

**Charakterisierung zellautonomer Selbstverteidigung  
und pathogenvermittelter Gegenwehr in *Coxiella burnetii*-infizierten  
dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen**

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von

**Svea Matthiesen**

Greifswald, 18.01.2021

Dekan: Prof. Dr. Gerald Kerth  
Erster Gutachter: PD Dr. Michael R. Knittler  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Rödel  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Oliver Daumke  
Tag der Promotion: 17.05.2021

» *För mien Öllers* «

» **Es macht die Wüste schön** «, sagte der kleine Prinz,  
» **dass sie irgendwo einen Brunnen birgt.** «

(Der kleine Prinz, Antoine de Saint-Exupéry)



## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 <i>Coxiella burnetii</i></b> .....	<b>8</b>
1.1.1 Taxonomie und Krankheitsbild .....	8
1.1.2 Biphasischer Lebenszyklus .....	10
1.1.3 Virulenzfaktoren und Wirts-Pathogen-Interaktionen.....	12
<b>1.2 Das Immunsystem</b> .....	<b>14</b>
1.2.1 Das angeborene Immunsystem.....	15
1.2.2 Das adaptive Immunsystem .....	16
1.2.3 Die Rolle dendritischer Zellen im Immunsystem .....	17
1.2.4 Die Mechanismen der MHC I-Antigenpräsentation.....	19
1.2.5 Die Funktion von NK-Zellen im Immunsystem .....	20
1.2.6 Immunzellfunktionen und -metabolismus unter Hypoxie.....	22
1.2.7 Die Immunbiologie einer <i>C. burnetii</i> -Infektion .....	23
<b>1.3 Zellautonome Abwehrmechanismen des Immunsystems</b> .....	<b>26</b>
1.3.1 Die Funktionen des GTPase-Systems.....	27
1.3.2 Die Funktionen des NOX2/ROS-Systems .....	28
1.3.3 Die Funktionen des iNOS/NO-Systems .....	28
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>30</b>
<b>2. Material</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1 Biologisches Material</b> .....	<b>32</b>
2.1.1 Bakterienstämme .....	32
2.1.2 Zellen und Zelllinien .....	32
<b>2.2 Medien und Medienzusätze</b> .....	<b>32</b>
<b>2.3 Chemikalien und Reagenzien</b> .....	<b>33</b>
<b>2.4 Antikörper</b> .....	<b>34</b>
2.4.1 Primärantikörper.....	34
2.4.2 Sekundärantikörper .....	35
2.4.3 Neutralisierende Antikörper .....	36
<b>2.5 Inhibitoren, Induktoren und Fluorophore</b> .....	<b>36</b>
<b>2.6 Sequenzen</b> .....	<b>37</b>
2.6.1 Primersequenzen .....	37
2.6.2 siRNA Sequenzen.....	37

---

2.6.2 CRISPR/Cas9 Sequenzen .....	38
<b>2.7 Kits .....</b>	<b>38</b>
<b>2.8 Glaswaren.....</b>	<b>38</b>
<b>2.9 Plastikwaren .....</b>	<b>38</b>
<b>2.10 Verbrauchsmaterial.....</b>	<b>39</b>
<b>2.11 Geräte .....</b>	<b>39</b>
<b>2.12 Wissenschaftliche Software .....</b>	<b>40</b>
<b>3. Methoden.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Zellkulturmethoden.....</b>	<b>41</b>
3.1.1 Auftauen von Zellen .....	41
3.1.2 Kultivierung von Zellen .....	41
3.1.3 Passagieren von Zellen.....	42
3.1.4 Kryokonservierung von Zellen .....	43
3.1.5 Kontrolle der Zellen auf Mykoplasmenkontamination.....	43
3.1.6 Arbeiten unter Hypoxie.....	44
<b>3.2 Arbeiten mit <i>C. burnetii</i>.....</b>	<b>46</b>
3.2.1 Herstellung eines <i>C. burnetii</i> -Stocks.....	46
3.2.2 Titerbestimmung eines <i>C. burnetii</i> -Stocks .....	47
3.2.2.1 Titerbestimmung eines <i>C. burnetii</i> -Stocks mittels Real Time-PCR.....	48
3.2.2.2 Titerbestimmung eines <i>C. burnetii</i> -Stocks mittels Durchflusszytometrie .....	49
3.2.3 Infektion von Zellen .....	50
3.2.4 Reinfektionsassay .....	51
3.2.5 Neutralisationsassay .....	51
<b>3.3 Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>52</b>
3.3.1 Immunfluoreszenzmikroskopie .....	52
3.3.2 Transmissionselektronenmikroskopie.....	53
3.3.3 Durchflusszytometrie.....	54
3.3.4 Untersuchung des Einflusses von Fc-Rezeptoren .....	56
3.3.5 Messung der Autophagosomen.....	56
3.3.6 Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_M$ ) .....	57
3.3.7 Bestimmung des Anteils reaktiver Sauerstoffspezies .....	57
3.3.8 Live Cell Imaging.....	58
<b>3.4 Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>59</b>
3.4.1 Herstellung von Zelllysaten .....	59
3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	61
3.4.3 Western-Blot-Analyse.....	62

3.4.4 Zytokinarray .....	63
3.4.5 Identifizierung von MHC-gebundenen Peptiden mittels nLC-MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie .....	63
3.4.6 Griess-Assay .....	65
3.4.7 L-Laktat-Assay .....	66
3.4.8 IFN- $\gamma$ und TGF- $\beta$ -Zytokin-ELISA .....	66
3.4.9 Nachweis von Granzym-B .....	67
<b>3.5 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>67</b>
3.5.1 RNA-Isolation .....	67
3.5.2 Reverse Transkription .....	68
3.5.3 Semiquantitative PCR .....	69
3.5.4 Real Time-PCR .....	69
3.5.5 siRNA-vermittelter <i>knock down</i> .....	70
3.5.6 CRISPR/Cas9-vermittelter <i>knock out</i> .....	71
<b>3.6 Statistische Analyse .....</b>	<b>72</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>73</b>
4.1 Charakterisierung der <i>C. burnetii</i> -Infektion von DCs .....	73
4.2 Untersuchung der MHC I-Antigenpräsentation <i>C. burnetii</i> -infizierter DCs .....	79
4.3 Immunsubversion <i>C. burnetii</i> -infizierter DCs .....	80
4.3.1 TGF- $\beta$ -vermittelte MHC I-Suppression <i>C. burnetii</i> -infizierter DCs .....	80
4.3.2 Induktion des TGF- $\beta$ -aktivierenden $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrins in infizierten DCs .....	82
4.4 Aufhebung TGF- $\beta$ -vermittelter MHC I-Suppression <i>C. burnetii</i> -infizierter DCs .....	84
4.4.1 Interferon-vermittelte MHC I-Induktion infizierter DCs .....	84
4.4.2 IFN- $\gamma$ -Einfluss auf Antigenpräsentation und $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrin-Expression infizierter DCs .....	85
4.4.3 IFN- $\gamma$ -Einfluss auf Etablierung und Infektiosität von <i>C. burnetii</i> in DCs .....	88
4.4.4 Einflussnahme von Ph I- und II-LPS bei MHC I-Suppression <i>C. burnetii</i> -infizierter DCs ...	90
4.5 IFN- $\gamma$ -regulierte Abwehr <i>C. burnetii</i> -infizierter DCs .....	92
4.5.1 Beteiligung von NOX2/ROS bei der anti- <i>C. burnetii</i> Abwehr infizierter DCs .....	93
4.5.2 Rolle des iNOS/NO-Systems während der <i>C. burnetii</i> -Infektion in DCs .....	94
4.5.2.1 Charakterisierung des iNOS/NO-Systems in <i>C. burnetii</i> -infizierten DCs .....	95
4.5.2.2 iNOS/NO-vermittelte Selbstverteidigung <i>C. burnetii</i> -infizierter DCs .....	100
4.5.2.3 Charakterisierung von iNOS/NO während der <i>C. burnetii</i> -Infektion primärer DCs .....	103
4.5.2.4 Auswirkung reduzierter/fehlender iNOS-Induktion auf die <i>C. burnetii</i> -Infektion von DCs .....	107

---

4.5.3 Rolle des bakteriellen DotA bei der <i>C. burnetii</i> -Infektion in DCs .....	120
4.5.4 Bedeutung von iNOS/NO während der <i>C. burnetii</i> -Infektion in Makrophagen.....	124
4.6 Bedeutung von iNOS/NO für die anti- <i>C. burnetii</i> Abwehr hypoxischer DCs .....	129
4.7 Funktionelle Aufgabe von NK-Zellen in der anti- <i>C. burnetii</i> Abwehr.....	138
4.7.1 Charakterisierung der <i>C. burnetii</i> -Wirtszell-Interaktion infizierter NK-Zellen.....	139
4.7.2 Funktionale Reifung und Aktivierung <i>C. burnetii</i> -infizierter NK-Zellen.....	143
4.7.3 Freisetzung infektiöser Bakterienstrukturen durch Degranulierung infizierter NK-Zellen.	145
4.7.4 Resistenz von <i>C. burnetii</i> gegenüber der zellulären Abwehr infizierter NK-Zellen.....	148
4.7.5 Charakterisierung der anti- <i>C. burnetii</i> Abwehr in primären NK-Zellen.....	153
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>158</b>
5.1 Mechanismen der Immunsubversion <i>C. burnetii</i> -infizierter DCs .....	158
5.2 Aktivierung zellulärer Selbstverteidigung <i>C. burnetii</i> -infizierter DCs.....	161
5.3 Bakterielle Gegenstrategien und hypoxischer Einfluss auf die zelluläre Selbstverteidigung <i>C. burnetii</i> -infizierter DCs.....	167
5.4 Funktion von NK-Zellen in der anti- <i>C. burnetii</i> Abwehr .....	171
5.5 Übersichtsmodell zur funktionalen Kooperation von DCs und NK-Zellen in der frühen Abwehr von <i>C. burnetii</i> .....	175
5.6 Ausblick für weiterführende Untersuchungen .....	176
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>178</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>207</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>210</b>
<b>Publikationen und Kongressbeiträge.....</b>	<b>212</b>

## Zusammenfassung

Der Erreger des Q-Fiebers ist *C. burnetii*, ein zoonotisches intrazelluläres Bakterium. Die Gram-negativen Coxiellen kommen in zwei verschiedenen antigenen Lipopolysaccharid (LPS)-Formen vor: als virulente Ph I-LPS- und/oder avirulente Ph II-LPS-Bakterien. *C. burnetii* wird durch Kontakt mit infizierten Tieren sowie infektiösen Stäuben übertragen. Akute fiebrige Infektionen können beim Menschen im weiteren Verlauf eine Pneumonie oder Hepatitis auslösen. Zu einem geringen Prozentsatz entstehen chronische Infektionen mit persistierenden Coxiellen. Eine *C. burnetii*-Infektion bewirkt sowohl eine humorale als auch zelluläre Immunantwort. Neben Monozyten und Makrophagen dienen auch dendritische Zellen (DCs) den Coxiellen als geeignete Wirtszellen. DCs gehören zu den Immunzellen der *first-line-of-defense* des angeborenen Immunsystems und treten während einer Coxiellen-Infektion ebenso wie die mit ihnen kooperierenden natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) früh mit dem aufgenommenen bakteriellen Pathogen in Kontakt. Durch Antigenpräsentation infizierter DCs wird die für die anti-Coxiellen Abwehr maßgebliche T-Zell-Immunität initialisiert und die nachgeschaltete Immunantwort funktional ausgerichtet.

Trotz dieser zentralen Immunfunktion sind die zellulären Vorgänge von DCs während einer *C. burnetii*-Infektion, insbesondere mit Blick auf die zelluläre Selbstverteidigung gegenüber den vermutlich initial auftretenden Ph II-LPS-Varianten, nicht ausreichend verstanden. Zudem ist bisher nicht hinreichend geklärt, welchen Einfluss FN- $\gamma$ , das von aktivierten NK-Zellen produziert wird, sowie die Sauerstoffumgebung auf die zelluläre Abwehr infizierter APCs nimmt.

Das Forschungsziel dieser Promotionsarbeit war es daher, einen detaillierten Einblick in die Prozesse der Coxiellen-Infektionen von DCs und NK-Zellen zu erhalten und hierbei insbesondere die IFN- $\gamma$ -Wirkung auf die DC-Pathogen-Wechselwirkung sowohl unter norm- als auch hypoxischen Bedingungen zu untersuchen.

Die im ersten Teil der Promotionsarbeit durchgeführten zellbiologischen, immunologischen und proteinbiochemischen Analysen im murinen Zellsystem belegen eine pathogenausgelöste Subversion der funktionalen Aktivierung/Induktion der MHC I-Antigenpräsentation Coxiellen-infizierter DCs. Die infektionsbedingte Beeinträchtigung der MHC-Antigenpräsentation infizierter DCs lässt sich in direkter Weise auf einen autokrinen Suppressionseffekt des  $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrin-aktivierten TGF- $\beta$  und nicht auf die subversive Wirkung von Coxiellen-LPS als Virulenzfaktor zurückführen. Untersuchungen im Zusammenhang mit IFN- $\gamma$  zeigen, dass dieses Zytokin in infizierten DCs eine Wiederherstellung der MHC I-Induktion und -Oberflächenexpression bewirkt, welche mit einer funktionalen Prozessierung und MHC-Präsentation pathogener Peptidantigene verbunden ist. Weitere Studien belegen zudem, dass IFN- $\gamma$ -behandelte DCs in der Lage sind, die Etablierung/Vermehrung intrazellulärer Coxiellen negativ zu beeinflussen. Die durchgeführten siRNA- und CRISPR/Cas9-Experimente zeigen, dass die zelluläre Selbstverteidigung infizierter DCs maßgeblich durch das IFN- $\gamma$ -induzierbare iNOS/NO-System vermittelt wird. Als reaktives Stickstoffradikal scheint Stickstoffmonoxid (NO) sowohl Komponenten der bakteriellen Elektronentransportkette als auch die autophagische Ausbildung und Integrität parasitophorer Vakuolen zu beeinträchtigen. Parallel hierzu schützen sich infizierte DCs über einen metabolischen

Wechsel zur aeroben Glykolyse vor mitotoxischer NO-Wirkung und sichern so während der intrazellulären Coxiellen-Eliminierung ihr eigenes Überleben.

Weitere Untersuchungen dieser Arbeit belegen zudem, dass auch *C. burnetii* zu einer entsprechenden Gegenwehr fähig ist. Um der NO-vermittelten Abwehr infizierter DCs entgegenzuwirken, induzieren Coxiellen zur Minderung antibakterieller Radikal-Effekte ihre Cytochrom *bd*-, Katalase- und SOD-Expression. Infektionsstudien mit T4SS-defekten Coxiellen weisen ferner darauf hin, dass das bakterielle Sekretionssystem vermutlich eine wichtige Rolle bei der Wirksamkeit der NO-vermittelten Abwehr infizierter DCs spielt, da sich Coxiellen ohne intaktes T4SS offensichtlich dem negativen NO-Einfluss entziehen und/oder keine entsprechenden Angriffsziele für NO bieten. Studien *C. burnetii*-infizierter Makrophagen bestätigen, dass das iNOS/NO-System eine essenzielle antibakterielle Selbstverteidigung von APCs darstellt. So zeigen auch Makrophagen eine deutliche Beeinträchtigung intrazellulärer Coxiellen-Vermehrung unter iNOS-vermittelter NO-Synthese. Die im weiteren Verlauf der Arbeit untersuchten norm- und hypoxischen Infektionsmodelle infizierter DCs lassen vermuten, dass hypoxische Kulturbedingungen die Coxiellen dazu veranlassen, ein sporenähnliches Stadium ohne produktive Vakuolenbildung auszubilden. Diese hypoxische Überlebensform intrazellulärer Coxiellen zeichnet sich durch IFN- $\gamma$ -Resistenz, eine durch modifizierte Genexpression optimierte Sauerstoffverwertung und Radikalentgiftung sowie die Erhaltung ihrer Infektiosität aus. Dies deutet darauf hin, dass Hypoxie den intrazellulären Coxiellen weitere Möglichkeiten zur effizienten Immunevasion eröffnet, die einen unentdeckten Bakterienverbleib innerhalb infizierter Wirtszellen begünstigt und so vermutlich chronische *C. burnetii*-Infektionen fördert.

Für die Synthese und Freisetzung des APC-stimulierenden IFN- $\gamma$  sind im Zuge angeborener Immunität vor allem die mit DCs kooperierenden NK-Zellen verantwortlich. Die im zweiten Teil dieser Promotionsarbeit durchgeführten Studien zur Charakterisierung der Interaktion zwischen NK-Zellen und Coxiellen belegen, dass NK-Zellen von *C. burnetii* infiziert werden, sie jedoch die Etablierung und Replikation internalisierter Bakterien durch Ausschleusung in die extrazelluläre Umgebung unterbinden. Dieser Prozess geht mit einer funktionalen NK-Zell-Aktivierung einher, welche durch Phospho-Aktivierung der PKC  $\Theta$  sowie IFN- $\gamma$ - und Granzym B-Ausschüttung charakterisiert ist. Verschiedene mikroskopische Analysen zeigen zudem, dass die intrazellulären bakteriellen Strukturen in unmittelbarem Kontakt mit den sekretorischen Granula stehen und die Coxiellen-Freisetzung über Degranulierung infizierter NK-Zellen erfolgt. Der Abtötung innerhalb der sekretorischen Granula infizierter NK-Zellen scheint sich *C. burnetii* durch seine Säure- und Protease-Resistenz zu entziehen. Freigesetzte Coxiellen erhalten nach Degranulierung größtenteils ihre Integrität und Fähigkeit zur Infektion benachbarter Wirtszellen. Obschon Coxiellen der Eliminierung durch die sekretorischen Granula entgehen und dies eine kritische Achillesferse der angeborenen Immunantwort darstellt, verbleibt über das gleichzeitig ausgeschüttete IFN- $\gamma$  infizierter NK-Zellen ein positiver Effekt auf die antibakterielle APC-Aktivität.

In ihrer Gesamtbetrachtung tragen die erzielten Ergebnisse dieser Promotionsarbeit zu einem besseren und tieferen Verständnis der *C. burnetii*-Infektion von DCs und NK-Zellen bei und geben neue Einsichten in die zelluläre Selbstverteidigung sowie die IFN- $\gamma$ -basierte Immunkooperation innerhalb der frühen Phase der anti-Coxiellen Abwehr. Im weiteren Infektionsverlauf können jedoch diese immunologischen Prozesse durch auftretende Hypoxie vermutlich eingeschränkt und die Eliminierung intrazellulärer Coxiellen erschwert sein.

## Summary

The causative agent of Q fever is the zoonotic intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *C. burnetii* is gram-negative and occurs in two different antigenic forms that differ in the structure of their lipopolysaccharide (LPS): a virulent Ph I LPS form, and an avirulent Ph II LPS form. Transmission to humans occurs through contact with infected animals or contaminated particulates, and causes an acute febrile infection that may progress to pneumonia or hepatitis. A small percentage of cases develop into chronic infections with bacterial persistence.

*C. burnetii* infection induces both a humoral and cellular immune response. In addition to monocytes and macrophages, dendritic cells (DCs) serve as suitable host cells for infection. DCs belong to the first-line-of-defense of the innate immune system and make early contact with *C. burnetii* during infection, as do the natural killer (NK) cells that functionally cooperate with them. Antigen presentation by infected DCs also initiates the development of T cell immunity, which is critical for defense against *C. burnetii*, and functionally directs downstream immune responses.

Despite this central role in immune function, the cellular processes taking place in DCs during *C. burnetii* infection, especially regarding cellular self-defense against Ph II LPS variants, are not sufficiently understood. This also holds true for the influence of NK cell produced IFN- $\gamma$  and the role of the oxygen environment on cellular defense in infected APCs.

Therefore, the goal of this thesis was to gain detailed insight into the cellular processes associated with *C. burnetii* infection of DCs and NK cells, explicitly investigating the effect of IFN- $\gamma$  on DC-pathogen interaction under both norm- and hypoxic conditions.

In the first part of the Ph.D. thesis, cell biological, immunological, and protein biochemical analyses in the murine cell system demonstrated pathogen-triggered subversion of functional activation/induction of MHC I antigen presentation in *C. burnetii*-infected DCs. This infection-induced impairment of MHC antigen presentation was directly attributed to autocrine suppression by  $\alpha$ V $\beta$ 8-integrin-activated TGF- $\beta$ , and not to the subversive impact of *C. burnetii* LPS as a virulence factor. Further experiments also showed that IFN- $\gamma$  restores MHC I induction and surface expression in infected DCs, ensuring the functional processing and MHC presentation of pathogen-derived peptide antigens. Moreover, IFN- $\gamma$ -treatment of DCs affected the establishment/multiplication of intracellular *C. burnetii*, and additional siRNA and CRISPR/Cas9 experiments found that cellular self-defense in infected DCs is mediated to a significant extent by the IFN- $\gamma$ -inducible iNOS/NO system. As a reactive radical species, nitric oxide (NO) appears to affect components of the bacterial electron transport chain, as well as autophagic compartment formation and the integrity of parasitophorous vacuoles. In parallel, infected DCs protected themselves from the mitotoxic effects of NO through a metabolic switch to aerobic glycolysis, thus ensuring their survival during intracellular *C. burnetii* elimination. Macrophages also showed a marked impairment of intracellular *C. burnetii* proliferation under conditions of iNOS-mediated NO synthesis, further confirming that the iNOS/NO system plays a central role in anti-bacterial self-defense in APCs.

Further studies in this work, however, demonstrate that *C. burnetii* is also capable of a counter-defense. To counteract the NO-mediated defense mounted by infected DCs, *C. burnetii* upregulates its cytochrome *bd*, catalase, and SOD expression to mitigate the anti-bacterial effects

of NO production. Infection studies with *C. burnetii* lacking a functional Type IV secretion system (T4SS), further indicated that this system probably plays a critical role in the efficacy of the NO-mediated defense of infected DCs. Specifically, bacteria without an intact T4SS apparently evade the negative effects of NO and/or do not present the appropriate targets for anti-bacterial activity of NO. Further, experiments in norm- and hypoxic infection models of DC infection suggest that hypoxic culture conditions induce *C. burnetii* to form spore-like particles without productive vacuole formation. This survival form of intracellular *C. burnetii* is characterized by IFN- $\gamma$  resistance, enhanced oxygen-binding and radical detoxification due to modified gene expression, as well as the retention of infectivity. This suggests that hypoxia provides intracellular *C. burnetii* with additional opportunities for efficient immune evasion, favoring undetected bacterial presence within infected host cells, and thus presumably promoting chronic *C. burnetii* infections.

NK cells cooperating with DCs are primarily responsible for the synthesis and release of APC-stimulating IFN- $\gamma$  as part of the innate immune response. Therefore, studies performed in the second part of this thesis characterized the interaction between NK cells and *C. burnetii*. These experiments demonstrated that also NK cells are infected by *C. burnetii*. However, these infected NK cells prevent the establishment and replication of internalized bacteria by expelling them into the extracellular environment. This process is accompanied by functional NK cell activation, characterized by phospho-activation of PKC  $\Theta$  as well as IFN- $\gamma$  and granzyme B release. Various microscopic analyses also show that intracellular bacterial structures colocalize with secretory granules and that *C. burnetii* release occurs via degranulation of the infected NK cells. However, killing within the secretory granules of infected NK cells appears to be evaded by *C. burnetii* due to its acid and protease resistance. Thus, released *C. burnetii* largely maintains its integrity and ability to infect neighboring host cells after degranulation. Nonetheless, although *C. burnetii* escapes elimination by secretory granules, representing a critical Achilles heel of the innate immune response, the release of IFN- $\gamma$  by infected NK cells still has a positive effect on the anti-bacterial activity of APCs.

Taken together, the results presented in this Ph.D. thesis contribute to a better and more in-depth understanding of *C. burnetii* infection in both DCs and NK cells and provide new insights into the contributions of cellular self-defense and IFN- $\gamma$ -based immune cooperation during the early phase of anti-*C. burnetii* defense. At the same time, however, our work also suggests that as the infection progresses these immunological processes may be impaired by hypoxia, and thus the elimination of intracellular *C. burnetii* may be hindered.



## Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
APC	<i>antigen-presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
BSA	bovines Serumalbumin, Fraktion V
C.	Chlamydia
C.	Coxiella
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
CCV	<i>Coxiella-containing vacuole</i> , Coxiella-haltige Vakuole
cDC	<i>conventional DC</i> , konventionelle DC
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
cGC	<i>cyclic guanylate cyclase</i> , zyklisches Guanosinmonophosphat
cGMP	<i>cyclic guanosine monophosphate</i> , zyklisches Guanosinmonophosphat
CHX	Cycloheximid
coxHSP60	Coxiellen-spezifisches Hitzeschockprotein 60
coxLPS	Coxiellen-LPS
CR3	<i>complement receptor 3</i> , Komplementrezeptor 3
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR RNA
Ct	<i>cycle threshold</i>
CTL	<i>cytotoxic lymphocytes</i> , zytotoxische T-Zellen
DAMPs	<i>damage-associated molecular pattern</i> , schadensassoziierte molekulare Muster
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCs	<i>dendritic cells</i> , dendritische Zellen
DEX	DC-Exosomen/Dexosomen
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acids</i> , Desoxyribonukleinsäuren
Dot/Icm	<i>defect in organelle trafficking / intracellular multiplication</i>
dpi	<i>days post infection</i> , Tage nach Infektion
DUOX	Dual-Oxidasen
E-Puffer	Elektrophorese-Puffer
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale NOS
ER	endoplasmatisches Retikulum
ETC	<i>electron transport chain</i> , Elektronentransportkette
FAD	Flavinadenindinukleotid
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fetales Rinderserum
Fc-R	Fc-Rezeptoren
FIH	<i>factor inhibiting HIF</i>
FMN	Flavinmononukleotid
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
G418	Geneticin
GAS	<i>IFN-γ-activated site</i>
gDNA	genomische DNA

GDP	Guanosindiphosphat
GE	<i>genomic equivalents</i> , genomische Äquivalente
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor
gRNA	<i>guide RNA</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	<i>hours</i> , Stunden
hai	<i>hours ante infection</i> , Stunden vor der Infektion
HDAC6	Histondeacetylase 6
HDR	<i>homology-directed repair</i> , Homologie-gerichtete Reparatur
HIF	Hypoxie-induzierbarer Transkriptionsfaktor
hpi	<i>hours post infection</i> , Stunden nach Infektion
HRE	<i>hypoxia response element sequences</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IFU	<i>infectious units</i> , infektiöse Einheiten
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible NO synthase</i> , induzierbare NO-Synthase
IRF	<i>IFN-regulatory factor</i>
IRGs	<i>immunity-related GTPases</i>
ISRE	<i>IFN-stimulated response elements</i>
ISGF	<i>IFN-stimulated gene factor</i>
JAKs	<i>Janus kinases</i> , Januskinasen
kDA	Kilodalton
KO	knock out
LAP	<i>latency-associated peptide</i>
LC	<i>Langerhans cells</i> , Langerhans-Zellen
LCV	<i>large cell variant</i> , große Zellvariante
LMP	<i>Low-Melting-Point</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRRK2	<i>GTPase leucinerich repeat kinase 2</i>
MALDI-TOF/TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight</i>
MDC	Monodansylcadaverin
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
Min.	Minuten
miRNA	<i>microRNA</i>
moDCs	<i>monocyte-derived DCs</i> , monozytische DCs
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mtNOS	mitochondriale NOS
MTOC	<i>microtubule organizing center</i> , Mikrotubuli-Organisationszentrum
MVB	<i>multivesicular bodies</i> , Multivesikularkörperchen
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NED	Naphthylethylendiamin
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> , nicht-homologe Endverknüpfung
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nLC	<i>nano liquid-chromatography</i>
nNOS	neuronale NOS
NO	<i>nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid

NOD	<i>nucleotide-binding and oligomerization domain</i>
NOS2	<i>nitric oxide synthase 2</i> , Stickstoffmonoxid-Synthase 2
NOSs	NO-Synthasen
NOX	NADPH-Oxidasen
NOX2	NADPH-Oxidase 2
NTC	<i>non template control</i> , Negativkontrolle
OmpA	<i>outer membrane protein A</i> , äußeres Membranprotein A
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> , pathogenassoziierte molekulare Muster
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pDCs	<i>plasmacytoid DCs</i> , plasmazytoide DCs
PDI	Proteindisulfidisomerase
PFA	Paraformaldehyd
PHD	Prolylhydroxylase
PKC	Proteinkinase C
PLC	<i>peptide loading complex</i> , Peptid-Ladungs-Komplex
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
RNA	<i>ribonucleic acids</i> , Ribonukleinsäuren
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> , reaktive Stickstoffspezies
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds/revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time-PCR
s	Sekunden
SA	Sulfanilamid
SCID	<i>severe combined immunodeficient mice</i> , Mäuse mit schwerer kombinierter Immunschwäche
SCV	<i>small cell variant</i> , kleine Zellvariante
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SLPs	<i>spore-like particles</i> , sporeartige Partikel
SOD	Superoxiddismutasen
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
T4SS	Typ IV Sekretionssystem
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TBHP	tert-Butylhydroperoxid
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> , Trifluoressigsäure
THB	Tetrahydrobiopterin
Tip-DCs	<i>TNF/iNOS-producing DCs</i> , TNF/iNOS-produzierende DCs
TLRs	Toll-Like-Rezeptoren
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> , Tumornekrosefaktor
tracrRNA	<i>transactivating crRNA</i>
TYK2	<i>tyrosine kinase 2</i>
ÜS	Überstand
VF	Verdünnungsfaktor
WT	Wildtyp

## 1. Einleitung

### 1.1 *Coxiella burnetii*

#### 1.1.1 Taxonomie und Krankheitsbild

*Coxiella (C.) burnetii* ist ein obligat intrazelluläres Bakterium und wird zur Klasse der Gamma-Proteobakterien gezählt. *C. burnetii* ist Auslöser einer zoonotischen Erkrankung, dem Q-Fieber, das erstmals 1937 in Australien während eines Ausbruchs unter Schlachthausmitarbeitern beobachtet wurde. Eine Isolierung und Charakterisierung des Erregers war zunächst nicht erfolgreich, so dass die ungeklärte fieberhafte Erkrankung als „*query fever*“ bezeichnet wurde<sup>1,2</sup>. Aus dieser Bezeichnung leitet sich die aktuelle Krankheitsbenennung „Q-Fieber“ ab. Die tatsächliche Erregerisolierung gelang gleichzeitig zwei unabhängigen Arbeitsgruppen. Zum einen konnten die Bakterien aus Blut und Urin der erkrankten Schlachthausmitarbeiter isoliert werden. Auf Grund der großen Ähnlichkeit erfolgte die Eingruppierung in die Familie der Rickettsiaceae unter der Bezeichnung *Rickettsia burnetii*<sup>3</sup>. Zum anderen gelang die Isolierung des Pathogens aus Zecken in den USA, nahe des *Nine Mile*-Flusses in Montana. Ein Infektionsmodell in Meerschweinchen zeigte, dass beide Isolate einen ähnlichen Fieber-assoziierten Phänotyp und darüber hinaus eine Kreuzimmunität aufwiesen<sup>4</sup>. Neben der Erstbeschreibung durch Burnet wurde die Erforschung der Bakterien vor allem durch die Bemühungen von Cox vorangetrieben, welcher die Kultivierung der Bakterien in Hühnereiern etablierte<sup>5</sup>. Zur Anerkennung der Bemühungen der beiden maßgeblichen Wissenschaftler wurde der Erreger von *Rickettsia burnetii* in *Coxiella burnetii* umbenannt. Spätere Analysen des 16S rRNA-Gens und des gesamten Genoms zeigten des Weiteren, dass *Coxiella* zwar taxonomisch korrekt in die Familie der Rickettsiaceae eingegliedert wurde, allerdings phylogenetisch eng mit *Legionella pneumonia* verwandt ist<sup>6-8</sup>. Als weitere Coxiellen-artige wurden *C. cheraxi* in einem australischen Süßwasserkrebs (*Cherax quadricarinatus*), *Candidatus C. massiliensis* und *Candidatus C. mudrowiae* in Zecken und *Candidatus C. avium* in Papageien und einem Tukan beschrieben<sup>9-12</sup>.

Nachdem *C. burnetii* erstmals in einem Schlachtbetrieb beschrieben wurde, manifestierten sich domestizierte Wiederkäuer, wie Rinder, Ziegen und Schafe, als primäre Erregerreservoir. Allerdings konnten die Bakterien auch in einer Vielzahl weiterer Organismen detektiert werden. Dazu zählen neben Wildtieren auch Haustiere wie Hunde und Katzen, aber auch Zecken und Amöben<sup>13,14</sup>. Eine besondere Rolle bei der Übertragung von Coxiellen wird dabei den Nagetieren zugesprochen. Untersuchungen zeigen dabei, dass infizierte Haus- und Wanderratten (*Rattus rattus* und *Rattus norvegicus*) nicht nur als unbeabsichtigte *spill-over* oder *dead-end* Wirte fungieren, sondern in der Umgebung untersuchter landwirtschaftlicher Ziegen-Betriebe ebenfalls positiv auf Coxiellen getestet wurden. Somit tragen die Nager unmittelbar zur Verbreitung und Aufrechterhaltung des Infektionsgeschehens bei<sup>15</sup>. Neben den Nagern kommt auch den Arthropoden eine große Bedeutung bei der Übertragung und der Aufrechterhaltung des

Infektionszyklus in Wildtieren zu. Insbesondere Zecken nehmen mit 50 verschiedenen Arten als Coxiellen-Überträger eine wichtige Rolle ein. Die Replikation der Bakterien findet in diesem Fall im Verdauungstrakt statt und ermöglicht so die Ausbreitung der Bakterien über den kontaminierten Kot<sup>16,17</sup>. Daher tragen Zecken vor allem zum Infektionsgeschehen in Wildtieren, aber auch in domestizierten Hunden bei<sup>14</sup>. Im humanen System spielen die Zecken nach bisherigen Erkenntnissen allerdings eine eher untergeordnete Rolle<sup>18</sup>.

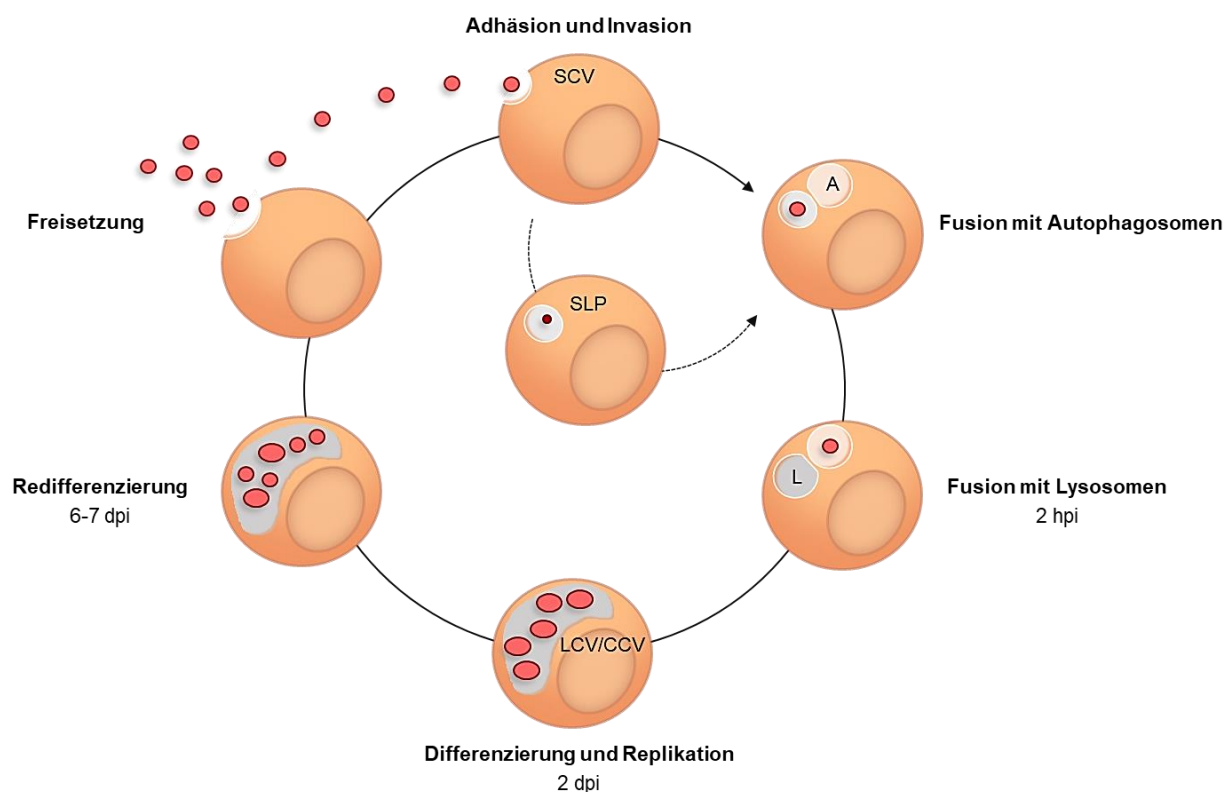
Innerhalb der Hauptreservoirs, Rinder, Ziegen und Schafe, verläuft die Infektion (auch Coxiellose) häufig unauffällig. Im Zusammenhang mit tragenden Tieren allerdings werden Fehl-, Schwach- oder Frühgeburten beobachtet. Dabei stellt gerade der Geburtsvorgang eine besondere Risikosituation dar, da *C. burnetii* über das Geburtmaterial (Plazenta, Amnionflüssigkeit) von infizierten Tieren ausgeschieden wird. Hierbei kann 1g Plazentagewebe bis zu 10<sup>9</sup> Bakterien enthalten<sup>19,20</sup>, da *C. burnetii* vor allem die Trophoblasten der Plazenta für die Replikation nutzt. Dabei wird ein Anstieg der Erregerlast hin zur Geburt beobachtet. Die grundlegenden Ursachen für dieses Phänomen sind allerdings noch nicht hinreichend geklärt<sup>20</sup>. In vielen Fällen wird außerdem eine Manifestierung der Bakterien in den Tieren beobachtet, so dass eine chronische Infektion und damit einhergehend auch eine dauerhafte Ausscheidung vorliegen. Neben den Geburtsprodukten spielen außerdem Urin, Kot und Milch eine Rolle bei der zoonotischen Übertragung auf den Menschen<sup>14</sup>. *C. burnetii* infiziert den Menschen über kontaminierte Aerosole oder Partikel (wie Stäube)<sup>21</sup>. Dadurch sind die höchst kontagiösen Bakterien in der Lage, bei entsprechenden windigen Wetterbedingungen auch weitere Entfernungen bis zu ihrem nächsten Wirt zu überbrücken<sup>22-24</sup>. Unter Laborbedingungen gelang es einem einzelnen Bakterium, eine manifestierende Infektion hervorzurufen<sup>25</sup>. Eine ergänzende Untersuchung hingegen zeigte, dass für den Menschen eine Dosis von mindestens 10 Bakterien für eine entsprechende Infektion notwendig ist<sup>21</sup>. Infolge einer erfolgreichen Q-Fieber-Infektion im Menschen kann diese entweder akut verlaufen oder sich chronisch manifestieren. Die akute Erkrankung verläuft in 60% der Fälle asymptomatisch. Treten Symptome auf, werden vor allem grippeähnliche Beschwerden wie Husten, Kopf- und Gliederschmerzen und Schweißausbrüche im Zusammenhang mit dem charakteristischen Fieber beschrieben. Allerdings kann die Infektion auch ursächlich für eine atypische Pneumonie oder Hepatitis sein. Eine chronische Infektion tritt in 5-15% der Fälle auf<sup>26</sup> und ist mit Krankheitsbildern wie der bakteriell bedingten Endokarditis, chronischer Hepatitis, vaskulärer Infektion oder dem chronischen Erschöpfungssyndrom (auch chronisches Fatigue-Syndrom) assoziiert<sup>13,14</sup>. Ähnlich der Coxiellose im Tier kann auch das Q-Fieber im Menschen für schwangere Frauen ein besonderes Risiko bedeuten. Bei einer Infektion während der Schwangerschaft wurden frühzeitige Entbindungen, spontane Aborte, Totgeburten (intrauteriner Fruchttod) oder eine eingeschränkte Fötus-Entwicklung beschrieben<sup>27,28</sup>. Auf Grund der hohen Tenazität des Pathogens ist *C. burnetii* nahezu weltweit verbreitet<sup>14</sup>. Gemeinsam mit der zwar niedrigen Mortalität, aber einer sehr hohen Infektiosität führte dies zur Klassifizierung eines potentiellen bioterroristischen Mittels als „Kategorie B“ Pathogen<sup>29</sup>. Die Bedeutung der Q-Fieber-Infektion wurde darüber hinaus in den Jahren 2007 bis 2010 in den Niederlanden sehr deutlich. Der bisher größte beschriebene Ausbruch umfasste etwa 4000 humane Krankheits- und 14 Todesfälle<sup>13</sup>. In Deutschland wird ein Median von 233

Erkrankungen pro Jahr angegeben, wobei die Fallzahlen zwischen den Jahren großen Schwankungen unterliegen (86 bis 416 Fälle/Jahr). Für das Jahr 2018 wurden 93 Q-Fieber-Infektionen an das Robert-Koch-Institut übermittelt<sup>30</sup>. Die Behandlung einer akuten Q-Fieber-Infektion basiert auf einer Antibiotika-Therapie, die schnellstmöglich initiiert werden sollte. In diesem Zusammenhang zeigte bisher nur Doxycyclin, in Kombination mit weiteren bakteriostatischen Antibiotika wie Trimethoprim oder Chloramphenicol, eine effektive Wirkung<sup>31</sup>. Kommt es zu einer Chronifizierung der Erkrankung, wird eine Behandlung mit Doxycyclin und Hydroxychloroquin über mehrere Jahre notwendig<sup>14,32</sup>. Um die Übertragung und die Ausbreitung des Q-Fiebers zu reduzieren, ist die Kontrolle der primären Erregerreservoirs (Schaf, Ziege und Rind) von entscheidender Bedeutung, um die Gefahr der Umweltkontamination zu minimieren. Für Wiederkäuer wird daher die Vakzinierung der Herde mit dem Impfstoff Coxevac<sup>®</sup> empfohlen. Grundlage des Impfstoffs sind inaktivierte Phase (Ph) I-Coxiellen. Die Impfung kann vor allem das Infektions- und damit das Ausscheidungsrisiko naiver Tiere reduzieren. In endemischen Herden ist die Vakzinierung weniger effizient, so dass eine regelmäßige Erneuerung der Impfung erforderlich ist<sup>18,33</sup>. Gleichzeitig wurde jedoch eine Leistungsdepression bei Rindern nach Vakzinierung beobachtet<sup>34</sup>, die die Entscheidung für eine Herdenvakzinierung mitbeeinflussen kann. Eine humane Vakzinierung, die ebenfalls auf inaktivierten Ph I-Coxiellen basiert, ist derzeit nur in Australien mit dem dort lizenzierten Impfstoff Q-VAX<sup>®</sup> möglich<sup>35</sup>. Die Wirksamkeit (Coxevac<sup>®</sup>) und die Verfügbarkeit (Q-VAX<sup>®</sup>) der Impfstoffe verdeutlichen die Dringlichkeit neuer, effektiver Behandlungsstrategien der *C. burnetii*-Infektion.

### 1.1.2 Biphasischer Lebenszyklus

Bedingt durch die obligat intrazelluläre Lebensweise der Coxiellen sind diese bei ihrer Replikation auf entsprechende Wirtszellen angewiesen. Im Verlauf der Replikation in einem biphasischen Zyklus weist *C. burnetii* verschiedene Zellvarianten auf. Die kleine Zellvariante (*small cell variant*, SCV) wird dabei oft als initiale Infektionsform betrachtet<sup>36</sup>. Sie weist eine kugelförmige Morphologie mit einer Größe von 0,2 µm bis 0,5 µm auf. Außerdem verfügt die SCV über eine dichte Chromatinverpackung und eine verdichtete Zellwand, so dass sie als sehr umweltresistent beschrieben wird. Im Weiteren wird die metabolisch aktivere große Zellvariante (*large cell variant*, LCV) beschrieben. Diese zeigt eine für Gram-negative Bakterien typische Morphologie und kann eine Größe von mehr als 1 µm erreichen. LCVs haben im Vergleich zu den SCVs eine dünnere Zellwand und ein sehr dispergiertes Nukleoid<sup>18,36,37</sup>. Sowohl die SCVs als auch die LCVs werden als infektiös beschrieben<sup>38</sup>. Neben den SCVs und LCVs wurde eine weitere Variante, die sporenartigen Partikel (*spore-like particles*, SLPs) beschrieben<sup>37</sup>. Diese wurden in Form sehr elektronendichter polarer Kompartimente in LCVs beobachtet. Es wird diskutiert, dass diese Variante auf Grund ihrer Beschaffenheit und Morphologie endosporenähnliche Eigenschaften aufweist und daher ein besonderes (möglicherweise extrazelluläres) Überlebensstadium darstellt<sup>37</sup>. Zielzellen für die Replikation sind vor allem mononukleäre Phagozyten, insbesondere Alveolar-

Makrophagen<sup>39,40</sup> und dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs)<sup>41</sup>. Ebenso fungieren die Trophoblasten der Plazenta, wie schon im vorangegangenen Kapitel angedeutet, als Wirtszellen zur Replikation<sup>42,43</sup>. Die Pathogenaufnahme erfolgt über klassische rezeptorvermittelte Phagozytose. Relevante Aufnahmerezeptoren sind in diesem Zusammenhang Integrine ( $\alpha V\beta 3$  für Lipopolysaccharid (LPS)-Phasentyp I und II) sowie der Komplementrezeptor 3 (*complement receptor 3*, CR3) (für LPS-Phasentyp II)<sup>44</sup>. Nicht-phagozytierende Zellen werden vermittelt über bakterielle Invasine in Interaktion mit entsprechenden Zellrezeptoren infiziert. Dazu gehört beispielsweise das äußere Membran Protein A (*outer membrane protein A*, OmpA)<sup>45</sup>. Die Internalisierung von *C. burnetii* und die Ausbildung der Coxiella-haltigen Vakuole (*Coxiella-containing vacuole*, CCV) ist dabei maßgeblich durch die Neuorganisation des Aktinnetzes der Zelle bedingt<sup>46,47</sup>. Nach der Aufnahme in das Phagosom folgt die schrittweise Fusion mit den Kompartimenten des Autophagie-Weges (Autophagosomen, Lysosomen) wie in Abbildung 1-1 dargestellt. Es wurden dabei Interaktionen mit frühen (Rab5) und späten endosomalen Markern (Rab7) sowie lysosomalen Markern (LAMP1) beschrieben<sup>48</sup>. Innerhalb von 48 Stunden weisen die CCVs dann eine Oberflächendekoration auf, die charakteristisch für ausgereifte Autophagosomen ist (LC3, Flotillin-1/-2, LAMP1-3 und eine H<sup>+</sup> ATPase)<sup>48-50</sup>. In diesem Kontext wurde gezeigt, dass *C. burnetii* die proteolytische Eliminierung mittels Xenophagie in diesen Kompartimenten unterdrückt<sup>51,52</sup>. Die Fusion mit den Lysosomen erwirkt eine pH-Wert-Erniedrigung, die eine Differenzierung der SCVs zu den metabolisch hoch aktiven LCVs initiiert. Dabei wurde ein Bereich von pH 4,5-4,75 als ideal für die Coxiellen-Replikation beschrieben<sup>53</sup>. Allerdings haben ergänzende Studien gezeigt, dass der pH-Wert der CCV durchaus in einem Bereich zwischen pH 4-5,7 schwanken kann<sup>50,54,55</sup>. Im weiteren Verlauf rekrutiert *C. burnetii* verschiedene Wirtsproteine zur CCV, um die Fusiogenität der Vakuole zu erhöhen<sup>56</sup>, die Fusion mehrerer früher CCVs zu ermöglichen<sup>57</sup> und die Fusion mit sekretorischen Vesikeln sicherzustellen<sup>58</sup>. Gleichmaßen scheint allerdings auch die eigene bakterielle Proteinsynthese Einfluss auf diesen Prozess zu nehmen<sup>59</sup>. Die CCV kann während der Replikation ein außerordentliches Volumen erreichen und damit die gesamte Wirtszelle ausfüllen<sup>60,61</sup>. Nach 6 bis 7 Tagen wird die Redifferenzierung der LCVs zu SCVs initialisiert. Die hoch infektiösen SCVs verlassen die Wirtszelle und infizieren benachbarte Zellen<sup>60</sup>.



**Abbildung 1-1: Biphasischer Lebenszyklus von *C. burnetii* (modifiziert nach Minnick und Raghavan 2012)**

Die Replikation innerhalb der Wirtszelle beginnt mit der Infektion durch die kleine Zellvariante (SCV) der Coxiellen. Liegen keine geeigneten Replikationsbedingungen vor, erfolgt die Differenzierung in sporenartige Partikel (SLPs). Unter geeigneten Bedingungen wird die Ausbildung einer parasitophoren Vakuole, der *Coxiella*-haltigen Vakuole (CCV), durch die Fusion mit Autophagosomen (A) und Lysosomen (L) eingeleitet (ab 2 hours post infection, hpi). Innerhalb des sauren Milieus der CCV erfolgt die Differenzierung der SCVs in die metabolisch aktive große Zellvariante (LCVs). Nach der Replikation folgt die Redifferenzierung in die hoch infektiösen SCVs. Nach 6-7 Tagen (days post infection, dpi) verlassen die SCVs die Wirtszelle, um weitere, benachbarte Zellen infizieren.

### 1.1.3 Virulenzfaktoren und Wirts-Pathogen-Interaktionen

Die Etablierung einer wirtszellfreien Kultivierung von *C. burnetii* (unter axenischen Bedingungen) eröffnete die Möglichkeit der detaillierten Analyse der Virulenzfaktoren und der Wirts-Pathogen-Interaktionen über genetische Manipulationen<sup>62,63</sup>. Besondere Beachtung fand dabei bisher das Coxiellen-LPS. Die Oberflächenstruktur wird in verschiedensten Varianten auch für andere Pathogene, wie *Escherichia coli* oder *Salmonella typhimurium* vorgefunden, allerdings in Verbindung mit einer deutlich höheren LPS-Toxizität (100- bis 1000-fach erhöht)<sup>64</sup>. Auch zwischen Ph I- und Ph II-Coxiellen basiert der einzige derzeit nachgewiesene Unterschied in der Struktur des LPS. Im Verlauf der *in vitro*-Kultivierung der *full-length* Ph I-LPS Bakterien trat eine Chromosomendeletion auf. Die folgende genetische Mutation führte zu einer Änderung der LPS-Biosynthese<sup>65</sup>. Grundsätzlich ist das *full-length* LPS der Coxiellen durch ein komplettes O-Antigen gekennzeichnet. Dieses besteht auf untypischen Zuckerstrukturen wie Dihydrohydroxystreptose, L-Virenose und Galactosaminuranyl- $\alpha$ -(1,6)-Glucosamin. Das LPS der Ph II-Bakterien wird auch als *truncated* (z. Dt. verkürztes) LPS bezeichnet, da in diesem Fall die terminalen O-Polysaccharide fehlen<sup>66,67</sup> und damit einhergehend eine verminderte Virulenz beschrieben wurde. Auf Basis dieser



Beobachtung konnte eine Differenzierung zwischen Ph I-Bakterien als virulent (Nine Mile I, Pathogen der Biosicherheitsstufe 3) und Ph II-Bakterien als avirulent (Nine Mile II, Pathogen der Biosicherheitsstufe 2) getroffen werden<sup>64</sup>. Ergänzend wurde auch ein *intermediate-length* LPS für einen weiteren avirulenten Coxiellen-Stamm (Nine Mile Crazy) beschrieben<sup>68</sup>. Aufbauende Infektionsmodelle in Meerschweinchen belegten diese Annahmen zur Virulenz und zeigten, dass ausschließlich der virulente Ph I-Stamm Symptome und eine Persistenz hervorruft<sup>69</sup>. Ferner wurden ebenfalls Unterschiede bei den Interaktionen mit Oberflächenrezeptoren zur Internalisierung dokumentiert. Die Pathogenaufnahme in die Wirtszellen verläuft phasenabhängig entweder lediglich Integrin-vermittelt (Ph I-LPS) oder unter zusätzlicher Beteiligung des CR3 (Ph II-LPS; dazu auch Kapitel 1.1.2)<sup>44</sup>. Wird der CR3 bei der Internalisierung miteinbezogen, folgt die Aktivierung verschiedener zellulärer Signalkaskaden, so dass *C. burnetii* Ph II vermehrt aufgenommen und in den Wirtszell-Phagolysosomen eliminiert wird<sup>70,71</sup>. Ebenfalls wurden virulente im Vergleich zu avirulenten Bakterien als resistent gegenüber der Komplement-assoziierten Lyse des Immunsystems beschrieben<sup>72</sup>. Unabhängig vom Aufnahmemechanismus zeigten sich in etablierten Wirtszell-Systemen (Makrophagen, DCs) allerdings vergleichbare Replikationsraten der virulenten Ph I- und der avirulenten Ph II-Coxiellen<sup>73,74</sup>. Darauf aufbauend vermuten schon sehr frühe Untersuchungen, dass weniger das LPS als einzelne Komponente, sondern vielmehr ein aktiver Phasenwechsel im Verlauf der Infektion den eigentlichen Virulenzfaktor ausmacht<sup>75</sup>. Dabei wird in zwei Schritten beschrieben, dass zunächst eine Infektion basierend auf dem *truncated* Ph II-LPS initiiert wird, das immunologisch hoch reaktiv ist. Gleichzeitig erfolgt die Synthese des *full-length* Ph I-LPS, das zum einen generell weniger detektiert wird und zum anderen nicht angreifbar durch die einsetzende Immunantwort gegen das ursprüngliche Ph II-LPS ist. Der zweite Schritt der Virulenz beruht vermutlich auf der LPS-Ermüdung der Immunzellrezeptoren (Toll-Like-Rezeptoren, TLRs). Dieses Phänomen wird bei einer kontinuierlichen LPS-Stimulation der Rezeptoren beschrieben, die letztlich zu einer sinkenden Sensibilität bis hin zum Ausbleiben der Reaktivität (Toleranz) der Rezeptoren führt<sup>76-78</sup>. Somit wird einerseits ein zeitlicher Vorteil geschaffen, in dem das Immunsystem gezielt gegen das hoch immunogene Ph II-LPS reagiert, dadurch aber unvorbereitet gegenüber dem neusynthetisierten Ph I-LPS ist. Und andererseits erzeugt die permanente LPS-Stimulation eine Ermüdung/Toleranz der TLRs und ermöglicht so eine Maskierung der weiteren Infektion<sup>79</sup>. Gestützt wird dieser Erklärungsansatz durch ein Infektionsmodell in *severe combined immunodeficiency syndrome* (SCID)-Mäusen. Avirulente Coxiellen erzeugten in diesen Tieren einen vergleichbaren Infektionsverlauf und eine ähnliche Pathologie wie die virulenten Ph I-Bakterien und die Infektion konnte nicht auf Ebene des innatens Immunsystems geklärt werden<sup>80</sup>. Wie bereits in vorangegangenen Studien beschrieben, könnte dies durch eine *in vivo*-Konversion zum *full-length* LPS zu erklären sein<sup>75</sup>. Weitere Untersuchungen sind nach wie vor zur vollständigen Aufklärung des LPS-Wirkungsmechanismus notwendig. Die vorangegangenen Beschreibungen veranschaulichen, dass die Immunevasion ein zentraler Bestandteil der *C. burnetii*-Infektion ist. Bedeutend für diesen Prozess ist die bakterielle Sekretion von Effektormolekülen in das Zytoplasma der infizierten Wirtszelle. Zu diesem Zweck besitzt *C. burnetii* Komponenten bakterieller Sekretionssysteme. Neben Komponenten des Typs I und

Typs II Sekretionssystems erfolgt die entscheidende Sekretion von über 150 bakteriellen Effektormolekülen über das *defect in organelle trafficking/intracellular multiplication* (Dot/Icm) Typ IV Sekretionssystem (T4SS)<sup>81,82</sup>. Ursprünglich wurde das T4SS für den horizontalen Gentransfer genutzt<sup>83</sup>, im Verlauf der Ko-Evolution mit der Wirtszelle wurde das System allerdings für die Wirtszellmodifikation adaptiert<sup>84</sup>. Für das T4SS von *C. burnetii* konnten starke Homologien mit dem Sekretionssystem von *Legionella pneumophila* beschrieben werden, die es dem Pathogen ermöglichen, aus der geschützten parasitophoren Vakuole heraus Effektormoleküle in das Wirtszellzytoplasma zu sekretieren<sup>85</sup>. Allerdings sind die verantwortlichen Gene für *C. burnetii* in einem zusammenhängenden Genombereich kodiert<sup>86</sup>, welcher über den PmrA-Genregulator gesteuert wird<sup>87</sup>. Insgesamt besteht der Multiproteinkomplex aus über 20 Bestandteilen. Hierbei erwiesen sich die in der inneren Membran verankerten Proteine als bedeutsam für die Aktivität (DotI, DotJ, IcmR, IcmQ) und die Translokalisierung (DotL, DotM, DotN) der Effektormoleküle<sup>88</sup>. Weiter scheint die DotA Komponente gerade in der stationären Phase eine besondere Rolle für den Metabolismus der Bakterien zu spielen<sup>61</sup>. Darüber hinaus zeigten *knock out*-Untersuchungen, dass Coxiellen ohne funktionales Dot/Icm T4SS Sekretionssystem nicht mehr zur Replikation befähigt sind, ihre Lebensfähigkeit jedoch durchaus innerhalb der parasitophoren Vakuolen erhalten können<sup>89-92</sup>. Die Funktionen der sekretierten Effektormoleküle können auf eine Vielzahl wirtszellseitiger Prozesse einwirken. Die Bakterien können so die Etablierung ihrer CCV sichern<sup>91,93</sup> und Einfluss auf Regulation des Vesikel- und Proteintransportes<sup>93,94</sup>, der Immunantwort<sup>95</sup>, der Autophagie<sup>96,97</sup> oder der Apoptose<sup>96,97</sup> nehmen. Weiterhin können sich die Coxiellen durch verschiedene Abwehrsysteme der Eliminierung durch das Immunsystem entziehen. In diesem Kontext ist die Expression von alkalischen Phosphatasen, Katalasen und Superoxiddismutasen (SOD) beschrieben, die für die Entgiftung von Sauerstoffradikalen notwendig sind<sup>98,99</sup>. Ein vergleichbarer Entgiftungsprozess von Radikalen kann außerdem über die Expression von Cytochrom *bd* (auch *cydAB*) erfolgen<sup>100,101</sup>. Die Neutralisierung von Radikalen ist entscheidend, da diese in der Lage sind, mit Proteinen, Lipiden oder DNA zu interagieren und diese schädigen<sup>102-104</sup>. Um eine solche Schädigung zu minimieren, besitzen die Coxiellen einen DNA-Reparaturmechanismus (SOS-System)<sup>105,106</sup>.

## 1.2 Das Immunsystem

Das vertebrale Immunsystem wird als ein komplexes und vielschichtiges Abwehrsystem verstanden. Die zentralen Aufgaben bestehen sowohl in der Abwehr gegen von außen eindringende Pathogene als auch im Schutz vor fehlerhaften oder entarteten Zellen. Um den Schutz des Wirtes zu gewährleisten, teilt sich das Immunsystem in zwei Bestandteile, welche sich anhand der Reaktionsgeschwindigkeit und der Reaktionsgenauigkeit unterscheiden lassen<sup>107</sup>. Das angeborene Immunsystem ist in der Lage, sehr schnell auf Pathogene zu reagieren, indem unspezifische Abwehrmechanismen initiiert werden. Darauf aufbauend kann eine Immunantwort des adaptiven Immunsystems induziert werden. Die adaptiven Abwehrmechanismen treten also zeitlich verzögert ein, zeichnen sich aber durch eine hohe Spezifität aus<sup>108</sup>. Für eine effiziente Erkennung und

Eliminierung von Erregern sind beide Komponenten des Immunsystems und ihr Zusammenspiel von zentraler Bedeutung <sup>107,109</sup>.

### 1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem (auch innates Immunsystem) wird auch als unspezifische Wirtsabwehr bezeichnet, da es sehr schnell, aber gleichzeitig auch stereotyp pathogenunspezifisch agiert. Ebenso wie das adaptive Immunsystem verfügt auch das innate Immunsystem über zelluläre und humorale Elemente, um die Immunabwehr sicherzustellen. Um das Eindringen des Erregers initial zu verhindern, bestehen zunächst mechanische und physiologische Barrieren. Als solche werden Haut und Schleimhäute, die Zilien der Lunge, die Körpertemperatur, der niedrige pH-Wert im Magen sowie das bakterizide Lysozym in Körperflüssigkeiten wie Speichel und Tränensekret beschrieben <sup>110</sup>. Hat der Erreger diese ersten Hindernisse überwunden und Zellen infiziert, bestehen verschiedene Möglichkeiten, wie das Pathogen durch die Zellen des Immunsystems erkannt und folglich eliminiert werden kann.

Das Komplementsystem macht einen wichtigen Teil des angeborenen Immunsystems aus. Es beschreibt eine enzymatische Reaktionskaskade, die sowohl zur Markierung (Opsonierung) und damit zur Erkennung von Pathogenen als auch zur unmittelbaren Eliminierung dieser Pathogene beiträgt <sup>111</sup>. Des Weiteren verfügt das angeborene Immunsystem über ein Repertoire löslicher und zellassoziierter Keimbahn-kodierter Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs). Über PRRs können zum einen konservierte Pathogenstrukturen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) identifiziert werden <sup>112</sup>. Zum anderen werden in Folge von Zelllyse oder Gewebsschädigungen auch sezernierte endogene Gefahrensignale (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) erkannt <sup>113</sup>. Auf die Erkennung eines Erregers folgt die Aufnahme über Phagozytose und die intrazelluläre Eliminierung über die Produktion reaktiver Sauerstoff (*reactive oxygen species*, ROS)- und/oder Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*, RNS) <sup>114</sup>. Weitere Effektorzellen können darauf aufbauend durch sezernierte Chemokine rekrutiert werden und eine primäre Immunantwort initiieren <sup>115</sup>. Eine letzte Detektionsstrategie des angeborenen Immunsystems basiert auf der Differenzierung zwischen „selbst“ und „fremd“ durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen). NK-Zellen können auf Basis der Expression von Oberflächenrezeptoren zwischen gesunden und infizierten oder entarteten Zellen differenzieren. Eine besondere Rolle spielen hierbei Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC)-Moleküle. Die MHC I-Moleküle werden als Glykoproteine konstitutiv von intakten Zellen exprimiert und erzeugen ein inhibitorisches Signal. Dieses Signal verhindert eine Aktivierung der NK-Zellen. Infizierten oder entarteten Zellen mit verringerter MHC I-Expression fehlt dieses inhibitorische Signal. Infolge kommt es zur NK-Zell-Aktivierung und der Induktion von Apoptose <sup>116</sup>. Zusätzlich wird derzeit eine weitere Funktion, die sogenannte trainierte Immunität (*trained immunity*), diskutiert. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass auch das angeborene Immunsystem nach Durchlaufen

einer Infektion durchaus erlernte Merkmale aufweisen kann <sup>117-119</sup>. Diese Eigenschaft war nach der bisherigen Auffassung eine Besonderheit des adaptiven Immunsystems.

### 1.2.2 Das adaptive Immunsystem

Im Vergleich zur angeborenen Immunität wird für das adaptive Immunsystem eine äußerst spezifische Erregererkennung beschrieben. Die Etablierung dieser Immunantwort benötigt allerdings eine deutlich längere Zeitspanne und ist daher nicht innerhalb von einigen Stunden, sondern erst innerhalb von mehreren Tagen verfügbar <sup>120</sup>. Jedoch wird die resultierende Reaktion als sehr effektiv beschrieben und kann darüber hinaus langanhaltenden Schutz bei einer wiederholten Infektion gewährleisten (immunologisches Gedächtnis) <sup>108</sup>. Im Rahmen der adaptiven Immunität kann zwischen der humoralen und der zellulären Immunantwort unterschieden werden <sup>107</sup>. Zentraler Bestandteil des humoralen Armes sind die Antikörper, die als Antigenrezeptoren auf der Oberfläche von B-Lymphozyten (auch B-Zellen) gebunden sind <sup>121</sup>. Infolge der Bindung von Antikörper und spezifischem Antigen kommt es zur B-Zell-Aktivierung und -Proliferation. Die aus diesem Vorgang resultierenden Plasmazellen sind in der Lage, große Mengen der jeweiligen Antikörper zu synthetisieren und zu sekretieren <sup>122</sup>. Folglich können die neuen Antikörper verschiedene Funktionen übernehmen. Zum einen können sie eine neutralisierende Wirkung vermitteln, in dem sie an Bestandteile wie lösliche Proteine, virale Partikel oder bakterielle Toxine binden und diese so neutralisieren. Zum anderen können sie Mikroorganismen opsonieren <sup>123</sup>. Die opsonierten Pathogene werden so wieder dem angeborenen Immunsystem zugeführt. Es folgen entweder eine unmittelbare Phagozytose und Eliminierung oder die Aktivierung des Komplementsystems mit nachfolgender Lyse <sup>124</sup>.

Der zelluläre Arm der adaptiven Immunität wird durch die T-Lymphozyten (auch T-Zellen) gebildet. Naive T-Zellen können das spezifische Antigen nur in einer vorprozessierten Form als Komplex mit MHC-Molekülen erkennen <sup>125</sup>. MHC I- und MHC II-Moleküle werden daher mit Peptidantigenen beladen und können gemeinsam mit den kostimulatorischen Molekülen (CD80/CD86) über die Bindung des spezifischen T-Zell-Rezeptors (CD28) die T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung initiieren <sup>126</sup>. In diesem Zusammenhang spielen vor allem die DCs als Teil der innate Immunität eine entscheidende Rolle, die im folgenden Kapitel (1.2.3) genauer beschrieben wird. Die Art der T-Zelldifferenzierung ist abhängig von den jeweilig präsentierten Peptidantigenen, wobei grundlegend in CD4-positive (CD4<sup>+</sup>) und CD8-positive (CD8<sup>+</sup>) T-Zellpopulationen unterteilt werden kann <sup>123</sup>. CD4<sup>+</sup> T-Zellen (auch T-Helferzellen) erkennen ihr Antigen im Zusammenhang mit MHC II-Molekülen. Schwerpunkt dieser Zellen sind die Zytokinsekretion und somit die Orchestrierung der weiteren Immunantwort <sup>127</sup>. Auf Basis der Zytokinprofile können die aktivierten T-Helferzellen hierbei erneut in zwei Subpopulationen, die T<sub>H</sub>1- und die T<sub>H</sub>2-Zellen, unterteilt werden. T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren vorrangig Interferon (IFN)- $\gamma$ , Interleukin (IL)-2 und TNF- $\alpha$  und aktivieren in diesem Kontext die zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen <sup>128</sup>. Die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und die Aktivierung von B-Zellen hingegen sind hingegen Merkmale der T<sub>H</sub>2-Zellen <sup>129</sup>. CD8<sup>+</sup> T-Zellen

erkennen ihr Antigen im Kontext mit MHC I-Molekülen und differenzieren nach dem Kontakt zu zytotoxischen T-Zellen (*cytototoxic lymphocytes*, CTL) aus. Ähnlich den NK-Zellen sind auch die CTL in der Lage, infizierte oder entartete Zellen über die Apoptoseinduktion zu eliminieren<sup>130</sup>. Kommen diese CTL erneut mit dem spezifischen Antigen in Berührung, setzen sie dazu zytotoxische Granula (Granzyme) frei, die über das Poren-bildende Perforin in die Zielzelle eindringen und dort als Serinproteasen die Apoptosekaskade initiieren<sup>131</sup>. Eine weitere Funktion aktivierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist die IFN- $\gamma$ -Sekernierung, die in Folge zu einer Makrophagen-Aktivierung und einer lokal erhöhten MHC I-Oberflächenexpression führt<sup>132</sup>. Ein Teil der aktivierten B- und T-Zellen kann zu Gedächtniszellen ausdifferenzieren. Für diese Gedächtniszellen ist bekannt, dass sie eine überdurchschnittliche Lebensdauer aufweisen und in der Lage sind, schneller auf Reinfektionen reagieren<sup>108</sup>.

### 1.2.3 Die Rolle dendritischer Zellen im Immunsystem

DCs sichern als professionell antigenpräsentierende Zellen (*antigen-presenting cell*, APC) die Vermittlung zwischen innater und adaptiver Immunantwort<sup>133</sup>. In diesem Kontext werden sie auch als Wächterzellen bezeichnet, da sie in ihrem unreifen Stadium in der Peripherie des Organismus Fremdartigene detektieren<sup>134</sup>. Die Erkennung solcher mikrobieller Fremdartigene geschieht über die in Kapitel 1.2.1 beschriebenen PRRs<sup>135,136</sup>. Die effiziente Aufnahme solcher Antigene wird über eine sehr hohe Phagozytoseaktivität unreifer DCs gewährleistet<sup>137</sup>. Wird nun ein entsprechendes Fremdartigen erkannt und aufgenommen, stellen die unreifen DCs ihre Phagozytoseaktivität weitestgehend ein und initiieren ein komplexes Differenzierungsprogramm. Teil dieses Differenzierungsprogrammes ist die Oberflächenexpression spezieller Chemokinrezeptoren (CCR-7), die die Migration in die lymphoiden Organe ermöglicht<sup>138</sup>. Gleichzeitig startet die Degradation der aufgenommenen Fremdartigene zu Peptidantigenen. Dieser Ablauf wird als Antigenprozessierung bezeichnet und ist grundlegend für die nachfolgende Beladung der MHC-Moleküle. Die mit Peptidantigenen beladenen MHC-Antigen-Komplexe werden letztlich auf die Zelloberfläche transportiert und dort den T-Zellen präsentiert<sup>139</sup>. Ob die Peptidantigene hierbei im Kontext mit MHC I (CD8<sup>+</sup> T-Zellen)- oder MHC II (CD4<sup>+</sup> T-Zellen)-Molekülen präsentiert werden, wird sowohl durch die Form des Fremdartigens als auch durch den Ort der Prozessierung bestimmt<sup>137</sup>. Die Präsentation von Peptidantigenen, die ihren Ursprung in intrazellulär-replizierenden Mikroorganismen haben, erfolgt im Kontext mit MHC I-Molekülen<sup>140</sup>. Extrazelluläre Pathogene hingegen befinden sich nach ihrer Aufnahme über Phagozytose in endosomalen Kompartimenten<sup>141</sup>. Die Antigenprozessierung erfolgt somit ebenfalls in diesen Kompartimenten, gefolgt von der Beladung auf die MHC II-Moleküle<sup>142</sup>. Generell sind alle kernhaltigen Zellen in der Lage, Antigene über MHC I-Antigen-Komplexe zu präsentieren. Die Antigenpräsentation über MHC II-Moleküle ist allerdings den APCs vorbehalten<sup>143</sup>. Darüber hinaus besteht neben dem klassischen MHC I-Antigenpräsentationsweg noch die Möglichkeit der Kreuzpräsentation<sup>144</sup>. Die verschiedenen Wege der Antigenpräsentation werden in Kapitel 1.2.4 detailliert beschrieben. Für eine tiefergehende

Betrachtung können DCs auf Basis ihrer Lokalisation, Effektorfunktionen und der Expression von Oberflächenmarkern in verschiedene Subpopulationen differenziert werden. Es wird zwischen den konventionellen DCs (*conventional DCs*, cDCs), den plasmazytoiden DCs (*plasmacytoid DCs*, pDCs), den Langerhans-Zellen (*Langerhans cells*, LC) und den monozytischen DCs (*monocyte-derived DCs*, moDCs) unterschieden<sup>145</sup>. Die cDCs stellen eine sehr spezialisierte Population von DCs mit einer hohen Endozytoseaktivität dar<sup>146</sup>. Eine weitere Unterteilung der cDCs in *lymphoid-organ resident* DCs und *peripheral/migratory* DCs kann anhand des Migrationsverhalten getroffen werden<sup>145</sup>. Der Fokus der pDCs liegt auf einer schnellen und enormen Typ I-Interferon-Antwort nach Virus-Kontakt<sup>147</sup>. Bei den LCs handelt es sich um eine Subpopulation, die in der Epidermis lokalisiert ist. Dort spielen die LCs eine entscheidende Rolle im Zusammenhang mit der Initialisierung der adaptiven Immunantwort durch Fremdanigene, die die mechanische Barriere der Haut durchbrochen haben<sup>148</sup>. Monozyten differenzieren in Abhängigkeit der Wachstumsfaktoren Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) und IL-4 zu moDCs aus<sup>149</sup>. Hauptaufgabe/n der moDCs ist/sind neben der Antigenpräsentation (klassische Antigenpräsentation und Kreuzpräsentation) die Produktion und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*, TNF- $\alpha$ ) und Effektormoleküle wie Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO)<sup>144,150</sup>. Neben den TNF/induzierbare NO-Synthase (iNOS)-produzierenden DCs (Tip-DCs<sup>150</sup>) gehören auch die in dieser Arbeit verwendeten JAWS II-Zellen zu dieser Subpopulation<sup>151,152</sup>. Das Effektormolekül NO wird oft im Zusammenhang mit der Eliminierung von Pathogenen thematisiert<sup>153</sup>, es fungiert aber darüber hinaus offenbar auch als Regulator bei der Interaktion mit weiteren Immunzellen. Dies wurde insbesondere im Zusammenhang mit NK-Zellen in verschiedenen Infektionsmodellen beschrieben. Es wurde beobachtet, dass NO die Aktivität<sup>154-157</sup>, die IFN- $\gamma$ -Sekretion<sup>158</sup> und die Zytotoxizität<sup>159,160</sup> von NK-Zellen beeinflussen kann<sup>161,162</sup>. Eine weitere Möglichkeit bei der interzellulären Kommunikation sind DC-stämmige Exosomen (DC-Exosomen/Dexosomen, DEX). Im Allgemeinen handelt es sich bei Exosomen um endosomal-generierte, extrazelluläre Vesikel, die durch die Fusion von sogenannten Multivesikularkörperchen (*multivesicular bodies*, MVB) mit der Plasmamembran entstehen<sup>163,164</sup>. Die von einer Lipiddoppelschicht isolierten Exosomen können entsprechend dem Zellphänotyp, aus dem sie stammen, sehr stark in den klassischen Makromolekülen (Kohlenhydrate, Proteine, Lipide, Nukleinsäuren) variieren<sup>165</sup>. Entscheidend ist, dass die Exosomen auf Grund ihrer Beschaffenheit dazu in der Lage sind, mit Rezeptoren und anderen Oberflächenstrukturen benachbarter Zellen zu interagieren<sup>164</sup>. Die Freisetzung der Exosomen kann hierbei entweder nach Stimulation, wie bei T-Zellen<sup>166</sup> oder B-Zellen<sup>167</sup>, oder konstitutiv erfolgen, wie bei Makrophagen<sup>168</sup> oder DCs<sup>169</sup>. Charakteristisch für die DEX sind die Mitglieder der TNF-Superfamilie (wie TNF, FasL, Trail) auf ihrer Oberfläche, mittels derer eine direkte Apoptoseinduktion in Tumorzellen ermöglicht wird<sup>170</sup>. Auch eine IFN- $\gamma$ -Induktion kann durch die Bindung des TNF-Rezeptors von NK-Zellen initiiert werden<sup>171</sup>. Darüber hinaus wurde eine NK-Zell-Aktivierung über Exosomen unreifer DCs beschrieben<sup>172</sup>, die durch die Bindung der aktivierenden Rezeptoren (BAT3, MICA, MICB) vermittelt wurde<sup>173,174</sup>. Auch eine Aktivierung von T-Zellen durch Exosomen, dekoriert mit MHC- und kostimulatorischen Molekülen, wird beschrieben<sup>175</sup>. Somit können DCs über die DEX und

Effektormoleküle (wie NO) Interaktionen und Kooperationen mit weiteren Immunzellpopulationen, insbesondere mit NK-Zellen und T-Zellen, eingehen.

