

4. Diskussion

Die Lunge wäre ständig Entzündungsprozessen ausgesetzt, wenn es nicht ein gut funktionierendes lokales Abwehrsystem gäbe. Diese Keimabwehr wird unter anderem vom alveolaren Surfactant ausgeübt, das in den Typ II Pneumozyten synthetisiert und als Lamellarkörper konstitutiv bzw. stimuliert in den Alveolus ausgeschieden wird [76]. Nur ein geringer Teil des sezernierten Surfactant stammt aus der de novo Synthese. Der überwiegende Teil resultiert aus der Wiederaufnahme (Endozytose) von bereits sezerniertem „gebrauchten“ Surfactant. Der Surfactanthaushalt, Synthese, Sekretion, Wiederaufnahme, intrazellulärer Transport (Rezyklierung) bzw. Abbau, wird streng kontrolliert. Störungen in diesem Gleichgewicht führen zur Veränderung der Surfactantzusammensetzung. Dies kann einer der Gründe sein, dass die Barrierewirkung des Alveolarepithels beeinträchtigt wird [77].

C. pneumoniae verursacht Atemwegserkrankungen und stellt einen relevanten Pneumonie auslösenden Erreger dar. Über die verschiedenen Einflüsse eines Pathogens auf den Surfactanthaushalt ist wenig bekannt. Unsere Untersuchungen sollen zur Klärung beitragen, ob und wie an mit *C. pneumoniae* infizierten Typ II Zellen die Surfactantaufnahme, der intrazelluläre Surfactanttransport sowie die Surfactantsekretion beeinträchtigt werden. Es wurde geprüft, ob Zytoskelettveränderungen hierbei Einflüsse zeigen.

4.1 Surfactantaufnahme und intrazellulärer Surfactanttransport

Es wurden relativ kurze Inkubationszeiten von 3, 6 und 12 Stunden mit *C. pneumoniae* an drei Stunden kultivierten Typ II Zellen gewählt, da Shannon et al. [78] zeigen konnten, dass Typ-II-Pneumozyten nach zwei bis fünf Tagen in Kultur Typ-II-pneumozytenspezifische Eigenschaften verlieren und Typ-I-pneumozytentypische Eigenschaften annehmen. Aufgrund der Typ-II-Pneumozyten-spezifischen Eigenschaft der Surfactantsynthese konnten so keine längeren Inkubationszeiten untersucht werden.

Die biochemischen Experimente, deren Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden, wurden parallel zu confocal laser scan mikroskopischen (CLSM) Untersuchungen der Arbeitsgruppe Wissel durchgeführt. Bei den mikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* von Typ-II-Pneumozyten aufgenommen werden und abhängig von der Inkubationszeit in verschiedenen Kompartimenten der Zellen nachzuweisen sind. Nach kurzer Infektionszeit (drei und sechs Stunden) war eine Lokalisation der intrazellulären Bakterien in Frühen (Early) Endosomen erkennbar [79].

Ähnliche Ergebnisse wurden bei Infektionen verschiedener Zellen mit *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pneumoniae* erhalten [80,81].

Weitere CLSM-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben das nach drei Stunden *C. pneumoniae* Inkubation, das SP-A vermittelte aufgenommene Lipid auch in Frühe Endosomen gelangte. Die lokalisorische Übereinstimmung der internalisierten Bakterien und des Surfactant in Frühen Endosomen lassen die Schlussfolgerung eines Kontaktes während der Frühphase der Infektion zu. Nach einer längeren Infektionszeit von 12 Stunden ließen sich die Bakterien im perinukleären Kompartiment nachweisen, während Surfactantlipid hier nicht darstellbar war [79].

In der vorliegenden Arbeit stellten wir in biochemischen Untersuchungen an 3, 6 und 12 Stunden infizierten Typ II Zellen eine erhöhte SP-A vermittelte Surfactantlipidaufnahme im Vergleich zu nicht infizierten Zellen fest (siehe 3.1). Ohne SP-A waren keine Unterschiede in der Surfactantlipidaufnahme zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen erkennbar.

