Lage ist, sich in Makrophagen zu replizieren (Maus, (Rothermel, Rubin et al. 1986)). Diese Replikation ist abhängig von der eingesetzten MOI, wobei eine geringe MOI (MOI1) die Replikation ermöglichte und eine hohe MOI (MOI100) zum Untergang der murinen Peritonealmakrophagen führte (Wyrick and Brownridge 1978). In den hier durchgeführten Versuchen konnte sich *C. psittaci* (MOI1, 2, 5) innerhalb von 48 Stunden in humanen und bovinen MDM gut vermehren. Es wurde ein signifikanter Anstieg der ifu/cell und ifu/2ml (48 hpi) festgestellt. Der signifikante Anstieg der ifu/2ml nach 48 hpi in humanen und bovinen MDM zeigt die Freisetzung von neu gebildeten Elementarkörperchen in den Überstand an. In den Versuchen von Wyrick et al mit *C. psittaci* Stamm Cal10 in peritonealen Mausmakrophagen wurde ein Freisetzungsspeak von Elementarkörperchen nach 96 h erreicht (Wyrick and Brownridge 1978). In den hier durchgeführten Versuchen mit humanen und bovinen MDM konnten chlamydiale Einschlüsse ebenfalls im Licht-, Immunfluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskop innerhalb von 48 h sichtbar gemacht werden. Die Replikation in den MDM beider Wirte war verglichen mit der Replikation in der epithelialen nicht-immunkompetenten Zelllinie BGM, die als gängige Zelllinie zur Isolation von *C. psittaci* gilt (Parte 2012), signifikant geringer. Die hier eingesetzten MOI 1, 2 und 5 hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Replikation von *C. psittaci* in den MDM. Versuche mit MOI10 (Daten nicht aufgeführt) in humanen MDM führten erwartungsgemäß zu ca. 2-2,5 fach mehr ifu/cell, als MOI5. Eine erhöhte Cytotoxizität wurde nicht festgestellt, sodass bei den hier gewählten MOI keine negative Korrelation zwischen MOI und Replikation entstand.

In den Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wurden Retikularkörperchen von *C. psittaci* interessanterweise auch außerhalb des chlamydialen Einschlusses im Zytosol der humanen und bovinen MDM gefunden. In Abbildung 16A erkennt man eine Zusammenhangstrennung in der Membran des chlamydialen Einschlusses, in dessen Nähe sich das Retikularkörperchen befindet und in Abbildung 16B sind Mitochondrien und Golgiapparat in der Nähe der „freien“ Retikularkörperchen gelagert. Ähnliche Beobachtungen machten (Fiegl, Kagebein et al. 2013) mit *C. psittaci* Stamm DC15 (A-6BC) in der Zelllinie JAWS II (dendritische Zellen). Sie stellten in ihrer Arbeit einen Zusammenhang mit dem MHC-I-Antigenpräsentationsweg her und präsentierten ein neues detailliertes Model dazu. Nach diesem Model kommt es zu einer Aufhebung der Integrität der Wand des chlamydialen Einschlusses, sodass die Retikularkörperchen freigesetzt werden. Eine Eigenschaft des chlamydialen Proteins CPAF ist es die Integrität der Wand des chlamydialen Einschlusses zu schützen (Jorgensen, Bednar et al. 2011). In der Studie von Fiegl et al wurde eine gestörte Expression von CPAF in den JAWS II-Zellen im Vergleich zu einer epithelialen Vergleichszelllinie festgestellt (Fiegl, Kagebein et al. 2013). In den hier vorliegenden Versuchen wurde CPAF-mRNA weder in den mit *C. psittaci* infizierten MDM noch in der infizierten epithelialen Zelllinie BGM signifikant zur Kontrolle erhöht. Damit ist nicht davon auszugehen, dass die chlamydiale Einschlussmembran hier durch CPAF

geschützt wurde. Die freigesetzten Retikularkörperchen von *C. psittaci* werden nach Fiegl et al dann von autophagosomalen Strukturen umgeben (Fiegl, Kagebein et al. 2013). In Abbildung 16B sieht man Strukturen (roter Pfeilkopf), die den autophagosomalen Strukturen in den JAWS II-Zellen sehr ähneln. In dem bezeichneten Autophagosom ist eine Struktur enthalten, die typisch für Elementarkörperchen ist. In der Nähe dieser autophagosomalen Strukturen finden sich noch weitere chlamydiale Retikularkörperchen. Chlamydiale Antigene werden laut Fiegl et al über MHCI-Moleküle auf der Oberfläche der Wirtszelle präsentiert (Fiegl, Kagebein et al. 2013). In ihrer Studie wurde nach Infektion mit *C. psittaci* eine 4 fach höhere MHCI-Expression auf den JAWS II-Zellen als auf den epithelialen Zellen festgestellt. In den Versuchen mit den humanen MDM wurde die Expression von MHCI nach Stimulation mit *C. psittaci* um das bis zu 2 fache gegenüber der nicht infizierten Kontrolle erhöht. Es gibt in der vorliegenden Studie demnach einige Übereinstimmungen zu der Hypothese von Fiegl et al ob es sich allerdings wirklich um den von ihnen beschriebenen Reaktionsweg in Makrophagen handelt, muss durch tiefergehende Versuchsreihen zu diesem Thema überprüft werden.

*C. psittaci* ist in der Lage verschiedenste Wirte, aviärer und non-aviärer Art, zu infizieren (Knittler, Berndt et al. 2014). In Versuchen mit Rindern und Mäusen konnten mit *C. psittaci* DC15 experimentell Krankheitssymptome hervorgerufen werden. In Rindern kam es abhängig von der Dosis zur Ausbildung von klinischen Symptomen (Reinhold, Ostermann et al. 2012), welche nach einem Peak von 48 h ohne den Einsatz von Medikamenten wieder zurückgingen (Prohl, Lohr et al. 2015). Während dieser Infektion wurden vermehrt Immunzellen nachgewiesen, die zu einer inflammatorischen Immunantwort beitragen (Prohl, Lohr et al. 2015). Im Blut der infizierten Rinder wurde eine moderate mRNA-Expressionsteigerung von IL-1 $\beta$  und TNF nachgewiesen. Die mRNA-Expression von IL-6 wurde hingegen nicht beeinflusst (Prohl, Wolf et al. 2015). Im Mausmodell wurde nach einer intranasalen Infektion mit *C. psittaci* DC15 eine Erhöhung der Zytokine TNF $\alpha$ , IL-6 und IFN $\gamma$  im Vergleich zu nicht infizierten Mäusen nachgewiesen. Nach 9 Tagen wurde auch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 erhöht (Bode, Dutow et al. 2012). In den hier vorgestellten Versuchen kam es nach Infektion der humanen und bovinen MDM mit *C. psittaci* im Vergleich zur Stimulation mit *E. coli*-LPS zu einer moderaten Immunreaktion wobei diese Reaktion in den bovinen MDM signifikant höher als in den humanen MDM ausfiel. Die mRNA-Expression inflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ ) wurde erhöht und auch typische Abwehrmechanismen der Makrophagen, wie NO $_2^-$  Abgabe undIDO bzw. iNOS mRNA-Expressionssteigerung, wurden aktiviert. Das sich *C. psittaci* trotz der erhöhten IDO mRNA-Expression noch gut vermehren konnte, könnte daran liegen, dass *C. psittaci* ein Trp-Operon besitzt und den von IDO ausgelösten Tryptophanmangel umgehen kann. Dies müsste in weiteren Studien näher untersucht werden, da dieses Operon bei *C. psittaci* nicht vollständig ist (Shaw, Christiansen et al. 2000). *C. psittaci* führte im Mausmodell zu einer Steigerung der IFN $\gamma$ -Konzentration (Bode, Dutow et al. 2012), was durch die Anwesenheit von T-Zellen zu erklären war. In der reinen humanen MDM-Zellkultur wurde eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von IFN $\gamma$  festgestellt, die auch eine Erklärung für eine gesteigerte IDO-mRNA Expression ist. Eine Verunreinigung der Zellkultur mit T-Zellen wurde durch mehrmalige Waschgänge und eine längere Kultur minimiert, mittels FACS-Analyse überprüft und für sehr gering befunden. Möglichkeiten der IFN $\gamma$ -Produktion von humanen MDM wurden in Abschnitt 5.1 diskutiert. In humanen MDM kam es nach Infektion mit *C. psittaci* auch zu einer moderaten Erhöhung der mRNA-Expression von IL-10. Das Zytokin IL-

IL-10 gilt als antiinflammatorisches Zytokin und trägt zur Wiederherstellung der Homeostase nach einer entzündlichen Infektion bei. Daher tritt es meist nach einer inflammatorischen Reaktion, also zu einem späteren Zeitpunkt im Infektionsverlauf, vermehrt in Erscheinung (Iyer and Cheng 2012). Die Erhöhung in den mit *C. psittaci* infizierten humanen MDM erfolgte bereits nach 4 hpi und fiel 48 hpi wieder ab. Ähnlich verhielt sich die Kinetik der IL-10 mRNA-Expression nach Stimulation mit *E. coli*-LPS. Pathogene wie *Toxoplasma gondii* und *Mycobacterium tuberculosis* nutzen IL-10, um eine starke inflammatorische Reaktion der Zellen zu unterdrücken, damit sie sich besser vermehren können. Dazu blockieren sie spezifisch die TNF $\alpha$  Produktion, erhalten aber die IL-10 Expression (Iyer and Cheng 2012). In den Versuchen mit den humanen MDM und *C. psittaci* wurden die mRNA-Expressionen von TNF $\alpha$  und IL-10 in gleichem Maße und zur gleichen Zeit erhöht. Allerdings war die mRNA-Expression von TNF $\alpha$  nach Stimulation der humanen MDM mit *E. coli*-LPS signifikant höher als nach Infektion mit *C. psittaci*. Demnach ist eine Expressionssuppression von TNF $\alpha$  durch *C. psittaci* nicht auszuschließen und müsste in nachfolgenden Versuchen genauer untersucht werden.

Das Antigen-Expressionsprofil der humanen Makrophagen wies unstimuliert einen typischen M0-Makrophagen-Phänotyp auf. Nach Stimulation mit *C. psittaci* zeichnete sich das Bild einer teilweisen Aktivierung in Richtung M1-Phänotyp ab. Wie in Tabelle 11 vereinfacht dargestellt, wurden einige M1-Makrophagenmarker, wie CD86 (24 hpi), MHCI (24/48 hpi) und CD40 (bis 200% mehr Expression, 48 hpi) vermehrt auf der Oberfläche der humanen MDM exprimiert. Wichtige Marker, wie CD64, TLR-4 oder MHCII wurden hingegen nicht vermehrt auf der Oberfläche gefunden (Tabelle 11). In Vorversuchen konnte aber gezeigt werden, dass die humanen MDM generell in der Lage waren solche Marker vermehrt zu exprimieren. Die mRNA-Expression typischer inflammatorischer Zytokine wurde nur leicht erhöht. Die Expression des M2-Makrophagen-Markers CD206 wurde nicht gesteigert, obwohl eine leichte mRNA-Expressionserhöhung von IL-10 (M2) festgestellt wurde.

**Tabelle 11 Typische Oberflächenmarker des M1-Phänotyps im Vergleich mit Oberflächenmarkern, die nach Stimulation von humanen MDM mit *C. psittaci* untersucht wurden**

↑: leicht erhöht; ↑↑: stark erhöht; - : nicht vorhanden; +: vorhanden, aber nach Stimulation nicht erhöht; nd; no data; 1: Serotec (2013), 2: M.A. Vega (2006), 4: Ambarus, Krausz et al. (2012), 5: Hristodorov, Mladenov et al. (2012), 6: Mantovani, Sica et al. (2004), 8: Kahnert, Seiler et al. (2006), 16: (Ishizuka, Ferreira et al. 2012)

LPS/IFN $\gamma$	<i>C. psittaci</i>	<i>C. psittaci</i>
CD80 <sup>↑</sup> <sup>1,4,5</sup>	CD80-	CD44 <sup>↑</sup>
CD86 <sup>↑</sup> <sup>1,4,5,6,8</sup>	CD86 <sup>↑</sup>	
MHCI <sup>↑</sup> <sup>5</sup>	MHCI <sup>↑</sup>	
MHCII <sup>↑</sup> <sup>1,5,6</sup>	MHCII+	
CD16 <sup>+</sup> <sup>6</sup>	CD16nd	
CD40 <sup>+</sup> <sup>16</sup>	CD40 <sup>↑↑</sup>	
CD64 <sup>↑</sup> <sup>2</sup>	CD64-	
TLR-2 <sup>+</sup> <sup>1,2</sup>	TLR-2nd	
TLR-4 <sup>+</sup>	TLR-4-	
<b>=&gt; M1-Makrophagen</b>	<b>=&gt; teilweise Aktivierung des M1-Phänotyps</b>	<b>=&gt; Phagozytose Unterdrückung der Entzündungsreaktion</b>

Der Oberflächenmarker CD40 wurde durch *C. psittaci* auf den humanen MDM stark erhöht. Diese vermehrte Expression ist mit der von *C. pneumoniae* verursachten Steigerung zu vergleichen, mit dem Unterschied, dass im Versuch mit *C. psittaci* nur 24 hpi eine signifikante Erhöhung ermittelt werden konnte. Die Bedeutung von CD40 wurde in Abschnitt 5.1 ausführlich besprochen. Der Oberflächenmarker CD14 spielte nach Stimulation mit *C. psittaci* keine Rolle.

CD44 ist ein Oberflächenprotein mit vielseitigen Funktionen, die das Zellwachstum und -überleben und deren Entwicklung betreffen. Außerdem spielt es eine wichtige Rolle in der Immunabwehr, der Hämatopoese und Apoptose. Der wichtigste Ligand für CD44 ist Hyaluronsäure, die in der Extrazellulären Matrix vorkommt (Ponta, Sherman et al. 2003). Ein weiterer wichtiger Ligand für CD44 ist LPS. Nach Stimulation mit LPS wurde die Expression von CD44 auf humanen Monozyten erhöht. CD44 wird als ein kompetenter phagozytotischer Rezeptor beschrieben (Vachon, Martin et al. 2006; Vachon, Martin et al. 2007). Andere Studien wiesen nach, dass die Zytokine TNF $\alpha$  und IL-10 auch Liganden für CD44 sein können. Nach Stimulation mit LPS wurden diese endogen gebildet und führten zu einer erhöhten CD44-Oberflächenexpression auf humanen Monozyten (Gee, Lim et al. 2002). In der hier vorliegenden Studie wurde CD44 auf den humanen MDM generell sehr stark auf der Oberfläche exprimiert. Nach Stimulation mit *C. psittaci* kam es zu einer moderaten, aber signifikanten Erhöhung der Expression, die mit zunehmender Chlamydienkonzentration verschwand. Die hohe Grundexpression ließe sich mit den Umständen der Methode zur Isolierung der MDM erklären, denn CD44 auf humanen MDM spielt eine Rolle bei der Beseitigung apoptotischer neutrophiler Granulozyten, die bei dem Isolierungs- und Aufreinigungsprozess vermehrt auftraten (Hart, Dougherty et al. 1997). Die erhöhte Expression von CD44 auf humanen MDM nach Infektion mit *C. psittaci* ging einher mit erhöhten TNF $\alpha$  und IL-10 mRNA-Expressionen. Es wird beschrieben, dass CD44 einen tiefgründigen Effekt auf den LPS-TLR-4-Signalweg in Mausmakrophagen hat, indem es zur Ausbildung negativer Regulatoren beiträgt und damit ausufernde entzündliche LPS-Reaktionen verhindert (Liang, Jiang et al. 2007). In Vorversuchen zu der vorliegenden Arbeit kam es nach alleiniger Stimulation mit *E.coli*-LPS nicht zu einer Expressionssteigerung von CD44 auf humanen MDM. Eine verminderte inflammatorische Reaktion humaner Makrophagen durch eine erhöhte CD44-Oberflächenexpression nach Infektion mit *C. psittaci* wirkt sich positiv auf Replikation und Dissemination des Erregers aus.

Bei den Untersuchungen, die auf die Reaktion von *C. psittaci* im Zusammenspiel mit humanen bzw. bovinen MDM abzielten, wurde eine signifikante Steigerung der mRNA-Expressionen der Virulenzfaktoren *ftsW*, *rpoN* und *IncA* ermittelt. Dagegen wurden die mRNA-Expressionen der Virulenzfaktoren *CPAF* und *groEL* gar nicht oder nur in sehr geringem Maße (*groEL*) erhöht. *CPAF* soll Untersuchungen zufolge im Genom von *C. psittaci* Stamm 6BC codiert sein (Dong, Zhong et al. 2005). Nach Infektion von BGM-Zellen mit *C. psittaci* in der hier beschriebenen Versuchsreihe kam es aber ebenfalls nicht zu einer mRNA-Expressionerhöhung von *CPAF*. Eine weitere Studie zeigte, dass die Freisetzung von *CPAF* durch *C. psittaci* (A-6BC) in dendritischen Zellen im Vergleich zu der Freisetzung in epithelialen Zellen gestört ist (Fiegl, Kagebein et al. 2013). Ob dieses Phänomen hier eine Rolle spielte, müsste durch weiterführende Untersuchungen überprüft werden.

*GroEL* mRNA wurde in humanen MDM nur in sehr geringem Maße signifikant zur Kontrolle erhöht. In bovinen MDM gab es überhaupt keine Erhöhung. Allerdings kam es 24 und 48 hpi

in nicht immunkompetenten BGM zu signifikanten Erhöhungen der groEL mRNA-Expression. Da groEL sehr immunogen (Abschnitt 5.2, (Kol, Bourcier et al. 1999)) ist, führt eine geringe groEL mRNA-Expression zu einer geringen Immunstimulation. Eine geringe Immunstimulation begünstigt Replikation und Dissemination von *C. psittaci*.

Die mRNA des Zellteilungsproteins FtsW (Braukmann, Sachse et al. 2012) wurde in der vorliegenden Studie ausschließlich von *C. psittaci* in humanen und bovinen MDM signifikant zur Kontrolle erhöht. Es trägt während der Zellteilung zur Ausbildung eines Septums bei, indem es Peptidoglykan synthetisiert (Stephens, Kalman et al. 1998; Goellner, Schubert et al. 2006). In der quantitativen Untersuchung und mithilfe des Elektronen-, Fluoreszenz- und Lichtmikroskops wurde bereits eine deutliche Replikation von *C. psittaci* festgestellt. Die Expressionssteigerung eines Proteins, das in die Zellteilung involviert ist, ist eine weitere Bestätigung für eine funktionierende Replikation von *C. psittaci* in MDM. Die geringere Expressionsrate 24 und 48 hpi in bovinen im Vergleich zu humanen MDM steht mit dem rapiden Untergang der bovinen Zellen nach Infektion mit *C. psittaci* in Zusammenhang.

Die mRNA- Expression von rpoN wurde in humanen und bovinen Makrophagen durch *C. psittaci* nur 4 hpi signifikant zur Kontrolle erhöht. Die Beobachtung, dass rpoN zu den „late stage“ Proteinen gehört, kann hier nicht bestätigt werden (Mathews, Volp et al. 1999). In diesen frühen Untersuchungen wurde rpoN mit der Umwandlung von Retikularkörperchen in Elementarkörperchen in Verbindung gebracht. Ein weiterer Zusammenhang wird mit dem Stickstoffmetabolismus von Bakterien hergestellt (Buck, Gallegos et al. 2000). Außerdem werden rpoN Funktionen beim Säuretransport, bei der RNA-Herstellung, beim Energieaustausch und der Fructoseaufnahme zugeschrieben (Studholme and Buck 2000). Allgemein hat rpoN also vielfältige Funktionen im Bakterienstoffwechsel. Die metabolisch aktive Form der Chlamydien sind die Retikularkörperchen, die auch die Zweiteilung im Replikationszyklus vollziehen (Parte 2012). Die gesteigerte mRNA-Expression von rpoN ist somit eine weitere Bestätigung für eine Replikation von *C. psittaci* in humanen und bovinen MDM.

IncA-mRNA wurde von *C. psittaci* in humanen und bovinen MDM stetig über den Untersuchungszeitraum von 48 Stunden exprimiert. Da *C. psittaci* in der vorliegenden Studie in humanen und bovinen MDM nachweislich mehrere Einschlüsse bildete, spricht nichts dagegen, dass IncA in die Einschlussmembran eingebaut wurde und zur Bildung weiterer Einschlüsse beitrug. Des Weiteren soll IncA auch die Fusion mit Wirtszellendosomen vermitteln, die wichtige Metabolite für den Chlamydienstoffwechsel enthalten, was für ein sich reproduzierendes Bakterium essentiell ist (siehe dazu Abschnitt 5.2).

#### 5.4 Replikation und Immunstimulation von *C. muridarum* in humanen und bovinen Makrophagen

*C. muridarum* wurde bisher nur aus Individuen der Familie Muridae isoliert. Zu der Spezies gehören bisher 2 Stämme, ein Maus-Stamm und ein Hamster-Stamm. In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Isolat Nigg des Maus-Stammes verwendet. Die wenigen Isolate lassen vermuten, dass sich der Erreger auf einen bestimmten Wirt spezialisiert hat.