#### 1.2.4 Die Mechanismen der MHC I-Antigenpräsentation

Die über MHC I-Moleküle präsentierten Peptidantigene vermitteln dem Immunsystem richtungweisende Informationen über den Zustand der APC <sup>176</sup>. In Kapitel 1.2.1 wurde bereits beschrieben, dass auf diese Weise zwischen gesunden und infizierten oder entarteten Zellen diskriminiert werden kann. Die von intakten Zellen präsentierten Peptidantigene werden toleriert, wohingegen die von infizierten oder entarteten Zellen präsentierten Peptidantigene von Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden und zur Eliminierung der Zielzelle führen <sup>177</sup>. Die klassische MHC I-Antigenpräsentation kann durch alle kernhaltigen Zellen durchgeführt werden und basiert auf überwiegend zytosolischen Peptiden, wie Virusproteinen <sup>178</sup>. Im Allgemeinen stellen MHC I-Moleküle Heterodimere dar, die aus einer schweren, in der Plasmamembran verankerten Kette (dem integralen Membranglykoprotein, auch die  $\alpha$ -Untereinheit) und einem löslichen Protein (dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin) bestehen. Dieser Komplex kann in vier Domänen unterteilt werden. Die extrazelluläre Region der schweren Kette besteht hierbei aus drei Domänen ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3), die vierte Domäne bildet das lösliche  $\beta$ 2-Mikroglobulin <sup>179</sup>. Die sogenannte Peptid-Bindungsfurche wird durch die Untereinheiten  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 gebildet und ermöglicht so die Bindung der 8-15 Aminosäuren langen Peptidantigene auf der Oberfläche des MHC I-Moleküls <sup>180</sup>. Die beiden Ankerreste der Peptide sind bei dieser Bindung maßgeblich, da sie mit den Bindungstaschen der MHC I-Moleküle interagieren <sup>181</sup>. Durch Variationen im MHC I-Allel besitzen diese unterschiedliche Bindungstaschen und demzufolge unterschiedliche Präferenzen für die Peptidantigene <sup>182</sup>. Startend mit der Prozessierung endogener Proteine, erfolgt die Generierung der Peptidantigene für die klassische MHC I-Antigenpräsentation überwiegend im Zytosol. Mit Hilfe des Proteasoms werden die Fremdantigene hier in kurze Peptide gespalten und folgend über den ABC-Peptidtransporter-Komplex *transporter associated with antigen processing* (TAP)1/2 in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert <sup>183,184</sup>. Im ER können die Peptide auf leere MHC I-Moleküle geladen werden. Dieser Prozess wieder über den Peptid-Ladungs-Komplex (*peptide loading complex*, PLC) realisiert <sup>185</sup>. Die Bestandteile des PLC, ergänzend zu dem unbeladenen MHC-Molekül und des TAP1/2-Transporters, sind die Chaperone Tapasin und Calreticulin, die Proteindisulfidisomerase (PDI) und die Reduktase ERp57 <sup>186</sup>. Tapasin vermittelt hierbei die Bindung hoch affiner Peptidantigene an die MHC I-Moleküle und bildet eine Verbindung zwischen dem MHC I-Chaperon-Komplex und dem TAP1/2-Transporter <sup>187</sup>. Nach Abschluss des Beladungsprozesses dissoziiert der MHC I-Peptid-Komplex vom PLC. Anschließend verlässt der Komplex das ER über den sekretorischen Weg hin zur Zelloberfläche und präsentiert dort die Peptidantigene an CD8<sup>+</sup> T-Zellen <sup>186,188</sup>. Allerdings gibt es neben dem klassischen MHC I-Antigenpräsentationsweg, wie bereits angedeutet, noch die Möglichkeit der Kreuzpräsentation. Die Kreuzpräsentation wird mehrheitlich von DCs (insbesondere CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs <sup>189,190</sup>), in geringerem

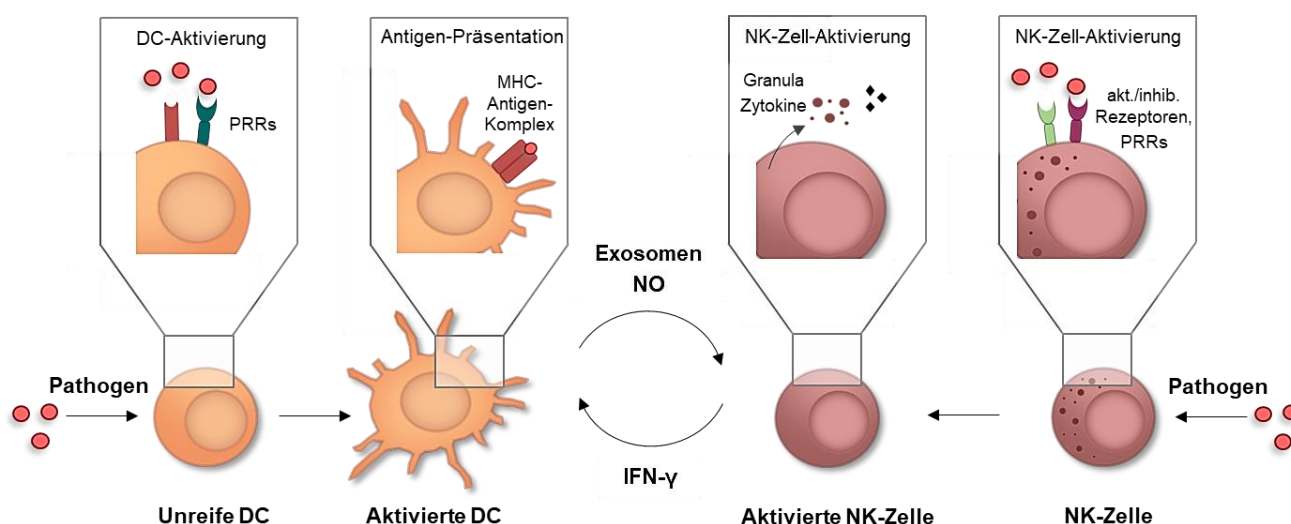
Maße auch von Makrophagen und B-Zellen, ausgeführt <sup>144</sup>. Die Kreuzpräsentation ist für die Bekämpfung viraler und bakterieller Infektionen entscheidend, spielt aber auch bei Abstoßungsreaktionen von Transplantaten eine Rolle. Diese alternative Form der Antigenpräsentation kann sowohl TAP/Proteasom-abhängig als auch TAP/Proteasom-unabhängig erfolgen <sup>191</sup>. Unabhängig von der Beteiligung von TAP und Proteasom werden die extrazellulären Antigene zunächst über verschiedene Aufnahmemechanismen in die APCs aufgenommen. Hierbei nutzen Makrophagen überwiegend Phagozytose, während DCs die rezeptorvermittelte Endozytose nutzen <sup>141</sup>. Die folgende Kreuzpräsentation wird mehrheitlich über den TAP/Proteasom-abhängigen, auch zytosolischen, Weg vermittelt <sup>192</sup>. Dabei erfolgt zunächst eine endosomale Vorprozessierung der extrazellulären Fremdartigene. Anschließend werden die Antigene über den Transporter Sec61 in das Zytosol transportiert und dort im Proteasom weiter prozessiert <sup>193</sup>. Die generierten Peptidantigene werden dann durch den TAP1/2-Transporter dem klassischen MHC I-Antigenbeladungsweg zugeführt. Im Falle des TAP/Proteasom-unabhängigen, auch vakuolären, Weges werden die Antigene nach der endosomalen Prozessierung unmittelbar auf rezirkulierende MHC I-Moleküle beladen und zur Zelloberfläche transportiert <sup>194</sup>. Es wird vermutet, dass beide Wege parallel ablaufen und somit nicht scharf voneinander zu trennen sind <sup>195</sup>.

### 1.2.5 Die Funktion von NK-Zellen im Immunsystem

NK-Zellen stellen neben den T- und B-Zellen eine weitere Subpopulation der Lymphozyten dar <sup>196</sup>. Allerdings besitzen sie keine Rezeptoren für die spezifische Detektion von Fremdartigenen auf der Oberfläche <sup>197</sup>. Der Schwerpunkt der NK-Zellen liegt vielmehr in der zügigen Eliminierung sowohl Virus- und Bakterien-infizierter als auch entarteter Zellen <sup>198-202</sup>. Die Aktivierung der NK-Zellen und damit ihre zytotoxische Wirkung ist dabei in höchstem Maße reguliert, um gesunde und intakte Zellen vor einer fälschlichen Eliminierung zu schützen <sup>203</sup>. Die Regulierung der NK-Zell-Aktivierung kann in diesem Zusammenhang auf verschiedene Weisen erfolgen. Zunächst besteht die sogenannte „*missing-self*“-Theorie. Hierbei wird die Hypothese vertreten, dass die Aktivierung der NK-Zellen auf inhibierenden Oberflächenrezeptoren (murin: Ly49; human: KIR) beruht. Diese Rezeptoren detektieren die MHC I-Expression der Zielzellen, die unter normalen Umständen konstitutiv erfolgt, unter Zellstress allerdings reduziert wird <sup>196,204</sup> und so zur Aktivierung der NK-Zellen führt. Konträr dazu basiert die „*induced-self*“-Theorie auf der Annahme, dass aktivierende NK-Zell-Rezeptoren (wie NKG2D <sup>205</sup>, CD16, NK1.1, Nkp46 oder 2B4 <sup>204</sup>) Proteine, die unter zellulärem Stress exprimiert werden, erkennen und so das aktivierende Signal induzieren <sup>204</sup>. Alternativ können auch von APCs sezernierte Zytokine, beispielsweise Typ I-IFN, IL-12, IL-15 und IL-18, eine Aktivierung der NK-Zellen induzieren <sup>206</sup>. Erneut nehmen die DCs eine Schlüsselrolle ein, indem sie nicht nur die relevanten Zytokine sekretieren (IFN- $\alpha/\beta$ , IL-12, IL-15), sondern darüber hinaus eine NK-Zell-Aktivierung über Zell-Zell-Kontakt hervorrufen können <sup>206</sup>. Weitere Möglichkeiten der Aktivierung sind außerdem eine direkte bakterielle oder virale Infektion von NK-Zellen <sup>202,207</sup> sowie die Detektion von Pathogenen über PRRs. Letzterer Mechanismus wurde



sowohl für die TLRs als auch für die *nucleotide-binding and oligomerization domain* (NOD)-Rezeptoren und die *NOD-like* (NLR)-Rezeptoren beschrieben<sup>208-212</sup>. NK-Zell-aktivierenden Rezeptoren benötigen nachweislich die Proteinkinase C (PKC)  $\theta$  für eine langanhaltende Signalvermittlung und die Initiierung der spezifischen Effektorfunktionen<sup>213</sup>. In diesem Kontext besteht die Möglichkeit der natürlichen Zytotoxizität. Dieser Mechanismus erfolgt ohne vorherige Sensibilisierung und induziert daher eine schnelle Eliminierung der Zielzelle<sup>196</sup>. Nachdem die NK-Zelle die Zielzelle erkannt hat, wird die Degranulierung, also die Exozytose der sekretorischen Granula, induziert. Dieser Prozess geht zwangsläufig mit einer Remodellierung des Zytoskelettes einher<sup>214</sup>. Dabei werden die überwiegend Granzym B- und Perforin-haltigen sekretorischen Granula durch die lytische Synapse transportiert und ihr Inhalt in den immunologischen Spalt entlassen<sup>196</sup>. Die Hauptaufgabe des Perforins ist die Permeabilisierung der Membran, so dass das Granzym B nachfolgend in das Zytoplasma der Zielzelle entlassen werden kann. Am Zielort spaltet Granzym B verschiedenste Proteine, wie die Caspasen, und führt so zur Induktion der Apoptose<sup>215</sup>. Eine weitere Effektorfunktion besteht in der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC). Diese beruht auf der Erkennung und Bindung der Fc-Teile monomerer Immunglobulin (Ig)G-Antikörper über den Fc $\gamma$ III-Rezeptor (CD16) von NK-Zellen. Im Gegensatz zu der natürlichen Zytotoxizität muss in diesem Fall vorab eine Sensibilisierung, klonale Expansion und Antikörperproduktion von B-Zellen stattgefunden haben<sup>216</sup>. Kommt die NK-Zelle in Kontakt mit einer antikörperdekorierten Zielzelle, sekretiert sie IFN- $\gamma$  und zytotoxische Proteine, die zur Eliminierung der Zielzelle führen<sup>196</sup>. Die NK-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion erfolgt allerdings nicht nur über die Degranulierung, sondern kann in entarteten Zellen auch über Liganden der TNF-Familie (wie FasL, TRAIL und TNF) induziert werden<sup>217</sup>. Des Weiteren sezernieren aktivierte NK-Zellen verschiedenste Zytokine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF) und Chemokine (CCL-3, CCL-4, CCL-5), die die Eliminierung der Zielzellen ebenfalls begünstigen<sup>218</sup>. Eine Schlüsselrolle kann dabei dem IFN- $\gamma$  zugesprochen werden. Einerseits erhöht IFN- $\gamma$  die MHC I-Expression beziehungsweise die Expression seiner Varianten auf Tumorzellen (ULBP, MICA/MICB) und fördert so deren Detektion. Andererseits kann IFN- $\gamma$  selbst auch maßgeblich auf die Kontrolle des malignen Wachstums einwirken<sup>219</sup>. Weiterhin hat IFN- $\gamma$  auch übergreifende Effekte auf andere Immunzellpopulationen. Einerseits kann die Differenzierung von naiven T-Lymphozyten zu T-Helferzellen (T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen) induziert und somit eine nachfolgende T-Zell-Antwort verstärkt werden<sup>220</sup>. Andererseits erwies sich die NK-Zell-vermittelte IFN- $\gamma$ -Sekretion als bedeutend für die Reifung und nachfolgenden die Effektorfunktionen von DCs<sup>221</sup>. Das Zusammenspiel zwischen NK-Zellen und DCs, wie auch schon in Kapitel 1.2.3 beschrieben, ist in der Abbildung 1-2 zusammengefasst.



**Abbildung 1-2: Zusammenspiel dendritischer Zellen und NK-Zellen im Rahmen der angeborenen Immunität**

Dendritische Zellen (DCs) erkennen Pathogene über die konservierten Mustererkennungsrezeptoren (PRRs). In Folge kommt es zur Reifung und zur Präsentation mikrobieller Antigene über den MHC-Antigen-Komplex, notwendig für die Einleitung der adaptiven Immunantwort. Außerdem werden DC-stämmige Exosomen (DEX) sekretiert, die zelluläre Informationen an die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) weiterleiten und diese dadurch aktivieren können. Auch NK-Zellen können Pathogene über verschiedene Rezeptoren (aktivierende/inhibierende Rezeptoren; PRRs) detektieren. Kommt es zur Infektion, schüttet die aktivierte NK-Zelle zytotoxische Granula aus und sekretiert das Signalmolekül Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). IFN- $\gamma$  wiederum kann unreife DCs aktivieren, ihre Reifung initiieren und so die Antigenpräsentation veranlassen.

### 1.2.6 Immunzellfunktionen und -metabolismus unter Hypoxie

Die Sauerstoffversorgung im Organismus kann stark variieren. Eine Vielzahl aktueller Veröffentlichungen diskutiert die Variabilität der Sauerstoffverfügbarkeit im Basalzustand sowie während Inflammation, Tumorentwicklung oder anderer Pathologien und deren Einfluss auf die Immunantwort<sup>222-224</sup>. Für eine generelle Beschreibung der Sauerstoffversorgung wird zunächst zwischen Normoxie (20% O<sub>2</sub>, 160 mmHg) und Hypoxie (< 2% O<sub>2</sub>, 15 mmHg) unterschieden. Der Begriff der Physoxie beschreibt darüber hinaus die tatsächliche Sauerstoffkonzentration im Gewebe, die mit etwa 5% O<sub>2</sub> (38 mmHg) bemessen wird. Die Physoxia kann im Weiteren in eine physiologische (2% O<sub>2</sub>, 15 mmHg) und pathologische Physoxia (1% O<sub>2</sub>, 8 mmHg) aufgeteilt werden<sup>225</sup>. Die Verfügbarkeit dieses Sauerstoffs bedingt eine Reihe zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Migration, Metabolismus und Apoptose<sup>226</sup>. Die Reaktion auf die Veränderung in der Mikroumgebung wird in diesem Kontext durch die Familie der Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren (HIFs) reguliert. Die dimeren Transkriptionsfaktoren bestehen aus einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit und einer Sauerstoff-sensitiven  $\alpha$ -Untereinheit (HIF-1 $\alpha$  oder HIF-2 $\alpha$ ). Die Stabilität der  $\alpha$ -Untereinheit wird durch die Prolylhydroxylase (PHD) und den *factor inhibiting HIF* (FIH, Asparaginhydroxylase) bestimmt. Sobald die Enzyme aktiv sind, führen sie zur Hydroxylierung der HIF- $\alpha$ -Untereinheit, was eine proteasomale Degradation zur Folge hat<sup>227</sup>. Kommt es zur Inaktivierung der Enzyme, wird die  $\alpha$ -Untereinheit stabilisiert und zum Nukleus transportiert. Dort folgt die Formierung eines Komplexes mit der  $\beta$ -Untereinheit. Der Komplex bindet folglich die *hypoxia response element sequences* (HRE) in den Zielgenen und vermittelt die Effektorfunktionen<sup>226</sup>. In diesem Zusammenhang können neben der Sauerstoffkonzentration auch Effektormoleküle

oder pathogene Strukturen eine Inhibierung der Hydroxylasen und damit eine sauerstoffunabhängige Stabilisierung der HIF- $\alpha$ -Untereinheit initiieren<sup>228</sup>. Dieses Phänomen wurde unter anderem im Kontext mit LPS<sup>(228,229)</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>(230)</sup>, ROS<sup>(231,232)</sup> oder NO<sup>(232-234)</sup> beschrieben. HIFs regulieren (O<sub>2</sub>-abhängig und O<sub>2</sub>-unabhängig) insbesondere die Effektorfunktionen und die Versorgung von Immunzellen. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass die Aktivierung von HIFs Einfluss auf die Migration, die Reifung, die immunologischen Funktionen und die metabolische Umprogrammierung von Immunzellen nimmt<sup>226</sup>. Bei der metabolischen Umprogrammierung, auch Warburg Effekt<sup>235</sup>, handelt es sich um den Wechsel von oxidativer Phosphorylierung (OXPHOS) hin zur aeroben Glykolyse. Dieser Wechsel sichert die Energieversorgung der Zellen über die Glykolyse unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit und der Funktionalität der Mitochondrien<sup>226,227</sup>. In Makrophagen nimmt die Stabilisierung von HIFs unter anderem Einfluss auf die Phänotyp-Polarisierung, die Beweglichkeit und die antibakterielle Abwehr<sup>232,236,237</sup>. In DCs führt die HIF-Aktivierung beispielsweise zu Änderungen in der Differenzierung, der Migration, der Antigenpräsentation, der Zytokinausschüttung und dem Überleben der Zellen<sup>232,238-240</sup>. Neben den wirtszellseitigen Auswirkungen beeinflusst die Hypoxie insbesondere intrazelluläre Pathogene. In diesem Kontext wurde gezeigt, dass *Chlamydia pneumoniae* zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion eine Aktivierung von HIF- $\alpha$  induziert, um das intrazelluläre Überleben unter hypoxischen Bedingungen zu sichern<sup>228</sup>. Für *Mycobacterium tuberculosis*<sup>241</sup> und *Pseudomonas aeruginosa*<sup>242</sup> konnte beobachtet werden, dass hypoxische Umgebungen die Bakterien weniger empfindlich gegenüber Antibiotika machen und so das Überleben verbessern. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Hypoxie und HIFs einen entscheidenden Einfluss auf zelluläre und pathogene Prozesse und auf die Wirts-Pathogen-Interaktion nehmen.

### 1.2.7 Die Immunbiologie einer *C. burnetii*-Infektion

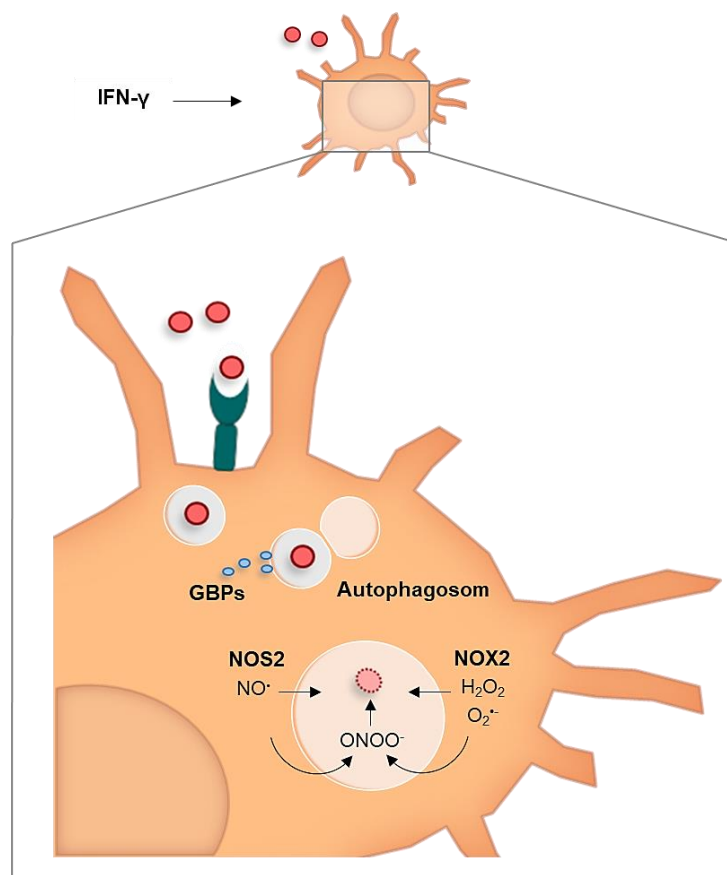
An der Erkennung und Bekämpfung der intrazellulär-replizierenden Coxiellen sind sowohl das innate als auch das adaptive Immunsystem beteiligt. Zu den initialen Zielzellen der Bakterien gehören neben Monozyten und Makrophagen<sup>243,244</sup> auch DCs<sup>74</sup>. Die Aufnahme erfolgt dabei über die rezeptorvermittelte Endozytose, wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben<sup>44</sup>. Im Kontext der Makrophagen-Infektion induziert *C. burnetii* eine Polarisierung der Zellen in den M2-Phänotyp, welcher mit der Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine (TGF- $\beta$ , IL-1ra, IL-19) assoziiert ist<sup>245</sup>. Darüber hinaus unterdrückt *C. burnetii* (virulent, NMI und avirulent, NMII) die MHC-Antigenpräsentation infizierter Makrophagen<sup>40</sup>. Diese Form der Immunsabversion wurde ebenfalls für DCs beschrieben, in diesem Fall allerdings nur bei der Infektion mit dem virulenten Coxiellen-Stamm<sup>74</sup>. Da eine Immunzellaktivierung auch über die bereits beschriebenen PRRs ausgelöst werden kann, ist die Untersuchung dieser Rezeptoren im Fokus aktueller Untersuchungen. In murinen und humanen Infektionsmodellen wird eine mögliche Beteiligung von TLR1 (Peptidoglycan-/Lipoprotein-Erkennung), TLR2 (Lipoprotein-Erkennung), TLR4 (LPS-Erkennung) und TLR6 (Lipoprotein-Erkennung) im Kontext der *C. burnetii*-Infektion untersucht<sup>246,247</sup>. Auch für

die intrazellulären NLRs (wie NOD2) wird eine mögliche Beteiligung während der Infektion beschrieben<sup>246</sup>. Weiterhin ist in diesem Zusammenhang auch der Einfluss des genetischen Polymorphismus der PRRs im humanen System untersucht worden. Hierbei zeigte sich, dass bestimmte genetische PRR-Varianten mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einhergehen, chronisches Q-Fieber zu entwickeln<sup>248</sup>. Basierend auf den Untersuchungen zu den TLRs wird angenommen, dass das Ph I-Coxiellen-LPS maskierend auf diese Rezeptoren wirkt, um weitere Antagonisten zu inhibieren. Diese Annahme wird als mögliche Erklärung für die Beobachtung herangezogen, dass die avirulenten Coxiellen im Vergleich zu den virulenten Bakterien in murinen Infektionsmodellen eine robuste DC-Reifung und T<sub>H</sub>1 Immunität anregen, da das verkürzte Ph II-LPS immunologisch reaktiver ist<sup>74,249</sup>. Es bestehen allerdings auch erweiterte Erklärungsansätze zur Immunologie des Coxiellen-LPS. Diese Hypothesen beschreiben Ph I- und Ph II-Bakterien weniger als unabhängige, distinkte Populationen, sondern vermuten vielmehr einen Evasionsmechanismus durch einen aktiven Wechsel von Ph II auf Ph I während der Infektion im Wirt. Grundlegend dafür sind klinische Daten. Bereits eine sehr frühe Untersuchung beschreibt einen reversiblen Phasenwechsel. In diesem Fall wurden die Bakterien unter *in vitro* Bedingungen kultiviert, was zum Verlust des Ph I-LPS führte. Im Rahmen einer experimentellen Infektion konnte dann das Ph I-LPS wieder detektiert werden, ein Hinweis auf eine reversible Transformation<sup>75</sup>. Weitere klinische Daten stützen diese frühen Ergebnisse über die Detektion phasenspezifischer Antikörper. Im Infektionsverlauf mit virulenten Bakterien zeigte sich zunächst eine Antikörperreaktion im Kontext mit Ph II-LPS und erst zeitlich verzögert im Kontext mit Ph I-LPS<sup>250</sup>. Damit zeigt die akute Q-Fieber-Infektion eine Antikörperdominanz gegenüber Ph II- und die chronische Q-Fieber-Infektion eine Antikörperdominanz gegenüber Ph I-Antigenen<sup>251-253</sup>. Es wird vermutet, dass das verkürzte Ph II-LPS ein natürlicher Bestandteil der virulenten *full-length* LPS-Coxiellen ist und darauf aufbauend auch eine Immunität gegenüber Ph I- und Ph II-LPS zu erwarten ist<sup>254</sup>. In diesem Zusammenhang haben bereits sehr frühe Studien vermutet, dass das Ph I-LPS eine Rolle bei der Erkennung, Zugänglichkeit und Bindung von Antikörpern spielt<sup>255</sup>. Aktuelle Untersuchungen beschreiben dieses Phänomen auch als „*immunological decoy*“<sup>79</sup>. Hierbei wird das Ph II-LPS als Ablenkungsmechanismus eingesetzt, der es den Bakterien ermöglicht, den Wirt zu infizieren und eine Immunreaktion gegen das Ph II-LPS zu initiieren, während das komplexere Ph I-LPS synthetisiert wird. Die resultierenden Antikörper basierend auf dem Ph II-LPS sind somit nicht protektiv gegenüber den transformierten *full-length* LPS-Coxiellen. Die Immunantwort gegen das Ph I-LPS kann daher erst verzögert eingeleitet werden und verschafft den Coxiellen einen zeitlichen Vorteil für die Verbreitung und Replikation im Wirt<sup>79</sup>. Außerdem erzeugt das Phänomen der LPS-Ermüdung/Toleranz eine Maskierung der weiteren Infektion, da das bakterielle LPS nicht weiter über die Immunzellrezeptoren erkannt wird<sup>76-78</sup> (dazu auch Kapitel 1.1.3). Diese Annahme wird durch die Analyse der an der LPS-Synthese beteiligten Gene gestützt. Es konnte beobachtet werden, dass zwei der sechs beteiligten Gene essenziell für die Elongation von Ph II zu Ph I sind<sup>256</sup>. Zusammenfassend zeigt sich eine große Variation an Hypothesen und Erklärungsansätzen, die im Rahmen weiterer Studien zu untersuchen sind, um die vollständigen Funktionen des Coxiellen-LPS aufzuklären.

Infolge einer erfolgreichen Antigenpräsentation aktivierter APCs wird die adaptive Immunantwort eingeleitet. Dieser scheint eine große Bedeutung zuzukommen, denn Maussysteme mit fehlender T- und B-Zellimmunität zeigten in diesem Zusammenhang eine starke *C. burnetii*-Infektion<sup>80,257,258</sup>. In Vergleichsstudien, in denen die T-Zell-Antwort, nicht aber die antikörpervermittelte B-Zell-Immunität ausgeschaltet wurde, konnte ebenfalls keine Eliminierung der Infektion erreicht werden. Allerdings konnte der Transfer von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in immunschwache SCID-Mäuse die Kontrolle der Infektion wiederherstellen<sup>259</sup>. Als besonders relevant hat sich dabei die T<sub>H</sub>1-vermittelte Immunantwort herausgestellt<sup>14</sup>. Bestätigt wird dies durch ein murines Infektionsmodell, in dem die Mäuse mit einer verringerten oder ausbleibenden IFN- $\gamma$ -Ausschüttung hohe Mortalitätsraten aufweisen. Die Bedeutung von IFN- $\gamma$  als das Schlüsselzytokin einer T<sub>H</sub>1-Zell-Antwort wird dadurch überaus deutlich<sup>257</sup>. Es wurde darüber hinaus beschrieben, dass die IFN- $\gamma$ -Aktivierung infizierter Zellen die *C. burnetii*-Replikation durch die Produktion von ROS und RNS hemmen kann<sup>260-262</sup>. Gleichzeitig sind die Bakterien jedoch im Stande, die ROS-Produktion über die Sekretion einer sauren Phosphatase zu blockieren<sup>263</sup>. Es besteht die Hypothese, dass dadurch die Bildung des Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase-Komplexes verhindert wird<sup>264</sup>. Die RNS-Produktion bedingt die Neusynthese von iNOS wird beispielsweise nach TLR-Stimulation<sup>265</sup> oder durch die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine<sup>266</sup> initiiert. Das beschriebene Ausbleiben einer solchen Stimulation führt in infizierten Makrophagen schlussfolgernd nicht zu einer entsprechenden RNS-Synthese<sup>245</sup>. Allerdings konnte unter Zugabe von IFN- $\gamma$  für *in vitro*-Systeme mit Fibroblasten und Makrophagen gezeigt werden, dass das Zytokin eine partielle Kontrolle der Infektion über die Produktion von ROS und/oder RNS ermöglicht<sup>260,261,267</sup>. Ferner wird für die Kontrolle einer akuten Q-Fieber-Infektion außerdem die Bildung von Granuloma als relevant diskutiert<sup>14</sup>. Eine grundlegende Beteiligung von T<sub>H</sub>1-Zellen konnte auch für die Granulomabildung nachgewiesen werden<sup>44</sup>. Welcher genaue Mechanismus zur T-Zell-Aktivierung führt, kann durch die derzeitige Studienlage nicht geklärt werden. Die B-Zell-vermittelte Immunantwort zeigte, wie oben beschrieben, *in vivo* im Vergleich zu der T-Zell-vermittelten Immunität keinen erheblichen Einfluss auf die Klärung der Infektion. Dennoch vermuten mehrere Studien einen positiven Sekundäreffekt auf Basis der Antikörperproduktion<sup>259,268</sup>. In Tier und Mensch konnte eine Antikörperantwort sowohl nach einer primären *C. burnetii*-Infektion als auch nach Injektion von *C. burnetii*-Antigenen nachgewiesen werden<sup>258,269-271</sup>. Während der akuten Infektion wurden spezifische IgM Antikörper gegen Ph I und spezifische IgM, IgA und IgG Antikörper gegen Ph II-Coxiellen detektiert. Im Verlauf der chronischen Infektion wurden ausschließlich IgA und IgE detektiert<sup>272</sup>. Neben den T-Lymphozyten als IFN- $\gamma$ -Produzenten wurde auch die Beteiligung von IFN- $\gamma$ -produzierenden NK-Zellen an der *C. burnetii*-Infektion untersucht. Die limitierende Datenlage zeigt, dass die NK-Zellen ähnlich den B-Zellen keinen Einfluss auf die Klärung der Infektion nehmen. Jedoch ließ sich weiter beobachten, dass es unter NK-Zell-Depletion zu einer schwereren Histopathologie kommt<sup>257</sup>. In diesem Zusammenhang könnten ebenfalls etwaige Sekundäreffekte von NK-Zellen während der Coxiellen-Infektion vermutet werden.

### 1.3 Zellautonome Abwehrmechanismen des Immunsystems

Im Kontext der zellautonomen Immunität spielen Signalmoleküle wie pro-inflammatorische Zytokine eine bedeutende Rolle für die Induktion und Effektivität der Abwehrmechanismen. Eine Gruppe stark regulierender Signalmoleküle sind die IFNs <sup>273,274</sup>. Die IFNs werden nach aktuellem Forschungsstand in drei Subtypen unterschieden, Typ I IFN (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ), Typ II IFN (IFN- $\gamma$ ) und Typ III IFN (IFN- $\lambda$ ). Die jeweiligen Liganden binden spezifische Rezeptorkomplexe und induzieren daher verschiedene Signalkaskaden. Typ I und III IFN-vermittelte Signale verlaufen über *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1)-Heterodimere, wohingegen Typ II IFN-Signale über STAT1-Homodimere weitervermittelt werden. Die jeweiligen STAT1-Moleküle werden in Folge durch assoziierte Tyrosinkinassen (*Janus kinases*, JAKs und *tyrosine kinase 2*, TYK2) phosphoryliert. Im Falle von Typ I und III IFN-Signalen formen die phosphorylierten STAT1/STAT2-Heterodimere einen gemeinsamen Komplex mit *IFN-regulatory factor* (IRF) 9, welcher als *IFN-stimulated gene factor* (ISGF) 3 bezeichnet wird. Dieser Komplex verlagert sich in den Zellkern und bindet dort *IFN-stimulated response elements* (ISREs) in den Promotorregionen entsprechender Effektorgene. Die phosphorylierten STAT1-Homodimere der Typ II IFN-Signalvermittlung (auch GAF) werden unmittelbar zum Nukleus translokalisiert und binden dort *IFN- $\gamma$ -activated site* (GAS) Promotorregionen <sup>275</sup>. Typ II IFN kommt im Zusammenhang mit der Bekämpfung bakterieller Infektionen eine besondere Rolle zu <sup>261,276-279</sup>. Daher werden im Folgenden die dominanten Wirkungsmechanismen über das GTPase-, das NADPH-Oxidase 2 (NOX2)/ROS- und das iNOS/NO-System (Abb. 1-3) genauer betrachtet.



**Abbildung 1-3: IFN- $\gamma$ -regulierte, zellautonome Immunitätsmechanismen in APCs**

Wird eine Antigen-präsentierende Zelle (APC) infiziert, ermöglicht das Signalmolekül Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) eine starke Induktion verschiedener zellautonomer Immunitätsmechanismen. Die induzierten Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) dekorieren die parasitophoren Vakuolen eingedrungener Erreger, induzieren autophagosomale Eliminierung und Inflammation-Aktivierung. Außerdem interagieren sie mit der NADPH Oxidase (NOX2), die ebenfalls durch IFN- $\gamma$  induziert wird. Es folgt die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Gleiches gilt für die induzierbare NO-Synthase (iNOS), welche reaktive Stickstoffspezies (RNS,  $\text{NO}^{\cdot}$ ) produziert. Eine Kombination von ROS und RNS führt zur Bildung weiterer Radikale, exemplarisch gezeigt Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^{\cdot}$ ).

**1.3.1 Die Funktionen des GTPase-Systems**

Die GTPase-Proteinfamilie kann in drei Mitglieder, die Mx-Proteine, die p47 GTPasen/*immunity-related GTPases* (IRGs) und die p65 GTPasen/GBPs aufgeteilt werden. Die Genexpression aller Mitglieder, mit Ausnahme der Mx-Proteine, wird besonders stark durch IFN- $\gamma$  induziert<sup>279</sup>. Die Mx-Proteine hingegen werden durch Typ I und Typ III IFNs induziert<sup>278,280-284</sup>. Weiter zeigen die Mx-Proteine speziell eine starke antivirale Funktion, so dass schon sehr früh beschrieben werden konnte, dass diese Proteine mitverantwortlich für die Resistenz gegenüber Influenzaviren sind<sup>285,286</sup>. Die p47 GTPasen/IRGs werden dominant über IFN- $\gamma$  induziert, können aber auch über Typ I und Typ III IFNs oder LPS aktiviert werden<sup>287</sup>. Angriffspunkt dieser GTPasen sind intrazelluläre Erreger (zytosolisch und vakuolär), in dem sie den Transfer zu den Lysosomen vermitteln oder direkten Einfluss auf die Zerstörung des Erregerkompartiments oder den Erreger selbst nehmen. So wurde der Einfluss der p47 GTPasen/IRGs auf die Eliminierung von beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydomphila psittaci* beschrieben<sup>282,288-294</sup>. Eine vergleichende Wirkung wurde bisher nicht im humanen System nachgewiesen<sup>280</sup>. Die p65 GTPasen/GBPs werden ähnlich zu den p47 GTPasen/IRGs hauptsächlich durch Typ II IFN (IFN- $\gamma$ ) induziert, wenngleich auch eine Aktivierung der Genexpression durch IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  nachgewiesen wurde<sup>273</sup>. Im murinen System konnte darüber hinaus für einige p65 GTPasen/GBPs (GBP1-GBP5) ebenfalls eine Induktion in Anwesenheit von LPS gezeigt werden<sup>295</sup>. Auch die p65 GTPasen/GBPs sind an der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene beteiligt. Beschrieben wurde diese im Rahmen von murinen Infektionsmodellen für *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii* und *Mycobacterium bovis*<sup>278,282,296</sup>. GBP1 erscheint dabei maßgeblich für die IFN- $\gamma$ -induzierte Abwehr der intrazellulären Pathogene über Xenophagie, also die selektive Autophagie<sup>276,277,279,297-299</sup>. Des Weiteren wurde für die p65 GTPasen/GBPs eine direkte Interaktion mit einem IFN- $\gamma$ -induzierbaren Mechanismus zellautonomer Immunität, dem ROS-System, gezeigt. In Anwesenheit von IFN- $\gamma$  erleichtern p65 GTPasen/GBPs die Aktivierung notwendiger NOX2 Holoenzyme und rekrutieren zytosolische Untereinheiten des NOX2-Komplexes in Richtung bakterieller Vakuolen von *Listeria monocytogenes* und *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin<sup>282</sup>. Ferner wurde nachgewiesen, dass eine IFN- $\gamma$ -aktivierte *GTPase leucinerich repeat kinase 2* (LRRK2) die NOX2 Aktivität gegenüber *Salmonella Typhimurium* fördert<sup>300</sup>.

### 1.3.2 Die Funktionen des NOX2/ROS-Systems

Das NOX2/ROS-System beruht auf der Freisetzung von ROS. Darunter werden sowohl chemisch reaktive (ein oder mehr freie Elektronen) Radikale als auch nicht-reaktive (keine freien Elektronen) Sauerstoffderivate verstanden<sup>104,301</sup>. Für die Ausschüttung dieser Moleküle sind Enzyme der NADPH-Oxidase (NOX)-Familie verantwortlich. Zu dieser gehören NOX1-5 sowie die Dual-Oxidasen (DUOX) 1 und 2, wobei NOX2 im humanen System den Hauptanteil an der ROS-Produktion ausmacht und daher eine zentrale Rolle in der Eliminierung von Pathogenen einnimmt<sup>104</sup>. NOX2 besteht aus zwei Transmembran-Heterodimeren, gp91<sup>phox</sup> und gp22<sup>phox</sup> (zusammengefasst auch als Cytochrom b558 bezeichnet) und weiteren vier regulatorischen Untereinheiten (p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> und der GTPase Rac2). Die zytosolisch vorliegenden Untereinheiten sind für Aktivierung und Stabilisierung von NOX2 verantwortlich, denn nur der funktionale Komplex aus Heterodimeren und Untereinheiten ist zum Elektronentransfer in der Lage, der die intrazelluläre oder extrazelluläre Ausschüttung ROS ermöglicht<sup>301</sup>. Im Ruhezustand liegen die Transmembran-Heterodimere gp91<sup>phox</sup> und gp22<sup>phox</sup> in Vesikeln vor<sup>302</sup>. Kommt es zur Aktivierung, wird das inaktive Guanosindiphosphat (GDP)-gebundene Rac2 in aktives Guanosintriphosphat (GTP)-gebundenes Rac2 konvertiert und ermöglicht die Rekrutierung der Heterodimere zur Zielmembran<sup>303</sup>. Die folgende Phosphorylierung von p47<sup>phox</sup> ermöglicht die eigene Stabilisierung und die Interaktion mit gp22<sup>phox</sup> am Heterodimer-Komplex. Weiter werden auch p67<sup>phox</sup> und p40<sup>phox</sup> aus dem Zytosol zur Membran rekrutiert und phosphoryliert<sup>304</sup>. Die Interaktion von phosphoryliertem p67<sup>phox</sup>, Rac2 und den Heterodimeren erzeugt die notwendige Konformationsänderung für den Elektronentransport und somit die ROS-Produktion<sup>305</sup>. Die Rolle der phosphorylierten p40<sup>phox</sup> Untereinheit ist nicht eindeutig geklärt, scheint aber gemeinsam mit p67<sup>phox</sup> einen Einfluss auf Aktivierung und Regulierung von NOX2 zu haben<sup>306</sup>. Der Einfluss von IFN- $\gamma$ -induzierter NOX2 in Kooperation mit GTPasen in der Immunabwehr wurde bereits in Kapitel 1.3.2 beschrieben. Freigesetzte ROS können dabei unmittelbar mit DNA, Lipiden oder Proteinen interagieren und diese schädigen<sup>102-104</sup>. NOX-induzierte ROS, wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub><sup>-</sup>, zeigten dabei einen negativen Einfluss auf die Vitalität einer Vielzahl von Erregern, unter anderem *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*<sup>104</sup>, *Mycobacterium tuberculosis*<sup>307,308</sup> oder *C. burnetii*<sup>261</sup>. Die Effizienz der bakteriellen Abwehr hängt dabei entscheidend von der Wirtszelle ab. So wird für Makrophagen eine effiziente ROS-vermittelte Eliminierung der Pathogene beschrieben, wohingegen ROS in DCs mehrheitlich zu einer verstärkten Kreuzpräsentation, weniger zur Bekämpfung der eindringenden Pathogene führt<sup>309-311</sup>.

### 1.3.3 Die Funktionen des iNOS/NO-Systems

Die Wirkungsweise des iNOS/NO-Systems erfolgt ähnlich dem NOX2/ROS-System über die Generierung von Radikalen. Verantwortlich dafür ist die Familie der NO-Synthasen (NOSs). Für die NOSs sind drei Subtypen mit einer Sequenzhomologie von 50-60% beschrieben, die anhand der



Gewebespezifität differenziert werden<sup>312</sup>. Unterschieden wird dabei zwischen endothelialer NOS (eNOS, auch NOS I), induzierbarer NOS (iNOS, auch NOS II) und neuronaler NOS (nNOS, auch NOS III)<sup>313-315</sup>. iNOS und eNOS liegen dabei in gelöster Form vor, während eNOS als membrangebunden beschrieben wird<sup>316</sup>. Weiter finden sich Unterschiede in der Wirkungsweise der NOSs. In diesem Kontext zeigen eNOS und nNOS auch im Ruhezustand eine konstitutive Aktivität, sind aber darüber hinaus über Kalzium und Kalmodulin induzierbar<sup>312</sup>. Die Hauptfunktion von eNOS liegt dabei in der Regulation des Gefäßtonus, wohingegen nNOS möglicherweise in der retrograden Signalübertragung der Synapsen liegt<sup>317</sup>. Infolge der Induktion wird NO in geringen bis moderaten Mengen generiert und bindet Hämeisen löslicher Guanylatzyklasen (*cyclic guanylate cyclase*, cGC), um zyklisches Guanosinmonophosphat (*cyclic guanosine monophosphate*, cGMP) zu aktivieren. cGMP ist als *second messenger* in der Lage, eine Vielzahl weiterer Mediatoren, wie Ionenkanäle, Proteinkinasen oder Phosphodiesterasen, zu aktivieren. Außerdem nimmt cGMP ebenfalls Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration und die Muskelspannung<sup>318</sup>. Im Gegensatz dazu wird iNOS nicht von ruhenden Zellen exprimiert, ist aber über verschiedene immunstimulierende Moleküle, wie IFN- $\gamma$  oder LPS, induzierbar. Infolgedessen kommt es zu einer vergleichsweise starken NO-Produktion, die außerdem (im Gegensatz zu eNOS und nNOS) unabhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration ist<sup>319,320</sup>. Des Weiteren wurde kürzlich eine weitere NOS, die mitochondriale NOS (mtNOS) beschrieben. Wie nNOS und eNOS wird für mtNOS eine Kalziumabhängigkeit beschrieben. Die Funktion der mtNOS wurde in Nager-Modellen nachgewiesen und zeigt eine Funktion im Rahmen der mitochondrialen Bioenergetik<sup>321-323</sup>. Die genaue Regulation sowie die Interaktion mit anderen NOSs ist allerdings derzeit noch ungeklärt<sup>324</sup>. Unabhängig von der jeweiligen Spezifität der einzelnen Enzyme erfolgt die Biosynthese des schnelllebigen freien Radikals NO. Ausgangssubstrat ist dabei L-Arginin. L-Arginin reagiert in Anwesenheit von O<sub>2</sub> und NADPH (Elektronendonator) zu dem Intermediat N<sup>w</sup>-Hydroxy-L-Arginin und in einem zweiten Oxidationsschritt zu L-Citrullin und NO. Die Monooxygenase I- und II-vermittelte Reaktion verläuft unter Einbeziehung diverser Kofaktoren (Häm, Flavinmononukleotid (FMN), Flavinadenindinukleotid (FAD) und Tetrahydrobiopterin (H<sub>4</sub>B, THB)), die die Elektronenübertragung ermöglichen<sup>312,315,325</sup>. Es besteht auch die Möglichkeit einer nicht-enzymatischen NO-Synthese auf Basis von Nitrit und einer Umgebung mit niedrigem pH-Wert und reduzierenden Bedingungen (beispielweise vorliegend in Magen, auf der Hautoberfläche oder im Ischämie-Herz). Es wird angenommen, dass die Funktionen von nicht-enzymatisch- und enzymatisch-generiertem NO vergleichbar sind, die generelle Bedeutung und Beziehung zu den NOSs sind derzeit allerdings noch ungeklärt<sup>326-328</sup>. Das hergestellte NO fungiert sowohl als *second messenger*<sup>329</sup>, hat aber auch Einfluss auf die Physiologie<sup>330-332</sup> und bei der Bekämpfung von eindringenden Pathogenen, unter anderem *Leishmania major*<sup>333,334</sup>, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria*, *Rickettsia*, *Chlamydia*<sup>153,335,336</sup> und *C. burnetii*<sup>260,261</sup>. Im Zusammenhang mit der Radikal-vermittelten zellulären Immunität wird darüber hinaus beschrieben, dass das NOX2/ROS-System und das iNOS/NO-System ineinandergreifen. Die toxischen Produkte (wie Hydroxyl-Radikale, hypochlorige Anionen, Stickstoffdioxid oder Peroxynitrit), die aus der Reaktion der Radikale beider Systeme entstehen, können die einzelne Wirkung beider Systeme noch verstärken<sup>337,338</sup>.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

DCs gehören als professionelle APCs zu der *first-line-of-defense*, den ersten Immunzellen, die während einer Infektion mit den eindringenden Pathogenen sehr früh in Kontakt treten. Sie sind in der Lage, Erreger über verschiedenste Oberflächenrezeptoren zu detektieren, aufzunehmen und proteolytisch zu prozessieren. Durch ihre Fähigkeit zur MHC-vermittelten Antigenpräsentation können sie die spezifischen antigenischen Peptide des Erregers auf ihrer Oberfläche präsentieren und sind damit essenziell für die Vermittlung zwischen innatem und adaptivem Immunsystem sowie die Ausrichtung der nachgeschalteten Immunantwort. Die über DCs initialisierte T-Zell-Immunität scheint essenziell für die erfolgreiche Abwehr einer *C. burnetii*-Infektion und eine effiziente Bakterieneliminierung zu sein. Ungeachtet dieser zentralen Aufgabe und Bedeutung sind die zellulären sowie pathogenen Prozesse während einer Coxiellen-Infektion in DCs bis heute nicht ausreichend verstanden. Vor allem mit Blick auf die initiale Infektionsphase und dem damit verbundenen Auftreten von LPS Ph II-Coxiellen bestehen noch erhebliche Unklarheiten im Feld der zoonotischen Infektionsforschung. Ein wichtiges Ziel dieser Promotionsarbeit war daher die molekularen, zellbiologischen und immunologischen Abläufe für Coxiellen-infizierte DCs im Kontext der Funktionsreifung und MHC I-Antigenpräsentation zu charakterisieren und ein besseres immunologisches und zellbiologisches Verständnis der wechselseitigen DC-Pathogen-Interaktion zu schaffen. Auf Grundlage bereits vorangegangener Forschungsarbeiten scheint vor allem das pro-inflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$  einen maßgeblichen Anteil an der erfolgreichen Immunabwehr von APCs gegen Coxiellen zu haben. Allerdings fehlen bisher detaillierte Studien zur anti-Coxiellen Abwehr in infizierten DCs unter Einfluss dieses wichtigen Zytokins. Entsprechendes gilt auch für die Einflussnahme des umgebenden Sauerstoffgehalts während der Coxiellen-Infektion und Immunabwehr. Hypoxie ist ein wichtiges Kennzeichen für infizierte, entzündete und beschädigte Gewebe, nimmt Einfluss auf die Effektorfunktion und Zytokinausschüttung von Immunzellen und ist zudem eng mit dem Überleben infizierter Wirtszellen und intrazellulärer Pathogene verbunden. Somit ist ein weiterer zentraler Punkt dieser Promotionsarbeit die zellbiologische Aufklärung des durch IFN- $\gamma$ -vermittelten Einflusses auf *C. burnetii* im Verlauf einer DC-Infektion sowohl unter normoxischen wie auch hypoxischen Bedingungen.

Für die Produktion des APC-stimulierenden IFN- $\gamma$  sind vor allem zwei Zellpopulationen, die T- und die NK-Zellen, verantwortlich. Während die funktionale Beteiligung von T-Zellen, insbesondere die der T<sub>H</sub>1-gerichteten T-Zell-Antwort, in vorherigen Untersuchungen zu Coxiellen-Infektionen eingehend untersucht wurde, ist die Bedeutung von NK-Zellen, die ebenfalls zur *first-line-of-defense* zählen, in diesem Infektionskontext bisher noch ungeklärt. Erste Studien lassen zwar eine Teilnahme an der anti-Coxiellen Abwehr vermuten, eine genaue Analyse Coxiellen-infizierter NK-Zellen wurde jedoch bisher nicht durchgeführt. Somit stellt die Charakterisierung der Coxiellen-Infektion von NK-Zellen einen weiteren Fokus dieser Arbeit dar. In diesem Zusammenhang wird insbesondere die Frage geklärt, ob NK-Zellen ebenfalls als Wirtszellen von *C. burnetii* dienen und über ihre zellautonome zelluläre Selbstverteidigung zur frühen Coxiellen-Abwehr beitragen. Die Erkenntnisse dieser Promotionsarbeit ermöglichen ein besseres und tieferes

Verständnis der *C. burnetii*-Infektion von DCs und NK-Zellen, die als wichtige Komponenten des innate Immunsystems früh mit dem Pathogen Kontakt aufnehmen und wegweisende Schritte der nachgeschalteten Immunantwort einleiten und lenken. Ferner tragen die neuen Erkenntnisse zum IFN- $\gamma$ -Einfluss auf die DC-Infektion mit seinen funktionalen Konsequenzen für die Wirts-Pathogen-Interaktion zu einem besseren Verständnis der *C. burnetii*-Infektion und zellautonomen Selbstverteidigung von Immunzellen während der frühen Phase antibakterieller Immunreaktionen bei.

## 2. Material

### 2.1 Biologisches Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Tabelle 2.1 Verwendete Bakterienstämme

Name	Herkunft
<i>Coxiella burnetii</i> Nine Mile II RSA 439	PD Dr. Anja Lührmann, Universitätsklinikum, Erlangen
tdTomato <i>Coxiella burnetii</i> Nine Mile II RSA 439	Michael Mauermeir & PD Dr. A. Lührmann, Universitätsklinikum, Erlangen
<i>Coxiella burnetii</i> Nine Mile II RSA 439 DotA(T4SS) <sup>-</sup>	PD Dr. Anja Lührmann, Universitätsklinikum, Erlangen
nicht-aviärer <i>Chlamydia psittaci</i> DC15 (S2)	Friedrich-Loeffler-Institut, Jena

#### 2.1.2 Zellen und Zelllinien

Tabelle 2.2 Verwendete Zellen und Zelllinien

Name	Beschreibung	Herkunft
<b>Zelllinien</b>		
L929	murine Fibroblasten, adhärent	ATCC, CCL-1
JAWS II	murine unreife dendritische Zellen, semi-adhärent	ATCC, CRL-11904
KG-1	humane, myeloide Leukämiezellen, Suspension	DSMZ, ACC14
KY-2	muriner NK-Zellklon, adhärent	Dr. W. Yokoyama, St. Louis
RAW 264.7	murine Makrophagen, adhärent	Dr. Björn Corleis, Friedrich-Loeffler-Institut, Riems
<b>Primärzellen</b>		
Primäre Dendritische Zellen	aus dem Knochenmark gewonnene, murine dendritische Zellen, semi-adhärent	C57BL/6 Mäuse
Primäre NK-Zellen	aus der Milz gewonnene, murine NK-Zellen, adhärent	C57BL/6 Mäuse

### 2.2 Medien und Medienzusätze

Tabelle 2.3 Verwendete Medien und Medienzusätze

Name	Herkunft
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, Deutschland
Fetales Rinderserum	Pan Biotech/Bio&Cell, Deutschland/USA
GM-CSF, murin	Invitrogen, Deutschland
IL-2, rekombinant, murin	Miltenyi Biotec, Deutschland
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Gibco, Deutschland
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) Phenolrot-frei	Gibco, Deutschland
Penicillin	Sigma-Aldrich, Deutschland

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Sigma-Aldrich, Deutschland
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypsin	Sigma-Aldrich, Deutschland

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.4 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Name	Herkunft
5x PCR Mastermix Ready to Load	Bio&Sell, USA
Acetic acid	AppliChem, Deutschland
Aceton	Invitrogen, Deutschland
Acrylamid	Carl Roth, Deutschland
Agarose	Invitrogen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bleiactetat	Serva, Deutschland
Bovines Serum Albumin, Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deutschland
<i>C. burnetii</i> Control Antigen Ph I	Virion/Serion, Deutschland
<i>C. burnetii</i> Antigen Ph I	Virion/Serion, Deutschland
<i>C. burnetii</i> Control Antigen Ph II	Virion/Serion, Deutschland
<i>C. burnetii</i> Antigen Ph II	Virion/Serion, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deutschland
Chloroquine	Invitrogen, Deutschland
Chloramphenicol	Carl Roth, Deutschland
Cobaltchlorid (CoCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Deutschland
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Deutschland
Coxevac®	Ceva Santé Animale, Frankreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Deutschland
DNA-free H <sub>2</sub> O	Qiagen, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva, Deutschland
Fc-R Blocking Reagent, mouse	Miltenyi Biotec, Deutschland
Geneticin (G418)	Corning, USA
Glycerin	Merck, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Deutschland
Granzym B	R&D Systems, USA
Griess Reagenz (modified)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Deutschland
HEPES	Serva, Deutschland
IFN- $\gamma$ , rekombinant, human	Invitrogen, Deutschland
IFN- $\gamma$ , rekombinant, murin	Gibco/Invitrogen, Deutschland
Image-iT™ Green Hypoxia Reagent	Invitrogen, Deutschland
Ionomycin	InvivoGen, USA
Isopropanol	Merck, Deutschland
Kalziumchlorid	Merck, Deutschland
Kalziumdihydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Kalziumhydrogenphosphat	Carl Roth, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Deutschland
Kohrsolin	ThermoFisher Scientific, UK

<b>Lipopolysaccharid (LPS)</b>	Sigma-Aldrich, Deutschland
<b>LysoTracker®</b>	CellSignaling, USA
<b>MassRuler (DNA Ladder)</b>	ThermoFisher Scientific, Litauen
<b>Milchpulver</b>	Heirler-Cenovis, Deutschland
<b>Microbial DNA-free water</b>	Qiagen, Deutschland
<b>N, N, N', N' Tetramethylethylendiamin (TEMED)</b>	ThermoFisher Scientific, UK
<b>Natriumazid</b>	Sigma-Aldrich, Deutschland
<b>Natriumchlorid</b>	Carl Roth, Deutschland
<b>Natriumdihydrogenphosphat</b>	Merck, Deutschland
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS)</b>	Merck, Deutschland
<b>Nuclease free water</b>	Promega, USA
<b>n-Octylglucopyranosid</b>	Santa Cruz Biotechnology, Deutschland
<b>Oxoid Mounting Fluid</b>	ThermoFisher Scientific, Deutschland
<b>Oxygen Absorber</b>	O2frepak, China
<b>Oxygen Indicator (AgelessEye®)</b>	Long Life for Art, Eichstetten
<b>PageRuler™ (Protein Ladder)</b>	ThermoFisher Scientific, Litauen
<b>Paraformaldehyd (PFA)</b>	Merck, Deutschland
<b>Phenolrot</b>	Merck, Deutschland
<b>Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)</b>	InvivoGen, USA
<b>Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)</b>	Sigma-Aldrich, Deutschland
<b>Pierce™ ECL Western Blotting Substrate</b>	ThermoFisher Scientific, Deutschland
<b>Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween 20)</b>	BDH Laboratory Supplies, UK
<b>Ponceau S Natriumsalz</b>	Sigma-Aldrich, Deutschland
<b>ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI</b>	Invitrogen, Deutschland
<b>Protein G-Sepharose</b>	GE Healthcare, Deutschland
<b>Saponin</b>	Sigma-Aldrich, Deutschland
<b>iTaq Universal SYBR Green Supermix</b>	Bio-Rad, USA
<b>t-Octoylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100)</b>	Sigma-Aldrich, Deutschland
<b>Trifluoressigsäure (TFA)</b>	Sigma-Aldrich, Deutschland
<b>Trinatriumcitrat-Dihydrat</b>	Merck, Deutschland
<b>Tris</b>	Invitrogen, Deutschland
<b>Trizol (peqGold TriFast)</b>	Peqlab, Deutschland
<b>TNF-α, rekombinant, murin</b>	ThermoFisher Scientific, Deutschland
<b>Wasserstoffperoxid, 30 %</b>	Merck, Deutschland
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Merck, Deutschland

## 2.4 Antikörper

### 2.4.1 Primärantikörper

Die in der folgenden Liste angegebenen Primärantikörper wurden in verschiedenen Methoden eingesetzt. Zur Übersichtlichkeit wurden die Methoden mit jeweiligen Kürzeln versehen. Im Folgenden wird die Durchflusszytometrie mit FACS, der Western Blot mit WB und die Immunfluoreszenz mit IF abgekürzt.

Tabelle 2.5 Verwendete Primärantikörper

Protein	Ursprung	Anwendung	Herkunft
<b>BiP (GRP78)</b>	Maus, mono	WB, 1:200	PD Dr. Ingrid Haas (em.), Max-Planck-Institut, Freiburg
<b>CD107a (LAMP1)</b>	Ratte, mono	FACS, 1:2000	abcam, UK
<b>coxHSP60</b>	Maus, mono	WB, 1:1000	Enzo Life Sciences, Schweiz
<b>CoxII</b>	Kaninchen, poly	IF, 1:5000; FACS, 1:5000; WB, 1:10.000	PD Dr. Anja Lührmann, Universitätsklinikum, Erlangen
<b>GAPDH</b>	Maus, mono	WB, 1:20.000	Millipore, USA
<b>GBP1</b>	Kaninchen, poly	WB, 1:500	ThermoFisher Scientific, Dtl. Santa Cruz
<b>GBP1-5</b>	Maus, mono	WB, 1:200	Biotechnology Inc., USA
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Maus, mono	WB, 1:500	Novus Biologicals, Dtl.
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Kaninchen, poly	WB, 1:500	Novus Biologicals, Dtl. Santa Cruz
<b>Integrin <math>\alpha</math>V<math>\beta</math>8</b>	Maus, mono	WB, 1:500	ThermoFisher Scientific, Dtl.
<b>iNOS</b>	Kaninchen, poly	IF, 1:200; WB, 1:500	ThermoFisher Scientific, Dtl.
<b>Perforin</b>	Maus, mono	IF, 1:200	ThermoFisher Scientific, Dtl.
<b>Perforin</b>	Kaninchen, poly	IF, 1:200	abcam, UK
<b>PKC <math>\theta</math></b>	Kaninchen, poly	WB, 1:1000	Cell Signaling Technology, USA
<b>P-PKC <math>\delta/\theta</math></b>	Kaninchen, poly	WB, 1:1000	Cell Signaling, USA
<b>MHC I (Y-3, H-2K<sup>b</sup>)</b>	Maus, mono	IF, 1:200; FACS, 1:200	Hybridoma-Zelllinie Y3
<b>NOX2 (gp91phox)</b>	Kaninchen, poly	WB, 1:500	abcam, UK
<b>W6/32 (PAN-HLA)</b>	Maus, mono	IF, 1:200	P. Cresswell, USA
<b>3.B10.7 (MHC I, schwere Kette)</b>	Ratte, mono	WB, 1:500	P. Cresswell, USA

### 2.4.2 Sekundärantikörper

Die in der folgenden Liste angegebenen Sekundärantikörper wurden in verschiedenen Methoden eingesetzt. Zur Übersichtlichkeit wurden die Methoden mit Kürzeln versehen. Im Folgenden wird die Durchflusszytometrie mit FACS, der Western Blot mit WB und die Immunfluoreszenz mit IF abgekürzt.

Tabelle 2.6 Verwendete Sekundärantikörper

Protein	Ursprung	Anwendung	Herkunft
<b>IgG (H+L) Kaninchen</b>	HRP	WB: 1:1000	Dianova, Dtl.
<b>IgG (H+L) Kaninchen</b>	Alexa488	IF, 1:500; FACS, 1:500	Cell Signaling, USA
<b>IgG (H+L) Kaninchen</b>	Alexa594	IF, 1:500	Cell Signaling, USA
<b>IgG (H+L) Kaninchen</b>	Alexa647	FACS, 1:500	Dianova, Dtl.
<b>IgG (H+L) Maus</b>	HRP	WB: 1:1000	Dianova, Dtl.
<b>IgG (H+L) Maus</b>	Alexa488	IF, 1:500; FACS, 1:500	Cell Signaling, USA
<b>IgG (H+L) Maus</b>	Alexa594	IF, 1:500; FACS, 1:500	Cell Signaling, USA

IgG (H+L) Ratte	HRP	WB: 1:1000	Dianova, Dtl.
IgG (H+L) Ziege	Alexa680	FACS, 1:200	Cell Signaling, USA

### 2.4.3 Neutralisierende Antikörper

Tabelle 2.7 Verwendete Neutralisierende Antikörper

Protein	Ursprung	Herkunft
TGF- $\beta$ (1,2,3)	Maus, mono	R&D Systems, USA

### 2.5 Inhibitoren, Induktoren und Fluorophore

Tabelle 2.8 Verwendete Inhibitoren und Induktoren

Name	Target	Herkunft
<b>Inhibitoren</b>		
1400W	iNOS	Tocris, USA
Apocynin	NOX2	Sigma-Aldrich, Dtl.
CAPE	NF- $\kappa$ B	Tocris, USA
Catalase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <i>reducer</i>	Sigma-Aldrich, Dtl.
Cycloheximide	Proteinsynthese	abcam, USA
MDC	Clathrin-abhängige Endozytose	Cayman Chemical, USA
NMMLA	iNOS	Sigma-Aldrich, Dtl.
Rapamycin	mTOR	Sigma-Aldrich, Dtl.
SB202190	p38 $\alpha$ & p38 $\beta$	Invivogen, USA
Sotrastaurin	pan-PKC	abcam, USA
Tubacin	HDAC6	Enzo Life Sciences, Dtl.
U0126	MAP Kinasen ERK1/2	Invivogen, USA
<b>Induktoren</b>		
DETA NONOate	NO-Donor	Enzo Life Sciences, USA
Hypoxanthin (HX)/ Xanthinoxidase (XOD)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <i>producer</i>	Sigma-Aldrich, Dtl.
<b>Fluorophore</b>		
DAF-2 DA	Fluoreszierende Stickoxid-Sonde	abcam, Deutschland
MDC	Autophagosomen	Cayman Chemical, USA
Image-iT™ Green Hypoxia Reagent	Hypoxie-Marker	ThermoFisher Scientific, Deutschland



## 2.6 Sequenzen

### 2.6.1 Primersequenzen

Alle in der folgenden Tabelle aufgelisteten Primerpaare wurden von der Firma Metabion bezogen.

Tabelle 2.9 Verwendete Primersequenzen

Gen	Sequenz	Produkt (bp)
<b>Mykoplasmen-Test</b>	Forward 5'-CCAGACTCCTACGGGAGGCA-3'	550
	Reverse 5'-GGTCTGAGGATGCCCTCCGT-3'	
<b>DotA (T4SS)</b>	Forward 5'-GCGCAATACGCTCAATCACA-3'	70
	Reverse 5'-CCATGGCCCCAATTCTCTT-3'	
<b>GAPDH 1</b>	Forward 5'-GGTAGAAGGTACGGTGTGAACG-3'	233
	Reverse 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3'	
<b>NOS2</b>	Forward 5'-GGAGAACGGAGAACGGAGAAC-3'	166
	Reverse 5'-GCTGAGAACAGCACAAAGGGG-3'	
<b>Katalase (CBU_0281)</b>	Forward 5'-GCCCATTTCCGATGACCAGA-3'	344
	Reverse 5'-TCCCCACGAGGTCCCAATTA-3'	
<b>Superoxiddismutase (SOD CU/ZN, CBU_1822)</b>	Forward 5'-TCAGGCGTGGCGCTAAAATA-3'	222
	Reverse 5'-CCAATTTGCGAGGCTTACCG-3'	
<b>Superoxiddismutase (SOD FE, CBU_1708)</b>	Forward 5'-ATCGAAGGCACCCCTTTTGA-3'	260
	Reverse 5'-TCTTTAACGAGCCAAGCCCA-3'	
<b>Cytochrom <i>bd</i> (CydA-2, CBU_0965)</b>	Forward 5'-GTCGGGGCGCATTGATTT-3'	209
	Reverse 5'-ATAGCCACTGTCATCGAGCG-3'	
<b>Cytochrom <i>bd</i> (CydA-1, CBU_0218)</b>	Forward 5'-TGGCGGTTGCTTTTATGGC-3'	224
	Reverse 5'-ACCGGGCACAAACACCTTTTA-3'	
<b>Cytochrom <i>bd</i> (CydB, CBU_0966)</b>	Forward 5'-GCGGATCATGCCGCTTTTAG-3'	255
	Reverse 5'-AATCTTGGGAAGCGGCGTAT-3'	

### 2.6.2 siRNA Sequenzen

Alle in der folgenden Tabelle aufgelisteten siRNA-Sequenzen wurden von der Firma Qiagen bezogen.

Tabelle 2.10 Verwendete siRNA-Sequenzen

Gen	Sequenz
<b>AllStar negative siRNA</b>	Proprietär
<b>NOS2</b>	AACGTTGGATTTGGAGCAGAA
	ACGGAGAACGTTGGATTTGGA
	CACATCGGATTTCACTTGCAA
	CCGATTTAGAGTCTTGGTGAA
<b>GBP1 (GBP2b)</b>	TTGCATATCTCTGAAGATAAA
	CAGAAGGAACAGAGTTATCAA
	CAGGAAAGACTTCTCAAGCAA
	CAGATTGAAATGGAACGTATA

## 2.6.2 CRISPR/Cas9 Sequenzen

Alle in der folgenden Tabelle aufgelisteten Primer für die *guide* RNA (gRNA) wurden von der Firma EurofinsGenomics bezogen. Die Klonierungsstelle von *BbsI* ist in der Primersequenz kursiv hervorgehoben.