Wir konnten zeigen, dass ein möglicher 10%iger Anteil von Makrophagen in der Typ II Zellpräparation die Surfactantaufnahme bei Typ II Zellen nicht signifikant verändert.

Die Feststellung der erhöhten Surfactantlipidaufnahme bei infizierten Pneumozyten lassen noch keinen Schluss auf die Ursachen dieses Ergebnisses zu. Hier musste geklärt werden, ob es sich um eine „echte“ erhöhte SP-A vermittelte Lipidaufnahme oder um einen intrazellulären Surfactantstau handelt. Zur Klärung dieser Fragestellung führten wir sog. Resekretionsversuche (Surfactantransportversuche) durch (siehe 3.3). Wir stellten fest, dass nach 3 und 12 Stunden Infektion mehr als 90% des Surfactantlipid in den Zellen verblieb. Ohne Infektion hingegen verließen mehr als 30% des SP-A-vermittelten Surfactantlipids die Zellen.

Mittels CLSM wurde nachgewiesen, dass sich nach drei Stunden *C. pneumoniae* Infektion das Surfactant in Frühen Endosomen der Typ II Pneumozyten staute. Die Bakterieninfektion verhinderte den Weitertransport des aufgenommenen Surfactantlipid zu Späten (Late) Endosomen, Lysosomen und Lamellarkörpern . Die Bakterien ließen sich weder in Kontakt mit Späten Endosomen, Lysosomen noch mit Lamellarkörper nachweisen [79].

Eine Überlebensstrategie dieser Bakterien ist der Schutz vor Fusion mit lysosomalen Kompartimenten [82].

Somit scheint sich die oben formulierte Möglichkeit einer scheinbar gesteigerten Surfactantaufnahme bei infizierten Zellen in Anwesenheit von SP-A mit dem gehemmten intrazellulären Transport des Surfactant erklären zu lassen.

Unter Zuhilfenahme der CLSM Ergebnisse kann eine Hemmung des intrazellulären Weitertransportes sowohl von Frühen Endosomen zu Späten Endosomen und Lamellarkörper als auch von Frühen Endosomen auf dem schnellen Rezyklierungsweg zur Plasmamembran der Typ II Pneumozyten postuliert werden [79].

Um Ursachen für einen Surfactantstau zu erkennen prüften wir, ob durch die *C. pneumoniae* Infektion Zytoskelettstrukturen der Typ II Zellen verändert werden, die ursächlich sein könnten für die Hemmung im Surfactanttransport. Hierzu nutzten wir die Stabilisatoren des β -Mikrotubulin Zytoskelett (Paclitaxel) und des F-Actin Zytoskelett (Phalloidin) in Surfactantaufnahmeversuchen und Resekretionsassays. Wir stellten fest, dass Paclitaxel den

Surfactantstau bei infizierten Zellen verhinderte, während Phalloidin keine Wirkung zeigte. Hieraus schlossen wir, dass Veränderungen des β -Mikrotubulin Zytoskelett nach Infektion zum Stau des aufgenommenen Surfactantlipid führen. Wahrscheinlich spielen Veränderungen von F-Actinstrukturen hierbei keine Rolle.

Mittels CLSMikroskopie konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass die Infektion der Typ II Pneumozyten mit *C. pneumoniae* zu Veränderungen des F-Aktin und des β -Mikrotubulin Zytoskelett führte [79].