Auch für die Replikation von *C. muridarum* in Makrophagen gibt es Berichte in der Literatur. Rajaram et al. beschrieben eine Abhängigkeit von Replikation und MOI-Konzentration von *C. muridarum* in der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW (Rajaram and Nelson 2015). Bei MOI 1 verlief die Replikation am Besten und infektiöse Einschlusskörperchen wurden im Überstand detektiert. Die Replikation in murinen Knochenmark-gereiften Makrophagen war abhängig von der Polarisation der Makrophagen. Sie verlief besser in M0- und in M2-Makrophagen als in M1-Makrophagen (Gracey, Lin et al. 2013). Die Replikation von *C. muridarum* in den hier eingesetzten humanen und bovinen MDM verlief heterogen. In humanen MDM wurden hohe Standardabweichungen der ifu/cell festgestellt, weswegen eine Unterteilung stattfand. In der einen Hälfte der Spenderzellen konnte eine signifikante Steigerung von 4 zu 24 hpi festgestellt werden in der anderen Hälfte und in bovinen MDM gab es keine Erhöhung der ifu/cell innerhalb von 48 Stunden. Es wurden keine Elementarkörperchen in den Überstand abgegeben. Die dabei eingesetzten MOI 1, 2 und 5 hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe der ifu/cell (ANOVA). Die verwendeten humanen MDM wurden in Vorversuchen als M0-Makrophagen charakterisiert. Wie in Tabelle 12 vereinfacht dargestellt veränderte sich der Phänotyp der Makrophagen nach Stimulation mit *C. muridarum* noch etwas stärker in Richtung M1-Makrophagen (CD86, MHCI, MHCII, CD40), als nach Stimulation mit *C. psittaci*. Wie nach Stimulation mit *C. psittaci* konnte auch *C. muridarum* keine Expressionserhöhung der wichtigsten M1-Marker CD64 und TLR-4 bewirken. Dafür konnte im Gegensatz zu dem Versuch mit *C. psittaci* eine Expressionssteigerung von dem 3. wichtigen M1-Marker MHCII beobachtet werden.

**Tabelle 12 Typische Oberflächenmarker des M1-Phänotyps im Vergleich mit Oberflächenmarkern, die nach Stimulation von humanen MDM mit *C. muridarum* bzw. *C. psittaci* untersucht wurden**

↑: leicht erhöht; ↑↑: stark erhöht; - : nicht vorhanden; +: vorhanden, aber nach Stimulation nicht erhöht; nd; no data; 1: Serotec (2013), 2: M.A. Vega (2006), 4: Ambarus, Krausz et al. (2012), 5: Hristodorov, Mladenov et al. (2012), 6: Mantovani, Sica et al. (2004), 8: Kahnert, Seiler et al. (2006), 16: (Ishizuka, Ferreira et al. 2012)

LPS/IFN $\gamma$	<i>C. muridarum</i>	<i>C. psittaci</i>
<b>CD80</b> ↑ <sup>1,4,5</sup>	CD80-	CD80-
<b>CD86</b> ↑ <sup>1,4,5,6,8</sup>	CD86↑	CD86↑
<b>MHCI</b> ↑ <sup>5</sup>	MHCI↑	MHCI↑
<b>MHCII</b> ↑ <sup>1,5,6</sup>	<b>MHCII</b> ↑	<b>MHCII</b> +
<b>CD16</b> + <sup>6</sup>	CD16nd	CD16nd
<b>CD40</b> + <sup>16</sup>	CD40↑↑	CD40↑↑
<b>CD64</b> ↑ <sup>2</sup>	CD64-	CD64-
<b>TLR-2</b> + <sup>1,2</sup>	TLR-2nd	TLR-2nd
<b>TLR-4</b> +	TLR-4-	TLR-4-
<b>=&gt; M1-Makrophagen</b>	=> teilweise Aktivierung des M1-Phänotyps	=> teilweise Aktivierung des M1-Phänotyps

Für die Einteilung in M1- und M2- Makrophagen werden, wie in Abschnitt 1.2.3 ausführlich dargestellt, neben den Oberflächenexpressionsprofilen auch die Expression von Zytokinen, Enzymen und Chemokinen herangezogen. *C. muridarum* führte zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression aller untersuchten inflammatorischen Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ ; M1) in humanen und bovinen MDM. In den Untersuchungen von Rajaram et al wurden die genannten Zytokine durch *C. muridarum* in der Makrophagenzelllinie RAW ebenfalls stark erhöht (Rajaram and Nelson 2015). Bei den hier durchgeführten Untersuchungen war die mRNA-Expressionserhöhung in humanen MDM (außer TNF $\alpha$ ) signifikant höher als nach Stimulation mit *C. psittaci* bzw. *C. pneumoniae*. In bovinen MDM war die Expressionserhöhung nach Stimulation mit *C. muridarum* im Vergleich zu den Versuchen mit *C. psittaci* und *C. pneumoniae* entweder signifikant erhöht (IL-6, IL-12) oder gleichwertig (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ). Die mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine wurde von *C. muridarum* in humanen und bovinen MDM demnach am deutlichsten erhöht. Die mRNA-Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (M2, (Mantovani, Sica et al. 2004; M.A. Vega 2006; Serotec 2013) wurde nach Stimulation der humanen und bovinen MDM nicht erhöht. Die inducible nitric oxide synthase kurz iNOS oder NOS2 wird ebenfalls als Schlüsselmarker für M1-Makrophagen beschrieben (M.A. Vega 2006; Gracey, Lin et al. 2013; Serotec 2013). In der vorliegenden Studie wurde die mRNA-Expression von iNOS nach Stimulation mit *C. muridarum* in bovinen MDM signifikant zur Kontrolle erhöht. In humanen MDM war dies nicht der Fall. Die Gründe dafür wurden in Abschnitt 5.1 bereits diskutiert. Als Ergänzung wurde die mRNA-Expression des für diesen Sachverhalt relevanteren Enzyms IDO (Jaguin, Houlbert et al. 2013) untersucht. *C. muridarum* führte in humanen MDM zu einer signifikanten mRNA-Expressionserhöhung von IDO, die gleichwertig mit der Erhöhung nach Stimulation mit *C. psittaci* war. *C. muridarum* besitzt im Gegensatz zu *C. psittaci* in seinem Genom keine Anzeichen für ein Trp-Operon ((Read, Brunham et al. 2000), *C. trachomatis* MoPn = *C. muridarum*). Daher könnte die erhöhte IDO mRNA-Expression zu der schlechten bis nicht vorhandenen Replikation von *C. muridarum*

beigetragen haben, da der entstehende Tryptophanmangel nicht ausgeglichen werden konnte. Die mRNA-Expression von IFN $\gamma$ , welches zur Bildung vonIDO beiträgt, war in humanen MDM ebenfalls signifikant erhöht. Auch in der Studie von Gracey et al fand nach Infektion der murinen knochenmark-gereiften Makrophagen mit *C. muridarum* keine eindeutige Polarisation in Richtung M1- oder M2-Makrophagen statt (Gracey, Lin et al. 2013). Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse ist ebenfalls die Tendenz zur Ausbildung des M1-Makrophagenphänotyps zu erkennen, da es zu einer leichten Expressionserhöhung von NOS2 (=iNOS) und IL-12 mRNA kam. Bei Untersuchungen mit vorpolarisierten Makrophagen viel auf, dass *C. muridarum* in M1-Markophagen eine gestörte Replikation mit Hinweisen auf ein Persistenzstadium zeigte (Gracey, Lin et al. 2013). Genau dieses Phänomen zeigte sich bei den hier verwendeten humanen Makrophagen. Mit dem Transmissionselektronenmikroskop wurden Hinweise für eine gestörte Replikation und für persistente Stadien gefunden. 24 Stunden nach Infektion der humanen und bovinen MDM mit *C. muridarum* waren vor allem Elementarkörperchen zu sehen. 24 Stunden später (48 hpi) wirkten die Einschlüsse kleiner und enthielten alle Stadien des chlamydialen Entwicklungszyklus. In den Einschlüssen war außer den Chlamydien viel zelluläres Material zu finden. Einige Einschlüsse waren sogar komplett leer. Dies lässt auf Abbauprozesse innerhalb der Einschlüsse schließen. In der quantitativen Bestimmung wurde deutlich, dass *C. muridarum* nicht in der Lage war Elementarkörperchen in die Umgebung abzugeben. Die Aufnahmen lassen vermuten, dass der Reproduktionszyklus zwar begonnen wurde, die Chlamydien aber durch bestimmte Prozesse abgebaut oder in ihrer Entwicklung gestört wurden. In humanen MDM fielen zudem Vesikel auf, die mit Membranansammlungen und elektronendichtem Material gefüllt waren, die der Beschreibung nach Autophagosomen glichen ((Fiegl, Kagebein et al. 2013), (Sacco 2009) S. 69). Sie traten mit Lysosomen in Kontakt, wodurch Autophagolysosomen entstanden ((Sacco 2009), S. 69). Diese Gebilde tragen zusätzlich zu der Ansicht bei, dass es bei einer Infektion mit *C. muridarum* innerhalb der Makrophage zu Abbauprozessen gekommen ist. Dazu passt auch, dass in der quantitativen Auswertung der humanen (low) und bovinen MDM der Eindruck entstand, dass die ifu/cell 48 hpi weniger wurden. Des Weiteren fanden sich in humanen Makrophagen 48 hpi Einschlüsse, die von der normalen Form abweichende (aberrante) und vergrößerte Retikularkörperchen enthielten. Diese Einschlüsse waren auch etwas kleiner als 24 hpi. Große abnormale Retikularkörperchen in verkleinerten Einschlüssen findet man in verschiedenen Persistenzmodellen, so auch nach Stimulation mit IFN $\gamma$  (Goellner, Schubert et al. 2006). Beatty et al beschreiben das persistente Stadium als ein Stadium, in dem große aberrante Retikularkörperchen bei gleichzeitiger Abwesenheit von Elementarkörperchen in den Einschlüssen vorhanden sind (Beatty, Byrne et al. 1993). In der hier vorliegenden Studie befanden sich neben den aberranten Retikularkörperchen zugleich einige Elementarkörperchen in den Einschlüssen. Ein ähnliches Phänomen wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung in murinen dendritischen Zellen beobachtet (Rey-Ladino, Jiang et al. 2007). Dies lässt auf ein unvollständiges persistentes Stadium schließen. In den humanen Makrophagen scheinen demnach Prozesse abzulaufen, die *C. muridarum* teilweise in ein persistentes Stadium zwingen. Zu diesen Prozessen könnte die erhöhte mRNA-Expression von IFN $\gamma$  gehören (Goellner, Schubert et al. 2006). In humanen MDM, die mit *C. muridarum* stimuliert worden waren fanden wir 24 hpi die höchste Expression von IFN $\gamma$ -mRNA, verglichen mit humanen MDM, die mit *C. pneumoniae* bzw. *C. psittaci* stimuliert worden waren. Die Frage inwieweit Makrophagen in der Lage sind IFN $\gamma$  freizusetzen, wurde ausführlich in Abschnitt 5.1 erörtert. Einer Studie zufolge wurden während einer persistenten

Infektion von *C. psittaci* die chlamydialen Gene IncA und rpoN hochreguliert (Goellner, Schubert et al. 2006; Gracey, Lin et al. 2013). In der vorliegenden Studie war dies nicht der Fall. Es ist möglich, dass diese Gene hier nicht signifikant hochreguliert wurden, da es sich um ein Persistenzstadium handelte, das nicht alle Retikularkörperchen betraf und deshalb als unvollständig bezeichnet werden kann. Während der Persistenz wird normalerweise eine chronische unterschwellige Immunantwort beobachtet (Mpiga and Ravaoarino 2006). *C. muridarum* löste im Vergleich zu den anderen untersuchten Chlamydienarten eine starke Immunantwort aus. Im Vergleich zu der Reaktion in bovinen MDM war sie aber schwächer. In den bovinen Makrophagen, die *C. muridarum* enthielten, wurden keine aberranten Retikularkörperchen entdeckt. Auffällig war, dass die nativen bovinen MDM stark vakuolisiert waren. Diese Vakuolisierung schien 48 hpi abzunehmen. Eine starke Vakuolisierung weist auf eine erhöhte Aktivierung der Zellen hin, die meist in Stresssituationen auftritt. Im Lichtmikroskop waren 48 hpi deutliche Auflösungserscheinungen und Veränderungen der Zellen zu sehen. Die humanen MDM hingegen zeigten bis zu 5 Tage lang kaum Veränderungen und selbst 86 Tage nach Inokulation mit *C. muridarum* waren noch typische Makrophagen zu finden. Nicht-stimulierte humane Makrophagen lebten ebenfalls bis zu 86 Tage, wobei einige typische Anzeichen der Alterung zu sehen waren. Im Persistenzstadium sind Chlamydien lebensfähig, aber nicht kultivierbar. Es stellt einen alternativen Zweig des Replikationszyklus dar, mit dem Chlamydien dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen versuchen (Goellner, Schubert et al. 2006). In frühen Versuchen zur Persistenz wurde ein Gleichgewicht zwischen Zellwachstum, Zellzerstörung und chlamydialer Entwicklung beobachtet (Beatty, Morrison et al. 1994). Die lange Lebensdauer, der hier mit *C. muridarum* infizierten humanen MDM und die nicht nachweisbare Freisetzung von infektiösen Chlamydien lässt auf einen ähnlichen Gleichgewichtszustand schließen. Zudem wurde die mRNA des anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieds Mcl-1 signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die moderate Erhöhung dieses Apoptoseregulators (Rajalingam, Sharma et al. 2008) könnte ebenfalls einer frühzeitigen Zerstörung der Makrophagen durch *C. muridarum* entgegengewirkt haben. Obwohl die Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop auf Abbauprozesse und Persistenz hinwiesen, konnte *C. muridarum* nachdem es aus humanen bzw. bovinen MDM isoliert wurde in BGM-Zellen wieder angezüchtet werden. Da nicht alle Zellen und Chlamydien von diesen Beobachtungen betroffen waren, ist es nicht verwunderlich, dass noch Chlamydien vorhanden waren, die sich vermehren konnten. Ähnliches wurde in dendritischen Zellen und nach erneuter Aussaat auf HeLa-Zellen beobachtet (Rey-Ladino, Jiang et al. 2007).

Zusätzlich kam es nach Stimulation mit *C. muridarum* zu einer signifikanten Expressionssteigerung des typischen M2-Makrophagenmarkers CD206 ((Stein, Keshav et al. 1992),(Goerdts, Politz et al. 1999),  $p < 0,1$ ). Die Proben für das Durchflusszytometer wurden nicht in 2 unterschiedliche Gruppen eingeteilt, wodurch eine vorhandene Spendervariabilität nicht ausgeschlossen werden kann. Dies kann zu Störungen bei der Herausstellung deutlicher Signifikanzen ( $p < 0,05-0,01$ ) führen. M2-Makrophagen stehen für den anti-inflammatorischen Abwehrweg des Körpers. Er soll das Gleichgewicht, das in Ruhesituationen herrscht wiederherstellen (Abschnitt 1.2.3). *C. muridarum* führte bei humanen MDM zu einer deutlichen Entzündungsreaktion. Die leichte, etwas undeutliche Steigerung von CD206 könnte somit der Anfang einer Gegenregulation der Makrophagen sein. CD44 scheint ähnliche Expressionsniveaus wie nach Stimulation mit *C. psittaci* zu erreichen. Aber auch hier konnte nur eine sehr schwache Signifikanz festgestellt werden. Da

CD44 nach Aktivierung mit passenden Liganden einen anti-inflammatorischen Abwehrweg begünstigen kann (Abschnitt 5.2), ist seine leichte Erhöhung ebenfalls ein Indiz für eine beginnende Gegenregulation.

Die Reaktion von *C. muridarum* auf die Konfrontation mit humanen und bovinen MDM verlief relativ ereignislos. Bei den hier vorgestellten Untersuchungen wurde ausschließlich eine leichte Expressionssteigerung des chlamydialen Proteins groEL festgestellt. CPAF soll zwar im Genom von *C. muridarum* vorkommen (Dong, Zhong et al. 2005), dessen mRNA-Expression wurde aber weder in humanen noch in bovinen MDM gesteigert. In Abschnitt 5.2 wurde dargelegt, dass die Virulenzfaktoren ftsw, rpoN und IncA in die Zellteilung involviert sind und damit eine funktionierende Replikation anzeigen. Die fehlende Expressionssteigerung dieser chlamydialen Faktoren passt zu den Ergebnissen der quantitativen Untersuchung, in der für *C. muridarum* keine Hinweise für eine vollständige Replikation gefunden wurden. Einige Untersuchungsergebnisse wiesen auf einen teilweisen Übergang in das Persistenzstadium hin. Geringe mRNA Expressionslevel von ftsW wurden in mehreren Studien mit verschiedenen Chlamydienspezies mit der Ausbildung eines Persistenzstadiums in Verbindung gebracht (Goellner, Schubert et al. 2006). Die signifikante Expressionssteigerung von GroEL geht einher mit der deutlichen Immunreaktion der Makrophagen, die durch *C. muridarum* ausgelöst wurde. Wie in Abschnitt 5.1 beschrieben, ist GroEL immunogen und führt zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine, deren mRNA Expressionen hier sowohl in humanen als auch in bovinen MDM deutlich erhöht waren. Weiterhin wird groEL auch als Indikator für Persistenz beschrieben, denn in Versuchen zur induzierten Persistenz von Chlamydien nach IFN $\gamma$ -Gabe wurde es vermehrt gefunden und löste T-zellabhängige Immunantworten aus (Kinnunen, Paavonen et al. 2001).

### **5.5 Vergleichende Modelle zur Infektiosität und Wirtsadaptation verschiedener Chlamydienspezies in humanen und bovinen MDM**

Aktuellen Literaturrecherchen zufolge gibt es nur wenige Forschungsarbeiten, die verschiedene Chlamydienspezies in einem Wirt untersucht haben. Braukmann et al verglichen Wirts-Pathogen-Beziehungen von *C. psittaci* und *C. abortus* in Hühnerembryonen (Braukmann, Sachse et al. 2012). Beagley et al erstellten einen Überblick zum Wachstum von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* in Immunzellen (Beagley, Huston et al. 2009). Dong et al untersuchten die Genome von 5 verschiedenen Chlamydienspezies auf der Suche nach dem Virulenzfaktor CpaF (Dong, Zhong et al. 2005). Kuo et al verglichen die Affinität von *C. trachomatis*, *C. psittaci* und *C. pneumoniae* zu dem Mannose-Rezeptor auf Mausmakrophagen (Kuo, Puolakkainen et al. 2002). Und Millman et al verwendeten die gleichen 3 Chlamydienspezies, um vergleichende Genomanalysen in den OmpA- und OmpB-Genregionen durchzuführen (Millman, Tavare et al. 2001). Vergleichende in vitro-Versuche zu Replikation, Immunstimulation und Wirtsadaptation von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. muridarum* in humanen und bovinen MDM wurden bisher nicht durchgeführt. Diese 3 Spezies zeigen verschiedene Wirtstropismen. Während *C. pneumoniae* vornehmlich aus Menschen isoliert (Biovar Mensch) wurde (siehe 1.1.5), zeigt *C. psittaci* ein sehr breites Wirtsspektrum und wurde vor allem in verschiedensten Vogelarten und Säugetieren, darunter Mensch gefunden (siehe 1.1.6). *C. muridarum* wurde bisher nur aus Mäusen und Hamstern isoliert (siehe 1.1.7). Daher ist ein Vergleich in Hinblick auf verschiedene

Eigenschaften unterschiedlicher Chlamydienpezies in ein und derselben Wirtszelle von großer wissenschaftlicher Bedeutung.

In der vorliegenden Studie zeigte *C. psittaci* in humanen MDM im Vergleich zu *C. pneumoniae* und *C. muridarum* die höchste Infektiosität und setzte die größte Anzahl an Elementarkörperchen in den Überstand frei (Abbildung 40). Auch in der Studie von Braukmann et al war die Infektiosität von *C. psittaci* gegenüber dem Vergleichskeim *C. abortus* erhöht (Braukmann, Sachse et al. 2012). Allerdings zeigte *C. psittaci* dort auch eine höhere mRNA-Expression chlamydialer Virulenzgene und veranlasste Immunzellen vermehrt dazu immunologisch wichtige Proteine zu exprimieren. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen in humanen MDM führte eine Infektion mit *C. muridarum* zu der stärksten Stimulation der Immunzellen. Chlamydiale Virulenzfaktoren wurden am deutlichsten von *C. pneumoniae* exprimiert (Abbildung 40). Während Dong et al nachwiesen, dass das Cpf-Protein von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. muridarum* nach Infektion von HeLa-Zellen exprimiert wurde (Dong, Zhong et al. 2005), wurde Cpf mRNA in den vorliegenden Versuchen nur in humanen MDM nachgewiesen, die mit *C. pneumoniae* stimuliert worden waren (Abbildung 40).

In bovinen MDM wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, nur die Immunantwort der Makrophagen fiel deutlicher aus und die Replikation von *C. psittaci* war gegenüber der in humanen MDM signifikant erhöht. Der Zelluntergang der infizierten bovinen Zellen trat deutlich früher, als bei den humanen infizierten Zellen ein (Abbildung 41).

In der vorliegenden Studie werden einprägsam die Unterschiede in der Replikation verschiedener Chlamydienpezies und der Immunantwort des Wirtes vor Augen geführt. Wie Coers et al in ihrer Review beschreiben entsteht die Wirtsspezifität eines Pathogens durch eine kontinuierliche Selektion über tausende von Jahren, die eine Adaptation an die ökologische Nische, die der spezifische Wirt darstellt begünstigen (Coers, Starnbach et al. 2009). Wenn ein Pathogen nun mit einer Spezies in Berührung kommt, mit der es sich nicht gemeinsam weiterentwickelt hat, fehlt die molekuläre Feintuning. So sagen sie, dass Pathogene, die einen spezifischen Wirt infizieren, oft zu chronischen Infektionen mit geringer Erregerlast und wenig effizienter Immunität führen. Vergleichbares wurde in den hier durchgeführten Versuchen für *C. pneumoniae* (Biovar Mensch) in humanen MDM festgestellt. Die Erregerlast, wie die erfolgte Immunantwort der Makrophagen vergleichsweise gering. Chronische Infektionen werden durch eine Verbreitung im Organismus und eine Apoptosehemmung begünstigt (Abbildung 40). Für beides wurden Hinweise in den Untersuchungsergebnissen gefunden (siehe 5.1). In bovinen MDM hingegen kam es zu einer höheren Erregerlast, als in humanen MDM und die Überlebensdauer der Zellen sank rapide. Auch die Immunantwort, war gegenüber der in humanen MDM erhöht (Abbildung 41).