Tabelle 2.11 Verwendete Primersequenzen für gRNA

<b>Gen</b>	<b>Sequenz</b>
mNOS2 gRNA1	CACCCGACCCGTCCGTCCAGTATGTGTTT
mNOS2 gRNA2	CACCCATGACACTCTTCTTCACCAAGTTT
mNOS2 gRNA3	CACCTGCAGCTTGTCCAGGGGATTCGTTT

## 2.7 Kits

Tabelle 2.12 Verwendete Kits

<b>Name</b>	<b>Herkunft</b>
DNeasy Blood&Tissue Kit	Qiagen, Deutschland
TGF beta-1 Human/Mouse Uncoated ELISA Kit	ThermoFisher Scientific, Dtl.
IMAGEN™ Chlamydia Kit	ThermoFisher Scientific, Dtl.
L-Lactate Assay Kit	abcam, USA
L-Lactate Assay Kit	Sigma-Aldrich, Deutschland
Extract Me genomic DNA	Blirt, USA
JC-1 Mitochondrial Potential Flow Cytometry Assay Kit	Cayman Chemical, USA
Mouse Dendritic Cell Nucleofector Kit	Lonza, Deutschland
Mouse Granzyme B Platinum ELISA	eBioscience, Österreich
Mouse IFN-γ Platinum ELISA	eBioscience, Österreich
Nitric Oxide Assay Kit (Flow Cytometry – Red)	abcam, USA
Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit, Panel A	R&D Systems, USA
Reverse Transcription System (AMC Reverse Transcriptase)	Promega, USA

## 2.8 Glaswaren

Tabelle 2.13 Verwendete Glaswaren

<b>Name</b>	<b>Herkunft</b>
Bechergläser	Schott-DURAN, Deutschland
Deckgläser	Menzel-Gläser, Deutschland/USA
Erlenmeyer-Kolben	Schott-DURAN, Deutschland
Glaspipetten	Scherf-Präzision, Deutschland
Neubauerzählkammer	Carl Roth, Deutschland
Objektträger	Hirschmann, Deutschland

## 2.9 Plastikwaren

Tabelle 2.14 Verwendete Plastikwaren

<b>Name</b>	<b>Herkunft</b>
Deckglasröhrchen	ThermoFisher Scientific, USA
Einmalspritzen, Norm-Ject® (1 ml, 5 ml)	HSW, Deutschland

FACS-Röhrchen	BD Falcon, USA
Filtersysteme (250 ml, 500 ml)	Greiner Bio-One, Deutschland
Kryogefäße (1 ml)	Greiner Bio-One, Deutschland
Mikrotiterplatten (6-, 12-, 96-well)	Greiner Bio-One, Deutschland
LCI-Schale (35 mm)	ibidi, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Deutschland
Real-Time PCR Gefäße & Folien	Peqlab, Deutschland
Ultrazentrifugenröhrchen	Eppendorf, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Deutschland
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Greiner Bio-One, Deutschland

## 2.10 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.15 Verwendetes Verbrauchsmaterial

Name	Herkunft
Entwickler, Roentorol HG	Tetenal, Deutschland
Fixierer, Superfix LR	Tetenal, Deutschland
Kanülen, G21, G18	B. Braun, Deutschland
Nitrozellulose Protran® 0,45 mm	ThermoFisher Scientific, USA
Parafilm	American National Can, USA
Röntgenfilme Super RX, 100 NIF	Fujifilm, Japan
Skalpellklingen	B. Braun, Deutschland
Whatman-Papier, 3 mm	ThermoFisher Scientific, USA
Zentrifugen-Filter, Amicon® 3kDa Membrane, 3000 MWCO	Millipore, USA

## 2.11 Geräte

Tabelle 2.16 Verwendete Geräte

Name	Herkunft
Abflammgerät	CFH, Deutschland
Axiovert200/LSM 5 Exiter	Zeiss, Deutschland
Brutschränke MCO-19AIC	Bergmann, Deutschland/ Forma Scientific, USA
C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop Leica DMI8	Leica, Deutschland
Freezing Container Mr. Frosty™	Sigma-Aldrich, Deutschland
Gel-Elektrophorese-System (Agarose)	Gibco-BRL, Deutschland
Gel-Elektrophorese-System (SDS)	FLI Eigenbau
Heizkammer HT200	ibidi, Deutschland
Kreisschüttler 3015	Gesellschaft für Labortechnik, Deutschland
Kühlschrank, 4°C	Liebherr, Deutschland
Konfokal-Laserscan-Mikroskop DMI6000 TCS SP5	Leica, Deutschland
Lichtmikroskop Leica DM IL	Leica Microsystems, Deutschland
Lichtmikroskop Nikon ECLIPSE TS100	Nikon, Deutschland
MACS Quant	Miltenyi Biotec, Deutschland
Magnetrührer IKA-Combimag RTC	Janke & Kunkel, Deutschland
Nano liquid-chromatography System	Bruker, England
NanoDrop 2000	ThermoFisher Scientific, USA
Nucleofactor II	Lonza, Deutschland
Pinzette	Bochem Instrumente, Deutschland

Pipetten	Gilson, USA/ Biozym, Deutschland
Pipettierhilfe Accu Jet®	Brand, Deutschland
pH-Meter Hanna Checker	Sigma-Aldrich, Deutschland
Röntgenfilm Entwickler Compact2	Protect, Deutschland
SONOREX RK 31 H, Ultraschall	Bandelin, Deutschland
Sterilwerkbank Model 3336 S/N 32002	CEAG Schirp, Deutschland
Stickstofftank Chronos	Messer, Deutschland
Sunrise Remote ELISA Reader	Tecan, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra, Deutschland
TEM Tecnai-Spirit	FEI, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Deutschland
Tiefkühlschrank, -20 °C	Liebherr, Deutschland
Tiefkühlschrank, -80 °C	Liebherr, Deutschland
UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF	Bruker, England
Ultramikrotom UC7	Leica, Deutschland
Ultra-Zentrifuge TL-100	Beckmann, USA
Vakuuier- und Folienschweißgerät	Shenzhen Green Electrical Appliance Co., Ltd, China
KitchenBoss	Scientific Industries, USA
Vortex Genie 2	Mettler Waagen, Deutschland
Waage Mettler PE200	Julabo, Deutschland
Wasserbad Julabo U3	FLI Eigenbau
Western Blot-Blotting-Apparatur	Heraeus Christ, Deutschland/ Eppendorf, Deutschland/ Hettich, Deutschland
Zentrifugen	

## 2.12 Wissenschaftliche Software

Tabelle 2.17 Verwendete wissenschaftliche Software

Name	Herkunft
Agarose-Dokumentation Vision Capt 1	Peqlab, Deutschland
AxioVision	Zeiss, Deutschland
CRISPOR	Open Source, M. Haeussler
Fiji	National Institutes of Health & Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, USA
GelQuant	BioChem Lab Solutions, Deutschland
GraphPad Prism	GraphPad software, USA
IC-Capture	The Imaging Source, Deutschland
Image Studio Lite	Li-Cor Biosciences, USA
LASAF	Leica, Deutschland
ImageJ	National Institutes of Health & Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, USA
Literaturverarbeitung Endnote X7	Thomson Reuters, USA
MACS Quantify	Miltenyi Biotec, USA
Magelan	Tecan, Deutschland
PrimerBlast/NCBI	Nationale Institute of Health, USA
UniProt	UniProt Consortium, Europa/USA

### 3. Methoden

#### 3.1 Zellkulturmethoden

##### 3.1.1 Auftauen von Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden zügig in einem auf 37°C vorgeheizten Wasserbad aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Kulturmedium überführt. Diese Suspension wurde bei 1300 Umdrehungen pro Minute (*rounds/revolutions per minute*, rpm) für 5 Minuten (Min.) bei 4°C zentrifugiert. Der Dimethylsulfoxid (DMSO)-haltige Überstand (ÜS) wurde dekantiert und das verbliebene Zellpellet in 5 ml frischen Kulturmediums resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde anschließend in eine Zellkulturflasche angemessener Größe überführt und mit der entsprechenden Menge Kulturmedium aufgefüllt.

##### 3.1.2 Kultivierung von Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Primärzellen wurden in Inkubatoren bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Sättigung von 7,5% kultiviert. Für jeden Zelltyp wurde ein geeignetes Zellkulturmedium verwendet (siehe Tabelle 3.1). Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit und der notwendigen Zelldichte wurden die Zelllinien alle 3 bis 5 Tage passagiert. Für die Primärzellen und die *knock out*-Zellen wurde außerdem eine maximale Kultivierungslänge von 2 Wochen festgelegt, um das Zellsterben beziehungsweise eine etwaige genetische Instabilität zu vermeiden.

Tabelle 3.1 Verwendete Kulturmedien

Kulturmedium	Agenzien	Menge
<b>L929</b>	IMDM	200 ml
	FBS	10 %
	Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	2 ml
	Amphotericin (5 mg/ml)	100 µl
<b>JAWS II</b>	IMDM	200 ml
	FBS	20 %
	Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	2 ml
	Amphotericin (5 mg/ml)	100 µl
	GM-CSF (100 µg/ml)	10 µl
<b>KG-1</b>	IMDM	200 µml
	FBS	20 %
	Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	2 ml
<b>KY-2</b>	RPMI1640 (2 mM L-Glutamin)	200 ml
	FBS	20 %
	Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	2 ml
	β-Mercaptoethanol (10 µM)	7 µl/l
	IL-2	200 U/ml

<b>RAW 264.7</b>	IMDM	200 ml
	FBS	10 %
	Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	2 ml
	Amphotericin (5 mg/ml)	100 µl
<b>Primäre dendritische Zellen</b>	IMDM	200 ml
	FBS	20 %
	Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	2 ml
	β-Mercaptoethanol (10 µM)	7 µl/l
<b>Primäre NK-Zellen</b>	RPMI1640 (2 mM L-Glutamin)	200 ml
	FBS	20 %
	Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	2 ml
	β-Mercaptoethanol (10 µM)	7 µl/l
	IL-2	200 U/ml

### 3.1.3 Passagieren von Zellen

Das Passagieren der Zellen orientierte sich an der Wachstumsgeschwindigkeit und der gewünschten Dichte der Zelllinien und Primärzellen. Nach 3 bis 5 Tagen wurden die Zellen angepasst an ihre Kultureigenschaften unterschiedlich passagiert. Dafür wurde zunächst das Kulturmedium aller adhären Zellen (L929, KY-2, RAW 264.7, primäre NK-Zellen) abgenommen und verworfen. Um die Zellen vom Zellkulturflaschenboden zu lösen, wurden diese mit einer geeigneten Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung (siehe Tabelle 3.2) behandelt oder im Falle der RAW 264.7-Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Die Menge der eingesetzten Lösung bemaß sich anhand der Größe der verwendeten Zellkulturflaschen (T25 – 1 ml, T75 – 1-2 ml, T175 – 2-3 ml). Die semi-adhären Zellen und Suspensionszellen (JAWS II, KG-1, primäre dendritische Zellen) im Zellkulturüberstand hingegen wurden zunächst in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml) gesammelt und die verbliebenen adhären Zellen anschließend gleichermaßen mit der geeigneten Trypsin-EDTA-Lösung behandelt. Die Trypsin-EDTA-behandelten Zellkulturflaschen wurden für 5 Min. im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Um diese Reaktion abzustoppen, wurde eine äquivalente Menge Kulturmedium hinzugefügt. Nach gründlichem Spülen wurde die entstandene Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt beziehungsweise im Falle der semi-adhären Zellen der bereits gesammelten Zellsuspension zugeführt. Im Anschluss wurde die Suspension bei 1300 rpm für 5 Min. 4°C zentrifugiert. Der nun entstandene ÜS wurde dekantiert und das Zellpellet in einer angemessenen Menge Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden im Anschluss für die weitere Kultivierung auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Darauf aufbauend konnte außerdem die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt werden, um die Zellen in der gewünschten Konzentration für folgende Versuche in Zellkulturplatten auszusäen.

Tabelle 3.2 Verwendete Trypsin-EDTA-Lösungen

Kulturmedium	Agenzien	Menge
<b>L929</b>	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,15 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
	Trypsin	2,5 g
	EDTA	1,25 g
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
<b>JAWS II, KG-1 &amp; Primäre dendritische Zellen</b>	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,15 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
	Trypsin	2,5 g
	EDTA	0,3 g
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
<b>KY-2 &amp; Primäre NK-Zellen</b>	1 mM EDTA in PBS (Sigma-Aldrich)	-

### 3.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Für die Langzeitkonservierung wurden die Zellen, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, aus den Zellkulturflaschen gelöst, zentrifugiert und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauerzählkammer bestimmt. Nun konnten je  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in geeignetem Einfriermedium (siehe Tabelle 3.3) aufgenommen und in vorbereitete Kryoröhrchen überführt werden. Diese wurden zunächst für 24 Stunden (*hours*, h) in einer Einfrierbox bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Anschließend wurden sie zur dauerhaften Lagerung in den flüssigen Stickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) umgesetzt.

Tabelle 3.3 Verwendete Einfriermedien

Kulturmedium	Agenzien	Menge
<b>L929, JAWS II &amp; Primäre dendritische Zellen</b>	FBS	50 ml
	DMSO	10 %
<b>KG-1</b>	Kulturmedium	50 ml
	DMSO	5 %
<b>KY-2 &amp; Primäre NK-Zellen</b>	FBS	50 ml
	DMSO	20 %

### 3.1.5 Kontrolle der Zellen auf Mykoplasmenkontamination

Um mögliche Kontaminationen und damit einhergehende Qualitätsverluste der Zellkulturarbeiten zu verhindern, wurden die kultivierten Zellen regelmäßig auf eine Mykoplasmenkontamination getestet. Dieser Test ist entscheidend für die Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da Mykoplasmen einen großen Einfluss auf den Stoffwechsel der Zellen haben und somit ihre grundlegenden Eigenschaften verändern können<sup>339</sup>. Da Mykoplasmen lichtmikroskopisch nicht detektierbar sind, wurde eine laborinterne Mykoplasmen-Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) etabliert, die die 16S-ribosomale Untereinheit der

Mykoplasmen detektiert. Grundlage dieser PCR waren 100 µl Zellkulturüberstand aus den jeweiligen Zellkulturflaschen. Der laborinternen Vorgabe folgend waren die betreffenden Zellen bei Abnahme des ÜS bereits mindestens 3 Tage in Kultur. Der Zellkulturüberstand wurde 5 Min. bei 95°C erhitzt und anschließend 5 Min. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Aus dem entstandenen ÜS wurden 2 µl als *Template* in der Mykoplasmen-PCR eingesetzt (Zusammensetzung und Temperaturprofil siehe Tabelle 3.4 und 3.5). Die Reaktion wurde in einem T3 Thermocycler (Biometra) durchgeführt.

Tabelle 3.4 Zusammensetzung des Mykoplasmen-PCR-Ansatzes

Agenzien	Menge
Forward Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol)	1 µl
Interne Kontroll-DNA	1 µl
PCR Mix (5x)	4 µl
Template (ÜS)	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Tabelle 3.5 Temperaturprofil der PCR zur Mykoplasmenkontrolle

Schritt	Denat.	Denat.	Annealing	Elongat.	finale Elongat.	Pause
Temperatur	95°C	95 °C	55°C	72°C	72°C	4°C
Zeit	60 s	30 s	60 s	90 s	5 Min.	∞
<b>29 Zyklen</b>						

Zur Visualisierung der Analyse wurden 5 µl des PCR-Amplifikates und ein Marker (*MassRuler DNA Ladder Mix*, ThermoFisher Scientific) auf ein zuvor vorbereitetes 1% Agarose-Gel (siehe Tabelle 3.6) aufgetragen und bei 40 V für 1 h elektrophoretisch aufgetrennt. Bei einer vorliegenden Mykoplasmenkontamination wurde neben dem Amplifikat der internen Kontrolle (500 bp) noch ein zweites Amplifikat (550 bp) detektiert.

Tabelle 3.6 Zusammensetzung eines 1% Agarose-Gels

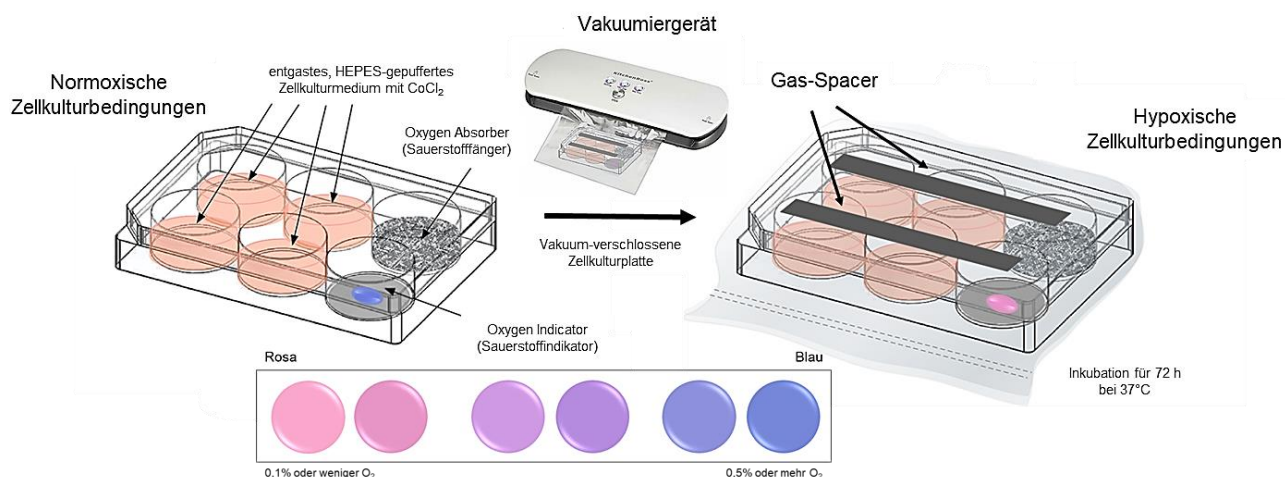
Agenzien	Menge
Agarose in TAE-Puffer	1 %
Ethidiumbromid	0,003 %

### 3.1.6 Arbeiten unter Hypoxie

Aufbauend auf den Ausführungen in Kapitel 1.2.6, wurden im Rahmen dieser Arbeit ausgewählte Experimente ebenfalls unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde ein Hypoxiekammersystem (im Weiteren als HypoxyCell bezeichnet) verwendet, dessen Konzept und Aufbau auf einer Dienstleistung von PD Dr. Michael R. Knittler beruht (Abb. 3-1). Dabei wurde zwischen einer physiologischen und einer pathologischen Sauerstoffkonzentration differenziert. Es wurden die Begriffe Normoxie für eine Sauerstoffkonzentration von 5% O<sub>2</sub> und Hypoxie für eine Sauerstoffkonzentration von <1% O<sub>2</sub> festgelegt und verwendet. Diese Kammer wurde für alle Infektionsexperimente verwendet.



Zur Durchführung des Experiments wurden je Ansatz  $1 \times 10^5$  Zellen in entgastem, HEPES-gepuffertem Medium (siehe Tabelle 3.7) in einer 6-well-Zellkulturplatten ausgesät. Anschließend wurde die Zellkulturplatte in einer geeigneten Vakuumierfolie platziert und diese zunächst ohne Vakuum verschlossen. Die Zellen wurden so für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  im Inkubator gelagert. Diese Vorgehensweise sicherte die Adhärenz und die Assimilation der Zellen. Nach Ablauf der Setzzeit wurde die Vakuumierfolie geöffnet und die Zellen je nach Versuchsaufbau mit *C. burnetii* infiziert (siehe Kapitel 3.2.3) und/oder mit anderen Reagenzien behandelt. Alle wells wurden außerdem mit  $100 \mu\text{M}$  Cobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ )-Lösung versetzt.  $\text{CoCl}_2$  stabilisiert den hypoxischen Zustand, in dem es die Hydroxylasen inaktiviert, die für den Abbau des Hypoxie-Faktors HIF-1 $\alpha$  verantwortlich sind<sup>340</sup>. Um den Umgebungssauerstoffgehalt zu minimieren, wurden der Platte sogenannte *Oxygen Absorber*, also Sauerstofffänger, hinzugefügt. Diese enthalten aktiviertes Eisenpulver (50-60%) sowie Aktivkohle (3-15%) und Natriumsalze (5-15%) und sind so in der Lage, Sauerstoff zu binden. Eingesetzte *Gas-Spacer* ermöglichten eine Verbindung zwischen den einzelnen wells der Platte und so die Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der gesamten Zellkulturplatte. Zur Kontrolle der hypoxischen Bedingungen wurde die Platte des Weiteren um einen Sauerstoffindikator (*Oxygen Indicator/Oxy Eye*) ergänzt. Die vollständige Hypoxie-Zellkulturplatte wurde in einer Vakuumierfolie platziert und mit Hilfe eines geeigneten Vakuumiergerätes unter Vakuum gesetzt und verschlossen. Es folgte eine Inkubationszeit von 72 h bei  $37^\circ\text{C}$  im Inkubator. Die Funktionalität des Systems wurde mikroskopisch über das *Image-iT™ Green Hypoxia Reagent* (ThermoFisher Scientific) in direktem Vergleich zu einer Standard-Hypoxiekammer (Whitley H35) überprüft, sowie mittels einer Western-Blot-Analyse des Hypoxie-Markers HIF-1 $\alpha$  bestätigt. Die Etablierung der hypoxischen Zellkulturbedingungen ist in Abbildung 3-1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3-1: Etablierung von hypoxischen Zellkulturbedingungen auf Basis einer FLI-Dienstleistung von PD Dr. Michael R. Knittler (HypoCell)**

Für die Etablierung hypoxischer Zellkulturbedingungen wurden die Zellen unter Normoxie-Bedingungen in entgastem, HEPES-gepuffertem und mit  $\text{CoCl}_2$  versetztem Medium ausgesät. Außerdem wurden der Platte ein Sauerstofffänger (*Oxygen Absorber*) und ein Sauerstoffindikator (*Oxygen Indicator*) hinzugefügt, um die hypoxische Umgebung zu garantieren. Nach der Assimilation der Zellen wurden diese mit *C. burnetii* infiziert und/oder anderweitig behandelt. Eingesetzte *Gas-Spacer* sicherten die Verbindung zwischen wells. Die Platte wurde in einer geeigneten Folie unter Vakuum gesetzt, luftdicht verschlossen und bis Versuchsende nach 72 h bei  $37^\circ\text{C}$  im Inkubator gelagert.

Die Analyse der Hypoxie-Experimente erfolgte primär mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse (siehe Kapitel 3.4.2 und 3.4.3). Bei der Aufbereitung der Proben zur Herstellung von Zelllysaten war es von hoher Priorität, sehr zügig vorzugehen. Unmittelbar nach Aussetzen der Hypoxie, in diesem Fall nach Entfernen des Vakuums, beginnt die Degradation von HIF-1 $\alpha$ <sup>224,240</sup>. Daher musste die Herstellung der Lysate schnellstmöglich erfolgen, um den Nachweis der Hypoxie über diesen Marker zu sichern. Des Weiteren war zu beachten, dass HIF-1 $\alpha$  Kern-ständig ist, also eine Totallyse der Zellen notwendig ist, um auch die im Kern enthaltenen Proteine nachweisen zu können<sup>240</sup>. Daher wurden die Zellen direkt nach Entfernen des Vakuums mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, die Zellsuspension in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) gesammelt und für 5 Min. bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit eiskaltem Hypoxie-Waschpuffer (siehe Tabelle 3.7) und eine erneute Zentrifugation. Anschließend wurde umgehend mit der Totallyse der entstandenen Zellpellets fortgefahren, welche im Kapitel 3.4.1 beschrieben wird.

**Tabelle 3.7 Für hypoxische Arbeiten verwendete Puffer**

Name	Agenzien
<b>Hypoxie-Zellkulturmedium (pH 7,4-7,5; entgast)</b>	FBS (10%)
	Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)
	Amphotericin (5 mg/ml)
	GM-CSF (100 $\mu$ g/ml)
	HEPES (20 mM)
<b>Hypoxie-Waschpuffer (entgast)</b>	ad. 100 ml IMDM
	100 $\mu$ M CoCl <sub>2</sub> (stets frisch zuzugeben)
	50 $\mu$ M CoCl <sub>2</sub> (stets frisch zuzugeben) ad.10 ml PBS (entgast)

### 3.2 Arbeiten mit *C. burnetii*

Alle Arbeiten, die *C. burnetii* beinhalteten, wurden unter den genannten Sicherheitswerkbänken Klasse II unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 3.2.1 Herstellung eines *C. burnetii*-Stocks

Als Grundlage für die Infektionsversuche wurden zunächst Bakterienstocks hergestellt. Für die Anzucht wurden, bedingt durch die obligat intrazelluläre Lebensform der Coxiellen, die etablierten L929-Fibroblasten als Wirtszellen für die persistente Infektion verwendet<sup>341-343</sup>. Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Abläufe wurden für beide verwendeten Coxiellen-Stämme (siehe Tabelle 2.1.1) gleichermaßen angewandt.

Zunächst wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in einer T25-Zellkulturflasche ausgesät. Nach dem Adhärenz-Werden (ca. 1 bis 2 h) wurden diese mit einer *multiplicity of infection* (MOI) 50 infiziert und bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Sobald die Zellen konfluent wurden, wurden diese passagiert

und/oder auf nächstgrößere Zellkulturflaschen (T75, T175) aufgeteilt. Hierbei war es entscheidend, die Zellkulturüberstände der adhären Zellen nicht zu verwerfen, sondern mitzuführen, um die darin enthaltenen Coxiellen nicht zu verlieren. Die Replikation der Bakterien wurde lichtmikroskopisch über die charakteristischen *Coxiella-containing vacuoles* (CCVs) kontrolliert.

Nach 14 Tagen Anzucht wurde eine Gesamtmenge von 12 bis 16 T175-Zellkulturflaschen erreicht, so dass mit der Aufreinigung begonnen werden konnte. Zunächst wurden alle Zellkulturüberstände in 50 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und das gesamte Volumen bei 4°C und 4500 rpm für 30 Min. zentrifugiert. Die entstandenen ÜS wurden verworfen und die Pellets, die sowohl Bakterien als auch Zellen beinhalteten, in 500 µl doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) gelöst. Diese Suspension wurde in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und für weitere 15 Min. bei 4°C und 4500 rpm zentrifugiert, um letzte Rückstände des Zellkulturmediums zu entfernen. Der ÜS wurde erneut dekantiert, das Pellet ( $x_1$ ) in 500 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bis zur weiteren Aufreinigung auf Eis gestellt. Die adhären Zellen wurden mit 10 ml ddH<sub>2</sub>O/T175-Zellkulturflasche für 45 bis 60 Min. bei 4°C inkubiert, um eine hypotone Lyse zu erreichen. Die entstandene Suspension aus aufgeplatzten Zellen und freigesetzten Bakterien wurde in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, kurz gevortext und bei 4°C und 250 rpm für 10 Min. zentrifugiert. Die Coxiellen-haltigen ÜS konnten nach dieser Zentrifugation in neue Zentrifugenröhrchen überführt und direkt auf Eis gestellt werden. Die verbliebenen Pellets ( $x_2$ ), die erneut gleichermaßen Bakterien und Zellen enthielten, wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und mit den bereits vorhandenen Rückständen ( $x_1$ ) vereinigt. Nun erfolgte das *syringe releasing*, bei dem die Coxiellen-haltigen Zellen, die sich nicht mittels osmotischer Lyse öffnen ließen, mechanisch aufgeschlossen werden. Die Bakterien-Zell-Suspension wurde dazu jeweils 10-mal durch eine 22G und eine 18G Kanüle gezogen, um letzte intakte Zellen zu öffnen. Anschließend wurde die Suspension bei 4°C und 250 rpm für 10 Min. zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis der bakterienhaltige ÜS möglichst klar und frei von Zellrückständen erschien. In einem abschließenden Schritt konnten alle Coxiellen-enthaltenden ÜS bei 4°C und 4500 rpm für 30 Min. zentrifugiert werden. Ergebnis dieses Zentrifugationsschrittes war ein Bakterienpellet. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde dieser Schritt mit den verbliebenen ÜS noch einmal wiederholt. Die entstandenen Pellets wurden in 5 bis 6 ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) aufgenommen und in 50 µl bis 100 µl Aliquots bei -80°C weggefroren und gelagert.

### 3.2.2 Titerbestimmung eines *C. burnetii*-Stocks

Für die Titerbestimmung der Bakterienstocks erwies sich eine Kombination aus quantitativer Real Time (RT)-PCR und Durchflusszytometrie als angemessen, um zwischen den genomischen Äquivalenten (*genomic equivalents*, GE, Detektion infektiöser sowie nicht-infektiöser Bakterien) und den infektiösen Einheiten (*infectious units*, IFU, Detektion ausschließlich infektiöser Bakterien) differenzieren und den tatsächlichen Lebendtitern bestimmen zu können. Eine Gegenüberstellung

beider Methoden ergab eine Differenz von (mindestens) einem Faktor 10 zwischen GE und IFU und verweist auf die Notwendigkeit der Detektion des tatsächlichen Lebendtiters <sup>344</sup>.

### 3.2.2.1 Titerbestimmung eines *C. burnetii*-Stocks mittels Real Time-PCR

Grundlage für die Bestimmung des Titers mittels Real Time-PCR (RT-PCR, auch quantitative PCR) war die genomische DNA (gDNA) des Bakterienstocks. Diese wurde unter Verwendung des DNeasy Blood&Tissue Kits von Qiagen aus 10 µl des betreffenden Coxiellen-Stocks isoliert. Die gDNA wurde unmittelbar weiterverwendet oder bei bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

Die gDNA diente als *Template* für die folgende RT-PCR. Die RT-PCR wurde mit dem iTaq Universal SYBR Green Supermix-System (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Ansatz erfolgte stets in Duplikaten. Als Standard/Bezugsgröße für die Bestimmung der enthaltenen GE diente ein Fragment des Coxiellen-spezifischen Gens DotA. Das Gen beschreibt eine Komponente des T4SS und ist einmalig im bakteriellen Genom kodiert. Auf Grund dieser Eigenschaft wurde DotA von verschiedenen Arbeitsgruppen als Referenz etabliert <sup>41,50</sup>. Ein 109 bp großes Fragment der bakteriellen DotA-Sequenz wurde gemeinsam mit den spezifischen Primerbindestellen in einen pcDNA3.1\_DotA-Vektor ligiert. Der Vektor wurde in bekannten Verdünnungen ( $10^{10}$ ,  $10^8$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ) eingesetzt und ermöglichte so eine genaue Bestimmung der GE aus dem *Template*. Als *non template control* (NTC, Negativkontrolle) wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt. Der verwendete Ansatz und das Temperaturprofil sind nachfolgend beschrieben.

Tabelle 3.8 Ansatz für die RT-PCR zur Titerbestimmung

Agenzien	Menge
Forward Primer (10 pmol)	10,5 µl
Reverse Primer (10 pmol)	10,5 µl
iTaq Universal SYBR Green Supermix	175 µl
DNA-free H <sub>2</sub> O	140 µl
Standard (DotA, 4 Verdünnungen)	je 1 µl
Template (gDNA)	je 1 µl
NTC (H <sub>2</sub> O, Negativkontrolle)	je 1 µl
20 µl Gesamtvolumen/Ansatz	

Tabelle 3.9 Temperaturprofil der RT-PCR zur Titerbestimmung

Schritt	Aktiv.	Denat.	Annealing/Elongat.	Finale Elongat.	
Temperatur	95°C	95 °C	55°C	95°C	52°C
Zeit	5 Min.	10 s	30 s	1 Min.	1 Min.
<b>44 Zyklen</b>					

Für die Analyse der PCR wurden die erhaltenen *cycle threshold* (Ct)-Werte aus den Duplikaten des Standards und des *Templates* zunächst gemittelt. Nun konnte aus den Werten des Standards und den bekannten Potenzen ( $10^x$ ) eine Standardkurve kalkuliert werden. Auf Basis dieser Standardkurve mit gegebenen Zahlenwerten für die Steigung (m) und den Achsenabschnitt (b)

wurde die Bakterienkonzentration der unbekannt Probe über lineare Interpolation mit den unten aufgeführten Gleichungen berechnet.

$$1. y = mx + b$$

$$2. x = \frac{y-b}{m}$$

$$3. GE/\mu l = 10^x$$

$$4. GE/ml = 10^x \times 1000$$

Der gemessene Ct-Wert der unbekannt Probe wurde als y in die Gleichung eingesetzt und diese nach x umgestellt. Da x der Potenz ( $10^x$ ) entspricht, konnte dieser Wert berechnet werden. Das Ergebnis entsprach der GE/ $\mu$ l bei einem Einsatz von 1  $\mu$ l in der RT-PCR. Korrigiert um einen Faktor von 1000 wurden so die GE/ml kalkuliert.

### 3.2.2.2 Titerbestimmung eines *C. burnetii*-Stocks mittels Durchflusszytometrie

Zur Titerbestimmung der Coxiellen-Stocks mittels Durchflusszytometrie wurden  $5 \times 10^5$  L929-Fibroblasten in T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach dem Adhärenz-Werden wurden diese in verschiedenen Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100) mit dem neuen Bakterienstock infiziert. 72 Stunden nach Infektion (*hours post infection*, hpi) wurden die Zellen mit der notwendigen Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 3.1.3). Anschließend wurden die Ansätze intrazellulär mit dem CoxII-Antikörper zum Nachweis von *C. burnetii* angefärbt (siehe Kapitel 3.3.3). Auf Grundlage der Gesamtzellzahlen pro Ansatz (nicht-infizierte Kontrolle und die jeweiligen Verdünnungsstufen), dem prozentualen Anteil infizierter Zellen pro Ansatz und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (VF), konnte der Titer des Coxiellen-Stocks mit der untenstehenden Formel bestimmt werden.

$$IFU/ml = \frac{\text{Anteil infizierter Zellen} \times \text{Zellzahl}}{100} \times VF \times 10$$

Der Mittelwert des Coxiellen-Titers (IFU/ml) wird hierbei aus den Werten der Verdünnungsstufen gebildet, die im linearen Bereich liegen. Darüber hinaus wurde als Ergänzung zu jeder durchflusszytometrischen Titerbestimmung in L929-Fibroblasten außerdem eine Infektionskontrolle in JAWS II-Zellen durchgeführt. Dies garantierte, dass verschiedene Stocks bei gleich eingesetzter MOI auch zu einer vergleichbaren Infektionsrate und Schwankungen bei der Infektiosität nicht zur Verfälschung von Ergebnissen führen. Dafür wurden JAWS II-Zellen mit der geeigneten Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Nach dem Adhärenz-Werden wurden je  $1 \times 10^5$  JAWS II-Zellen, auf Basis des Ergebnisses der bisherigen Titerbestimmung, mit verschiedenen MOIs (10, 20, 50, 75, 100) infiziert. 72 hpi wurde der Anteil infizierter Zellen über eine intrazelluläre Anfärbung mit dem CoxII-Antikörper durchflusszytometrisch bestimmt (siehe

Kapitel 3.3.3). Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte für jeden Stock eine geeignete MOI (Lebendtiter) ausgewählt werden, welche vergleichbare Infektionsraten in JAWS II-Zellen hervorruft und so die Vergleichbarkeit der Resultate garantiert.

### 3.2.3 Infektion von Zellen

Für alle Infektionsversuche wurden die Zellen zunächst, wie unter 3.1.3 beschrieben, mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, zentrifugiert und anschließend die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Abhängig vom jeweiligen Versuchsaufbau wurden die Zellen in der benötigten Dichte in die jeweiligen Zellkulturplatten/-flaschen oder auf Deckgläschen ausgesät. Im besonderen Falle der Suspensionszelllinie KG-1 war zudem eine bis zu 72 h lange Vorbehandlung mit PMA (10 ng/ml) und Ionomycin (100 ng/ml) notwendig, um eine Differenzierung der Zellen und damit das Adhärenz-Werden für eine erfolgreiche Infektion zu induzieren. Entscheidend für die Infektionsversuche war der Wechsel auf antibiotikafreies Kulturmedium mit einer maximalen fetalen Rinderserum (*fetal bovine serum*, FBS)-Konzentration von 10%. Semi-adhärenz Zellen wurden etwa 1 h nach der Aussaat, adhärenz Zellen nach dem Adhärenz-Werden (etwa 1 bis 2 h), mit *C. burnetii* infiziert. Die benötigten Coxiellen-Stocks wurden dazu zügig aufgetaut und entsprechend der zu erreichenden MOI in Zellkulturmedium verdünnt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zelllinien und Primärzellen, sofern nicht anders gekennzeichnet, mit den jeweiligen MOIs (Lebendtiter) infiziert, die Tabelle 3.10 zu entnehmen sind.

Zur Kontrolle auf apoptotischen Zelltod wurden die behandelten und/oder infizierten Kulturen im Umgang und bei der Aufbereitung routinemäßig optisch mittels Trypanblau-Färbung untersucht.

Im Falle der Infektion von NK-Zellen ermöglicht die Zugabe des Inhibitors Sotrastaurin<sup>345</sup> die Detektion intrazellulärer Bakterien in infizierten NK-Zellen, in dem die PKC  $\Theta$ -abhängige Freisetzung (Degranulierung) der bakterienhaltigen Granula dauerhaft blockiert wird.

**Tabelle 3.10** Verwendete MOI zur Infektion der verschiedenen Zelllinien und Primärzellen

Name	Eingesetzte MOI (Lebendtiter)
<b>Zelllinien</b>	
L929	10
JAWS II	10
KG-1	50
KY-2	10
RAW 264.7	10
<b>Primärzellen</b>	
Primäre dendritische Zellen	10
Primäre NK-Zellen	10

### 3.2.4 Reinfektionsassay

Der Reinfektionsassay diente dazu, die Infektiosität von Zellsuspensionen und Zellkulturüberständen, die zuvor bereits mit *C. burnetii* infiziert waren, feststellen zu können. Für die Analyse wurden die jeweiligen Zellen zunächst in gewünschter Dichte in 6-*well*-Zellkulturplatten in antibiotikafreiem Medium ausgesät und nach der Setzzeit mit Coxiellen infiziert. Nach der gewünschten Inkubationszeit (24-120 hpi) wurden entweder nur der Zellkulturüberstand oder die gesamte Zellsuspension weiter aufbereitet.

Im Falle der Zellkulturüberstände wurden diese gesammelt und bei 4°C und 250 rpm für 10 Min. zentrifugiert. Die Suspensionszellen befanden sich nun im Pellet und die Coxiellen im ÜS, so dass dieser vorsichtig abgenommen und erneut bei 4°C und 4500 rpm für 30 Min. zentrifugiert werden konnte. Ergebnis dieses Zentrifugationsschrittes war ein Bakterienpellet, das in Zellkulturmedium resuspendiert und dann direkt für die Reinfektion genutzt werden konnte. Für die Reinfektion aus Zellsuspensionen wurde ebenfalls der Zellkulturüberstand gesammelt, gleichzeitig wurden aber auch die adhärennten Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und mit dem ÜS vereinigt. Zur Freisetzung der Bakterien wurde das im Kapitel 3.2.1 beschriebene *syringe releasing* für einen mechanischen Aufschluss der Zellen genutzt. Anschließend wurden die entstandenen Zelltrümmer bei 4°C und 400 rpm für 5 Min. abzentrifugiert und der Coxiellen-haltige ÜS für die Reinfektion verwendet.

Die ÜS, entstanden aus reinen Zellkulturüberständen oder den Zellsuspensionen, wurden nach der Aufreinigung auf frisch ausgesäte, adhärennte Reporterzellen, hier L929-Fibroblasten, gegeben und für 72 h inkubiert. Als Auswertesystem wurde die durchflusszytometrische Bestimmung der Infektion (also der Anteil infizierter Zellen) über die intrazelluläre Anfärbung mit dem CoxII-Antikörper genutzt (siehe Kapitel 3.3.3).

### 3.2.5 Neutralisationsassay

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anwesenheit sowie die Wirksamkeit neutralisierender Antikörper auf *C. burnetii* in verschiedenen Zellkultursystemen mit Hilfe eines Neutralisationsassays etabliert und überprüft. Das Ausgangsmaterial waren Seren nicht-vakzinierter und Coxevac®-vakzinierter infizierter Schafe aus einem Impf-Vorversuch im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Benjamin Bauer von der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Um festzustellen, ob wirksame neutralisierende Antikörper gegenüber *C. burnetii* in den genannten Seren vorlagen, wurden die Bakterien (MOI 10) zunächst für 6 h bei 4°C auf einem Schüttler mit den Seren inkubiert. Als Positivkontrollen wurden ein Negativserum sowie eine FBS- und eine PBS-Kontrolle mitgeführt. Währenddessen wurden JAWS II-DCs und L929-Fibroblasten als Reporterzellen vorbereitet. Dazu wurden pro Neutralisationsansatz  $1 \times 10^5$  Reporterzellen in 6-*well*-Zellkulturplatten ausgesät. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Bakterien-Seren-Suspension auf die adhärennten Reporterzellen gegeben und für 72 h inkubiert. Ergänzend waren

außerdem stets eine Infektionskontrolle ohne Prä-Inkubation sowie eine nicht-infizierte Negativkontrolle Teil des Versuchsaufbaus. Um die Wirksamkeit der neutralisierenden Antikörper zu untersuchen, wurde die Änderung der Infektionsrate unter Serum-Inkubation im Vergleich zur maximalen Infektionsrate der Positivkontrollen über eine intrazelluläre CoxII-Anfärbung durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.3.3).

Nach der Validierung wurde der Neutralisationsassay im Weiteren als zusätzliches Auswertesystem für eine erweiterte Coxevac<sup>®</sup>-Impfstudie der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Prof. Dr. Martin Ganter, Gesundheitsdienste für kleine Wiederkäuer, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) für ausgewähltes Probenmaterial eingesetzt. Hierbei wurde der relative Neutralisationsfaktor etabliert, bei dem das Verhältnis aus der Wirkung neutralisierender Antikörper vor und nach der Impfung berechnet wird.

### 3.3 Zellbiologische Methoden

#### 3.3.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ermöglicht die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen oder Pathogenen und so Schlussfolgerungen hinsichtlich Protein-Protein- und Protein-Pathogen-Interaktionen sowie Kolokalisationsstudien.

Für derartige Analysen wurden zunächst  $1 \times 10^5$  Zellen/Ansatz in einer 6-well-Zellkulturplatte auf zuvor abgeflammt Deckgläschen in Kulturmedium (ohne Antibiotikum) ausgesät. Nach dem Adhären-Werden der Zellen folgte die *C. burnetii*-Infektion. Hierbei wurden beide der unter 2.1.1 genannten Coxiellen-Stämme eingesetzt. Wurde der rot-fluoreszierende tdTomato-Coxiellen-Stamm verwendet, wurde dem Zellkulturmedium außerdem noch Chloramphenicol (5,7 µg/ml) zugesetzt, um den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten. Nach Ablauf der Inkubationszeit, variierend zwischen 24 und 72 h, begann die Aufbereitung der Immunfluoreszenzmikroskopie-Präparate. In einem ersten Schritt wurde das Zellkulturmedium vorsichtig abgenommen und der Zellrasen mit 1 ml PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Fixierung der Zellen mit Fixierpuffer (siehe Tabelle 3.11) für mindestens 20 Min. bei 4°C auf einem Schüttler. Danach folgten drei weitere Waschschrte mit je 1 ml PBS. Anschließend wurden die Präparate mit 500 µl Waschpuffer (siehe Tabelle 3.11) für 10 Min. bei Raumtemperatur (RT) auf dem Schüttler permeabilisiert. Zielte die Analyse auf eine reine Oberflächenfärbung ab, wurde der Permeabilisierungsschritt ausgelassen und die in Tabelle 3.11 angegebenen Puffer ohne Saponin eingesetzt. Die folgende Inkubation mit 1 ml Blockpuffer (siehe Tabelle 3.11) sorgte für eine Reduktion unspezifischer Bindungen und erfolgte für 1 h bei RT auf dem Schüttler. Nun wurden die Präparate mit den gewünschten Primäantikörpern inkubiert, welche zuvor in geeigneten Verdünnungen mit Blockpuffer angesetzt wurden. Die Anfärbung erfolgte erneut schüttelnd bei RT für 1 h. Anschließend wurde das Primäantikörper-Gemisch abgenommen und die Präparate dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Inkubation mit den Fluoreszenz-gekoppelten Sekundäantikörpern, ebenfalls in geeigneter Verdünnung mit Blockpuffer, folgte im Anschluss für 30 Min. bei RT im Dunkeln. Je nach Versuchsaufbau konnte



eine Zweit-Anfärbung mit einem weiteren Primärantikörper erfolgen, wenn bei der Auswahl der Sekundärantikörper verschiedene Fluoreszenz-Markierungen berücksichtigt wurden. Nach einem weiteren, dreimaligen Waschschrift mit Waschpuffer wurden die Zellen auf einem Objektträger fixiert. Grundlage dafür war ein 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-haltiges oder DAPI-freies Einbettmedium. 10 µl dieses Einbettmediums wurden auf einen vorbereiteten Objektträger pipettiert und das Präparat mit Hilfe einer Pinzette und mit dem Zellrasen nach unten zeigend auf dem Objektträger platziert. Die Präparate wurden in diesem Zustand über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4°C im Dunkeln gelagert und härteten am Folgetag bei RT für 2 bis 3 h im Dunkeln aus. Anschließend wurden die Präparate mit Nagellack versiegelt und bis zur mikroskopischen Analyse bei 4°C im Dunkeln gelagert. Ausgewertet wurden die Präparate an einem Zeiss Axiovert200/Apotome-Mikroskop in einer 63x Vergrößerung.

**Tabelle 3.11** Verwendete Puffer für die Immunfluoreszenz

Name	Agenzien
Fixierpuffer	2% PFA (in PBS)
Waschpuffer	0,1 % Saponin (in PBS)
Blockpuffer	0,1 % Saponin, 3 % BSA (in PBS)

### 3.3.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Unter Einsatz der Transmissionselektronenmikroskopie können Präparate in einer sehr hohen Auflösung bis hinein in den nm-Bereich abgebildet werden. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass Elektronenstrahlen eingesetzt werden, die im Vergleich zu sichtbarem Licht eine deutlich kürzere Wellenlänge aufweisen. Aufbereitung und Analyse der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Objekte wurden durch Frau Dr. Kati Franzke vom FLI Riems durchgeführt.

Als Vorbereitung auf die Transmissionselektronenmikroskopie wurden zunächst  $1 \times 10^6$  Zellen/Präparat in T75-Zellkulturflaschen in antibiotikafreiem Kulturmedium ausgesät und nach der Setzzeit mit *C. burnetii* infiziert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben abgelöst und 5 Min. bei 4°C und 1300 rpm zentrifugiert. Der entstandene ÜS wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen, auf Eis gestellt und dem Labor Franzke zur Epoxidharz-Einbettung übergeben. Im Rahmen der weiteren Aufbereitung wurden die Zellen erneut pelletiert, mit Kakodylatpuffer (siehe Tabelle 3.12) gewaschen und mit der Fixierlösung (siehe Tabelle 3.12) vorfixiert. Nach zwei weiteren Waschschriften mit Kakodylatpuffer erfolgte die Zwischeneinbettung mit Einbettlösung und die Nachfixierung mit Osmium (siehe Tabelle 3.12). Schließlich folgte die Kontrastierung *en bloc* nach zwei weiteren Waschungen mit Kakodylatpuffer. Anschließend wurden die Präparate mit verschiedenen Ethanollösungen schrittweise entwässert und mit Glycidether 100 (siehe Tabelle 3.12) eingebettet. Die Polymerisation erfolgte für 3 Tage bei 60°C.

Zur Herstellung von Präparaten aus Zellkulturüberständen oder Bakterienstocks (*C. burnetii* und *Chlamydia (C.) psittaci*) wurde dieses Protokoll leicht verändert. Die bakterienhaltigen ÜS wurden gesammelt und für 1 h bei 4°C und 4500 rpm zentrifugiert, so dass ein Bakterienpellet entstand.

Nachdem der ÜS verworfen wurde, wurden die Bakterien entweder in einem geringen Volumen (50 µl) resuspendiert oder unmittelbar als Pellet auf Eis gestellt und dem Labor Franzke übergeben. Hier folgte in einem ersten Schritt die Zwischeneinbettung in *Low-Melting-Point* (LMP)-Agarose (siehe Tabelle 3.12), um Materialverlust vorzubeugen. Anschließend wurde mit der Fixierung und den oben genannten Schritten bis zur Polymerisierung fortgefahren.

Nach der vollständigen Polymerisation der Präparate konnten mittels Ultramikrotom (UC7, Leica) Ultradünnschnitte angefertigt werden, die mit Uranylacetat und Bleiacetat nachkontrastiert wurden. Die Schnitte wurden am Transmissionselektronenmikroskop (Tecnai-Spirit, FEI) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV <sup>346</sup> analysiert.

**Tabelle 3.12** Verwendete Puffer und Lösungen für die Transmissionselektronenmikroskopie

Name	Agenzien
<b>Kakodylatpuffer (pH 7,4)</b>	0,1 M Natriumkakodylat (in dH <sub>2</sub> O)
<b>Fixierlösung (Vorfixierung)</b>	2,5% Glutaraldehyd (in Kakodylatpuffer)
<b>Einbettlösung (Zwischeneinbettung)</b>	1,8% <i>Low-Melting</i> -Agarose (in Kakodylatpuffer)
<b>Fixierlösung (Nachfixierung)</b>	2% O <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (in dH <sub>2</sub> O)
<b>Kontrastierungslösung</b>	1% Uranylacetat (in dH <sub>2</sub> O)

### 3.3.3 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es, ebenso wie bei der Immunfluoreszenzmikroskopie, möglich, sowohl Oberflächenmoleküle als auch intrazelluläre Strukturen (Proteine oder Pathogene) mit Antikörpern auf Basis der spezifischen Antikörper-Antigen-Interaktion anzufärben. Die entscheidende Eigenschaft der Durchflusszytometrie ist hierbei, dass neben einer qualitativen Analyse der angefärbten Strukturen auch eine Quantifizierung (prozentual oder als mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) dieser möglich ist. Ursächlich dafür ist das Messprinzip der Durchflusszytometrie, welches darauf basiert, dass die fluoreszenzmarkierten Zellen durch einen Flüssigkeitsstrom vereinzelt und an Laserstrahlen verschiedener Fluoreszenzspektren vorbeigeführt werden. Darauf aufbauend können ergänzend zu der Zielstruktur auch noch Größe (im Vorwärtsstreulicht, *forward scatter*, FSC) und Granularität (im Seitwärtsstreulicht, *side scatter*, SSC) der Zelle analysiert werden. Auch bei der Durchflusszytometrie ist eine Mehrfachanfärbung verschiedener Strukturen möglich, wenn von fluoreszenzmarkierten Antikörpern verschiedener Emissionsspektren Gebrauch gemacht wird.

#### Anfärbung von Oberflächenmolekülen

Für die Anfärbung von zellulären Oberflächenmolekülen wurden je Ansatz 1x10<sup>5</sup> Zellen (nach der Aussaat in antibiotikafreiem Kulturmedium, Infektion und/oder Behandlung und Inkubationszeit) mit Trypsin-EDTA-Lösung (siehe Tabelle 3.2) abgelöst und 5 Min. bei 4°C und 1300 rpm zentrifugiert. Der entstandene ÜS wurde verworfen und das Zellpellet mit 200 µl kaltem DFN (siehe Tabelle 3.13) gewaschen (Zentrifugenröhrchen: 5 Min., 4°C, 1300 rpm; Reaktionsgefäß (1,5 ml): 5 Min., 4°C,

3500 rpm). Nach Verwerfen des ÜS folgte die Resuspension in der gewünschten Primärantikörper-Lösung (verdünnt in DFN, 200 µl/Probe) mit einer Inkubation für 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler. Dies gewährleistete eine gleichmäßige Anfärbung der Zellen. Im Anschluss wurden die Zellen, wie oben beschrieben, mit DFN gewaschen, gefolgt von der 30-minütigen Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (verdünnt in DFN, 100 µl/Probe) bei 4°C im Dunkeln auf dem Überkopfschüttler. Danach wurden die Proben erneut gewaschen und für die Messung am MACS Quant-Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec) in einem angemessenen Volumen (200-500 µl) PBS aufgenommen und in FACS-Röhrchen übertragen.

### Anfärbung intrazellulärer Proteine

Für Untersuchungen intrazellulärer Proteine, Strukturen oder Pathogene (*C. burnetii* und *C. psittaci*) wird eine Permeabilisierung benötigt, die den Fluoreszenz-markierten Antikörpern den Zugang zu der Zielstruktur innerhalb der Zelle ermöglicht. Zu Beginn der Analyse wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/Ansatz, wie oben beschrieben, vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst und bei 1300 rpm und 4°C für 5 Min. zentrifugiert. Um Kulturmediumrückstände zu entfernen, erfolgte außerdem ebenso ein Waschschrift mit kaltem DFN (Zentrifugenröhrchen: 5 Min., 4°C, 1300 rpm; Reaktionsgefäß (1,5 ml): 5 Min., 4°C, 3500 rpm). Nachdem der ÜS verworfen wurde, folgte eine Inkubation der Zellsuspension mit Fixierpuffer (200 µl/Probe, siehe Tabelle 3.13) für 10 bis 15 Minuten bei RT auf dem Überkopfschüttler. Die besagte Permeabilisierung erfolgte nach einer Zentrifugation und dem erneuten Verwerfen des ÜS mit Waschpuffer (200 µl/Probe, siehe Tabelle 3.13) für 30 Min. schüttelnd bei RT. Nach der Permeabilisierung konnte die Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in Waschpuffer, 200 µl/Probe) für 1 h bei RT auf dem Überkopfschüttler erfolgen. Erneut wurden die Proben zentrifugiert und der ÜS verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper (verdünnt in Waschpuffer, 200 µl/Probe) für 30 Min. bei RT im Dunkeln auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Im Falle einer Mehrfachanfärbung wurde an dieser Stelle mit einer weiteren Primärantikörper-Inkubation fortgefahren. Äquivalent zur Oberflächenfärbung wurden die Zellen nach der (letzten) Sekundärantikörper-Inkubation und einem weiteren Zentrifugationsschritt in einer adäquaten Menge (200-500 µl) PBS aufgenommen, in FACS-Röhrchen übertragen und am MACS Quant-Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec) gemessen.

**Tabelle 3.13** Verwendete Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

<b>Name</b>	<b>Agenzien</b>
<b>500x DAB</b>	449 mM CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O 246 mM MgCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O
<b>DFN</b>	10% FBS (in PBS) 0,2 % 500x DAB 0,1 % Natriumazid
<b>Fixierpuffer</b>	2 % PFA (in PBS)
<b>Blockpuffer</b>	10 mM Glycin (in PBS)
<b>Waschpuffer</b>	0,5 % Saponin, 0,5 % BSA (in PBS)

### 3.3.4 Untersuchung des Einflusses von Fc-Rezeptoren

Fc-Rezeptoren (Fc-R) sind Membranrezeptoren auf der Oberfläche einer Vielzahl von Immunzellpopulationen, die verschiedene Immunglobulinisotypen, also Antikörper, binden können. Haben die Immunglobuline ein Pathogen erkannt und gebunden (opsoniert), können diese Komplexe durch phagozytierende Zellen aufgenommen werden, wenn diese den benötigten Fc-R auf der Oberfläche tragen. Um den Einfluss dieser Fc-R bei der Aufnahme von opsonierten Bakterien untersuchen zu können, wurde ein Fc-R-Blockierungsversuch durchgeführt.

Für jeden Ansatz wurden  $1 \times 10^5$  JAWS II-Zellen mit und ohne Fc-R-Blockierungsreagenz (1:3 in PBS verdünnt) für 30 Min. auf dem Überkopfschüttler bei 4°C vor-inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 20 µl Serum *C. burnetii*-infizierter Schafe versetzt und für 20 Min. bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit kaltem PBS, nach jeweiliger Zentrifugation für 5 Min. bei 4°C und 3500 rpm und Verwerfen des ÜS. Anschließend wurden die Zellen für 20 Min. auf dem Überkopfschüttler mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrten, wie bereits beschrieben, konnten die Proben am MACS-Quant Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec) untersucht werden. Analysiert wurde hierbei die Bindung beziehungsweise die Blockierung der Bindung zwischen den Immunglobulinen aus dem Schafsserum und dem spezifischen Sekundärantikörper.

### 3.3.5 Messung der Autophagosomen

Für die Detektion der Autophagosomen wurde Monodansylcadaverin (MDC) verwendet. Es handelt sich dabei um ein autofluoreszierendes Reagenz, das sich spezifisch in Doppelmembranen einlagert und somit nur Kompartimente oder Vakuolen mit entsprechenden Membranen nachweist. Auf Grund der hohen Spezifität der Doppelmembran-Färbung ist MDC ein etablierter Marker für den Nachweis von Autophagosomen/Autophagolysosomen, die diese Membranen vorrangig besitzen<sup>347,348</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde MDC (unter anderem) für die durchflusszytometrische und immunfluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Autophagosomen eingesetzt.

Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden zunächst  $1 \times 10^5$  Zellen präpariert und in Phenolrot-freiem Kulturmedium in 6-*well*-Zellkulturplatten ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 72 h erfolgte die Zugabe von 50 µM MDC unmittelbar in jedes *well*. Darauf folgte eine weitere Inkubation für 1 h bei 37°C im Inkubator. Während dieser Zeit erfolgte die Anfärbung der Autophagosomen über das membranpermeable MDC. Im Anschluss wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (siehe Tabelle 3.2) abgelöst, in einem Zentrifugenröhrchen (15 ml) gesammelt und bei 1300 rpm für 5 Min. bei 4°C zentrifugiert. Der entstandene ÜS wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µl PBS resuspendiert. Die durchflusszytometrische Messung zur Quantifizierung des Anteils MDC-positiver Zellen erfolgte unmittelbar am MACS-Quant Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec). Die Vorbereitung auf die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung entsprach dem Ablauf für

die Durchflusszytometrie, einziger Unterschied war das Aussäen der Zellen auf abgeflamte Deckgläschen (siehe Kapitel 3.3.1). Nach 72 h Inkubation wurde jedes *well* gleichermaßen um 50  $\mu\text{M}$  MDC ergänzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit PBS und die Fixierung der Zellen auf dem Deckgläschen (siehe Kapitel 3.3.1). Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte ein Blockierungsschrift mit Glycinpuffer (siehe Tabelle 3.13) schüttelnd für 10 Minuten bei 4°C. Die Einbettung mit Einbettmedium erfolgte nach einem letzten PBS-Waschschrift. In diesem Fall wurde DAPI-freies Einbettmedium verwendet, um Fluoreszenz-Überlappungen zwischen DAPI und MDC bei der Mikroskopie zu verhindern. Die weitere Bearbeitung der Präparate erfolgte wie bereits unter 3.3.1 beschrieben. Die Analyse der Präparate erfolgte an einem Zeiss Axiovert200/Apotome-Mikroskop in einer 63x Vergrößerung.

### 3.3.6 Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_M$ )

Das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\psi_M$ ) wurde mit Hilfe des *JC-1 Mitochondrial Potential Flow Cytometry Assay Kit* von Cayman Chemical durchflusszytometrisch nachgewiesen. Hierbei fungiert das Membranpotential als Parameter für die Vitalität und Funktionalität der Mitochondrien. Da die Mitochondrien zentraler Bestandteil der Energieproduktion der Zelle sind, spiegelt die Vitalität des Mitochondriums somit auch die Vitalität der Zelle wider. Die durchflusszytometrische Anfärbung beruht auf dem Farbstoff 5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin-Iodid (JC-1), welcher in die Mitochondrien eindringt und dort je nach Zustand der Mitochondrien fluoreszierende Komplexe formt. Intakte Mitochondrien mit einem hohen  $\Delta\psi_M$  sorgen für eine Bildung von Komplexen, welche J-Aggregate genannt und in der durchflusszytometrischen Analyse als rote Fluoreszenz detektiert werden. In geschädigten Mitochondrien, mit einem sehr geringem  $\Delta\psi_M$ , verbleibt der Farbstoff JC-1 hingegen in seiner monomeren Form, welche als grüne Fluoreszenz nachweisbar ist.

Für die Anfärbung in den beschriebenen Zellkultursystemen wurden je Ansatz  $1 \times 10^5$  Zellen in antibiotikafreiem Medium ausgesät, mit *C. burnetii* infiziert und/oder anderweitig behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (siehe Tabelle 3.2) abgelöst und 5 Min. bei 4°C und 1300 rpm zentrifugiert. Der ÜS wurde verworfen oder für weitere Versuche bei -20°C verwahrt. Anschließend wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Für die Analyse am Durchflusszytometer (MACS-Quant, Miltenyi Biotec) wurden die Proben in FACS-Röhrchen überführt und parallel im roten (PE) und grünen (FITC) Kanal gemessen.

### 3.3.7 Bestimmung des Anteils reaktiver Sauerstoffspezies

Für die Analyse des oxidativen Stresses wurde der intrazelluläre ROS-Anteil bestimmt. Zu diesem Zwecke wurde das CellROX® Green Reagent der Firma Life Technologies verwendet und dabei nach den Angaben des Herstellers verfahren. Bei dem CellROX® Green Reagent handelt

es sich um ein membrangängiges Reagenz, welches im Grundzustand nur eine geringe Fluoreszenz aufweist. Kommt es zur Oxidation durch ROS, kann eine grüne Fluoreszenz detektiert werden.

Zur Bestimmung des ROS-Anteils wurden  $1 \times 10^5$  JAWS II-Zellen in antibiotikafreiem Medium ausgesät und mit *C. burnetii* infiziert. Als Positivkontrolle wurde ein ROS-Donor, tert-Butylhydroperoxid (TBHP, 200  $\mu$ M), eingesetzt. Nach 72 h erfolgte die Zugabe von des CellROX® Green Reagent (5  $\mu$ M) und eine weitere Inkubation für 30 Min. bei 37 °C. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit der entsprechenden Trypsin-EDTA-Lösung (siehe Tabelle 3.2) abgelöst. Die Zellsuspension wurde bei 1300 rpm bei RT für 5 Min. zentrifugiert und das entstandene Zellpellet noch einmal mit PBS gewaschen. Nach einer zweiten Zentrifugation (1300 rpm, 5 Min., RT) konnten die Zellen in einer geeigneten Menge PBS aufgenommen und am MACS-Quant-Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec) gemessen werden.

### 3.3.8 Live Cell Imaging

Das Live Cell Imaging (LCI) ermöglicht das Erstellen von Echtzeitaufnahmen verschiedenster Zellkultursysteme im Durchlicht sowie in verschiedenen Emissionsspektren. Unter Einsatz fluoreszierender Pathogene ist es zudem möglich, diese innerhalb und außerhalb der Zielzellen zu lokalisieren.

Einem solchen Analyseansatz folgend, wurden  $1 \times 10^5$  KY-2-Zellen in  $\mu$ -LCI-Schalen (35 mm, ibidi) ausgesät. Diese speziellen Zellkulturschalen werden mit einem Deckel fest verschlossen. Da in diesem Fall kein Gasaustausch mehr möglich ist, wurde das verwendete antibiotikafreie Zellkulturmedium mit 20 mM HEPES gepuffert. Nach dem Adhärenz-Werden wurden die KY-2-Zellen mit *C. burnetii* (MOI 30) infiziert. Hierfür wurde der rot-fluoreszierende tdTomato-Coxiellen-Stamm verwendet, daher wurde das Zellkulturmedium außerdem mit 5,7  $\mu$ g/ml Chloramphenicol versetzt um den Selektionsdruck zu erhalten. Nachdem davon ausgegangen werden konnte, dass der Großteil der Bakterien in die Zellen aufgenommen wurde (2,5 hpi), erfolgte dreimaliges Waschen mit sterilem PBS. Dadurch konnten nicht-internalisierte Bakterien aus dem System entfernt werden. Nachfolgend wurden verschiedene Strategien für das LCI angewandt.

Zum einen wurden die Proben nach diesem Waschschrift mit frischem Zellkulturmedium (antibiotikafrei, 20 mM HEPES, 5,7  $\mu$ g/ml Chloramphenicol) versetzt und bis zum Ablauf der Inkubationszeit inkubiert. Zum anderen wurde ergänzend die Möglichkeit einer Überschichtung mit LMP-Agarose genutzt, um die Mobilität der KY-2-Zellen zu reduzieren und die Qualität der Aufnahmen zu verbessern. Zu diesem Ziel wurde doppelt konzentriertes Zellkulturmedium, inklusive aller benötigten Zusätze, in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt und 1:1 mit ebenfalls vorgewärmter, steriler 1,2% LMP-Agarose versetzt. So entstand ein einfach konzentriertes Zellkulturmedium mit einer finalen Konzentration von 0,6% LMP-Agarose. Diese niedrige Agarosekonzentration garantierte eine stabile Zellvitalität bei verringerter Mobilität. Nach Abnahme des ursprünglichen Zellkulturmediums aus den LCI-Schalen wurden die Zellen zügig mit dem vorgewärmten LMP-

agarosehaltigen Zellkulturmedium überschichtet. Die Aushärtung erfolgte für 2-3 Min. bei RT. Anschließend wurden die Schalen bis zum LCI im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit (24 hpi) wurden die Proben an Herrn Luca Zaack aus dem Labor von Herrn Prof. Dr. Stefan Finke vom FLI für die Aufnahmen übergeben. Die Präparate wurden am Fluoreszenz-Mikroskop (DMI8, Leica; Objektiv: HC PL APO 63x/1.30 GLYC UV; Kamera: DFC7000GT) und mit dem Konfokalen Laserscan-Mikroskop (DMI6000 TCS SP5, Leica; Objektiv: HCX PL APO lambda blue 63x/1.40 OIL UV; Detektion: *hybrid detector* [HyD], *scan speed*: 1400 Hz, *pinhole*: 280 µm, *z-step size*: 2 µm) in einer 63x Vergrößerung untersucht. Für die Langzeitaufnahmen lagerten die Platten in einer Heizkammer (HT200, ibidi) bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Für die Nachbearbeitung, Auswertung und das Bakterientracking wurde die Software Fiji (ImageJ) verwendet. Die Originalfilme sind unter folgenden Adressen abzurufen.

- 1) [https://iai.asm.org/highwire/filestream/173591/field\\_highwire\\_adjunct\\_files/1/IAI.00172-20-sm002.mp4](https://iai.asm.org/highwire/filestream/173591/field_highwire_adjunct_files/1/IAI.00172-20-sm002.mp4)
- 2) [https://iai.asm.org/highwire/filestream/173591/field\\_highwire\\_adjunct\\_files/2/IAI.00172-20-sm003.mp4](https://iai.asm.org/highwire/filestream/173591/field_highwire_adjunct_files/2/IAI.00172-20-sm003.mp4)
- 3) [https://iai.asm.org/highwire/filestream/173591/field\\_highwire\\_adjunct\\_files/3/IAI.00172-20-sm004.mp4](https://iai.asm.org/highwire/filestream/173591/field_highwire_adjunct_files/3/IAI.00172-20-sm004.mp4)

### 3.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Grundlage der proteinbiochemischen Western-Blot-Analyse waren Zelllysate. Für die Herstellung dieser Lysate wurden die Zellen in der benötigten Zelldichte in Zellkulturplatten ausgesät und nach dem Adhärenz-Werden mit *C. burnetii* infiziert und/oder noch mit weiteren Reagenzien behandelt. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen abhängig von der gewünschten Fraktion, die in der Western-Blot-Analyse untersucht wurde, in verschiedener Weise weiterbehandelt.

##### Lysatherstellung aus löslichen Bestandteilen

Für die Herstellung von Lysaten aus löslichen Zellbestandteilen wurden die Zellen, wie unter 3.1.3 beschrieben, mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, in einem Zentrifugenröhrchen (Zellsuspension und ÜS) oder einem Reaktionsgefäß (nur Zellsuspension) gesammelt und bei 1300 rpm für 5 Min. bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der entstandene ÜS verworfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert, um Reste des Zellkulturmediums zu entfernen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 3500 rpm für 5 Min. bei RT. Im Anschluss wurde die Zellzahl mit einer Neubauerzählkammer bestimmt und das Zellpellet in Lysepuffer (100 µl/1x10<sup>6</sup> Zellen, siehe Tabelle 3.14) resuspendiert. Die Zellyse erfolgte für 30 Min. auf Eis. Danach wurden die lysierten Zellen bei 14.000 rpm und 4°C für 30 Min. zentrifugiert. Die unlöslichen Kerne und etwaige Zelltrümmer lagen im Anschluss als Pellet vor, so dass die löslichen Bestandteile als Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Western-Blot-Analyse bei -20°C gelagert werden konnten.

### Lysatherstellung aus Lysepuffer-unlöslichen Bestandteilen/Totallyse

Die Herstellung von Zelllysaten aus Lysepuffer-unlöslichen Bestandteilen erfolgte bis einschließlich zum letzten Zentrifugationsschritt wie bereits im vorherigen Absatz beschrieben. Um die Möglichkeit zu nutzen, auch das ungelöste Kernpellet weiter analysieren zu können, wurde das entstandene Pellet nicht verworfen, sondern in einer geringen Menge (15 µl) PBS oder Ladepuffer aufgenommen und einer Ultraschall-Behandlung (3x 100 Watt, 20-30 s) unterzogen. Zellbestandteile, die unempfindlich gegenüber den verwendeten Lysepuffern waren, konnten so ebenfalls für die Untersuchungen zugänglich gemacht werden. Die entstandene Suspension wurde im Anschluss in der gewünschten Menge Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS)-Probenpuffer (siehe Tabelle 3.16) aufgenommen und die Ultraschall-Behandlung noch einmal wiederholt. Es folgte die Lagerung bei -20°C bis zum Einsatz in der Analyse. Für den Nachweis der Hypoxie mittels HIF-1α erfolgte ergänzend ein Aufkochen der Proben bei 95°C für 5 Min. sowie eine Lagerung bei -80°C.

### Lysatherstellung aus Zellkulturüberständen

Für die Detektion von Bestandteilen aus Zellkulturüberständen wurden die Zellen zunächst, wie zu Beginn des Kapitels beschrieben, ausgesät, infiziert und/oder anderweitig behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden nun allerdings ausschließlich die Zellkulturüberstände abgenommen und in Reaktionsgefäßen (ultrazentrifugationsfähig, 2 ml) gesammelt. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 100.000 rpm und 4°C für 1 h. Die im ÜS enthaltenen Bestandteile lagen nun als Pellet vor, so dass der neu entstandene ÜS verworfen werden konnte. Ohne das Pellet zu lösen, wurde es zweimal mit kaltem PBS gewaschen und erneut bei 100.000 rpm und 4°C für 15 Min. ultrazentrifugiert. Nachdem der ÜS verworfen wurde, wurde das Pellet in der gewünschten Menge SDS-Probenpuffer (siehe Tabelle 3.16) aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### Plasmamembran-Isolation

Für die Untersuchung explizit plasmamembranständiger Proteine und ihrer Expression war es notwendig, dass die Membran nicht gemeinsam mit der Zielzelle lysiert, sondern intakt isoliert wurde. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte zwischen der Proteinexpression auf der Zelloberfläche und der Gesamtzellexpression differenziert werden. In diesem Fall wurden die Zellen zunächst regulär ausgesät, infiziert und/oder mit Reagenzien versetzt. Die Zellen wurden mit der jeweiligen Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst (siehe Kapitel 3.1.3), in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei 450 xg für 10 Min. bei 4°C zentrifugiert. Der entstandene ÜS wurde verworfen und das Pellet in einer geringen Menge (15 µl) kaltem PBS/Complete (siehe Tabelle 3.14) aufgenommen. Es folgte eine Ultraschall-Behandlung (3x 100 Watt, 30 s) und eine weitere Zentrifugation bei 12.000 xg für 20 Min. bei 4°C. Anschließend wurde der ÜS gesammelt, in ultrazentrifugationsfähige Reaktionsgefäße überführt und bei 50.000 xg bei 4°C für 1 h ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde, ohne es zu lösen, einmal mit kaltem PBS gewaschen und in der gewünschten Menge SDS-Probenpuffer (siehe Tabelle 3.16) aufgenommen. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.



Tabelle 3.14 Verwendete Puffer für die Herstellung von Zelllysaten

Name	Agenzien
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
	150 mM NaCl
	1% NP-40
	0,25% DOC
	1x Complete/50ml
Triton X-100	5 mM Na-Fluorid
	1% Triton X-100 (in PBS)
PBS/Complete	1x Complete/50ml
	1x Complete/50ml (in PBS)
HIF-1 $\alpha$ -Lyse-/Ladepuffer	10 mM Tris-HCl (pH 6,8)
	6,65 M Harnstoff
	1 % SDS
	10% Glycerin
	1x Complete/50ml
	Bromphenolblau (wenige Kristalle)
	7% $\beta$ -Mercaptoethanol (stets frisch zuzugeben)
50 $\mu$ M CoCl <sub>2</sub> (stets frisch zuzugeben)	

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

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht das elektrophoretische Auftrennen der in einem Zelllysate vorliegenden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes<sup>349</sup>. Basis dieser Auftrennung ist das SDS. SDS bindet die Proteine gleichermaßen, denaturiert sie und verleiht ihnen dadurch die notwendige negative Ladung. Das für die Elektrophorese verwendete Polyacrylamid-Gel (siehe Tabelle 3.15) enthält ebenfalls SDS, so dass die negativ-geladenen Proteine durch diese netzartige Struktur wandern und aufgetrennt werden. Die Analyse erfolgt über das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

Tabelle 3.15 Zusammensetzung der verwendeten Acrylamid-Gele

Agenzien	Sammelgel	Trenngel (10%)	Trenngel (15%)
Acrylamid	1,3 ml	10 ml	15 ml
Sammelgelpuffer <sup>[1]</sup>	2,5 ml	-	-
Trenngelpuffer <sup>[2]</sup>	-	7,5 ml	7,5 ml
ddH <sub>2</sub> O	6,1 ml	12 ml	7 ml
SDS-Lösung (10%)	100 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l
APS	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l

<sup>[1]</sup> 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8    <sup>[2]</sup> 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Für die Denaturierung und Polarisierung der Proteine in den Zelllysaten wurden diese 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer (siehe Tabelle 3.16) versetzt und für 10 Min. bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Polyacrylamid-Gel mit den jeweiligen Proben sowie dem Molekulargewichtsmarker (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, Fermentas) beladen.

Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA in 1x Elektrophorese-Puffer (E-Puffer, siehe Tabelle 3.16).

**Tabelle 3.16 Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die SDS-PAGE**

Name	Agenzien	Menge
<b>2x SDS Probenpuffer (mit Harnstoff)</b>	SDS-Lösung (10%)	20 ml
	Glycerin	10 ml
	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	12,5 ml
	ddH <sub>2</sub> O	7,5 ml
	Harnstoff (2,4 M)	7,2 g
	Bromphenolblau	wenige Kristalle
	β-Mercaptoethanol	7% (stets frisch zuzugeben)
<b>10x E-Puffer (in dH<sub>2</sub>O)</b>	Tris	250 mM
	Glycin	1,9 M
<b>1x E-Puffer</b>	10x E-Puffer	100 ml
	SDS-Lösung (10%)	10 ml
	ddH <sub>2</sub> O	890 ml

### 3.4.3 Western-Blot-Analyse

Nach der Auftrennung der im Zelllysate enthaltenen Proteine mittels SDS-Page wurden diese vom Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (0,45 µm) transferiert. Der Transfer erfolgte für 45 Min. in Blotpuffer (siehe Tabelle 3.17) bei einer konstanten Stromstärke von 500 mA. Um die Effizienz des Transfers zu überprüfen, wurde im Anschluss eine Ponceau S-Färbung (siehe Tabelle 3.17) durchgeführt. Durch die reversible Bindung an die Aminogruppen der Proteine können diese auf der Nitrozellulose sichtbar gemacht werden. Anschließend wurde die Färbung mit ddH<sub>2</sub>O und Waschpuffer (siehe Tabelle 3.17) wieder entfernt. Der nächste Schritt, das Blocken von unspezifischen Bindungsstellen, erfolgte für 2 h bei RT auf dem Schüttler. Auf dreimaliges Waschen mit Waschpuffer für je 5 Min. folgte die Inkubation mit den spezifischen Primärantikörpern. Die notwendigen Verdünnungen wurden in Waschpuffer (II, siehe Tabelle 3.17), unter Zusatz von 10% FBS angesetzt, um etwaige unspezifische Bindungen zu unterbinden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Am darauffolgenden Tag wurde die Nitrozellulosemembran zunächst erneut dreimal für 5 Min. mit Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss konnte die Membran für 30 Min. bei RT mit einem Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper (verdünnt in Waschpuffer) auf dem Schüttler inkubiert werden. Nach drei erneuten Waschschrritten konnte die spezifische Bindung der Antikörper über die *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Reaktion detektiert werden. Bei dieser Reaktion wird Luminol unter dem Einfluss von Wasserstoffperoxid katalysiert und durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP oxidativ umgesetzt. Infolgedessen kommt es zu einer Emission von Licht, die durch Auflegen eines Röntgenfilms auf die Nitrozellulosemembran detektiert werden kann. Als ECL-Lösung wurde das *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (ThermoFisher Scientific) verwendet. Die beiden Substratlösungen wurden in einem 1:1 Verhältnis gemischt und die Membran in dieser

Lösung für 1 Min. schüttelnd inkubiert. Dann erfolgte die Detektion der ECL-Reaktion mit der automatischen Entwicklermaschine Compact 2 der Firma Protec.

Je nach Versuchsaufbau war es im Anschluss möglich, noch weitere Anfärbungen vorzunehmen. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran ausgiebig mit Waschpuffer gewaschen, um alle ECL-Reste zu entfernen. Anschließend konnte eine weitere Anfärbung mit ergänzenden Primär- und Sekundärantikörpern erfolgen.

Tabelle 3.17 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen für die Western-Blot-Analyse

Name	Agenzien	Menge
Blotpuffer	10x E-Puffer	100 ml
	ddH <sub>2</sub> O	890 ml
Ponceau S	Ponceau (in PBS)	0,1%
	Essigsäure	5%
Waschpuffer	Tween-20 (in PBS)	0,1%
Waschpuffer (II)	FBS (in Tween-20 in PBS)	10 %
Blockpuffer	Milchpulver (in PBS/Tween-20)	5%

#### 3.4.4 Zytokinarray

Der Zytokinarray *Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit, Panel A* der Firma R&D Systems basiert wie auch der Western-Blot auf der Detektion der spezifischen Antikörperbindung auf einer Nitrozellulosemembran. In diesem Fall sind auf einer einzigen Membran Antikörper gegen 40 verschiedene Zytokine und Chemokine, jeweils als einzelne *Spots*, aufgebracht. Auf diese Weise können die Botenstoffe in den Zellkulturüberständen über die spezifische Bindung an den Antikörpern auf dieser Nitrozellulosemembran nachgewiesen werden.

Zur Herstellung der Zellkulturüberstände wurden  $1 \times 10^5$  JAWS II in einer 6-well-Zellkulturplatte ausgesät, mit *C. burnetii* infiziert und/oder mit weiteren Reagenzien behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden die ÜS in Reaktionsgefäßen (2 ml) gesammelt und für 30 Min. bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt diente zum Ausschluss von etwaigen Zellen, Zelltrümmern oder Bakterien. Anschließend konnte der ÜS abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Die Überstände wurden unmittelbar untersucht oder bis zu der Verwendung bei -80°C gelagert. Bei der Durchführung des Zytokinarrays wurde nach den Herstellerangaben verfahren. Bei der Auswertung wurden nur die mittleren Pixelintensitäten größer als ein Wert von 2000 einbezogen. Signale mit niedrigeren Pixelintensitäten wurden auf Grund der Schwäche des Signals ausgeschlossen.

#### 3.4.5 Identifizierung von MHC-gebundenen Peptiden mittels nLC-MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie

Um MHC-gebundene Peptide zu identifizieren, wurde die *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight* (MALDI-TOF/TOF)-Massenspektrometrie angewendet.

Bei diesem Verfahren kann die Masse von Molekülen in einer Größenordnung von 5 bis 500 kDa bestimmt werden. Die Probe wird dabei zunächst in ein Matrix-Material eingebettet und in Folge durch Laserpulse ionisiert. Die entstandenen Ionen können nun in einem elektrischen Feld beschleunigt und die Flugzeit mittels eines TOF-Analysators analysiert werden. Probenaufbereitung und -messung wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Bahne Christiansen und Herrn Dr. Axel Karger vom FLI Riems durchgeführt.

Für die Isolation der zu analysierenden Peptide wurden zunächst  $1 \times 10^7$  JAWS II-Zellen in T175-Zellkulturflaschen ausgesät, mit *C. burnetii* infiziert und/oder mit weiteren Reagenzien behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden die JAWS II-Zellen, wie unter Kapitel 3.1.3 beschrieben, geerntet und in Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt. Es wurden 50  $\mu$ l Aliquots für die Kontrolle der Zellzahl abgenommen und die Zellen anschließend bei 90 xg und 4°C für 5 Min. zentrifugiert. Es folgten drei Waschschrte (90 xg, 4°C, 5 Min.) mit 5 bis 7 ml PBS, um Kulturmediumrückstände zu entfernen. Der letzte Waschschrte erfolgte hierbei mit 500 bis 1000  $\mu$ l PBS, so dass ein Wechsel auf die kleineren Reaktionsgefäße (1,5 ml) möglich war. Nach der letzten Abnahme des ÜS wurde das Zellpellet durch leichtes Schnipsen resuspendiert und es wurde mit der Elution fortgefahren. Für die Elution wurden die Proben mit 0,5 ml Citratpuffer (siehe Tabelle 3.18) für eine milde, saure Peptidisolation versetzt<sup>350</sup>. Die Peptidisolation wurde für 3 Min. unter regelmäßigem Schnipsen durchgeführt. Inklusve der anschließenden Zentrifugation bei 90 xg, 4°C für 5 Min. ergab sich eine Gesamt-Elutionszeit von 8 Min. Das entstandene Pellet enthielt die Zelltrümmer, der ÜS hingegen beinhaltete die gelösten Oberflächenmoleküle (Proteine, Peptide), daher wurde dieser in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgten (mindestens) zwei weitere Zentrifugationsschritte bei 10.000 xg bei 4°C für 10 Min., um weitere zelluläre Rückstände zu entfernen. Dabei wurde der ÜS stets vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Sobald nach der Zentrifugation kein Pellet mehr sichtbar war, wurde der ÜS abermals in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wobei ein minimales Flüssigkeitsvolumen zurückgelassen wurde, um Kontaminationen mit zellulären Restbestandteilen vollständig auszuschließen. Die Proben wurden auf Eis gestellt und für die weitere Bearbeitung an das Labor Karger übergeben. Dort folgte das Filtrieren der Proben mit einer 3 kDa *cut-off* Zentrifugen-Filtereinheit (Amicon®) für 25 Min. bei 14.000 xg. Dies diente der Abtrennung von Verunreinigungen wie Proteinen, vorwiegend des  $\beta$ 2 Mikroglobulins und sicherte eine ungestörte Identifizierung der gebundenen Peptide. Die gefilterten Proben wurde in 200  $\mu$ l PBS aufgenommen und für 10 Min. bei RT und 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Daraufhin folgte die Entsalzung über eine Empore HP Extraction Disk Cartridge (C18-SD, 3 M) und die Einengung der Proben mittels einer Vakuumzentrifuge. Im Anschluss wurden die Proben in 50  $\mu$ l 0,1% Trifluoressigsäure (*trifluoroacetic acid*, TFA)-Lösung (siehe Tabelle 3.18) aufgenommen, direkt massenspektrometrisch analysiert oder bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert.

Basis der Analyse war eine *nano liquid-chromatography* (nLC)-MALDI-TOF-MS/MS-Plattform, welche sich aus einem nLC-System (UltiMate 3000, ThermoFisher Scientific), einem Spotrobooter (ProteinSpotter Sample Spotting Roboter, Bruker) und dem MALDI-TOF/TOF-System (UltrafleXtreme, Bruker) zusammensetzte. Für die Analyse wurden je 2  $\mu$ g der Proben, gelöst in

TFA, zunächst auf eine Vorsäule (Acclaim PepMap100 C18, ThermoFisher Scientific) gegeben. Die Elution auf einer analytischen Säule (Acclaim PepMap RSLC C18, ThermoFisher Scientific) erfolgte bei einer konstanten Flussrate von 300 nL/Min., nach einer vorherigen Waschung mit 0,05% TFA (siehe Tabelle 3.18). Für die chromatographische Trennung wurden lineare Gradientenprofile verwendet, die sich aus der Mischung der Gradienten-Lösung A und B ergaben (siehe Tabelle 3.18). Der Anteil der Gradienten-Lösung B variierte während des 55-minütigen Laufes zwischen 4% und 90%. Das aufgetrennte und eluierte Probenmaterial wurde mittels Spotroboter mit der Trägermatrix gemischt und auf einer 192-Spot Anchor Chip Target-Platte (Bruker) gesammelt. Die anschließende Messung erfolgte dann am UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF. Die Ergebnisse wurden mit der unter Kapitel 2.12 beschriebenen Software/Datenbank ausgewertet und mit dem Proteom der Maus (*Mus musculus*) und dem von *C. burnetii* (NMII RSA 439) abgeglichen.

**Tabelle 3.18 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen für die Massenspektrometrie**

Name	Agenzien	Menge
Citratpuffer (pH 3,0)	NaCl	150 mM (80%)
	Citronensäure	5,3%
	ddH <sub>2</sub> O	ad. 100 % ddH <sub>2</sub> O
<b>Trifluoressigsäure-Lösung</b>	Trifluoressigsäure (TFA, in ddH <sub>2</sub> O)	0,1%/0,05%
<b>Gradienten-Lösung A</b>	TFA	0,05%
<b>Gradienten-Lösung B</b>	TFA	0,05%
	Acetonitril	90%

### 3.4.6 Griess-Assay

Um die Anwesenheit von Stickstoffmonoxid (NO) im Zellkultursystem nachzuweisen, wurde der Griess-Assay verwendet. Das Testprinzip beruht dabei auf der Detektion von Nitrit, welches durch die Autooxidation von NO entstanden ist. Das tatsächliche NO kann also nur indirekt und im Gegensatz zum Nitrit nicht quantitativ nachgewiesen werden. Grundlage dieses Assays ist das sogenannte Griess-Reagenz, welches ein Gemisch aus Sulfanilamid (SA) und Naphthylethylendiamin (NED) enthält und eine zwei-Schritte-Reaktion ermöglicht. Im ersten Schritt reagiert das Nitrit in Anwesenheit von Sauerstoff mit dem SA und ein transientes Diazoniumsalz entsteht. Dieses Intermediat reagiert folglich mit dem NED zu einem stabilen, sichtbaren *azo compound*. Die kolorimetrische Reaktion entsteht daher proportional der enthaltenden NO-Metabolite<sup>351</sup>.

Für den Griess-Assay wurden JAWS II-Zellen in einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  in 6-well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach der Setzzeit wurden die Zellen mit *C. burnetii* infiziert und/oder mit anderen Reagenzien behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit (24 bis 72 hpi) wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und bei 1300 rpm bei 4°C für 5 Min. zentrifugiert, um etwaige Zellen aus den ÜS zu entfernen. Nun konnten 100 µl der ÜS abgenommen und im Griess-Assay eingesetzt werden. Die verbliebenen Zellen konnten im Rahmen anderer Methoden weiterverwendet werden.

Die Zellkulturüberstände wurden in Duplikaten (je 100 µl) in eine 96-well-Zellkulturplatte überführt. Als Standard wurde eine Natriumnitrit (NaNO<sub>2</sub>)-Lösung in verschiedenen Konzentrationen (je 100 µl 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 µM NaNO<sub>2</sub>, verdünnt in Zellkulturmedium) und als Negativkontrolle ein NTC (100 µl Zellkulturmedium) mitgeführt. Anschließend wurden 100 µl des hergestellten Griess-Reagenzes (siehe Tabelle 3.19) mit einer Mehrkanalpipette gleichmäßig in die 96-well-Zellkulturplatte mit den Proben und dem Standard pipettiert. Die kolorimetrische Reaktion konnte nach einer Inkubation von 30 Min. im Dunkeln am Sunrise Remote ELISA Readers (Tecan) bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden.

**Tabelle 3.19 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen für den Griess-Assay**

Name	Agenzien	Menge
<b>NaNO<sub>2</sub>-Lösung (800 µM)</b>	Natriumnitrit (NaNO <sub>2</sub> ) ddH <sub>2</sub> O	5,5192 g ad. 100 ml
<b>Griess-Reagenz</b>	Griess-Reagenz (modified) ddH <sub>2</sub> O	0,4 g ad. 10 ml

### 3.4.7 L-Laktat-Assay

Unter Verwendung von *L-Laktat Assay Kits* von abcam und Sigma-Aldrich konnte die L-Laktat-Konzentration quantifiziert und so der metabolische Status der untersuchten Zellen bestimmt werden. Zugrundeliegend ist die Tatsache, dass es unter Infektion oder anderweitiger Behandlung zu einem Warburg Switch kommen kann. Hierbei handelt es sich um einen Wechsel des Stoffwechsels von oxidativer Phosphorylierung hin zur (aeroben) Glykolyse. Diese Umprogrammierung kann anhand der Menge von bestimmten Stoffwechselprodukten, in diesem Fall Laktat, bestimmt werden<sup>235</sup>.

Für die Quantifizierung wurden je nach Vorgaben des Kits zwischen  $0,5 \times 10^5$  und  $1,5 \times 10^6$  Zellen in Phenolrot-freiem Kulturmedium in T75-Zellkulturflaschen kultiviert und entsprechend dem Versuchsaufbau nach der Setzzeit mit *C. burnetii* infiziert und/oder mit anderen Reagenzien behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit (48-72 h) wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (siehe Tabelle 3.2) abgelöst. Um die L-Laktat-Werte auf die Zellzahl der einzelnen Proben normieren zu können, wurden die Zellen nach dem Ablösen zunächst mit Hilfe einer Neubauerzählkammer gezählt. Die weitere Durchführung richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers. Bei der Analyse wurden 50 µl unverdünnter Zellkulturüberstand eingesetzt. Mittels des Sunrise Remote ELISA Readers (Tecan) wurde die kolorimetrische Reaktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

### 3.4.8 IFN-γ und TGF-β-Zytokin-ELISA

Die Quantifizierung der Zytokine IFN-γ und TGF-β in Zellkulturüberständen wurden mit dem *Mouse IFN-γ Platinum ELISA* der Firma eBioscience und dem *human/mouse TGF-β1 uncoated ELISA* der Firma ThermoFisherScientific durchgeführt.

Für die Analyse wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in 6-well-Zellkulturplatten ausgesät und nach dem Adhärenz-Werden mit *C. burnetii* infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24-72 h wurden die Zellkulturüberstände in ein Reaktionsgefäß (2 ml) überführt und für 30 Min. bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert, um zu verhindern, dass etwaige semi-adhärenente Zellen in den ÜS verbleiben. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände direkt für den Zytokin-ELISA verwendet oder bei -80°C bis zur weiteren Untersuchung gelagert. Im ELISA-Test wurden jeweils 50-100 µl der unverdünnten Zellkulturüberstände sowie verschiedene Verdünnungen (1:50, 1:100 in *Sample Diluent*) analysiert. Dabei wurde nach den jeweiligen Herstellerangaben verfahren. Die Messung der kolorimetrischen Reaktion fand bei einer Wellenlänge von 450 nm am des Sunrise Remote ELISA Readers (Tecan) statt.

### 3.4.9 Nachweis von Granzym-B

Für die Quantifizierung der Protease Granzym-B in Zellkulturüberständen aus NK-Zell-Kulturen wurde der *Mouse Granzym-B Platinum ELISA* der Firma eBioscience verwendet.

Vergleichend zum Zytokin-ELISA (siehe Kapitel 3.4.8) wurden für die Analyse  $1 \times 10^5$  Zellen in 6-well-Zellkulturplatten kultiviert und mit *C. burnetii* infiziert. 72 hpi wurden die Zellkulturüberstände in einem Reaktionsgefäß (2 ml) gesammelt und für 30 Min. bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Zellkulturüberstände direkt für den Granzym-B-ELISA verwendet oder bei -80°C gelagert. Eingesetzt wurden erneut jeweils 50 µl der unverdünnten Zellkulturüberstände sowie verschiedene Verdünnungen (1:50, 1:100 in *Sample Diluent*), verfahren wurde nach Angaben des Herstellers. Die Messung der kolorimetrischen Reaktion wurde mit dem Sunrise Remote ELISA Readers (Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt.

## 3.5 Molekularbiologische Methoden

### 3.5.1 RNA-Isolation

Grundlage vieler molekularbiologischer Analysen war die Isolation der genetischen Informationen in Form von Ribonukleinsäuren (*ribonucleic acids*, RNA). Dafür wurden  $5 \times 10^5$ - $1,5 \times 10^6$  Zellen in T75-Zellkulturflaschen ausgesät, mit *C. burnetii* infiziert und/oder mit weiteren Reagenzien behandelt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1 ml TriFast Trizol abgelöst. Im Falle der semi-adhärenenten Zellen wurden die Suspensionszellen zunächst in Zentrifugenröhrchen gesammelt, bei 1300 rpm und 4°C für 5 Min. zentrifugiert und dann mit den adhärenenten TriFast Trizol-behandelten Zellen vereinigt. Die abgelösten Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß (2 ml) überführt, bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C (für maximal eine Woche) gelagert oder unmittelbar für 5 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt und die Proben für 20 Sekunden (s) mittels Vortexten gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation für 5 Min. bei RT und eine Zentrifugation bei 12.000 xg für 5 Min. bei RT. Die entstandene RNA-haltige wässrige Phase wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß (2 ml) überführt, so dass mit der

Präzipitation fortgeföhren werden konnte. Nachdem 500 µl Isopropanol für die Präzipitation der RNA hinzugefügt und die Proben sorgfältig homogenisiert wurden, folgte eine 10 Min. Inkubation auf Eis. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle weiteren Zentrifugations- und Inkubationsschritte bei 4°C beziehungsweise auf Eis. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben für 10 Min. bei 12.000 xg zentrifugiert. Folgend lag die RNA als Pellet vor, so dass der ÜS dekantiert werden konnte. Es schlossen sich zwei Waschschriffe mit je 1 ml Ethanol (75%, unvergällt) an, bei denen das Pellet allerdings nicht gelöst wurde. Das gereinigte RNA-Pellet wurde im Anschluss an der Luft oder bei Bedarf in kurzen Intervallen in einem vorgeheizten Heizblock (maximal 55°C) getrocknet, um restliches Ethanol zu entfernen. Nun konnte die RNA in einem angemessenen Volumen (30-50µl) RNase-freien Wassers aufgenommen und das Verhältnis von Konzentration/Reinheit aus 1 µl Probe am Nanodrop-Spektrophotometer (NanoDrop 2000, ThermoFisher Scientific) bestimmt werden. Es wurde unmittelbar mit der Reversen Transkription fortgeföhren oder die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.5.2 Reverse Transkription

Mit Hilfe des *Reverse Transkriptase*-Systems der Firma Promega war es möglich, die isolierte Gesamt-RNA in einzelsträngige komplementäre Desoxyribonukleinsäuren (*desoxyribonucleic acids*, DNA; *complementary DNA*, cDNA) umzuschreiben. Ausschlaggebend für diesen Arbeitsschritt waren die deutlich höhere Stabilität der komplementären DNA sowie die einfachere Handhabung und Lagerung. Bei der Reversen Transkription wurde nach den Herstellerangaben verfahren. Der Reaktionsansatz ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 3.20 Ansatz für die Reverse Transkription-Reaktion

Agenzien	Menge
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
Reverse Transkription 10x Puffer	2 µl
10 mM dNTP Mischung	2 µl
RNasin	0,5 µl
AMV Reverse Transkriptase	15 U
Random Primer (0,5 µg)	1 µl
Template (RNA)	1 µg
Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	ad. 20 µl
	20 µl Gesamtvolumen/Ansatz

Tabelle 3.21 Temperaturprofil für die Reverse Transkription-Reaktion

Schritt	Aktivierung	Transkription	Denaturierung	Pause
Temperatur	42°C	42 °C	95°C	4°C
Zeit	10 Min.	30 Min.	5 Min.	∞

Die hergestellte cDNA wurde im Anschluss bis zum Einsatz bei -20°C gelagert.



### 3.5.3 Semiquantitative PCR

Die semiquantitative PCR ermöglicht die Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe eines Thermocyclers. Hierbei lagern sich die zielspezifischen Primer (Design: PrimerBlast, NCBI Datenbank; Herstellung: Metabion) an die komplementären Sequenzen der einzelsträngigen DNA an. Durch das Enzym DNA-Polymerase erfolgt dann schließlich die Amplifizierung. Im Anschluss können die PCR-Produkte in einem Agarose-Gel visualisiert und analysiert werden. Der Reaktionsansatz (siehe Tabelle 3.22) entsprach den Herstellerangaben des *5x PCR Mastermix Ready to Load* der Firma Bio&Sell. Die Reaktion wurde in einem T3 Thermocycler (Biometra) durchgeführt.

Tabelle 3.22 Ansatz für die semiquantitative PCR

Agenzien	Menge
Forward Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol)	1 µl
PCR Mix (5x)	4 µl
Template (cDNA, 100 ng)	2 µl
Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	12 µl
20 µl Gesamtvolumen/Ansatz	

Tabelle 3.23 Temperaturprofil für die semiquantitative PCR

Schritt	Denat.	Denat.	Annealing	Elongat.	finale Elongat.	Pause
Temperatur	94°C	94 °C	[x <sub>1</sub> ]°C	72°C	72°C	4°C
Zeit	5 Min.	30 s	30 s	1 Min.	10 Min.	∞
[x <sub>2</sub> ] Zyklen						

Das oben aufgeführte Temperaturprofil wurde stets den primerspezifischen Temperaturen [x<sub>1</sub>] und Zyklen angepasst [x<sub>2</sub>]. Für das Standard-PCR-Protokoll wurden 35 Zyklen verwendet und diese je nach Versuchsaufbau durch Kontroll-PCRs mit einer verringerten Zyklenanzahl (25) ergänzt. Nach Abschluss der PCR wurden 5 µl der PCR-Amplifikate und sowie ein Marker (*MassRuler DNA Ladder Mix*, ThermoFisher Scientific) auf ein 1% Agarose-Gel (siehe Tabelle 3.6) geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 V für 1 h.

### 3.5.4 Real Time-PCR

Im Vergleich zu der semiquantitativen PCR kann bei der RT-PCR die Amplifikation der synthetisierten PCR-Produkte in Echtzeit gemessen werden. Die Basis dafür sind interkalierende Farbstoffe, die sich bei erfolgreicher Amplifikation an die doppelsträngige DNA anlagern und eine messbare Fluoreszenz abgeben. Die Menge an Amplifikaten und somit auch an Fluoreszenz nimmt mit steigender Zyklenanzahl zu und kann über die Ct-Werte quantifiziert werden. Der Ct-Wert definiert hierbei die Anzahl der Zyklen, bei denen ein für alle Proben konstantes Fluoreszenzsignal

erreicht wird. Enthält eine Probe nun mehr Amplifikate und somit Fluoreszenz, wird das Niveau schneller erreicht und der daraus resultierende Ct-Wert ist geringer.

Für eine relative Quantifizierung wurde in der vorliegenden Arbeit die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode genutzt. Dabei wird in einem ersten Schritt der Ct-Wert eines nicht regulierten Referenz-Gens von dem des Ziel-Gens abgezogen ( $\triangleq \Delta\text{Ct}$ -Wert). In einem zweiten Schritt wird dann der Effekt einer Infektion und/oder Behandlung herausgearbeitet, indem der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert einer nicht-infizierten/unbehandelten Probe von dem einer infizierten/behandelten Probe subtrahiert wird ( $\triangleq \Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert). Zuletzt werden diese Effekte dann in ein Verhältnis gesetzt, um die relative Änderung der *messenger* RNA (mRNA)-Expression zu quantifizieren ( $\triangleq 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ). Die Berechnungen lassen sich zusammenfassend mit den folgenden Formeln beschreiben.

1.  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Referenz-Gen}}$
2.  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Infektion/Behandlung}} - \text{Ct}_{\text{Kontrolle}}$
3.  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

Die Reaktionsansätze für die RT-PCR wurden nach den Herstellerangaben des *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad) in einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  (siehe Tabelle 3.24) vorbereitet. Die Durchführung der Reaktion erfolgte unter Verwendung eines geeigneten Temperaturprofils (siehe Tabelle 3.25) und eines PCR-Cycler (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad).

Tabelle 3.24 Ansatz für die RT-PCR

Agenzien	Menge
Forward Primer (10 pmol)	0,35 $\mu\text{l}$
Reverse Primer (10 pmol)	0,35 $\mu\text{l}$
DNA-free H <sub>2</sub> O	3,3 $\mu\text{l}$
iTaq Universal SYBR Green Supermix	5 $\mu\text{l}$
Template (cDNA, 100 ng)	1 $\mu\text{l}$
10 $\mu\text{l}$ Gesamtvolumen/Ansatz	

Tabelle 3.25 Temperaturprofil der RT-PCR

Schritt	Aktiv.	Denat.	Annealing/Elongat.	Finale Elongat.	
Temperatur	95°C	95 °C	[x]°C	95°C	52°C
Zeit	5 Min.	10 s	30 s	1 Min.	1 Min.
<b>44 Zyklen</b>					

### 3.5.5 siRNA-vermittelter *knock down*

Durch das Einbringen von artifizieller sogenannter *short interfering* RNA (siRNA) ist ein zielgerichtetes Ausschalten spezifischer Gene auf Basis der RNA-Interferenz möglich. In diesem Zusammenhang werden zelluläre mRNA-Moleküle durch die Bindung ihrer komplementären siRNA dem enzymatischen Abbau zugeführt. Mit Hilfe dieser Methode können Ziel-Gene auf posttranskriptionaler Ebene herunterreguliert und die folgenden Auswirkungen auf zellulärer Ebene analysiert werden. Zur Maximierung des *knock downs* wurden im Rahmen dieser Arbeit je vier

verschiedene spezifische siRNAs verwendet, die jeweils eine Komplementarität zu verschiedenen Bereichen der Ziel-mRNA auswiesen. Als Negativkontrolle wurde eine *AllStar*-siRNA eingesetzt, welche keine komplementäre mRNA besitzt, so dass *off-target*-Effekte ausgeschlossen werden konnten. Alle siRNAs wurden von der Firma Qiagen bezogen. Die Transfektion in die Zielzellen erfolgte mit dem *Mouse Dendritic Cell Nucleofactor* Kit (Lonza) in Kombination mit einer Elektroporation durch den Nucleofactor II (Lonza).

Zunächst wurden je  $5 \times 10^5$  JAWS II-Zellen/Transfektionsansatz in Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt und für 5 Min. und  $300 \times g$  bei RT zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets konnten nun in 150  $\mu$ l Transfektionslösung (siehe Tabelle 3.26), zuzüglich der gewünschten siRNA (Endkonzentration 300 nM), resuspendiert und für 5 bis 10 Min. inkubiert werden. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in Nucleofactor-Küvetten überführt und mit dem Programm Y-001 des Nucleofactor II durch Elektroporation transfiziert. Anschließend wurde die Zellsuspensionen aus den Transfektionsansätzen auf 6-well-Zellkulturplatten gegeben und mit antibiotikafreiem Medium versetzt. Nach der jeweiligen Setzzeit folgte die Infektion mit *C. burnetii* und/oder die Zugabe weiterer Reagenzien. Sowohl die Effizienz des *knock downs* als auch die tatsächlichen Untersuchungen der siRNA-vermittelten Effekte wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels Western-Blot-Analysen überprüft.

Tabelle 3.26 Verwendete Lösungen für die siRNA-Transfektion

Agenzien	Menge
Nucleofactor Solution	2,25 ml
Supplement 1	0,5 ml

### 3.5.6 CRISPR/Cas9-vermittelter *knock out*

Mittels der CRISPR/Cas9-Methode können gezielte DNA-Deletionen oder auch DNA-Insertionen erreicht werden. Die essenziellen Bestandteile des Systems sind dabei *clustered regularly interspaced palindromic repeats* (CRISPR), *CRISPR-associated protein 9* (Cas9) und kurze, nicht-kodierende gRNA. Die gRNA wiederum ist ein Kombinationsprodukt aus CRISPR RNA (crRNA) und *transactivating crRNA* (tracrRNA). Die crRNA besteht hierbei zum einem aus einer Sequenz, die komplementär zur Ziel-Sequenz in der DNA ist, und zum anderen aus einem Abschnitt, der mit einem Teil der tracrRNA hybridisieren kann. Die tracrRNA besteht aus der immer gleichen Sequenz. crRNA und tracrRNA bilden gemeinsam eine Sekundärstruktur aus, die für die Interaktion mit der Cas9 Nuklease entscheidend ist. Die Cas9 wird durch die gRNA-Einheit zu dem spezifischen Gen-Abschnitt geführt, an dem die Nuklease dann einen gezielten Doppelstrangbruch entsprechend der crRNA initiiert. Allerdings muss beachtet werden, dass die Cas9 die DNA nur dann schneiden kann, wenn sie in direkter Nähe zu einem sogenannten *protospacer adjacent motif* (PAM, -NGG) liegt. Die zelluläre Maschinerie leitet daraufhin entweder die nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ, Verknüpfung der getrennten Stränge

unabhängig von der Sequenz) oder eine Homologie-gerichtete Reparatur (*homology-directed repair*, HDR, sequenzabhängige Reparatur der Doppelstrangbrüche) ein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein CRISPR/Cas9-vermittelter *knock out* des iNOS-Gens (Stickstoffmonoxid-Synthase 2, *nitric oxide synthase 2*, NOS2) in JAWS II-DCs (hergestellt mit technischer Unterstützung von Herrn Rico Jahnke, Institut für Immunologie, FLI Riems) und RAW 264.7-Makrophagen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Björn Corleis, Institut für Immunologie, FLI Riems) analysiert. Dafür wurde eine modifizierte Version des Plasmids pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 (Addgen #42230, ein Geschenk von Feng Zhang<sup>352</sup>) verwendet. Das genannte Plasmid exprimiert die gRNA, die tracrRNA und die Cas9 Nuklease, wie im Originalkonstrukt, jedoch mit einer zusätzlichen Neomycin-Resistenzkassette zur stabilen Zelllinien-Selektion (pX330-neoR, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Walter Fuchs, Institut für molekulare Virologie und Zellbiologie, FLI Riems,<sup>353</sup>). Mit CRISPR wurden drei verschiedene gRNAs für das iNOS-Gen entworfen, die Oligonukleotide *annealed* und mittels BbsI in pX330-neoR kloniert. Alle Konstrukte wurden mittels Sanger-Sequenzierung (MiSeq, Illumina) validiert. Die JAWS II-Zellen wurden mit den drei pX330-neoR-Konstrukten, die die gRNAs für iNOS exprimieren, mittels *Mouse Dendritic Cell Nucleofactor* Kit (Lonza) und Elektroporation mit dem Nucleofactor II (Lonza) transfiziert. Nach einer Setzzeit von 2 Tagen wurden die Zellen in Zellkulturmedium mit Geneticin (G418, 300 µg/ml) übertragen und kultiviert. Die Selektion erfolgte maximal für 1 Woche. Die Transfektanden wurden dann mittels einer 96-well-Zellkulturplatte klonal ausgesät und weiter kultiviert, bevor sie in An- und Abwesenheit von IFN-γ auf ihre iNOS-Expression hin mittels Western-Blot-Analyse untersucht wurden. Zusätzlich wurde die genomische DNA der ausgewählten Klone mit dem *Extract Me genomic DNA* Kit der Firma Bliirt den Angaben der Hersteller folgend isoliert und sequenziert. Diese Vorgehensweise sollte die Einführung der Sequenz-Deletion an der erwarteten Gen-Position bestätigen. Zellklone, die eine völlige iNOS-Defizienz zeigten, wurden für nachfolgende Untersuchungen verwendet.

### 3.6 Statistische Analyse

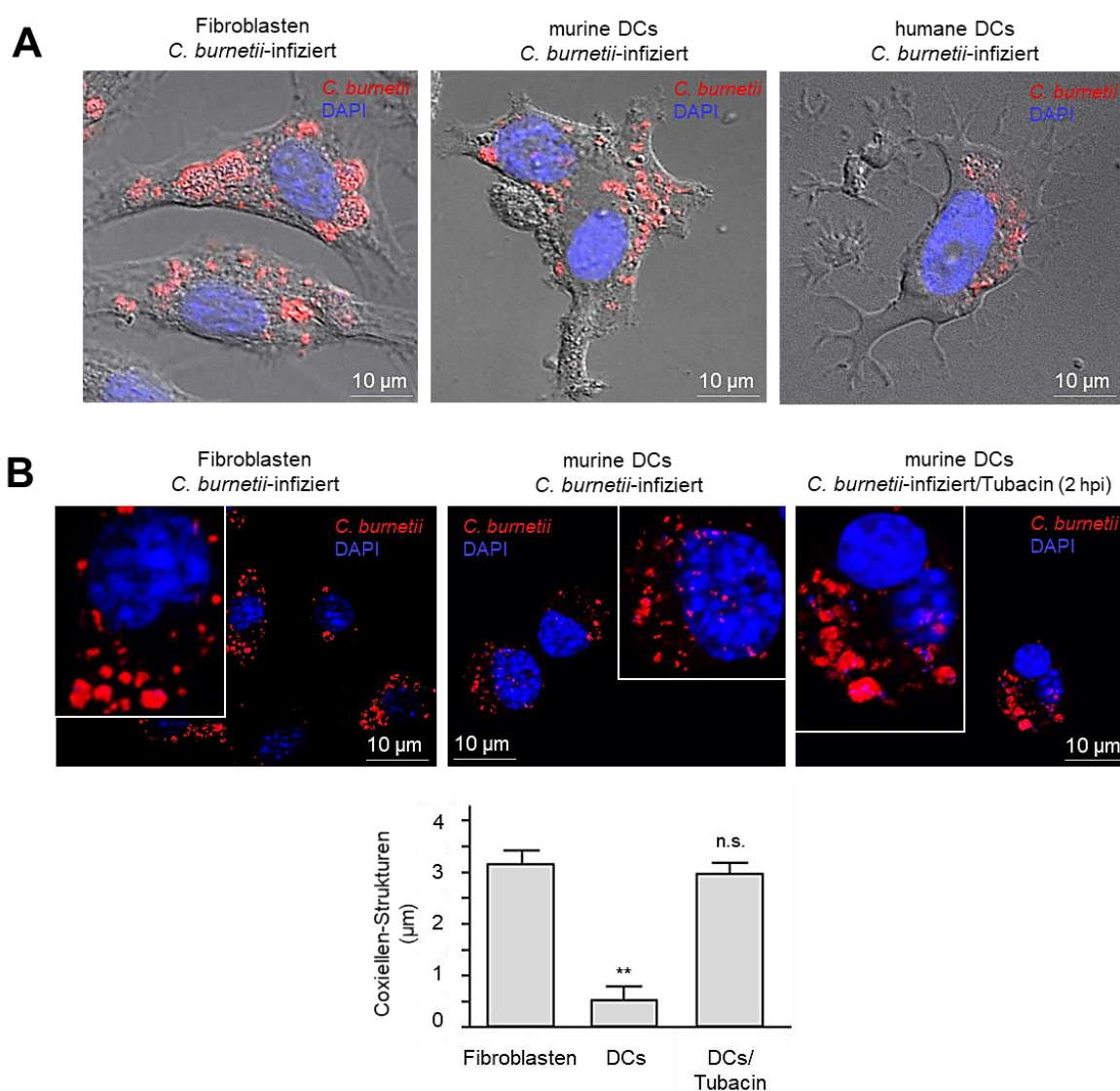
Die Statistische Analyse der erhaltenen Daten ist als Mittelwert mit jeweiliger Standardabweichung mindestens dreier individueller Experimente gezeigt und wurde unter Verwendung von GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) ermittelt. Die Daten wurden unter Verwendung des t-Tests bestimmt (n.s.: nicht signifikant; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 und \*\*\*\*p < 0,0001).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der *C. burnetii*-Infektion von DCs

Es wird angenommen, dass die beobachtete *in vivo*-Phasenvariation von Coxiellen-LPS (Ph II/ Ph I) die Immunerkennung bakterieller Oberflächen während einer Infektion nachteilig beeinflusst <sup>79</sup>. Möglicherweise wirkt das zeitlich zuerst detektierte Ph II-LPS als "immunologischer Köder" in einer Weise, dass die primäre humorale anti-Ph II-Reaktion, die sich als weitgehend nicht-protektiv erweist <sup>41</sup>, als wirksame immunologische Subversionsstrategie wirkt, um die spätere neutralisierende Antikörperreaktion gegen Ph I-Coxiellen aktiv zu verzögern <sup>79</sup>. Es ist bekannt, dass Ph I-Coxiellen-Antikörper gegen Ph I- und II-Antigene auslösen, während hingegen Ph II-Coxiellen prädominant die Antikörperbildung gegen Ph II-Antigene bewirken <sup>79,252,253,354-356</sup>. Man geht daher mittlerweile davon aus, dass ein pathogener *escape*-Mechanismus mit sukzessivem Ph II/I-Antigenwechsel eine wirksame Immunsubversion der Coxiellen ermöglichen könnte und hierdurch auch die Pathogenität des Erregers erhöht wird <sup>79</sup>. Interessanterweise lassen vorangegangene *in vivo*-Studien vermuten, dass Ph II-Antigene unter bestimmten Gegebenheiten in der Lage sind, APCs funktional zu aktivieren, um einen immunologischen Schutz gegen *C. burnetii* zu gewähren <sup>40</sup>. Wie jedoch die angeborene zelluläre Immunität auf Ph II-Coxiellen reagiert und welchen Einfluss diese Bakterien auf die Zellen der *first-line-of-defense* (wie DCs und NK-Zellen) haben, ist nahezu unbekannt. Erkenntnisse hierzu sind von besonderer Bedeutung, da DCs und NK-Zellen als eine Art "äußere Wächter" zu den ersten Immunzellen gehören, die einer *C. burnetii*-Infektion entgegentreten und die nachfolgende adaptive Immunantwort mit ausrichten und orchestrieren.

Die Ausbildung einer parasitophoren Vakuole ist für *C. burnetii* als obligat intrazellulären Erreger essenziell, denn dieses bakterielle Kompartiment (CCV) bildet die Grundlage für eine produktive Zellinfektion durch Coxiellen <sup>36</sup>. Um einen strukturellen Einblick in Ph II-*C. burnetii*-Infektionen von DCs zu erhalten, wurde in einer ersten Untersuchung dieser Arbeit die morphologische Ausbildung von CCVs infizierter DCs mit denen in Standard-Reporterzellen (L929-Fibroblasten) verglichen.

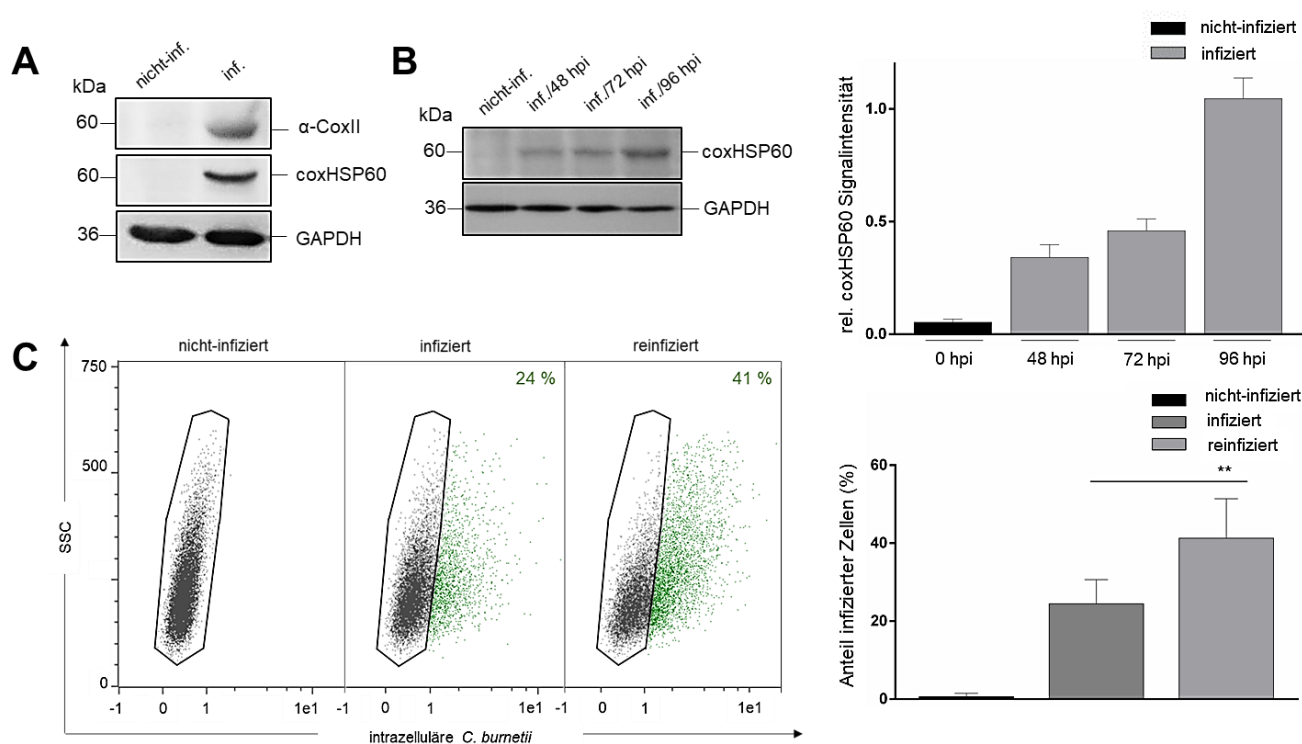


**Abbildung 4-1: *C. burnetii*-Strukturen in infizierten Fibroblasten sowie humanen und murinen DCs**

**(A)** Immunfluoreszenzmikroskopie zur Charakterisierung der Ausbildung parasitophorer Vakuolen in Fibroblasten (L929-Zellen, MOI 10, rechts), murinen (JAWS II-Zellen, MOI 10, mittig) und humanen DCs (KG-1-Zellen, MOI 50, links). Alle Zelllinien wurden mit rot-fluoreszierenden *C. burnetii* (NMII) infiziert und 72 h inkubiert. Der Nachweis der DNA erfolgte mittels DAPI (blau). **(B)** Untersuchung des HDAC6-Einflusses auf die Formierung der parasitophoren Vakuolen mittels Immunfluoreszenz-Analyse in L929-Fibroblasten (links) und JAWS II-DCs (mittig & rechts). Die Zellen wurden mit rot-fluoreszierenden Coxiellen (MOI 10) infiziert, unbehandelt belassen oder 2 hpi mit dem HDAC6-Inhibitor Tubacin (2,8 µM) behandelt (rechts). Alle Präparate wurden 72 h inkubiert und die DNA mit DAPI blau angefärbt. Das Histogramm zeigt die Größe identifizierter Coxiellen-Strukturen in Fibroblasten und DCs (+/- Tubacin). Die statistische Analyse ist in Kapitel 3.6 beschrieben (n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle (Fibroblasten); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (Fibroblasten);  $n=20$ ).

Immunfluoreszenzen in Abbildung 4-1 A zeigen den Vergleich von Coxiellen-Infektionen in Fibroblasten sowie murinen (JAWS II) und humanen (KG-1) DCs. In den untersuchten Fibroblasten sind bei 72 hpi große CCVs mit einem Durchmesser von 5–10 µm zu beobachten, die in den Wirtszellen vornehmlich perinukleär auftreten. Bakterielle Kompartimente mit ähnlicher Größe und Morphologie finden sich nicht in infizierten murinen oder humanen DCs. Hier sind vorherrschend kleine bakterielle Strukturen ( $\leq 1$  µm) sichtbar, die offensichtlich nicht zu größeren CCVs fusionieren. Wie in Abbildung 4-1 B zu sehen, scheint es jedoch durch Anwesenheit des Histondeacetylase 6 (HDAC6)-Inhibitors Tubacin möglich zu sein, eine den Fibroblasten vergleichbare CCV-Morphologie in DCs zu generieren. Die Tubacin-vermittelte HDAC6-Inhibierung führt zu einer erhöhten  $\alpha$ -Tubulin-

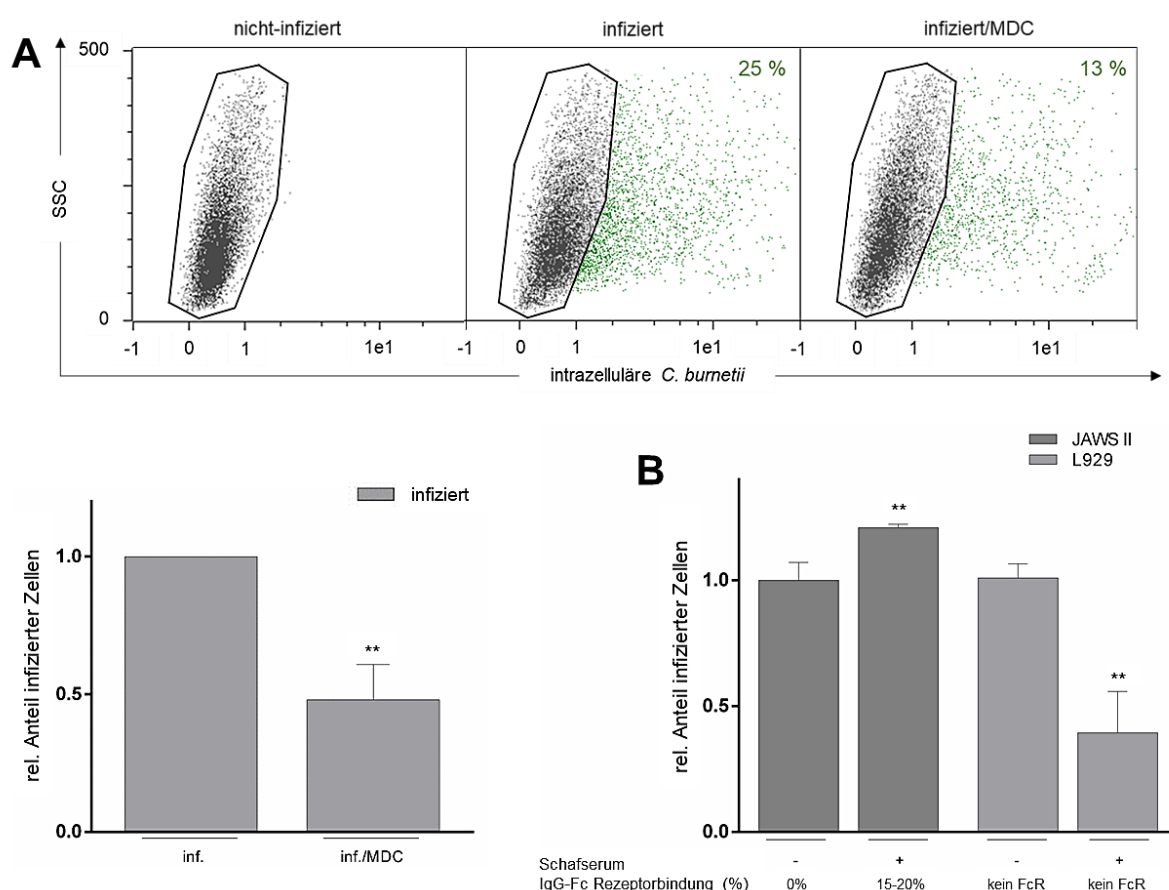
Acetylierung und damit zur Stabilisierung intrazellulärer Mikrotubuli<sup>357</sup>. Einerseits sind diese Proteinbausteine des Zytoskeletts in ihrer stabilen acetylierten Polymerform entscheidend für die Ausbildung und Etablierung intrazellulärer Bakterienkompartimente<sup>358</sup>. Andererseits besitzen sie mit ihrer strukturellen Auf- und Abbaudynamik große Bedeutung für die funktionalen Zytoskelett-Eigenschaften von DCs<sup>359</sup>. So kontrolliert die Mikrotubuli-Dynamik Prozesse der DC-Migration und -Reifung<sup>359,360</sup> sowie auch Antigenaufnahme und -präsentation<sup>361</sup>. Erst die in DCs durch Tubacin stabilisierten Mikrotubuli-Strukturen ermöglichen die Ausbildung von CCV-Strukturen, die in ihrer veränderten Größe (5-10 µm) denen von Fibroblasten entsprechen (Vergleich Abb. 4-1 B rechts und links sowie Abb. 4-1 B unten). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass DCs als Wirtszellen für eine Ph II-*C. burnetii*-Infektion dienen und der beobachtete charakteristische Infektionsphänotyp mit der Ausbildung größenreduzierter CCVs offensichtlich auf die für DCs typische Dynamik/Instabilität vorhandener Mikrotubuli zurückzuführen ist<sup>359</sup>.



#### Abbildung 4-2: Charakterisierung der Infektiosität *C. burnetii*-infizierter DCs

**(A)** Western-Blot-Analyse zum Nachweis einer *C. burnetii*-Infektion in JAWS II-DCs. Die Zellen wurden mit *C. burnetii* (MOI 10) infiziert und für 72 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurden nicht-infizierte JAWS II-DCs mitgeführt. Der Infektionsnachweis erfolgte über einen polyklonalen Coxiellen-Antikörper ( $\alpha$ -CoxII) sowie das Coxiellen-spezifische Hitzeschockprotein 60 (coxHSP60). Als Ladekontrolle diente GAPDH. **(B)** Untersuchung des Infektionsverlaufs infizierter DCs mittels Western-Blot-Analyse. JAWS II-DCs wurden mit Coxiellen (MOI 10) infiziert und in einer Zeitspanne von 48 hpi bis 96 hpi kultiviert. Nicht-infizierte Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. GAPDH wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von coxHSP60 quantifiziert und anschließend auf die Ladekontrolle normiert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Versuchsansatz  $\pm$  Standardabweichung auf Basis dreier unterschiedlicher Expositionen. **(C)** Durchflusszytometrie der Reinfektiosität von *C. burnetii* (MOI 10) nach 72 h Kultivierung in JAWS II-DCs. 72 hpi wurden die Bakterien mittels *syringe releasing* freigesetzt und auf Reporterzellen (L929-Fibroblasten) gegeben. Nach 72 h wurde die Fähigkeit zur Reinfektion durchflusszytometrisch über den Nachweis infizierter Reporterzellen untersucht. Für die Anfärbung wurde der  $\alpha$ -CoxII Antikörper eingesetzt. Nicht-infizierte sowie *C. burnetii* (MOI 10, 72 hpi)-infizierte Reporterzellen wurden als Kontrollen mitgeführt. Gezeigt sind die Resultate aus sechs unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.6 beschrieben (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert);  $n=6$ ).

In nachfolgenden Experimenten wurde nun der Verlauf der Coxiellen-Infektion in DCs genauer untersucht. Hierzu wurden geeignete Western-Blot-Analysen unter Verwendung spezifischer anti-Coxiellen-Antikörper etabliert. Wie in Abbildung 4-2 A zu sehen ist, kann die Coxiellen-Infektion (Bakterienlast) von DCs sowohl über das bakterielle Hitzeschockprotein 60 (coxHSP60) als auch über einen polyklonalen Coxiellen-Antikörper ( $\alpha$ -CoxII<sup>50</sup>) detektiert werden. Hierauf basierend zeigte sich unter Verwendung des coxHSP60-Antikörpers eine Coxiellen-Infektion von DCs mit zunehmendem coxHSP60-Signal über 96 hpi (Abb. 4-2 B). Des Weiteren ergab die  $\alpha$ -CoxII-basierte Durchflusszytometrie zum Nachweis der Infektiosität von Coxiellen aus DCs (die zuvor mit MOI 10 für 72 h infiziert wurden), dass die freigesetzten Bakterien einen höheren Anteil an Reporterzellen reinfizieren (40%) als die entsprechenden Kontrollen (25%) des parallel analysierten Ausgangs-Stocks mit MOI 10 (Abb. 4-2 C). Somit deuten die Ergebnisse der Analysen darauf hin, dass DCs als Wirtszellen eine produktive *C. burnetii*-Infektion (mit Generierung infektiöser Bakterien) aufweisen.



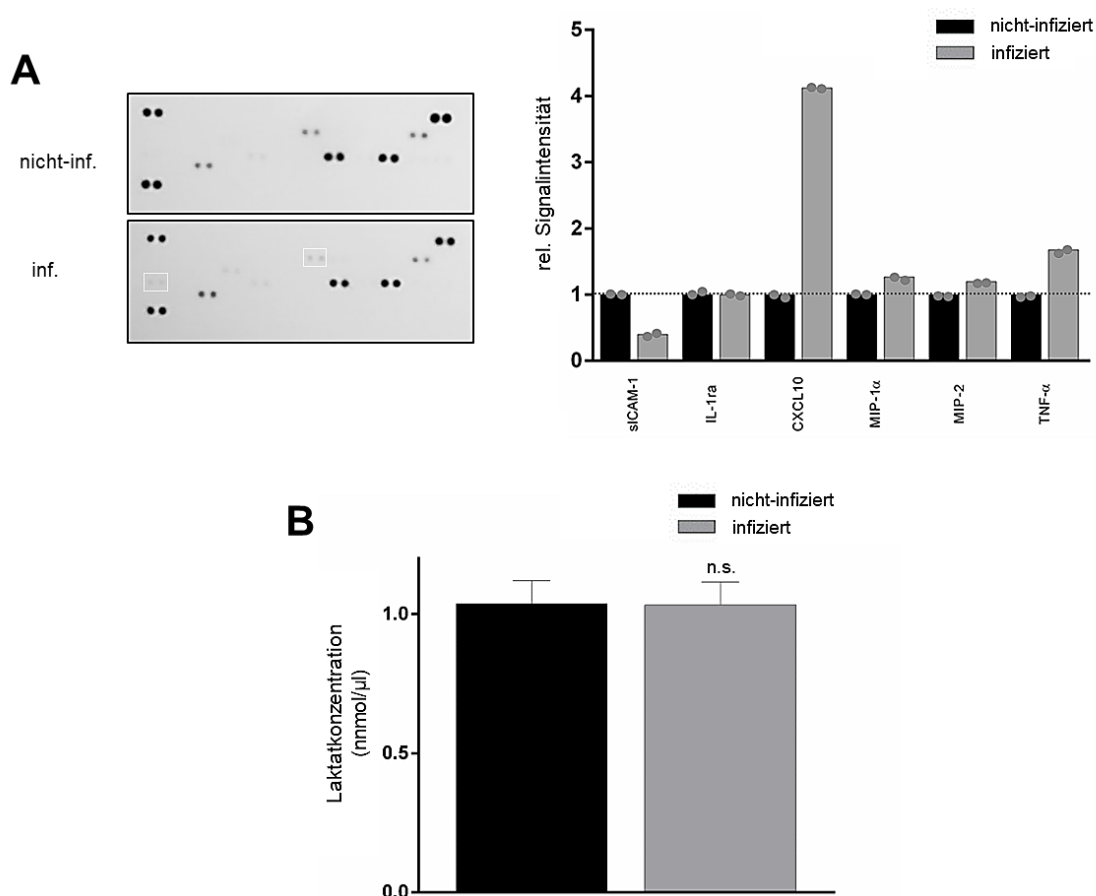
#### Abbildung 4-3: Zelluläre Aufnahme von *C. burnetii* durch DCs

**(A)** Durchflusszytometrische Untersuchung des Aufnahmemechanismus von *C. burnetii* in DCs. JAWS II-DCs wurden in An- oder Abwesenheit des Inhibitors MDC (Clathrin-vermittelte Endozytose, 200  $\mu$ M) für 24 h mit *C. burnetii* (MOI 10) infiziert. Anschließend wurde der Anteil infizierter Zellen über eine Anfärbung mit dem  $\alpha$ -CoxII-Antikörper quantifiziert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Gezeigt ist der relative Anteil infizierter Zellen, bei dem die infizierte Kontrolle auf 1 gesetzt wurde. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.6 beschrieben (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(B)** Überprüfung der Antikörper- und Fc-Rezeptor (Fc-R)-vermittelten Coxiellen-Aufnahme. Coxiellen (MOI 10) wurden 6 h mit Serumproben infizierter Schafe inkubiert. Als Kontrollen wurden unbehandelte Coxiellen mitgeführt. Anschließend wurden JAWS II-DCs und L929-Fibroblasten infiziert und der Anteil infizierter Zellen nach 72 h durchflusszytometrisch ( $\alpha$ -CoxII) bestimmt. Die Abbildung basiert auf drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung, dargestellt ist der relative Anteil infizierter Zellen, bei dem die



unbehandelte Kontrolle auf 1 normiert wurde. Ergänzend ist der Einfluss der IgG-Fc Rezeptorbindung bei der Coxiellen-Aufnahme gezeigt. Die Durchführung der Analyse, basierend auf einer Fc-R Blockierung, ist in Kapitel 3.3.4 erläutert. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.6 beschrieben (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (JAWS II-DCs/L929-Fibroblasten ohne Behandlung);  $n=3$ ).

Die Clathrin-abhängige Endozytose kann bei DCs zur zellulären Aufnahme bakterieller Pathogene dienen<sup>44</sup>. Um zu untersuchen, ob und in welchem Maße dieser zelluläre Mechanismus bei der Coxiellen-Infektion von DCs beteiligt ist, wurde für durchflusszytometrische Infektionsanalysen der entsprechende zelluläre Aufnahmeweg mittels Inhibitor (MDC) pharmakologisch blockiert. Wie die Ergebnisse in Abbildung 4-3 A zeigen, führt die Anwesenheit von 200  $\mu\text{M}$  MDC in infizierten DCs im Vergleich zur Kontrolle zu einer deutlichen Reduktion der intrazellulären Bakterienlast um 50%. Somit scheint Clathrin-abhängige Endozytose eine wichtige Rolle bei der Coxiellen-Infektion von DCs zu spielen. Dieser endozytotische Aufnahmeweg ist bei verschiedenen Immunzellen häufig dadurch charakterisiert, dass IgG-bindende Fc-R die Aufnahme antikörpermarkierter Pathogene vermitteln<sup>362,363</sup>, ein Prozess, der spezieübergreifend beschrieben ist<sup>364</sup>. Um zu untersuchen, ob und in welchem Umfang die Coxiellen-Infektion von DCs durch vorhandene Fc-R unterstützt wird, wurden die Bakterien vor der DC-Infektion mit entsprechenden *C. burnetii*-bindenden IgGs aus Schafseren vorbehandelt. L929-Fibroblasten dienten als Negativkontrolle, da sie weder Fc-R exprimieren<sup>365</sup> noch die Coxiellen über Clathrin-vermittelte Endozytose aufnehmen<sup>93</sup>. Die Durchflusszytometrie in Abbildung 4-3 B ergab einen messbar positiven Effekt der Vorbehandlung von Coxiellen auf die DC-Infektion. Der Infektionsanstieg (zwischen 15-20%) korreliert mit der über einen Fc-R-Blockierungssassay ermittelten IgG-Fc-R-Bindungsrate des eingesetzten Serums. Für die Fc-R-negativen L929-Fibroblasten zeigte sich hingegen nach Vorbehandlung der Coxiellen eine deutliche Reduktion der zellulären Infektionsrate um 50%. Dies lässt bei den eingesetzten Kontrollzellen auf eine antikörpervermittelte Beeinträchtigung der Coxiellen-Infektion durch Neutralisierung schließen. Ein Phänomen, das *in vivo* bereits zuvor beschrieben wurde<sup>366</sup>. In Zusammenfassung dieser Resultate lässt sich festhalten, dass die Clathrin-abhängige Endozytose eine wichtige Rolle bei der Coxiellen-Infektion von DCs spielt und der zelluläre Aufnahmeprozess vermutlich zusätzlich über Coxiellen-bindende Antikörper und Fc-R unterstützt wird.



**Abbildung 4-4: Zyto-/Chemokinprofil und Stoffwechselaktivität von *C. burnetii*-infizierten DCs**

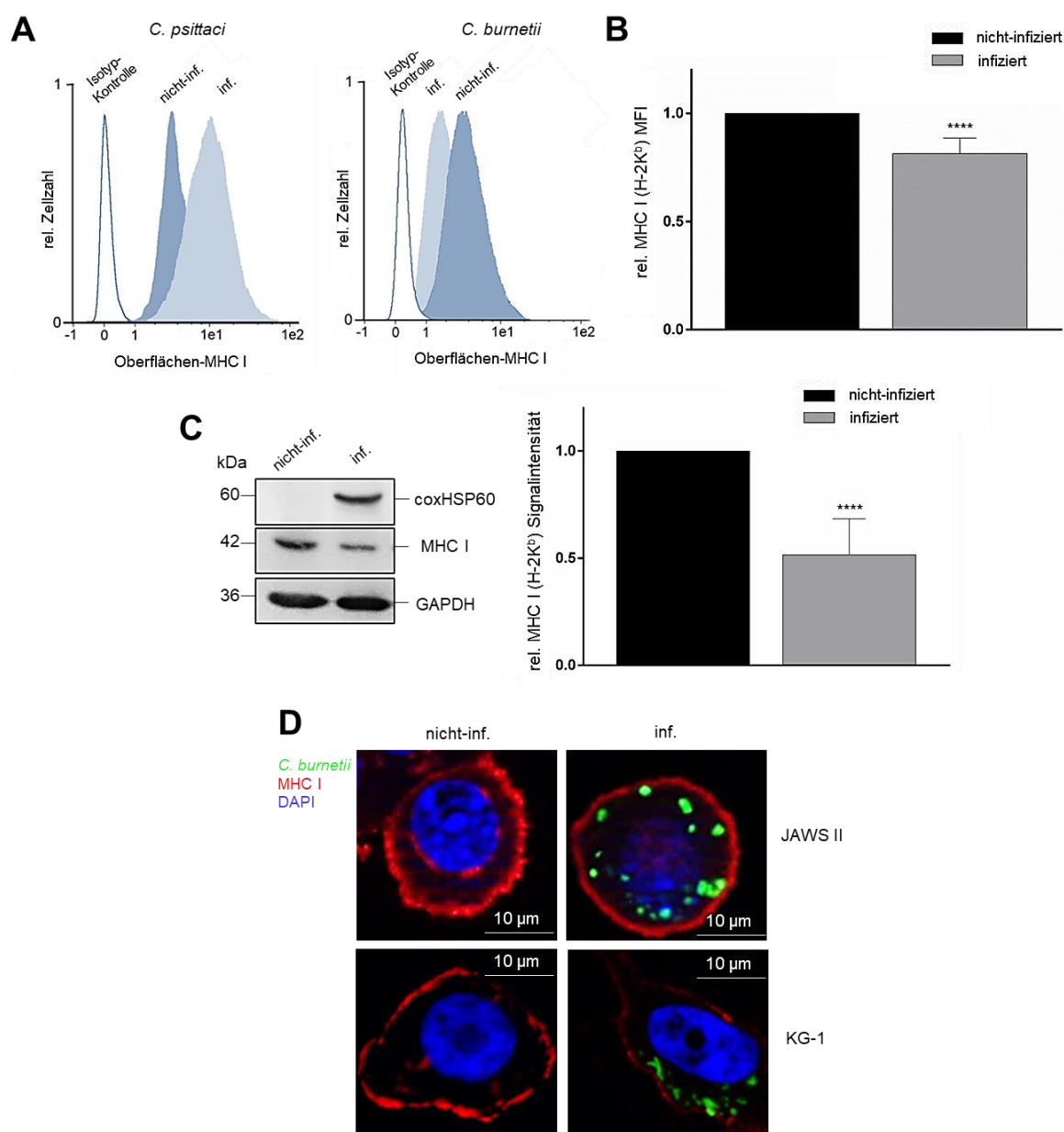
**(A)** Analyse sekretierter Zyto- und Chemokine während der Coxiellen-Infektion in DCs. JAWS II-DCs wurden für 72 h mit *C. burnetii* (MOI 10) infiziert. Nicht-infizierte Zellen dienten als Kontrolle. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und mit Hilfe des Zytokinarrays (R&D Systems) untersucht. Die densitometrische Analyse der einzelnen *Dot-Blots* erfolgte auf Basis der internen Kontrollen des Zytokinarrays mit Einführung eines *thresholds* für die mittlere Pixelintensität mit einem Wert von 2000. Niedrigere Pixelintensitäten wurden auf Grund der Schwäche des Signals aus der densitometrischen Analyse ausgeschlossen. Für die Darstellung der relativen Signalintensität wurden die nicht-infizierten Kontrollzellen auf 1 gesetzt. Zur Feststellung der Unterschiede zwischen nicht-infizierten und infizierten DCs wurden interne *thresholds* etabliert (Herunterregulation < 0,5; keine Änderung  $\pm$  1; Hochregulation > 2). **(B)** Quantifizierung der Laktatkonzentration (*L-Lactate-Assay Kit*, abcam/Sigma-Aldrich) in nicht-infizierten und *C. burnetii*-infizierten (MOI 10) JAWS II-DCs 72 hpi. Dargestellt sind die Resultate aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Analyse wurde entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.6 durchgeführt (n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle (nicht-infiziert); n=3).

Anhand der Sekretion immunologischer Botenstoffe von DCs können Aktivierungsstatus und infektionsimmunologische Veränderungen abgelesen werden<sup>367,368</sup>. Um festzustellen, ob und in welchem Maße eine Coxiellen-Infektion dies bei DCs induziert, wurde die Zyto-/Chemokinausschüttung infizierter DCs mithilfe eines Zytokinarrays (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.4.4) analysiert. Dabei ergab sich, dass die Infektion nur minimale Modifikationen im Zyto-/Chemokinprofil der DCs bewirkt (Abb. 4-4 A). Auf sehr geringem Sekretionsniveau konnte bei infizierten DCs lediglich eine schwache siCAM (CD54)-Reduktion (Marker/Regulator für Inflammation<sup>369</sup>) und eine leichte CXCL10 (IP-10)-Induktion (Marker/Regulator für Inflammation, Apoptose und Zellteilung<sup>370</sup>) detektiert werden. Für alle anderen untersuchten Botenstoffe zeigten sich keine Unterschiede zwischen nicht-infizierten und infizierten DCs. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Coxiellen-Infektion insgesamt keine funktionale DC-Aktivierung/Reifung

hervorruft. Ein entscheidender physiologischer Marker für eine solche Reifung von DCs ist die metabolische "Umprogrammierung" (*metabolic switch*) von der OXPHOS hin zur aeroben Glykolyse mit gesteigerter Lactatsynthese<sup>367,368,371</sup>. Bei der Laktatbestimmung in den Zellkulturüberständen konnten jedoch wiederum keine messbaren Unterschiede zwischen nicht-infizierten und infizierten DCs detektiert werden (Abb. 4-4 B). In sich ergänzender Weise zeigen die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit, dass die Coxiellen-Infektion offensichtlich nicht zu einer das Immunsystem unterstützenden Aktivierung/Reifung betroffener DCs führt.

#### 4.2 Untersuchung der MHC I-Antigenpräsentation *C. burnetii*-infizierter DCs

Der MHC I-vermittelten Antigenpräsentation von DCs wird eine entscheidende Bedeutung bei der zellulären Immunabwehr gegen *C. burnetii* zugeschrieben<sup>372</sup>. Daher wurde dieser wichtige Prozess der Immunabwehr von DCs im Verlauf der Coxiellen-Infektion eingehender untersucht.



**Abbildung 4-5: MHC I-Ausprägung in und auf *C. burnetii*-infizierten DCs**

**(A)** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Oberflächen-MHC I (H-2K<sup>b</sup>)-Expression während einer *C. psittaci*- und einer *C. burnetii*-Infektion in DCs. JAWS II-DCs wurden mit *C. psittaci* (MOI 10, 48 h) oder *C. burnetii* (MOI 10, 72 h) infiziert und entsprechend der Länge des Replikationszyklus inkubiert. Isotyp- und nicht-infizierte Kontrollen wurden mitgeführt. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität des Oberflächen-MHC I (H-2K<sup>b</sup>) für nicht-infizierte sowie *C. psittaci* (links)- und *C. burnetii* (rechts)-infizierte JAWS II-DCs. **(B)** Durchflusszytometrische Quantifizierung der MHC I (H-2K<sup>b</sup>)-Oberflächenexpression nicht-infizierter und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter JAWS II-DCs 72 hpi. Gezeigt sind die Ergebnisse aus sechs unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Für die Darstellung der relativen MFI wurden die nicht-infizierten Kontrollzellen auf 1 gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.6 dargelegt (\*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert);  $n=6$ ). **(C)** zeigt eine ergänzende Western-Blot-Analyse des Gesamt-MHC I nicht-infizierter und *C. burnetii*-infizierter JAWS II-DCs nach 72 h. Die densitometrische Analyse erfolgte auf Basis der quantifizierten Bandenintensitäten von MHC I (H-2K<sup>b</sup>) sowie der Normalisierung auf die mitgeführte Ladekontrolle GAPDH. Die dargestellten Resultate basieren auf sechs unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Analyse ist in Kapitel 3.6 beschrieben (\*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert);  $n=6$ ). **(D)** Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der MHC I (H-2K<sup>b</sup>)-Oberflächenexpression nicht-infizierter und *C. burnetii*-infizierter JAWS II-DCs (MOI 10, oben) und KG-1-DCs (MOI 50, unten) 72 hpi. Gezeigt sind eine Oberflächenanfärbung für MHC I (H-2K<sup>b</sup>, rot) sowie eine nachträgliche intrazelluläre Anfärbung der Coxiellen (grün) mit dem  $\alpha$ -CoxII Antikörper. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau).