Auch andere Arbeitgruppen wiesen nach, dass einige Bakterien, wie zum Beispiel auch *Chlamydia trachomatis*, das Zytoskelett verändern, um in die Wirtszellen zu gelangen und sich in diesen zu vermehren [83-85]. Die Rolle des Zytoskeletts bei Infektionen von Wirtszellen ist gut beschrieben für eine Infektion epithelialer Zellen mit *Chlamydia trachomatis* [42], Unklarheit herrscht bislang über den Einfluss einer *Chlamydia pneumoniae* Infektion auf das Zytoskelett der Wirtszelle. Gezeigt werden konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse in Vergleich zur parallel durchgeführten mikroskopischen Untersuchung mittels CLSM, dass bei nicht mit zytoskelettstabilisierenden Substanzen inkubierten Zellen kein Kontakt des Pathogens mit den lysosomalen Kompartimenten und den Späten Endosomen stattfand, wohingegen stabilisierte zytoskelettale Strukturen mit Phalloidin und/oder Paclitaxel einen Kontakt der Bakterien zu Lysosomen und den Späten Endosomen ermöglichten. Hieraus läßt sich zum einen ein Überlebens- und Fortpflanzungsschutz des Pathogens im Wirtsorganismus und zum anderen eine Option zur Störung intrazellulärer Neuarrangements durch Pathogene ableiten.

4.2 Surfactantsekretion

Wir wiesen nach, dass die basale Surfactantsekretion bereits nach 3 Stunden Infektion mit *C. pneumoniae* stimuliert wurde. Die Vorinkubation der Typ II Zellen mit Phalloidin (hemmt die F- zu G-Aktin Umwandlung) mit anschließender *C. pneumoniae* Infektion bewirkte eine Hemmung der stimulierten Sekretion. Paclitaxel, der β -Tubulin Zytoskelettstabilisator hatte keinen Einfluss auf die *C. pneumoniae* vermittelte stimulierte Surfactantsekretion. Somit kann ein Zusammenhang zwischen der infektionsbedingt stimulierten Surfactantsekretion und der Veränderungen des F-Aktin Zytoskelett postuliert werden.

Verschiedene Studien unterstreichen den Zusammenhang von zytoskelettalen Veränderungen des Aktins nach mechanischen und bakteriellen Toxin Einflüssen auf Typ II Pneumozyten mit nachfolgender stimulierter Surfactantsekretion [86]. Seit längerem ist bekannt, dass verschiedenste Surfactantstimulie bewirken, dass sich das in den Lamellarkörper gespeicherte Surfactant über die Plasmamembran entleert. Seit kurzem wissen wir, dass bei dieser Entleerung eine zytoskelettale Barriere zu überwinden ist. Diese Barriere wird u.a. überwunden durch Reorganisation des F-Aktin Zytoskelett unter Beteiligung von Annexin II Proteinen [87].

4.3 Möglicher Einfluss der *C. pneumoniae* auf Schwankungen im Surfactanthaushalt

Das den Alveolarraum auskleidende Surfactant wird zum großen Teil konstitutiv oder auf einen Stimulus hin aus den Lamellarkörpern in den Alveolus sezerniert und entfaltet sich dort zu tubulärem Myelin. „Gebrauchtes“ Surfactant aus dem Alveolarraum wird durch Typ II Zellen wieder aufgenommen und den Lamellarkörpern zugeführt. Nur ein kleiner Teil des gespeicherten Surfactant in den Lamellarkörpern stammt aus der de novo Synthese [45-48].

Darauf Bezug nehmend haben die Arbeitsgruppen Stevens und Wissel gezeigt, dass SP-A und Surfactantlipid über den Endozytoseweg der Typ-II-Zellen, über clathrin-coated-pit in Frühe Endosomen gelangen [68,69]. Ein Teil des Lipids und des SP-A wird über recycling vesicles auf einem schnellen Transportweg wieder aus der Zelle resezerniert. Der überwiegende Teil des

Surfactantlipid wird über Späte Endosomen zu den Lamellarkörpern transportiert [69] bzw. ein kleiner Teil wird in Lysosomen abgebaut und der Surfactantsynthese zugeführt. Die Identifizierung der Frühen Endosomen, der peripheren Recyclingvesikel (peripheral recycling vesicles), der Späten Endosomen, der Lysosomen und der Lamellarkörper erfolgte mit speziellen

Antikörpern, wie in Abbildung 8A dargestellt.