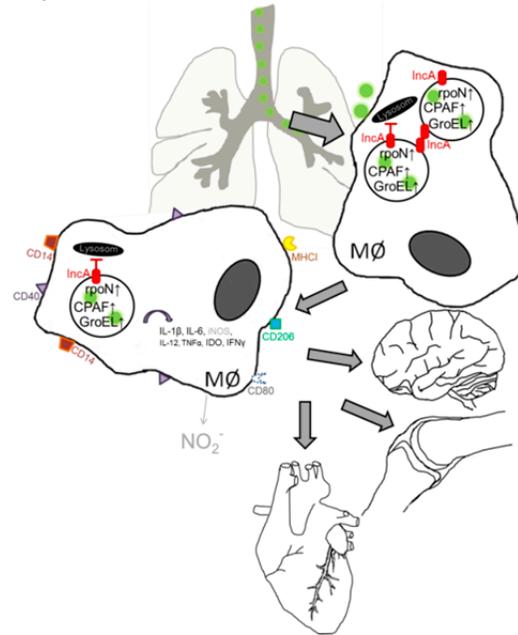
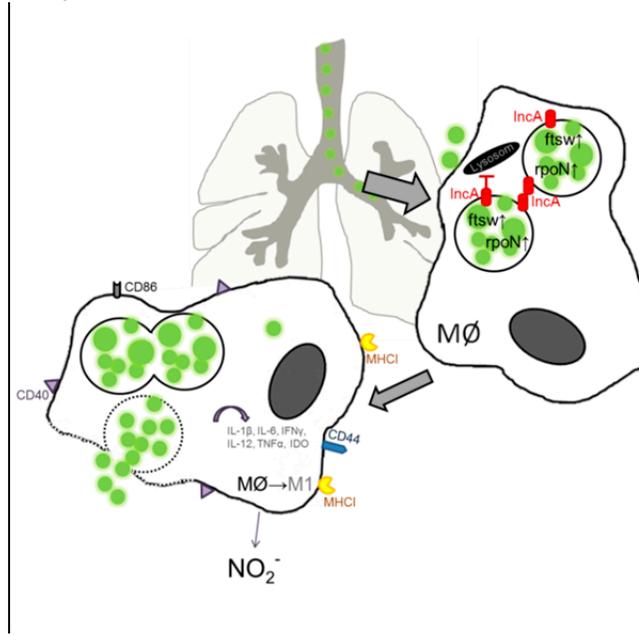
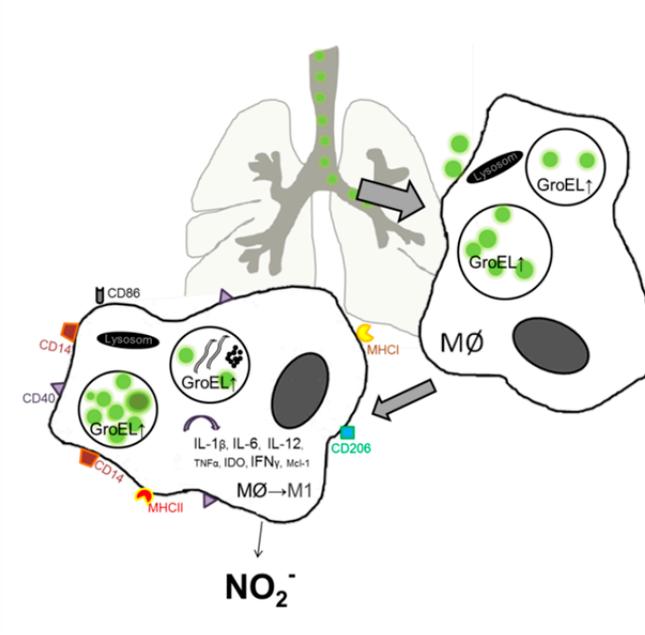
Im Gegensatz dazu führen Infektionsversuche mit Pathogenen und Wirten, die sich nicht gemeinsam entwickelt haben zu einem ernstesten Krankheitsverlauf, gefolgt von einer kompletten Erregerelimination und der Ausbildung einer effektiven Immunität (Coers, Starnbach et al. 2009). Da *C. muridarum* bisher nur in 2 Spezies der Familie Muridae gefunden wurde, ist davon auszugehen, dass sich das Bakterium auf einen bestimmten Wirt spezialisiert hat. Die Wirte Mensch und Rind sind demnach eher Wirte mit denen es sich nicht gemeinsam entwickelt hat. In beiden Wirten kam es zu einer deutlichen

## DISKUSSION

---

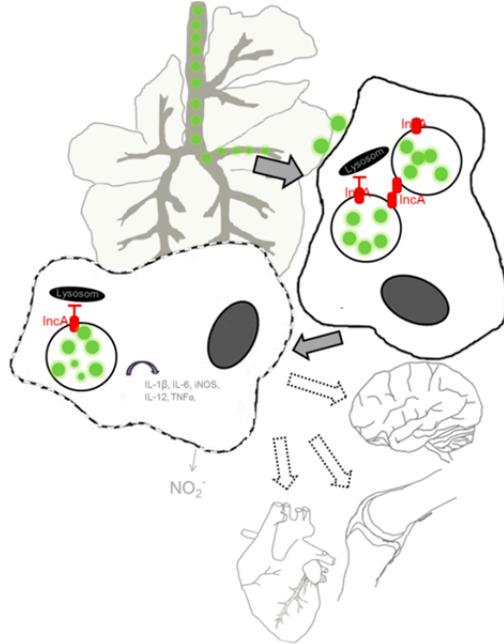
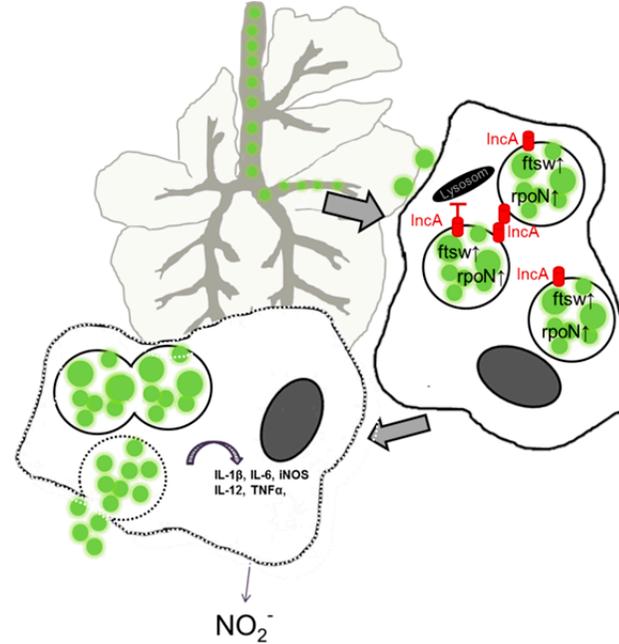
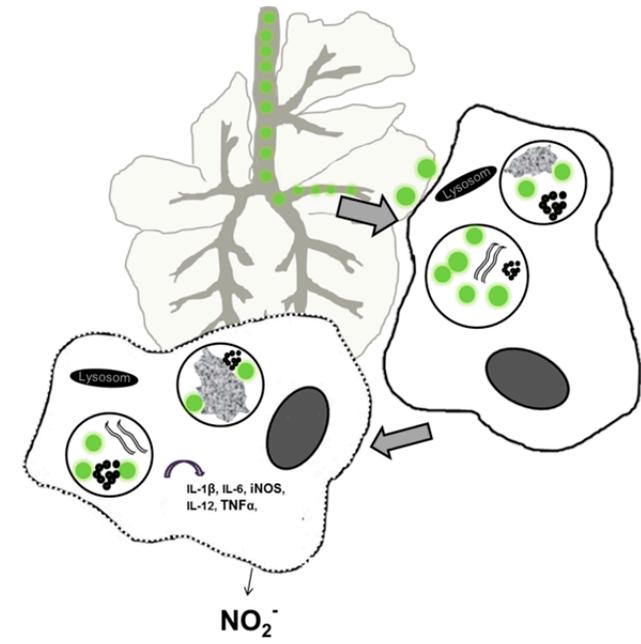
inflammatorischen Reaktion der MDM, was sich in der Abgabe von  $\text{NO}_2^-$  und der Erhöhung der Expression wichtiger inflammatorischer Zytokine widerspiegelte. In humanen MDM kam es zur Ausbildung eines Phänotyps, der sich in Richtung M1-Makrophagen bewegte. Zur gleichen Zeit wurden Marker erhöht, die einen anti-inflammatorischen Weg begünstigen und die Balance nach einer starken entzündlichen Reaktion wieder herstellen sollen. Es wurden auch Hinweise für eine Erregerelimination gefunden, wie z.B. das Auffinden von Autophagolysosomen im Transmissionselektronenmikroskop. Chlamydien sind allerdings sehr geschickte Organismen wenn es darum geht, sich an einen Wirt anzupassen (Mehlitz and Rudel 2013). Als Reaktion auf die Abwehrmechanismen der MDM schien *C. muridarum* in humanen MDM ein persistentes Stadium etablieren zu wollen, wie Transmissionselektronenmikroskopaufnahmen zeigten. Zudem wurden Anzeichen für eine Apoptosehemmung in den humanen MDM entdeckt. Persistenz und Apoptosehemmung ist auch für *C. pneumoniae* (Biovar Mensch) beschrieben (Chacko, Beagley et al. 2015; Sarkar, Moller et al. 2015). An den Menschen scheint sich *C. muridarum* daher schon etwas besser angepasst zu haben, als an bovine Zellen, da in einigen der Spendermakrophagen eine moderate Vermehrung gemessen wurde. Die Reaktionen auf die Abwehrmechanismen der MDM zeigen ebenfalls, dass *C. muridarum* Wege zu etablieren versucht, um in den humanen MDM länger zu überleben.

*C. psittaci* ist ein Pathogen, das sich in vielen Wirten wiederfinden lässt. Es vermehrt sich meist gut und führt zu einem moderaten Krankheitsgeschehen und zur Ausbildung einer deutlichen aber nicht ausufernden Immunreaktion. Dennoch wird der Erreger oft wieder eliminiert und es kommt zur Genesung des Wirtes (Prohl, Lohr et al. 2014). Daher lässt sich *C. psittaci* im Bezug auf seine Adaptation an die Prozesse des Wirtes zwischen *C. pneumoniae* und *C. muridarum* einordnen.

*C. pneumoniae**C. psittaci**C. muridarum*

**Abbildung 40 Hypothetisches Modell der intrazellulären Vermehrung und Wirtsanpassung von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* in humanen monozyten-gereiften Makrophagen**

*C. pneumoniae* konnte sich in humanen MDM innerhalb von 48h nicht effektiv vermehren, wurde aber nicht von den Wirtszellen zerstört. Das Bakterium zeigte metabolische Aktivität und schien das Leben der Wirtszellen zu verlängern. Die immunologische Reaktion der Makrophagen war moderat. Eine Verbreitung im Organismus ist möglich, da weder die Trägerzelle noch das Pathogen zerstört wird. *C. psittaci* zeigte eine effektive Vermehrung mit Freisetzung von Elementarkörperchen innerhalb von 48h. Es kam zu einer deutlichen Immunreaktion und moderaten Aktivierung der Makrophagen. Erst nach 36 Tagen waren die Wirtszellen komplett zerstört. *C. muridarum* vermehrte sich innerhalb von 48h kaum in humanen MDM. Es wurden keine Elementarkörperchen freigesetzt. Die Wirtszellen wurden zu einer starken immunologischen Reaktion getrieben. Es waren Anzeichen für Persistenz und Apoptosehemmung zu finden.

*C. pneumoniae**C. psittaci**C. muridarum*

**Abbildung 41 Hypothetisches Modell der intrazellulären Vermehrung und Wirtsanpassung von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* in bovinen monozyten-gereiften Makrophagen**

*C. pneumoniae* vermehrte sich in bovinen MDM ebenfalls nicht effektiv, gelang aber etwas besser in die Makrophagen. Die immunologische Reaktion der bovinen Makrophagen war noch etwas geringer als in humanen MDM. Eine Verbreitung im bovinen Organismus ist weniger wahrscheinlich, da die bovine potentielle Trägerzelle deutlich früher zerstört wurde. *C. psittaci* zeigte in bovinen MDM eine effektive Vermehrung innerhalb von 48h und setzte signifikant mehr Elementarkörperchen frei als im humanen Wirt. Es kam zu einer deutlichen Immunreaktion und zur frühen Zerstörung der bovinen Makrophagen. *C. muridarum* vermehrte sich innerhalb von 48h kaum in bovinen MDM. Es wurden keine Elementarkörperchen freigesetzt. Die Wirtszellen wurden zu einer starken immunologischen Reaktion getrieben. In den chlamydialen Einschlüssen war viel Zelldetritus zu sehen. Die bovinen Wirtszellen waren 5 Tage nach der Infektion zerstört.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Replikation, Immunstimulation und Wirtsadaptation verschiedener Chlamydienspezies in humanen und bovinen monozyten-gereiften Makrophagen

Chlamydien sind kokkenähnliche, unbewegliche, obligat intrazelluläre Bakterien mit einem einzigartigen 3-phasigen Entwicklungszyklus. Sie sind metabolisch eingeschränkt, weswegen sie auf bestimmte Reaktionswege der Wirtszelle angewiesen sind. Sie werden zu den Gram(-)-Bakterien gezählt. Die in dieser Studie verwendeten Spezies *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. muridarum* gehören dem Genus *Chlamydia* an und werden zur Familie der *Chlamydiaceae* gezählt. Alle drei Spezies bilden im Wirt das Krankheitsbild einer Pneumonie aus. *C. pneumoniae* Stamm DC40 (TW-183) bevorzugt dabei den Menschen als Wirt. *C. psittaci* Stamm DC15 (A-6BC) befällt vorrangig Papageienvögel und Tauben, wurde aber auch aus Säugetieren isoliert und kann demnach als ein ubiquitärer Erreger eingestuft werden. *C. muridarum* Stamm DC39 (Nigg) wurde bisher nur aus Vertretern der Familie Muridae isoliert, zeigt also ein sehr enges Wirtsspektrum. Chlamydien befallen vorrangig epitheliale Zellen und bilden dort das vorherrschende Krankheitsbild heraus. Ebenso ist bekannt, dass Chlamydien mononukleäre Zellen infizieren können. Zu diesem Zelltyp gehören die Makrophagen. Sie bilden sich aus der myeloiden Linie über Monozyten im Knochenmark heran und differenzieren sich im Gewebe zu Makrophagen. Sie nehmen eine zentrale Stellung während der wirtseigenen Immunantwort ein und sind ein wichtiges Verbindungsglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort. Makrophagen lassen sich ähnlich dem  $T_H1/T_H2$ -System in M1/M2-Makrophagen einteilen. Dazu wird das Antigen-Expressionsprofil und die Zytokin- und Chemokinabgabe der Makrophagen herangezogen. M1-Makrophagen stehen für den inflammatorischen Abwehrweg und M2-Makrophagen zeigen typische Eigenschaften eines anti-inflammatorischen Abwehrweges. Makrophagen stellen die erste Abwehrlinie des Immunsystems dar und spielen dadurch eine bedeutende Rolle bei der Bekämpfung von Krankheitserregern. Daher wurden viele Studien mit Chlamydien und Monozyten/Makrophagen durchgeführt (Beagley, Huston et al. 2009). Dennoch bleiben weiterhin viele Fragen offen. Die meisten Untersuchungen beschränkten sich auf die Nutzung einer Chlamydienspezies in einem speziellen Wirt. Studien, die den Vergleich zwischen drei verschiedenen Chlamydienspezies in verschiedenen Wirten anstellen sind rar. In der vorliegenden Studie soll die Anpassung des Pathogens an zelluläre und immunologische Prozesse des Wirts (Wirtsadaptation) untersucht werden. Dabei wird besonderes Augenmerk auf die Replikation der Chlamydien, auf ihr Zytokinexpressionsprofil, auf das Überleben der Makrophagen und ihre Reaktion auf eine Infektion gelegt. Für die Versuche wurden humane bzw. bovine monozyten-gereifte Makrophagen aus Vollblut isoliert und kultiviert. Die isolierten Zellen wurden mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* inokuliert, um Proben für verschiedenste Untersuchungsverfahren zu gewinnen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden in die Themenbereiche Wachstum und Überleben der Chlamydien, Wirtszellantwort und Transkriptionsverhalten der Chlamydien eingeteilt. *C. pneumoniae* konnte in bovinen und humanen Makrophagen seinen Entwicklungszyklus innerhalb von 48 Stunden nicht abschließen, denn es wurden keine neuen Elementarkörperchen freigesetzt. In humanen Makrophagen schien der Entwicklungszyklus verzögert, anstatt komplett ausgesetzt zu sein, denn *C. pneumoniae* wurde weder zerstört noch inaktiviert. Vielmehr behielt es seine metabolische Aktivität bei, was man an einer Erhöhung der mRNA-Expression von rpoN und IncA ablesen konnte.

Diese zwei Virulenzfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Umwandlung von Elementarkörperchen in Retikularkörperchen. Es gab auch Anzeichen für chlamydiale Einschlüsse in humanen MDM nach ca. 23 Tagen (Lichtmikroskop). *C. pneumoniae* konnte die Makrophagen nur sehr geringfügig aktivieren und konnte keine eindeutige Polarisation in Richtung M1/M2 hervorrufen. Auch die bovinen Makrophagen konnten nicht effektiv infiziert werden. Die PCR-Daten zeigten aber signifikant mehr Chlamydien in den bovinen Makrophagen, als in den humanen. Es war auch eine leichte Zunahme der ifu/cell (nicht signifikant) zu erkennen. Im Licht- und Fluoreszenzmikroskop wurden mögliche Einschlüsse 24 hpi entdeckt, was darauf hinweist, dass der Entwicklungszyklus in bovinen Zellen etwas schneller als in humanen Zellen ablief. Rindermakrophagen waren generell empfindlicher gegenüber einer Infektion mit Chlamydien. *C. pneumoniae* konnte mehrfach aus anderen Organen (Gehirn, Gelenke, Herz, Blutgefäße) humaner Wirte isoliert werden, sodass Monozyten/Makrophagen als Trägerzellen diskutiert werden können. Dazu tragen die verzögerte Vermehrung und stete metabolische Aktivität in den humanen Makrophagen bei, welche einen Transport und eine rasche Wiederaufnahme des Reproduktionszyklus in den Zielgeweben begünstigen, wo sie epitheliale Zellen infizieren können (siehe Abbildung 40 und Abbildung 41). *C. psittaci* replizierte sich in beiden hier untersuchten Wirten sehr deutlich. Die Virulenzgene *ftsw*, *rpoN* und *IncA* wurden in beiden Wirten vermehrt exprimiert, was neben der signifikanten Erhöhung der ifu/cell und der ifu/2ml 48 hpi eine deutliche Replikation anzeigt. Die Replikation in den bovinen MDM war dabei signifikant höher als in humanen MDM (ca. 10 fach mehr ifu/cell). Gleichzeitig wurden die bovinen MDM deutlich früher zerstört, als die humanen MDM. In beiden Wirten wurden auch außerhalb der chlamydialen Einschlüsse Retikularkörperchen gefunden. In bovinen MDM wurde durch *C. psittaci* eine deutlich höhere inflammatorische Reaktion als in humanen MDM erzeugt. Zusammen mit dem Antigen-Expressionsprofil ließen sich die humanen MDM nicht eindeutig in M1/M2-Makrophagen einteilen, verschoben sich aber etwas mehr in Richtung M1-Makrophagenphänotyp. *C. psittaci* scheint etwas besser an den humanen Wirt angepasst zu sein, da dort eine moderatere inflammatorische Reaktion stattfand und die Zellen länger vital blieben. Die Infektion im bovinen Wirt verlief deutlich stürmischer (siehe Abbildung 40 und Abbildung 41). *C. muridarum* konnte in beiden Wirten keine effektive Vermehrung etablieren, denn es wurden keine neuen Elementarkörperchen freigesetzt. In beiden Wirten wurde aber eine deutliche inflammatorische Reaktion der MDM ausgelöst, was durch die Abgabe von  $\text{NO}_2^-$  und die Erhöhung der Expression wichtiger inflammatorischer Zytokine zu erkennen war. In humanen MDM entwickelte sich ein Phänotyp, der M1-Makrophagen nahe kommt. Auch wurden CD14, CD40 und CD86 vermehrt exprimiert, was eine Aktivierung der Immunzellen anzeigt. Ein anti-inflammatorischer Marker wurde ebenfalls erhöht, was ein Anzeichen für die Wiederherstellung einer Balance nach einer starken entzündlichen Reaktion sein kann. Des Weiteren schien *C. muridarum* in humanen MDM ein unvollständiges persistentes Stadium zu etablieren, was durch die fehlende Freisetzung von EK, das Auftreten aberranter Retikularkörperchen (TEM) und einer erhöhten IFN $\gamma$ -Expression durch die MDM gekennzeichnet war. Eine weitere Reaktion von *C. muridarum* auf die stark inflammatorische Reaktion der Makrophagen war die erhöhte mRNA-Expression von Mcl-1, was zusammen mit der langen Lebensdauer der humanen MDM von mehr als 86 Tagen auf eine Apoptosehemmung hinwies. An die Wirte Mensch und Rind ist *C. muridarum* nicht gut angepasst. An den Menschen scheint er etwas besser angepasst zu sein. Denn in einigen Spendermakrophagen war eine moderate Vermehrung zu erkennen

und die Reaktionen des Bakteriums auf die Abwehrmechanismen der MDM zeigten Wege auf, um in humanen MDM länger zu überleben (siehe Abbildung 40 und Abbildung 41).

#### Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen einen Einblick in die Vermehrung verschiedener Chlamydienpezies in unterschiedlichen Wirten. Die Anpassung an das intrazelluläre Leben und an den Wirt ist von Spezies zu Spezies verschieden. Die Annahme, dass *C. pneumoniae* gut an die Verbreitung im menschlichen Organismus angepasst ist, muss durch weiterführende Studien untersucht werden. Dazu gehört eine Verlängerung des Beobachtungszeitraums für die quantitative Untersuchung. Auch die zugehörigen immunologischen Prozesse müssten über mindestens 2 Wochen beobachtet werden. Des Weiteren fanden sich im Versuch mit *C. pneumoniae* Hinweise auf eine Apoptosehemmung, die durch Untersuchungen mit Staurosporin oder TUNEL weiter verdichtet werden können. Ein weiteres interessantes Ergebnis war, dass sich *C. psittaci*, trotz hoherIDO-Expression gut vermehren konnte. Studien, die sich mit dem Tryptophansyntheseweg der Chlamydien beschäftigen, könnten hier ansetzen. Das Hitzeschockprotein groEL wurde von *C. psittaci* nur in geringem Maße exprimiert, was für die Entwicklung von *C. psittaci* von Vorteil ist, da die Immunantwort der infizierten Zelle weniger stimuliert wird. Vertiefende Untersuchungen hierzu könnten einen Mechanismus aufdecken, der es Chlamydien ermöglicht vom Immunsystem weitestgehend unentdeckt zu bleiben, ohne in Persistenz zu gehen. Des Weiteren fanden sich „freie“ Retikularkörperchen von *C. psittaci* im Zytoplasma beider Wirte. Fiegl et al postulierten einen Zusammenhang mit dem MHCI-Präsentationsweg in einer dendritischen Zelllinie (Fiegl, Kagebein et al. 2013). Weitere Versuche hierzu können Klarheit darüber verschaffen, ob hier ein ähnlicher Mechanismus vorlag. Im Versuch mit *C. muridarum* sind Hinweise für eine beginnende Persistenz aufgetreten, die einer natürlichen Infektion nahe kommen. Persistenzstudien werden oft mit einer hohen Persistenz-auslösenden Stimulation durchgeführt. Das hier vorgestellte Modell könnte die Entstehung und Etablierung einer Persistenz unter Infektionsbedingungen untersuchen. Da *C. muridarum* ein sehr enges Wirtsspektrum hat, wäre die Erweiterung des hier eingesetzten Versuchsmodells auf die Familie der *Muridae* sehr interessant und würde die Versuchsreihe komplettieren. Auch die angezweifelten Funktionen des Virulenzfaktors CPAF könnten in dem hier vorgestellten Versuchsmodell überprüft und weiter erforscht werden.

Die hier vorgestellte Arbeit ermöglicht einen guten Einblick in das Anpassungsvermögen der Chlamydien. Es konnten Unterschiede verschiedener Spezies in verschiedenen Wirten dargestellt und erklärt werden. Es wurde ein stabiles Modell etabliert, das für viele weiterführende Studien zur Verfügung steht. Wie erläutert ergaben sich aus den Ergebnissen dieser Studie einige weitere Fragen und Ansatzstellen für tiefere Forschungsprojekte. Somit dient die vorgelegte Arbeit als Grundlage für das Forschungsgebiet der Wirtsadaptation von Chlamydien.

## Summary

Replication, stimulation of immune response and host-adaptation of different chlamydial species in human and bovine monocyte-derived macrophages

Chlamydiae are cocci-like, immobile, obligate intracellular bacteria. They are distinguished by a characteristic three stage replication cycle. Their metabolism is restricted, so they depend on distinct pathways of their host. *Chlamydiae* belong to the group of gram-negative bacteria. The chlamydial species *C. pneumoniae*, *C. psittaci* and *C. muridarum*, used in this study, belong to the genus *Chlamydia* and are part of the family *Chlamydiaceae*. All three species cause pneumonia in their particular hosts. The *C. pneumoniae* strain DC40 (TW-183) prefers humans as main hosts while the *C. psittaci* strain DC15 (A-6BC) is a ubiquitous species because it affects *Psittacidae* and *Columbidae* as well as mammals. The *C. muridarum* strain DC39 (Nigg) is solely collected from members of the family *Muridae*, which indicates a very tight host range. *Chlamydiae* affect epithelial cells preferentially, where they form the predominant clinical picture. They are also able to infect mononuclear cells, to which the macrophages belong. Macrophages are generated in the bone marrow from monocytes via the myeloid pathway. These monocytes then differentiate to macrophages in the tissue. They play a central role in the host immune system where they represent an important connector between the humoral and cell mediated immunity. Similar to the  $T_H1/T_H2$  system, macrophages can be divided into M1 and M2 subtypes. The differentiation between the two is achieved by observing surface structure as well as cytokine and chemokine release. M1 macrophages mark the inflammatory defense pathway, while M2 macrophages show typical characteristics of an anti-inflammatory pathway. Macrophages play an important role in controlling pathogens: they represent the immune system's first line of defense. While many studies working with monocytes/macrophages exist (Beagley, Huston et al., 2009), many questions remain unanswered. Most of these studies were restricted to one species and one distinct host. Studies which compare three different species in two different hosts are rare. In the present study, the adaptation of the pathogen to cellular and immunologic processes of the host (host adaptation) will be observed. Replication of *Chlamydiae*, their cytokine expression profile, the viability of the macrophages and their reaction to infection are of special interest. The first step of the experiments was to isolate and cultivate human and bovine monocyte-derived macrophages from whole blood samples of healthy donors. The cultivated cells were inoculated with *C. pneumoniae*, *C. psittaci* or *C. muridarum*, respectively. Samples for different analytical methods were collected. The results of these studies were separated into the following topics: growth and survival of the Chlamydiae, host response, and transcriptional characteristics of the chlamydiae. *C. pneumoniae* was not able to complete its replication cycle within 48 hours, as no elementary bodies were released into the supernatant. The replication cycle in human macrophages appeared delayed rather than turned off, as *C. pneumoniae* was neither destroyed nor inactivated. The increase of the mRNA expression of *rpoN* and *IncA* showed that it remained metabolically active. These two virulence factors are important for the differentiation of elementary into reticulate bodies. There was also evidence of chlamydial inclusions after 23 days in human macrophages (light microscopy). *C. pneumoniae* only marginally activated the macrophages and was not able to initialize an appropriate polarization to M1 or M2. The bovine macrophages were infected ineffectively as well. However, PCR-data revealed more chlamydiae in bovine macrophages than in human macrophages. There was also a slight increase of the ifu/cell (not significant)

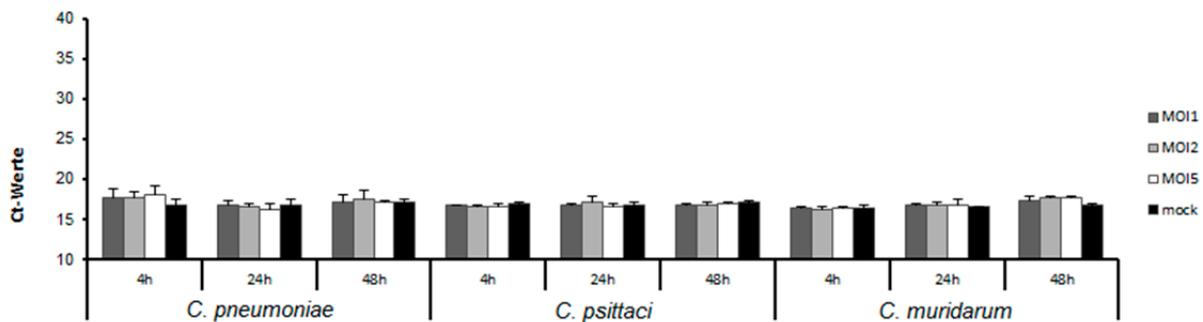
in bovine macrophages within 48 hours. Light and fluorescence microscopy revealed possible inclusions 24 hpi, which indicates a slightly faster reproduction cycle of *C. pneumoniae* in bovine macrophages compared to human macrophages. Bovine macrophages were more sensitive to an infection with *Chlamydiae* in general. *C. pneumoniae* was isolated several times from different organs (brain, joints, heart, vessels) of human hosts, human monocytes/macrophages could be regarded as transporter cells for *C. pneumoniae*. A delayed replication and continuous metabolic activity in human macrophages support this thesis, and promote the transportation and rapid resumption of the replication cycle in the target tissues, where epithelial cells will be infected first (vide Abbildung 40 and Abbildung 41). *C. psittaci* clearly proliferated in the two examined hosts. The expression of the virulence factors *ftsW*, *rpoN* and *IncA* were increased. Together with the significant increase of ifu/cell within 48 hours and of ifu/2ml 48 hpi, the distinct replication of *C. psittaci* could be revealed. The replication in bovine macrophages was significantly higher compared to human macrophages (about 10 fold). Simultaneously, bovine macrophages were destroyed earlier than human macrophages. Reticular bodies were also found outside the chlamydial inclusion in both hosts (TEM). *C. psittaci* produced a more severe inflammatory reaction in bovine macrophages than observed in human macrophages. Together with the outer membrane protein profile, a definite distinction between M1 and M2 macrophages of the human macrophages could not be achieved. However, there was a slight movement to the M1-phenotype. *C. psittaci* seemed to be more adapted to the human host, because a more moderate inflammatory reaction was produced and the cells remained vital for a longer period of time. In bovine macrophages, the infection proceeded more severely (vide Abbildung 40 and Abbildung 41). *C. muridarum* was not able to establish an effective infection in both hosts, because no new elementary bodies were released. However, in both hosts a severe inflammatory reaction of the macrophages was triggered. This was observed by the release of  $\text{NO}_2^-$  and the expression of major inflammatory cytokines. In human macrophages, a phenotype similar to M1-macrophages was developed. Also, the expression of CD14, CD40 and CD86 was increased, a sign for the activation of immune cells. The simultaneous increase of the expression of an anti-inflammatory marker is evidence for the attempt of the organism to restore homeostasis after a severe inflammatory reaction. Furthermore, *C. muridarum* seemed to establish a partial persistent state in human macrophages. Indicators for this persistent state were the lack of release of elementary bodies, aberrant reticular bodies (TEM) and an increase of the expression of IFN $\gamma$  in the monocyte-derived macrophages. Another reaction of *C. muridarum* to the severe inflammatory reaction of the macrophages was an increased mRNA-expression of Mcl-1. Along with the long life span of the human macrophages of more than 86 days, these observations hint at the inhibition of apoptosis. *C. muridarum* is not adapted well to a human or bovine host. However, it seemed to be more adapted to the human host, because moderate replication was observed in some human donor cells, and the reaction of the pathogen to the immune response of the macrophages revealed some pathways to extend its viability (vide Abbildung 40 and Abbildung 41).

#### Future prospects

The results of this study provide insight into the replication of different chlamydial species in diverse hosts. The adaptation to intracellular life and the host is different from species to species. The assumption that *C. pneumoniae* is adapted well to the distribution in the human

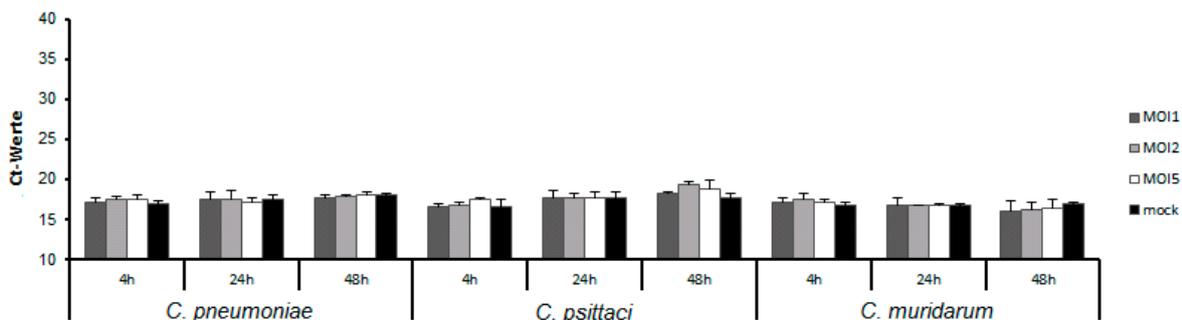
organism must be examined with further studies. For this purpose, the observation time span must be extended for further quantitative analyses. The corresponding immunological processes should also be observed for at least two weeks. In addition, hints of inhibition of apoptosis were found in trials with *C. pneumoniae* and *C. muridarum*. Research with staurosporine and TUNEL should support these observations. Another interesting aspect of this study was that *C. psittaci* was able to proliferate in human macrophages in spite of a high IDO expression. Studies on the topics of the synthesis of tryptophan and its pathways in chlamydiae should clarify this observation. The heat shock protein GroEL was expressed to a very low amount by *C. psittaci*. This was beneficial for the development of *C. psittaci*, because the immune response of the infected cell was triggered less. Deeper examinations into this topic may reveal a mechanism that enables chlamydiae to hide from the immune response without establishing a persistent state. Furthermore, “free” reticulate bodies of *C. psittaci* were found in the cytoplasm of both hosts. Fiegl et al postulated a correlation with the MHC I-presentation pathway in dendritic cells (Fiegl, Kagebein et al. 2013). Continuative studies will clarify if the mechanism in this doctoral thesis were of similar origin. In the trial with *C. muridarum*, hints of an incipient persistent state similar to that of a natural infection were found. Most studies that deal with the persistent state of chlamydiae work with high stimulatory initiation dosages. The infection model of the present study can be used for observations of the development and establishment of the persistent state of chlamydiae under the terms of infection. *C. muridarum* is known to have a very tight host range. The extension of the present study to a host of the family of *Muridae* could be of great interest and would complete the entire infection model. The contested functions of the virulence factor CPAF can also be tested and explored with the present model. The present doctoral thesis offers a detailed insight into the adaptability of *Chlamydiae*. Differences between species and hosts were described and explained. A stable infection model, available for further studies, was established. As illustrated by the comments herein, the results of this study led to further questions and revealed topics for in depth research projects. Hence, the present study serves as a basis for the field of research: Host adaptation of *Chlamydia*.

## 7. ANHANG



### Anhang 1 Ct-Werte der Referenzgene GAPDH/β-Aktin in humanen MDM, während der Stimulation mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum*

Die Ct-Werte von GAPDH/β-Aktin in der Mock-Kontrolle unterschieden sich nicht signifikant von den Ct-Werten der stimulierten humanen Makrophagen. Es lag keine Regulierung vor, wodurch GAPDH/β-Aktin als Referenzgene gut geeignet waren.



### Anhang 2 Ct-Werte des Referenzgens GAPDH in bovinen MDM, während der Stimulation mit *C. pneumoniae*, *C. psittaci* bzw. *C. muridarum*

Die Ct-Werte von GAPDH in der Mock-Kontrolle unterschieden sich nicht signifikant von den Ct-Werten der stimulierten bovinen Makrophagen. Es lag keine Regulierung vor, wodurch GAPDH als Referenzgen gut geeignet war.

#### Rezept CPD-Puffer

Zitronensäure	3,27g
Natriumzitat	26,3g
Natriumdihydrogenphosphat	2,51g
Glucose-D	25,5g

in 1l Aq. dest lösen und steriltrieren

#### Anhang 3 Rezept für CPD-Puffer

Der CPD-Puffer ist eine spezielle Rezeptur für Blutkonservenbeutel in der Humanmedizin. Er ist in den Blutkonservenbeuteln der human Buffy Coats enthalten.

**Anhang 4 Tabellarische Auflistung der Versuchswiederholungen (n) pro Versuch**

Versuch	Verwendete Zellen	Spezies	Zeitpunkte	Konzentration MOI	Anzahl der Versuche
<b>Quantitative Bestimmung der Chlamydien mittels <i>realtime</i> PCR</b>	Humane Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Humane Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Humane Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0	8
				1	8
				2	8
				5	8
	Bovine Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Bovine Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
Bovine Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0	6	
			1	6	
			2	6	
			5	6	
BGM	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0	6	
			1	6	
			2	6	
			5	6	
BGM	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0	6	
			1	6	
			2	6	
			5	6	
BGM	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0	6	
			1	6	
			2	6	
			5	6	
<b>Beschreibung und semiquantitative Bestimmung der Chlamydien mittels Immunfluoreszenzfärbung (IFT)</b>	Humane Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Humane Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Humane Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6

	Bovine Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0 1 2 5	6 6 6 6
	Bovine Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0 1 2 5	6 6 6 6
	Bovine Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0 1 2 5	6 6 6 6
<b>Überprüfung des Entwicklungsstadiums der Chlamydien mittels Transmissionselektronenmikroskopie</b>	Humane Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	24, 48 hpi	0, 1-5x10 <sup>6</sup> EBE/ml	3
	Humane Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	24, 48 hpi	0 5	3
	Humane Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	24, 48 hpi	0 5	3
	Bovine Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	24, 48 hpi	0 1-5x10 <sup>6</sup> EBE/ml	3
	Bovine Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	24, 48 hpi	0 5	3
	Bovine Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	24 48 hpi	0 5	3
<b>Infektiosität der Chlamydien nach Isolierung aus monozytengereiften Makrophagen (IFT)</b>	Humane Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0 5	3
	Humane Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0 5	3
	Humane Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0 5	3
	Bovine Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0 5	3
	Bovine Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0 5	3
	Bovine Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0 5	3
<b>Überlebensfähigkeit monozytengereifter Makrophagen (MDM)</b>	Humane Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi Täglich bis 44 dpi	0 5	3
	Humane Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi Täglich bis 36 dpi	0 5	3
<b>Lichtmikroskopische Untersuchungen</b>	Humane Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi Täglich bis 86 dpi	0 5	3
	Bovine Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi Täglich bis 12 dpi	0 5	3
	Bovine Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0 5	3

ANHANG

	Bovine Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi Taglich bis 5 dpi	0 5	3 6
<b>Das mRNA-Expressionsprofil humaner MDM nach Stimulation mit LPS</b>	Humane Makrophagen	LPS	2, 4, 24 hpi	0	6
				5 µg/ml	6
<b>Das mRNA-Expressionsprofil der humanen und bovinen MDM nach Inokulation mit Chlamydien (RT qPCR)</b>	Humane Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Humane Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Humane Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
Bovine Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0	6	
			1	6	
			2	6	
			5	6	
Bovine Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0	6	
			1	6	
			2	6	
			5	6	
Bovine Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0	6	
			1	6	
			2	6	
			5	6	
<b>Nitritfreisetzung durch humane und bovine MDM nach Stimulation mit Chlamydien (Photometrisch)</b>	Humane Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Humane Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Humane Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0	8
				1	8
				2	8
				5	8
Bovine Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0	6	
			1	6	
			2	6	
			5	6	
Bovine Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0	6	
			1	6	
			2	6	
			5	6	
Bovine Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0	6	
			1	6	

				2	6
				5	6
<b>Abgabe von freien Sauerstoffradikalen durch humane Makrophagen nach Stimulation mit Chlamydien (Photometrisch)</b>	Humane Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Humane Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Humane Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
<b>Expression der Oberflächenmarker humaner monozyten-gereifter Makrophagen (MDM) nach Stimulation mit IFN<math>\gamma</math> und/oder LPS. 24 hpi (FACS)</b>	Humane Makrophagen	IFN $\gamma$	24 hpi	0	2
				50 U	
	Humane Makrophagen	LPS	24 hpi	0	2
				10 $\mu$ g/ml	
Humane Makrophagen	IFN $\gamma$ + LPS	24 hpi	0	2	
			50 U + 10 $\mu$ g/ml		
Humane Makrophagen	IFN $\gamma$ + LPS	24 hpi	50 U + 100 $\mu$ g/ml	2	
<b>Einfluss verschiedener Chlamydien-Stämme auf die Expression der Oberflächenmarker von humanen Makrophagen (FACS)</b>	Humane Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 48, 72 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Humane Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 48, 72 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Humane Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 48, 72 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
<b>Die Expression chlamydialer Virulenzfaktoren durch <i>C. pneumoniae</i>, <i>C. psittaci</i>, bzw. <i>C. muridarum</i> in humanen und bovinen monozyten-gereiften Makrophagen (RT qPCR)</b>	Humane Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Humane Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
	Humane Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
				1	6
				2	6
				5	6
Bovine Makrophagen	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0	6	
			1	6	
			2	6	
			5	6	

ANHANG

Bovine Makrophagen	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
			1	6
			2	6
			5	6
Bovine Makrophagen	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
			1	6
			2	6
			5	6
BGM	<i>C. pneumoniae</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
			1	6
			2	6
			5	6
BGM	<i>C. psittaci</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
			1	6
			2	6
			5	6
BGM	<i>C. muridarum</i>	4, 24, 48 hpi	0	6
			1	6
			2	6
			5	6

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übermittelte Ornithosen nach Meldejahr, Deutschland, 2001 bis 2015.....	10
Abbildung 2 Schematische Darstellung eines Monocyten und eines Makrophagen ....	13
Abbildung 3 Übersicht über die Stellung der Makrophagen im Immunsystem und ihre Hauptaufgaben .....	15
Abbildung 4 Naive Makrophage mit typischen Rezeptoren .....	18
Abbildung 5 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus .....	36
Abbildung 6 Lichtmikroskopische Aufnahme von monozyten-gereiften Makrophagen 8 Tage nach der Isolation .....	40
Abbildung 7 HemaDiff-Schnellfärbung von monozyten-gereiften Makrophagen mit definiertem Raster.....	45
Abbildung 8 Schematische Darstellung des Versuchsverlaufes zum Thema Wachstum und Überleben der Chlamydien in humanen und bovinen Makrophagen .....	58
Abbildung 9 Replikationsdynamiken von <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C.</i> <i>muridarum</i> in humanen und bovinen MDM .....	60
Abbildung 10 Einschlussbildende Einheiten pro Zelle (ifu/cell) von <i>C. pneumoniae</i> , <i>C.</i> <i>psittaci</i> und <i>C. muridarum</i> in humanen bzw. bovinen monozyten-gereiften Makrophagen (MDM).....	61
Abbildung 11 Vergleich der einschlussbildenden Einheiten pro Zelle (ifu/cell) von <i>C.</i> <i>pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> in humanen und bovinen monozyten- gereiften Makrophagen (MDM).....	61
Abbildung 12 Vergleich des Wachstums von <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> und <i>C.</i> <i>muridarum</i> in BGM mit ihrem Wachstum in humanen bzw. bovinen MDM .....	62
Abbildung 13 Semi-quantitative Analyse von humanen und bovinen monozyten- gereiften Makrophagen (MDM), die mit <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C.</i> <i>muridarum</i> inokuliert wurden .....	63
Abbildung 14 Nachweis von <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> in humanen und bovinen MDM mittels Immunfluoreszenzmikroskopie .....	64
Abbildung 15 Nachweis von <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> in humanen und bovinen MDM mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie.....	67
Abbildung 16 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C.</i> <i>muridarum</i> in humanen und bovinen Makrophagen .....	69
Abbildung 17 Überlebensfähigkeit von <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> in humanen und bovinen MDM .....	70
Abbildung 18 Nachweis von <i>C. psittaci</i> , <i>C. muridarum</i> bzw. <i>C. pneumoniae</i> in BGM, nachdem sie aus humanen und bovinen MDM isoliert wurden. Immunfluoreszenz .....	70
Abbildung 19 Schematische Darstellung des Versuchsverlaufes zum Thema Wirtszellantwort auf die Stimulation mit Chlamydien .....	71
Abbildung 20 Lebensfähigkeit humaner MDM, die mit <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> inokuliert wurden. Lichtmikroskopie.....	73
Abbildung 21 Humane MDM, die mit <i>C. pneumoniae</i> inokuliert wurden.....	74
Abbildung 22 Humane MDM, die mit <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> inokuliert wurden .....	74