Abbildung 4-5 A zeigt die Durchflusszytometrie der MHC I-Oberflächenexpression von DCs nach Infektion mit *C. burnetii* (72 hpi) und zur Kontrolle mit *Chlamydia (C.) psittaci* (48 hpi). Entsprechend vorangegangenen Studien des Labors zeigen die Kontrollexperimente mit Chlamydien-infizierten DCs eine deutliche MHC I-Oberflächeninduktion<sup>373,374</sup>. Im Gegensatz dazu weisen *C. burnetii*-infizierte DCs eine markante Reduktion von Oberflächen-MHC I auf (Abb. 4-5 B). In Übereinstimmung hiermit belegte die Immunblot-Analyse der MHC I-Gesamtausprägung (Abb. 4-5 C) für infizierte DCs eine ebenfalls ausgeprägte Reduktion von 40-50%. Diese Beobachtungen für Coxiellen-infizierte DCs konnte mittels vergleichender Immunfluoreszenzmikroskopie in Abbildung 4-5 D untermauert werden. Während nicht-infizierte murine und humane DCs eine deutliche MHC I-Oberflächenexpression (rot) aufwiesen, war diese für die *C. burnetii* (grün)-infizierten DCs deutlich verringert. Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse der Untersuchungen, dass bei einer Coxiellen-Infektion von DCs die funktionale Aktivierung und die Induktion der MHC I-vermittelten Antigenpräsentation ausbleiben beziehungsweise supprimiert werden.

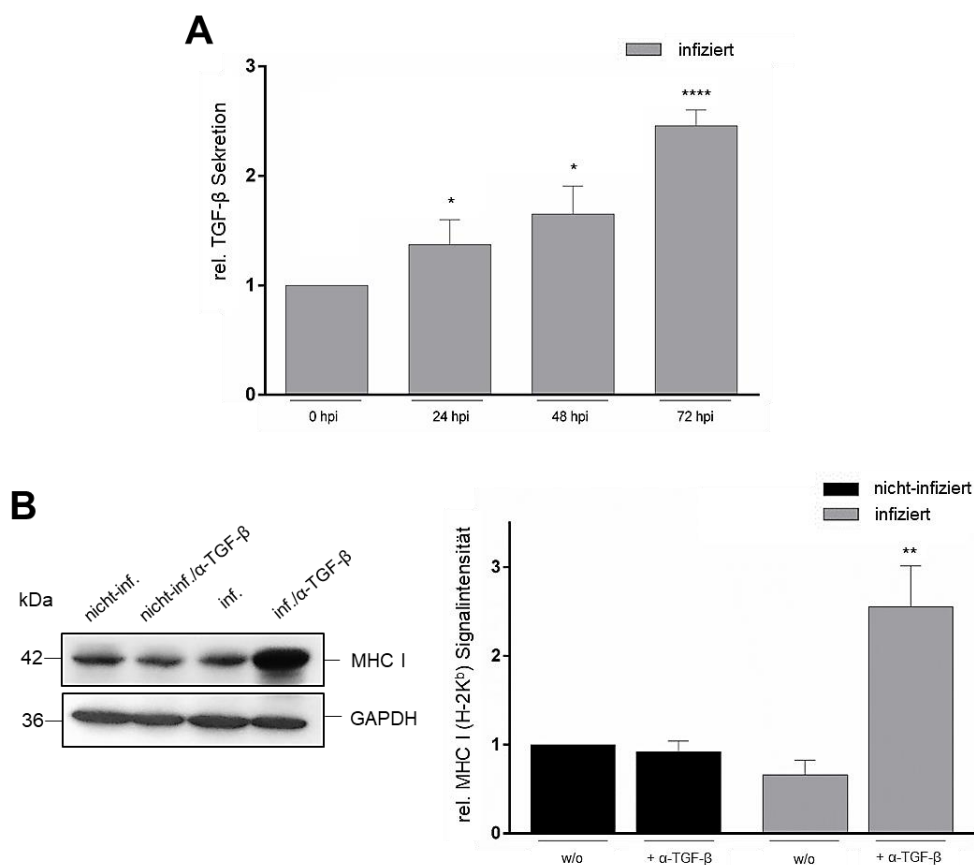
**4.3 Immunsubversion *C. burnetii*-infizierter DCs**

Die Suppression der MHC I-vermittelten Antigenpräsentation Coxiellen-infizierter DCs deutet auf einen immunologischen Subversionsmechanismus der Bakterien hin. Ziel der nachfolgend beschriebenen Experimente war es daher, die molekular- und zellbiologischen Hintergründe dieser Coxiellen-Strategie näher zu untersuchen.

**4.3.1 TGF- $\beta$ -vermittelte MHC I-Suppression *C. burnetii*-infizierter DCs**

Dem Zytokin TGF- $\beta$  wird eine systemisch immunsuppressive Wirkung zugesprochen<sup>375</sup>. Weitere Untersuchungen zeigten, dass TGF- $\beta$  zudem einen ausgeprägten negativen Einfluss auf

die Reifung, Effektorfunktionen und Antigenpräsentation von DCs ausübt<sup>376,377</sup>. Darüber hinaus hat die Anwesenheit des Zytokins starke Auswirkungen auf den Infektionsverlauf verschiedener bakterieller Pathogene<sup>378-381</sup>. Auf Grundlage dieser Untersuchungen wurde nachfolgend analysiert, ob und in welchem Umfang TGF- $\beta$  eine funktionale Bedeutung für die Coxiellen-Infektion von DCs besitzt.



**Abbildung 4-6: TGF- $\beta$  vermittelte MHC I-Suppression in *C. burnetii*-infizierten DCs**

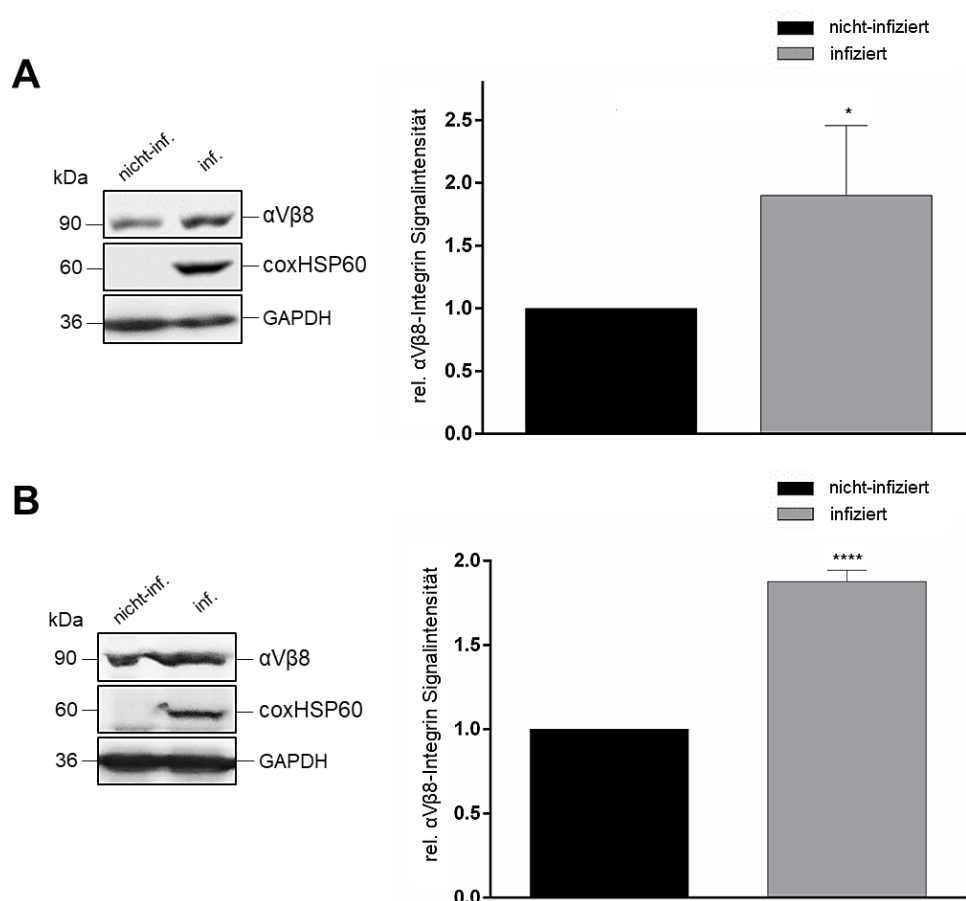
(A) TGF- $\beta$ -Sekretion im Verlauf einer *C. burnetii*-Infektion in DCs. Mit Hilfe eines TGF- $\beta$ -ELISA wurden die Überstände aus *C. burnetii* (MOI 10)-infizierten JAWS II-DCs (24-72 hpi) auf ihre TGF- $\beta$ -Sekretion hin untersucht. Als Negativkontrollen wurden nicht-infizierte JAWS II-DCs verwendet (0 hpi). Dargestellt ist die relative Zytokin-Sekretion aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung, bei der die nicht-infizierten Kontrollzellen auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.6 beschrieben (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert, 0 hpi); \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert, 0 hpi);  $n = 3$ ). (B) zeigt die Auswirkungen der Neutralisierung von TGF- $\beta$  auf infizierte DCs. Nicht-infizierte und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden entweder ohne Behandlung oder unter Zugabe eines neutralisierenden  $\alpha$ -TGF- $\beta$ (1,2,3; 1,5  $\mu$ g/ml)-Antikörpers für 72 h kultiviert. GAPDH wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von MHC I (H-2K<sup>b</sup>) quantifiziert und auf die Ladekontrolle normiert. Dargestellt ist die relative MHC I (H-2K<sup>b</sup>)-Signalintensität, bei der die nicht-infizierten Kontrollwerte auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Analyse, siehe Kapitel 3.6, wurde auf Basis von drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung durchgeführt (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung);  $n = 3$ ).

Zunächst wurde analysiert, ob es im Rahmen der Infektion zu einer DC-vermittelten Ausschüttung von TGF- $\beta$  kommt, die ursächlich für die MHC I-Suppression sein könnte<sup>382</sup>. Dazu wurden Zellkulturüberstände infizierter DC-Kulturen während des Infektionsverlaufs (0-72 hpi) mit einem TGF- $\beta$ -ELISA (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.4.8) auf die Sekretion des Zytokins hin untersucht. Im Vergleich zu einer nicht-infizierten Kontrolle wiesen die Zellkulturüberstände der Coxiellen-infizierten DCs tatsächlich eine über die Zeit ansteigende höhere TGF- $\beta$ -Ausschüttung auf

(Abb. 4-6 A). Die relative Zunahme liegt bei einem Wert von 2,5. Des Weiteren wurde in einem Antikörper-Neutralisationsversuch der TGF- $\beta$ -Einfluss auf die MHC I-Expression untersucht. Dazu wurden nicht-infizierte und *C. burnetii*-infizierte DCs in An- und Abwesenheit eines TGF- $\beta$ -neutralisierenden Antikörpers für 72 h kultiviert und die MHC I-Expression mittels Western-Blot untersucht (Abb. 4-6 B). Bei der TGF- $\beta$ -Neutralisierung konnte im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollexperimenten ein deutlicher 2- bis 3-facher Anstieg des exprimierten MHC I-Levels in infizierten DCs beobachtet werden. Somit weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass in infizierten DCs die infektionsbedingte MHC I-Suppression auf eine parallel erhöhte autokrine Ausschüttung und Wirkung des anti-inflammatorischen TGF- $\beta$  zurückzuführen ist.

#### 4.3.2 Induktion des TGF- $\beta$ -aktivierenden $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrins in infizierten DCs

Die gesteigerte TGF- $\beta$ -Sekretion und ihr Einfluss auf die MHC I-Antigenpräsentation Coxiellen-infizierter DCs lassen einen autokrinen immunmodulatorischen Einfluss des Zytokins vermuten. Die Funktionalität von TGF- $\beta$  ist von der Bindung an einen spezifischen Oberflächenrezeptor abhängig, der auf APCs exprimiert wird <sup>383</sup>. Die Rezeptorbindung von TGF- $\beta$  kann nur in Anwesenheit eines membranverankerten Integrins erfolgen. Der komplexe Interaktionsprozess wird durch die nicht-kovalente Assoziation des Zytokins mit dem sogenannten *latency-associated peptide* (LAP) kontrolliert. LAP formt eine klammerähnliche Struktur um das Zytokin und verhindert so seine Rezeptorbindung. Um das TGF- $\beta$  aus dieser inaktiven Struktur zu entlassen, sind Integrine notwendig, die LAP strukturell deformieren und/oder seine proteolytische Zugänglichkeit erhöhen und so zur Freisetzung des aktiven TGF- $\beta$  führen. Dieses kann nun an seinen Rezeptor binden, Signalkaskaden und nachgeschaltete immunologische Prozesse initiieren <sup>384,385</sup>. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde in nachfolgenden Experimenten die Integrin-Expression, die die eigentliche Aktivität und Funktionalität von TGF- $\beta$  bestimmt, analysiert. Da für DCs bekannt ist, dass sie vorwiegend das TGF- $\beta$ -aktivierende  $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrin exprimieren <sup>383,386,387</sup>, wurde die Induktion dieses DC-charakteristischen Integrin-Typs genauer untersucht.



#### Abbildung 4-7: $\alpha V\beta 8$ -Integrin als aktivierender Mittler der TGF- $\beta$ -abhängigen Immunsuppression

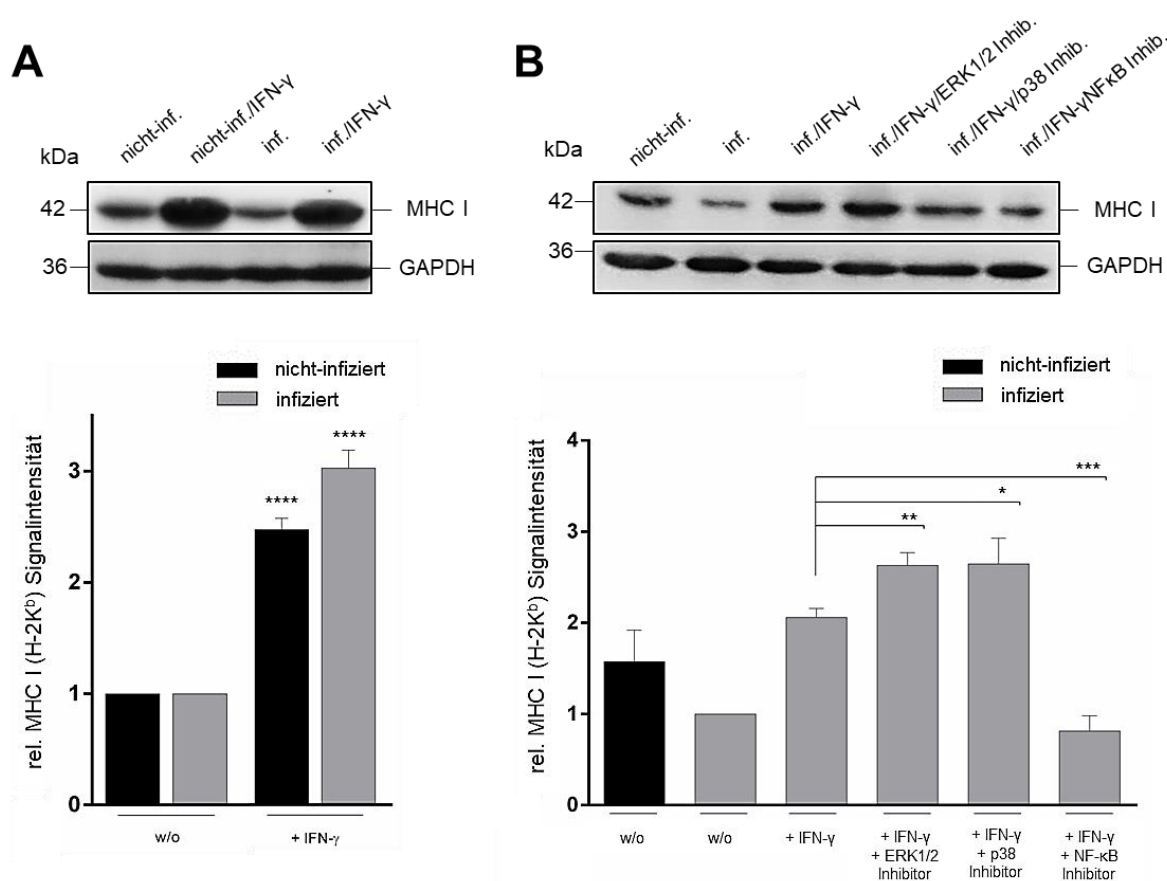
**(A)** Western-Blot-Analyse zur Untersuchung des Einflusses des  $\alpha V\beta 8$ -Integrins auf die Immunsuppression durch Coxiellen. Nicht-infizierte und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden für 72 h kultiviert. Für die densitometrische Auswertung wurden die Bandenintensitäten des  $\alpha V\beta 8$ -Integrin quantifiziert und auf die mitgeführte Ladekontrolle GAPDH normiert. Dargestellt ist die relative  $\alpha V\beta 8$ -Integrin-Signalintensität, für die die nicht-infizierten Kontrollen auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Analyse, beschrieben in Kapitel 3.6, wurde auf Basis von drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung durchgeführt (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert);  $n=3$ ). **(B)** zeigt eine ergänzende Western-Blot-Analyse zur  $\alpha V\beta 8$ -Integrin-Oberflächenexpression. Die dafür notwendige Aufbereitung der Plasmamembranen ist unter Kapitel 3.4.1 erläutert. JAWS II-DCs wurden für 72 h mit Coxiellen (MOI 10) infiziert oder blieben nicht-infiziert. Für die densitometrische Auswertung wurden die Bandenintensitäten des  $\alpha V\beta 8$ -Integrins quantifiziert und auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert. Gezeigt ist die relative Signalintensität, basierend auf der nicht-infizierten Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde. Die statistische Analyse (siehe Kapitel 3.6) wurde auf Basis von drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung durchgeführt (\*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert);  $n=3$ ).

Wie im Western-Blot von Abbildung 4-7 zu sehen ist, erfolgte die Untersuchung des Expressions-Levels des  $\alpha V\beta 8$ -Integrins vor und während der Coxiellen-Infektion von DCs. Es wurde sowohl die Gesamtausprägung des Integrins (Abb. 4-7 A) als auch seine Präsenz auf der Plasmamembran von DCs analysiert (Abb. 4-7 B, siehe Material und Methoden, Kapitel 3.4.1, Abschnitt Plasmamembran-Isolation). Für beide zellulären Gegebenheiten der DCs zeigte sich während der Coxiellen-Infektion eine signifikante Proteininduktion (Faktor 2-3) des  $\alpha V\beta 8$ -Integrins. Somit wird bei infizierten DCs die gesteigerte TGF- $\beta$ -Ausschüttung von einer deutlichen Expressionszunahme des Zytokin-aktivierenden  $\alpha V\beta 8$ -Integrins begleitet. Dies untermauert die obige Hypothese, dass die beobachtete infektionsbedingte Beeinträchtigung der MHC-Antigenpräsentation infizierter DCs in der Tat in direkter Weise auf einen induzierten autokrinen Suppressionseffekt des  $\alpha V\beta 8$ -Integrin-aktivierten TGF- $\beta$  zurückzuführen ist.

#### 4.4 Aufhebung TGF- $\beta$ -vermittelter MHC I-Suppression *C. burnetii*-infizierter DCs

Die hier durchgeführten Studien zeigen, dass eine DC-Infektion mit Ph II-Coxiellen zu einer "selbst-blockierenden" Ausschüttung von  $\alpha\text{V}\beta 8$ -Integrin-aktivierten TGF- $\beta$  führt, die die MHC I-Antigenpräsentation supprimiert. Die MHC I-Präsentation von Coxiellen-Antigenen über infizierte DCs ist jedoch für die Einleitung einer nachgeschalteten T-Zell-Immunität essenziell<sup>14,259</sup>. In diesem immunologischen Kontext kommt IFN- $\gamma$  eine entscheidende Bedeutung zu. Dieses stimuliert Aktivierung und MHC I-Antigenpräsentation von DCs<sup>221</sup>. Hierauf basierend wurde in nachfolgend beschriebenen Experimenten der Einfluss des Interferons auf die MHC I-Expression Coxiellen-infizierter DCs untersucht.

##### 4.4.1 Interferon-vermittelte MHC I-Induktion infizierter DCs



**Abbildung 4-8: Interferon-vermittelte MHC I-Induktion *C. burnetii*-infizierter DCs**

**(A)** Western-Blot-Analyse zur Untersuchung des Einflusses von IFN- $\gamma$  auf die MHC I (H-2K<sup>b</sup>)-Expression von DCs. Nicht-infizierte sowie *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden für 72 h in An- oder Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) kultiviert. Die densitometrische Analyse basiert auf der Quantifizierung der MHC I-Bandenintensitäten und der Normalisierung auf GAPDH als Ladekontrolle. Gezeigt ist die relative MHC I (H-2K<sup>b</sup>)-Signalintensität, für die die entsprechende unbehandelte Kontrolle (nicht-infiziert/infiziert) auf 1 gesetzt wurde. Die statistische Analyse erfolgte, wie in Kapitel 3.6 beschrieben, für drei unabhängige Experimente  $\pm$  Standardabweichung (\*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert/infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(B)** Identifizierung des relevanten Signalweges für die Wiederherstellung der MHC I-Antigenpräsentation infizierter DCs mittels Western-Blot-Analyse. JAWS II-DCs wurden für 2 h mit Inhibitoren verschiedener Kinase-Signalwege (ERK1/2 [U0126, 50  $\mu$ M], p38 [SB202490, 10  $\mu$ M], NF- $\kappa$ B [CAPE, 5  $\mu$ M]) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit *C. burnetii* (MOI 10) infiziert, 12 hpi mit IFN- $\gamma$  (100 U/ml) behandelt und bis 48 hpi inkubiert. Unbehandelte, nicht-infizierte Zellen wurden als Kontrollen mitgeführt.

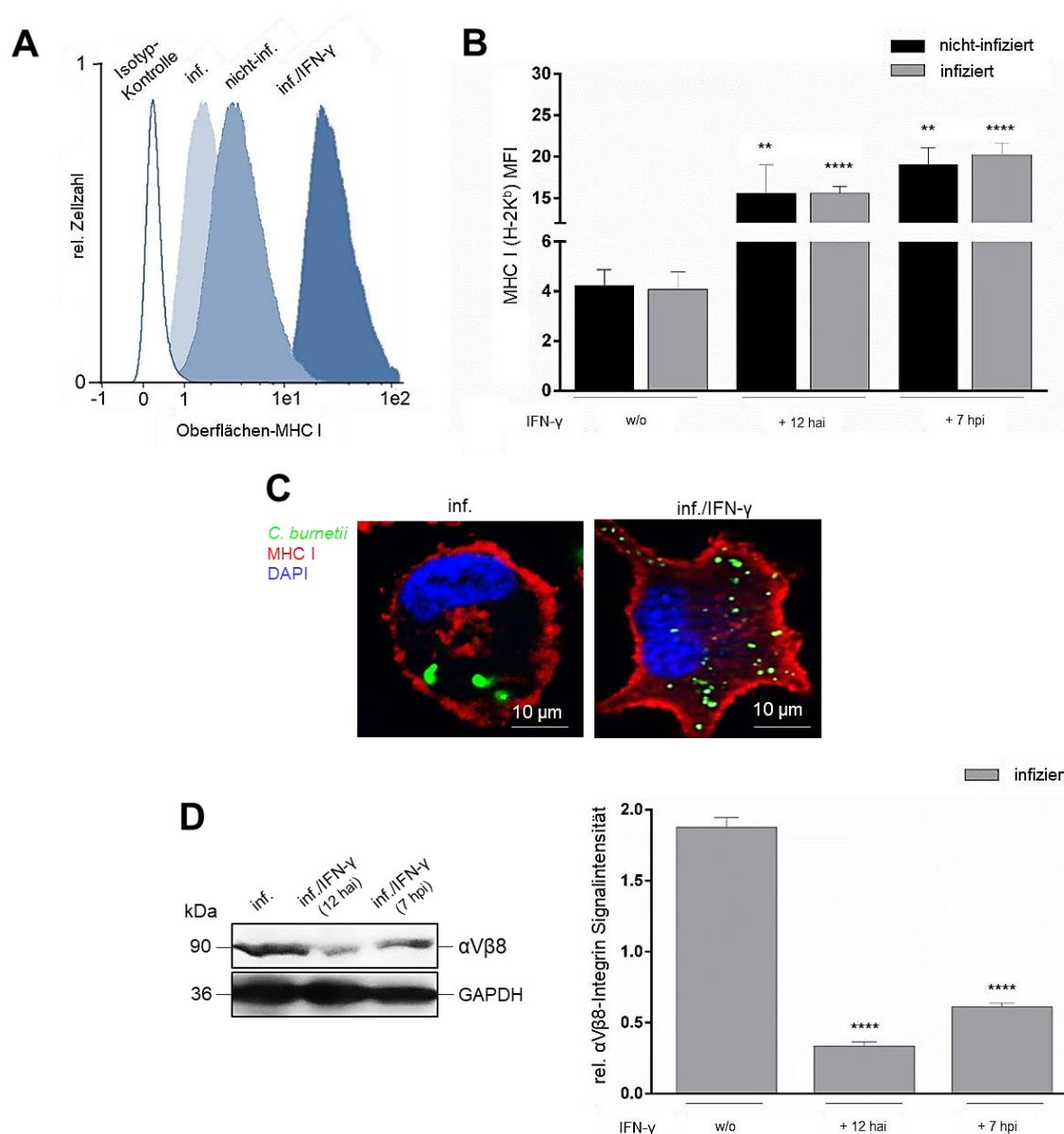


Die Quantifizierung der Bandenintensitäten von MHC I (H-2K<sup>b</sup>) und die Normierung auf GAPDH erfolgten im Rahmen der densitometrischen Analyse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Dargestellt ist die relative MHC I-Signalintensität, für die die infizierte, unbehandelte Kontrolle auf 1 gesetzt wurde. Die statistische Analyse folgt der Beschreibung in Kapitel 3.6 (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (infiziert + IFN- $\gamma$ ); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert + IFN- $\gamma$ ); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (infiziert + IFN- $\gamma$ );  $n=3$ ).

Die Western-Blot-Analyse in Abbildung 4-8 A zeigt die Untersuchung zur MHC I-Expression *C. burnetii*-infizierter DCs in Anwesenheit von IFN- $\gamma$ . Die Grundexpression wurde mittels un behandelter Zellen bestimmt. In Anwesenheit von IFN- $\gamma$  ist eine deutliche MHC I-Erhöhung (Faktor 2-3) für nicht-infizierte und infizierte DCs detektierbar. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass IFN- $\gamma$  eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Antigenpräsentation spielt. Zur Identifizierung des relevanten Signalweges dieser Interferon-stimulierten MHC I-Induktion wurde im Anschluss ein Inhibitionsexperiment zur Blockierung verschiedener IFN- $\gamma$ -aktivierbarer Kinase-Signalwege<sup>388-390</sup> durchgeführt (Western-Blot Analyse, Abb. 4-8 B). Hierzu wurden ERK1/2, p38 und NF- $\kappa$ B pharmakologisch inhibiert und die MHC I-Expression infizierter IFN- $\gamma$ -stimulierter Zellen mittels Western-Blot analysiert. Unter Blockierung von NF- $\kappa$ B wurde eine deutliche Reduktion (75%) des MHC I-Levels gemessen, während die Inhibition von ERK1/2 und p38 zu einer marginalen MHC I-Steigerung (25%) führte. Die Analysen weisen somit darauf hin, dass der Signalweg der IFN- $\gamma$ -stimulierten MHC I-Antigenpräsentation infizierter DCs maßgeblich über NF- $\kappa$ B vermittelt wird, während die beiden MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 die IFN- $\gamma$ -vermittelte MHC I-Induktion im Kontext einer Coxiellen-Infektion offensichtlich negativ beeinflussen.

#### 4.4.2 IFN- $\gamma$ -Einfluss auf Antigenpräsentation und $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrin-Expression infizierter DCs

Die obigen Experimente belegen, dass die IFN- $\gamma$ -Anwesenheit zu einer Wiederherstellung induzierter MHC I-Expression in Coxiellen-infizierten DCs führt. In nachfolgend beschriebenen Studien wurde daher eine detaillierte Analyse der Einflussnahme von IFN- $\gamma$  auf die MHC I-vermittelte Antigenpräsentation sowie die TGF- $\beta$ -regulierende Expression des  $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrins infizierter DCs durchgeführt.



#### Abbildung 4-9: Auswirkungen der IFN-γ-Anwesenheit auf die Antigenpräsentation und αVβ8-Integrin-Expression *C. burnetii*-infizierter DCs

**(A)** Repräsentative Durchflusszytometrie der Oberflächen-MHC I (H-2K<sup>b</sup>)-Expression *C. burnetii*-infizierter DCs in An- und Abwesenheit von IFN-γ. *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden in An- und Abwesenheit von IFN-γ (100 U/ml, 7 hpi) für 72 h inkubiert. Isotyp- und nicht-infizierte Kontrollen wurden mitgeführt. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität des Oberflächen-MHC I. **(B)** Quantifizierung der MHC I (H-2K<sup>b</sup>)-Oberflächenexpression während der *C. burnetii*-Infektion in DCs in An- und Abwesenheit von IFN-γ. Nicht-infizierte und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs mit und ohne IFN-γ-Zugabe (100 U/ml, 12 hai, 7 hpi) wurden 72 hpi auf ihre Oberflächen-MHC I-Expression hin durchflusszytometrisch untersucht. Gezeigt sind die Ergebnisse als MFI aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. Die statistische Analyse ist in Kapitel 3.6 beschrieben (\*\*p < 0,01 vs. Kontrolle (nicht-infiziert ohne Behandlung); \*\*\*\*p < 0,0001 vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung); n=3). **(C)** Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der MHC I-Oberflächenexpression infizierter DCs mit und ohne IFN-γ-Zugabe. *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden in An- und Abwesenheit von IFN-γ (100 U/ml, 7 hpi) 72 h kultiviert. Anschließend erfolgte eine Oberflächenanfärbung mit einem MHC I (H-2K<sup>b</sup>)-Antikörper (rot) und eine nachträgliche intrazelluläre Anfärbung von *C. burnetii* mit dem α-CoxII Antikörper (grün). Die DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). **(D)** zeigt die Western-Blot-Analyse zur αVβ8-Integrin-Oberflächenexpression infizierter DCs in Anwesenheit von IFN-γ. *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden mit IFN-γ behandelt (100 U/ml, 12 hai, 7 hpi) und für 72 h kultiviert. Nicht-infizierte Zellen wurden als Kontrollen mitgeführt. Es folgte die densitometrische Analyse der αVβ8-Integrin-Signalintensität, für die die Bandenintensitäten quantifiziert und auf GAPDH als Ladekontrolle normiert wurden. Gezeigt ist die relative αVβ8-Integrin-Signalintensität aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung, die auf die nicht-infizierte Kontrolle normiert wurde. Die statistische Aufbereitung erfolgte wie in Kapitel 3.6 beschrieben (\*\*\*\*p < 0,0001 vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung); n=3).

Die repräsentative Durchflusszytometrie in Abbildung 4-9 A zeigt die deutliche Ausprägung der MHC I-Oberflächenexpression IFN- $\gamma$ -stimulierter infizierter DCs. Die quantitative Auswertung ergab, dass eine IFN- $\gamma$ -Zugabe sowohl vor (*hours ante infection*, hai) als auch nach der Infektion (hpi) eine vergleichbar hohe MHC I-Induktion (um einen Faktor 4-5) bewirkt (Abb. 4-9 B). Die korrespondierende Immunfluoreszenz in Abbildung 4-9 C belegt die IFN- $\gamma$ -vermittelte Induktion von Oberflächen-MHC I (rot) für Coxiellen (grün)-infizierte DCs. Aus der Gesamtheit dieser Ergebnisse lässt sich somit ableiten, dass IFN- $\gamma$  die Suppression der MHC I-Expression und -Präsentation infizierter DCs in effizienter Weise aufhebt. Um zu untersuchen, wie IFN- $\gamma$  der MHC I-Suppression entgegenwirkt, wurde sein Einfluss auf die Expression des TGF- $\beta$ -aktivierenden  $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrins in infizierten DCs näher untersucht. Die Western-Blot-Analyse in Abbildung 4-9 D zeigt, dass die IFN- $\gamma$ -Anwesenheit eine ausgeprägte Reduktion des  $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrin-Levels (50-75%) infizierter DCs hervorruft. Dies weist darauf hin, dass IFN- $\gamma$  die durch TGF- $\beta$  ausgelöste MHC I-Suppression Coxiellen-infizierter DCs mittels Reduktion des  $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrins aufhebt und so eine induzierte Antigenpräsentation von Peptidantigenen ermöglicht.

Zugangsnr.	Gen-Name	Protein	Peptid-Sequenz	Ion score
Q83D13	CBU_0933	Transport-Permease-Protein	LAGLINAI	31
Q83CG3	CBU_1155	N-(5'-Phosphoribosyl)Anthranilat-Isomerase	LGANVIPVL	27

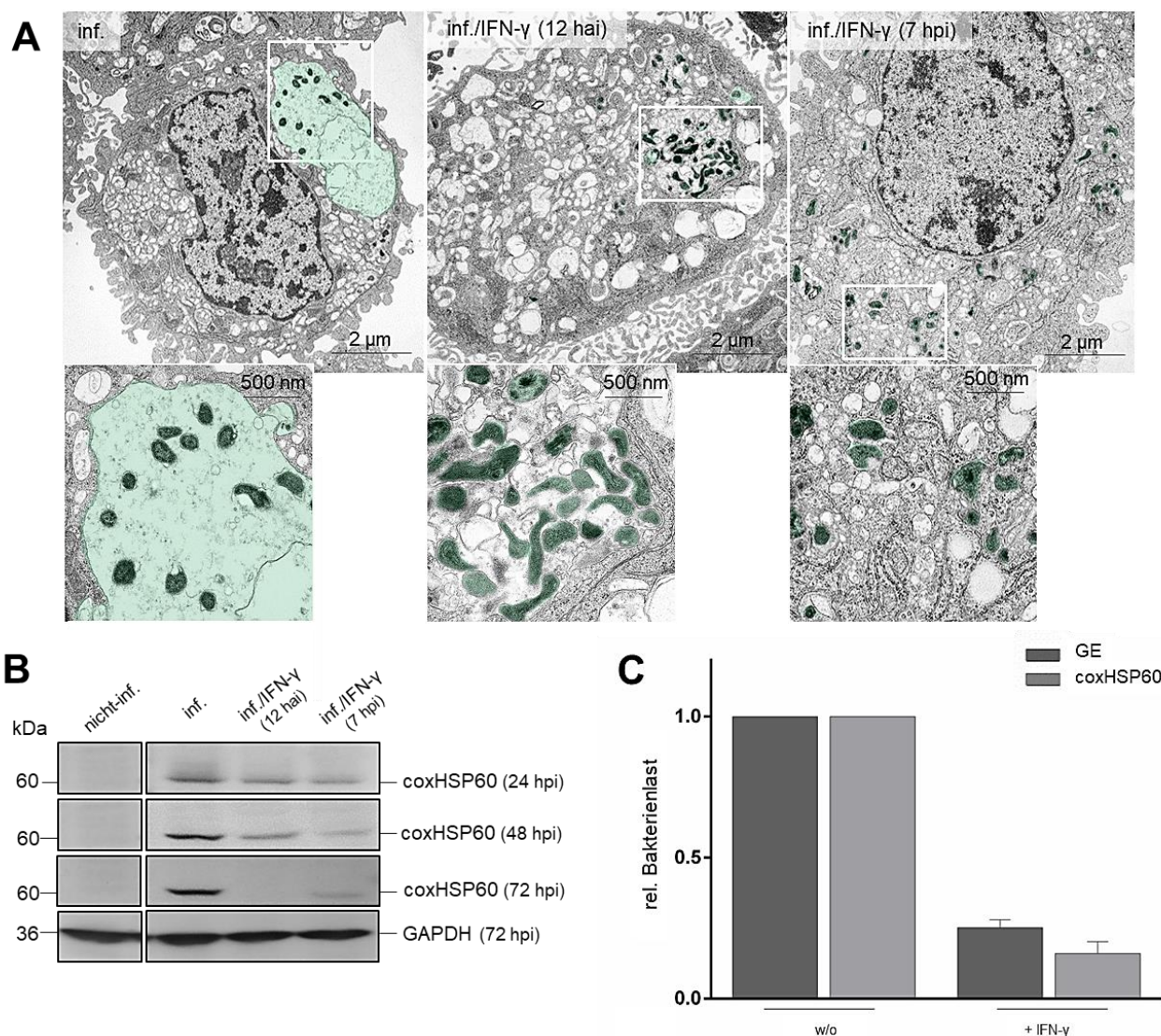
**Tabelle 4-1: Identifizierte MHC I -Peptidantigene aus *C. burnetii***

*C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden 72 h in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml) kultiviert. Anschließend wurden die MHC I-Moleküle isoliert und in der Massenspektroskopie analysiert. Nicht-infizierte und unbehandelte Proben wurden als Kontrollen mitgeführt. Für die Identifizierung der MHC I-präsentierten Peptidantigene wurden nur Peptide mit einem Ion score > 25 in die Analyse mit einbezogen. Die Peptide wurden über den NetMHCpan-Server auf eine etwaige Bindungsaffinität zu MHC I (H-2K<sup>b</sup>) überprüft und mit Hilfe von Uniprot-Datenbanken (zu *Coxiella burnetii* NMII RSA 439 und *mus musculus*) identifiziert.

Basierend auf der IFN- $\gamma$ -stimulierten MHC I-Antigenpräsentation infizierter DCs wurde untersucht, ob und welche pathogenassoziierten Antigene im Kontext von MHC I-Molekülen präsentiert werden. Hierzu wurden Peptid-beladene MHC-Moleküle IFN- $\gamma$ -stimulierter infizierter DCs mittels saurer Peptidisolierung isoliert (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.4.5). Als Vergleichskontrolle dienten nicht-infizierte und infizierte DCs ohne entsprechende Interferon-Behandlung. Nach massenspektroskopischer Aufbereitung der Eluate wurden die gefundenen Peptide bezüglich ihrer IFN- $\gamma$ -Induzierbarkeit, ihres spezifischen *C. burnetii*-Ursprungs sowie ihrer MHC I-Bindungsseigenschaften hin überprüft. Nach entsprechender bioinformatischer Evaluierung konnten zwei Coxiellen-spezifische MHC I-Bindungspeptide identifiziert werden (Tabelle 4-1). Hierbei handelt es sich um ein 8- sowie ein 9-mer-Peptid, welche von dem MHC I-Allel-Produkt H-2K<sup>b</sup> gebunden/präsentiert werden und der Transport-Permease (CBU\_0933) sowie einem multifunktionalen Fusionsprotein (CBU\_1155) von *C. burnetii* entstammen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in Coxiellen-infizierten DCs die IFN- $\gamma$ -vermittelte Induktion der MHC I-Oberflächenexpression mit einer funktionalen Präsentation pathogener Peptidantigene verbunden ist.

#### 4.4.3 IFN- $\gamma$ -Einfluss auf Etablierung und Infektiosität von *C. burnetii* in DCs

Durch die bisherigen Untersuchungen konnten zelluläre Prozesse infizierter DCs unter Einflussnahme von IFN- $\gamma$  beschrieben werden. Um nun zu untersuchen, ob und welchen Einfluss die Interferon-Behandlung der DCs auf das intrazelluläre Pathogen und die von ihm gebildeten Vakuolen (CCVs) hat, wurden elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt.

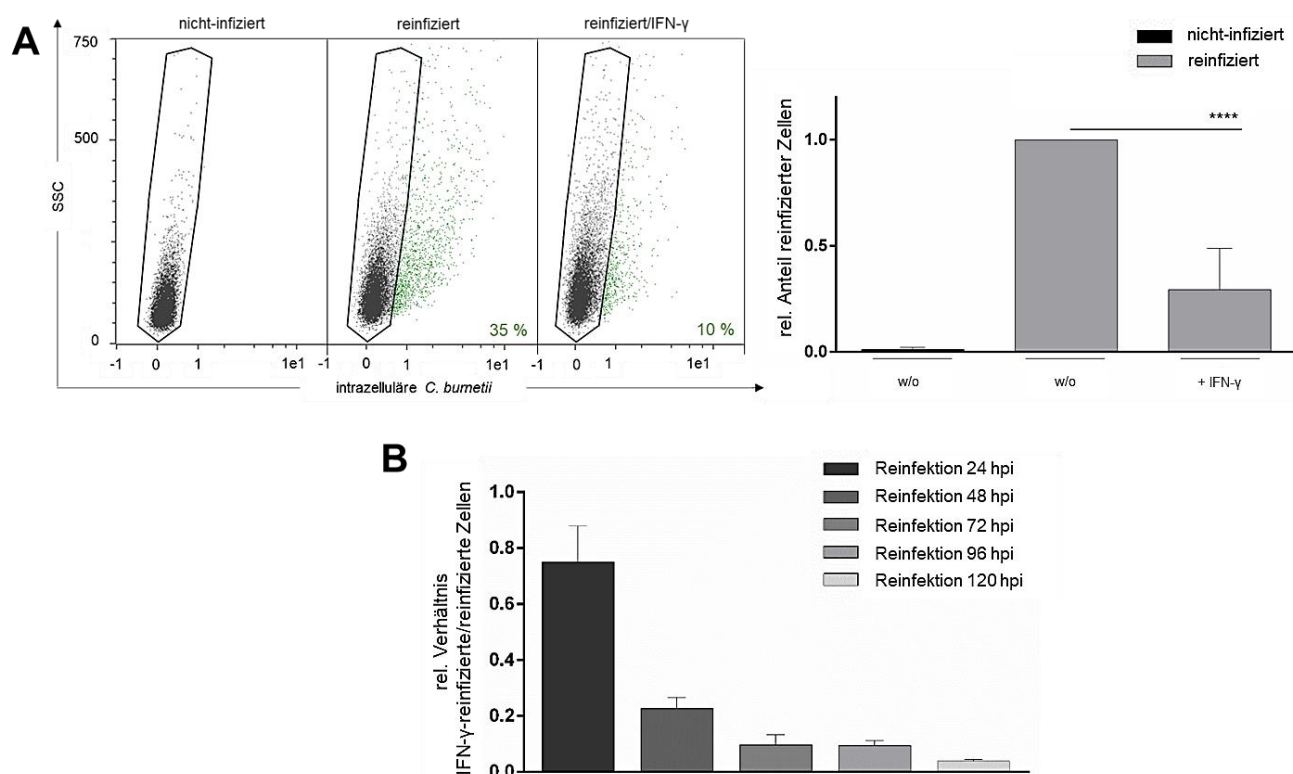


**Abbildung 4-10: Charakterisierung der *C. burnetii*-Infektion in Anwesenheit von IFN- $\gamma$**

**(A)** Elektronenmikroskopische Aufnahmen *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 12 hai, 7 hpi) 72 hpi. Unten aufgeführt ist jeweils eine vergrößerte Ansicht des oben weiß-eingerahmten Bildausschnitts. Coxiellen-Strukturen wurden nachträglich grün eingefärbt. **(B)** Western-Blot-Analyse eines Infektionsverlaufes in DCs in Anwesenheit von IFN- $\gamma$ . *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden für 24-72 h mit und ohne Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 12 hai, 7 hpi) kultiviert. Nicht-infizierte Zellen wurden mitgeführt. GAPDH diente als Ladekontrolle. **(C)** Vergleichende Analyse der GE und der coxHSP60-Expression in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$ . Für die Bestimmung der GE wurden *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs mit und ohne Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) für 72 h kultiviert. Anschließend erfolgte die gDNA-Isolation und die Bestimmung der GE über qPCR wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben. Für die Bestimmung der coxHSP60-Expression wurde ein identischer Versuchsansatz verwendet. Nach 72 h folgte die Western-Blot-Analyse mit densitometrischer Auswertung der coxHSP60-Bandenintensität unter Normalisierung auf die Ladekontrolle GAPDH. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse aus je drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung als relative Bakterienlast.



Die in Abbildung 4-10 A dargestellte Elektronenmikroskopie zeigt, welche Auswirkungen IFN- $\gamma$  auf die Etablierung und das Wachstum der Bakterien in DCs hat. Links ist die DC-Infektion ohne Interferon gezeigt, wobei die Ausbildung einer intakten CCV deutlich zu erkennen ist. Mittig ist die Infektion nach vorheriger Zugabe von IFN- $\gamma$  (12 hai) dargestellt. In diesem Fall wurden zytosolisch vorliegende Bakterien ohne erkennbare CCV und/oder die Ausbildung deformierter, kleiner CCVs beobachtet. Rechts findet sich die DC-Infektion unter nachträglicher Zugabe des Interferons. Unter diesen Bedingungen konnten keine CCVs, sondern nur vereinzelt Bakterien im Zytosol detektiert werden. Diese Befunde belegen, dass die Ausbildung der CCV sowie die bakterielle Vermehrung durch IFN- $\gamma$  stark beeinträchtigt sind. Aufbauend auf diesen Beobachtungen wurde der Verlauf der Coxiellen-Infektion unter IFN- $\gamma$ -Einfluss mittels coxHSP60-Western-Blot-Analyse untersucht. Abbildung 4-10 B zeigt, dass IFN- $\gamma$  einen deutlich negativen Effekt auf die coxHSP60-Ausprägung hat und sich dieser Effekt im weiteren Zeitverlauf der Zellkultivierung verstärkt. In einer kombinierten Analyse zur Bestimmung der GE und des coxHSP60-Levels (mittels qPCR und Western-Blot) zeigte sich, dass sich GEs äquivalent zu coxHSP60 verhalten und somit beide Analysemethoden vergleichbare Auskunft über die jeweilige Bakterienlast infizierter DCs geben. Unter Verwendung beider Methoden zeigte sich in IFN- $\gamma$ -vor- und -nachbehandelten DCs eine bakterielle Reduktion um 75%. Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass durch Anwesenheit von IFN- $\gamma$  die Coxiellen-Infektion von DCs stark beeinträchtigt ist.



**Abbildung 4-11: Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die Reinfektiosität von *C. burnetii***

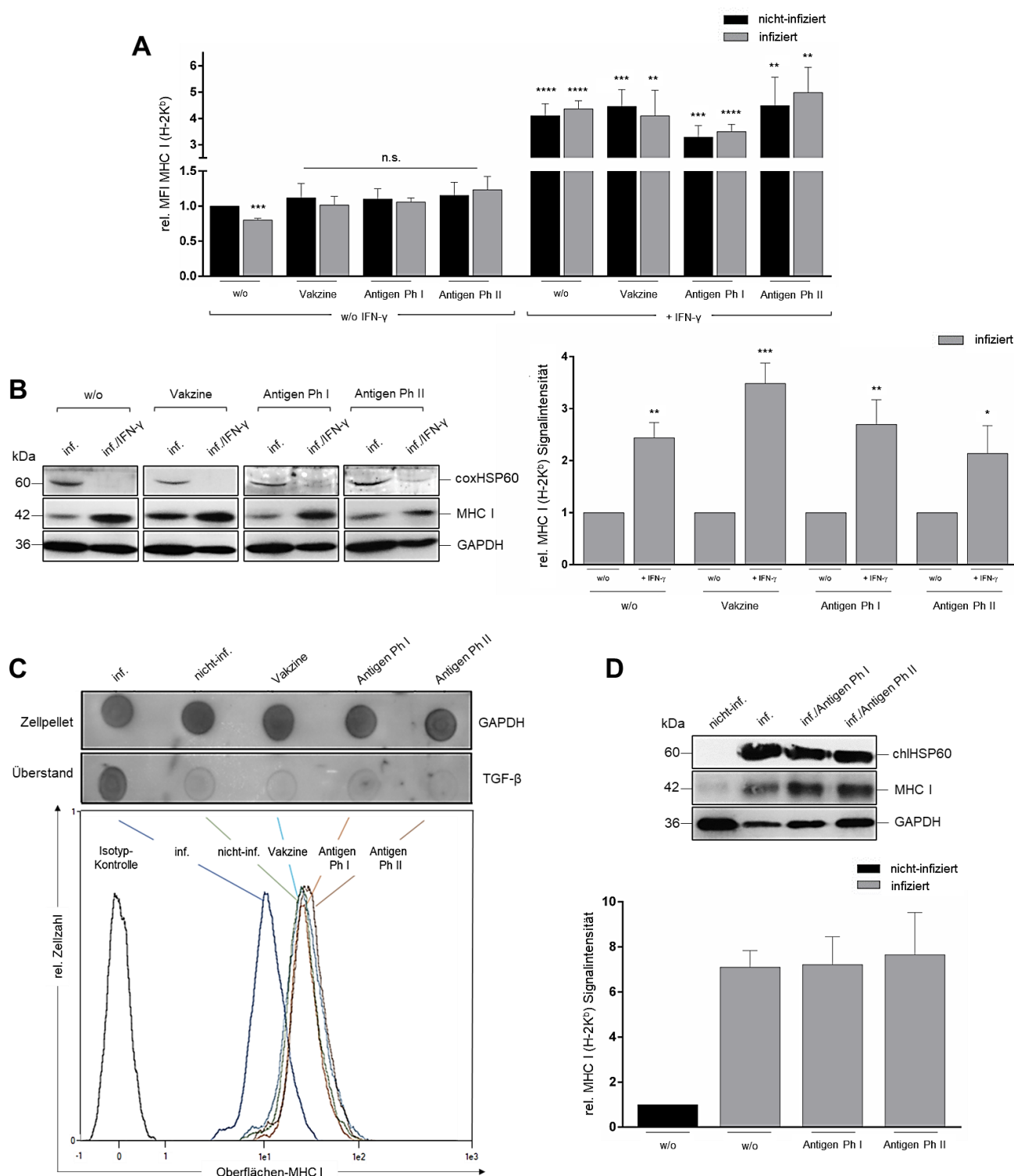
**(A)** Durchflusszytometrie der Reinfektiosität von *C. burnetii* nach Kultivierung in DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$ . JAWS II-DCs wurden mit *C. burnetii* (MOI 10) infiziert und 7 hpi mit IFN- $\gamma$  (100 U/ml) behandelt oder unbehandelt weiter kultiviert. 72 hpi wurden die Bakterien mittels *syringe releasing* freigesetzt und für eine Infektion von Reporterzellen (L929-Fibroblasten) verwendet. Nach 72 h wurde die Fähigkeit zur Reinfektion durchflusszytometrisch über den Nachweis infizierter Reporterzellen untersucht. Für die Anfärbung wurde der  $\alpha$ -CoxII Antikörper eingesetzt. Nicht-infizierte sowie *C. burnetii* (MOI 10, 72 hpi)-infizierte Reporterzellen wurden als Kontrollen mitgeführt. Gezeigt ist der relative Anteil infizierter Reporterzellen, bei dem die reinfizierten, nicht-behandelten Kontrollen auf 1 gesetzt wurden. Die statistische

Analyse aus neun unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung erfolgte wie in Kapitel 3.6 dargelegt (\*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (reinfiziert ohne Behandlung);  $n=9$ ). **(B)** zeigt eine Reinfektionskinetik. JAWS II-DCs wurden mit Coxiellen (MOI 10) infiziert und für 24-120 hpi in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) kultiviert. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die Bakterien über das *syringe releasing* freigesetzt und für die Reinfektion von Reporterzellen (L929-Fibroblasten) genutzt. Der Anteil der infizierten Reporterzellen konnte nach 72 h durchflusszytometrisch unter Verwendung des  $\alpha$ -CoxII Antikörpers bestimmt werden. Dargestellt ist das relative Verhältnis von IFN- $\gamma$ -reinfizierten Reporterzellen (vorherige Kultivierung in Anwesenheit von IFN- $\gamma$ ) zu reinfizierten Reporterzellen (vorherige Kultivierung in Abwesenheit von IFN- $\gamma$ ). Gezeigt sind die Resultate aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung.

Parallel zur Elektronenmikroskopie der CCVs und Bestimmung der Bakterienlast wurden Reinfektionsuntersuchungen durchgeführt. Wie die Durchflusszytometrie in Abbildung 4-11 A belegt, sinkt die Reinfektiosität der Bakterien in Anwesenheit des Interferons um 50-75%. Eine zusätzlich durchgeführte Kinetik (24-120 hpi) in Abbildung 4-11 B zeigt das Verhältnis zwischen reinfizierten Reporterzellen nach IFN- $\gamma$ -Vorbehandlung infizierter DCs und reinfizierten Kontrollreporterzellen (ohne entsprechende Interferon-Zugabe). Die Analysen ergaben, dass die Reinfektiosität der aus DCs stammenden Coxiellen entsprechend der Dauer der IFN- $\gamma$ -Verabreichung abnahm. Zusammenfassend weisen diese Studien darauf hin, dass Interferon-behandelte DCs in der Lage sind, nach Aufnahme des Pathogens die Etablierung/Vermehrung der Coxiellen in negativer Weise zu beeinflussen.

#### 4.4.4 Einflussnahme von Ph I- und II-LPS bei MHC I-Suppression *C. burnetii*-infizierter DCs

In Übereinstimmung mit den hier durchgeführten Arbeiten weisen vorausgegangene Studien anderer Arbeitsgruppen darauf hin, dass bei der Infektion mit Ph I-*C. burnetii* eine funktionale DC-Reifung mit entsprechender Zyto-/Chemokinproduktion ausbleibt<sup>41</sup>. Obschon die verantwortlichen Subversionsmechanismen völlig unklar sind, wurde spekuliert, dass hier eventuell Ph I-LPS als Virulenzfaktor eine blockierende Wirkung auf infizierte DCs hat<sup>41</sup>. Zudem ist bis heute ungewiss, ob und in welchem Maße das LPS der Ph II-Coxiellen eine vergleichbare Wirkung auf infizierte DCs haben könnte. So wäre durchaus denkbar, dass die durch autokrines TGF- $\beta$  ausgelöste Immunsuppression infizierter DCs (siehe Abb. 4-6) über Coxiellen-LPS zusätzlich unterstützt oder die IFN- $\gamma$ -vermittelte (Re)Aktivierung infizierter DCs durch Coxiellen-LPS beeinträchtigt wird. Um diese beiden möglichen Aspekte näher zu untersuchen, wurde der Einfluss von Ph I- und II-LPS auf die reifungsabhängige MHC I-Expression infizierter DCs analysiert. In einer vergleichenden Untersuchung wurde nicht-infizierten und infizierten DCs zusätzlich Coxiellen-LPS in aufgereinigter Form (Antigen, Ph I und II) oder als inaktivierte Vakzine (Vakzine, Ph I) zugesetzt.



**Abbildung 4-12: Einfluss von Phase I- und II-Coxiellen-LPS auf nicht-infizierte und infizierte DCs**

**(A)** Durchflusszytometrie des Einflusses von Phase I (Ph I)- und Phase II (Ph II)-Coxiellen-Lipopolysaccharid (coxLPS) auf die MHC I (H-2K<sup>b</sup>)-Oberflächenexpression von DCs. Nicht-infizierte und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) und unter Zugabe von Ph I (Vakzine Coxevac<sup>®</sup>, 72 QF U/ml, dialysiert & Ph I Antigen 1:100, dialysiert)- und Ph II (Ph II Antigen 1:100, dialysiert)-coxLPS kultiviert. 72 hpi wurden die Zellen auf ihre Oberflächen-MHC I (H-2K<sup>b</sup>)-Expression hin durchflusszytometrisch untersucht. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Für die Darstellung der relativen MFI wurden die nicht-infizierten Kontrollzellen auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.6 beschrieben (n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle (nicht-infiziert/infiziert ohne Behandlung); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert/infiziert ohne Behandlung); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert/infiziert ohne Behandlung); \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert/infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(B)** Western-Blot-Analyse der MHC I (H-2K<sup>b</sup>)-Expression von infizierten DCs unter Zugabe von Ph I- und Ph II-coxLPS. *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden in An- und Abwesenheit von Ph I (Vakzine Coxevac<sup>®</sup>, 72 QF U/ml, dialysiert & Ph I Antigen 1:100, dialysiert)- und Ph II (Ph II Antigen 1:100, dialysiert)-coxLPS sowie IFN- $\gamma$

(100 U/ml, 7 hpi) für 72 h kultiviert. Für die densitometrische Auswertung wurde die Bandenintensität von MHC I (H-2K<sup>b</sup>) quantifiziert und auf die Ladekontrolle GAPDH normiert. Für die Darstellung wurden die unbehandelten Kontrollen für jeden Ansatz auf 1 gesetzt. Die statistische Analyse, siehe Kapitel 3.6, wurde auf Basis von drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung durchgeführt (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(C)** Immuno-Dotblot-Analyse zur Detektion der TGF- $\beta$ -Ausschüttung durch DCs. Kulturüberstände Coxiellen (MOI 10)-infizierter und LPS-behandelter (Ph I & Ph II Antigen, 1:100, dialysiert & Vakzine Coxevac<sup>®</sup>, 72 QF U/ml, dialysiert) JAWS II-DC-Kulturen wurden nach 72 h Inkubation geerntet, auf Nitrozellulose aufgetragen und mittels TGF- $\beta$ -Antikörper analysiert. Zur Kontrolle erfolgte für korrespondierende Zelllysate eine GAPDH-Anfärbung. In einem parallelen Ansatz wurden infizierte und LPS-behandelte DCs mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung eines anti-H-2K<sup>b</sup>-Antikörpers auf Oberflächen-MHC I hin analysiert. Eine mitgeführte Isotypanfärbung diente als Negativkontrolle. **(D)** Western-Blot-Analyse der Reifung von Chlamydien (MOI 10)-infizierten DCs in An- und Abwesenheit von cox-LPS Ph I (Antigen 1:100 dialysiert, 12 hai) und Ph II (Antigen 1:100, dialysiert, 12 hai) nach 48 h Kultivierung. Für die densitometrische Auswertung wurde die Bandenintensität von MHC I (H-2K<sup>b</sup>) quantifiziert und auf die Ladekontrolle GAPDH normiert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Versuchsansatz  $\pm$  Standardabweichung auf Basis dreier unterschiedlicher Expositionen.

Die in Abbildung 4-12 A dargestellte Durchflusszytometrie zeigt, dass die Anwesenheit von Ph I- oder II-LPS keinen alleinigen oder zusätzlichen negativen Effekt auf die gemessenen MHC I-Oberflächenexpression hat. Dies gilt für infizierte und nicht-infizierte DCs und lässt vermuten, dass die Anwesenheit von Coxiellen-LPS (unabhängig von der LPS-Phasenvariation) für die hier beobachtete Reifungsblockierung infizierter DCs keine oder nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt. Diese Annahme wird wiederum dadurch bestätigt, dass weder Ph I- noch II-LPS einen detektierbaren Einfluss auf die IFN- $\gamma$ -induzierte MHC I-Expression infizierter DCs nimmt. Der Anstieg der MHC I-Oberflächenexpression lag bei allen untersuchten Ansätzen bei  $\leq 5$ . Korrespondierende Untersuchungen zur Bakterienlast und MHC I-Gesamtausprägung (Abb. 4-12 B) ergaben zudem eine starke, LPS-unabhängige Reduktion der Coxiellen-Infektion IFN- $\gamma$ -stimulierter DCs, die gleichzeitig einen deutlichen Anstieg der Gesamt-MHC I-Expression aufwiesen (Faktor 2-4). Da TLRs als mögliche Subversionstargets des Coxiellen-LPS auf JAWS II-DCs exprimiert werden<sup>391</sup>, jedoch die verschiedenen Coxiellen-LPS-Varianten nicht (wie bei der Coxiellen-Infektion) zu einer MHC I-Reduktion und/oder TGF- $\beta$ -Ausschüttung führten (Abb. 4-12 C), kann festgehalten werden, dass es offensichtlich keine LPS-Beteiligung an der hier gefundenen MHC I-Subversion infizierter DCs gibt. Ferner wurde der Einfluss des Coxiellen-LPS während einer Chlamydien-Infektion, welche eine funktionale DC-Reifung mit erhöhter MHC I-Expression hervorruft<sup>391</sup>, untersucht. Wie die Western-Blot-Analyse in Abbildung 4-12 D zeigt, konnte durch Ph I- oder Ph II-LPS-Zugabe keine Reifungsblockierung anhand der MHC I-Induktion infizierter DCs detektiert werden, was unterstützt, dass die Präsenz des Coxiellen-LPS offensichtlich keinen negativen Einfluss auf die DC-Reifung ausübt. Somit ist die Modulation funktionaler Eigenschaften Coxiellen-infizierter DCs maßgeblich auf das adversative Wirken von TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  und nicht auf die Gegenwart von Coxiellen-LPS als Virulenzfaktor zurückzuführen.

#### 4.5 IFN- $\gamma$ -regulierte Abwehr *C. burnetii*-infizierter DCs

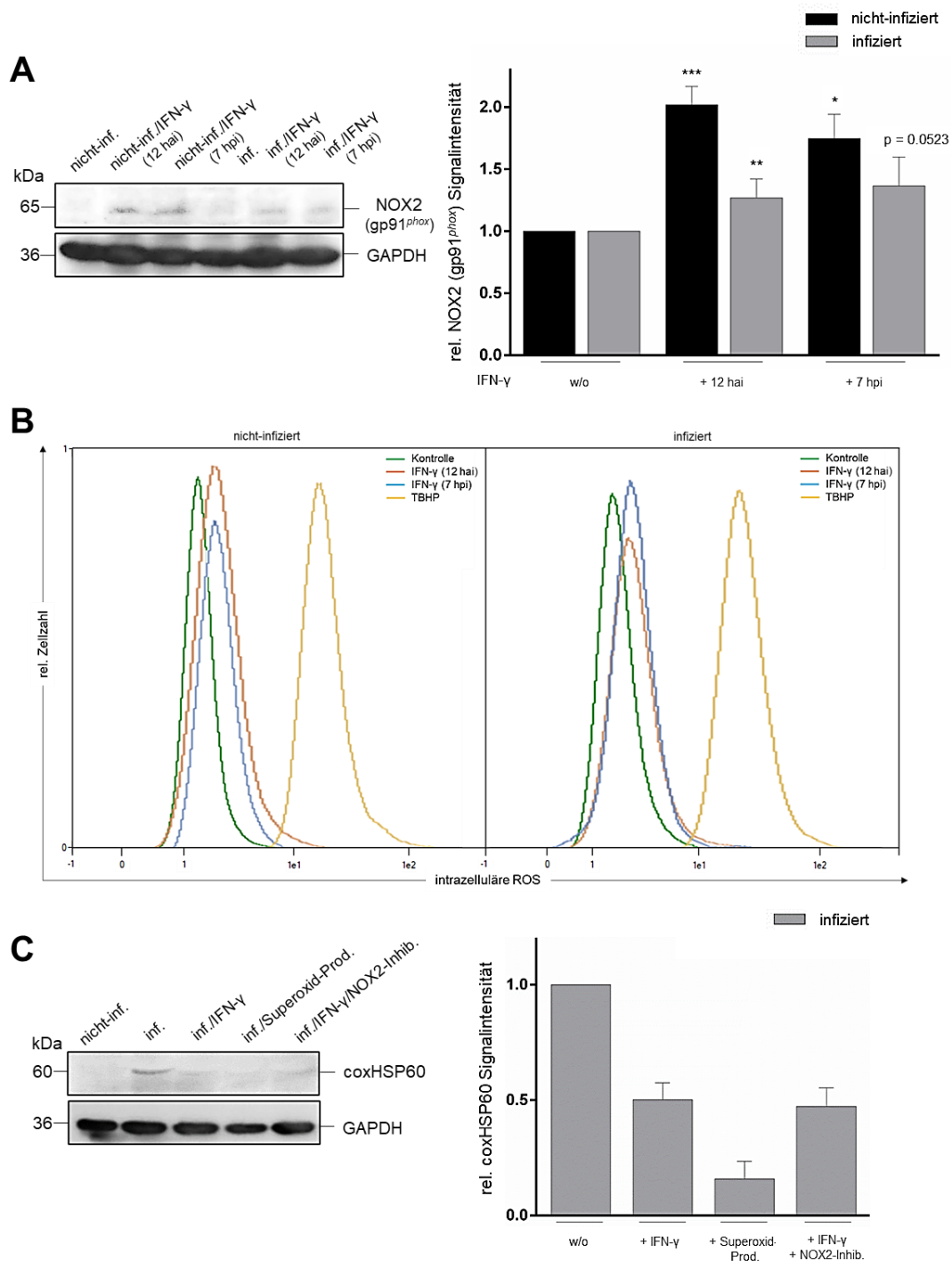
Die bisherigen Studien weisen deutlich auf eine IFN- $\gamma$ -vermittelte Pathogenabwehr infizierter DCs hin. Zur detaillierten Aufklärung dieser zellulären Selbstverteidigung gegen *C. burnetii* wurden



in nachfolgend beschriebenen Studien verschiedene Interferon-vermittelte zellautonome Abwehrmechanismen von DCs untersucht.

#### 4.5.1 Beteiligung von NOX2/ROS bei der anti-*C. burnetii* Abwehr infizierter DCs

In den folgenden Experimenten wurde der Fokus auf die funktionale Bedeutung des IFN- $\gamma$ -induzierbaren NOX2/ROS-Systems für die anti-Coxiellen Abwehr infizierter DCs gesetzt.



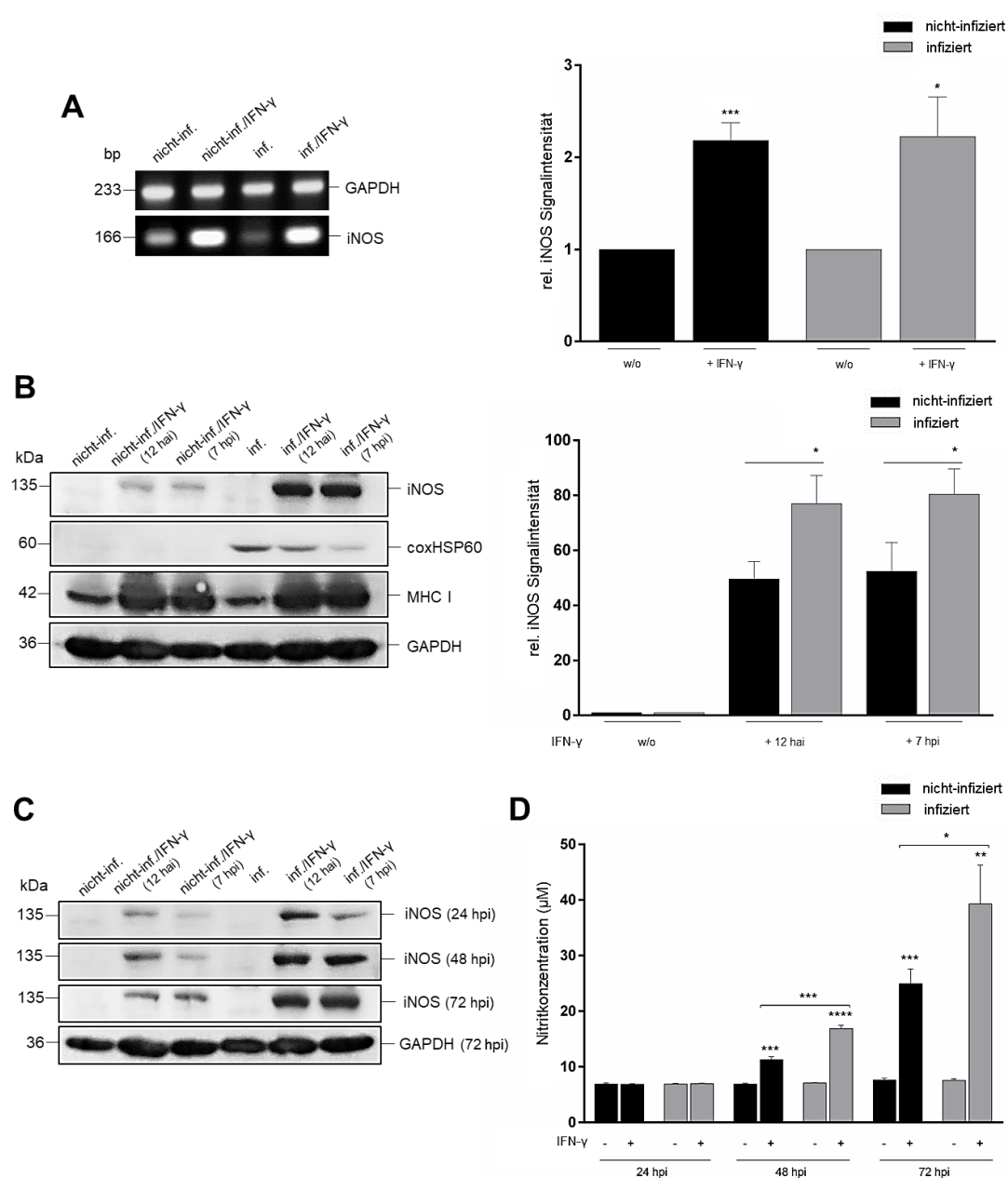
**Abbildung 4-13: Auswirkungen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf die *C. burnetii*-Infektion in DCs**

**(A)** Western-Blot-Analyse der NOX2 (gp91<sup>phox</sup>)-Expression während einer *C. burnetii*-Infektion. Nicht-infizierte und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden unter Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 12 hai, 7 hpi) oder unbehandelt für 72 h kultiviert. Für die densitometrische Analyse wurden die NOX2 (gp91<sup>phox</sup>)-Bandenintensitäten quantifiziert und auf die mitgeführte Ladekontrolle (GAPDH) normiert. Dargestellt ist die relative Signalintensität aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung, für die die unbehandelten Kontrollen (nicht-infiziert & infiziert) auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Analyse ist in Kapitel 3.6 beschrieben (n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung); \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert ohne Behandlung); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(B)** Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer ROS in nicht-infizierten und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierten JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 12 hai, 7 hpi) 72 hpi. Für den Nachweis von ROS wurde das *CellROX<sup>®</sup> Green Reagent* (Life Technologies), wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben, verwendet. Unbehandelte Zellen wurden als Negativ- und TBHP (ROS-Donor)-behandelte Zellen als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität intrazellulärer ROS aus einem Experiment. **(C)** zeigt ein kombiniertes Stimulations- und Inhibitionsexperiment zur Aufklärung des Einflusses von ROS in infizierten DCs. *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden unter Zugabe verschiedener Stimuli (IFN- $\gamma$  [100 U/ml], Hypoxanthin [HX, 250  $\mu$ M]/Xanthinoxidase [XOD, 20 nM] Superoxid-Produktion, 7 hpi) und eines NOX2-Inhibitors (Apocynin, 300  $\mu$ M, 7 hpi) für 72 h inkubiert. Nicht-infizierte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Für die densitometrische Analyse des ROS-Einfluss auf die Coxiellen wurden die Bandenintensitäten von coxHSP60 quantifiziert und auf GAPDH als Ladekontrolle normalisiert. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen *gepoolten* Versuchsansätzen  $\pm$  Standardabweichung auf Basis dreier verschiedener Expositionen. Für die Darstellung wurde die infizierte, unbehandelte Kontrolle auf 1 gesetzt.

Wie die Western-Blot-Analyse in Abbildung 4-13 A zeigt, induziert die IFN- $\gamma$ -Stimulation infizierter DCs nur eine mäßige NOX2 (gp91<sup>phox</sup>)-Expression, mit einer Steigerung der Signalintensität um einen Faktor  $\leq 2$ . Die NOX2-Expressionsrate wurde parallel mit der intrazellulären ROS-Synthese (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.3.7) abgeglichen (Abb. 4-13 B). In der durchgeführten Durchflusszytometrie zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-DCs und der ROS-Donor-Kontrolle nur ein geringer Anteil induzierter ROS-Mengen. Um festzustellen, ob und in welchem Umfang dieser ROS-Anteil Einfluss auf die DC-Infektion nimmt, wurden entsprechende Stimulations-/Inhibitions-Experimente angeschlossen, bei denen ein spezifischer Inhibitor für NOX2 (Apocynin) und ein Superoxid-Produzent (Radikal-Donor, HX/XOD) zum Einsatz kamen. Die in Abbildung 4-13 C dargestellte Immunblot-Analyse infizierter DCs zeigt eine ausgeprägte Reduktion der Bakterienlast (80%) in Anwesenheit von HX/XOD, die mittels coxHSP60 bestimmt wurde. Dies weist darauf hin, dass intrazelluläre Coxiellen sensitiv gegenüber Sauerstoff-Radikalen sind. Jedoch konnte der anti-*C. burnetii*-Effekt von IFN- $\gamma$  nicht durch den NOX2-Inhibitor aufgehoben werden, was wiederum nahelegt, dass trotz vorhandener ROS-Sensitivität intrazellulärer *C. burnetii* NOX2 eine eher untergeordnete Rolle bei der zellulären Selbstverteidigung infizierter DCs spielt.