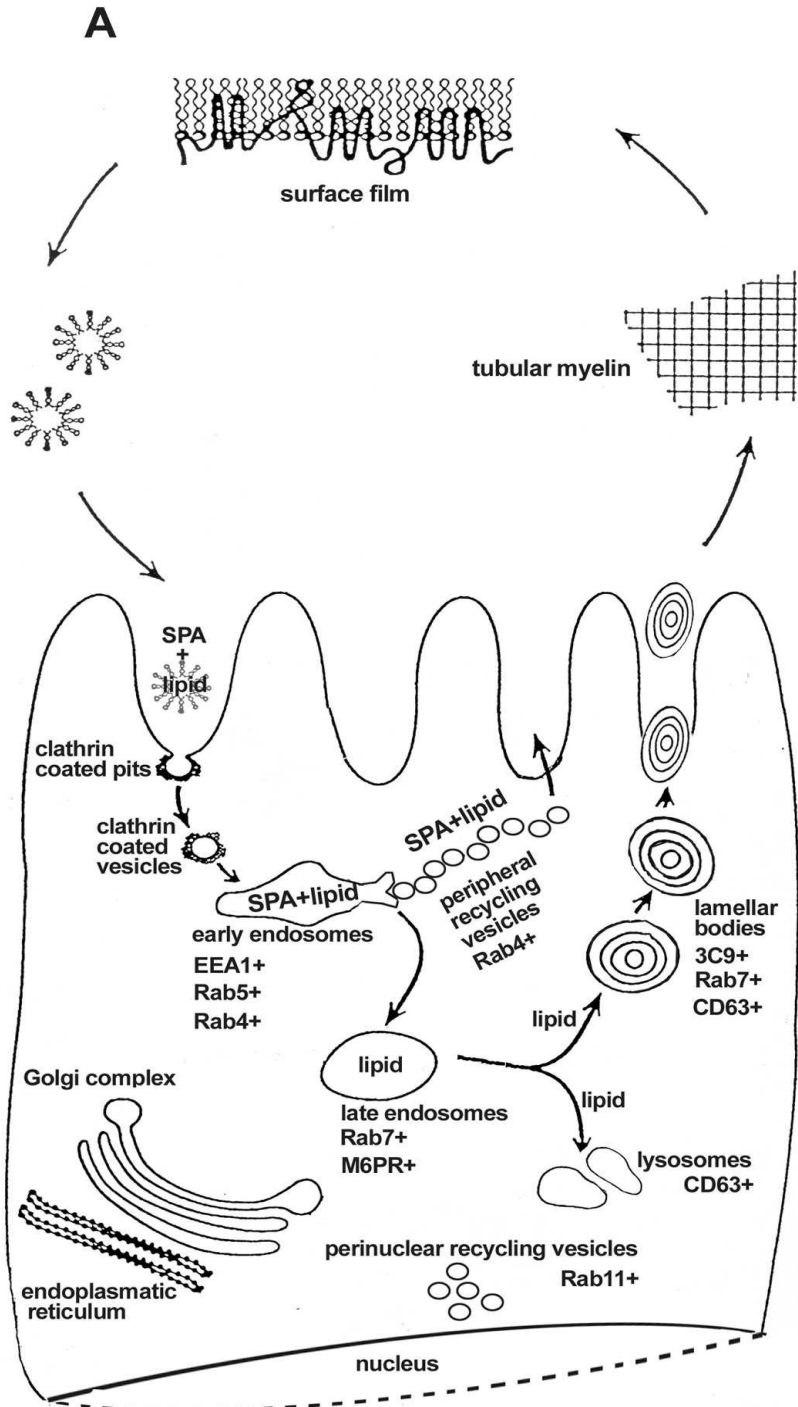


Abbildung 8A

Identische Abbildung mit Legende in Kapitel 1, hier Darstellung zum Vergleich mit der Darstellung der Veränderungen nach *Chlamydia pneumoniae* Infektion in Abbildung 6 B

Wir konnten mit zwei unterschiedlichen experimentalen Ansätzen, mit Hilfe biochemischer Assays und mit der CLSMikroskopie den resultierenden Einfluss der *C. pneumoniae* auf den intrazellulären Surfactanttransport aufzeigen [79].