Abbildung 23 Lebensfähigkeit boviner MDM, die mit <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> inokuliert wurden. Lichtmikroskopie .....	76
Abbildung 24 Bovine monozyten-gereifte Makrophagen, 9 dpi. Lichtmikroskopie .....	77
Abbildung 25 Bovine MDM, die mit <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> inokuliert wurden. Lichtmikroskopie .....	77
Abbildung 26 Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase (LDH) durch bovine MDM, die mit <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> inokuliert wurden.....	78
Abbildung 27 Das mRNA-Expressionsprofil humaner und boviner MDM nach Stimulation mit LPS .....	79
Abbildung 28 Vergleich der mRNA-Expressionsprofile in humanen MDM nach Stimulation mit <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> und <i>C. muridarum</i> .....	81
Abbildung 29 Höhe und Dynamik der mRNA-Expression ausgewählter Zytokine und Enzyme humaner MDM nach Stimulation mit <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> .....	83
Abbildung 30 Vergleich der mRNA-Expressionssteigerung ausgewählter Zytokine und Enzyme in bovinen MDM durch Stimulation mit <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> und <i>C. muridarum</i> .....	84
Abbildung 31 Höhe und Dynamik der mRNA-Expression ausgewählter Zytokine und Enzyme boviner MDM nach Stimulation mit <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> .....	85
Abbildung 32 Vergleich der mRNA-Expressionsprofile humaner und boviner MDM nach Stimulation mit Chlamydien .....	87
Abbildung 33 Freisetzung von Nitrit (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) durch humane und bovine MDM nach Stimulation mit <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> .....	89
Abbildung 34 Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Superoxid (SOX) durch humane MDM, die mit <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> stimuliert wurden .....	90
Abbildung 35 Expression der Oberflächenmarker von humanen monozyten-gereiften Makrophagen (MDM) vor der Stimulation mit Chlamydien .....	91
Abbildung 36 Expression der Oberflächenmarker humaner monozyten-gereifter Makrophagen (MDM) nach Stimulation mit IFN $\gamma$ und/oder LPS. 24 hpi.....	92
Abbildung 37 Expression von Oberflächenantigenen auf humanen monozyten-gereiften Makrophagen (MDM) nach Stimulation.....	94
Abbildung 38 mRNA-Expression chlamydialer Virulenzfaktoren in humanen und bovinen MDM.....	96
Abbildung 39 Die mRNA-Expression der Virulenzfaktoren von <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> und <i>C. muridarum</i> in BGM .....	97
Abbildung 40 Hypothetisches Modell der intrazellulären Vermehrung und Wirtsanpassung von <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> in humanen monozyten-gereiften Makrophagen .....	121
Abbildung 41 Hypothetisches Modell der intrazellulären Vermehrung und Wirtsanpassung von <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> bzw. <i>C. muridarum</i> in bovinen monozyten-gereiften Makrophagen .....	122

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Typische Oberflächenmarker von M1- und M2-Makrophagen.....	20
Tabelle 2 Typische Zytokine, Chemokine, Enzyme und Radikale, die nach Stimulation von M1- und M2-Makrophagen sezerniert werden.....	21
Tabelle 3 Genomgrößen der verwendeten Chlamydienspezies und –stämmen .....	23
Tabelle 4 Vergleich einiger Virulenzgene von <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> und <i>C. muridarum</i> .....	25
Tabelle 5 Testreihen zur Etablierung einer Methode zur erfolgreichen Isolierung und Kultivierung monozyten-gereifter Makrophagen aus humanem Buffy Coat.....	38
Tabelle 6 Temperaturprofile für die quantitative <i>real-time</i> PCR zum Nachweis der Chlamydiaceae 23S rRNA .....	50
Tabelle 7 Temperaturprofil für eine one-step RT-PCR unter Verwendung des QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit.....	51
Tabelle 8 Übersicht der verwendeten chlamydialen Primer für die quantitative real-time RT-PCR Es werden die forward (F)- und reverse (R)-Primer der jeweiligen Gene angegeben. TA: Annealingtemperatur; TS: Schmelztemperatur der Amplifikate; bp: Basenpaare; Rf: Referenz; nb: nicht bestimmt .....	52
Tabelle 9 Übersicht der verwendeten bovinen Primer für die quantitative real-time RT-PCR.....	53
Tabelle 10 Liste der in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper. ....	55
Tabelle 11 Typische Oberflächenmarker des M1-Phänotyps im Vergleich mit Oberflächenmarkern, die nach Stimulation von humanen MDM mit <i>C. psittaci</i> untersucht wurden.....	111
Tabelle 12 Typische Oberflächenmarker des M1-Phänotyps im Vergleich mit Oberflächenmarkern, die nach Stimulation von humanen MDM mit <i>C. muridarum</i> bzw. <i>C. psittaci</i> untersucht wurden.....	115

## Videoverzeichnis

Video 1	<b><i>C. pneumoniae</i> in humanen MDM, 29 dpi.</b> <a href="https://www.dropbox.com/s/makg2y0iab91034/Bc%2014-21%2029%20dpi%20MOI5%20Lz%20DC40%2040x.mp4?dl=0">https://www.dropbox.com/s/makg2y0iab91034/Bc%2014-21%2029%20dpi%20MOI5%20Lz%20DC40%2040x.mp4?dl=0</a>
Video 2	<b><i>C. pneumoniae</i> in bovinen MDM, 24 hpi.</b> <a href="https://www.dropbox.com//dtTnySBFrq6qkLjnThjc4o">https://www.dropbox.com//dtTnySBFrq6qkLjnThjc4o</a>
Video 3	<b><i>C. psittaci</i> in bovinen MDM 24hpi</b> <a href="https://www.dropbox.com//Hyc4TFY7DPhKgjYNgnGc7q">https://www.dropbox.com//Hyc4TFY7DPhKgjYNgnGc7q</a>
Video 4	<b><i>C. muridarum</i> in bovinen Zellen 24 hpi</b> <a href="https://www.dropbox.com//4sme6EhB37UFv8dFWMawDo">https://www.dropbox.com//4sme6EhB37UFv8dFWMawDo</a>
Video 5	<b>Programmierter Zelltod, Apoptose</b> <a href="http://www.dnatube.com/video/2379/Apoptosis-programmed-cell-deathPCD">http://www.dnatube.com/video/2379/Apoptosis-programmed-cell-deathPCD</a>

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

Adler, H.; Adler, B.; Peveri, P.; Werner, E. R.; Wachter, H.; Peterhans, E.; Jungi, T. W. (1996):

Differential regulation of inducible nitric oxide synthase production in bovine and caprine macrophages.

Journal of Infectious Diseases. 173(4), 971-978.

URL:<Go to ISI>://WOS:A1996UB27400026

<http://jid.oxfordjournals.org/content/173/4/971.full.pdf>.

Adler, H.; Peterhans, E.; Jungi, T. W. (1994):

Generation and functional characterization of bovine bone marrow-derived macrophages.

Vet Immunol Immunopathol. 41(3-4), 211-27.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7941305>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165242794900981>.

Airenne, S.; Surcel, H. M.; Alakarppa, H.; Laitinen, K.; Paavonen, J.; Saikku, P.; Laurila, A. (1999):

Chlamydia pneumoniae infection in human monocytes.

Infect Immun. 67(3), 1445-9.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10024593>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96479/pdf/ii001445.pdf>.

Akiyama, Y.; Griffith, R.; Miller, P.; Stevenson, G. W.; Lund, S.; Kanapa, D. J.; Stevenson, H. C. (1988):

Effects of adherence, activation and distinct serum proteins on the in vitro human monocyte maturation process.

J Leukoc Biol. 43(3), 224-31.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2830357>.

Ambarus, C. A.; Krausz, S.; van Eijk, M.; Hamann, J.; Radstake, T. R.; Reedquist, K. A.; Tak, P. P.; Baeten, D. L. (2012):

Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages.

J Immunol Methods. 375(1-2), 196-206.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22075274>

[http://ac.els-cdn.com/S0022175911002948/1-s2.0-S0022175911002948-main.pdf?\\_tid=90433e8c-c561-11e3-9d9b-00000aab0f26&acdnat=1397651037\\_8c7ea05579a1f3d8157093232e1a4604](http://ac.els-cdn.com/S0022175911002948/1-s2.0-S0022175911002948-main.pdf?_tid=90433e8c-c561-11e3-9d9b-00000aab0f26&acdnat=1397651037_8c7ea05579a1f3d8157093232e1a4604).

Auger, M. J. R., J.A. (1992):

The Macrophage: The natural immune system Oxford University Press, 3-73.

Bauer, G.; Dormann, S.; Engelmann, I.; Schulz, A.; Saran, M. (2000):

Reactive oxygen species and apoptosis In: Apoptosis and Its Modulation by Drugs.

Handbook of Experimental Pharmacology, Springer Verlag. 142, 275-318.

URL:[http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-57075-9\\_11](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-57075-9_11).

Bavoil, P.; Stephens, R. S.; Falkow, S. (1990):  
A soluble 60 kiloDalton antigen of Chlamydia spp. is a homologue of Escherichia coli GroEL.  
Mol Microbiol. 4(3), 461-9.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1972536>  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00612.x/abstract>.

Beagley, K. W.; Huston, W. M.; Hansbro, P. M.; Timms, P. (2009):  
Chlamydial infection of immune cells: altered function and implications for disease.  
Crit Rev Immunol. 29(4), 275-305.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19673684>  
<http://www.dl.begellhouse.com/journals/2ff21abf44b19838.0104643e0471e3e3.4dc95adc2ba5aeef.html>.

Beatty, W. L.; Byrne, G. I.; Morrison, R. P. (1993):  
Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent  
Chlamydia trachomatis infection in vitro.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 90(9), 3998-4002.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8387206>.

Beatty, W. L.; Morrison, R. P.; Byrne, G. I. (1994):  
Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis.  
Microbiol Rev. 58(4), 686-99.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7854252>  
<http://mibr.asm.org/content/58/4/686.full.pdf>.

Beeckman, D. S.; Vanrompay, D. C. (2009):  
Zoonotic Chlamydophila psittaci infections from a clinical perspective.  
Clin Microbiol Infect. 15(1), 11-7.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220335>  
[http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)60592-9/pdf](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)60592-9/pdf).

Belland, R. J.; Scidmore, M. A.; Crane, D. D.; Hogan, D. M.; Whitmire, W.; McClarty, G.;  
Caldwell, H. D. (2001):  
Chlamydia trachomatis cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 98(24), 13984-9.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11707582>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC61153/pdf/pq2401013984.pdf>.

Berger, L.; Volp, K.; Mathews, S.; Speare, R.; Timms, P. (1999):  
Chlamydia pneumoniae in a free-ranging giant barred frog (Mixophyes iteratus) from  
Australia.

J Clin Microbiol. 37(7), 2378-80.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364623>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC85174/pdf/jm002378.pdf>.

Binder, R. J.; Vatner, R.; Srivastava, P. (2004):

The heat-shock protein receptors: some answers and more questions.  
Tissue Antigens. 64(4), 442-51.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361121>

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-0039.2004.00299.x/abstract>.

Bode, J.; Dutow, P.; Sommer, K.; Janik, K.; Glage, S.; Tummler, B.; Munder, A.; Laudeley, R.; Sachse, K. W.; Klos, A. (2012):

A new role of the complement system: C3 provides protection in a mouse model of lung infection with intracellular *Chlamydia psittaci*.

PLoS One. 7(11), e50327.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23189195>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3506576/pdf/pone.0050327.pdf>.

Boyum, A. (1968):

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.

Scand J Clin Lab Invest Suppl. 97, 77-89.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4179068>.

Brade, L.; Schramek, S.; Schade, U.; Brade, H. (1986):

Chemical, biological, and immunochemical properties of the *Chlamydia psittaci* lipopolysaccharide.

Infect Immun. 54(2), 568-74.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3770953>

<http://iai.asm.org/content/54/2/568.full.pdf>.

Braukmann, M.; Sachse, K.; Jacobsen, I. D.; Westermann, M.; Menge, C.; Saluz, H. P.; Berndt, A. (2012):

Distinct intensity of host-pathogen interactions in *Chlamydia psittaci*- and *Chlamydia abortus*-infected chicken embryos.

Infect Immun. 80(9), 2976-88.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22689815>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3418749/pdf/zii2976.pdf>.

Brunham, R. C.; Rey-Ladino, J. (2005):

Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine.  
Nat Rev Immunol. 5(2), 149-61.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15688042>.

Buck, M.; Gallegos, M. T.; Studholme, D. J.; Guo, Y.; Gralla, J. D. (2000):

The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor.  
J Bacteriol. 182(15), 4129-36.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10894718>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC101881/pdf/jb004129.pdf>.

- Bulut, Y.; Shimada, K.; Wong, M. H.; Chen, S.; Gray, P.; Alsabeh, R.; Doherty, T. M.; Crother, T. R.; Arditi, M. (2009):  
Chlamydial heat shock protein 60 induces acute pulmonary inflammation in mice via the Toll-like receptor 4- and MyD88-dependent pathway.  
Infect Immun. 77(7), 2683-90.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19398543>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2708574/pdf/0248-09.pdf>.
- Caldwell, H. D.; Wood, H.; Crane, D.; Bailey, R.; Jones, R. B.; Mabey, D.; Maclean, I.; Mohammed, Z.; Peeling, R.; Roshick, C.; Schachter, J.; Solomon, A. W.; Stamm, W. E.; Suchland, R. J.; Taylor, L.; West, S. K.; Quinn, T. C.; Belland, R. J.; McClarty, G. (2003):  
Polymorphisms in Chlamydia trachomatis tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates.  
J Clin Invest. 111(11), 1757-69.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12782678>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC156111/pdf/JCI0317993.pdf>.
- Carlin, J. M.; Borden, E. C.; Sondel, P. M.; Byrne, G. I. (1989):  
Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes.  
J Leukoc Biol. 45(1), 29-34.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2463322>  
<http://www.jleukbio.org/content/45/1/29.full.pdf>.
- Carter, J. D.; Hudson, A. P. (2010):  
The evolving story of Chlamydia-induced reactive arthritis.  
Curr Opin Rheumatol. 22(4), 424-30.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20445454>.
- Chacko, A.; Beagley, K. W.; Timms, P.; Huston, W. M. (2015):  
Human Chlamydia pneumoniae isolates demonstrate ability to recover infectivity following penicillin treatment whereas animal isolates do not.  
FEMS Microbiol Lett. 362(6).  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25663156>  
<http://femsle.oxfordjournals.org/content/femsle/362/6/fnv015.full.pdf>.
- Chandel, H. S.; Pandey, S. P.; Shukla, D.; Lalsare, K.; Selvaraj, S. K.; Jha, M. K.; Saha, B. (2014):  
Toll-like receptors and CD40 modulate each other's expression affecting Leishmania major infection.  
Clin Exp Immunol. 176(2), 283-90.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24387292>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3992041/pdf/cei0176-0283.pdf>.
- Chen, A. L.; Johnson, K. A.; Lee, J. K.; Sutterlin, C.; Tan, M. (2012):  
CPAF: a Chlamydial protease in search of an authentic substrate.  
PLoS Pathog. 8(8), e1002842.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22876181>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3410858/pdf/ppat.1002842.pdf>.

Chen, A. L.; Wilson, A. C.; Tan, M. (2011):

A Chlamydia-specific C-terminal region of the stress response regulator HrcA modulates its repressor activity.

J Bacteriol. 193(23), 6733-41.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21965565>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3232872/pdf/zjb6733.pdf>.

Chen, W.; Liang, X. Q.; Peterson, A. J.; Munn, D. H.; Blazar, B. R. (2008):

The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation.

Journal of Immunology. 181(8), 5396-5404.

URL:<Go to ISI>://WOS:000260025300031

<http://www.jimmunol.org/content/181/8/5396.full.pdf>.

Chin, E.; Kirker, K.; Zuck, M.; James, G.; Hybiske, K. (2012):

Actin Recruitment to the Chlamydia Inclusion Is Spatiotemporally Regulated by a Mechanism That Requires Host and Bacterial Factors.

Plos One. 7(10).

URL:<Go to ISI>://WOS:000309807700044

<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0046949&representation=PDF>.

Coassin, N. A.; Kline, D. L. (1957):

Radiophosphorus measurement of the lifespan of lymphocytes in the rabbit.

Am J Physiol. 190(1), 147-51.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13458428>.

Coers, J.; Starnbach, M. N.; Howard, J. C. (2009):

Modeling infectious disease in mice: co-adaptation and the role of host-specific IFN $\gamma$  responses.

PLoS Pathog. 5(5), e1000333.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478881>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2682201/pdf/ppat.1000333.pdf>.

Coleman, M. L.; Sahai, E. A.; Yeo, M.; Bosch, M.; Dewar, A.; Olson, M. F. (2001):

Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I.

Nat Cell Biol. 3(4), 339-45.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283606>.

Corsaro, D.; Feroldi, V.; Saucedo, G.; Ribas, F.; Loret, J. F.; Greub, G. (2009):

Novel Chlamydiales strains isolated from a water treatment plant.

Environ Microbiol. 11(1), 188-200.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18793313>

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2008.01752.x/abstract>.

- Corsaro, D.; Venditti, D. (2009):  
Detection of Chlamydiae from freshwater environments by PCR, amoeba coculture and mixed coculture.  
Res Microbiol. 160(8), 547-52.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706325>  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250809001284>.
- Delevoeye, C.; Nilges, M.; Dautry-Varsat, A.; Subtil, A. (2004):  
Conservation of the biochemical properties of IncA from Chlamydia trachomatis and Chlamydia caviae: oligomerization of IncA mediates interaction between facing membranes.  
J Biol Chem. 279(45), 46896-906.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15316015>  
<http://www.jbc.org/content/279/45/46896.full.pdf>.
- Deniset, J. F.; Cheung, P. K.; Dibrov, E.; Lee, K.; Steigerwald, S.; Pierce, G. N. (2010):  
Chlamydophila pneumoniae infection leads to smooth muscle cell proliferation and thickening in the coronary artery without contributions from a host immune response.  
Am J Pathol. 176(2), 1028-37.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20019196>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2808105/pdf/JPATH176001028.pdf>.
- Dong, F.; Zhong, Y.; Arulanandam, B.; Zhong, G. (2005):  
Production of a proteolytically active protein, chlamydial protease/proteasome-like activity factor, by five different Chlamydia species.  
Infect Immun. 73(3), 1868-72.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731091>  
<http://iai.asm.org/content/73/3/1868.full.pdf>.
- Douglas, A. L.; Hatch, T. P. (2000):  
Expression of the transcripts of the sigma factors and putative sigma factor regulators of Chlamydia trachomatis L2.  
Gene. 247(1-2), 209-14.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773461>  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111900000949>.
- Draghi, A., 2nd; Popov, V. L.; Kahl, M. M.; Stanton, J. B.; Brown, C. C.; Tsongalis, G. J.; West, A. B.; Frasca, S., Jr. (2004):  
Characterization of "Candidatus piscichlamydia salmonis" (order Chlamydiales), a chlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (Salmo salar).  
J Clin Microbiol. 42(11), 5286-97.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15528727>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC525185/pdf/0470-04.pdf>.
- Dreses-Werringloer, U.; Bhuiyan, M.; Zhao, Y.; Gerard, H. C.; Whittum-Hudson, J. A.; Hudson, A. P. (2009):  
Initial characterization of Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae cultured from the late-onset Alzheimer brain.

Int J Med Microbiol. 299(3), 187-201.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18829386>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2730674/pdf/nihms107042.pdf>.

Dumoux, M.; Nans, A.; Saibil, H. R.; Hayward, R. D. (2014):

Making connections: snapshots of chlamydial type III secretion systems in contact with host membranes.

Curr Opin Microbiol. 23C, 1-7.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25461566>

[http://ac.els-cdn.com/S1369527414001398/1-s2.0-S1369527414001398-](http://ac.els-cdn.com/S1369527414001398/1-s2.0-S1369527414001398-main.pdf?_tid=93029190-a08a-11e4-a4f6-00000aacb35d&acdnat=1421747956_acb78b86fc511f1484632e23ba81ccb8)

[main.pdf?\\_tid=93029190-a08a-11e4-a4f6-](http://ac.els-cdn.com/S1369527414001398/1-s2.0-S1369527414001398-main.pdf?_tid=93029190-a08a-11e4-a4f6-00000aacb35d&acdnat=1421747956_acb78b86fc511f1484632e23ba81ccb8)

[00000aacb35d&acdnat=1421747956\\_acb78b86fc511f1484632e23ba81ccb8](http://ac.els-cdn.com/S1369527414001398/1-s2.0-S1369527414001398-main.pdf?_tid=93029190-a08a-11e4-a4f6-00000aacb35d&acdnat=1421747956_acb78b86fc511f1484632e23ba81ccb8)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527414001398>.

Ehricht, R.; Slickers, P.; Goellner, S.; Hotzel, H.; Sachse, K. (2006):

Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies.

Mol Cell Probes. 20(1), 60-3.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16330186>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890850805000757>.

Elwell, C.; Mirrashidi, K.; Engel, J. (2016):

Chlamydia cell biology and pathogenesis.