**4.5.2 Rolle des iNOS/NO-Systems während der *C. burnetii*-Infektion in DCs**

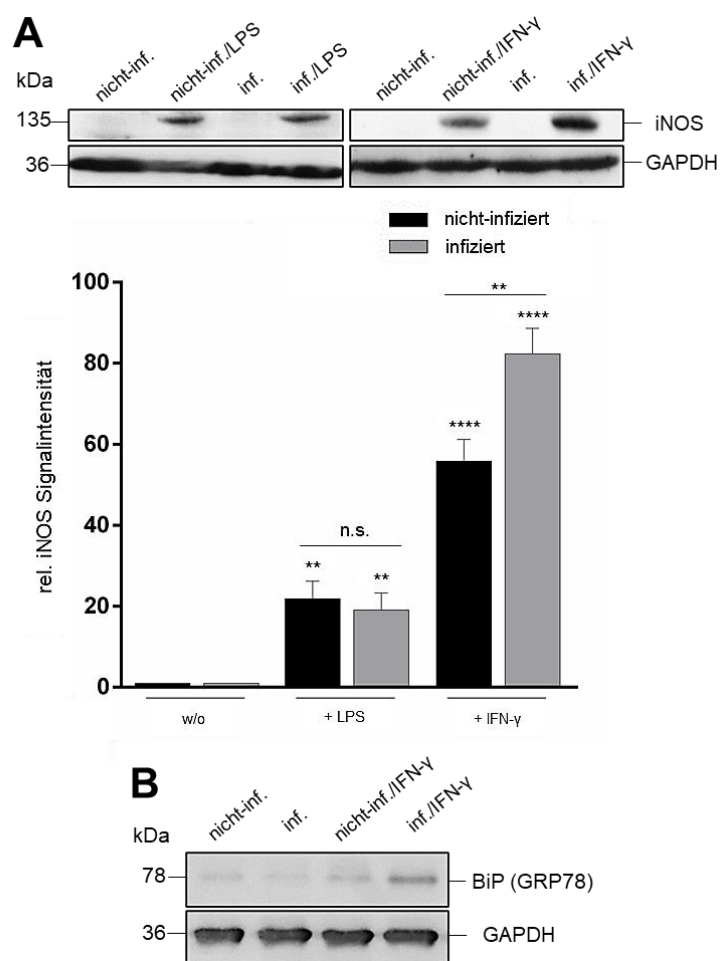
Die zuvor beschriebenen Untersuchungen belegen, dass die Anwesenheit von Radikalen einen negativen Einfluss auf die zelluläre Bakterienlast infizierter Zellen hat. Da jedoch NOX2 offensichtlich nicht maßgeblich an der Eliminierung der Coxiellen-Infektion von DCs beteiligt ist, wurde untersucht, ob dem IFN- $\gamma$ -induzierbaren iNOS/NO-System eine entsprechende Abwehrfunktion zukommt.

4.5.2.1 Charakterisierung des iNOS/NO-Systems in *C. burnetii*-infizierten DCs**Abbildung 4-14: Auswirkungen reaktiver Stickstoffspezies (NO) auf die *C. burnetii*-Infektion in DCs**

**(A)** Semi-quantitative PCR-Analyse der iNOS-Transkriptmenge nicht-infizierter und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi). Murines GAPDH wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Gezeigt ist die relative Signalintensität, bei der die unbehandelten Kontrollen (nicht-infiziert & infiziert) auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Analyse ist in Kapitel 3.6 beschrieben ( $*p < 0,05$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung);  $***p < 0,001$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(B)** Western-Blot-Analyse der iNOS-Expression während einer *C. burnetii*-Infektion. Nicht-infizierte und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden unter Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 12 hai, 7 hpi) oder unbehandelt für 72 h kultiviert. Für die densitometrische Analyse wurden die iNOS-Bandenintensitäten quantifiziert und auf die mitgeführte Ladekontrolle (GAPDH) normiert. Dargestellt ist die relative Signalintensität aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung, für die die unbehandelten Kontrollen (nicht-infiziert & infiziert) auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Analyse ist in Kapitel 3.6 beschrieben ( $*p < 0,05$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert + IFN- $\gamma$ );  $n=3$ ). **(C)** zeigt eine iNOS-Expressionskinetik im Rahmen einer Western-Blot-Analyse. Nicht-infizierte und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden unter Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 12 hai, 7 hpi) oder unbehandelt für 24-72 h kultiviert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. **(D)** Messung der Nitritkonzentration im Verlauf einer *C. burnetii*-Infektion in DCs mittels Griess-Assay. Nicht-infizierte und Coxiellen (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) 24-72 h inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde der Überstand entnommen und im Griess-Assay analysiert. Die statistische Analyse aus drei unabhängigen Experimenten

± Standardabweichung wurde entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.6 durchgeführt (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert + IFN- $\gamma$ , 72 hpi); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert + IFN- $\gamma$ , 48 hpi); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung, 72 hpi); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert ohne Behandlung, 48 hpi & 72 hpi); \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung, 48 hpi);  $n=3$ ).

Die IFN- $\gamma$ -Induzierbarkeit von iNOS wurde mittels semi-quantitativer PCR auf Transkriptionsebene untersucht (Abb. 4-14 A). Dabei zeigte sich, dass nicht-infizierte und *C. burnetii*-infizierte DCs ein basales iNOS-Transkriptionsniveau besitzen, welches in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  um einen Faktor  $\geq 2$  induziert wird. Mittels zusätzlicher Western-Blot-Analyse (Abb. 4-14 B) ergab sich, dass die iNOS-Signalintensität nach IFN- $\gamma$ -Stimulation in infizierten DCs deutlich ausgeprägter war (Faktor 80-90) als in nicht-infizierten DCs (Faktor 50-60). In Anwesenheit von IFN- $\gamma$  zeigte sich entsprechend den vorangegangenen Experimenten (Abb. 4-10) und reziprok zur iNOS-Induktion eine Abnahme der Bakterienlast infizierter DCs. Hier ist anzumerken, dass die IFN- $\gamma$ -Zugabe vor oder nach der Infektion (12 hai/7 hpi) zu einer vergleichbaren iNOS-Induktion führte. Eine weitere Western-Blot-Analyse, in der die iNOS-Expressionskinetik analysiert wurde, ergab, dass die Proteinmenge von iNOS in IFN- $\gamma$ -behandelten DCs in Abhängigkeit der Induktionszeit zunahm und bereits in der frühen Phase durch eine stärkere Ausprägung bei infizierten DCs charakterisiert war. Dies korrelierte mit der gemessenen NO-Ausschüttung im Zellkulturüberstand von DCs, die mittels Griess-Assay (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.4.6) bestimmt wurde (Abb. 4-14 D). Die Resultate der Untersuchungen belegen, dass durch IFN- $\gamma$  das iNOS/NO-System in den untersuchten DCs stark induziert wird. Der Unterschied der iNOS-Induktion nicht-infizierter und infizierter DCs deutet auf einen zusätzlichen Einfluss eines weiteren Faktors hin und wurde nachfolgend näher analysiert.



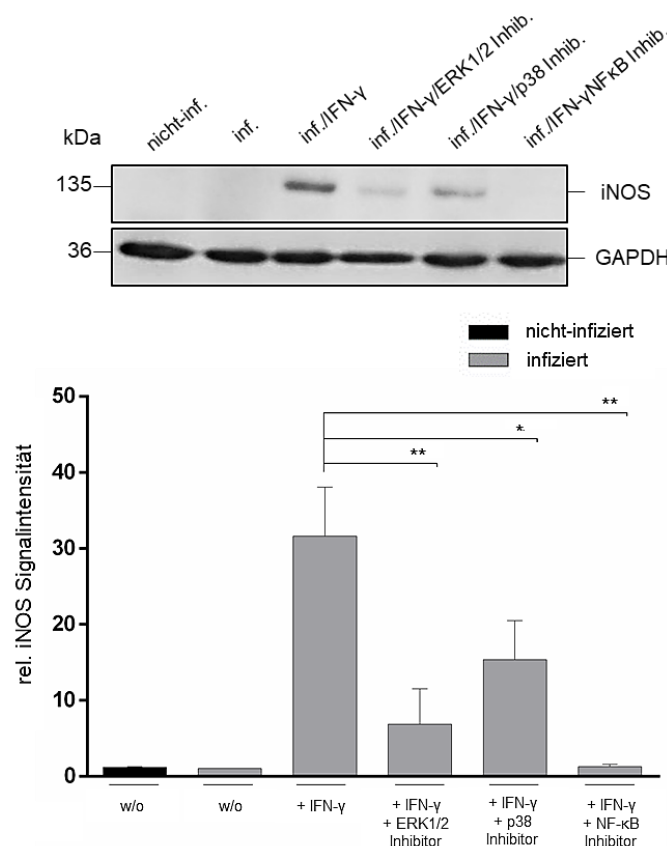
**Abbildung 4-15: Effekt von IFN- $\gamma$  und LPS auf die iNOS-Induktion in nicht-infizierten und infizierten DCs**

**(A)** zeigt die Western-Blot-Analyse nicht-infizierter und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von LPS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 7 hpi) und IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi). Für die densitometrische Analyse wurden die iNOS-Bandenintensitäten quantifiziert und auf die mitgeführte Ladekontrolle GAPDH normiert. Gezeigt sind die Resultate aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Für die Darstellung der relativen Signalintensität wurden die unbehandelten Kontrollen (nicht-infiziert & infiziert) auf 1 gesetzt. Die statistische Analyse ist in Kapitel 3.6 beschrieben (n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle (nicht-infiziert + LPS); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert/infiziert ohne Behandlung); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert + IFN- $\gamma$ ) \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert/infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ).

**(B)** Untersuchung der ER-Stress-Induktion infizierter DCs. Coxiellen (MOI 10)-infizierte und nicht-infizierte JAWS II-DCs wurden in An- oder Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) für 72 h kultiviert. Nach Abschluss der Kultivierung wurden die DCs lysiert und die jeweiligen Lysate mittels Western-Blot analysiert. Die Immunanfärbung mit einem BiP (GRP78)-spezifischen Antikörper diente zum Nachweis einer ER-Stress-Induktion der untersuchten DC-Kulturen. Die GAPDH-Anfärbung fungierte als Ladekontrolle der eingesetzten Zellysate.

Für iNOS ist gezeigt, dass es durch IFN- $\gamma$ , aber auch Endotoxine<sup>392,393</sup> und ausgelösten ER-Zellstress<sup>394-396</sup> induziert wird. ER-Zell-Stress entsteht ebenfalls durch Bakterieninfektionen<sup>397</sup>. Mittels Western-Blot (Abb. 4-15) wurde daher die iNOS-Induktion in nicht-infizierten und Ph II-Coxiellen-infizierten DCs in Anwesenheit von Endotoxinen (LPS) oder IFN- $\gamma$  analysiert. Hierbei zeigte sich unter Endotoxin-Zugabe eine vermehrte iNOS-Expression, die im Falle nicht-infizierter DCs bei  $\leq 50\%$  der IFN- $\gamma$ -vermittelten iNOS-Induktion lag, sich bei infizierten DCs (im Gegensatz zur Interferon-Situation) jedoch nicht weiter steigerte. Die *C. burnetii*-Infektion von DCs kann iNOS also nicht allein stimulieren und hat auch keinen positiven Einfluss auf die LPS-induzierte iNOS-Expression. Letzteres konnte nur für die IFN- $\gamma$ -vermittelte iNOS-Induktion beobachtet werden ( $\geq 30\%$  Anstieg) (Abb. 4-15). Somit lässt sich die zusätzliche Steigerung des iNOS-Effekts bei Interferon und Infektion offensichtlich nicht auf pathogene Komponenten, sondern eher auf

kombinierten ER-Zellstress der Wirtszelle<sup>398</sup> zurückführen, wie er ausgeprägt für IFN- $\gamma$ -Behandlung<sup>399</sup> und schwächer für Coxiellen-Infektionen<sup>400</sup> bereits beschrieben wurde. Hierfür spricht letztlich auch die detektierbare Induktion des wichtigen ER-Stressmarkers BiP (GRP78) in nicht-infizierten (Faktor 1,5) und infizierten DCs (Faktor 3,0) in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  (Abb. 4-15 B). Zusammenfassend lässt sich daraus folgern, dass der durch IFN- $\gamma$  induzierte ER-Zellstress durch Infektion in einer Größenordnung verstärkt wird, die derjenigen der zusätzlichen iNOS-Induktion in dieser Situation entspricht.



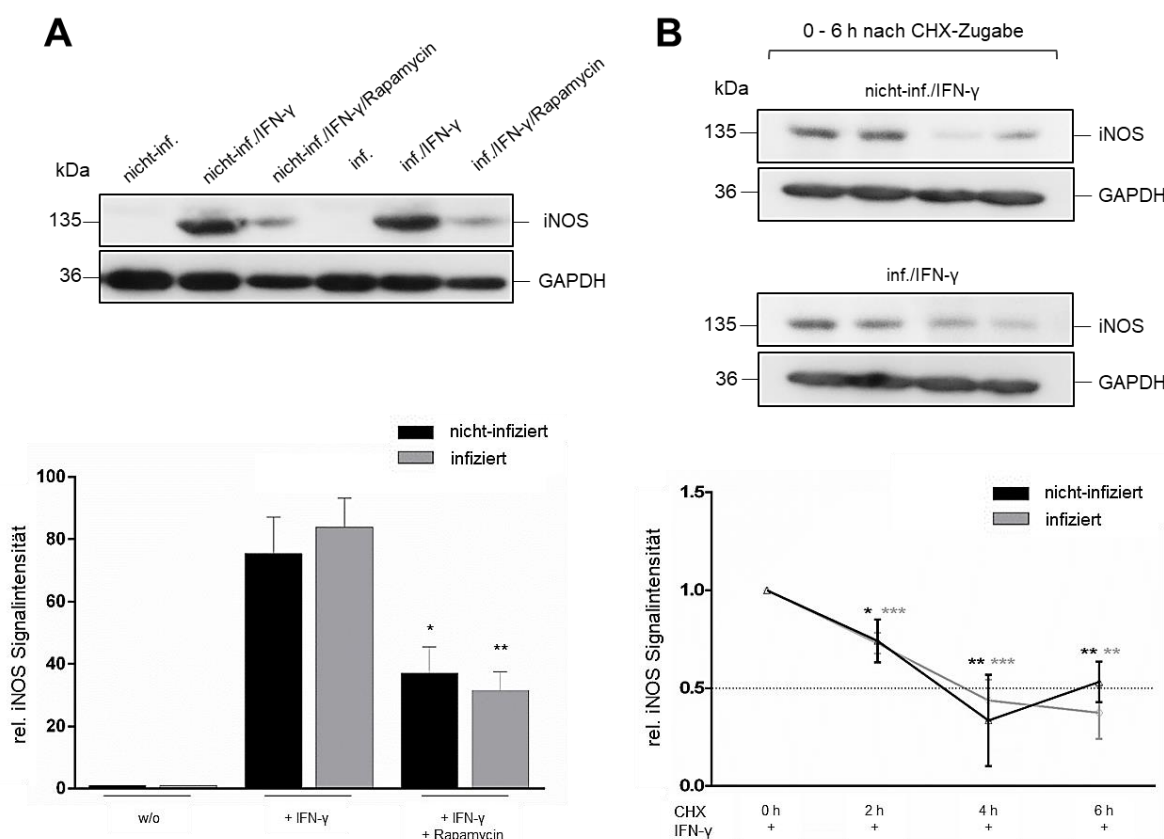
**Abbildung 4-16: Signalvermittlung des iNOS-Effektes in *C. burnetii*-infizierten DCs**

Western-Blot-Analyse zur Identifizierung des relevanten Signalweges zur Vermittlung des iNOS-Effektes in infizierten DCs. JAWS II-DCs wurden für 2 h mit Inhibitoren verschiedener Kinase-Signalwege (ERK1/2 [U0126, 50  $\mu$ M], p38 [SB202490, 10  $\mu$ M], NF- $\kappa$ B [CAPE, 5  $\mu$ M]) inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit *C. burnetii* (MOI 10) infiziert, 12 hpi mit IFN- $\gamma$  (100 U/ml) behandelt und bis 72 hpi inkubiert. Als Kontrollen wurden unbehandelte, nicht-infizierte Zellen mitgeführt. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von iNOS quantifiziert und auf die mitgeführte Ladekontrolle GAPDH normiert. Gezeigt sind drei unabhängige Experimente  $\pm$  Standardabweichung. Dargestellt ist die relative iNOS-Signalintensität, für die die infizierte, unbehandelte Kontrolle auf 1 gesetzt wurde. Die statistische Analyse folgt der Beschreibung in Kapitel 3.6 (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (infiziert + IFN- $\gamma$ ); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert + IFN- $\gamma$ );  $n = 3$ ).

Auf Grundlage der gefundenen IFN- $\gamma$ -vermittelten iNOS-Induktion infizierter DCs wurden nachfolgend die beteiligten zellulären Signalwege analysiert. Es wird angenommen, dass die iNOS-Expression vor allem durch NF- $\kappa$ B<sup>401-404</sup>, p38<sup>405,406</sup> und ERK1/2<sup>406,407</sup> kontrolliert wird. Die Western-Blot-Analyse in Abbildung 4-16, in der die verschiedenen Signalwege infizierter DCs pharmakologisch blockiert wurden, belegt, dass die Inhibition von ERK1/2 und p38 zu einer partiellen Reduktion der iNOS-Expression in den DCs führt (ERK1/2 60-70%; p38 50%). Wird hingegen der NF- $\kappa$ B-Weg blockiert, sinkt iNOS vollständig auf das Expressionsniveau unbehandelter Kontroll-DCs ab. Entsprechend dem angenommenen kooperierenden Induktionseffekt (Abb. 4-15) lässt dieses

Ergebnis vermuten, dass prädominant NF- $\kappa$ B und zu einem gewissen Anteil auch ERK1/2 und p38 an der iNOS-Induktion infizierter DCs beteiligt sind.

Die iNOS-vermittelte NO-Produktion spielt eine essenzielle Rolle bei der Pathogeneliminierung<sup>408</sup>. Jedoch sind die Wirtszellen auch mit den von ihnen produzierten Radikalen selbst konfrontiert. Somit ist für das Zellüberleben eine strikte Kontrolle von iNOS/NO entscheidend<sup>409</sup>. Im Kontext der iNOS-Regulation wird insbesondere dem mTOR-Proteinkomplex eine wichtige funktionale Rolle zugeschrieben<sup>410,411</sup>. In nachfolgenden Untersuchungen wurde daher die mögliche Beteiligung von mTOR an der induzierten iNOS-Expression *C. burnetii*-infizierter DCs untersucht.



**Abbildung 4-17: Stabilität und Abbau von iNOS während der *C. burnetii*-Infektion in DCs**

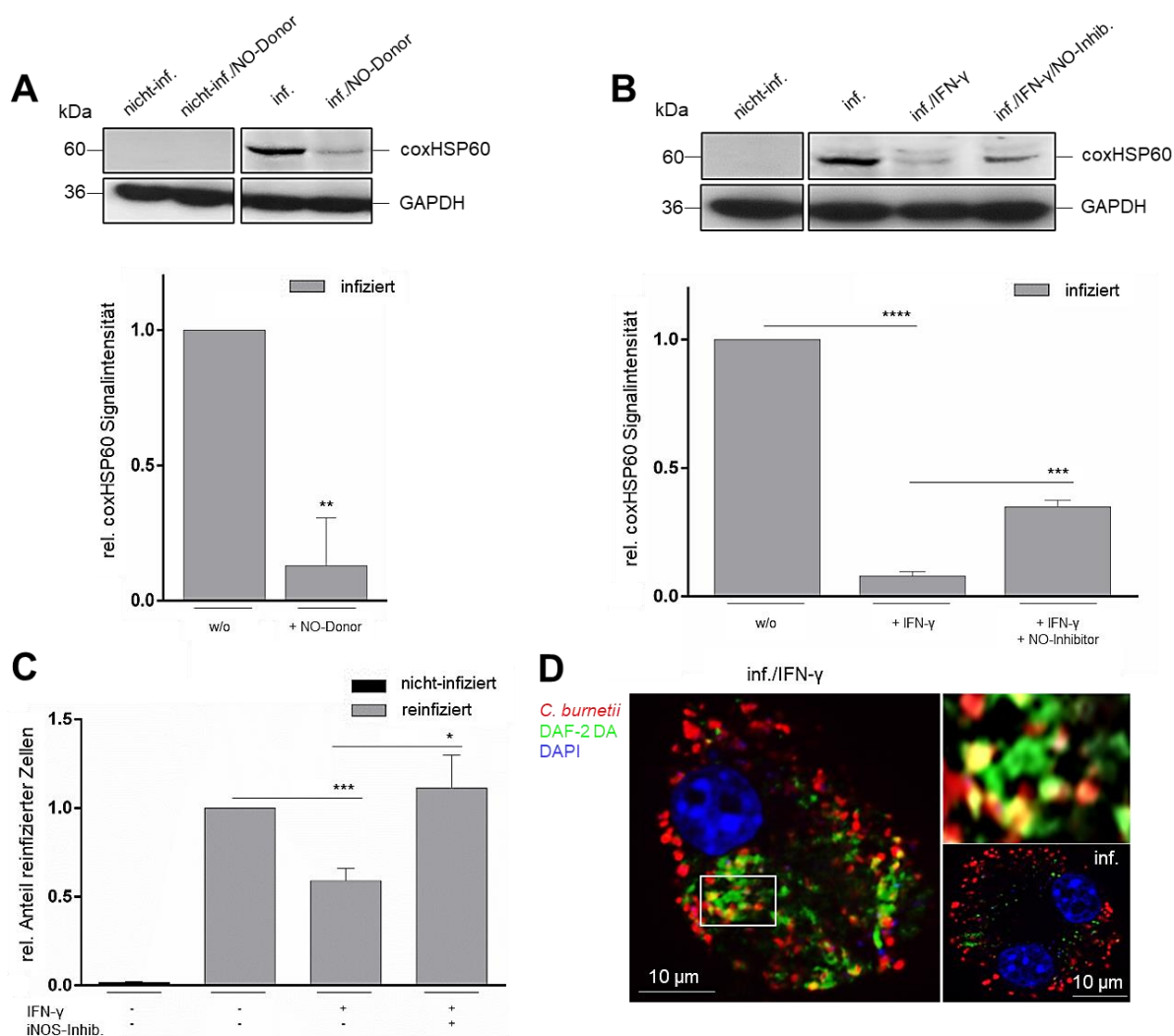
(A) zeigt die Western-Blot-Analyse der iNOS-Regulation über mTOR. Nicht-infizierte und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden für 2 h mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin (500 nM) inkubiert. Folgend wurden die Zellen mit *C. burnetii* (MOI 10) infiziert, 12 hpi mit IFN- $\gamma$  (100 U/ml) behandelt und bis 48 hpi inkubiert. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von iNOS quantifiziert und auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert. Gezeigt sind drei unabhängige Experimente  $\pm$  Standardabweichung. Dargestellt ist die relative iNOS-Signalintensität, für die die unbehandelten Kontrollen (nicht-infiziert & infiziert) auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Analyse folgt der Beschreibung in Kapitel 3.6 (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert + IFN- $\gamma$ ); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert + IFN- $\gamma$ );  $n = 3$ ). (B) Western-Blot-Untersuchung zur Analyse der iNOS-Stabilität. Nicht-infizierte und Coxiellen (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) für 24 h kultiviert. Es folgte die Blockierung der iNOS-Neusynthese unter Zugabe von Cycloheximid (CHX, 90  $\mu$ g/ml). Die Probenaufbereitung erfolgte 0-6 h nach CHX-Zugabe. Für die densitometrische Auswertung wurden die iNOS-Bandenintensitäten quantifiziert und auf die mitgeführte Ladekontrolle (GAPDH) normiert. Die Darstellung zeigt die relative Signalintensität aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung, bei der die Ausgangswerte (nicht-infiziert & infiziert, 0 h CHX) auf 1 gesetzt wurden. Der *threshold* wurde auf 0,5 gesetzt. Die statistische Analyse ist in Kapitel 3.6 beschrieben (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert 0h CHX); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert/infiziert 0h CHX); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (infiziert 0h CHX);  $n = 3$ ).

Um Einblick in die regulatorische mTOR-Funktion infizierter DCs zu erhalten, wurde ein Experiment auf Basis des Inhibitors Rapamycin durchgeführt. Die Western-Blot-Analyse in Abbildung 4-17 A zeigt in der Präsenz von Rapamycin eine deutliche iNOS-Reduktion (50%). Dies weist darauf hin, dass die induzierte iNOS-Expression in nicht-infizierten und infizierten DCs durch aktives mTOR positiv beeinflusst wird. Es ist bekannt, dass die mTOR-Inhibition die zelluläre Autophagie hochreguliert <sup>412</sup>, über die iNOS in Zellen proteolytisch abgebaut wird <sup>413</sup>. Somit kann vermutet werden, dass die beobachtete Rapamycin-vermittelte iNOS-Reduktion auf einen erhöhten autophagischen Abbau des Enzyms zurückzuführen ist. Da auch Coxiellen modulierenden Einfluss auf die Autophagie nehmen <sup>414</sup>, stellte sich die Frage, ob die iNOS-Stabilität infizierter DCs möglicherweise durch die Anwesenheit der Bakterien beeinträchtigt ist. Um dies zu untersuchen, wurde nach IFN- $\gamma$ -Behandlung die Proteinbiosynthese nicht-infizierter und infizierter DCs durch Cycloheximid (CHX)-Zugabe blockiert und die jeweilige Proteinstabilität von iNOS über einen Zeitraum von 6 h analysiert. Wie die Western-Blot-Analysen in Abbildung 4-17 B zeigen, hat die Infektion der DCs mit Coxiellen in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  jedoch keinen detektierbaren Einfluss auf den intrazellulären iNOS-Abbau. Sowohl für nicht-infizierte als auch infizierte DCs zeigte sich eine iNOS-Halbwertszeit von  $\geq 4$  h.

#### 4.5.2.2 iNOS/NO-vermittelte Selbstverteidigung *C. burnetii*-infizierter DCs

In den hier untersuchten DCs konnte mittels IFN- $\gamma$  eine starke iNOS-Induktion mit entsprechender NO-Synthese beobachtet werden. Hierauf basierend wurde in nachfolgenden Studien untersucht, ob und in welchem Umfang dieser Prozess tatsächlich für die zelluläre Selbstverteidigung Coxiellen-infizierter DCs verantwortlich ist.



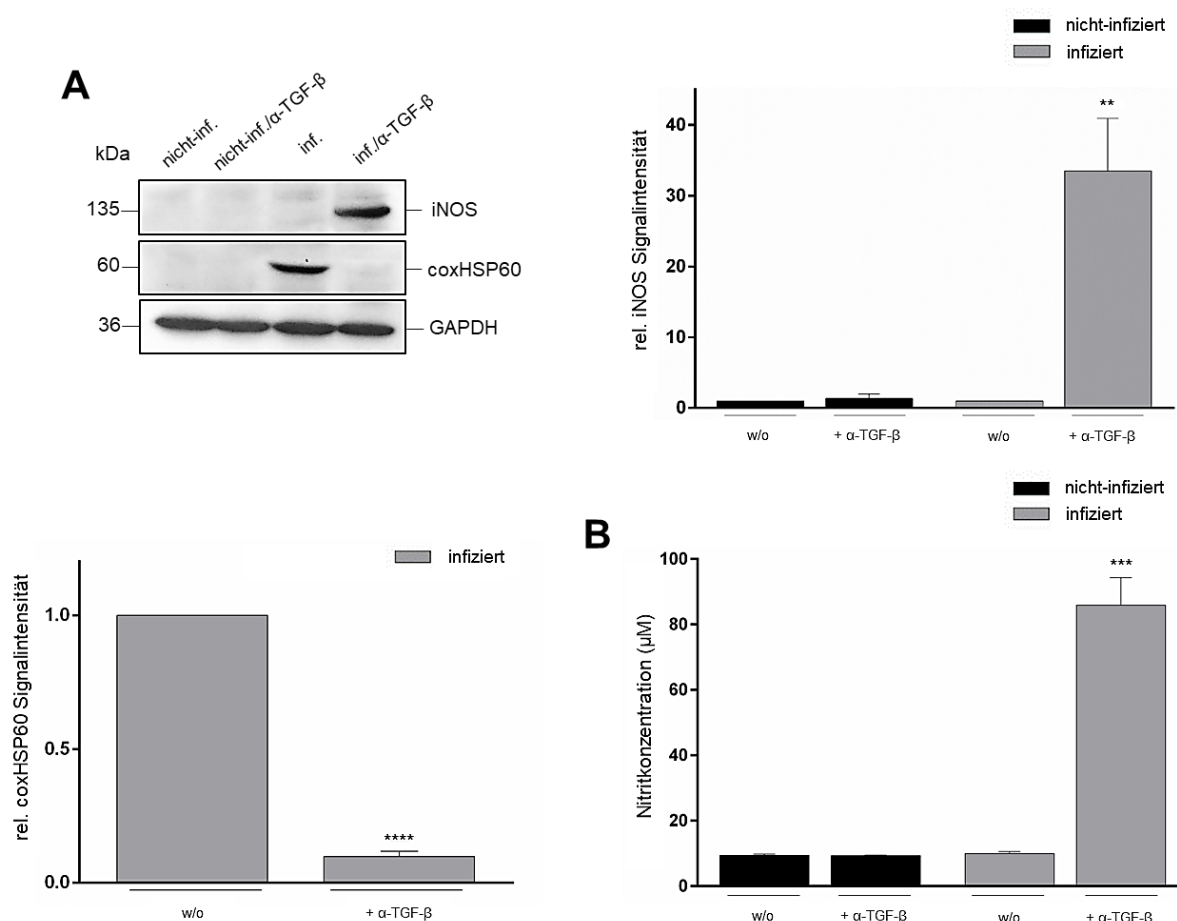


**Abbildung 4-18: Antibakterielle Effekte von NO auf *C. burnetii***

**(A)** Western-Blot-Analyse des Einflusses von NO auf *C. burnetii*-infizierte DCs. JAWS II-DCs wurden mit *C. burnetii* (MOI 10) infiziert und 7 hpi mit einem NO-Donor (DETA NONOate, 100 μM) behandelt. Als Kontrollen wurden nicht-infizierte Zellen unter gleichen Versuchsbedingungen mitgeführt. Die densitometrische Analyse der coxHSP60-Bandenintensitäten erfolgte 72 hpi. Die Abbildung zeigt die relativen Signalintensitäten aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung, bei der die infizierte, unbehandelte Kontrolle auf 1 gesetzt wurde. Die statistische Analyse wurde, wie in Kapitel 3.6 beschrieben, durchgeführt (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(B)** zeigt eine Western-Blot-Analyse zur Inhibition des NO-Effektes während der *C. burnetii*-Infektion. Coxiellen (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden in An- und Abwesenheit von IFN-γ (100 U/ml, 7 hpi) für 72 h kultiviert. Ergänzend wurde ein NO-Synthase-Inhibitor (NMMLA, 1 mM) hinzugefügt. Nicht-infizierte JAWS II-DCs wurden als Kontrollen mitgeführt. Die densitometrische Analyse basiert auf der Quantifizierung der coxHSP60-Bandenintensitäten und der Normalisierung auf die Ladekontrolle (GAPDH). Dargestellt ist die relative Signalintensität (aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung), bei der die infizierte, unbehandelte Kontrolle auf 1 gesetzt wurde. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.6 erläutert (\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (infiziert + IFN-γ); \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(C)** Durchflusszytometrie der Reinfektiosität von *C. burnetii* in Anwesenheit eines iNOS-Inhibitors. *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden in An- und Abwesenheit von IFN-γ (100 U/ml, 7 hpi) und eines spezifischen iNOS-Inhibitors (1400W, 15 μM, 7 hpi) kultiviert. 72 hpi wurden die Bakterien mittels *syringe releasing* freigesetzt und auf Reporterzellen (L929-Fibroblasten) gegeben. Nach 72 h wurde die Fähigkeit zur Reinfektion durchflusszytometrisch über die Anfärbung mit dem α-CoxII Antikörper nachgewiesen. Nicht-infizierte sowie *C. burnetii* (MOI 10, 72 hpi)-infizierte Reporterzellen wurden als Kontrollen mitgeführt. Gezeigt sind die Resultate aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. Für die Darstellung des relativen Anteils infizierter Zellen wurden die reinfizierten, unbehandelten Kontrollen auf 1 gesetzt. Die statistische Aufbereitung erfolgte wie in Kapitel 3.6 beschrieben (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (reinfiziert + IFN-γ); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (reinfiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(D)** zeigt einen immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von NO (DAF-2 DA, grün) in *C. burnetii* (tdTomato, MOI 10, rot)-infizierten DCs in An- (links und rechts, oben) und Abwesenheit (rechts, unten) von IFN-γ (100 U/ml, 7 hpi) nach 72 h. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). Der weiß-ingerahmte Bildausschnitt zeigt eine Vergrößerung der Aufnahme (rechts, oben).

Wie die Western-Blot-Analysen in Abbildung 4-18 A und B belegen, führt die Zugabe eines NO-Donors (DETA NONOate) zu einer äußerst starken Reduktion der Bakterienlast infizierter DCs (70-80%) und damit zu einem Phänotyp, der dem IFN- $\gamma$ -stimulierter DCs entspricht (Abb. 4-18 A). Darüber hinaus bewirkte der Einsatz des NO-Synthase-Blockers NMMLA eine teilweise Wiederherstellung (von 30-40%) der Bakterienlast IFN- $\gamma$ -behandelter, infizierter DCs (Abb. 4-18 B). Unter Verwendung eines spezifischen iNOS-Inhibitors (1400W) konnte im Rahmen von Reinfektionsexperimenten zudem demonstriert werden, dass bei einer iNOS-Blockierung die Reinfektiosität der aus DCs stammenden Coxiellen wieder vollständig hergestellt werden konnte (Abb. 4-18 C). Dass NO tatsächlich auch in räumlicher Nähe der Coxiellen synthetisiert wird und dort einwirken kann, zeigt die Immunfluoreszenz IFN- $\gamma$ -behandelter, infizierter DCs unter Verwendung des fluoreszierenden NO-Markers (DAF-2 DA, abcam, grün) (Abb. 4-18 D). Hier ist deutlich zu erkennen, dass nur IFN- $\gamma$ -induziertes NO (grün) mit den intrazellulären Coxiellen (rot) eine partielle Kolo-kalisierung ( $r=0,13$ ) aufweist. In Zusammenfassung zeigen die durchgeführten Untersuchungen, dass NO eine negative Auswirkung auf intrazelluläre Coxiellen hat und dies über Blockierung von iNOS oder des von ihm produzierten NO nachhaltig gemindert wird.

Die Untersuchungen dieser Arbeit deuten darauf hin, dass IFN- $\gamma$ -induziertes iNOS für die zelluläre Selbstverteidigung Coxiellen-infizierter DCs eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Obschon auch LPS in der Lage ist, iNOS in DCs zu induzieren (Abb. 4-15), bleibt eine entsprechende Enzyminduktion bei alleiniger Coxiellen-Infektion aus. Es stellte sich somit die Frage, wie dies zu erklären ist.



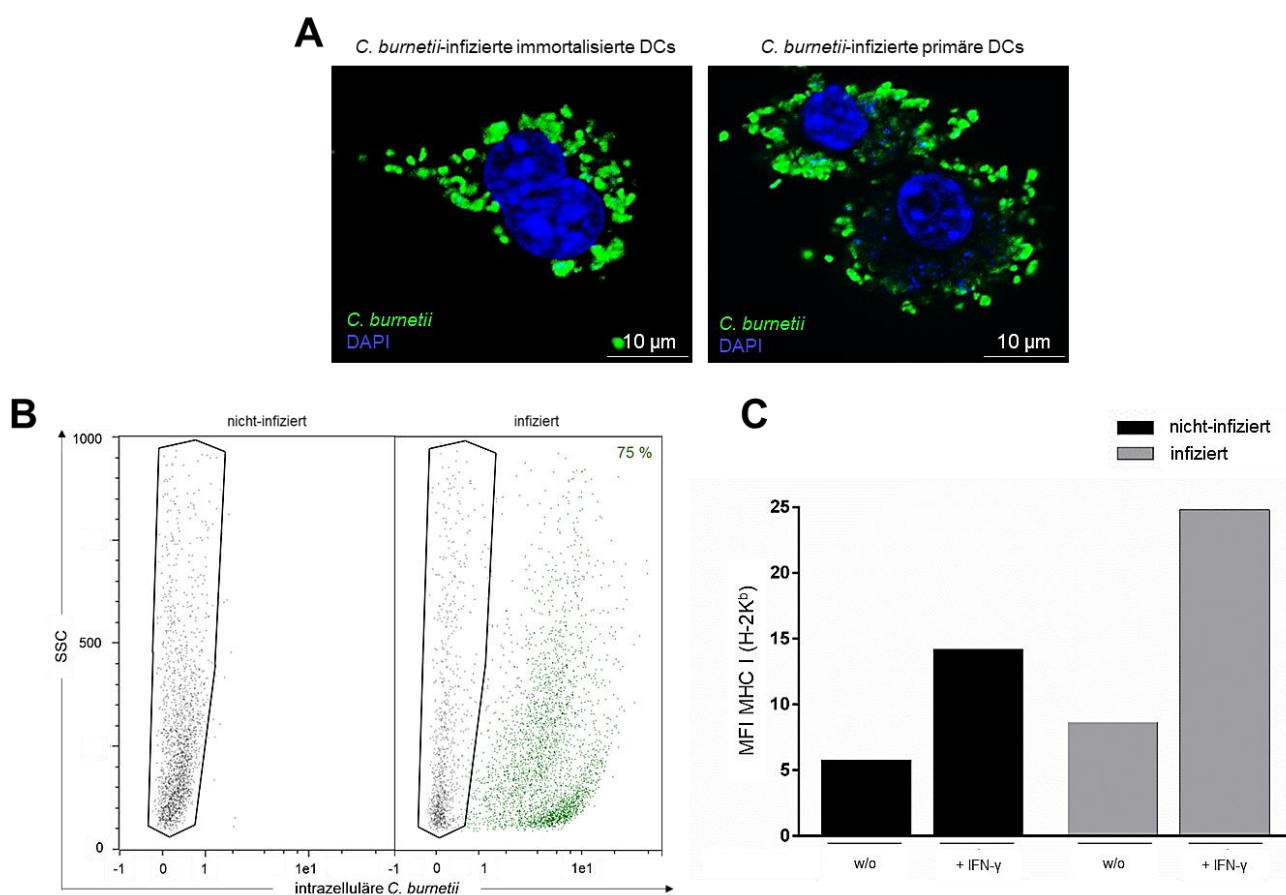
**Abbildung 4-19: TGF- $\beta$ -vermittelte Subversion von iNOS in *C. burnetii*-infizierten DCs**

**(A)** Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Auswirkung einer TGF- $\beta$ -Neutralisierung auf die iNOS-Expression infizierter DCs. Nicht-infizierte und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden entweder ohne Behandlung oder unter Zugabe eines neutralisierenden  $\alpha$ -TGF- $\beta$  (1,2,3; 1,5  $\mu$ g/ml)-Antikörpers für 72 h kultiviert. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von iNOS und coxHSP60 quantifiziert und auf die mitgeführte Ladekontrolle (GAPDH) normiert. Dargestellt sind die relativen Signalintensitäten, bei denen die unbehandelten Kontrollwerte auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Analyse, siehe Kapitel 3.6, wurde auf Basis von drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung durchgeführt (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(B)** zeigt die Messung der Nitritkonzentration aus Überständen des unter (A) beschriebenen Neutralisierungsexperimentes. Die statistische Analyse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung wurde entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.6 durchgeführt (\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ).

Vorangegangene Forschungsarbeiten anderer Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass TGF- $\beta$  einen negativen Einfluss auf die iNOS-Expression hat<sup>415,416</sup>, so dass nach Coxiellen-Infektion der DCs neben MHC I möglicherweise auch iNOS supprimiert wird. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde ein TGF- $\beta$ -Neutralisierungsexperiment durchgeführt. Wie die Immunblot-Analyse in Abbildung 4-19 A zeigt, tritt erst nach TGF- $\beta$ -Neutralisierung bei infizierten DCs eine deutliche iNOS-Induktion auf (Faktor 35). Daraus lässt sich ableiten, dass DCs durch Coxiellen grundsätzlich aktiviert werden können, die autokrine TGF- $\beta$ -Sekretion infizierter DCs eine iNOS-Induktion jedoch verhindert. Wird die iNOS-Suppression durch TGF- $\beta$ -Neutralisierung aufgehoben, geht dies mit einer deutlichen Reduktion der Bakterienlast (90%) einher. Somit scheinen infizierte DCs auch IFN- $\gamma$ -unabhängig zu einer effektiven Coxiellen-Eliminierung fähig zu sein, sobald die TGF- $\beta$ -vermittelte Subversion aufgehoben wird. In Ergänzung dieser Ergebnisse weist ein parallel durchgeführter Griess-Assay in Abbildung 4-19 B bei TGF- $\beta$ -Neutralisierung eine hohe NO-Synthese nach, was die Funktionalität des blockierten iNOS/NO-Systems belegt und wiederum die Bedeutung von NO als wichtigen Faktor bei der Coxiellen-Bekämpfung unterstreicht. Im Überblick lässt sich festhalten, dass Coxiellen über autokrine TGF- $\beta$ -Ausschüttung infizierter DCs offensichtlich eine doppelte Subversionsstrategie verfolgen, bei der sowohl die iNOS-vermittelte Eliminierung der Bakterien als auch die zelluläre Antigenpräsentation unterbunden werden.

**4.5.2.3 Charakterisierung von iNOS/NO während der *C. burnetii*-Infektion primärer DCs**

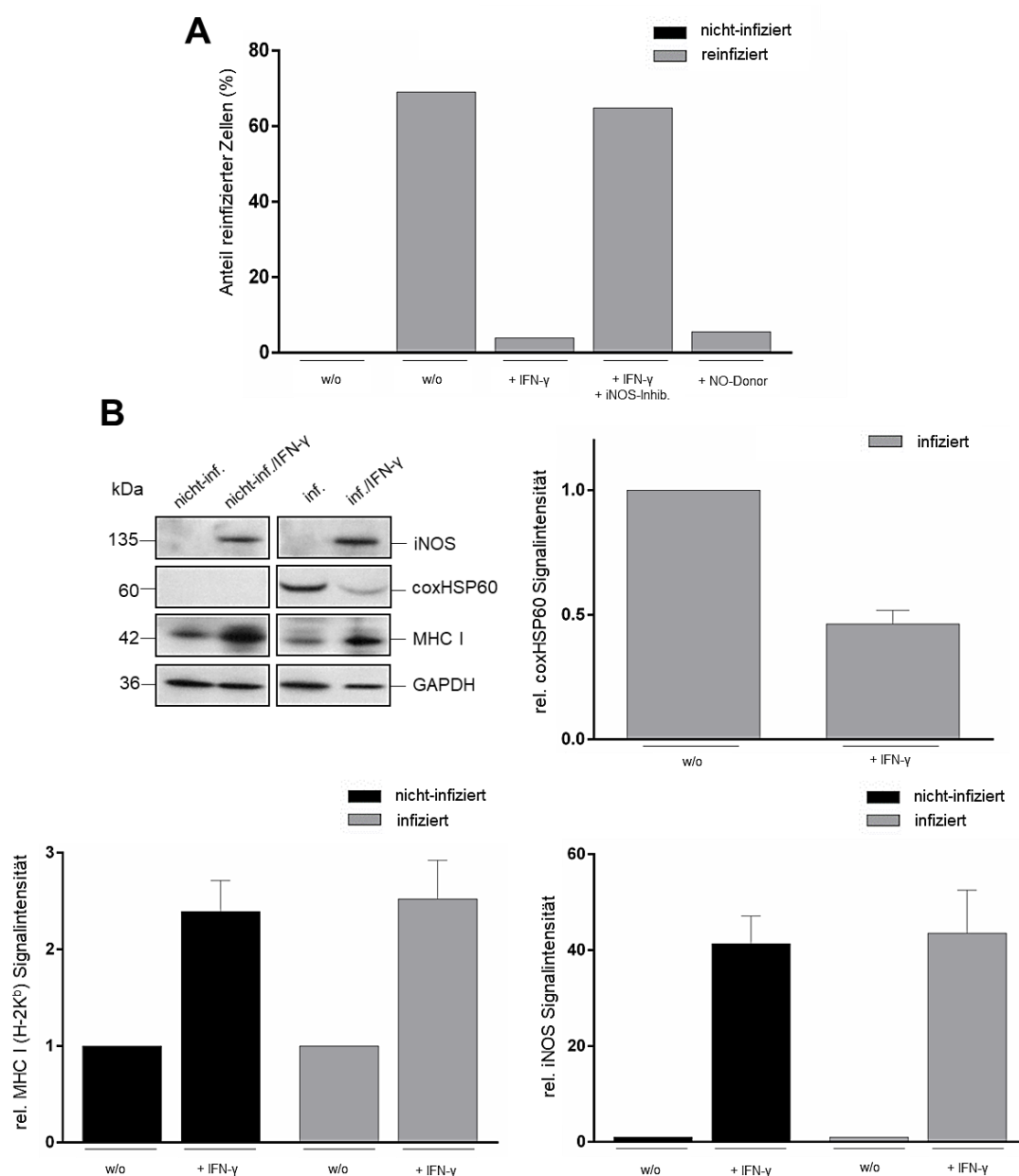
Um zu untersuchen, ob die für die Coxiellen-infizierten, immortalisierten JAWS II-DCs gemachten Beobachtungen auch für primäre DCs (BMDCs aus C57BL/6 Mäusen,  $\geq 90\%$  Reinheit) gelten, wurden in nachfolgenden Studien verschiedene Schlüsselexperimente zur Beschreibung einer entsprechenden Coxiellen-Infektion und -Abwehr durchgeführt.



**Abbildung 4-20: *C. burnetii*-Infektion in primären DCs**

**(A)** Immunfluoreszenzmikroskopie-Analyse einer *C. burnetii*-Infektion in primären DCs. Primäre DCs und JAWS II-DCs wurden für 72 h mit *C. burnetii* (MOI 10) infiziert. Der Nachweis bakterieller Strukturen erfolgte über den  $\alpha$ -CoxII Antikörper (grün), DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt. **(B)** Repräsentative Durchflusszytometrie intrazellulärer Coxiellen (MOI 10, 72 hpi) in primären DCs nach 72 h. Infizierte DCs und nicht-infizierte Kontrollzellen wurden mit dem  $\alpha$ -CoxII-Antikörper angefärbt. **(C)** Für die durchflusszytometrische Quantifizierung der MHC I (H2K<sup>b</sup>)-Expression in primären DCs wurden diese mit einer MOI 10 infiziert, mit IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) behandelt oder unbehandelt belassen. 72 hpi erfolgte eine Anfärbung mit dem MHC I (H2K<sup>b</sup>)-Antikörper. Dargestellt ist die MHC I (H-2K<sup>b</sup>) MFI aus einem Experiment.

Die Immunfluoreszenzmikroskopie in Abbildung 4-20 A zeigt, dass immortalisierte und primäre DCs einen vergleichbaren zellulären Phänotyp der *C. burnetii* (grün)-Infektion aufweisen. In beiden Fällen wurden mehrheitlich kleine, im Zytosol verteilte Coxiellen-Strukturen detektiert. Eine Ausprägung größerer CCVs zeigt sich nicht. Die in Abbildung 4-20 B gezeigte Durchflusszytometrie weist bei primären DCs (wie zuvor bei den JAWS II-DCs) einen hohen Anteil infizierter Zellen auf (bis zu 75 %). Bei der Analyse der MHC I-Gesamtausprägung wurde festgestellt, dass die Coxiellen-Infektion in primären DCs allein keine MHC I-Induktion hervorruft. Wie bereits zuvor bei den JAWS II-DCs (Abb. 4-9) konnte auch hier eine deutliche Zunahme des MHC I-Expressionslevels nur in IFN- $\gamma$ -Anwesenheit gemessen werden (Faktor 3-4; Abb. 4-20 C). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass immortalisierte und primäre DCs vor und nach einer Coxiellen-Infektion ein vergleichbares zelluläres Verhalten besitzen. In den folgenden Experimenten wurde für primäre DCs nun der Einfluss des IFN- $\gamma$  auf die *C. burnetii*-Infektion im Detail untersucht.



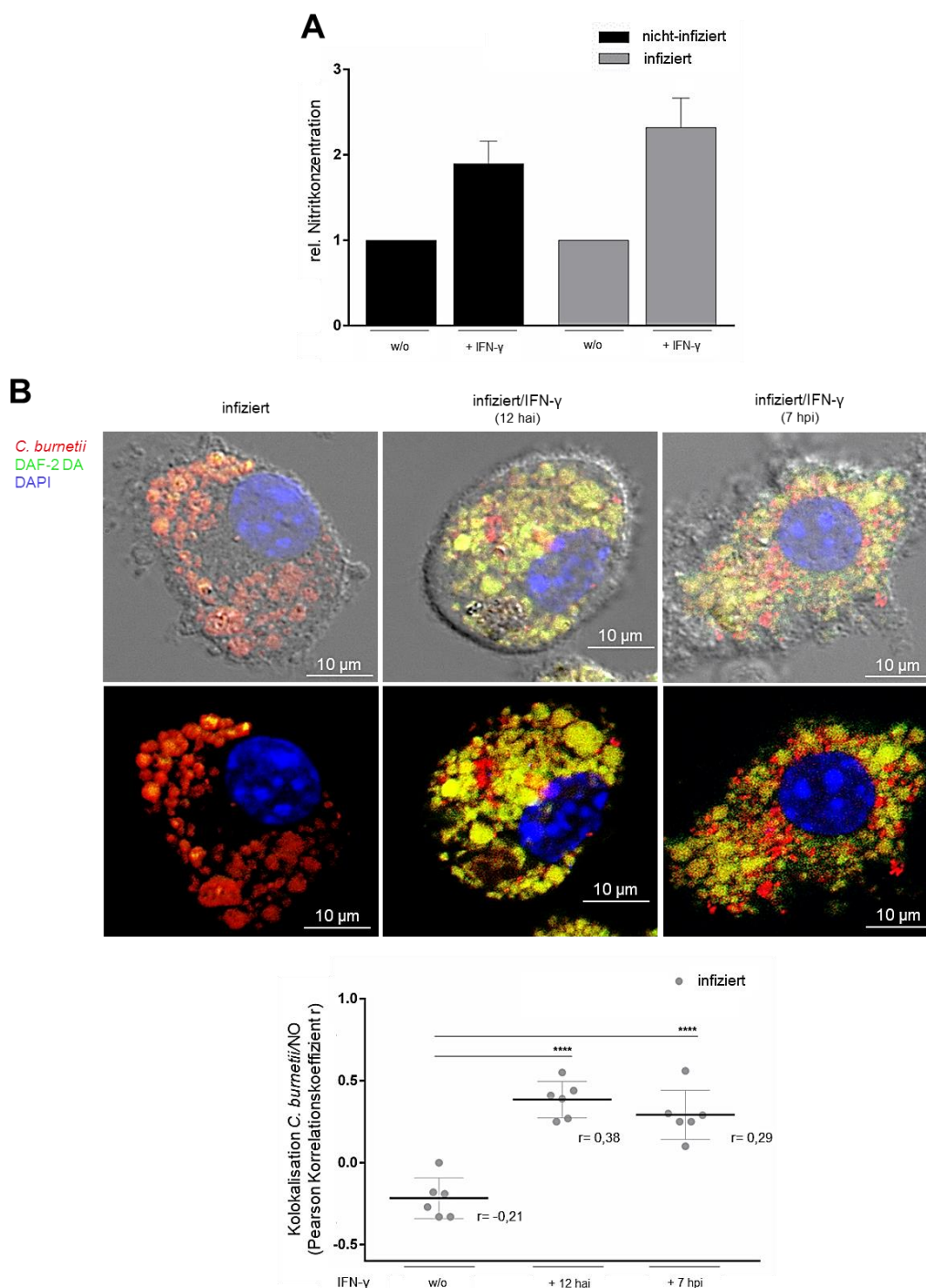
#### Abbildung 4-21: iNOS-vermittelte Abwehr in *C. burnetii*-infizierten primären DCs

**(A)** Durchflusszytometrie der Reinfektiosität von *C. burnetii* nach Kultivierung in primären DCs. *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte primäre DCs wurden in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi), eines spezifischen iNOS-Inhibitors (1400W, 15  $\mu$ M, 7 hpi) und eines NO-Donors (DETA NONOate, 100  $\mu$ M, 7 hpi) kultiviert. 72 hpi wurden die Bakterien mittels *syringe releasing* freigesetzt und auf Reporterzellen (L929-Fibroblasten) gegeben. Nach 72 h wurde die Fähigkeit zur Reinfektion durchflusszytometrisch über die Anfärbung mit dem  $\alpha$ -CoxII Antikörper nachgewiesen. Nicht-infizierte sowie *C. burnetii* (MOI 10, 72 hpi)-infizierte Reporterzellen wurden als Kontrollen mitgeführt. Gezeigt sind die Resultate aus einem Experiment. **(B)** Western-Blot-Analyse der IFN- $\gamma$ -induzierten Immunantwort *C. burnetii*-infizierter primärer DCs. Nicht-infizierte und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte primäre DCs wurden in An- oder Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 12 hai) für 72 h inkubiert. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von iNOS, MHC I und coxHSP60 quantifiziert und auf die mitgeführte Ladekontrolle (GAPDH) normiert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Versuchsansatz  $\pm$  Standardabweichung auf Basis dreier unterschiedlicher Expositionen.

Mittels Reinfektionsexperiment (Abb. 4-21 A) ließ sich zeigen, dass IFN- $\gamma$  oder NO-Donor bei primären DCs eine vergleichbar starke Reduktion der Reinfektion von Reporterzellen bewirkt (90-95%). Darüber hinaus ergab sich, dass in Anwesenheit der iNOS-Inhibitors 1400W der IFN- $\gamma$ -vermittelte negative Effekt auf die Reinfektion nahezu vollständig aufgehoben wurde. Dies untermauert die Annahme, dass iNOS und dem von ihm synthetisierten NO eine wichtige



Bedeutung für die anti-Coxiellen Abwehr infizierter DCs zukommt. In Übereinstimmung hiermit belegt die Western-Blot-Analyse in Abbildung 4-21 B, dass die Bakterienlast infizierter primärer DCs in Anwesenheit des Interferons um  $\leq 50\%$  reduziert ist. Im gleichen experimentellen Ansatz wurde zudem für infizierte primäre DCs (wie zuvor für die JAWS II-DCs, Abb. 4-14) in IFN- $\gamma$ -Anwesenheit eine Induktion für MHC I (Faktor 2,5) und iNOS (Faktor 45-50) detektiert.



#### Abbildung 4-22: NO-abhängige antibakterielle Effekte auf *C. burnetii* in infizierten primären DCs

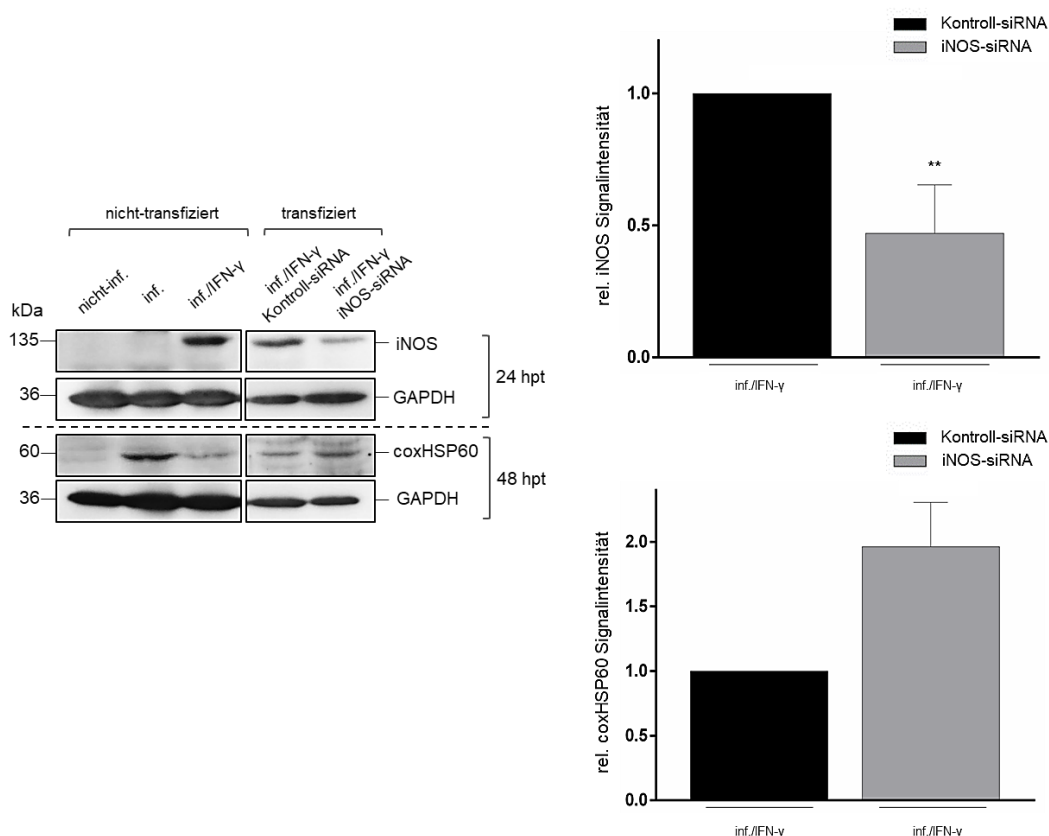
**(A)** Griess-Assay zur Messung der Nitritkonzentration während einer *C. burnetii*-Infektion in primären DCs. Nicht-infizierte und Coxiellen (MOI 10)-infizierte primäre DCs wurden in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) 72 h inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde der Überstand entnommen und im Griess-Assay analysiert. Dargestellt ist die relative Nitritkonzentration aus zwei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung, für die die unbehandelten Kontrollen (nicht-infiziert & infiziert) auf 1 gesetzt wurden. **(B)** zeigt den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis (oben) von NO (DAF-2 DA, grün) in *C. burnetii* (tdTomato, MOI 10, rot)-infizierten primären DCs unter Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml,

12 hai, 7 hpi). Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Eine Kolokalisation wurde anhand des Pearson Korrelationskoeffizienten  $r$  überprüft (AxioVision) und ist in der Abbildung unten dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.6 dargelegt und basiert auf sechs unabhängigen Präparatsfraktionen (\*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung);  $n=6$ ).

Dass die IFN- $\gamma$ -vermittelte iNOS-Induktion primärer DCs tatsächlich zu einer erhöhten NO-Synthese führt, konnte durch parallel durchgeführte Griess-Assays nachgewiesen werden (Abb. 4-22 A). Des Weiteren ergab eine Immunfluoreszenz (Abb. 4-22 B) infizierter primärer DCs in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  eine sehr stark ausgeprägte Kolokalisation ( $r= 0,29-0,38$ ) zwischen *C. burnetii* (rot) und dem NO-Marker DAF-2 DA (grün). Somit scheint auch bei primären DCs das IFN- $\gamma$ -induzierte iNOS/NO-System eine entscheidende Rolle bei der zellulären Selbstverteidigung gegen Coxiellen zu spielen.

#### 4.5.2.4 Auswirkung reduzierter/fehlender iNOS-Induktion auf die *C. burnetii*-Infektion von DCs

Um die iNOS-vermittelten Effekte auf die *C. burnetii*-Infektion von DCs im Detail zu untersuchen, wurden in den nachfolgenden Studien sowohl transiente iNOS-*knock down* (*silencing*)- als auch stabile iNOS-*knock out*-Experimente durchgeführt.

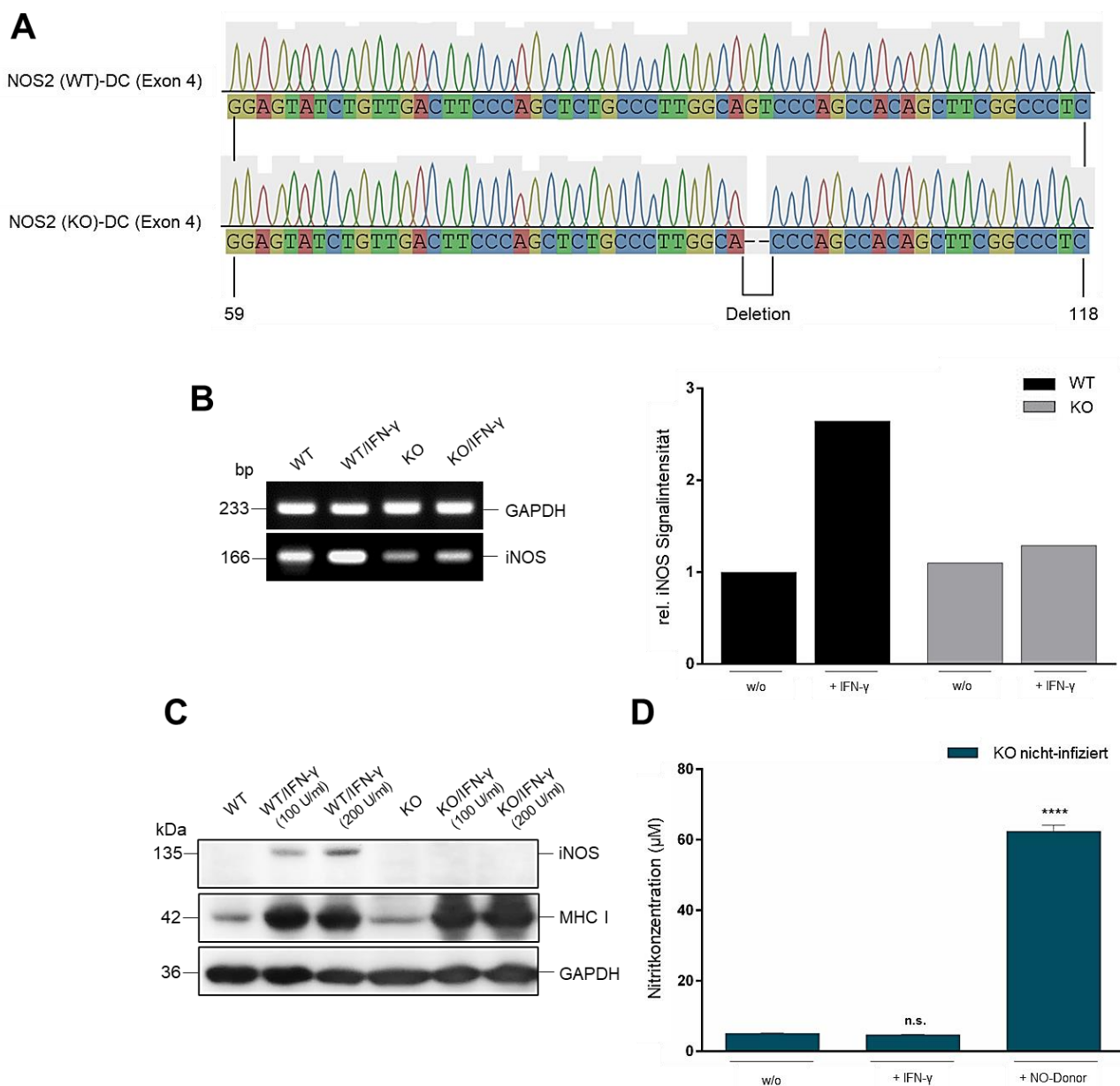


**Abbildung 4-23: siRNA-vermitteltes iNOS silencing in *C. burnetii*-infizierten DCs**

JAWS II-DCs wurden mit iNOS-siRNA transfiziert, 2,5 h später mit *C. burnetii* (MOI 10) infiziert und unbehandelt oder unter Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) für 24-48 h inkubiert. Als Kontrollen wurden infizierte Zellen mitgeführt, die mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Für die densitometrische Auswertung wurden die Bandenintensitäten von iNOS (oben, 24 hpt) und coxHSP60 (unten, 48 hpt) quantifiziert und auf GAPDH als Ladekontrolle normiert. Gezeigt sind jeweils die relativen Signalintensitäten, bei denen die Kontroll-siRNA (iNOS, oben; coxHSP60, unten) auf 1 gesetzt wurden. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente  $\pm$  Standardabweichung für iNOS sowie die

Ergebnisse aus drei unabhängigen *gepoolten* Versuchsansätzen  $\pm$  Standardabweichung auf Basis dreier verschiedener Expositionen für coxHSP60. Die statistische Analyse wurde entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.6 durchgeführt (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (Kontroll-siRNA);  $n=3$ ).

Der Western-Blot in Abbildung 4-23 zeigt die Auswirkung eines siRNA-*silencing* von iNOS auf die Coxiellen-Infektion IFN- $\gamma$ -stimulierter DCs. Die Effizienz des iNOS-*knock down* lag im Vergleich zur Kontroll-siRNA bei 40-50%. Unter diesen reduzierten iNOS-Expressionsbedingungen verdoppelte sich die (über coxHSP60 ermittelte) Bakterienlast in den infizierten DCs. Dies verdeutlicht, dass in IFN- $\gamma$ -stimulierten DCs die iNOS-abhängige NO-Synthese tatsächlich für die Reduktion intrazellulärer Coxiellen verantwortlich ist. Im Falle des durchgeführten siRNA-*silencing*-Experiments kann die iNOS-Genexpression nur vorübergehend ( $\leq 48$  h) auf RNA-Ebene unterbunden werden, was eine zeitliche Limitierung durchführbarer Studien zur Folge hat. Zur stabilen/permanenten Ausschaltung von iNOS in DCs wurde daher für weitere Analysen ein CRISPR/Cas9-vermittelter *knock out* etabliert, der auf der strukturellen/funktionalen Deletion des kodierenden NOS2-Gens basiert (siehe Material & Methoden, Kapitel 3.5.6).

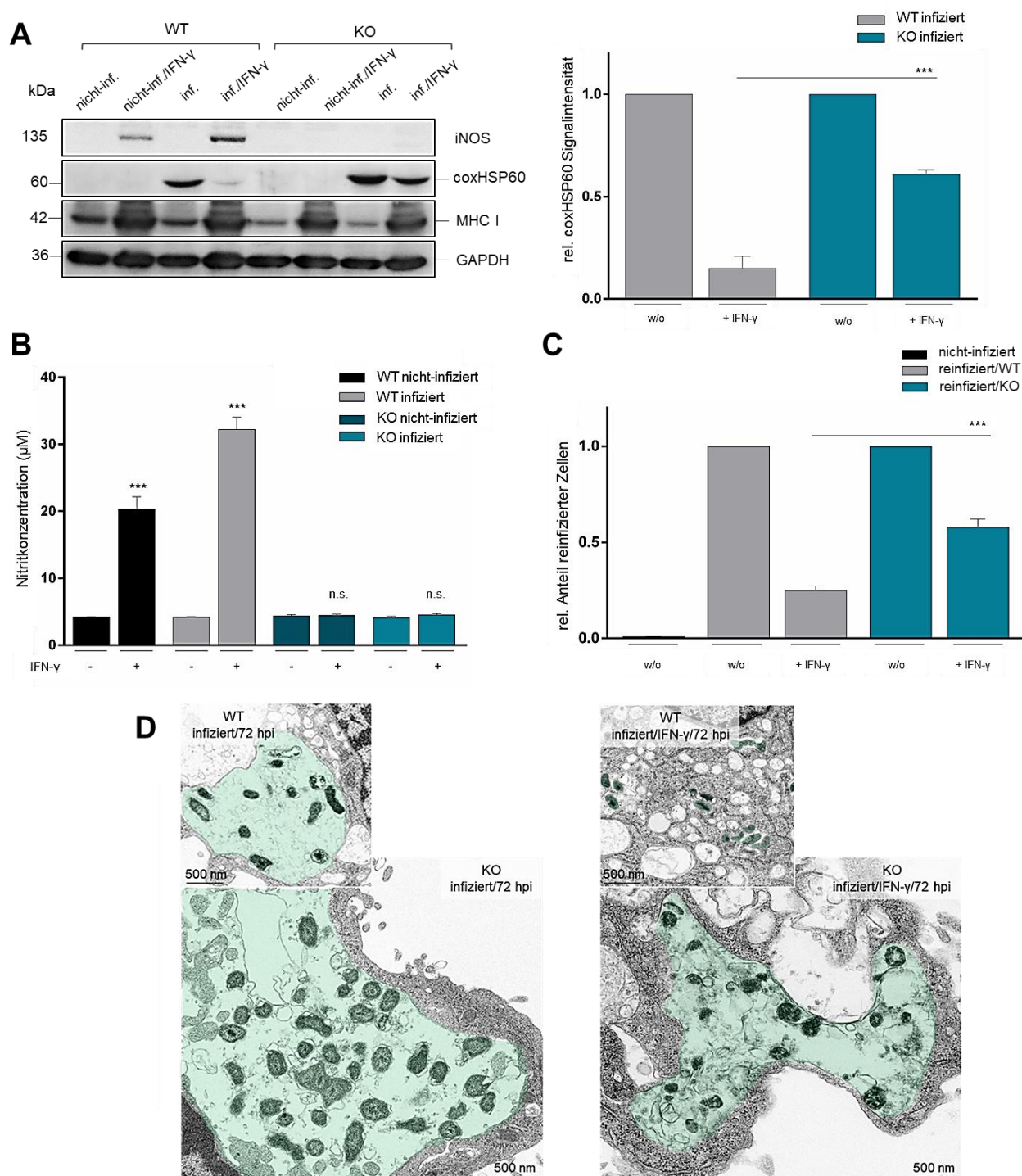




**Abbildung 4-24: Etablierung eines NOS2 knock out in JAWS II-DCs**

**(A)** NOS2-Exon 4-Sequenzausschnitt aus Wildtyp (WT, oben)- und *knock out* (KO, unten)-JAWS II-DCs nach Isolation der genomischen DNA (*Extract Me genomic DNA Kit*, Blirt), PCR-Amplifikation und Sanger-Sequenzierung. **(B)** Semi-quantitative PCR-Analyse der iNOS-Transkriptmenge nicht-infizierter JAWS II-WT- und -KO-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml). Murines GAPDH wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Rechts dargestellt ist die relative Signalintensität, bei der die unbehandelte WT-Kontrolle auf 1 gesetzt wurde. **(C)** Western-Blot-Analyse der iNOS-Expression in nicht-infizierten JAWS II-WT- und -KO-DCs unter Zugabe verschiedener IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (100 U/ml, 200 U/ml). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. **(D)** Griess-Assay zur Messung der Nitritkonzentration in den Zellkulturüberständen von nicht-infizierten JAWS II-KO-DCs unter Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml) und NO-Donor (DETA NONOate, 100  $\mu$ M, Positivkontrolle) nach 72 h Inkubation. Die statistische Analyse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung wurde entsprechend den Erläuterungen in Kapitel 3.6 durchgeführt (n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle (KO, nicht-infiziert ohne Behandlung); \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (KO, nicht-infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ).

Nach erfolgreicher CRISPR/Cas9-Transfektion, Anzucht und Selektion von NOS2(KO)-DCs (siehe Material & Methoden, Kapitel 3.5.6), erfolgte zunächst eine Charakterisierung des ausgewählten Zellklons anhand einer DNA-Sequenzierung des NOS2-Exons 4. Diese bestätigte das Vorhandensein einer Deletionsmutation von zwei Nukleotiden in der NOS2-DNA-Sequenz (Abb. 4-24 A). Eine im Anschluss durchgeführte semiquantitative PCR-Analyse (Abb. 4-24 B) zeigte für IFN- $\gamma$ -stimulierte NOS2(KO)-DCs nur eine sehr geringe Erhöhung der bereits im Grundzustand reduzierten iNOS-Transkriptmenge, was vermuten lässt, dass die vorhandene Nukleotiddeletion im NOS2-Gen einen negativen Einfluss auf die Ausprägung und Stabilität der jeweiligen Transkripte hat. Die Untersuchung der iNOS-Ausprägung auf Proteinebene mittels Western-Blot (Abb. 4-24 C) ergab, dass im Gegensatz zu Wildtyp (WT)- bei KO-DCs in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  keine entsprechende iNOS-Induktion zu beobachten war. In Übereinstimmung hiermit konnte in parallel durchgeführten Griess-Assays (Abb. 4-24 D) sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  für KO-DCs keine NO-Synthese detektiert werden. Wie zusätzlich durchgeführte Kontrollen belegen, konnte dies nur durch die externe Zugabe eines NO-Donors erreicht werden. In Zusammenfassung belegt die Charakterisierung des ausgewählten NOS2(KO)-DC-Zellklons ein vollständiges und dauerhaftes Ausschalten von iNOS und der mit ihm verbundenen NO-Synthese. Somit stellen diese zusammen mit WT-DCs ein geeignetes zelluläres Modellsystem für vergleichende Studien zur Bestimmung der funktionalen Bedeutung von iNOS/NO bei der zellulären Abwehr gegen *C. burnetii* dar.