Wir wiesen nach, dass die Infektion der Typ II Zellen mit *C. pneumoniae* die SP-A vermittelte Surfactantaufnahme nicht hemmt, jedoch aber die Rezyklierung, den intrazellulären Transport des Surfactantlipid zu Lamellarkörper und direkt zur Plasmamembran und gleichzeitig die Surfactantsekretion stimuliert. Der verursachte Surfactantstau und die stimulierte Surfactantsekretion könnten möglicherweise im Laufe der Zeit zur Hemmung der Speicherung des Surfactant in Lamellarkörper bzw. bis hin zum Erlöschen der Surfactantsekretion führen, wie in Abbildung 8B dargestellt. Desweiteren sind durch den in den frühen Endosomen bedingten Surfactantstau die Zellen dann möglicherweise nicht lange in der Lage, gebrauchtes Surfactant aus dem Alveolarraum aufzunehmen.

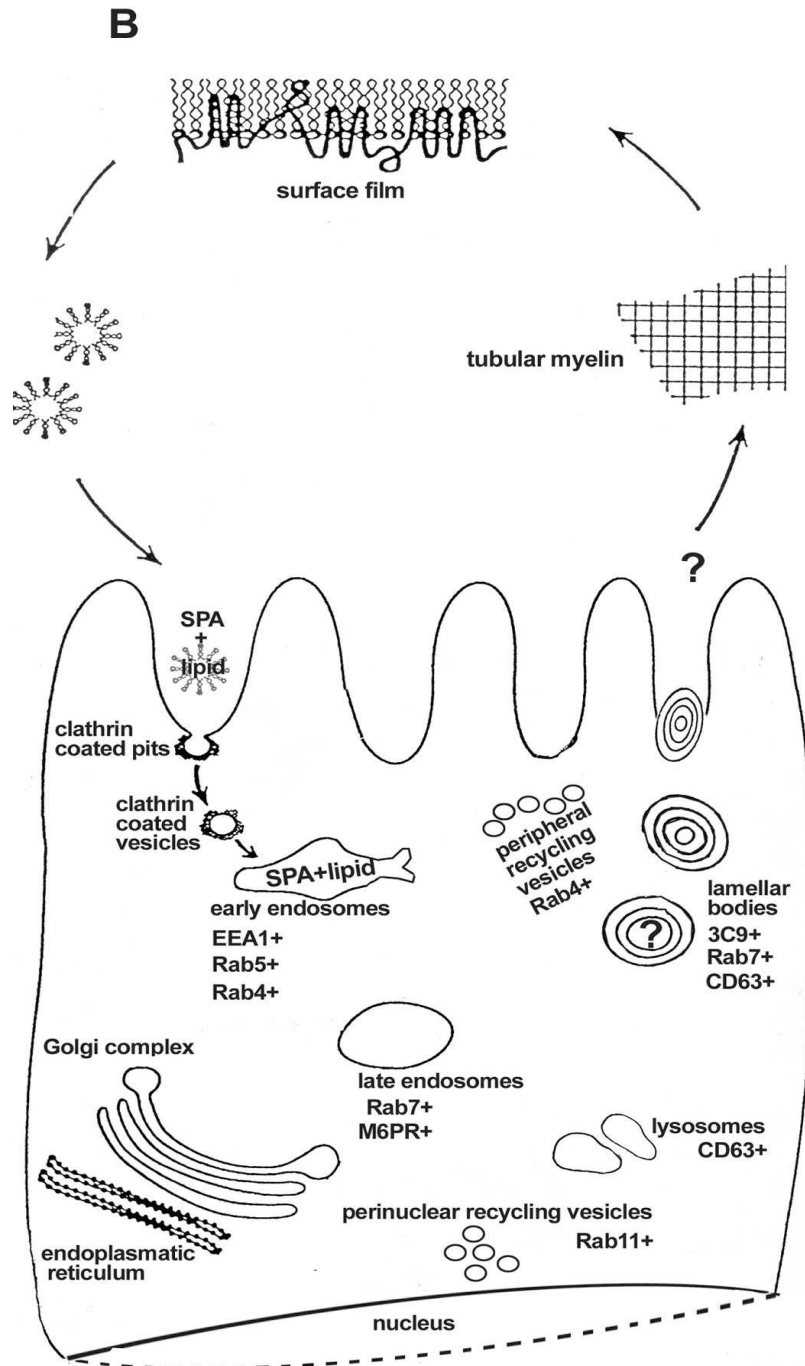


Abbildung 8B

Dargestellt werden die subzellulären Kompartimente der Typ-II-Zelle, welche am physiologischen Surfactant-turnover beteiligt sind und der postulierte Weg des Surfactant von

der Synthese bis zur Wiederaufnahme und dem Rezykling unter dem Einfluss einer Chlamydia pneumoniae Infektion. Angegeben sind ferner Oberflächenantigene der einzelnen Kompartimente zur immunhistochemischen Darstellung. Im Vergleich zur Abbildung 8 A stellt sich ein unterbrochener Transport von den Frühen Endosomen zu den Späten Endosomen und den peripheren Rezyklingvesikeln sowie von den Späten Endosomen sowohl zu den Lysosomen als auch den Lamellarkörpern dar. Erläuterungen im Text.