Nat Rev Microbiol. 14(6), 385-400.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27108705>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4886739/pdf/nihms-788401.pdf>.

Everett, K. D. E.; Bush, R. M.; Andersen, A. A. (1999):

Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms.

International Journal of Systematic Bacteriology. 49, 415-440.

URL:<Go to ISI>://WOS:000080024500010

<http://ijs.sgmjournals.org/content/49/2/415.full.pdf>.

Fehlings, M.; Drobbe, L.; Moos, V.; Renner Viveros, P.; Hagen, J.; Beigier-Bompadre, M.; Pang, E.; Belogolova, E.; Churin, Y.; Schneider, T.; Meyer, T. F.; Aebischer, T.; Ignatius, R. (2012):

Comparative analysis of the interaction of Helicobacter pylori with human dendritic cells, macrophages, and monocytes.

Infect Immun. 80(8), 2724-34.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22615251>

<http://iai.asm.org/content/80/8/2724.full.pdf>.

Fiegl, D.; Kagebein, D.; Liebler-Tenorio, E. M.; Weisser, T.; Sens, M.; Gutjahr, M.; Knittler, M. R. (2013):

Amphisomal route of MHC class I cross-presentation in bacteria-infected dendritic cells.

J Immunol. 190(6), 2791-806.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23418629>

<http://www.jimmunol.org/content/190/6/2791.full.pdf>.

Fischer, S. F.; Vier, J.; Kirschnek, S.; Klos, A.; Hess, S.; Ying, S.; Hacker, G. (2004):

Chlamydia inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3-only proteins.

J Exp Med. 200(7), 905-16.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15452181>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2213288/pdf/20040402.pdf>.

Fox, J. G.; Stills, H. F.; Paster, B. J.; Dewhirst, F. E.; Yan, L.; Palley, L.; Prostak, K. (1993):

Antigenic specificity and morphologic characteristics of Chlamydia trachomatis, strain SFPD, isolated from hamsters with proliferative ileitis.

Lab Anim Sci. 43(5), 405-10.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7506316>.

Frucht, D. M.; Fukao, T.; Bogdan, C.; Schindler, H.; O'Shea, J. J.; Koyasu, S. (2001):

IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge.

Trends Immunol. 22(10), 556-60.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11574279>

[http://www.cell.com/trends/immunology/abstract/S1471-4906\(01\)02005-](http://www.cell.com/trends/immunology/abstract/S1471-4906(01)02005-1?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS14714906)

[1?\\_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471490601020051%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/trends/immunology/abstract/S1471-4906(01)02005-1?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471490601020051%3Fshowall%3Dtrue).

Gauliard, E.; Ouellette, S. P.; Rueden, K. J.; Ladant, D. (2015):

Characterization of interactions between inclusion membrane proteins from Chlamydia trachomatis.

Front Cell Infect Microbiol. 5, 13.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25717440>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4324299/pdf/fcimb-05-00013.pdf>.

Gaydos, C. A.; Summersgill, J. T.; Sahney, N. N.; Ramirez, J. A.; Quinn, T. C. (1996):

Replication of Chlamydia pneumoniae in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells.

Infect Immun. 64(5), 1614-20.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8613369>

<http://iai.asm.org/content/64/5/1614.full.pdf>.

Gee, K.; Lim, W.; Ma, W.; Nandan, D.; Diaz-Mitoma, F.; Kozlowski, M.; Kumar, A. (2002):

Differential regulation of CD44 expression by lipopolysaccharide (LPS) and TNF-alpha in human monocytic cells: distinct involvement of c-Jun N-terminal kinase in LPS-induced CD44 expression.

J Immunol. 169(10), 5660-72.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12421945>

<http://www.jimmunol.org/content/169/10/5660.full.pdf>.

- Gerard, H. C.; Kohler, L.; Branigan, P. J.; Zeidler, H.; Schumacher, H. R.; Hudson, A. P. (1998):  
Viability and gene expression in *Chlamydia trachomatis* during persistent infection of cultured human monocytes.  
Med Microbiol Immunol. 187(2), 115-20.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9832326>.
- Gleissner, C. A.; Shaked, I.; Erbel, C.; Bockler, D.; Katus, H. A.; Ley, K. (2010):  
CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophages.  
Circ Res. 106(1), 203-11.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910578>  
<http://circres.ahajournals.org/content/106/1/203.full.pdf>.
- Goellner, S.; Schubert, E.; Liebler-Tenorio, E.; Hotzel, H.; Saluz, H. P.; Sachse, K. (2006):  
Transcriptional response patterns of *Chlamydia psittaci* in different in vitro models of persistent infection.  
Infect Immun. 74(8), 4801-8.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16861668>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1539575/pdf/1487-05.pdf>.
- Goerdts, S.; Politz, O.; Schledzewski, K.; Birk, R.; Gratchev, A.; Guillot, P.; Hakiy, N.; Klemke, C. D.; Dippel, E.; Kodelja, V.; Orfanos, C. E. (1999):  
Alternative versus classical activation of macrophages.  
Pathobiology. 67(5-6), 222-6.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725788>.
- Gordon, F. B.; Freeman, G.; Clampitt, J. M. (1938):  
A pneumonia-producing filtrable agent from stock mice.  
Proc Soc Exp Biol and Med. 39((3)), 450-453.  
URL:<Go to ISI>://BIOSIS:PREV19391300002616.
- Gracey, E.; Lin, A.; Akram, A.; Chiu, B.; Inman, R. D. (2013):  
Intracellular survival and persistence of *Chlamydia muridarum* is determined by macrophage polarization.  
PLoS One. 8(8), e69421.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23967058>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3743904/pdf/pone.0069421.pdf>.
- Grayston, J. T. (1994):  
*Chlamydia pneumoniae* (TWAR) infections in children.  
Pediatr Infect Dis J. 13(8), 675-84; quiz 685.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7970966>.
- Grayston, J. T. (2000):  
Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis.  
J Infect Dis. 181 Suppl 3, S402-10.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10839724>  
[http://jid.oxfordjournals.org/content/181/Supplement\\_3/S402.full.pdf](http://jid.oxfordjournals.org/content/181/Supplement_3/S402.full.pdf).

Grayston, J. T.; Kuo, C. C.; Campbell, L. A.; Wang, S. P. (1989):  
Chlamydia-Pneumoniae Sp-Nov for Chlamydia Sp Strain Twar.  
International Journal of Systematic Bacteriology. 39(1), 88-90.  
URL:<Go to ISI>://WOS:A1989R740400014.

Greiner, B.-O. G. (2013):  
Advanced TC™.  
URL:<http://www.gbo.com/bioscience>.

Griffiths, E.; Ventresca, M. S.; Gupta, R. S. (2006):  
BLAST screening of chlamydial genomes to identify signature proteins that are unique for the  
Chlamydiales, Chlamydiaceae, Chlamydophila and Chlamydia groups of species.  
BMC Genomics. 7, 14.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436211>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1403754/pdf/1471-2164-7-14.pdf>.

Gundra, U. M.; Girgis, N. M.; Ruckerl, D.; Jenkins, S.; Ward, L. N.; Kurtz, Z. D.; Wiens, K. E.;  
Tang, M. S.; Basu-Roy, U.; Mansukhani, A.; Allen, J. E.; Loke, P. (2014):  
Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are  
phenotypically and functionally distinct.  
Blood. 123(20), E110-E122.  
URL:<Go to ISI>://WOS:000335899400001  
<http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/123/20/e110.full.pdf>.

Hart, S. P.; Dougherty, G. J.; Haslett, C.; Dransfield, I. (1997):  
CD44 regulates phagocytosis of apoptotic neutrophil granulocytes, but not apoptotic  
lymphocytes, by human macrophages.  
J Immunol. 159(2), 919-25.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9218612>.

Heinemann, M.; Susa, M.; Simnacher, U.; Marre, R.; Essig, A. (1996):  
Growth of Chlamydia pneumoniae induces cytokine production and expression of CD14 in a  
human monocytic cell line.  
Infect Immun. 64(11), 4872-5.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8890256>  
<http://iai.asm.org/content/64/11/4872.full.pdf>.

Heuer, D.; Rejman Lipinski, A.; Machuy, N.; Karlas, A.; Wehrens, A.; Siedler, F.; Brinkmann,  
V.; Meyer, T. F. (2009):  
Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction.  
Nature. 457(7230), 731-5.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19060882>.

Hoffmann, B.; Depner, K.; Schirrmeier, H.; Beer, M. (2006):  
A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses.

J Virol Methods. 136(1-2), 200-9.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806503>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093406001777>.

Hotzel, H.; Grossmann, E.; Mutschmann, F.; Sachse, K. (2001):

Genetic characterization of a Chlamydomonas pneumoniae isolate from an African frog and comparison to currently accepted biovars.

Syst Appl Microbiol. 24(1), 63-6.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11403400>.

Hristodorov, D.; Mladenov, R.; Huhn, M.; Barth, S.; Thepen, T. (2012):

Macrophage-targeted therapy: CD64-based immunotoxins for treatment of chronic inflammatory diseases.

Toxins (Basel). 4(9), 676-94.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23105975>

<http://www.mdpi.com/2072-6651/4/9/676/pdf>.

Hybiske, K.; Stephens, R. S. (2007):

Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia.

Proc Natl Acad Sci U S A. 104(27), 11430-5.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17592133>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2040915/pdf/zpq11430.pdf>.

Ishizuka, E. K.; Ferreira, M. J.; Grund, L. Z.; Coutinho, E. M.; Komegae, E. N.; Cassado, A. A.; Bortoluci, K. R.; Lopes-Ferreira, M.; Lima, C. (2012):

Role of interplay between IL-4 and IFN-gamma in the in regulating M1 macrophage polarization induced by Nattectin.

Int Immunopharmacol. 14(4), 513-22.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940186>

[http://ac.els-cdn.com/S1567576912002512/1-s2.0-S1567576912002512-main.pdf?\\_tid=a41e1b5a-3470-11e5-8fc5-00000aab0f27&acdnat=1438009589\\_28e350872fbc89174d4a9e1399722ef2](http://ac.els-cdn.com/S1567576912002512/1-s2.0-S1567576912002512-main.pdf?_tid=a41e1b5a-3470-11e5-8fc5-00000aab0f27&acdnat=1438009589_28e350872fbc89174d4a9e1399722ef2).

Iyer, S. S.; Cheng, G. (2012):

Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease.

Crit Rev Immunol. 32(1), 23-63.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22428854>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3410706/pdf/nihms377104.pdf>.

Jackson, M.; White, N.; Giffard, P.; Timms, P. (1999):

Epizootiology of Chlamydia infections in two free-range koala populations.

Vet Microbiol. 65(4), 255-64.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10223324>

[http://ac.els-cdn.com/S0378113598003022/1-s2.0-S0378113598003022-main.pdf?\\_tid=c75b417a-a5f9-11e4-b4c1-0000aacb362&acdnat=1422345473\\_dfab4fa54d781d12f1dcb288f4103943](http://ac.els-cdn.com/S0378113598003022/1-s2.0-S0378113598003022-main.pdf?_tid=c75b417a-a5f9-11e4-b4c1-0000aacb362&acdnat=1422345473_dfab4fa54d781d12f1dcb288f4103943).

Jaguin, M.; Houlbert, N.; Fardel, O.; Lecureur, V. (2013):  
Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin.  
Cell Immunol. 281(1), 51-61.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23454681>  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008874913000233>.

James G. Fox, S. B., Muriel Davisson, Christian E. Newcomer, Fred W. Quimby, Abigail Smith (2006):  
The Mouse in Biomedical Research: Diseases American College of Laboratory Animal Medicine. second edition, p. 326-346.  
URL:<https://books.google.de/books?id=Gi6rlvx7Ni4C&printsec=frontcover&dq=bibliogroup:%22American+College+of+Laboratory+Animal+Medicine%22&hl=de&sa=X&ei=wanQVK-ICsb4UL-EgJAN&ved=0CCkQ6AEwAQ#v=onepage&q&f=false>.

Janagama, H. K.; Jeong, K.; Kapur, V.; Coussens, P.; Sreevatsan, S. (2006):  
Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis strains.  
BMC Microbiol. 6, 10.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16478544>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1382238/pdf/1471-2180-6-10.pdf>.

Jiang, Q.; Akashi, S.; Miyake, K.; Petty, H. R. (2000):  
Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B.  
J Immunol. 165(7), 3541-4.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034352>.

Jorgensen, I.; Bednar, M. M.; Amin, V.; Davis, B. K.; Ting, J. P.; McCafferty, D. G.; Valdivia, R. H. (2011):  
The Chlamydia protease CPAF regulates host and bacterial proteins to maintain pathogen vacuole integrity and promote virulence.  
Cell Host Microbe. 10(1), 21-32.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21767809>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3147293/pdf/nihms309301.pdf>.

Jungi, T. W.; Thony, M.; Brcic, M.; Adler, B.; Pauli, U.; Peterhans, E. (1996):  
Induction of nitric oxide synthase in bovine mononuclear phagocytes is differentiation stage-dependent.  
Immunobiology. 195(3), 385-400.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8877411>.

Kagebein, D.; Gutjahr, M.; Grosse, C.; Vogel, A. B.; Rodel, J.; Knittler, M. R. (2014):  
Chlamydia trachomatis-infected epithelial cells and fibroblasts retain the ability to express  
surface-presented major histocompatibility complex class I molecules.

Infect Immun. 82(3), 993-1006.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24343651>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3958011/pdf/zii0993.pdf>.

Kahnert, A.; Seiler, P.; Stein, M.; Bandermann, S.; Hahnke, K.; Mollenkopf, H.; Kaufmann, S.  
H. (2006):

Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to  
Mycobacterium tuberculosis.

Eur J Immunol. 36(3), 631-47.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16479545>

[http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/eji.200535496/asset/631\\_ftp.pdf?v=1&t=hu2lrsjo&s=9045ebdc324b74c7fdae79bd1d59f171cc446fd5](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/eji.200535496/asset/631_ftp.pdf?v=1&t=hu2lrsjo&s=9045ebdc324b74c7fdae79bd1d59f171cc446fd5).

Karlsen, M.; Nylund, A.; Watanabe, K.; Helvik, J. V.; Nylund, S.; Plarre, H. (2008):  
Characterization of 'Candidatus Clavochlamydia salmonicola': an intracellular bacterium  
infecting salmonid fish.

Environ Microbiol. 10(1), 208-18.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17894816>

<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1462-2920.2007.01445.x/asset/j.1462-2920.2007.01445.x.pdf?v=1&t=i53npydz&s=ee42301cd5ac51eefbc36f80ee08e17b2874e992>

Karr, H. V. (1943):

Study of a latent pneumotropic virus of mice.

Jour Infect Dis. 72((2)), 108-116.

URL:<Go to ISI>://BIOSIS:PREV19431700022002

<http://jid.oxfordjournals.org/content/72/2/108.full.pdf>.

Kenneth M. Murphy, P. T., Mark Walport (2009):

Janeway Immunologie. 7. Auflage, 1092 Seiten.

URL:<http://www.amazon.de/Janeway-Immunologie-Kerstin-Mahlke/dp/3827420474>.

Kern, J. M.; Maass, V.; Maass, M. (2009):

Molecular pathogenesis of chronic Chlamydia pneumoniae infection: a brief overview.

Clin Microbiol Infect. 15(1), 36-41.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220338>

[http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)60596-6/pdf](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)60596-6/pdf).

Kinnunen, A.; Paavonen, J.; Surcel, H. M. (2001):

Heat shock protein 60 specific T-cell response in chlamydial infections.

Scand J Immunol. 54(1-2), 76-81.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11439151>

<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1046/j.1365-3083.2001.00940.x/asset/j.1365-3083.2001.00940.x.pdf?v=1&t=ioimngl0&s=49b1930014f64231fcfd1bbcaef472d2d0dd431e>.

Knittler, M. R.; Berndt, A.; Bocker, S.; Dutow, P.; Hanel, F.; Heuer, D.; Kagebein, D.; Klos, A.; Koch, S.; Liebler-Tenorio, E.; Ostermann, C.; Reinhold, P.; Saluz, H. P.; Schofl, G.; Sehnert, P.; Sachse, K. (2014):

Chlamydia psittaci: new insights into genomic diversity, clinical pathology, host-pathogen interaction and anti-bacterial immunity.

Int J Med Microbiol. 304(7), 877-93.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25082204>

[http://ac.els-cdn.com/S1438422114000794/1-s2.0-S1438422114000794-main.pdf?\\_tid=6113f1d4-9db2-11e6-9a40-0000aab0f02&acdnat=1477730194\\_0104574381a7173b5333ba19d4b7f6c8](http://ac.els-cdn.com/S1438422114000794/1-s2.0-S1438422114000794-main.pdf?_tid=6113f1d4-9db2-11e6-9a40-0000aab0f02&acdnat=1477730194_0104574381a7173b5333ba19d4b7f6c8).

Kol, A.; Bourcier, T.; Lichtman, A. H.; Libby, P. (1999):

Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages.

J Clin Invest. 103(4), 571-7.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10021466>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC408102/pdf/JCI9905310.pdf>.

Kol, A.; Lichtman, A. H.; Finberg, R. W.; Libby, P.; Kurt-Jones, E. A. (2000):

Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells.

J Immunol. 164(1), 13-7.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10604986>

<http://www.jimmunol.org/content/164/1/13.full.pdf>.

Kol, A.; Sukhova, G. K.; Lichtman, A. H.; Libby, P. (1998):

Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression.

Circulation. 98(4), 300-7.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9711934>

<http://circ.ahajournals.org/content/98/4/300.full.pdf>.

Kuo, C. C.; Chen, H. H.; Wang, S. P.; Grayston, J. T. (1986):

Identification of a new group of Chlamydia psittaci strains called TWAR.

J Clin Microbiol. 24(6), 1034-7.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3097063>

<http://jcm.asm.org/content/24/6/1034.full.pdf>.

Kuo, C. C.; Puolakkainen, M.; Lin, T. M.; Witte, M.; Campbell, L. A. (2002):

Mannose-receptor positive and negative mouse macrophages differ in their susceptibility to infection by Chlamydia species.

Microb Pathog. 32(1), 43-8.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11782120>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401001904796>.

L.A., P. (1968):

Proposal for the recognition of two species in the genus *Chlamydia* Jones, Rake, and Stearns, 1945.

INTERNATIONAL JOURNAL OF  
SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Vol. 18, No. 1, pp. 51- 66.

L.A. Page (1966):

REVISION OF THE FAMILY CHLAMYDIACEAE RAKE  
(RICICETTSIALES): UNIFICATION OF THE PSITTACOSIS-LYMPHOGRANULOMA  
VENEREUM-TRACHOMA GROUP  
OF ORGANISMS IN THE GENUS CHLAMYDIA JONES,  
RAKE AND STEARNS, 1945'.

INTERNATIONAL JOURNAL OF  
SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Volume 16, No.2, 223-252.

Lagkouvardos, I.; Weinmaier, T.; Lauro, F. M.; Cavicchioli, R.; Rattei, T.; Horn, M. (2014):  
Integrating metagenomic and amplicon databases to resolve the phylogenetic and ecological  
diversity of the Chlamydiae.

ISME J. 8(1), 115-25.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23949660>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3869019/pdf/ismej2013142a.pdf>.

Lewis, M. R. (1925):

The Formation of Macrophages, Epithelioid Cells and Giant Cells from Leucocytes in  
Incubated Blood.

Am J Pathol. 1(1), 91-100 1.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969635>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1931667/pdf/amjpathol00386-0114.pdf>.

Li, Z. Y.; Chen, D.; Zhong, Y. M.; Wang, S. P.; Zhong, G. M. (2008):

The chlamydial plasmid-encoded protein pgp3 is secreted into the cytosol of Chlamydia-  
infected cells.

Infection and Immunity. 76(8), 3415-3428.

URL:<Go to ISI>://WOS:000258480900006

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2493211/pdf/1377-07.pdf>.

Liang, J.; Jiang, D.; Griffith, J.; Yu, S.; Fan, J.; Zhao, X.; Bucala, R.; Noble, P. W. (2007):

CD44 is a negative regulator of acute pulmonary inflammation and lipopolysaccharide-TLR  
signaling in mouse macrophages.

J Immunol. 178(4), 2469-75.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17277154>

<http://www.jimmunol.org/content/178/4/2469.full.pdf>.

Lugert, R.; Kuhns, M.; Polch, T.; Gross, U. (2004):

Expression and localization of type III secretion-related proteins of *Chlamydia pneumoniae*.  
Med Microbiol Immunol. 193(4), 163-71.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14593477>

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00430-003-0206-x>.

M.A. Vega, A. L. C. (2006):  
Human macrophage activation:  
Too many functions and phenotypes for a single cell type.  
*Inmunología*. Vol. 25 / Núm 4/ 248-272.

MacMicking, J.; Xie, Q. W.; Nathan, C. (1997):  
Nitric oxide and macrophage function.  
*Annu Rev Immunol*. 15, 323-50.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143691>.

Malkwitz, I.; Berndt, A.; Dauschies, A.; Bangoura, B. (2013):  
Long-term investigations on *Toxoplasma gondii*-infected primary chicken macrophages.  
*Parasitol Res*. 112(9), 3115-22.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749093>.

Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. (2004):  
The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.  
*Trends Immunol*. 25(12), 677-86.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530839>  
[http://ac.els-cdn.com/S1471490604002959/1-s2.0-S1471490604002959-main.pdf?\\_tid=2a8f57cc-c563-11e3-9397-00000aacb361&acdnat=1397651725\\_25aa496ef6e0748876f03a4f7bd75f43](http://ac.els-cdn.com/S1471490604002959/1-s2.0-S1471490604002959-main.pdf?_tid=2a8f57cc-c563-11e3-9397-00000aacb361&acdnat=1397651725_25aa496ef6e0748876f03a4f7bd75f43).

Marriott, H. M.; Bingle, C. D.; Read, R. C.; Braley, K. E.; Kroemer, G.; Hellewell, P. G.; Craig, R. W.; Whyte, M. K.; Dockrell, D. H. (2005):  
Dynamic changes in Mcl-1 expression regulate macrophage viability or commitment to apoptosis during bacterial clearance.  
*J Clin Invest*. 115(2), 359-68.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15650769>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC544034/pdf/JCI0521766.pdf>.