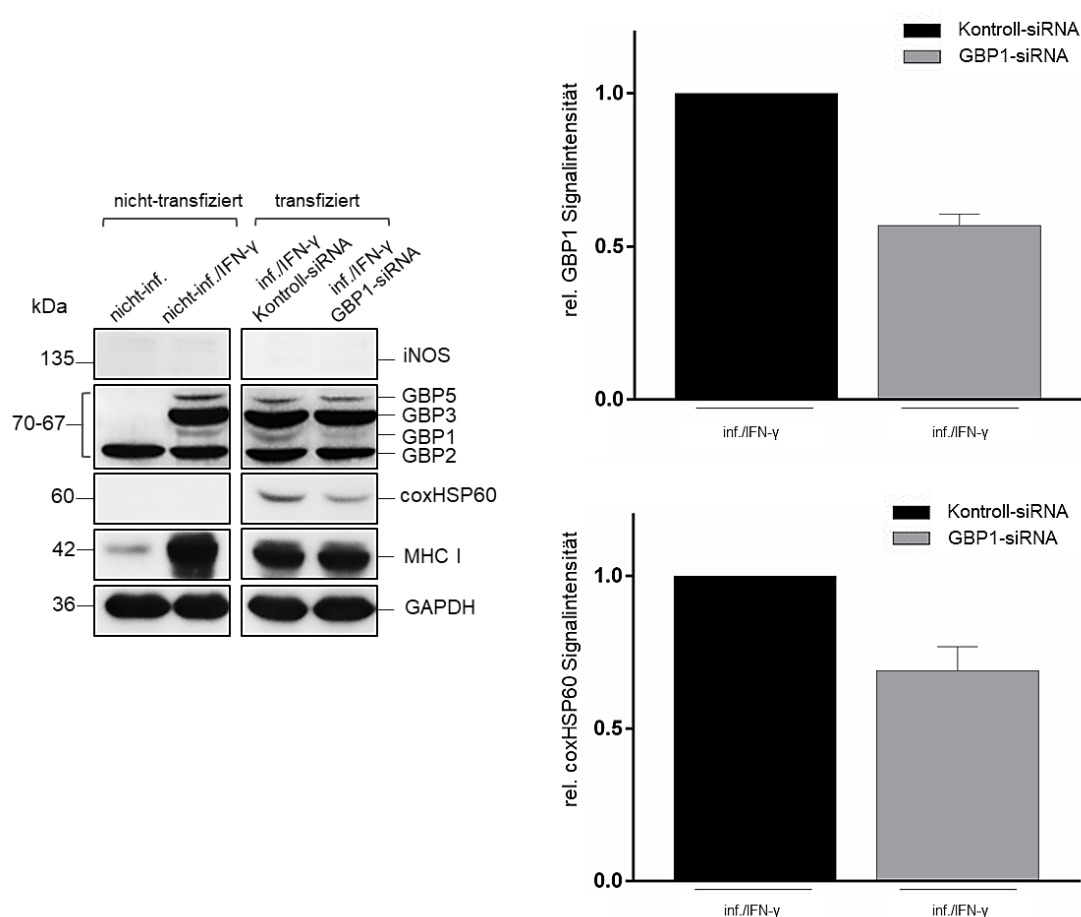
**Abbildung 4-25: Auswirkungen des NOS2 knock out auf die IFN- $\gamma$ -regulierte Selbstverteidigung *C. burnetii*-infizierter DCs**

**(A)** Vergleichende Western-Blot-Analyse nicht-infizierter und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter JAWS II-WT- und -KO-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) nach 72 h Kultivierung. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von coxHSP60 quantifiziert und auf GAPDH als Ladekontrolle normiert. Gezeigt ist die relative Signalintensität aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung, für die die jeweils unbehandelten Kontrollen von WT- und -KO-DCs auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Analyse wurde entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.6 durchgeführt (\*\*\*) $p < 0,001$  vs. Kontrolle (WT, infiziert + IFN- $\gamma$ );  $n=3$ ). **(B)** Messung der Nitritkonzentration aus Zellkulturüberständen nicht-infizierter und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter JAWS II-WT- und -KO-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) mittels Griess-Assay 72 hpi. Die statistische Analyse ist in Kapitel 3.6 beschrieben (n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle (KO, nicht-infiziert/infiziert ohne Behandlung); (\*\*\*) $p < 0,001$  vs. Kontrolle (WT nicht-infiziert/infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(C)** Durchflusszytometrie der Reinfektiosität von *C. burnetii* nach Kultivierung in JAWS II-WT- und -KO-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi). 72 hpi wurden die Bakterien mittels *syringe releasing* freigesetzt und für eine Infektion von Reporterzellen (L929-Fibroblasten) verwendet. Nach 72 h wurde die Fähigkeit zur Reinfektion durchflusszytometrisch über die Anfärbung mit dem  $\alpha$ -CoxII Antikörper nachgewiesen. Nicht-infizierte sowie *C. burnetii* (MOI 10, 72 hpi)-infizierte Reporterzellen wurden als Kontrollen mitgeführt. Gezeigt ist der

relative Anteil infizierter Reporterzellen, bei dem die reinfizierten, nicht-behandelten Kontrollen für WT- und -KO-DCs auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Auswertung aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung erfolgte wie in Kapitel 3.6 beschrieben (\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (WT, reinfiziert +IFN- $\gamma$ );  $n=3$ ). **(D)** Vergleichende elektronenmikroskopische Aufnahmen *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter JAWS II-WT (oben)- und -KO (unten)-Zellen in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi). Coxiellen-Strukturen wurden nachträglich grün eingefärbt.

Im Western-Blot von Abbildung 4-25 A wurde die *C. burnetii*-Infektion von WT- und KO-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  analysiert. Hierbei zeigte sich, dass das Fehlen von induziertem iNOS einen stark positiven Einfluss auf die Bakterienlast infizierter DCs hat (eine Steigerung um 75% im Vergleich zu wildtypischen DCs). Die parallel durchgeführten Griess-Assays (Abb. 4-25 B) bestätigten die fehlende NO-Synthese IFN- $\gamma$ -behandelter KO-DCs. Neben der Bakterienlast wurde auch die Infektiosität der Coxiellen aus DCs untersucht (Abb. 4-25 C). Für KO-DCs konnte eine um über  $\geq 50\%$  gesteigerte Reinfektion von Reporterzellen festgestellt werden. Dies macht deutlich, dass iNOS eine der Hauptkomponenten in der DC-Abwehr intrazellulärer Coxiellen ist. Dies geht auch deutlich aus der Elektronenmikroskopie der CCVs in WT- und KO-DCs hervor (Abb. 4-25 D). Im linken Teil der Abbildung 4-25 D sind CCVs infizierter WT- und KO-DCs in Abwesenheit von IFN- $\gamma$  dargestellt. In diesem Infektionszustand der DCs zeigen sich keine Unterschiede in der Morphologie, Größe und/oder der Anzahl der Coxiellen-Kompartimente. Die CCVs weisen sowohl SCVs als auch LCVs auf, ein Kennzeichen der Differenzierung und funktionalen Replikation von Coxiellen. Im rechten Teil von Abbildung 4-25 D sind infizierte WT- und KO-DCs in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  gezeigt. Während sich bei WT-DCs keine sichtbare CCV-Formierung zeigte und Bakterien nur vereinzelt im Zytosol auftraten, zeigte sich bei KO-DCs trotz der IFN- $\gamma$ -Anwesenheit die Ausbildung von CCVs. Zusammengefasst lässt dies den Schluss zu, dass die iNOS-Induktion mit ihrer NO-Synthese als effiziente zelluläre Abwehrstrategie infizierter DCs einen maßgeblichen Einfluss auf die CCV-Ausbildung und damit die Bakterienvitalität und -infektiosität nimmt.

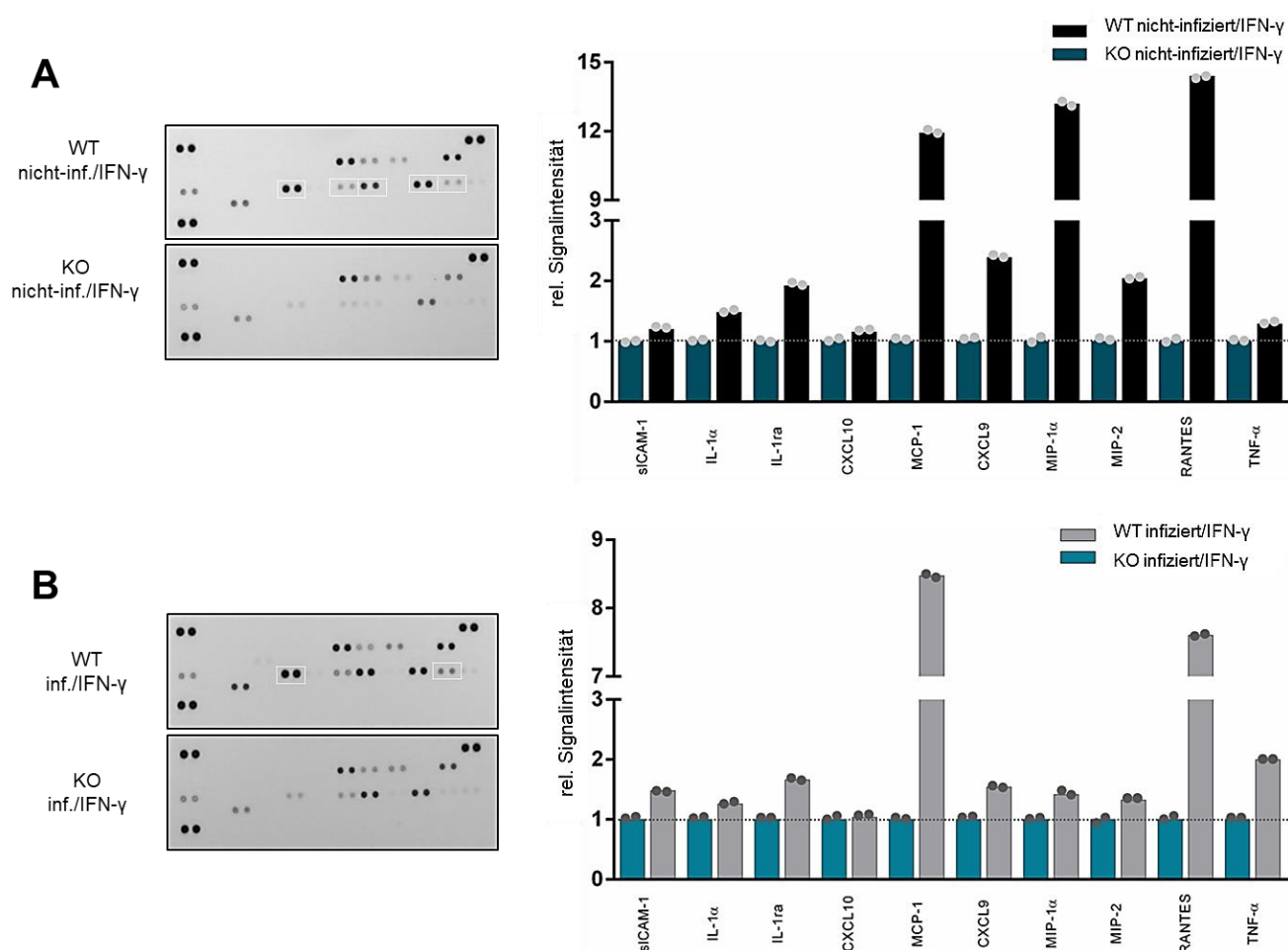
Die durchgeführten vergleichenden Analysen mit WT- und KO-DCs zeigen, dass der Hauptteil der IFN- $\gamma$ -vermittelten Selbstverteidigung *C. burnetii*-infizierter DCs offensichtlich auf die iNOS-vermittelte NO-Synthese zurückzuführen ist. Es besteht dennoch die Möglichkeit, dass in infizierten DCs noch weitere IFN- $\gamma$ -induzierte Abwehrmechanismen das iNOS/NO-System funktional ergänzen. Diese Aufgabe könnten zum Beispiel GBPs, eine Familie von GTPasen, die als Reaktion auf IFN- $\gamma$  induziert werden<sup>279</sup>, übernehmen. Sie vermitteln zellautonome Abwehrmechanismen über Auto-/Xenophagie gegen eine Vielzahl unterschiedlicher intrazellulärer Erreger<sup>279</sup>.



**Abbildung 4-26: Einfluss von IFN- $\gamma$  induziertem GBP1 auf die *C. burnetii*-Abwehr von DCs**

Gezeigt ist die Western-Blot-Analyse zur Untersuchung des siRNA-vermittelten GBP1-*silencing* in *C. burnetii*-infizierten JAWS II-KO-DCs 48 hpi. Die Zellen wurden zunächst mit GBP1-siRNA und Kontroll-siRNA transfiziert, nach 2,5 h mit Coxiellen (MOI 10) infiziert und 7 hpi mit IFN- $\gamma$  (100 U/ml) behandelt. Nicht-transfizierte und unbehandelte Zellen wurden als weitere Kontrollen integriert. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von GBP1 und coxHSP60 auf GAPDH als Ladekontrolle normiert. Dargestellt ist jeweils die relative Signalintensität, für die die Kontroll-siRNA auf 1 gesetzt wurde. Gezeigt sind Messungen aus zwei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung.

Als Teil des GPB-Systems nimmt GBP1 im Zusammenhang mit der IFN- $\gamma$ -induzierten Abwehr intrazellulärer Bakterien eine Schlüsselrolle ein <sup>276,277,298</sup>. Um den ergänzenden Einfluss von GBP1 bei der Coxiellen-Infektion in DCs zu untersuchen, wurde auf Basis der KO-DCs ein siRNA-vermitteltes GBP1-*silencing* durchgeführt. Wie die Immunblot-Analyse in Abbildung 4-26 belegt, wurde für GBP1 eine *knock down*-Effizienz von  $\geq 50\%$  erreicht. Es zeigte sich, dass der GBP1-*knock down* in infizierten IFN- $\gamma$ -behandelten KO-DCs nicht zu einer weiteren Zunahme der Bakterienlast, sondern wieder zu einer Reduktion dieser um 30% führte. Dies lässt vermuten, dass IFN- $\gamma$ -induziertes GBP1 eine Coxiellen-Infektion der DCs eher begünstigt als beeinträchtigt. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass das GBP-System intrazelluläre Erreger der Auto-/Xenophagie zuführt <sup>279</sup>. Da dieser Ablauf für die Coxiellen-Replikation in CCVs von entscheidender Bedeutung ist, könnte eine Blockierung dieses Schrittes durch den *knock down* von GBP1 einen negativen Einfluss auf die Coxiellen-Vermehrung haben. Es kann somit festgehalten werden, dass induziertes GBP1 als zellautonomes Abwehrprotein die anti-Coxiellen Abwehr über iNOS/NO vermutlich nicht ergänzt, sondern sogar eher mindert.



#### Abbildung 4-27: Untersuchung des Zyto-/Chemokinprofils der NOS2(KO)-DCs

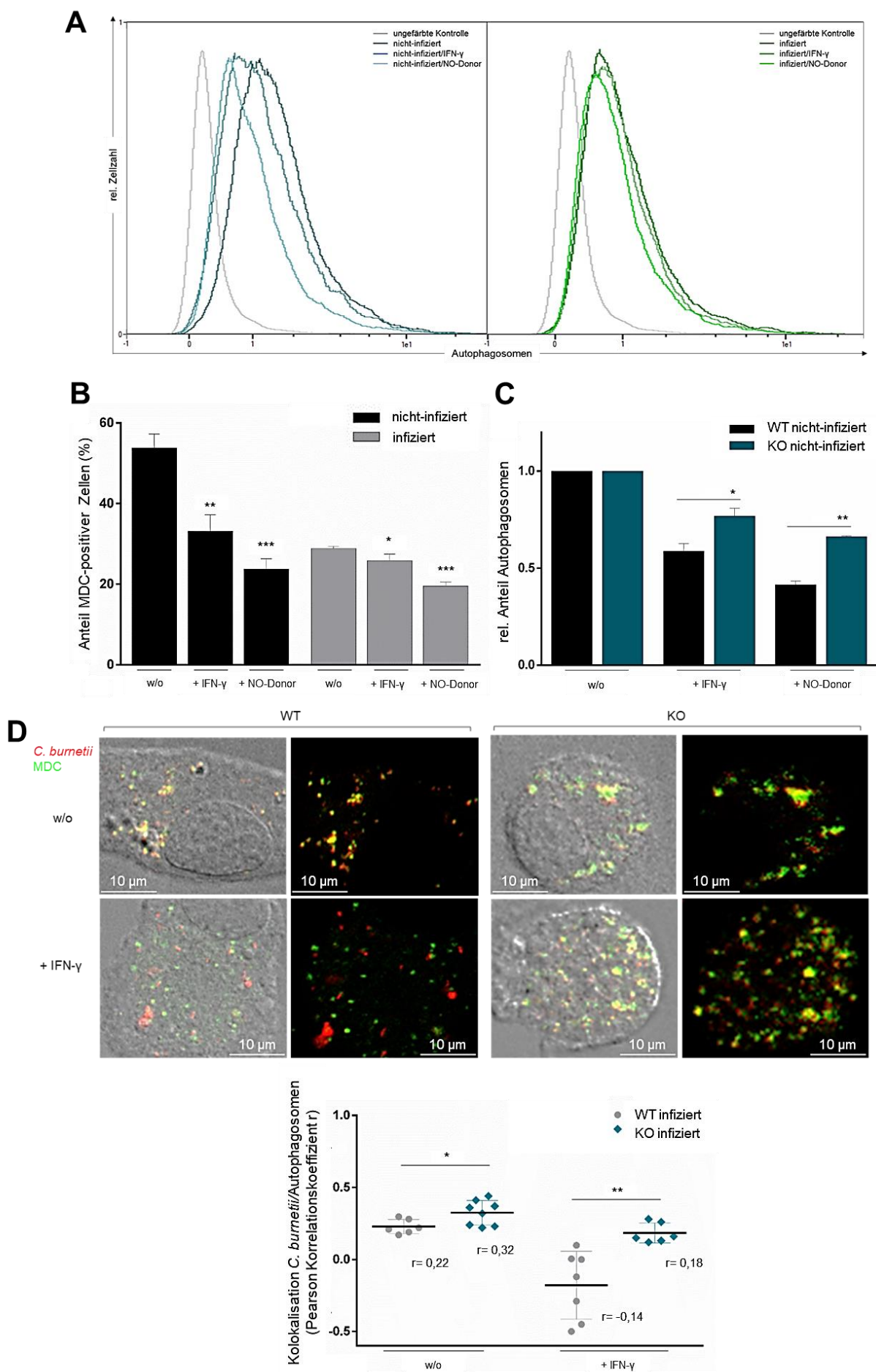
Vergleichende Analyse sekretierter Zytokine und Chemokine zwischen JAWS II-WT und -KO-DCs. Nicht-infizierte und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierte JAWS II-WT- und -KO-DCs wurden in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) für 72 h kultiviert. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und mittels Zytokinarray (R&D Systems) untersucht. Die densitometrische Analyse der einzelnen *Dot-Blots* erfolgte auf Basis der internen Kontrollen des Zytokinarrays mit Einführung eines *thresholds* für die mittlere Pixelintensität mit einem Wert von 2000. Niedrigere Pixelintensitäten wurden auf Grund der Schwäche des Signals aus der densitometrischen Analyse ausgeschlossen. Für die Darstellung der relativen Signalintensität wurden die Messdaten der nicht-infizierten und infizierten KO-DCs auf 1 gesetzt. Um Änderungen zwischen JAWS II-WT- und -KO-DCs festzustellen, wurden interne *thresholds* etabliert (Herunterregulation < 0,5; keine Änderung  $\pm$  1; Hochregulation > 2). **(A)** zeigt die relativen Unterschiede der nicht-infizierten JAWS II-WT-DCs im Vergleich zu den nicht-infizierten JAWS II-KO-DCs. **(B)** zeigt die entsprechenden Unterschiede während der *C. burnetii*-Infektion.

Zur weiteren Charakterisierung der iNOS-Defizienz wurden Zyto-/Chemokinprofile von WT- und KO-DCs nach IFN- $\gamma$ -Stimulation mittels Arrayanalyse (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.4.4) charakterisiert. Der Einfluss des iNOS-produzierten NO auf die Botenstoffausschüttung ist durch eine biphasische NF- $\kappa$ B-Regulation bestimmt<sup>417</sup>. Es wird angenommen, dass NO zu frühen Zeitpunkten und/oder in geringen Konzentrationen über eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung zur Induktion von Zyto-/Chemokinen führt, während zu späten Zeitpunkten mit höheren NO-Konzentrationen eine NF- $\kappa$ B-Inhibition die Zyto-/Chemokinsynthese/sekretion supprimiert<sup>418,419</sup>. Somit kann je nach zeitlicher Ausprägung des NF- $\kappa$ B-Effekts Induktion oder auch Suppression die Zyto-/Chemokinausschüttung dominieren<sup>417</sup>. Die Analyse in Abbildung 4-27 A zeigt, dass IFN- $\gamma$ -behandelte nicht-infizierte WT-DCs im Vergleich zu entsprechenden KO-DCs eine deutlich höhere Sekretion von MCP-1, MIP-1 $\alpha$  und RANTES aufweisen. Somit scheinen die über

NO kontrollierten Botenstoffe<sup>417</sup> in KO-DCs unterrepräsentiert zu sein. Dies lässt vermuten, dass hier die iNOS-vermittelte NF-κB-Aktivierung zur Zyto-/Chemokininduktion ausbleibt. Ein durchaus vergleichbares Bild zeigte sich auch bei den infizierten WT- und KO-DCs (Abb. 4-27 B). Auch hier wurde bei den WT- im Vergleich zu den KO-DCs eine ausgeprägte Ausschüttung von MCP-1 und RANTES detektiert. Jedoch zeigt sich dies nicht für die MIP-1α-Sekretion. Dies könnte auf eine spezifische infektionsbedingte Unterdrückung der entsprechenden Chemokinsekretion hindeuten, wie sie bereits auch für andere Pathogene beschrieben wurde<sup>420</sup>. Insgesamt zeigen die Untersuchungen auf, dass das Fehlen von iNOS in nicht-infizierten und infizierten DCs einen detektierbaren Einfluss auf die Ausschüttung NO-regulierter Zyto-/Chemokine nimmt und so auch als weiterer wichtiger Beleg für eine wirksame iNOS-Ausschaltung in KO-DCs steht.

Die in Abbildung 4-25 dargestellte Elektronenmikroskopie zeigt sehr große Unterschiede in der CCV-Ausbildung IFN-γ-behandelter infizierter WT- und KO-DCs. Die nachfolgenden Untersuchungen beschäftigten sich daher mit der Frage, welchen konkreten Einfluss iNOS/NO auf die Etablierung und Struktur der bakteriellen Kompartimente in infizierten DCs nimmt.





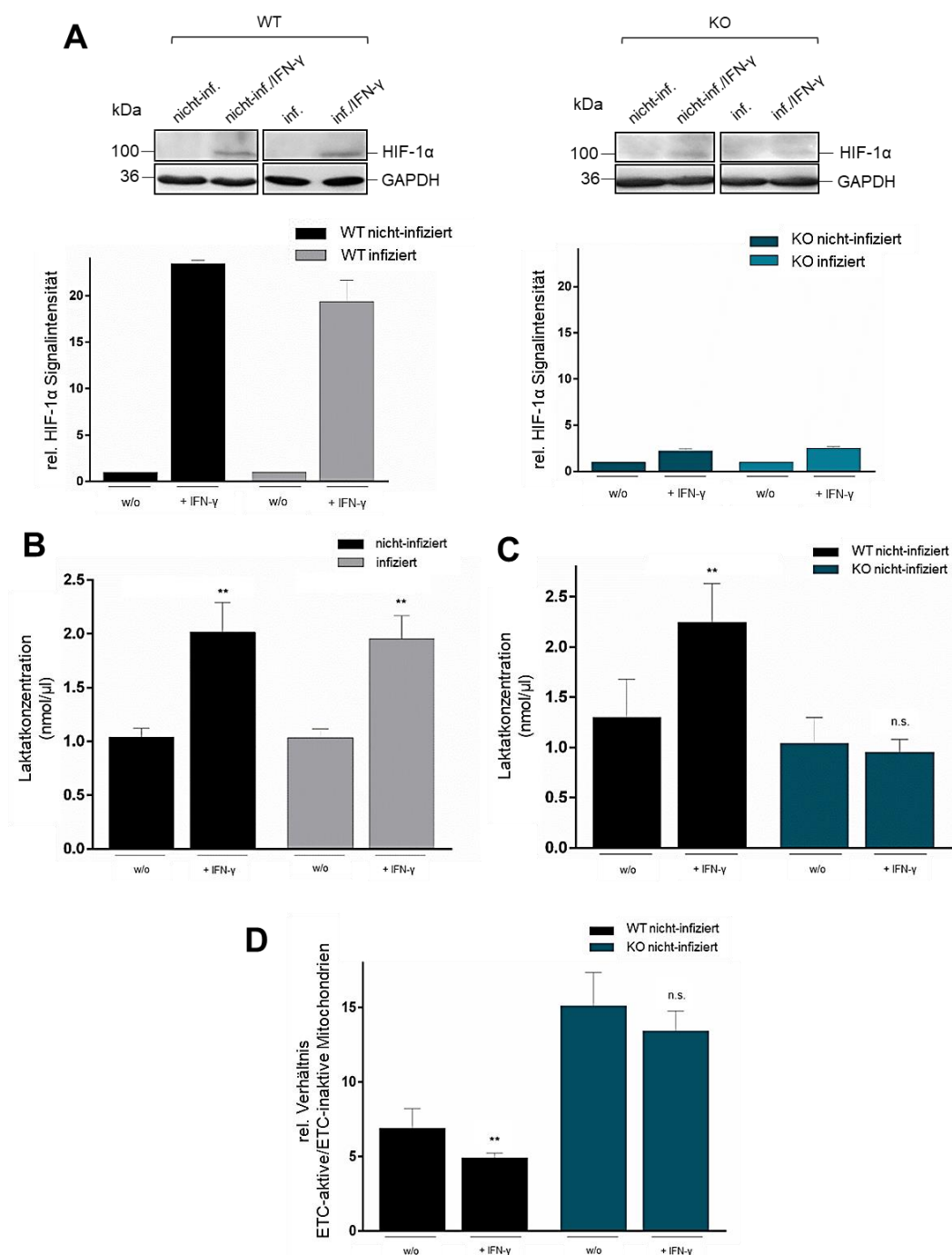
**Abbildung 4-28: NO-abhängige Reduktion von Autophagosomen in DCs**

**(A)** Repräsentative durchflusszytometrische Autophagosomen-Analyse nicht-infizierter und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) und dem NO-Donor (DETA NONOate, 100  $\mu$ M, 7 hpi) nach einer Inkubationszeit von 72 h. Ungefärbte Kontrollen wurden mitgeführt. **(B)** zeigt die Durchflusszytometrie der Autophagosomen nicht-infizierter und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) und dem NO-Donor (DETA NONOate, 100  $\mu$ M, 7 hpi) nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für den Autophagosomen-Nachweis wurde eine Monodansylcadaverin (MDC)-Färbung, wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben, durchgeführt. Nicht angefärbte Zellen wurden als Kontrollen verwendet. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Auswertung wurde entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.6 durchgeführt (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert ohne Behandlung); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert/infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(C)** zeigt eine ergänzende Untersuchung der Autophagosomen für nicht-infizierte JAWS II-WT- und -KO-DCs unter Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml) und dem NO-Donor (DETA NONOate, 100  $\mu$ M) nach 72 h Kultivierung. Dargestellt ist der relative Anteil der Autophagosomen, für den die unbehandelten WT- und KO-DCs auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Analyse auf Basis dreier unabhängiger Experimente  $\pm$  Standardabweichung erfolgte entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.6 (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (WT, nicht-infiziert + IFN- $\gamma$ ); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (WT, nicht-infiziert + NO-Donor);  $n=3$ ). **(D)** Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Autophagosomen (MDC, grün) in mit Coxiellen (tdTomato, MOI 10, rot) infizierten JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) 72 hpi. Eine Kollokalisation wurde anhand des Pearson Korrelationskoeffizienten  $r$  überprüft (AxioVision) und ist in der Abbildung unten dargestellt. Die statistische Analyse (siehe Kapitel 3.6) basiert auf mindestens sechs unabhängigen Präparatsfraktionen (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (WT, infiziert ohne Behandlung); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (WT, infiziert + IFN- $\gamma$ ); min.  $n=6$ ).

Entscheidend für die Etablierung der CCV in Wirtszellen sind funktionale Autophagosomen, für die eine negative regulatorische Einflussnahme durch das iNOS-induzierte NO angenommen wird<sup>421</sup>. Um zu prüfen, ob dies möglicherweise ausschlaggebend für die fehlende CCV-Etablierung in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  ist, wurden die vakuolären Kompartimente infizierter DCs genauer untersucht. Die durchflusszytometrische Untersuchung in Abbildung 4-28 A zeigt den Nachweis von Autophagosomen über MDC-Färbung in nicht-infizierten und infizierten DCs. Die Quantifizierung der Analyse ergab, dass die Anzahl der MDC-positiven DCs in Abhängigkeit von IFN- $\gamma$  (um 40%) und des NO-Donors (um 55%) reduziert ist, so dass gefolgert werden kann, dass die IFN- $\gamma$ -vermittelte NO-Synthese infizierter DCs in der Tat eine negative Auswirkung auf die Menge autophagosomaler Vakuolen besitzt (Abb. 4-28 B). Bei der Untersuchung ergab sich zudem, dass bereits das Ausgangsniveau der Autophagosomen infizierter DCs im Vergleich zu nicht-infizierten DCs um die Hälfte verringert war. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in infizierten DCs die von Coxiellen vereinnahmten Autophagosomen sehr stark modifiziert werden und hierdurch über MDC nicht mehr entsprechend angefärbt werden<sup>48</sup>. Die vergleichende Analyse von WT- und KO-DCs konnte zeigen, dass es in IFN- $\gamma$ -Anwesenheit bei WT-DCs zu einer signifikant stärkeren Autophagosomen-Reduktion kommt (Abb. 4-28 C). Interessanterweise ließ sich Entsprechendes auch in Anwesenheit eines extern hinzugegebenen NO-Donors beobachten. Somit scheinen sich WT- und KO-DCs bereits im nicht-induzierten Ausgangszustand in der NO-Regulation sowie der Stabilität ihrer Autophagosomen zu unterscheiden. Hierfür verantwortlich könnte die präexistierende beziehungsweise fehlende Basalexpression von iNOS in den untersuchten WT- und KO-DCs sein (Abb. 4-14 A). In der Tat zeigen Immunfluoreszenzen (Abb. 4-28 D), dass KO-DCs im Gegensatz zu WT-DCs bereits im Ausgangszustand eine wesentlich höhere Kollokalisation von Coxiellen (rot) und Autophagosomen (grün) aufweisen und diese auch in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  weitgehend erhalten bleibt, wohingegen IFN- $\gamma$ -stimulierte WT-DCs diese charakteristische Kollokalisation der intrazellulären Bakterien verlieren. Dies legt nahe, dass iNOS sowohl im Grundzustand als auch nach Induktion einen negativen Einfluss auf die Bildung autophagischer Coxiellen-Kompartimente hat.



Da das durch iNOS produzierte NO als Stickstoffradikal nicht in selektiver Weise auf intrazelluläre Bakterien einwirkt, sind protektive Mechanismen notwendig, die die iNOS-exprimierende Wirtszelle effektiv vor dem selbstproduzierten NO schützen. Davon betroffen sind hier insbesondere die für die ATP-basierende Energieversorgung verantwortlichen Mitochondrien. NO und NO-Derivate greifen die mitochondriale Atmungskette über Inhibition der Cytochrom *c*-Oxidase oder Nitrosylierung der Elektronentransportkette (*electron transport chain*, ETC) an<sup>422,423</sup>. Um die Verfügbarkeit zellulärer ATPs auch in Anwesenheit einer erhöhten NO-Konzentration und geschädigter Mitochondrien zu gewährleisten, können DCs ihren Energiestoffwechsel mittels „*metabolic switch*“ von OXPHOS auf aerobe Glykolyse umstellen<sup>330</sup>. Daher ergab sich die Frage, ob bei IFN- $\gamma$ -induzierter NO-Synthese ein entsprechender zellulärer Protektionsmechanismus auch bei Coxiellen-infizierten DCs zu beobachten ist.

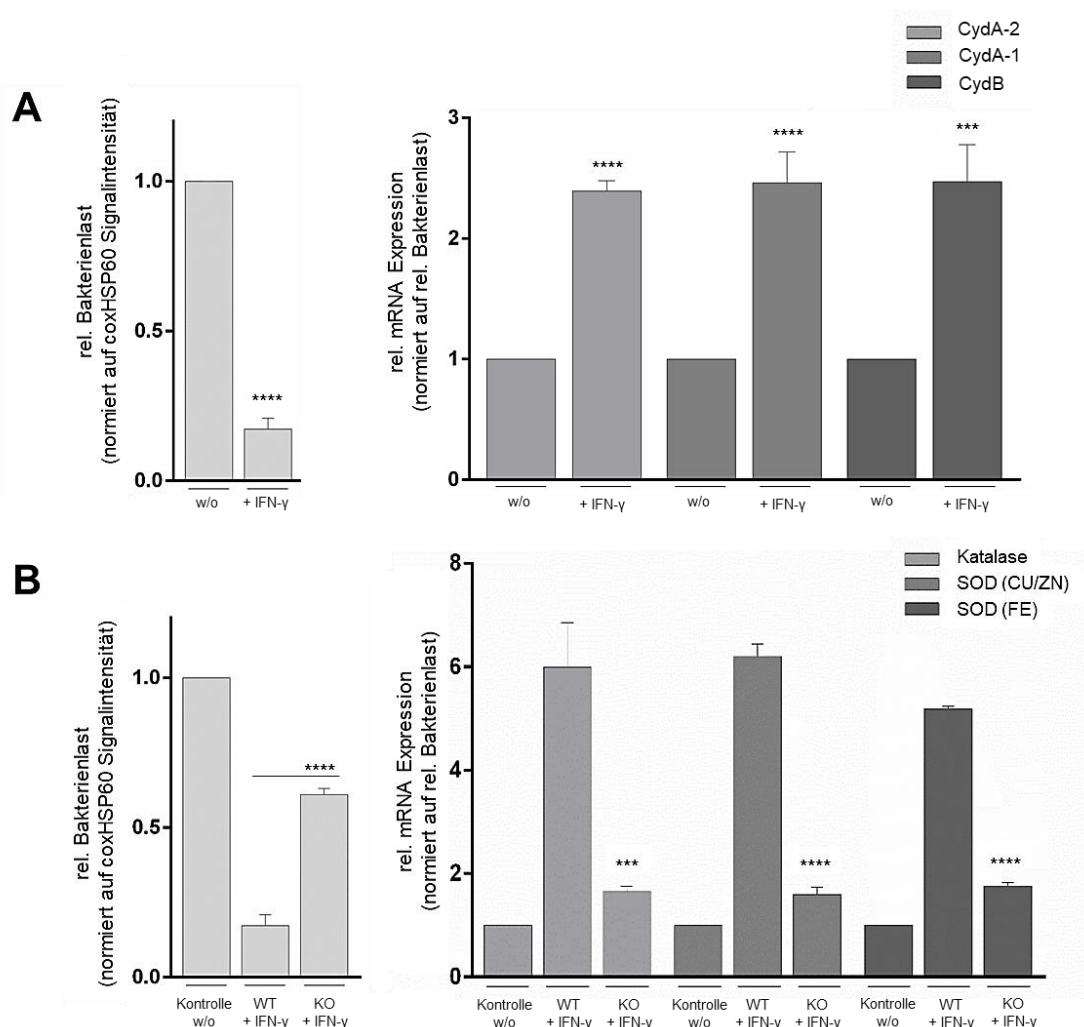


**Abbildung 4-29: Zellulärer Selbstschutz von DCs gegenüber mitotoxischem NO**

**(A)** Western-Analyse des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$ . Nicht-infizierte und Coxiellen (MOI 10)-infizierte JAWS II-DCs wurden in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml) und Cobaltchlorid (100  $\mu$ M) für 72 h kultiviert. GAPDH wurde als Ladekontrolle mitgeführt. Für die densitometrische Analyse wurden die Signalintensitäten von HIF-1 $\alpha$  quantifiziert und auf die Ladekontrolle normiert. Dargestellt ist die relative Signalintensität aus einem Experiment  $\pm$  Standardabweichung (auf Basis der Analyse dreier verschiedener Expositionen), für die die Kontrolle auf 1 gesetzt wurde. **(B)** Quantifizierung der Laktatkonzentration (*L-Lactate-Assay Kit*, abcam/Sigma-Aldrich) in nicht-infizierten und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierten JAWS II-DCs 72 hpi unter Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi). Dargestellt sind die Messungen aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.6 beschrieben (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert/infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(C)** Quantifizierung der Laktatkonzentration (*L-Lactate-Assay Kit*, abcam/Sigma-Aldrich) in nicht-infizierten JAWS II-WT- und -KO-DCs unter Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml). Dargestellt sind die Messungen aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte gemäß den Ausführungen in Kapitel 3.6 (n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle (KO, nicht-infiziert ohne Behandlung); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (WT, nicht-infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(D)** Analyse der Mitochondrien von JAWS II-WT- und -KO-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml) nach 72 h Kultivierung mittels JC-1 Kit (Cayman Chemical). Dargestellt ist das relative Verhältnis intakter/ETC-aktiver (JC-1-Aggregat) zu defekter/ETC-inaktiver (JC-1-Monomer) Mitochondrien aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Auswertung ist in Kapitel 3.6 erläutert (n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle (KO, nicht-infiziert ohne Behandlung); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (WT, nicht-infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ).

Da der „*metabolic switch*“ in Abhängigkeit von NO-stabilisiertem HIF-1 $\alpha$  reguliert wird<sup>232-234</sup>, wurde zunächst mittels Western-Blot überprüft, ob eine Ausprägung dieses Schlüsselfaktors in den IFN- $\gamma$ -stimulierten WT- und KO-DCs detektiert werden kann (Abb. 4-29 A). WT-DCs zeigten unabhängig vom Infektionsstatus eine IFN- $\gamma$ -induzierte Expression von HIF-1 $\alpha$  (Faktor 20-23), welche in den KO-DCs nur marginal sichtbar war (Faktor 2-2,5). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  in IFN- $\gamma$ -Anwesenheit primär über induziertes NO stattfindet und daher in den KO-DCs ausbleibt. Um zu zeigen, dass auf die HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung tatsächlich eine metabolische Umprogrammierung zum Schutz der Wirtszelle folgt, wurde die Laktatkonzentration als Glykolyse-Marker<sup>371</sup> mittels enzymatischem Assay bestimmt (Abb. 4-29 B). Sowohl nicht-infizierte als auch infizierte WT-DCs zeigten in Reaktion auf IFN- $\gamma$  eine um den Faktor  $\leq 2,5$  gesteigerte Laktatsynthese. Das Ausbleiben eines entsprechenden Laktatanstiegs bei KO-DCs deutet darauf hin, dass die metabolische Umprogrammierung der DCs in iNOS-abhängiger Weise ausgelöst wird (Abb. 4-29 C). Um den NO-Einfluss auf die Funktionalität der Mitochondrien zu überprüfen, wurde der Anteil ETC-aktiver und -inaktiver Mitochondrien durchflusszytometrisch über die JC-1-basierte Messung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_M$ ) bestimmt (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.3.6). Dabei steht ein hohes  $\Delta\psi_M$  für eine hohe mitochondriale Aktivität/ATP-Produktion, wohingegen eine geringe mitochondriale Aktivität/ATP-Produktion durch ein niedriges  $\Delta\psi_M$  widerspiegelt wird. Die Anwesenheit von IFN- $\gamma$  reduzierte die Mitochondrienfunktion in WT-DCs um 35%. Im Gegensatz dazu wurde keine entsprechende Beeinträchtigung für KO-DCs gemessen. Im Vergleich zu WT-DCs zeigten KO-DCs ein doppelt so hohes Niveau aktiver Mitochondrien in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$ . Dies legt nahe, dass bereits im Grundzustand der DCs das Fehlen einer basalen iNOS-Expression (Abb. 4-14 A) die Menge an funktionalen Autophagosomen (Abb. 4-28) und Mitochondrien in positiver Weise beeinflusst. Zusammenfassend weisen die Untersuchungen darauf hin, dass infizierte DCs in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  durch NO-Produktion eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  bewirken. Durch die HIF-1 $\alpha$ -nachgeschaltete metabolische Umprogrammierung sichern die DCs mittels aerober Glykolyse trotz inaktiver Mitochondrien ihr Überleben und ermöglichen so gleichzeitig die iNOS-basierte Eliminierung der Coxiellen.

Auch aufseiten eindringender Pathogene bestehen Protektionsmechanismen gegen NO und seine Derivate. Für verschiedene Bakterien ist beschrieben, dass sie ihre Energiegewinnung auf Basis von Cytochrom *bd* sichern, was eine funktionale ETC in Gegenwart des inhibierenden NO gewährleistet und eine effiziente Detoxifizierung des Radikals ermöglicht<sup>424,425</sup>. Zudem besitzen Bakterien antioxidative Enzyme zur direkten Abwehr von O<sub>2</sub>-Radikalen, die mit NO zu Peroxynitrit reagieren<sup>426</sup>, insbesondere Katalase und SOD<sup>427,428</sup>. In nachfolgenden Experimenten wurden daher Studien zur funktionalen Bedeutung der Coxiellen-exprimierten Proteine Cytochrom *bd*, Katalase und SODs bei der pathogenvermittelten NO-Abwehr untersucht.



**Abbildung 4-30: *C. burnetii*-spezifische Abwehrmechanismen gegenüber bakteriotoxischem NO**

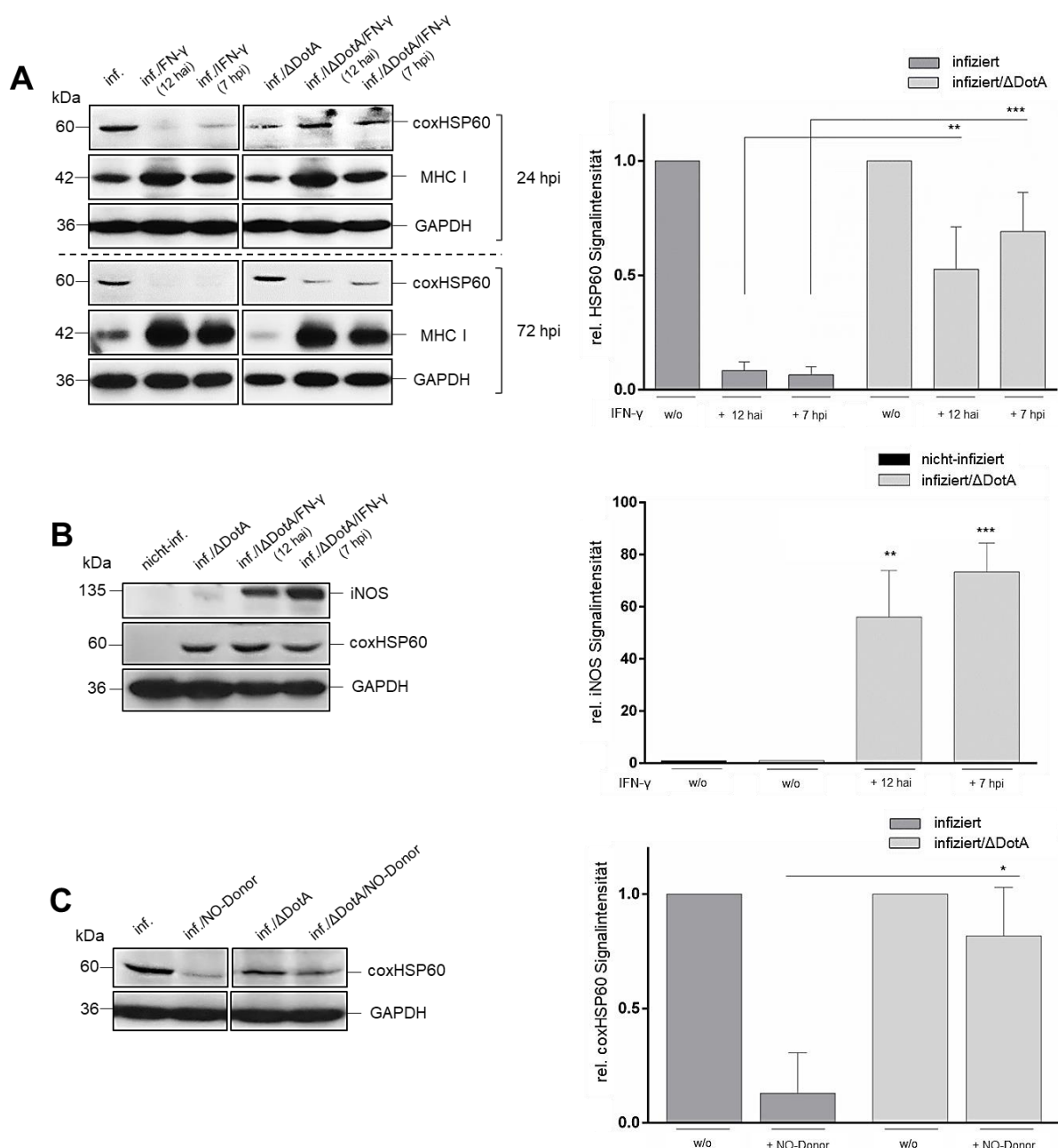
**(A)** Vergleichende semi-quantitative PCR-Analyse der Transkriptmengen verschiedener Cytochrom *bd*-Untereinheiten (CydA-1, CydA-2, CydB) in *C. burnetii* (MOI 10)-infizierten JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml). Nicht-infizierte JAWS II-DCs und NTCs wurden als Kontrollen mitgeführt. Murines GAPDH wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Dargestellt ist die relative mRNA Expression der Cytochrom *bd*-Untereinheiten (rechts), die anhand der coxHSP60-Expression auf die relative Bakterienlast (links) normiert wurde. Für die relative Darstellung wurde die Kontrolle (infiziert, ohne Behandlung) auf 1 gesetzt. Gezeigt sind die Resultate aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.6 (\*\*\* $p$ <0,001 vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung); \*\*\*\* $p$ <0,001 vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(B)** Vergleichende semi-quantitative PCR-Analyse der Transkriptmengen verschiedener bakterieller antioxidativer Enzyme (Katalase, SOD (FE), SOD (CU/ZN)) in *C. burnetii* (MOI 10)-infizierten JAWS II-WT- und -KO-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi). Nicht-infizierte JAWS II-WT-DCs und NTCs wurden als Kontrollen mitgeführt. Murines GAPDH wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Dargestellt ist die relative mRNA Expression der antioxidativen Enzyme (rechts), die anhand der coxHSP60-Expression auf die relative Bakterienlast (links) normiert wurde. Die infizierte Kontrolle (ohne Behandlung) wurde auf 1 gesetzt. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung.

Die statistische Auswertung wurde entsprechend den Erläuterungen in Kapitel 3.6 durchgeführt (\*\*p<0,001 vs. Kontrolle (WT infiziert + IFN- $\gamma$ ); \*\*\*p<0,0001 vs. Kontrolle (WT infiziert + IFN- $\gamma$ ); n=3).

Die Auswertung der PCR-Analyse infizierter DCs in Abbildung 4-30 A zeigt die auf die Bakterienlast normalisierte relative Cytochrom *bd*-mRNA Expression von *C. burnetii*. Die Analyse ergab, dass die mRNA Expression der drei Cytochrom *bd*-Untereinheiten (CydA-2 [CBU\_0965], CydA-1 [CBU\_0218] und CydB [CBU\_0966]) in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  signifikant hochreguliert ist, so dass von einer Aktivierung des Cytochrom *bd* als Reaktion auf das induzierte NO der Wirts-DCs auszugehen ist. Abbildung 4-30 B zeigt die PCR-Analyse der Coxiellen-Enzyme Katalase (CBU\_0281) und SOD (CU/ZN: Kupfer-Zink-vermittelt [CBU\_1822], FE: Eisen-vermittelt [CBU\_1708]) nach Normalisierung auf die jeweilige Bakterienlast. Hier konnte beobachtet werden, dass eine Coxiellen-Infektion in WT-DCs in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  eine starke Induktion der Katalase- und SOD-Transkripte hervorruft, wohingegen keine entsprechende Hochregulation für KO-DCs beobachtet wurde. Die Ergebnisse der infizierten WT- und KO-DCs lassen den Schluss zu, dass die intrazellulären Coxiellen zur Reduktion des von iNOS produzierten NO sowie seiner Oxidationsderivate Cytochrom *bd*, Katalase und SODs induzieren und so der zellulären Abwehr infizierter DCs direkt entgegenwirken.

#### 4.5.3 Rolle des bakteriellen DotA bei der *C. burnetii*-Infektion in DCs

Das T4SS der Coxiellen ist durch die Sekretion einer Vielzahl von Effektormolekülen entscheidend für die Wirts-Pathogen-Interaktion<sup>93-97</sup>. Speziell der T4SS-Komponente DotA wird eine besondere Bedeutung für den Metabolismus der Coxiellen zugeschrieben<sup>61</sup>. Um die Bedeutung dieser bakteriellen Komponente für den Verlauf der DC-Infektion zu untersuchen, wurden die nachfolgend beschriebenen Infektionsexperimente unter Einsatz eines DotA-defizienten ( $\Delta$ DotA) *C. burnetii*-Stamms durchgeführt.



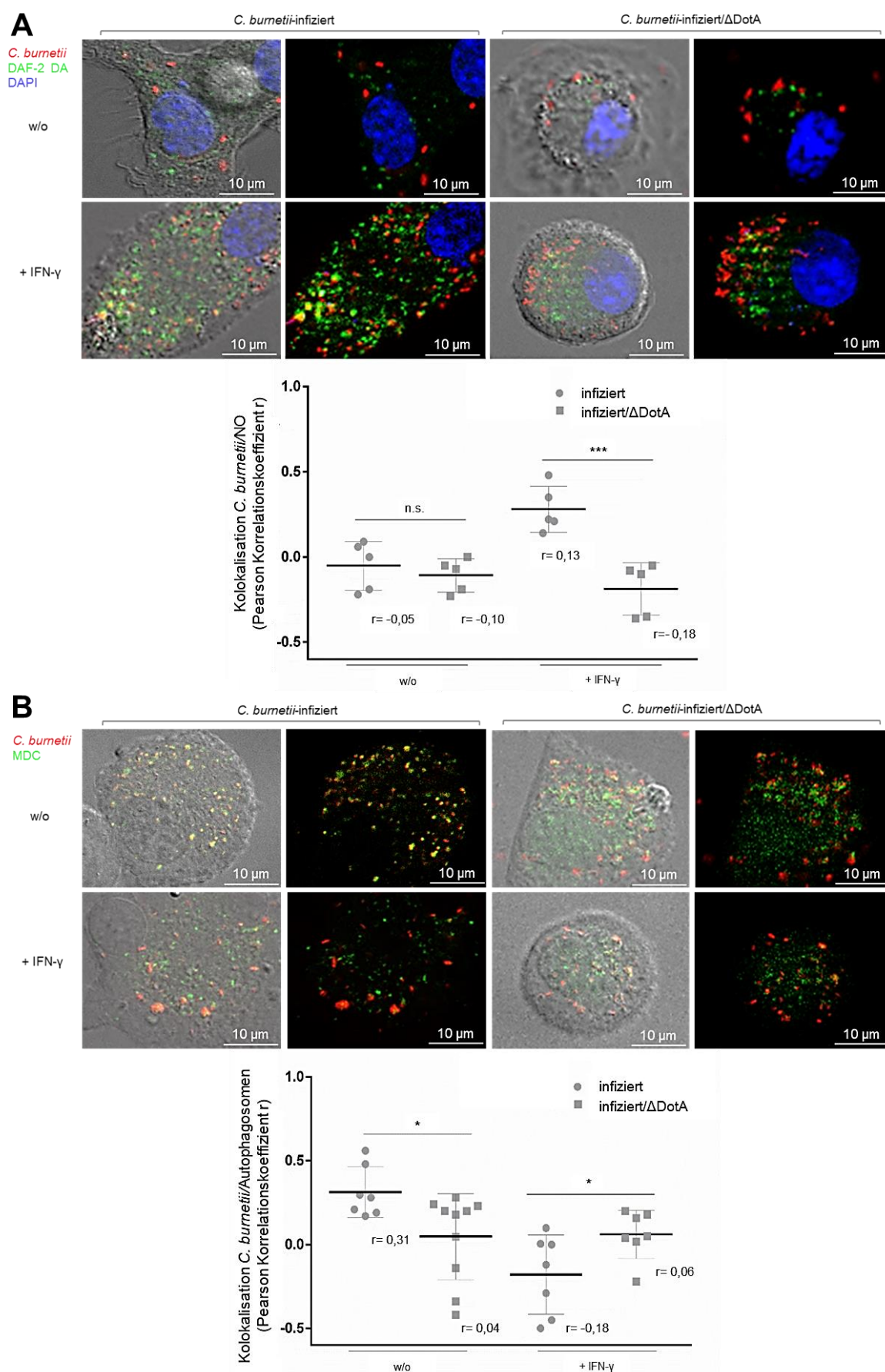
**Abbildung 4-31: Bedeutung der *C. burnetii* T4SS-Komponente DotA während der Infektion von DCs**

**(A)** Western-Blot-Analyse *C. burnetii* (MOI 10)- und *C. burnetii*  $\Delta$ DotA (MOI 10)-infizierter JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 12 hai, 7 hpi) 24 hpi und 72 hpi. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von coxHSP60 (72 hpi) quantifiziert und auf die mitgeführte Ladekontrolle GAPDH normiert. Dargestellt ist die relative Signalintensität, für die die unbehandelten Kontrollen (*C. burnetii* & *C. burnetii*  $\Delta$ DotA) auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Analyse auf Basis von drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung folgt der Beschreibung in Kapitel 3.6 (\*\*p < 0,01 vs. Kontrolle (infiziert + IFN- $\gamma$  12 hai); \*\*\*p < 0,001 vs. Kontrolle (infiziert + IFN- $\gamma$  7 hpi); n=3). **(B)** zeigt die Western-Blot-Analyse der iNOS-Expression während einer *C. burnetii*  $\Delta$ DotA (MOI 10)-Infektion in JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 12 hai, 7 hpi) nach 72 h. Als Kontrolle wurden nicht-infizierte Zellen mitgeführt. Für die densitometrische Auswertung wurden die Bandenintensitäten von iNOS quantifiziert und auf GAPDH normalisiert. Dargestellt ist die relative Signalintensität aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung, für die die infizierte, unbehandelte Kontrolle auf 1 gesetzt wurde. Die statistische Auswertung wurde entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.6 durchgeführt (\*\*p < 0,01 vs. Kontrolle (infiziert/ $\Delta$ DotA ohne Behandlung); \*\*\*p < 0,001 vs. Kontrolle (infiziert/ $\Delta$ DotA ohne Behandlung); n=3). **(C)** Vergleichende Western-Blot-Analyse der NO-Effekte auf *C. burnetii* (MOI 10) und *C. burnetii*  $\Delta$ DotA (MOI 10) während der DC-Infektion. Die infizierten JAWS II-DCs wurden mit einem NO-Donor (DETA NONOate, 100  $\mu$ M, 7 hpi) behandelt oder unbehandelt für 72 h inkubiert. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von coxHSP60 quantifiziert und auf die Ladekontrolle (GAPDH) normalisiert. Gezeigt ist die relative Signalintensität aus drei Experimenten  $\pm$  Standardabweichung, für die die unbehandelten Kontrollen (*C. burnetii* & *C. burnetii*  $\Delta$ DotA) auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Aufbereitung erfolgte entsprechend den Erläuterungen in Kapitel 3.6 (\*p < 0,05 vs. Kontrolle (infiziert + NO-Donor); n=3).

Die Immunblot-Analyse in Abbildung 4-31 A vergleicht den Infektionsverlauf in DCs unter Einsatz von *C. burnetii* mit und ohne DotA ( $\Delta$ DotA, T4SS-defekt). Die Reduktion der Bakterienlast in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  war für die T4SS-defekten Coxiellen wesentlich schwächer ausgeprägt als für die wildtypischen Coxiellen (Unterschied Faktor 3-4), obschon für beide Situationen eine vergleichbare iNOS-Induktion zu beobachten war (Faktor 80; Abb. 4-31 B). Dies deutet darauf hin, dass Bakterien ohne funktionales T4SS weit weniger empfindlich gegenüber der IFN- $\gamma$ -induzierten anti-Coxiellen Abwehr in DCs sind. Um zu untersuchen, ob dieses Phänomen auf eine direkte Resistenz gegenüber dem induzierten NO zurückzuführen ist, wurde der Radikaleinfluss mittels NO-Donor analysiert (Abb. 4-31 C). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bakterienlast T4SS-defekter Coxiellen in Anwesenheit des NO-Donors signifikant höher war (Faktor 4) als die der WT-Coxiellen unter entsprechenden Infektionsbedingungen. Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass die Funktionalität des Coxiellen-T4SS für die Effizienz der NO-vermittelten Abwehr in infizierten DCs entscheidend ist.

In nachfolgenden Experimenten wurde den Fragen nachgegangen, wie die gefundene NO-Insensitivität T4SS-defizienter Coxiellen und die bakteriotoxische NO-Wirkungsweise erklärt werden kann.





**Abbildung 4-32: DotA als limitierender Faktor gegenüber der IFN- $\gamma$ -induzierten Abwehr *C. burnetii*-infizierter DCs** (A) zeigt den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis (oben) von NO (DAF-2 DA, grün) in *C. burnetii* (tdTomato, MOI 10, rot)- und *C. burnetii*  $\Delta$ DotA (MOI 10, rot)-infizierten JAWS II-DCs unter Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi). Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Eine Kolokalisation wurde anhand des Pearson Korrelationskoeffizienten r

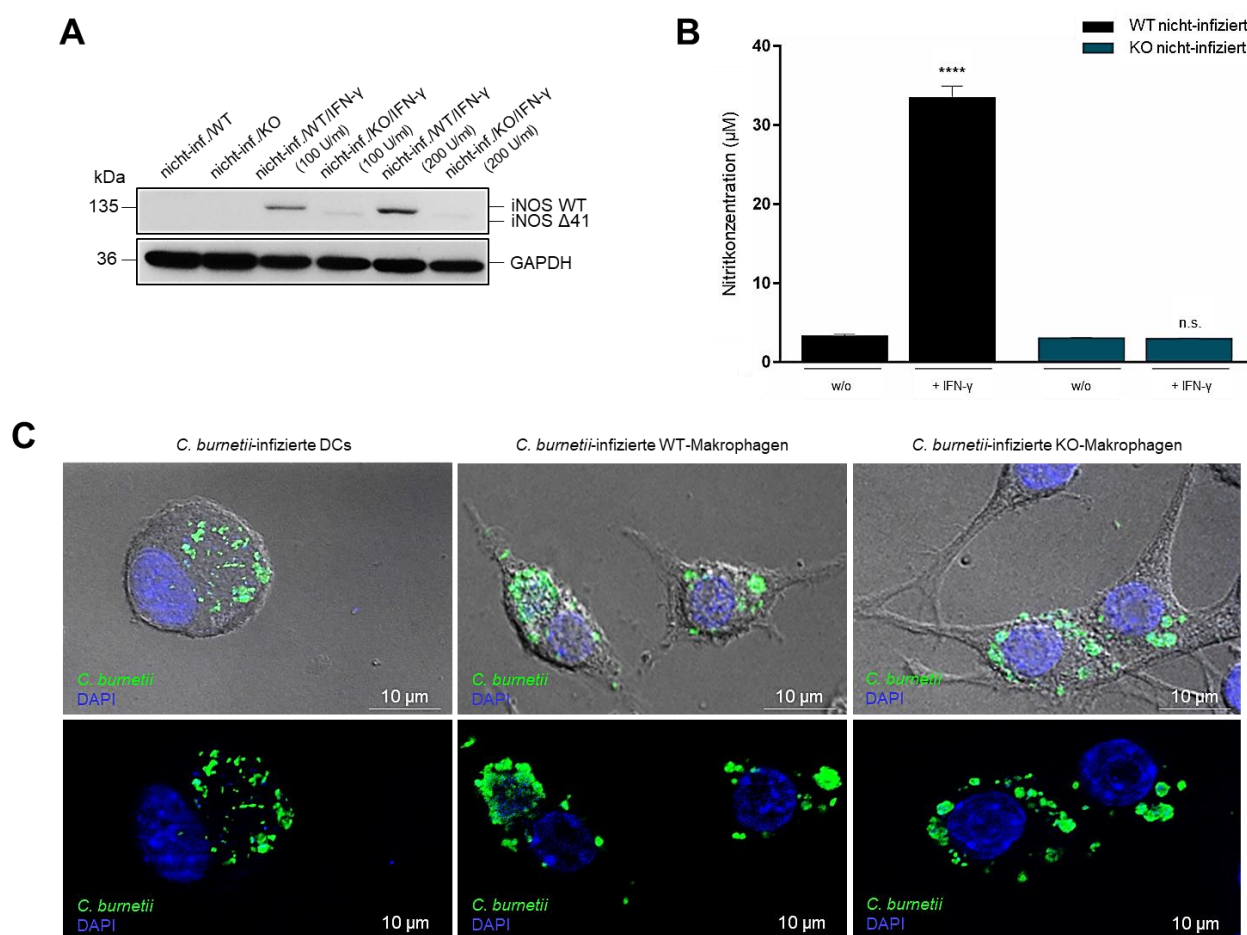
überprüft (AxioVision) und ist in der Abbildung unten dargestellt. Die statistische Analyse (siehe Kapitel 3.6) basiert auf fünf unabhängigen Präparatsfraktionen (n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (infiziert + IFN- $\gamma$ );  $n=5$ ). **(B)** Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Autophagosomen (MDC, grün) in *C. burnetii* (tdTomato, MOI 10, rot)- und *C. burnetii*  $\Delta$ DotA (MOI 10, rot)-infizierten JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) 72 hpi. Die Kolokalisation zwischen Bakterien und Autophagosomen wurde anhand des Pearson Korrelationskoeffizienten  $r$  überprüft (AxioVision) und ist unten gezeigt. Die statistische Analyse ist in Kapitel 3.6 dargelegt und basiert auf mindestens sieben unabhängigen Präparatsfraktionen (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung); \* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert + IFN- $\gamma$ ); min.  $n=7$ ).

Auf Basis der Immunfluoreszenz in Abbildung 4-32 A wurden Kolokalisationsstudien des NO-Markers (DAF-2 DA, grün) mit wildtypischen sowie T4SS-defekten Coxiellen (rot) in infizierten DCs durchgeführt. Während in Abwesenheit von IFN- $\gamma$  keine Unterschiede zwischen den WT- und defizienten Coxiellen detektiert wurden, zeigte sich in Interferon-Anwesenheit eine deutliche Kolokalisation zwischen WT-Coxiellen und NO-Marker ( $r=0,13$ ), welche im Fall der  $\Delta$ DotA-Coxiellen nicht zu beobachten war ( $r=-0,18$ ). Daraus lässt sich schließen, dass nur ein intaktes T4SS die bakterielle Zugänglichkeit des Radikals vermitteln kann. Es stellte sich nun die Frage, ob und in welchem Maße T4SS-defekte-Coxiellen von der NO-vermittelten Reduktion autophagosomaler Vakuolen betroffen sind (Abb. 4-28). Zu Klärung dieses Punktes wurde mittels Immunfluoreszenzanalyse (Abb. 4-32 B) die Interaktion zwischen Autophagosomen (MDC, grün) und Bakterien (rot) in infizierten DCs untersucht. Es zeigte sich, dass T4SS-defekte Coxiellen im Vergleich zu den wildtypischen Bakterien weder in Ab- noch in Anwesenheit von IFN- $\gamma$ -Zugabe eine autophagosomale Kolokalisation aufwiesen ( $r=0,04$  und  $r=0,06$ ). In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien<sup>429</sup> weisen die Beobachtungen darauf hin, dass T4SS-defekte Coxiellen nicht in der Lage sind, CCV-Autophagosom-Interaktionen zu steuern. Somit fällt ein wichtiges NO-Target zur Bekämpfung intrazellulärer Coxiellen durch infizierte DCs weg, da sich die intrazellulären Erreger nicht in autophagosomalen Vakuolen aufhalten.

#### 4.5.4 Bedeutung von iNOS/NO während der *C. burnetii*-Infektion in Makrophagen

Neben DCs spielen auch Makrophagen eine wichtige Rolle bei der initialen Coxiellen-Infektion, da insbesondere Alveolar-Makrophagen der Lunge mit *C. burnetii* konfrontiert sind<sup>21</sup> und der Erreger ein Infektionstropismus für mononukleären Phagozyten aufweist<sup>39,40</sup>. Somit stellte sich die Frage nach der funktionalen Bedeutung von iNOS in der antibakteriellen Abwehr *C. burnetii*-infizierter Makrophagen.



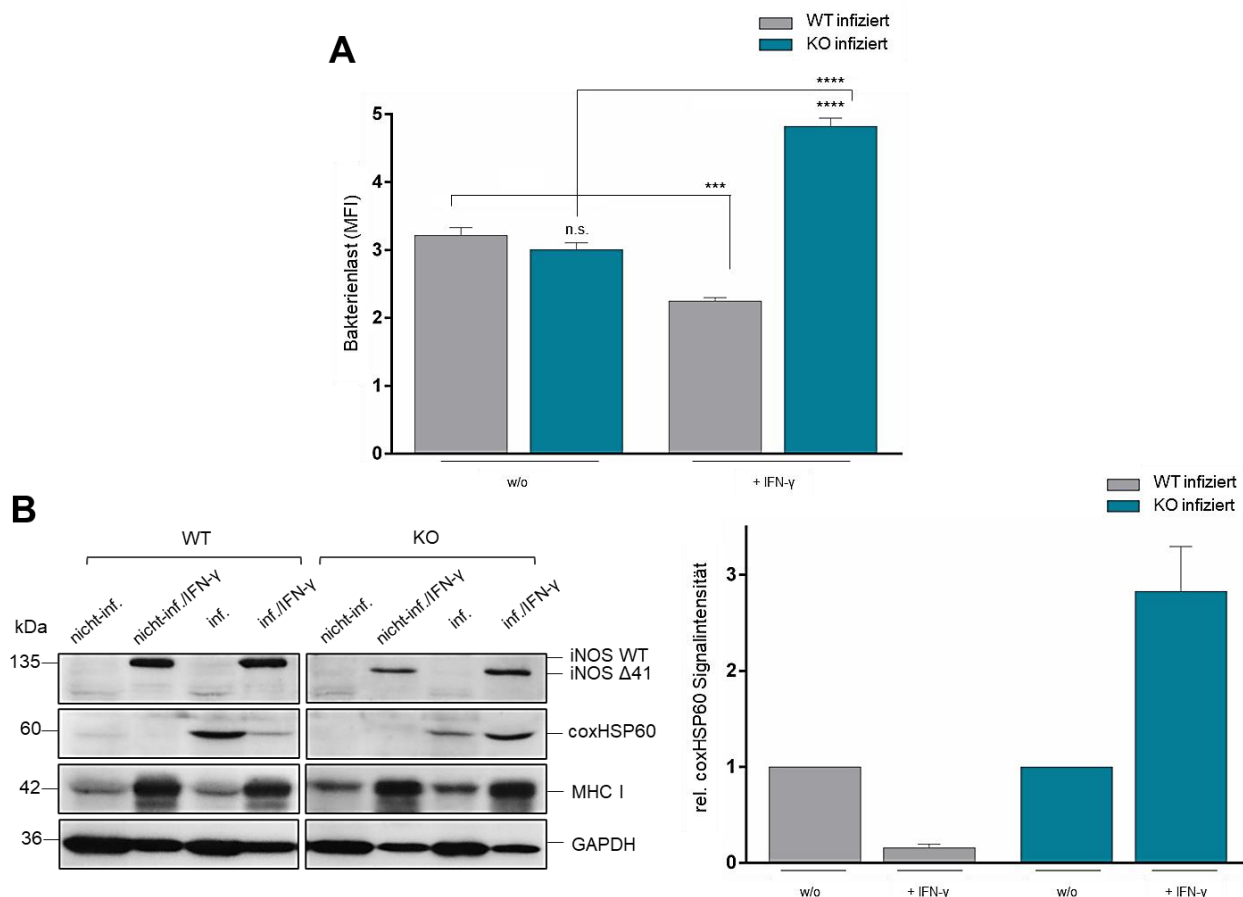


**Abbildung 4-33: Charakterisierung der *C. burnetii*-Infektion in WT- und -NOS2(KO)-Makrophagen**

(A) Western-Blot-Analyse der iNOS (WT und Δ41)-Expression in nicht-infizierten RAW 264.7-WT- und -KO-Makrophagen unter Zugabe verschiedener IFN-γ Konzentrationen (100 U/ml, 200 U/ml). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. (B) Griess-Assay zur Messung der Nitritkonzentration in den Zellkulturüberständen von nicht-infizierten RAW 264.7-WT- und -KO-Makrophagen unter Zugabe von IFN-γ (100 U/ml) nach 72 h Inkubation. Die statistische Analyse aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung wurde entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.6 durchgeführt (n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle (KO, nicht-infiziert ohne Behandlung); \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (WT, nicht-infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). (C) Vergleichende immunfluoreszenzmikroskopische Analyse bakterieller Strukturen ( $\alpha$ -CoxII, grün) in *C. burnetii* (MOI 10)-infizierten JAWS II-DCs (links), RAW 264.7-WT- (mittig)- und -KO (rechts)-Makrophagen nach 72 h Inkubation. Gezeigt ist die Fluoreszenz mit (oben) und ohne (unten) Phasenkontrast. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

Für die Charakterisierung der Coxiellen-Infektion und zellautonomen Abwehr in Makrophagen wurden WT- und NOS2(KO)-Zellvarianten untersucht, die von Dr. Corleis aus dem Institut für Immunologie des FLI-Riems zur Verfügung gestellt wurden (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.5.6). Die Immunblot-Analyse in Abbildung 4-33 A zeigt in WT-Makrophagen eine IFN-γ-vermittelte Induktion von iNOS mit einem erwarteten Molekulargewicht von 135 kDa, wohingegen für KO-Makrophagen durch CRISPR/CAS9-basierte Deletion nur ein trunkiertes Protein (iNOS Δ41) mit reduziertem Molekulargewicht (125 kDa) induziert wurde. Um festzustellen, ob die iNOS-Deletionsvariante ihre Aktivität gegenüber dem wildtypischen Enzym verloren hat, wurde die NO-Synthese IFN-γ-behandelter WT- und KO-Makrophagen mittels Griess-Assays analysiert (Abb. 4-33 C). Es zeigte sich, dass bei IFN-γ-Stimulierung nur WT-Makrophagen eine gesteigerte NO-Produktion aufwiesen. Somit hat iNOS Δ41 seine katalytische Aktivität durch die eingeführte Nukleotiddeletion verloren. Die Immunfluoreszenz in Abbildung 4-33 C zeigt einen Vergleich des

zellulären Phänotyps Coxiellen-infizierter DCs und Makrophagen. Die Analyse ergab, dass sich die Coxiellen-Strukturen infizierter Makrophagen, wie bei infizierten DCs, gehäuft im Zytosol verteilen, jedoch etwas größere Vakuolen auszubilden scheinen. Zusammenfassend kann hier festgehalten werden, dass bei DCs und Makrophagen die IFN- $\gamma$ -Induktion von iNOS und die Coxiellen-Infektion vergleichbar sind.