Schwankungen in der alveolaren Konzentration des Surfactant sind nicht nur für die Aufrechterhaltung der Atmung bedeutsam, sondern spielen auch eine wesentliche Rolle beim Schutz des Organismus vor Fremdpartikeln und Pathogenen. Veränderungen in der Surfactantzusammensetzung wurden bei verschiedenen humanen Lungenerkrankungen, wie z.B. auch bei bakterieller Pneumonie, mit Abbau von Surfactantproteinen und Surfactantlipiden in der Diagnostik mittels BAL erkannt [88,89]. Insofern könnten die vorliegenden Ergebnisse als Modell für die Pathophysiologie der Entzündung auch durch andere intrazelluläre Erreger Verwendung finden.

4.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Rupp et al. [90] wiesen nach, dass bei chronischen Infektionen der Atemwege die Typ-II-Pneumozyten die Zielzellen der Chlamydia pneumoniae Infektion sind. Bei akuten respiratorischen Infektionen fand man keine C. pneumoniae in den Typ II Zellen.

Andere Studien zeigten, dass gerade bei Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen, wie COPD und Asthma bronchiale, eine signifikant höhere Seroprävalenz von Antikörpern gegen Chlamydia pneumoniae und Mycoplasma pneumoniae nachweisbar war [91]. Bei Kindern mit therapierefraktären Bronchitiden und Pneumonien konnte die Assoziation von C. pneumoniae-Infektionen mit dem Krankheitsverlauf und der Krankheitsschwere bei Vorliegen vorwiegend bakterieller Zweitinfektionen gezeigt werden [92]. Gemeinsam mit der Arbeit von Hahn et al. [15], die den Zusammenhang einer akuten Infektion mit Chlamydia pneumoniae und der signifikanten Assoziation eines daraus resultierenden Asthma bronchiale beschrieb, kann man

hier die Notwendigkeit genauerer Diagnostik bei Infektionen der unteren Atemwege hinsichtlich der Folgeerkrankungen erkennen.