Martinez, F. O.; Gordon, S.; Locati, M.; Mantovani, A. (2006):  
Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression.  
*J Immunol*. 177(10), 7303-11.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082649>  
<http://www.jimmunol.org/content/177/10/7303.full.pdf>.

Martinez, F. O.; Helming, L.; Gordon, S. (2009):  
Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective.  
*Annu Rev Immunol*. 27, 451-83.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19105661>  
<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.immunol.021908.132532>.

- Mathews, S. A.; Volp, K. M.; Timms, P. (1999):  
Development of a quantitative gene expression assay for *Chlamydia trachomatis* identified temporal expression of sigma factors.  
FEBS Lett. 458(3), 354-8.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10570939>  
[http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1016/S0014-5793\(99\)01182-5/asset/feb2s0014579399011825.pdf?v=1&t=it8ocog0&s=d77d636688f4bb3fe6a558410717fd7eafd43846](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1016/S0014-5793(99)01182-5/asset/feb2s0014579399011825.pdf?v=1&t=it8ocog0&s=d77d636688f4bb3fe6a558410717fd7eafd43846).
- Mehlitz, A.; Rudel, T. (2013):  
Modulation of host signaling and cellular responses by *Chlamydia*.  
Cell Commun Signal. 11, 90.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24267514>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4222901/pdf/1478-811X-11-90.pdf>.
- Menge, C.; Loos, D.; Bridger, P. S.; Barth, S.; Werling, D.; Baljer, G. (2015):  
Bovine macrophages sense *Escherichia coli* Shiga toxin 1.  
Innate Immun. 21(6), 655-64.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25907071>  
<http://ini.sagepub.com/content/21/6/655.long>.
- Millman, K. L.; Tavare, S.; Dean, D. (2001):  
Recombination in the *ompA* gene but not the *omcB* gene of *Chlamydia* contributes to serovar-specific differences in tissue tropism, immune surveillance, and persistence of the organism.  
J Bacteriol. 183(20), 5997-6008.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567000>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99679/pdf/jb2001005997.pdf>.
- Mitchell, C. M.; Hovis, K. M.; Bavoil, P. M.; Myers, G. S.; Carrasco, J. A.; Timms, P. (2010):  
Comparison of koala LPCoLN and human strains of *Chlamydia pneumoniae* highlights extended genetic diversity in the species.  
BMC Genomics. 11, 442.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20646324>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3091639/pdf/1471-2164-11-442.pdf>.
- Mitchell, C. M.; Hutton, S.; Myers, G. S.; Brunham, R.; Timms, P. (2010):  
*Chlamydia pneumoniae* is genetically diverse in animals and appears to have crossed the host barrier to humans on (at least) two occasions.  
PLoS Pathog. 6(5), e1000903.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20502684>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2873915/pdf/ppat.1000903.pdf>.
- Miyairi, I.; Tatireddigari, V. R.; Mahdi, O. S.; Rose, L. A.; Belland, R. J.; Lu, L.; Williams, R. W.; Byrne, G. I. (2007):  
The p47 GTPases *ligp2* and *lrgb10* regulate innate immunity and inflammation to murine *Chlamydia psittaci* infection.

J Immunol. 179(3), 1814-24.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641048>  
<http://www.jimmunol.org/content/179/3/1814.full.pdf>.

Moazed, T. C.; Kuo, C. C.; Grayston, J. T.; Campbell, L. A. (1998):  
Evidence of systemic dissemination of Chlamydia pneumoniae via macrophages in the mouse.

J Infect Dis. 177(5), 1322-5.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593019>  
<http://jid.oxfordjournals.org/content/177/5/1322.full.pdf>.

Molestina, R. E.; Klein, J. B.; Miller, R. D.; Pierce, W. H.; Ramirez, J. A.; Summersgill, J. T. (2002):

Proteomic analysis of differentially expressed Chlamydia pneumoniae genes during persistent infection of HEp-2 cells.

Infect Immun. 70(6), 2976-81.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010987>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC127979/pdf/1331.pdf>.

Morrison, R. P.; Belland, R. J.; Lyng, K.; Caldwell, H. D. (1989):

Chlamydial disease pathogenesis. The 57-kD chlamydial hypersensitivity antigen is a stress response protein.

J Exp Med. 170(4), 1271-83.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2571668>  
<http://jem.rupress.org/content/170/4/1271.full.pdf>.

Mpiga, P.; Ravaoarino, M. (2006):

Chlamydia trachomatis persistence: an update.

Microbiol Res. 161(1), 9-19.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16338585>.

Myers, G. S. A.; Mathews, S. A.; Eppinger, M.; Mitchell, C.; O'Brien, K. K.; White, O. R.; Benahmed, F.; Brunham, R. C.; Read, T. D.; Ravel, J.; Bavoil, P. M.; Timms, P. (2009):  
Evidence that Human Chlamydia pneumoniae Was Zoonotically Acquired.

Journal of Bacteriology. 191(23), 7225-7233.

URL:<Go to ISI>://WOS:000271577300009

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2786552/pdf/0746-09.pdf>.

Nans, A.; Saibil, H. R.; Hayward, R. D. (2014):

Pathogen-host reorganization during Chlamydia invasion revealed by cryo-electron tomography.

Cellular Microbiology. 16(10), 1457-1472.

URL:<Go to ISI>://WOS:000342720500001

<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/cmi.12310/asset/cmi12310.pdf?v=1&t=i55557ab&s=c5bdaf2a8b31500c32baac297fc4d64df5789146>.

Neeper, I. D.; Patton, D. L.; Kuo, C. C. (1990):  
Cinematographic observations of growth cycles of *Chlamydia trachomatis* in primary cultures of human amniotic cells.

Infect Immun. 58(7), 2042-7.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2365450>

<http://iai.asm.org/content/58/7/2042.full.pdf>.

Nigg, C. (1942):

An unidentified virus which produces pneumonia and systemic infection in mice.

Science. 95((2454)), 49-50.

URL:<Go to ISI>://BIOSIS:PREV19431700001940.

OXOID, L. (2013):

IMAGEN Chlamydia.

URL:[www.oxid.com/ifu](http://www.oxid.com/ifu).

Packiam, M.; Weinrick, B.; Jacobs, W. R., Jr.; Maurelli, A. T. (2015):

Structural characterization of muropeptides from *Chlamydia trachomatis* peptidoglycan by mass spectrometry resolves "chlamydial anomaly".

Proc Natl Acad Sci U S A. 112(37), 11660-5.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26290580>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4577195/pdf/pnas.201514026.pdf>.

Pan, C.; Kumar, C.; Bohl, S.; Klingmueller, U.; Mann, M. (2009):

Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions.

Mol Cell Proteomics. 8(3), 443-50.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952599>

<http://www.mcponline.org/content/8/3/443.full.pdf>.

Parte, A. (2012):

Bergey's manual of systematic bacteriology. -

New York: Springer. - ISBN:9780387950433.)

URL:Publisher description <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy1316/2012930836-d.html>

Table of contents only <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy1316/2012930836-t.html>.

Peters, J.; Wilson, D. P.; Myers, G.; Timms, P.; Bavoil, P. M. (2007):

Type III secretion a la Chlamydia.

Trends Microbiol. 15(6), 241-51.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17482820>

[http://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X\(07\)00072-](http://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X(07)00072-8?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X07000728%3Fshowall%3Dtrue)

[8?\\_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X07000728%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X(07)00072-8?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X07000728%3Fshowall%3Dtrue).

Pfaffl, M. W. (2001):

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.

Nucleic Acids Research. 29(9), 6.

URL:<Go to ISI>://WOS:000168605800024

<http://nar.oxfordjournals.org/content/29/9/e45.full.pdf>.

Pinet, F.; Dupont, A.; Bencherif, N.; Guihot, A. L.; Quatannens, B.; Amouyel, P. (2003): Morphology, homogeneity and functionality of human monocytes-derived macrophages. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 49(6), 899-905.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656047>.

Pirbhai, M.; Dong, F.; Zhong, Y.; Pan, K. Z.; Zhong, G. (2006):

The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in Chlamydia trachomatis-infected cells.

J Biol Chem. 281(42), 31495-501.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16940052>

<http://www.jbc.org/content/281/42/31495.full.pdf>.

Poikonen, K.; Lajunen, T.; Silvennoinen-Kassinen, S.; Paldanius, M.; Leinonen, M.; Saikku, P. (2008):

Susceptibility of human monocyte-macrophages to Chlamydia pneumoniae infection in vitro is highly variable and associated with levels of soluble CD14 and C. pneumoniae IgA and human HSP-IgG antibodies in serum.

Scand J Immunol. 67(3), 279-84.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18194359>

<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1365-3083.2007.02061.x/asset/j.1365-3083.2007.02061.x.pdf?v=1&t=i7lyfn2h&s=9359f18fd1fb0413fe1d676dc7b4a39a627f6c40>.

Ponta, H.; Sherman, L.; Herrlich, P. A. (2003):

CD44: from adhesion molecules to signalling regulators.

Nat Rev Mol Cell Biol. 4(1), 33-45.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12511867>.

Porcheray, F.; Viaud, S.; Rimaniol, A. C.; Leone, C.; Samah, B.; Dereuddre-Bosquet, N.; Dormont, D.; Gras, G. (2005):

Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation.

Clin Exp Immunol. 142(3), 481-9.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16297160>

<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x/asset/j.1365-2249.2005.02934.x.pdf?v=1&t=hu2lfr5&s=d5391a2a5267a7e66e0286e67d1549379bfafbda>.

Prohl, A.; Lohr, M.; Ostermann, C.; Liebler-Tenorio, E.; Berndt, A.; Schroedl, W.; Rothe, M.; Schubert, E.; Sachse, K.; Reinhold, P. (2014):

Evaluation of antimicrobial treatment in a bovine model of acute Chlamydia psittaci infection: tetracycline versus tetracycline plus rifampicin.

Pathog Dis.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25113145>.

Prohl, A.; Lohr, M.; Ostermann, C.; Liebler-Tenorio, E.; Berndt, A.; Schroedl, W.; Rothe, M.; Schubert, E.; Sachse, K.; Reinhold, P. (2015):

Enrofloxacin and macrolides alone or in combination with rifampicin as antimicrobial treatment in a bovine model of acute *Chlamydia psittaci* infection.

PLoS One. 10(3), e0119736.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25768665>.

Prohl, A.; Wolf, K.; Weber, C.; Muller, K. E.; Menge, C.; Sachse, K.; Rodel, J.; Reinhold, P.; Berndt, A. (2015):

Kinetics of Local and Systemic Leucocyte and Cytokine Reaction of Calves to Intrabronchial Infection with *Chlamydia psittaci*.

PLoS One. 10(8), e0135161.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26252769>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4529195/pdf/pone.0135161.pdf>.

Rajalingam, K.; Sharma, M.; Lohmann, C.; Oswald, M.; Thieck, O.; Froelich, C. J.; Rudel, T. (2008):

Mcl-1 is a key regulator of apoptosis resistance in *Chlamydia trachomatis*-infected cells.

PLoS One. 3(9), e3102.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18769617>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2518856/pdf/pone.0003102.pdf>.

Rajaram, K.; Nelson, D. E. (2015):

*Chlamydia muridarum* infection of macrophages elicits bactericidal nitric oxide production via reactive oxygen species and cathepsin B.

Infect Immun. 83(8), 3164-75.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26015483>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4496605/pdf/zii3164.pdf>.

Ramsey, K. H.; Sigar, I. M.; Schripsema, J. H.; Denman, C. J.; Bowlin, A. K.; Myers, G. A. S.; Rank, R. G. (2009):

Strain and Virulence Diversity in the Mouse Pathogen *Chlamydia muridarum*.

Infection and Immunity. 77(8), 3284-3293.

URL:<Go to ISI>://WOS:000268098400018

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2715693/pdf/0147-09.pdf>.

Read, T. D.; Brunham, R. C.; Shen, C.; Gill, S. R.; Heidelberg, J. F.; White, O.; Hickey, E. K.; Peterson, J.; Utterback, T.; Berry, K.; Bass, S.; Linher, K.; Weidman, J.; Khouri, H.; Craven, B.; Bowman, C.; Dodson, R.; Gwinn, M.; Nelson, W.; DeBoy, R.; Kolonay, J.; McClarty, G.; Salzberg, S. L.; Eisen, J.; Fraser, C. M. (2000):

Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39.

Nucleic Acids Res. 28(6), 1397-406.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10684935>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC111046/pdf/gkd254.pdf>.

- Read, T. D.; Joseph, S. J.; Didelot, X.; Liang, B.; Patel, L.; Dean, D. (2013):  
Comparative analysis of *Chlamydia psittaci* genomes reveals the recent emergence of a pathogenic lineage with a broad host range.  
MBio. 4(2).  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23532978>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3622922/pdf/mBio.00604-12.pdf>.
- Reinhold, P.; Ostermann, C.; Liebler-Tenorio, E.; Berndt, A.; Vogel, A.; Lambertz, J.; Rothe, M.; Ruttger, A.; Schubert, E.; Sachse, K. (2012):  
A bovine model of respiratory *Chlamydia psittaci* infection: challenge dose titration.  
PLoS One. 7(1), e30125.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22299031>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3267716/pdf/pone.0030125.pdf>.
- Rey-Giraud, F.; Hafner, M.; Ries, C. H. (2012):  
In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions.  
PLoS One. 7(8), e42656.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22880072>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3412794/pdf/pone.0042656.pdf>.
- Rey-Ladino, J.; Jiang, X.; Gabel, B. R.; Shen, C.; Brunham, R. C. (2007):  
Survival of *Chlamydia muridarum* within dendritic cells.  
Infect Immun. 75(8), 3707-14.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17502393>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1952003/pdf/1618-06.pdf>.
- Rider, D.; Furusho, H.; Xu, S.; Trachtenberg, A. J.; Kuo, W. P.; Hirai, K.; Susa, M.; Bahammam, L.; Stashenko, P.; Fujimura, A.; Sasaki, H. (2016):  
Elevated CD14 (Cluster of Differentiation 14) and Toll-Like Receptor (TLR) 4 Signaling Deteriorate Periapical Inflammation in TLR2 Deficient Mice.  
Anat Rec (Hoboken). 299(9), 1281-92.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27314637>  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.23383/abstract>.
- Rockey, D. D.; Heinzen, R. A.; Hackstadt, T. (1995):  
Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells.  
Mol Microbiol. 15(4), 617-26.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7783634>  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02371.x/abstract>.
- Rothermel, C. D.; Rubin, B. Y.; Jaffe, E. A.; Murray, H. W. (1986):  
Oxygen-independent inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* growth by human monocytes and interferon-gamma-activated macrophages.  
J Immunol. 137(2), 689-92.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3088106>.

Rothfuchs, A. G.; Gigliotti, D.; Palmblad, K.; Andersson, U.; Wigzell, H.; Rottenberg, M. E. (2001):

IFN-alpha beta-dependent, IFN-gamma secretion by bone marrow-derived macrophages controls an intracellular bacterial infection.

J Immunol. 167(11), 6453-61.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714812>  
<http://www.jimmunol.org/content/167/11/6453.full.pdf>.

Rottenberg, M. E.; Gigliotti-Rothfuchs, A.; Wigzell, H. (2002):

The role of IFN-gamma in the outcome of chlamydial infection.

Curr Opin Immunol. 14(4), 444-51.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088678>  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791502003618>.

Roulis, E.; Polkinghorne, A.; Timms, P. (2013):

Chlamydia pneumoniae: modern insights into an ancient pathogen.

Trends Microbiol. 21(3), 120-8.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23218799>.

Roulis, E.; Polkinghorne, A.; Timms, P. (2013):

Chlamydia pneumoniae: modern insights into an ancient pathogen.

Trends in Microbiology. 21(3), 120-128.

URL:<Go to ISI>://WOS:000316715200003

[http://ac.els-cdn.com/S0966842X12001977/1-s2.0-S0966842X12001977-main.pdf?\\_tid=97be6f3a-a182-11e4-b8a9-0000aacb360&acdnat=1421854479\\_592ef949479337728052266f8395c257](http://ac.els-cdn.com/S0966842X12001977/1-s2.0-S0966842X12001977-main.pdf?_tid=97be6f3a-a182-11e4-b8a9-0000aacb360&acdnat=1421854479_592ef949479337728052266f8395c257).

Rurangirwa, F. R.; Dilbeck, P. M.; Crawford, T. B.; McGuire, T. C.; McElwain, T. F. (1999):  
Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of Waddliaceae fam. nov., Waddlia chondrophila gen. nov., sp. nov.

Int J Syst Bacteriol. 49 Pt 2, 577-81.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10319478>.

Sacco, R. E. (2009):

The Mononuclear Phagocyte System and Lymphocytes, in Ultrastructural Pathology the Comparative Cellular Basis of Disease.

Wiley-Blackwell, Oxford, UK. Second Edition (ed N. F. Cheville).

Sachse, K.; Bavoil, P. M.; Kaltenboeck, B.; Stephens, R. S.; Kuo, C. C.; Rossello-Mora, R.; Horn, M. (2015):

Emendation of the family Chlamydiaceae: Proposal of a single genus, Chlamydia, to include all currently recognized species.

Syst Appl Microbiol. 38(2), 99-103.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25618261>  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202015000028>.

Sachse, K.; Laroucau, K.; Hotzel, H.; Schubert, E.; Ehricht, R.; Slickers, P. (2008):  
Genotyping of *Chlamydophila psittaci* using a new DNA microarray assay based on  
sequence analysis of ompA genes.

BMC Microbiol. 8, 63.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419800>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2362127/pdf/1471-2180-8-63.pdf>.

Sachse, K.; Laroucau, K.; Riege, K.; Wehner, S.; Dilcher, M.; Creasy, H. H.; Weidmann, M.;  
Myers, G.; Vorimore, F.; Vicari, N.; Magnino, S.; Liebler-Tenorio, E.; Ruettger, A.; Bavoil, P.  
M.; Hufert, F. T.; Rossello-Mora, R.; Marz, M. (2014):

Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal  
of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov.

Syst Appl Microbiol. 37(2), 79-88.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24461712>

<http://ac.els-cdn.com/S0723202013001951/1-s2.0-S0723202013001951->

[main.pdf?\\_tid=f8d137b8-9fbf-11e4-b3ef-](http://ac.els-cdn.com/S0723202013001951/1-s2.0-S0723202013001951-main.pdf?_tid=f8d137b8-9fbf-11e4-b3ef-)

[0000aacb35d&acdnat=1421660939\\_fecee8ae8ddc21b5efc254b586b845](http://ac.els-cdn.com/S0723202013001951/1-s2.0-S0723202013001951-main.pdf?_tid=f8d137b8-9fbf-11e4-b3ef-0000aacb35d&acdnat=1421660939_fecee8ae8ddc21b5efc254b586b845).

Sachse, K.; Laroucau, K.; Vorimore, F.; Magnino, S.; Feige, J.; Muller, W.; Kube, S.; Hotzel,  
H.; Schubert, E.; Slickers, P.; Ehricht, R. (2009):

DNA microarray-based genotyping of *Chlamydophila psittaci* strains from culture and clinical  
samples.

Vet Microbiol. 135(1-2), 22-30.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18950965>

<http://ac.els-cdn.com/S0378113508003866/1-s2.0-S0378113508003866->

[main.pdf?\\_tid=78e16bdc-a892-11e4-9aa8-](http://ac.els-cdn.com/S0378113508003866/1-s2.0-S0378113508003866-main.pdf?_tid=78e16bdc-a892-11e4-9aa8-)

[0000aab0f26&acdnat=1422630957\\_b92c378db63e56dbb92faedc2f443dd5](http://ac.els-cdn.com/S0378113508003866/1-s2.0-S0378113508003866-main.pdf?_tid=78e16bdc-a892-11e4-9aa8-0000aab0f26&acdnat=1422630957_b92c378db63e56dbb92faedc2f443dd5)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113508003866>.

Salthouse, T. N. (1984):

"Some aspects of macrophage behavior at the implant interface Journal of Biomedical  
Materials Research Volume 18, Issue 4." Journal of Biomedical Materials Research 18, 395-  
401 URL:<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.820180407/abstract>.

Sarkar, A.; Moller, S.; Bhattacharyya, A.; Behnen, M.; Rupp, J.; van Zandbergen, G.;  
Solbach, W.; Laskay, T. (2015):

Mechanisms of apoptosis inhibition in *Chlamydia pneumoniae*-infected neutrophils.

Int J Med Microbiol.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26005182>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422115000429>.

Sarkar, A.; Moller, S.; Bhattacharyya, A.; Behnen, M.; Rupp, J.; van Zandbergen, G.;  
Solbach, W.; Laskay, T. (2015):

Mechanisms of apoptosis inhibition in *Chlamydia pneumoniae*-infected neutrophils.

Int J Med Microbiol. 305(6), 493-500.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26005182>

[http://ac.els-cdn.com/S1438422115000429/1-s2.0-S1438422115000429-main.pdf?\\_tid=a2156388-d59e-11e6-b347-00000aab0f6b&acdnat=1483878978\\_8cc226476391ebb65b414c666976f96c](http://ac.els-cdn.com/S1438422115000429/1-s2.0-S1438422115000429-main.pdf?_tid=a2156388-d59e-11e6-b347-00000aab0f6b&acdnat=1483878978_8cc226476391ebb65b414c666976f96c).

SCAHAW (2002):

Avian Chlamydiosis as a Zoonotic Disease and Risk Reduction Strategies. European Commission.

SCAHAW (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare), .

SANCO/AH/R26/2002(European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General).

URL:[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out73\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out73_en.pdf).

Schmittgen, T. D.; Livak, K. J. (2008):

Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.

Nat Protoc. 3(6), 1101-8.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18546601>.

Schwager, I.; Jungi, T. W. (1994):

Effect of human recombinant cytokines on the induction of macrophage procoagulant activity. Blood. 83(1), 152-60.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8274733>

<http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/83/1/152.full.pdf>.

Scidmore, M. A.; Fischer, E. R.; Hackstadt, T. (2003):

Restricted fusion of Chlamydia trachomatis vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection.

Infect Immun. 71(2), 973-84.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540580>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC145390/pdf/1267.pdf>.

Serotec, A. (2013):

Minireview: Macrophage Polarization Introduction

URL:<http://www.abdserotec.com/macrophage-polarization-minireview.html>.

Shaw, A. C.; Christiansen, G.; Roepstorff, P.; Birkelund, S. (2000):

Genetic differences in the Chlamydia trachomatis tryptophan synthase alpha-subunit can explain variations in serovar pathogenesis.

Microbes Infect. 2(6), 581-92.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884608>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457900003683>.

Soares, J.-B. P.-N., Pedro (2012):

Innate Immunity in Alcohol Liver Disease-Trends in

Alcoholic Liver Disease Research - Clinical and Scientific Aspects.

InTech.

URL:<http://www.intechopen.com/books/trends-in-alcoholic-liver-diseaseresearch-clinical-and-scientific-aspects/innate-immunity-in-alcohol-liver-disease>.

Sobotta, K.; Hillarius, K.; Mager, M.; Kerner, K.; Heydel, C.; Menge, C. (2016):  
Coxiella burnetii Infects Primary Bovine Macrophages and Limits Their Host Cell Response.  
Infect Immun. 84(6), 1722-34.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27021246>.

Spiller, K. L.; Anfang, R. R.; Spiller, K. J.; Ng, J.; Nakazawa, K. R.; Daulton, J. W.; Vunjak-Noyakovic, G. (2014):

The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds.  
Biomaterials. 35(15), 4477-4488.

URL:<Go to ISI>://WOS:000334819800007

[http://ac.els-cdn.com/S0142961214001525/1-s2.0-S0142961214001525-main.pdf?\\_tid=2ce6d6e0-1337-11e4-90ec-00000aacb35f&acdnat=1406209022\\_8c7d8cb43bde835ac2a9aff17b8814d2](http://ac.els-cdn.com/S0142961214001525/1-s2.0-S0142961214001525-main.pdf?_tid=2ce6d6e0-1337-11e4-90ec-00000aacb35f&acdnat=1406209022_8c7d8cb43bde835ac2a9aff17b8814d2).

Sprent, J. (1993):

Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes.

Curr Opin Immunol. 5(3), 433-8.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8347304>.

Squadrito, G. L.; Pryor, W. A. (1998):

Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide.  
Free Radic Biol Med. 25(4-5), 392-403.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9741578>.

Stein, M.; Keshav, S.; Harris, N.; Gordon, S. (1992):

INTERLEUKIN-4 POTENTLY ENHANCES MURINE MACROPHAGE MANNOSE RECEPTOR ACTIVITY - A MARKER OF ALTERNATIVE IMMUNOLOGICAL MACROPHAGE ACTIVATION.

Journal of Experimental Medicine. 176(1), 287-292.

URL:<Go to ISI>://WOS:A1992JA75900032

<http://jem.rupress.org/content/176/1/287.full.pdf>.

Stephens, R. S.; Kalman, S.; Lammel, C.; Fan, J.; Marathe, R.; Aravind, L.; Mitchell, W.; Olinger, L.; Tatusov, R. L.; Zhao, Q.; Koonin, E. V.; Davis, R. W. (1998):

Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis.  
Science. 282(5389), 754-9.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9784136>.

Stills, H.; Fox, J. G.; Paster, B. J.; Dewhirst, F. E. (1991):

A NEW CHLAMYDIA-SP STRAIN SFPD ISOLATED FROM TRANSMISSIBLE PROLIFERATIVE ILEITIS IN HAMSTERS.

Microbial Ecology in Health and Disease. 4(SPEC. ISSUE), S99.

URL:<Go to ISI>://BIOSIS:PREV199242017821.

Stills, H. F., Jr. (1991):

Isolation of an intracellular bacterium from hamsters (*Mesocricetus auratus*) with proliferative ileitis and reproduction of the disease with a pure culture.

Infect Immun. 59(9), 3227-36.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1879939>  
<http://iai.asm.org/content/59/9/3227.full.pdf>.

Storey, C.; Lusher, M.; Yates, P.; Richmond, S. (1993):  
Evidence for Chlamydia pneumoniae of non-human origin.  
J Gen Microbiol. 139(11), 2621-6.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8277245>  
<http://mic.sgmjournals.org/content/139/11/2621.full.pdf>.

Stride, M. C.; Polkinghorne, A.; Miller, T. L.; Groff, J. M.; Lapatra, S. E.; Nowak, B. F. (2013):  
Molecular characterization of "Candidatus Parilichlamydia carangidicola," a novel Chlamydia-  
like epitheliocystis agent in yellowtail kingfish, *Seriola lalandi* (Valenciennes), and the  
proposal of a new family, "Candidatus Parilichlamydiaceae" fam. nov. (order Chlamydiales).  
Appl Environ Microbiol. 79(5), 1590-7.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23275507>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3591964/pdf/zam1590.pdf>.

Studholme, D. J.; Buck, M. (2000):  
Novel roles of sigmaN in small genomes.  
Microbiology. 146 ( Pt 1), 4-5.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10658646>.

Suchland, R. J.; Rockey, D. D.; Weeks, S. K.; Alzhanov, D. T.; Stamm, W. E. (2005):  
Development of secondary inclusions in cells infected by Chlamydia trachomatis.  
Infect Immun. 73(7), 3954-62.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972482>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1168544/pdf/0010-05.pdf>.

Sutton, J. S.; Weiss, L. (1966):  
Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages, epithelioid cells, and  
multinucleated giant cells. An electron microscope study.  
J Cell Biol. 28(2), 303-32.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5914695>  
<http://jcb.rupress.org/content/28/2/303.full.pdf>.

Taylor, G. A.; Feng, C. G.; Sher, A. (2007):  
Control of IFN-gamma-mediated host resistance to intracellular pathogens by immunity-  
related GTPases (p47 GTPases).  
Microbes Infect. 9(14-15), 1644-51.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18023232>  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457907002845>.

Toft, C.; Andersson, S. G. (2010):  
Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation.  
Nat Rev Genet. 11(7), 465-75.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20517341>.

- Tsutsumi-Ishii, Y.; Shimada, K.; Daida, H.; Toman, R.; Nagaoka, I. (2008):  
Low potency of Chlamydomonada LPS to activate human mononuclear cells due to its reduced affinities for CD14 and LPS-binding protein.  
Int Immunol. 20(2), 199-208.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18056918>  
<http://intimm.oxfordjournals.org/content/20/2/199.full.pdf>.
- Vachon, E.; Martin, R.; Kwok, V.; Cherepanov, V.; Chow, C. W.; Doerschuk, C. M.; Plumb, J.; Grinstein, S.; Downey, G. P. (2007):  
CD44-mediated phagocytosis induces inside-out activation of complement receptor-3 in murine macrophages.  
Blood. 110(13), 4492-502.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17827392>  
<http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/110/13/4492.full.pdf>.
- Vachon, E.; Martin, R.; Plumb, J.; Kwok, V.; Vandivier, R. W.; Glogauer, M.; Kapus, A.; Wang, X.; Chow, C. W.; Grinstein, S.; Downey, G. P. (2006):  
CD44 is a phagocytic receptor.  
Blood. 107(10), 4149-58.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455948>  
<http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/107/10/4149.full.pdf>.
- van der Meer, J. W.; van de Gevel, J. S.; Blusse van Oud Alblas, A.; Kramps, J. A.; van Zwet, T. L.; Leijh, P. C.; van Furth, R. (1982):  
Characteristics of human monocytes cultured in the Teflon culture bag.  
Immunology. 47(4), 617-25.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6754582>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1555558/pdf/immunology00225-0042.pdf>.
- Voigt, A.; Schofl, G.; Saluz, H. P. (2012):  
The Chlamydia psittaci genome: a comparative analysis of intracellular pathogens.  
PLoS One. 7(4), e35097.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22506068>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3323650/pdf/pone.0035097.pdf>.
- Wallensten, A.; Fredlund, H.; Runehagen, A. (2014):  
Multiple human-to-human transmission from a severe case of psittacosis, Sweden, January-February 2013.  
Euro Surveill. 19(42).  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25358043>.
- Wang, Y.; Kahane, S.; Cutcliffe, L. T.; Skilton, R. J.; Lambden, P. R.; Clarke, I. N. (2011):  
Development of a transformation system for Chlamydia trachomatis: restoration of glycogen biosynthesis by acquisition of a plasmid shuttle vector.  
PLoS Pathog. 7(9), e1002258.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21966270>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3178582/pdf/ppat.1002258.pdf>.

Wang, Y.; Kahane, S.; Cutcliffe, L. T.; Skilton, R. J.; Lambden, P. R.; Persson, K.; Bjartling, C.; Clarke, I. N. (2013):

Genetic transformation of a clinical (genital tract), plasmid-free isolate of *Chlamydia trachomatis*: engineering the plasmid as a cloning vector.

PLoS One. 8(3), e59195.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23527131>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3601068/pdf/pone.0059195.pdf>.

Weiss, E. (1949):

The extracellular development of agents of the psittacosis-lymphogranuloma group (*Chlamydozoaceae*).

J Infect Dis. 84(2), 125-49.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18113778>

<http://jid.oxfordjournals.org/content/84/2/125.full.pdf>.

Werling, D.; Howard, C. J.; Niederer, E.; Straub, O. C.; Saalmuller, A.; Langhans, W. (1998):

Analysis of the phenotype and phagocytic activity of monocytes/macrophages from cattle infected with the bovine leukaemia virus.

Vet Immunol Immunopathol. 62(3), 185-95.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9643453>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242798000749>.

Werner, E. R.; Werner-Felmayer, G. (2007):

Substrate and cofactor requirements of indoleamine 2,3-dioxygenase in interferon-gamma-treated cells: utilization of oxygen rather than superoxide.

Curr Drug Metab. 8(3), 201-3.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17430107>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2851152/pdf/ukmss-29311.pdf>.

Wilhelm, J.; Pingoud, A. (2003):

Real-time polymerase chain reaction.

Chembiochem. 4(11), 1120-8.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613102>

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.200300662/abstract>.

Wills, J. M.; Watson, G.; Lusher, M.; Mair, T. S.; Wood, D.; Richmond, S. J. (1990):

Characterisation of *Chlamydia psittaci* isolated from a horse.

Vet Microbiol. 24(1), 11-9.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2219661>.

Wood, H.; Roshick, C.; McClarty, G. (2004):

Tryptophan recycling is responsible for the interferon-gamma resistance of *Chlamydia psittaci* GPIC in indoleamine dioxygenase-expressing host cells.

Mol Microbiol. 52(3), 903-16.

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15101993>

<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1365-2958.2004.04029.x/asset/j.1365-2958.2004.04029.x.pdf?v=1&t=i7ov1d0y&s=ae91d59d4f377bfa032b33cf19e8f946d7dc69d5>.

- Wyrick, P. B.; Brownridge, E. A. (1978):  
Growth of *Chlamydia psittaci* in macrophages.  
*Infect Immun.* 19(3), 1054-60.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/565338>  
<http://iai.asm.org/content/19/3/1054.full.pdf>.
- Yamaguchi, H.; Haranaga, S.; Friedman, H.; Moor, J. A.; Muffly, K. E.; Yamamoto, Y. (2002):  
A *Chlamydia pneumoniae* infection model using established human lymphocyte cell lines.  
*FEMS Microbiol Lett.* 216(2), 229-34.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12435507>.
- Yong, E. C.; Chi, E. Y.; Kuo, C. C. (1987):  
Differential antimicrobial activity of human mononuclear phagocytes against the human biovars of *Chlamydia trachomatis*.  
*J Immunol.* 139(4), 1297-302.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3112229>.
- Zhong, G.; Fan, P.; Ji, H.; Dong, F.; Huang, Y. (2001):  
Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors.  
*J Exp Med.* 193(8), 935-42.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304554>  
<http://jem.rupress.org/content/193/8/935.full.pdf>.
- Zimorski, V.; Ku, C.; Martin, W. F.; Gould, S. B. (2014):  
Endosymbiotic theory for organelle origins.  
*Curr Opin Microbiol.* 22, 38-48.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25306530>  
[http://ac.els-cdn.com/S1369527414001283/1-s2.0-S1369527414001283-main.pdf?\\_tid=d477860e-d593-11e6-92bb-00000aab0f26&acdnat=1483874345\\_ac3b98d88d843ee85a4e79f3be0afdbd](http://ac.els-cdn.com/S1369527414001283/1-s2.0-S1369527414001283-main.pdf?_tid=d477860e-d593-11e6-92bb-00000aab0f26&acdnat=1483874345_ac3b98d88d843ee85a4e79f3be0afdbd).
- Zuckerman, S. H.; Ackerman, S. K.; Douglas, S. D. (1979):  
Long-term human peripheral blood monocyte cultures: establishment, metabolism and morphology of primary human monocyte-macrophage cell cultures.  
*Immunology.* 38(2), 401-11.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/389789>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1457944/pdf/immunology00259-0184.pdf>.
- Zugel, U.; Kaufmann, S. H. (1999):  
Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases.  
*Clin Microbiol Rev.* 12(1), 19-39.  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9880473>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88905/pdf/cm000019.pdf>.

## 9. PUBLIKATIONSLISTE

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Originalartikel:

Sobotta K.; Hillarius K.; Jiménez PH.; Kerner K.; Heydel C.; Menge C.

(2018):

**Interaction of *Coxiella burnetii* Strains of Different Sources and Genotypes with Bovine and Human Monocyte-Derived Macrophages.**

Front Cell Infect Microbiol. 2018 Jan 12;7:543. doi: 10.3389/fcimb.2017.00543. eCollection 2017.

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29379776>

Sobotta, K.; Hillarius, K.; Mager, M.; Kerner, K.; Heydel, C.; Menge, C.

(2016):

***Coxiella burnetii* Infects Primary Bovine Macrophages and Limits Their Host Cell Response.**

Infect Immun. 84(6), 1722-34.

URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27021246>

Vorträge:

Kirstin Hillarius, Dagmar Barz, Konrad Sachse, Angela Berndt

**Charakterisierung der Wirts-Pathogen-Wechselwirkungen zwischen humanen monozyten-gereiften Makrophagen und *Chlamydia (C.) psittaci*, *C. pneumoniae* bzw. *C. muridarum*.**

Gemeinsame Arbeitstagung des Nationalen Referenzlabors für Chlamydiose, des Nationalen Referenzlabors für Q-Fieber und der DVG-Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie; Jena, 9.-10.10.2014

Poster:

Kirstin Hillarius, Dagmar Barz, Konrad Sachse, Angela Berndt

**In vitro studies on chlamydial pathogenicity and host response of primary macrophages**

10. Deutscher Chlamydienworkshop; Erfurt, 4.-6.04.2012

Infektionsmedizinisches Symposium in Leipzig; Leipzig, 10.09.2012

National Symposium on Zoonoses Research; Berlin, 11.-12.10.2012

Kirstin Hillarius, Dagmar Barz, Konrad Sachse, Angela Berndt

**In vitro studies on the replication efficacy of different chlamydial species in human monocyte-derived macrophages**

Annual Meeting - VIA 2013 (Veterinärimmunol. Arbeitskreis); Wien, 05.-06.04.2013

11. Deutscher Chlamydienworkshop; Würzburg, 10.-12.04.2013

EMAC-2 (2nd European Meeting on Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications ); Jena, 12.-14.06.2013

10. IVIS (Intern. Vet. Immun. Symp.); Mailand, 28.08.-01.09.2013

Kirstin Hillarius, Dagmar Barz, Konrad Sachse, Angela Berndt

**Factors involved in different host specificities of three chlamydial species**

National Symposium on Zoonoses Research; Berlin, 19.-20.09.2013

Kirstin Hillarius, Dagmar Barz, Konrad Sachse, Angela Berndt

**Characterization of host-pathogen interactions of human monocyte-derived macrophages infected with *C. muridarum* or *C. psittaci***

National Symposium on Zoonoses Research an 7th International Conference on Emerging Zoonoses; Berlin, 16-17.10.2014

### 10. DANKSAGUNG

Eine Dissertation ist ein umfangreiches Gesamtwerk, das einer alleine nicht ohne Hilfe zustande bringen kann. Viele Menschen haben mit ihrem Wissen und ihrer seelischen Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Einigen Personen möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. Mettenleiter, Präsident des Friedrich-Loeffler-Instituts und Institutsleiter des IMVZ und Prof. Dr. Christian Menge, Institutsleiter des Instituts für molekulare Pathogenese und örtlicher administrativer Vertreter des Präsidenten des Friedrich-Loeffler-Instituts für die Bereitstellung der Ressourcen und Labore, die ich zur erfolgreichen Bearbeitung des Promotionsthemas nutzen durfte.

Mein weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Veit, Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, für die Betreuung meiner Dissertation und der Möglichkeit zur Einreichung dieser Arbeit über das Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

Meinen Betreuern Frau PD Dr. Angela Berndt und Herrn Prof. hc. Dr. Konrad Sachse danke ich in besonderem Maße für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die gute Betreuung, die Fachgespräche und Diskussionen und ihre Geduld.

Frau Univ. Prof. Dr. med. habil. Dagmar Barz, ehemals Leiterin des Instituts für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Jena, danke ich für die Bereitstellung der humanen Spender Buffy Coats.

Dem Agrarunternehmen "Wöllmisse" Schlöben eG, Stadtroda gilt mein Dank für die Erlaubnis Spenderblut von ihren Rindern gewinnen zu dürfen.

Frau Stahlberg und Frau Lemser aus dem Tierhaus des Friedrich-Loeffler-Instituts, Jena, danke ich für die Gewinnung von Rinderspenderblut.

Frau Dr. Katharina Sobotta gilt mein herzlicher Dank für die Bereitschaft eine Kooperation mit mir einzugehen und mir im Tausch von humanen Makrophagen, Rindermakrophagen zur Verfügung zu stellen.

Ich danke den Mitarbeitern des nationalen Referenzlabors für Chlamydien für die Bereitstellung der hier genutzten Chlamydienstämme und ihre Unterstützung. Insbesondere danke ich Frau Sabine Scharf recht herzlich für die Unterstützung bei der Anzucht der Chlamydien und die Bereitstellung ihrer Kenntnisse und Erfahrung im Umgang mit Chlamydien und ihrer Beurteilung.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Infektionsimmunologie des Instituts für molekulare Pathogenese, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena gilt mein ganz besonderer Dank. Frau Christin Kühnert danke ich für die Bearbeitung und Tabellarisierung meiner Proben für die quantitative realtime PCR. Frau Katrin Schlehahn gilt mein Dank für die Bearbeitung meiner Proben für die quantitative reverse transkriptase realtime PCR. Beiden danke ich zusätzlich recht herzlich für die gute und freundliche Zusammenarbeit und die Hilfe in allen Bereichen

des Laboralltags. Frau Dr. Maria Braukmann gilt mein herzlicher Dank für ihre Unterstützung bei meinen Versuchen, sowie für die Bereitstellung ihres umfangreichen Wissens, die Beantwortung meiner Fragen und den sehr freundlichen und lieben Umgang mit mir.

Prof. Dr. Elisabeth M. Liebler-Tenorio Leiterin der Arbeitsgruppe Pathologie und Pathophysiologie mit dem Forschungsbereich Pathologie und Elektronenmikroskopie aus dem Institut für molekulare Pathogenese, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena und ihren Mitarbeitern danke ich für die Bearbeitung und Beurteilung meiner Proben für die Elektronenmikroskopie und die Bereitstellung der daraus entstandenen Bilder. Herrn Wolfram Maginot danke ich recht herzlich für die Bearbeitung meiner Mikroskopiebilder, der ihnen zu einem professionellen Aussehen verhalf. Frau Sabine Lied und Frau Lisa Wirker danke ich für die Erlaubnis der Nutzung ihrer Labore, die Bereitstellung ihres umfangreichen Wissen und die mentale Unterstützung in allen Bereichen des Lebens.

Frau Beate Burkert aus dem Institut für molekulare Pathogenese, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena danke ich für die Bereitstellung ihrer Zentrifuge und ihres Tecan Platten-Readers.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Teilnehmern der Mittagsrunde im Institut für molekulare Pathogenese, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena für die netten Gespräche, Rezepte und die Erholung von dem oft stressigen Laboralltag bedanken.

Meinen Doktorandenkollegen Katharina Sobotta, Katharina Bonkowski, Nadine Schmidt, Sarah Stalb, Anja Zigan, Gudrun Walter, Christina Polasky und Annette Prohl danke ich ganz besonders für die seelische, technische und wissenschaftliche Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft. Frau Dr. Annette Prohl gilt mein extra Dank für die Einarbeitung in das Statistikprogramm ‚R‘, ihre weitreichende Unterstützung bei der Bearbeitung meiner Statistikprobleme, ihre Freundschaft und ihre Bereitschaft auch mal ‚Schabernack‘ zu treiben.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich auch an Frau PD Dr. med. vet. Roswitha Merle Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Veterinär-Epidemiologie und Biometrie, Freie Universität Berlin richten, die mir sehr umfangreich bei der Auswertung meiner Daten aus der quantitativen reverse transkriptase realtime PCR geholfen hat.

Meinem Freund Timo Siempelkamp möchte ich aus tiefstem Herzen für seine Unterstützung, Motivation und sein Verständnis danken. Ohne ihn hätte ich mich nach einem tragischen Schicksalsschlag nicht zum Weitermachen aufraffen können.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer mit allem, was ich brauchte unterstützt haben. Für ihr Verständnis, dass ich weniger Zeit für sie hatte und für das ständige Nachfragen und Bezeugen von Interesse und die daraus entstehende Motivation weiterzumachen.

Abschließend möchte ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Teilnahme am Verbundprojekt Zoonotische Chlamydien und die Bereitstellung der finanziellen Mittel danken.

**SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.  
Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch  
genommen habe.

Berlin, den 13.04.2018

Kirstin Hillarius









9 783863 878962



**mbv**berlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-896-2