Bei akuten *C. pneumoniae* Infektionen der Lungen könnte es sein, dass die Bakterien schon vorher in den höheren Luftwegen durch die hier vorhandene Immunabwehr unschädlich gemacht werden. Durch die Passagebehinderung in den oberen Luftwegbereichen erreichen die Bakterien nicht Typ II Pneumozyten. Der Surfactanthaushalt dieser Zellen dürfte in diesem Fall, wenn nicht weitere Infektionen vorliegen, nicht gestört sein. Diese Annahme wird unterstützt durch Feststellungen, dass SP-A und SP-D in vitro die Phagozytose von *Chlamydia pneumoniae* durch die Makrophagen-ähnlichen Zelllinie (THP-1) verstärken [93], was eine Unschädlichmachung des Pathogens bereits vor Invasion in die Typ-II-Pneumozyten zur Folge hat.

Andererseits konnten Shemer- Avni et al. [94] in einem in- vitro- Modell zeigen, dass *Chlamydia pneumoniae*, selbst in durch UV-Strahlen inaktivierter Form, zu einer kompletten Ziliostasis der Bronchialepithelzellen innerhalb von 48 Stunden führen, was als Hinweis auf eine mögliche Passageerleichterung in tiefer gelegene Lungenabschnitte gewertet werden kann.

Es wurde nachgewiesen, dass bei Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* Blutmonozyten verstärkt aktiviert wurden, verbunden mit der Umwandlung zu Alveolarmakrophagen [95]. Die Alveolarmakrophagen sezernierten gesteigert Zellmediatoren wie das pro-inflammatorische Zytokin $TNF\alpha$ und das Interleukin $IL-1\beta$. Beide spielen in der lokalen Immunantwort des Lungenparenchyms eine ausschlaggebende Rolle [96]. Jedoch, die Entwicklung und Vermehrung von *C. pneumoniae* in den Alveolarmakrophagen wird dadurch wahrscheinlich nicht verhindert [95,96].

Desweiteren weiß man, dass an einer pro-inflammatorischen Immunantwort so genannte pattern recognition Rezeptoren beteiligt sind, zu denen Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir nachweisen, dass der Kontakt von *C. pneumoniae* mit Typ II Pneumozyten von Ratten zur TLR4 Expression mit anschließender Aktivierung von NF- κ B und Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins $TNF\alpha$ und des Chemokins MIP-2 führt [97]. Das könnte folglich auch bedeuten, daß die Typ II Pneumozyten über die TLR Aktivierung selbst in der Lage sind die *C. pneumoniae* Infektion und mutmaßlich auch andere Pathogene abzuwehren.

Das lokale Abwehrsystem in der Lunge wirkt sehr komplex. Sowohl Surfactantproteine als auch Surfactantlipide sind an der Immunabwehr beteiligt bzw. sie können sie auch hemmen, wie bereits in der Einleitung Kapitel 1.2.3 ausführlich beschrieben wurde. Störungen im Surfactanthaushalt spielen somit eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der Infektion.

Typ II Pneumozyten Infektionen mit *C. pneumoniae* könnten entstehen, wenn der Surfactanthaushalt und damit die Barrierefunktion des Surfactant, durch verschiedene Einflüsse bedingt, bereits beeinträchtigt ist. Die *C. pneumoniae* Infektion bzw. Co-Infektionen mit anderen Bakterien könnten somit zu chronischen Pneumonien mit schweren Surfactanthaushaltstörungen führen.

Obwohl hier nur *in vitro* Ergebnisse vorliegen, bieten sie doch Erklärungs- und Verständnismöglichkeiten für die Typ II Pneumozyten Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* bei chronischer respiratorischer Infektion.

Folgeuntersuchungen *in vivo* sind wünschenswert. So böten Infektionsmodelle bei Tieren bei der Beobachtung der Interaktionen von *C. pneumoniae* mit pulmonalen Zellen durch Analyse von Genom und Proteinstrukturen sowie der Detektion der Orte der Inkorporation der Erreger Aufklärung. Hierdurch könnten Voraussetzungen zur Entwicklung neuer Therapie- und Prophylaxekonzepte chronischer und gegebenenfalls auch akuter Lungenerkrankungen geschaffen werden.