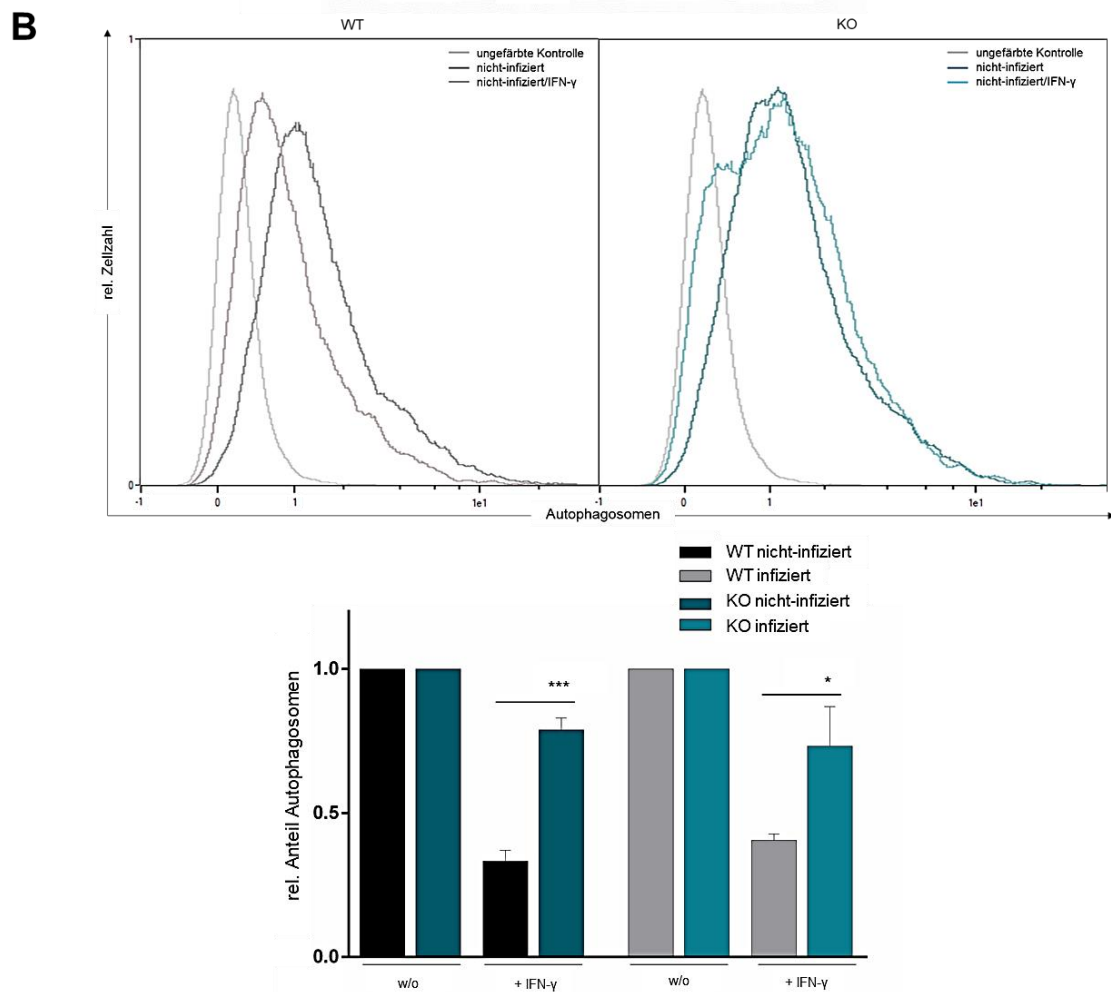
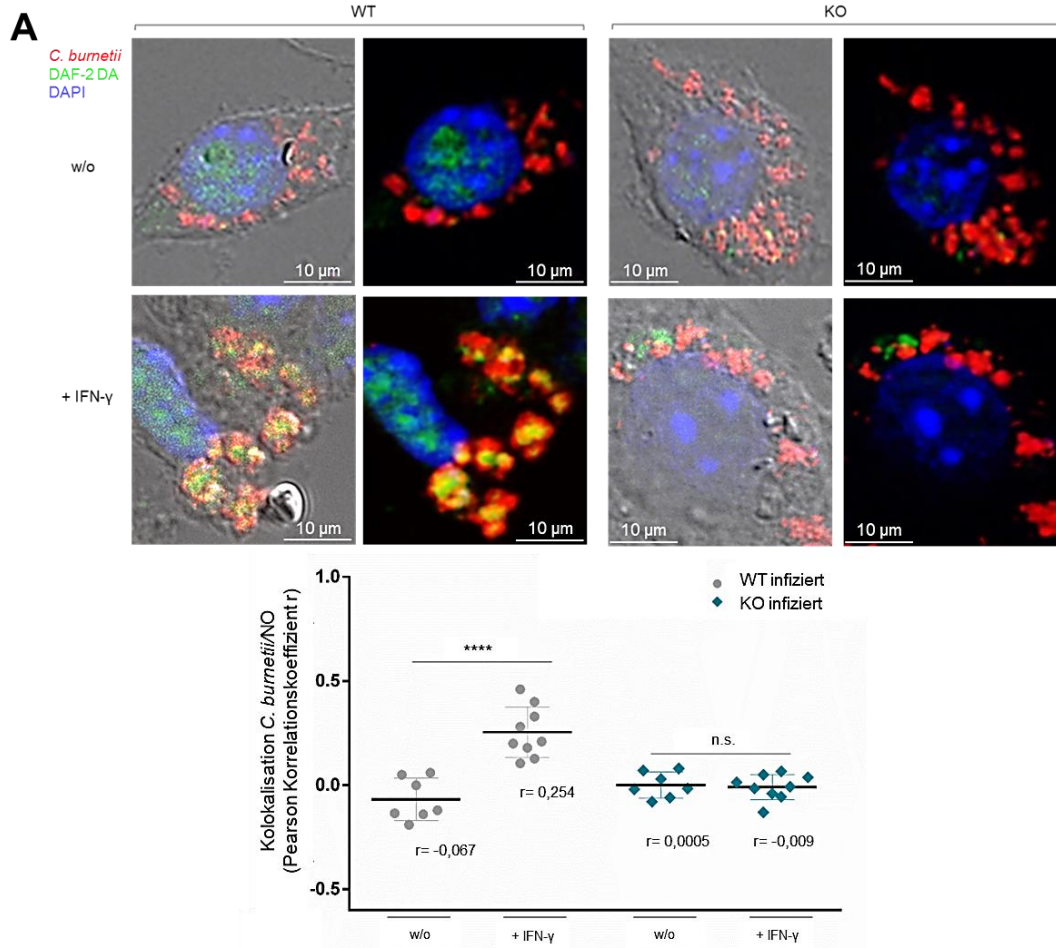
#### Abbildung 4-34: Einfluss von iNOS auf *C. burnetii* während der Makrophagen-Infektion

**(A)** Durchflusszytometrie der bakteriellen Last in *C. burnetii* (MOI 10)-infizierten RAW 264.7 WT- und -KO-Makrophagen mit und ohne Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) nach 72 h Kultivierung. Der Infektionsnachweis erfolgte über den  $\alpha$ -CoxII Antikörper, die Bakterienlast wurde anhand der MFI festgestellt. Die statistische Analyse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung ist in Kapitel 3.6 beschrieben (n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle (WT, infiziert ohne Behandlung)); \*\*\* $p$ <0,001 vs. Kontrolle (WT, infiziert ohne Behandlung); \*\*\*\* $p$ <0,0001 vs. Kontrolle (WT, infiziert + IFN- $\gamma$ ); \*\*\*\* $p$ <0,0001 vs. Kontrolle (KO, infiziert ohne Behandlung);  $n$ =3). **(B)** zeigt eine Western-Blot-Analyse nicht-infizierter und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter RAW 264.7-WT- und -KO-Makrophagen in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) nach 72 h. Für die densitometrische Analyse der coxHSP60-Bandenintensitäten wurden diese quantifiziert und auf die mitgeführte Ladekontrolle (GAPDH) normiert. Dargestellt ist die relative Signalintensität, für die die unbehandelten Kontrollen (WT & KO) auf 1 gesetzt wurden. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen *gepoolten* Versuchsansätzen  $\pm$  Standardabweichung auf Basis dreier verschiedener Expositionen.

Wie die durchflusszytometrische Bestimmung der Bakterienlast in Makrophagen zeigt (Abb. 4-34 A), ist in Abwesenheit von IFN- $\gamma$  kein signifikanter Unterschied der Coxiellen-Infektion von WT- und KO-Makrophagen festzustellen. Im Gegensatz dazu zeigt sich in Interferon-Anwesenheit eine signifikant höhere Bakterienlast (Faktor  $\geq$  2) in den KO-Makrophagen. Die spricht dafür, dass die IFN- $\gamma$ -Zugabe auch in WT-Makrophagen einen iNOS-vermittelten negativen Effekt auf die intrazellulären Coxiellen ausübt. In Übereinstimmung hiermit belegt die Immunblot-Analyse in Abbildung 4-34 B, dass für IFN- $\gamma$ -behandelte WT-Makrophagen mit hochreguliertem iNOS (und

induziertem MHC I als weitere IFN- $\gamma$ -Kontrolle) eine deutliche Reduktion der intrazellulären Bakterienlast ( $\geq 85\%$ ) zu beobachten war, während sich bei Interferon-stimulierten KO-Makrophagen wiederum ein eher positiver Effekt auf die Zellinfektion (Faktor  $\leq 3$ ) zeigte. Hieraus lässt sich ableiten, dass tatsächlich auch Makrophagen zu einer iNOS-vermittelten anti-Coxiellen Abwehr fähig sind und in Abwesenheit der induzierten NO-Synthese ihre bakterielle Infektion durch verbliebene IFN- $\gamma$ -vermittelte/induzierte Prozesse (wie zum Beispiel induzierte Auto-/Xenophagie <sup>430</sup>) möglicherweise sogar nachhaltig gefördert wird.

In weiteren Experimenten wurde nun untersucht, ob auch in infizierten Makrophagen iNOS-synthetisiertes NO in räumlicher Nähe und direkter Weise auf die intrazellulären Coxiellen einwirkt.



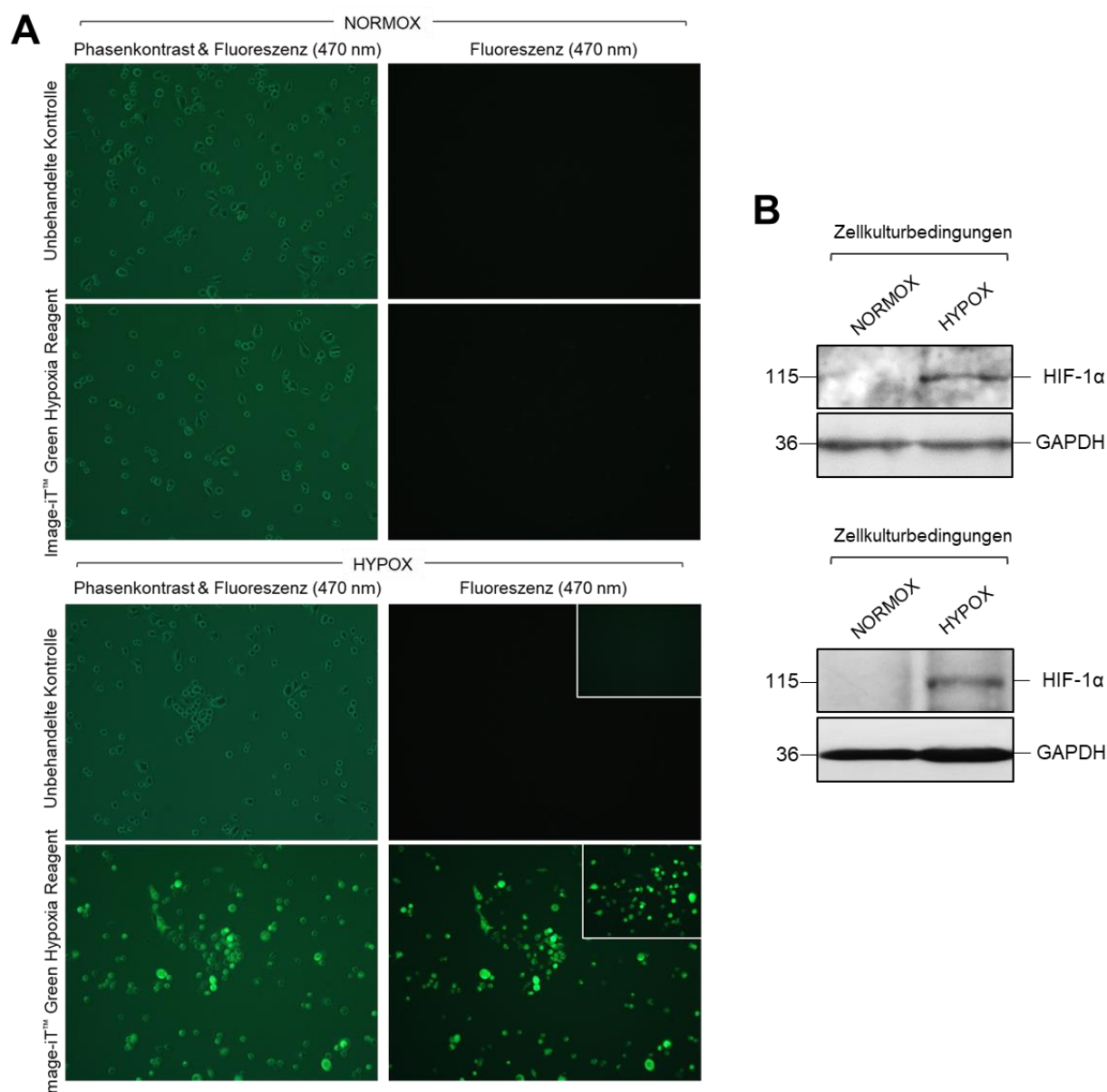
**Abbildung 4-35: Bedeutung der Autophagosomen in der anti-*C. burnetii* Abwehr infizierter Makrophagen**

**(A)** zeigt oben den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von NO (DAF-2 DA, grün) in *C. burnetii* (tdTomato, MOI 10, rot)-infizierten RAW 264.7-WT- und -KO-Makrophagen unter Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) 72 hpi. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Eine Kolokalisation wurde anhand des Pearson Korrelationskoeffizienten  $r$  überprüft (AxioVision) und ist in der Abbildung unten dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.6 beschrieben und basiert auf mindestens 7 unabhängigen Präparatsfraktionen (n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle (KO, infiziert ohne Behandlung); \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (WT, infiziert ohne Behandlung); min.  $n=7$ ). **(B)** zeigt eine Durchflusszytometrie der Autophagosomen für nicht-infizierte RAW 264.7-WT- und -KO-Makrophagen unter Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, 7 hpi) nach 72 h Kultivierung. Für den Autophagosomen-Nachweis wurde eine Monodansylcadaverin (MDC)-Färbung, wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben, durchgeführt. Nicht angefärbte Zellen wurden als Kontrollen mitgeführt. Dargestellt ist der relative Anteil der Autophagosomen, für den die unbehandelten WT- und -KO-Makrophagen auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Analyse auf Basis dreier unabhängiger Experimente  $\pm$  Standardabweichung ist in Kapitel 3.6 beschrieben (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (WT, infiziert + IFN- $\gamma$ ); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (WT, nicht-infiziert + IFN- $\gamma$ );  $n=3$ ).

Immunfluoreszenzen in Abbildung 4-35 A zeigen, dass infizierte WT-, nicht aber KO-Makrophagen in IFN- $\gamma$ -Anwesenheit eine positive Kolokalisation zwischen NO-Marker (grün) und Bakterien (rot) aufweisen ( $r=0,254$ ). Da NO in nicht-infizierten und infizierten DCs einen negativen Einfluss auf die Autophagosomenmenge ausübt (Abb. 4-28), wurde untersucht, ob ein entsprechender Mechanismus auch bei Makrophagen existiert. Die Durchflusszytometrie der Autophagosomen-Präsenz in Makrophagen (Abb. 4-35 B) zeigt, dass die Zugabe von IFN- $\gamma$  bei WT-Makrophagen zu einer starken Verringerung detektierbarer Autophagosomen führt (Reduktion  $\geq 60\%$ ). Dieses Phänomen ist für KO-Makrophagen deutlich schwächer ausgeprägt ( $\leq 20\%$ ) und könnte so die autophagosomale Coxiellen-Vermehrung begünstigen und die erhöhte Bakterienlast der KO-Zellen in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  erklären. In Zusammenfassung der Ergebnisse lässt sich annehmen, dass die induzierte NO-Produktion infizierter DCs und Makrophagen zu einer deutlichen Beeinträchtigung der intrazellulären Bakterienvermehrung führt und als effektive zellautonome Immunität ein übergeordnetes Verteidigungsprinzip *C. burnetii*-infizierter APCs darstellt.

**4.6 Bedeutung von iNOS/NO für die anti-*C. burnetii* Abwehr hypoxischer DCs**

Veränderungen der umgebenden Sauerstoffkonzentration können die Physiologie von Immunzellen und Pathogenen stark beeinflussen<sup>232,431</sup>. Der Wechsel von Norm- zu Hypoxie, der sich zum Beispiel lokal bei Entzündungen nach Infektionen in Zellen/Organen ausbilden kann, spielt vermutlich auch im Kontext von Coxiellen-Infektionen eine wichtige Rolle<sup>237</sup>. Hier fehlen jedoch immer noch wichtige Kenntnisse zur Auswirkung der Hypoxie auf die Wirts-Pathogen-Interaktion. Da Coxiellen zwar initial über die Aufnahme kontaminierter Aerosole in der Lunge zu finden sind, jedoch im weiteren Infektionsverlauf in andere, mehr distale Bereiche des Organismus gelangen<sup>19,20</sup>, die auch durch Hypoxie charakterisiert sind<sup>232</sup>, ist anzunehmen, dass die Bakterien sich so möglicherweise der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem entziehen können. Hieraus ergab sich nun die Frage, welchen Einfluss Hypoxie auf die zelluläre Selbstverteidigung *C. burnetii*-infizierter DCs hat. Zu diesem Zweck wurde in unserem Labor von Dr. Knitter eine Hypoxiekammer (HypoxyCell-System) für zelluläre Infektionsstudien entwickelt (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.1.6).



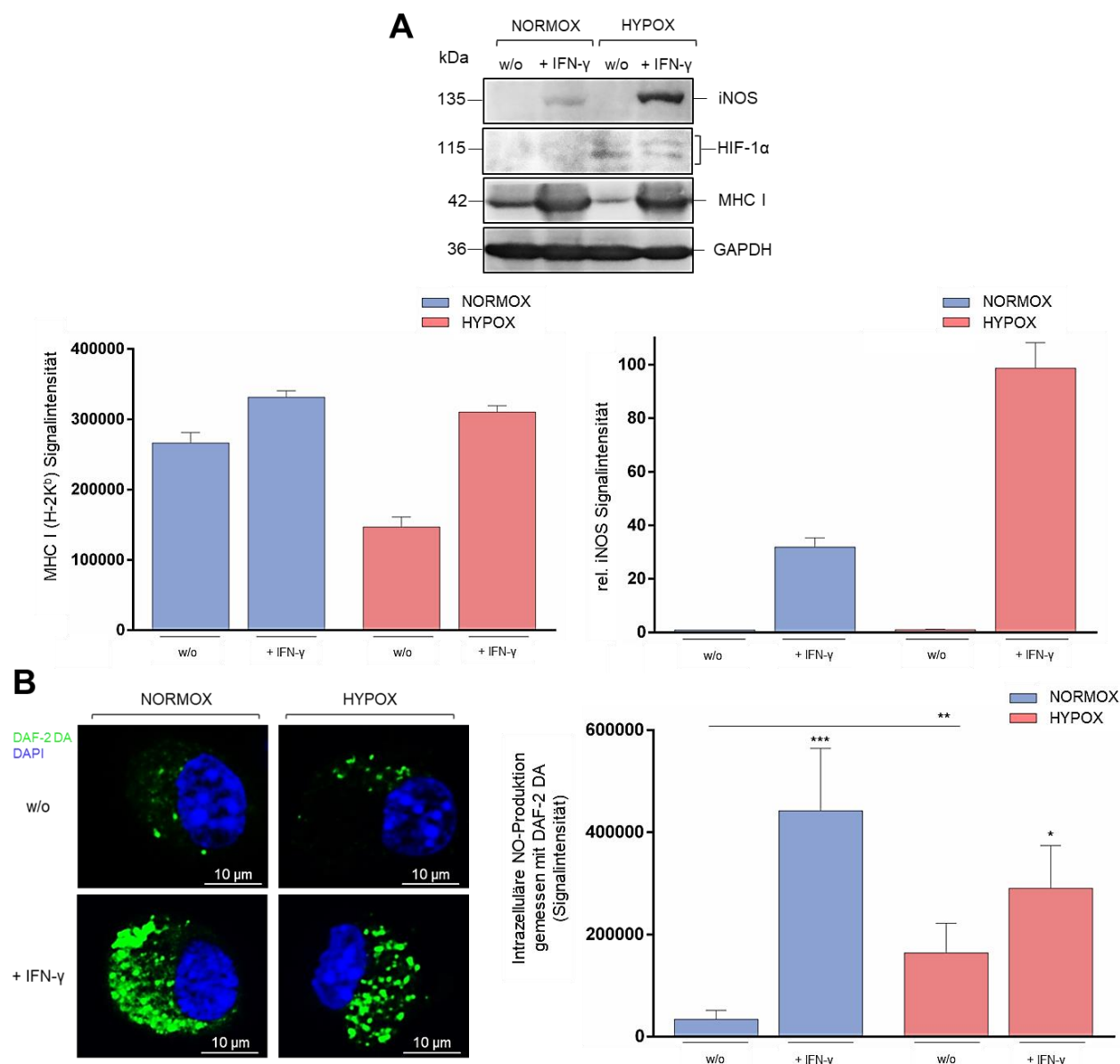
**Abbildung 4-36: Kultivierung von DCs unter hypoxischen Bedingungen**

(A) zeigt den Nachweis hypoxischer Zellkulturbedingungen nach 5 h Kultivierung nicht-infizierter JAWS II-DCs im HypoxyCell-System, beschrieben in Kapitel 3.1.6. Dargestellt sind unbehandelte und *Image-iT™ Green Hypoxia Reagent* (grün)-behandelte nicht-infizierte Zellen unter norm- (oben) und hypoxischen (unten) Bedingungen im Phasenkontrast und unter Fluoreszenz (470 nm). Die weiß-ingerahmten Bildausschnitte zeigen eine entsprechende *Image-iT™ Green Hypoxia Reagent* (grün)-Färbung von DCs, die in einer Standard-Hypoxiekammer (Whitley H35) durchgeführt wurde. (B) Western-Blot-Analyse des Hypoxie-Marker HIF-1α in nicht-infizierten JAWS II-DCs unter norm- und hypoxischen Zellkulturbedingungen nach 72 h Kultivierung im HypoxyCell-System (oben) und der Standard-Hypoxiekammer (Whitley H35, unten). GAPDH wurde als Ladekontrolle mitgeführt.

Der mikroskopische Nachweis hypoxischer Kultivierungsbedingungen im HypoxyCell-System (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.1.6) wurde für die DC-Kulturen auf Basis des *Image-iT™ Green Hypoxia Reagent* (ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Abbildung 4-36 A zeigt DCs, die unter norm- oder hypoxischen Bedingungen kultiviert und mit dem Detektionsreagenz entsprechend behandelt wurden. Nur hypoxische DC-Kulturen zeigten eine grüne Zellfluoreszenz zum Nachweis der sauerstoffarmen Kultivierungsbedingungen. Kontrollexperimente zur Überprüfung der Hypoxie-Bedingungen wurden zusätzlich unter Verwendung einer Standard-Hypoxiekammer (Whitley H35) durchgeführt und sind in den weiß-gerahmten Bildausschnitten gezeigt. Des Weiteren wurde mittels



Western-Blot die Expression des Hypoxie-Markers HIF-1 $\alpha$  ausschließlich für hypoxische DC-Kulturen (in HypoxyCell und Standard-Hypoxiekammer) nachgewiesen (Abb. 4-36 B). Somit erwies sich das HypoxyCell-System für die Durchführung weiterer Hypoxie-Experimente mit Coxiellen-infizierte DCs als geeignet.

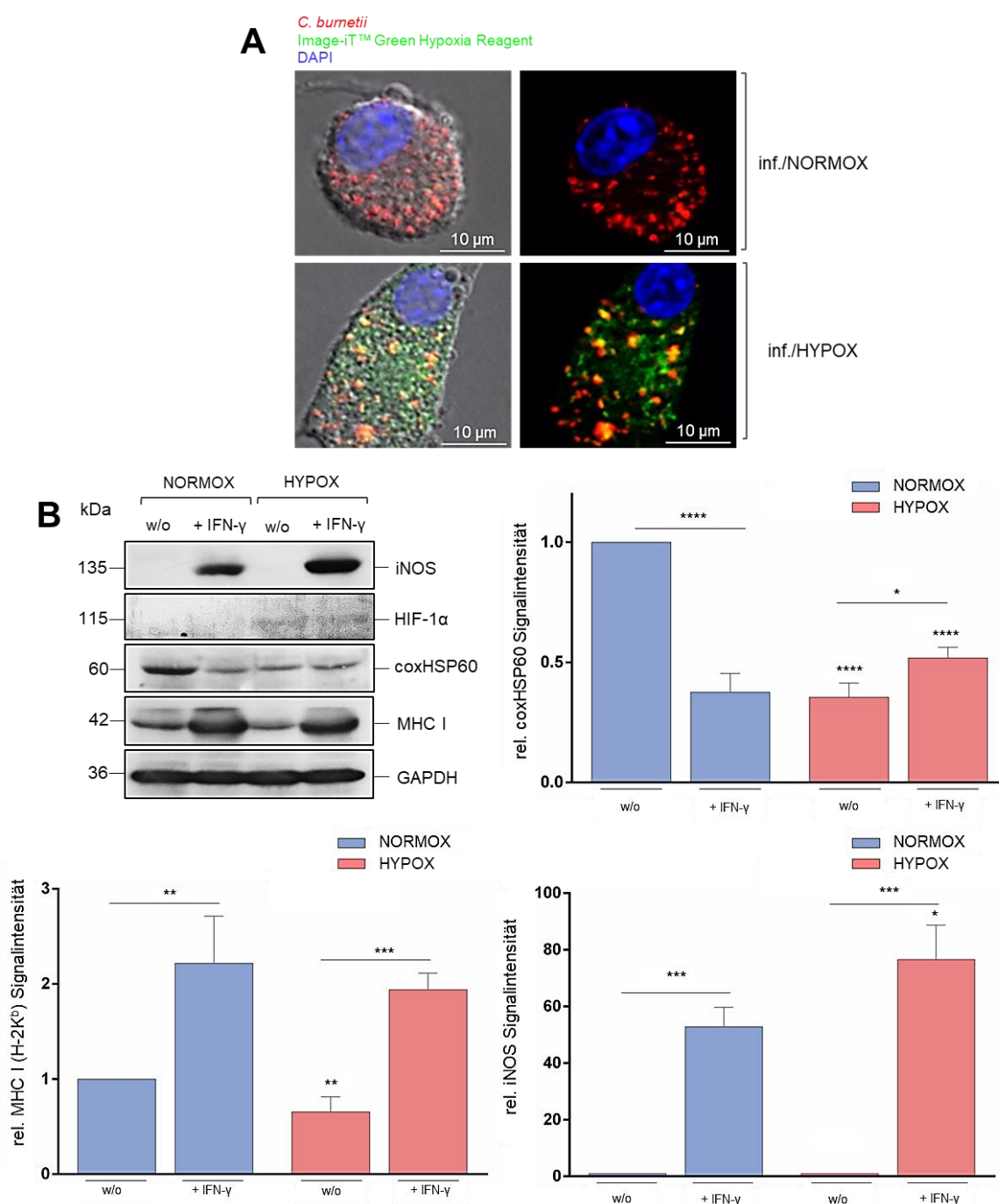


**Abbildung 4-37: Einfluss hypoxischer Bedingungen auf immunologische Funktionen von DCs**

(A) Gezeigt ist eine Western-Blot-Analyse nicht-infizierter JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, unmittelbare Zugabe) unter norm- und hypoxischen Zellkulturbedingungen nach 72 h Inkubation. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von MHC I und iNOS quantifiziert und auf GAPDH als Ladekontrolle normiert. Die HIF-1 $\alpha$ -Doppelbande ist auf zelluläre Degradation zurückzuführen. Gezeigt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Für iNOS ist die relative Signalintensität dargestellt, für die die unbehandelten Normoxiekontrollen ohne Behandlung auf 1 gesetzt wurden. (B) Immunfluoreszenzmikroskopie (links) zum Nachweis von NO (DAF-2 DA, grün) unter Normoxie und Hypoxie in nicht-infizierten JAWS II-DCs unter Zugabe von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, unmittelbare Zugabe) 72 hpi. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Für die Quantifizierung (rechts) wurden die Signalintensitäten von DAF-2 DA ermittelt. Die statistische Analyse ist in Kapitel 3.6 beschrieben und basiert auf fünf unabhängigen Präparatsfraktionen (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (HYPOX ohne Behandlung); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (NORMOX ohne Behandlung); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (NORMOX ohne Behandlung);  $n = 5$ ).

Zur Charakterisierung hypoxischer DCs wurde zunächst die Expression von MHC I und iNOS mittels Western-Blot untersucht (Abb. 4-37 A). Hierbei ergab sich, dass nicht-behandelte DCs unter Hypoxie eine um 50% verringerte MHC I-Expression aufweisen. Ein bekanntes Phänomen, das nachweislich durch stabilisiertes HIF-1 $\alpha$  hervorgerufen wird<sup>432-435</sup>. In Anwesenheit von IFN- $\gamma$  zeigte sich hingegen eine stark ausgeprägte MHC I-Induktion, die für norm- und hypoxische DCs durchaus vergleichbar war. Im Falle der IFN- $\gamma$ -abhängigen iNOS-Expression ergab sich bei hypoxischen DCs eine wesentlich stärkere Induktion als bei normoxischen DCs. In Abwesenheit von IFN- $\gamma$  war hingegen sowohl unter norm- als auch hypoxischen Bedingungen kaum eine iNOS-Expression sichtbar. Diese Befunde stehen in Einklang mit der Beobachtung, dass die iNOS-Expression über kooperative Effekte von IFN- $\gamma$  und HIF-1 $\alpha$  positiv reguliert werden kann<sup>436</sup>. Es stellte sich nun die Frage, ob eine durch Hypoxie gesteigerte iNOS-Induktion die auf Sauerstoff angewiesene NO-Synthese<sup>437</sup> weiter aufrechterhalten kann. Da für eine entsprechende Analyse der Griess-Assay auf Grund seiner strikten Sauerstoffabhängigkeit bei der Nitrit-/Nitrat-Bildung<sup>437,438</sup> nicht verwendet werden kann, wurde die NO-Anwesenheit direkt in den Zellen über einen intrazellulären NO-Marker (grün) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bei der zellulären Detektion des intrazellulären NOs in un- und IFN- $\gamma$ -stimulierten DCs zeigte sich, dass unbehandelte hypoxische DCs im Vergleich zu normoxischen DCs ein erhöhtes NO-Niveau aufwiesen, das jedoch durch IFN- $\gamma$  nicht (wie unter Normoxie) erheblich gesteigert werden konnte (Abb. 4-37 B). Dies weist darauf hin, dass Hypoxie allein schon einen deutlichen Einfluss auf den NO-Gehalt der Zellen hat, der jedoch offensichtlich nicht ausschließlich auf iNOS basiert. Die über IFN- $\gamma$  vermittelte iNOS-Induktion führt zwar zu einem etwas höheren NO-Anstieg, dieser erreicht jedoch nicht das normoxische Niveau IFN- $\gamma$ -behandelter DCs. Somit kann die erhöhte iNOS-Induktion unter hypoxischen IFN- $\gamma$ -Bedingungen die sauerstoffabhängige NO-Synthese des Enzyms, wenn überhaupt, nur zum Teil kompensieren. In ihrer Gesamtheit weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Hypoxie in Interferon-ab- und -unabhängiger Weise durchaus Einfluss auf das zelluläre NO-Level nimmt, das letztlich für die antibakterielle Abwehr infizierter DCs zur Verfügung steht. In weiteren Hypoxie-Experimenten wurde dieser wichtige Aspekt für *C. burnetii*-infizierte DCs daher näher untersucht.



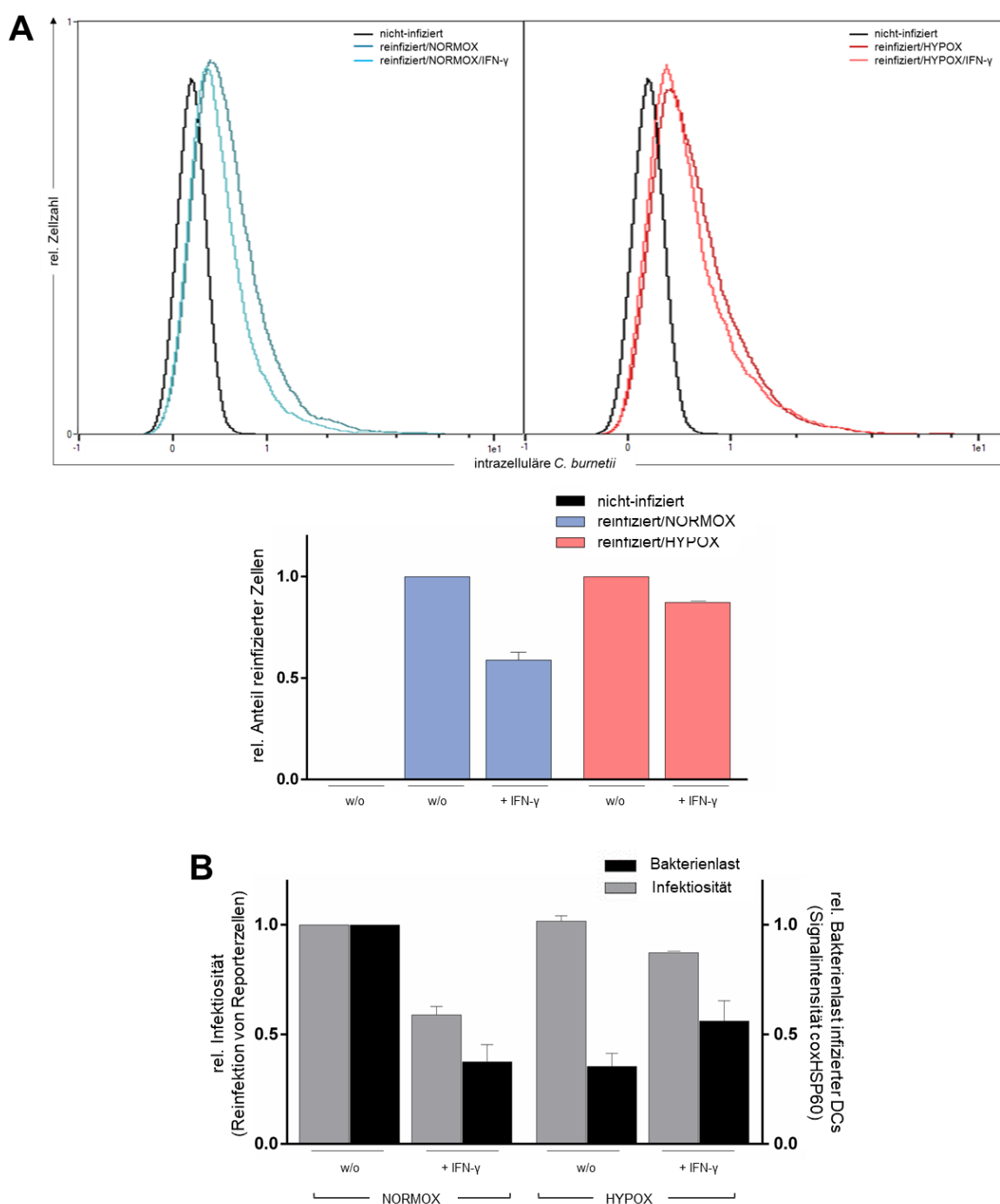


#### Abbildung 4-38: Die Rolle der Hypoxie während der *C. burnetii*-Infektion in DCs

(A) Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse *C. burnetii* (tdTomato, MOI 10, rot)-infizierter JAWS II-DCs unter Normoxie und Hypoxie. Der Hypoxie-Nachweis erfolgte mittels *Image-iT™ Green Hypoxia Reagent* (grün), DNA wurde DAPI (blau) gefärbt. (B) zeigt die Western-Blot-Analyse nicht-infizierter und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von IFN-γ (100 U/ml, unmittelbare Zugabe) unter norm- und hypoxischen Zellkulturbedingungen 72 hpi. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von MHC I, iNOS und coxHSP60 quantifiziert und auf die mitgeführte Ladekontrolle GAPDH normiert. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. Dargestellt sind die relativen Signalintensitäten, für die die Normoxiekontrollen ohne Behandlung auf 1 gesetzt wurden. Die statistische Auswertung entspricht der Beschreibung in Kapitel 3.6 (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (infiziert, HYPOX ohne Behandlung); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert, NORMOX ohne Behandlung); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (infiziert, NORMOX/HYPOX ohne Behandlung); \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (infiziert, NORMOX ohne Behandlung); \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (infiziert, NORMOX ohne Behandlung); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert, NORMOX ohne Behandlung); \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (infiziert NORMOX ohne Behandlung);  $n=3$ ).

Die Immunfluoreszenz in Abbildung 4-38 A zur Coxiellen-Infektion (rot) von DCs unter hypoxischen Bedingungen (grün) belegt, dass die Bakterien auch unter sauerstoffarmen

Bedingungen DCs infizieren. In einer parallel durchgeführten Western-Blot-Analyse (Abb. 4-38 B), in der der Hypoxie-Einfluss auf die anti-Coxiellen Abwehr infizierter DCs untersucht wurde, zeigte sich, dass die Bakterienlast unter sauerstoffarmen Bedingungen bereits in Abwesenheit von IFN- $\gamma$  im Vergleich zur Normoxie deutlich reduziert ist ( $\leq 70\%$ ). Allerdings konnte die hypoxische Bakterienlast durch IFN- $\gamma$  nicht weiter gemindert werden, es scheint hier sogar eine leicht positive Beeinflussung vorzuliegen. Diese Daten deuten darauf hin, dass unter Hypoxie keine oder nur stark reduzierte Coxiellen-Vermehrung möglich ist und das IFN- $\gamma$ -induzierte Abwehrsystem infizierter DCs somit wirkungslos erscheint.



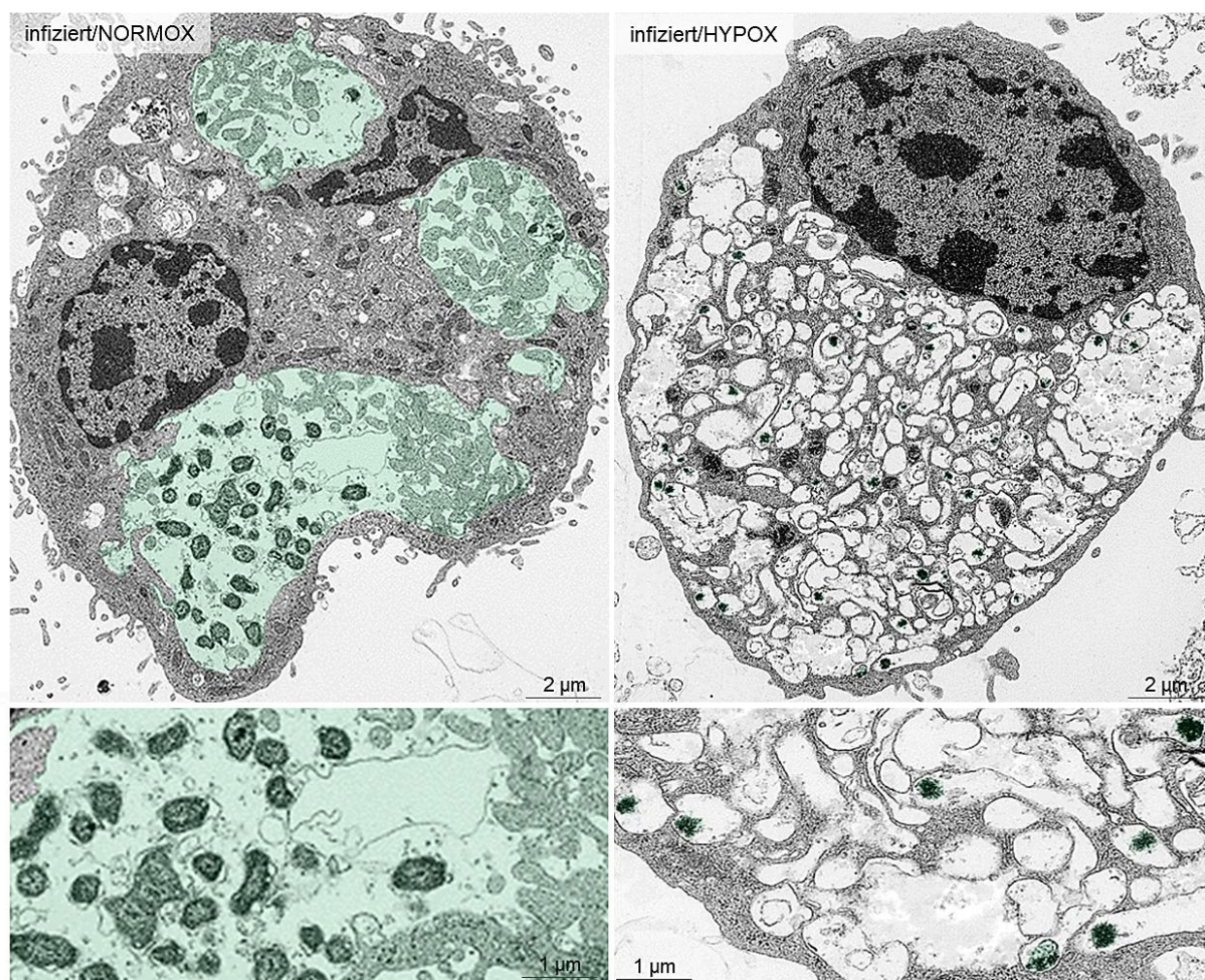
**Abbildung 4-39: Auswirkungen norm- und hypoxischer Bedingungen auf die Infektiosität von *C. burnetii***

(A) Durchflusszytometrie der Reinfektiosität von *C. burnetii* (MOI 10) nach Kultivierung in JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, unmittelbare Zugabe) unter norm- und hypoxischen Zellkulturbedingungen. 72 hpi

wurden die Bakterien mittels *syringe releasing* freigesetzt und für eine Infektion von Reporterzellen (L929-Fibroblasten) verwendet. Nach 72 h wurde die Fähigkeit zur Reinfektion durchflusszytometrisch über die Anfärbung mit dem  $\alpha$ -CoxII Antikörper nachgewiesen. Nicht-infizierte sowie *C. burnetii* (MOI 10, 72 hpi)-infizierte Reporterzellen wurden als Kontrollen mitgeführt. Gezeigt ist der relative Anteil infizierter Reporterzellen, bei dem die reinfizierten, nicht-behandelten Kontrollen unter Norm- und Hypoxie auf 1 gesetzt wurden. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. **(B)** zeigt die Bakterienlast infizierter DCs (coxHSP60-Signalintensitäten, Western-Blot-Analyse schwarz) und die Infektiosität (Durchflusszytometrie der Reinfektiosität, grau) von *C. burnetii* (MOI 10)-infizierten JAWS II-DCs An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, unmittelbare Zugabe) unter Normoxie und Hypoxie. Für die Darstellung wurden Bakterienlast und Infektiosität für die nicht-behandelten Kontrollen unter Normoxie auf 1 gesetzt.

In den nachfolgend beschriebenen Analysen wurde nun die Infektiosität von *C. burnetii* aus norm- und hypoxischen DC-Kulturen mittels Reinfektion von Reporterzellen bestimmt. Die entsprechenden Analysen in Abbildung 4-39 A ergaben, dass die IFN- $\gamma$ -Anwesenheit unter Hypoxie einen nur sehr geringen Einfluss auf die Coxiellen-Infektiosität hat, während die Reinfektiosität der Bakterien aus DCs unter Normoxie (Abb. 4-9) deutlich reduziert wird. In Abbildung 4-39 B sind zelluläre Bakterienlast und Infektiosität der Coxiellen für die verschiedenen norm- und hypoxischen Versuchsbedingungen gegenübergestellt. Hier wird deutlich, dass IFN- $\gamma$  unter normoxischen Bedingungen zelluläre Bakterienlast und Infektiosität einander entsprechend reduziert. Im Gegensatz dazu ist die Bakterienlast unter Hypoxie wesentlich stärker gemindert als die Infektiosität der Coxiellen. Somit scheinen sich die hypoxischen Bakterien dem negativen IFN- $\gamma$ -Einfluss entziehen zu können. Dies lässt vermuten, dass die Hypoxie die Coxiellen in ein bakterielles Stadium versetzt, welches der zellulären Abwehr entkommt und dabei seine Infektiosität größtenteils erhält. In der Tat wird für *C. burnetii* eine intrazelluläre sporenhähnliche Variante (SLP) beschrieben, die entsprechende morphologische Charakteristika und physiologische Eigenschaften aufweist<sup>37</sup>. Um zu klären, ob sich unter hypoxischen Bedingungen tatsächlich SLPs in infizierten DCs bilden, wurden in den nachfolgend beschriebenen Studien elektronenmikroskopische Experimente durchgeführt.

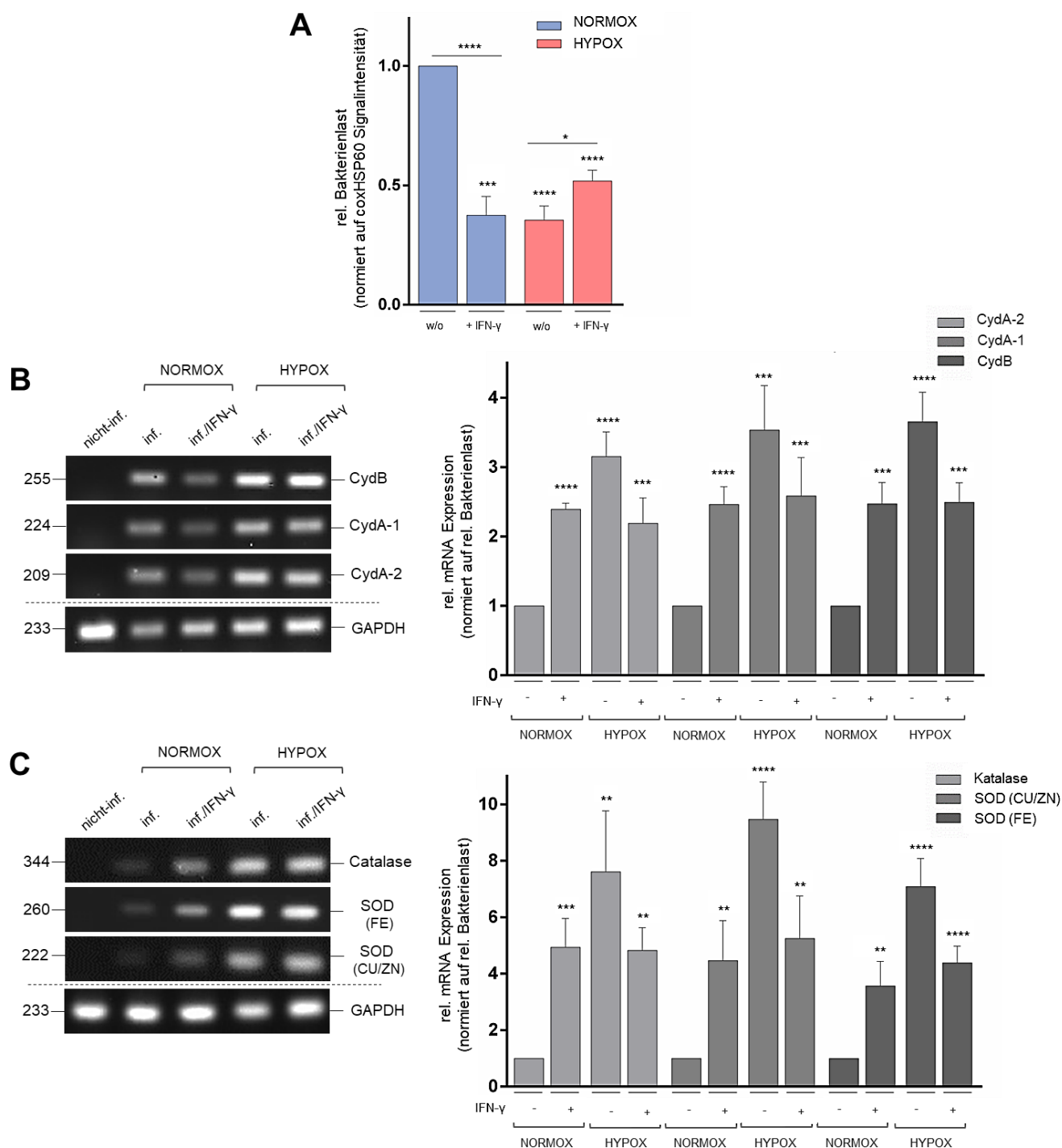




**Abbildung 4-40: Ausbildung von SLPs in *C. burnetii*-infizierten DCs unter Hypoxie**

Vergleichende elektronenmikroskopische Aufnahmen *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter JAWS II-DCs unter norm- (links) und hypoxischen (rechts) Zellkulturbedingungen 48 hpi. Unten aufgeführt ist jeweils eine vergrößerte Ansicht. Coxiellen-Strukturen wurden nachträglich grün eingefärbt.

Wie die in Abbildung 4-40 dargestellte Elektronenmikroskopie infizierter norm- und hypoxischer DCs zeigt, ist die Mitochondrienzahl hypoxischer DCs drastisch reduziert, was auf eine komplette Umstellung von mitochondrialer OXPHOS auf anaerobe Glykolyse hinweist. Nur unter Normoxie zeigen sich in den infizierten DCs Coxiellen-Kompartimente, die sowohl LCVs ( $\varnothing$  0,5-1  $\mu$ M) als auch SCVs ( $\varnothing$  0,2-0,5  $\mu$ M) enthalten (LCV:SCV-Verhältnis= 2:1). Die infizierten hypoxischen DCs besitzen keine entsprechenden Coxiellen-Vakuolen. Hier scheinen weder SCVs noch LCVs vorhanden zu sein. Stattdessen finden sich in den DCs elektronendichte Bakterienstrukturen deutlich geringerer Größe ( $\varnothing$  0,1  $\mu$ M), welche durch "ausgefranzte" Oberflächenstrukturen charakterisiert sind. Dies lässt vermuten, dass die Hypoxie die intrazellulären Coxiellen dazu veranlasst, ein stoffwechselreduziertes SLP-Stadium ohne produktive CCV-Bildung einzunehmen, welches replikationsinaktiv und resistent gegenüber äußeren Wirtszelleinflüssen (wie nitrosativem Stress) ist, aber dennoch seine Infektiosität behält.



#### Abbildung 4-41: Expressionsregulation bakterieller ETC und antioxidativer Enzyme unter Normoxie und Hypoxie

**(A)** Darstellung der relativen Bakterienlast basierend auf der densitometrischen Analyse der Western-Blot-Signalintensität von coxHSP60 *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter JAWS II-DCs unter norm- und hypoxischen Zellkulturbedingungen in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, unmittelbare Zugabe). Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Auswertung ist in Kapitel 3.6 beschrieben (\*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (infiziert, NORMOX ohne Behandlung); \*\*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (infiziert, NORMOX ohne Behandlung); \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (infiziert, HYPOX ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(B)** Vergleichende semi-quantitative PCR-Analyse der Transkriptmengen verschiedener Cytochrom *bd*-Untereinheiten (CydA-1, CydA-2, CydB) in *C. burnetii* (MOI 10)-infizierten JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, unmittelbare Zugabe) unter norm- und hypoxischen Zellkulturbedingungen. Nicht-infizierte JAWS II-DCs und NTCs wurden als Kontrollen mitgeführt. Murines GAPDH wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Dargestellt ist die relative mRNA Expression der Cytochrom *bd*-Untereinheiten (rechts), die anhand der coxHSP60-Expression auf die relative Bakterienlast (A) normiert wurde. Für die relative Darstellung wurde die Kontrolle (infiziert, NORMOX ohne Behandlung) auf 1 gesetzt. Gezeigt sind die Resultate von drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Auswertung wurde entsprechend den Erläuterungen in Kapitel 3.6 durchgeführt (\*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (infiziert, NORMOX ohne Behandlung); \*\*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (infiziert, NORMOX ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(C)** Vergleichende semi-quantitative PCR-Analyse der Transkriptmengen verschiedener

bakterieller antioxidativer Enzyme (Katalase, SOD (FE), SOD (CU/ZN)) *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter JAWS II-DCs in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (100 U/ml, unmittelbare Zugabe) unter Normoxie und Hypoxie. Als Kontrollen wurden nicht-infizierte JAWS II-DCs und NTCs mitgeführt. Murines GAPDH wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Gezeigt ist die relative mRNA Expression der antioxidativen Enzyme (rechts), die anhand der coxHSP60-Expression auf die relative Bakterienlast, in (A) gezeigt, normiert wurde. Für die relative Darstellung der drei unabhängigen Experimente  $\pm$  Standardabweichung wurde die Kontrolle (infiziert, NORMOX ohne Behandlung) auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.6 (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert, NORMOX ohne Behandlung); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (infiziert, NORMOX ohne Behandlung); \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (infiziert NORMOX ohne Behandlung);  $n=3$ ).

Um festzustellen, ob die Coxiellen-Differenzierung zu SLPs durch weitere bakterielle Prozesse begleitet wird, die ein Überleben des Pathogens unter sauerstoffarmen Bedingungen erlauben und der hypoxischen NO-Produktion (Abb. 4-37) entgegenwirken, wurden PCR-Analysen zur bakteriellen mRNA-Expression von Cytochrom *bd* (Abb. 4-41 B) sowie Katalase und SODs (Abb. 4-41 C) für norm- und hypoxische DC-Infektionen durchgeführt. Hierfür wurden die Transkriptmengen auf die jeweilige Bakterienlast (Abb. 4-41 A) infizierter DCs normiert. Für Cytochrom *bd* wird neben den nitrosativen Abwehreigenschaften ebenfalls beschrieben, dass eine erhöhte hypoxische Expression die bakterielle OXPHOS durch ausgeprägte Sauerstoffaffinität optimiert<sup>424</sup>. Die Analyse der mRNA-Expression in Abbildung 4-41 B belegt, dass es unter Hypoxie in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$  zu einer Hochregulation der drei bakteriellen Cytochrom *bd*-Untereinheiten (CydA-2, CydA-1, CydB) kommt. Anzumerken ist hier, dass unter Hypoxie für alle Untereinheiten signifikant höhere Transkriptmengen gemessen wurden als unter Normoxie. Obschon die Anwesenheit von IFN- $\gamma$  für beide Situationen einen expressionslimitierenden Einfluss ausübt, kann gefolgert werden, dass hypoxische Bedingungen allein ausreichen, um eine starke Induktion des Cytochrom *bd* zu bewirken. So lässt sich die für Coxiellen unter Hypoxie parallel auftretende Stresssituation durch erhöhte NO- und reduzierte O<sub>2</sub>-Konzentrationen mittels Einsatzes einer angehobenen Cytochrom *bd*-Expression bewältigen. Da Hypoxie über funktionsbeeinträchtigte Mitochondrien auch zu einer vermehrten zellulären ROS-Produktion betroffener Zellen führt<sup>439,440</sup> war interessant, dass für Coxiellen unter sauerstoffarmen Infektionsbedingungen (in An- und Abwesenheit von IFN- $\gamma$ ) ebenfalls eine Expressionsinduktion von Katalase und SODs zu beobachten war, was vermuten lässt, dass die intrazellulären Bakterien auch auf diese hypoxischen Begleitumstände infizierter DCs entsprechend reagieren können. Auch hier zeigte sich wie zuvor für Cytochrom *bd* ein expressionslimitierender IFN- $\gamma$ -Einfluss. In Zusammenfassung der Ergebnisse kann somit angenommen werden, dass diese komplexen physiologischen Anpassungen an Radikale (RNS und ROS) über veränderte Cytochrom *bd*-, Katalase- und SOD-Ausprägungen das Überleben der Coxiellen und die Aufrechterhaltung ihrer Infektiosität sichern.

#### 4.7 Funktionelle Aufgabe von NK-Zellen in der anti-*C. burnetii* Abwehr

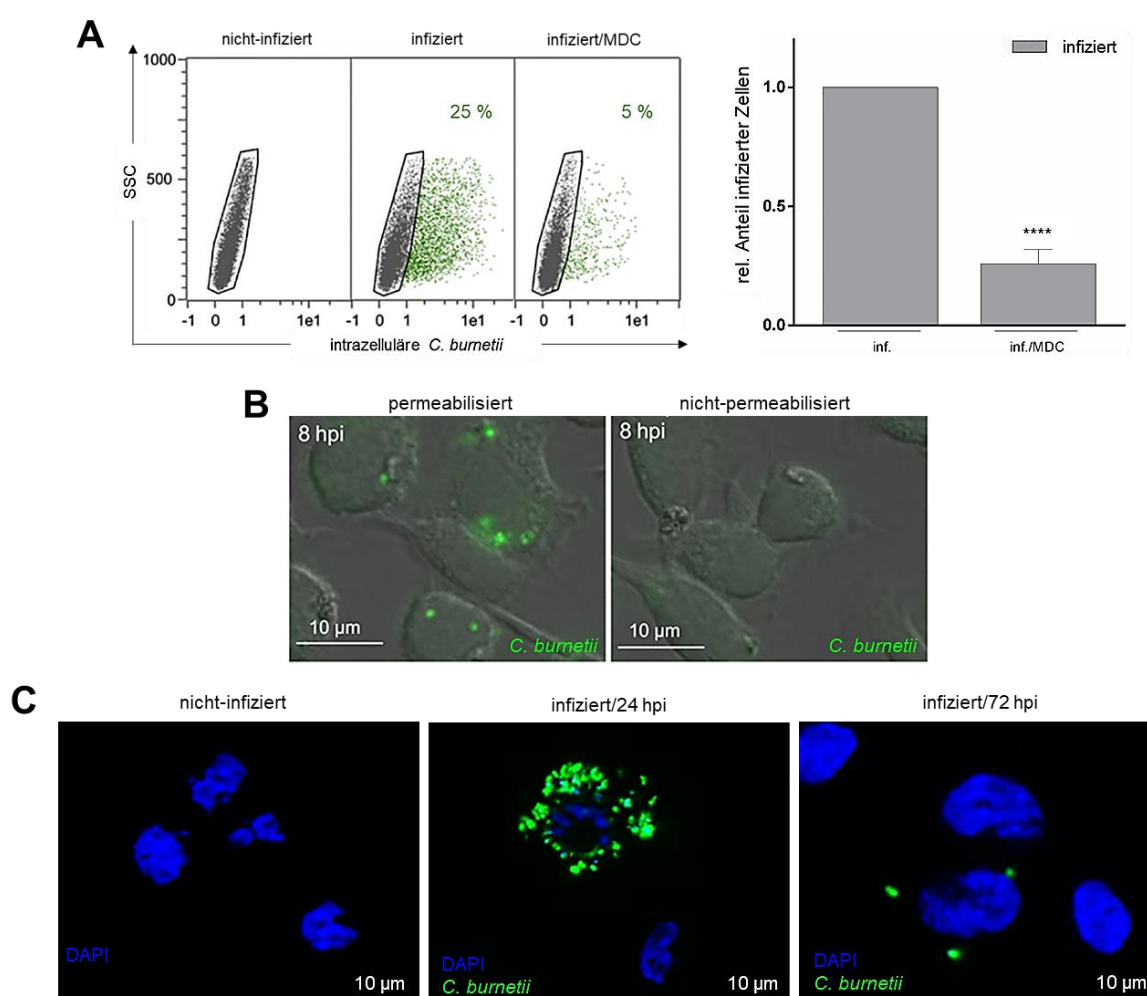
Im Kontext aktueller Forschung steht das bidirektionale Miteinander zwischen DCs und NK-Zellen während früher Immunreaktionen. Diese führt zur Auslösung einer effizienten innate Antwort durch DC/DEX-vermittelte NK-Zellaktivierung<sup>172</sup> und einer potenten adaptiven Immunantwort durch NK-Zellen/IFN- $\gamma$ -vermittelte DC-Stimulierung und DC-Reifung<sup>206</sup>. Bislang ist jedoch weitgehend ungeklärt, ob auch NK-Zellen durch Coxiellen infiziert werden und welche Rolle



sie im Rahmen einer entsprechenden Infektion spielen. Auf Basis vorhandener Daten lässt sich bisher annehmen, dass sie vermutlich funktional an einer frühen anti-Coxiellen Abwehr beteiligt sind<sup>257</sup>, da sie eine wichtige Quelle für IFN- $\gamma$ <sup>441</sup> darstellen, ein entscheidender Faktor bei der *C. burnetii*-Abwehr<sup>442</sup>. In den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden die Coxiellen-NK-Zell-Interaktion und ihre Auswirkung auf Pathogen und Wirtszelle daher näher untersucht.

#### 4.7.1 Charakterisierung der *C. burnetii*-Wirtszell-Interaktion infizierter NK-Zellen

Zunächst wurde analysiert, ob und in welchem Ausmaß NK-Zellen durch *C. burnetii* infiziert werden können. Dazu wurden Infektionsstudien mit der murinen NK-Zelllinie KY-2 (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.1.2) durchgeführt.

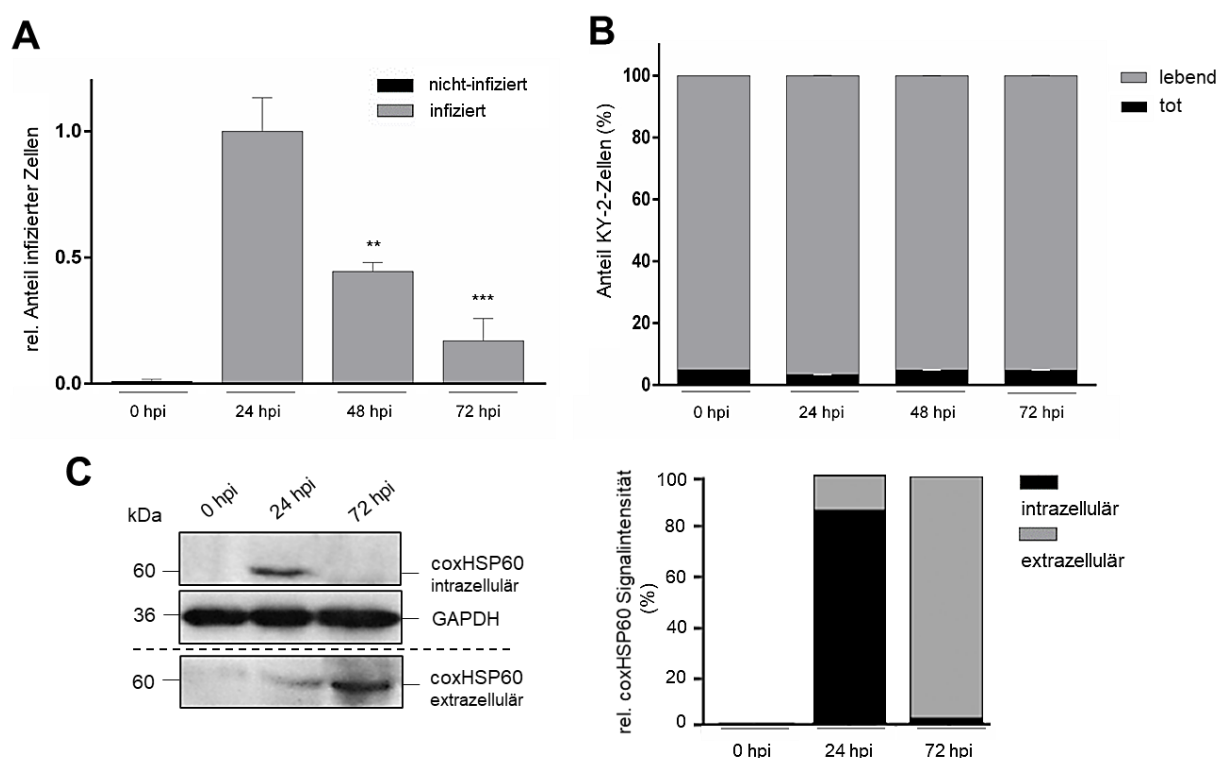


**Abbildung 4-42: *C. burnetii*-Infektion in NK-Zellen**

**(A)** Durchflusszytometrische Untersuchung der Aufnahme von *C. burnetii* in infizierten KY-2-Zellen. KY-2-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit des Inhibitors MDC (Clathrin-vermittelte Endozytose, 200  $\mu$ M) für 24 h mit *C. burnetii* (MOI 10) infiziert. Anschließend wurde der Anteil infizierter Zellen über eine Anfärbung mit dem  $\alpha$ -CoxII-Antikörper quantifiziert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung als relativer Anteil infizierter Zellen, bei dem die infizierte Kontrolle auf 1 gesetzt wurde. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.6 dargelegt (\*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (infiziert ohne Behandlung);  $n=3$ ). **(B)** zeigt die immunfluoreszenzmikroskopische Identifizierung intra- und extrazellulärer Bakterien in infizierten NK-Zellen. KY-2-Zellen wurden 3 h lang mit Coxiellen infiziert und anschließend intensiv gewaschen, um alle extrazellulären und an der Zelloberfläche gebundenen Bakterien zu entfernen. 8 hpi wurde die Aufnahme von *C. burnetii* anhand der  $\alpha$ -CoxII-Färbung (grün) permeabilisierter und nicht-permeabilisierter NK-Zellen analysiert. **(C)** Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der *C. burnetii* (MOI 10, grün)-

Infektion in KY-2-Zellen 24 hpi und 72 hpi. Als Kontrolle sind nicht-infizierte KY-2-Zellen gezeigt. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

Für eine Durchflusszytometrie (Abb. 4-42 A) wurden zu diesem Zweck NK-Zellen mit *C. burnetii* in An- und Abwesenheit von MDC (als Inhibitor Clathrin-vermittelter Endozytose) inkubiert. Es zeigte sich, dass die Bakterien die NK-Zellen infizieren ( $\geq 25\%$ ) und die Gegenwart des Inhibitors zu einer starken Reduktion der Coxiellen-Aufnahme führte ( $\leq 5\%$ ). Dies deutet darauf hin, dass die Clathrin-vermittelte Endozytose entscheidend an der Aufnahme der Bakterien beteiligt ist. Um die Infektion genauer zu analysieren, wurde eine Immunfluoreszanzanalyse zur Identifizierung intra- und extrazellulärer Coxiellen durchgeführt (Abb. 4-42 B). Dabei konnten keine zelloberflächengebundenen (bei nicht-permeabilisierte Zellen), sondern nur intrazelluläre Bakterien (bei permeabilisierte Zellen) detektiert werden, so dass von einer effizienten Coxiellen-Aufnahme ausgegangen werden kann. Darauf aufbauend wurde nun der Infektionsverlauf über 72 h untersucht (Abb. 4-42 C). Mittels Immunfluoreszenz konnte hierbei beobachtet werden, dass *C. burnetii* in infizierten NK-Zellen keine charakteristischen CCVs ausbildet, sondern 24 hpi perinukleär in mehreren kleinen Vakuolen mit einem Durchmesser von 1-3  $\mu\text{M}$  vorliegt. Für 72 hpi wurden nur noch sehr wenige oder gar keine bakteriellen Strukturen beobachtet. Aus diesen Untersuchungen lässt sich ableiten, dass es zu einer initialen Coxiellen-Infektion in NK-Zellen kommt, diese aber offensichtlich nur transient ist und nicht zu einer intrazellulären Bakterienreplikation führt.



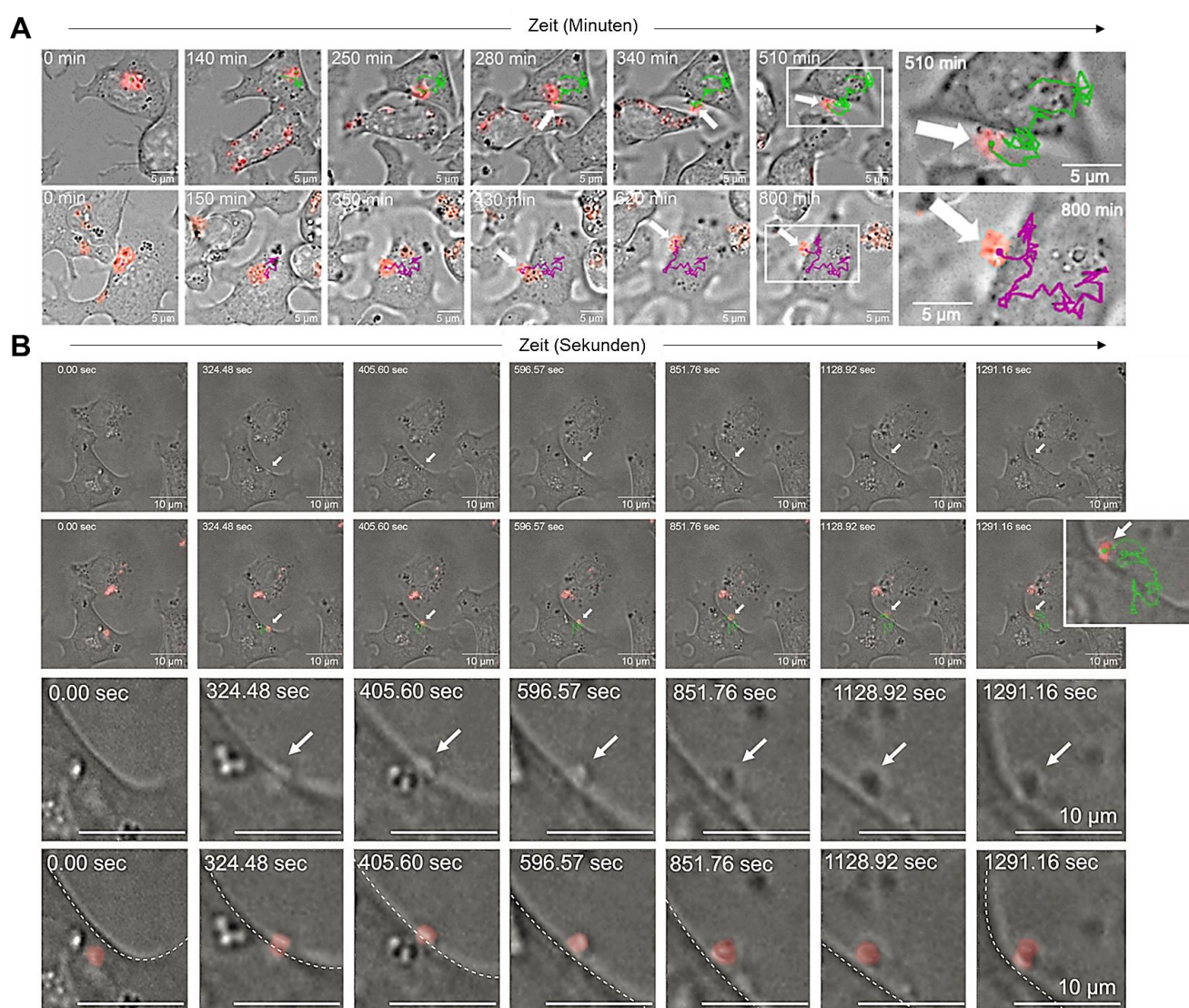
**Abbildung 4-43: Bakterienreduktion im Verlauf der NK-Zell-Infektion**

**(A)** Durchflusszytometrie des Infektionsverlaufs in KY-2-Zellen. KY-2-Zellen wurden mit *C. burnetii* (MOI 10) infiziert und die Bakterienlast 24-72 hpi mit dem  $\alpha$ -CoxII Antikörper bestimmt. Als Kontrollen wurden nicht-infizierte KY-2-Zellen mitgeführt. Gezeigt sind die Resultate aus drei unabhängigen Ergebnissen  $\pm$  Standardabweichung. Dargestellt ist der relative Anteil infizierter Zellen, für den der maximale Mittelwert 24 hpi auf 1 gesetzt wurde. Die statistische Auswertung ist in Kapitel 3.6 beschrieben (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert, 24 hpi); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (infiziert, 24 hpi);  $n=3$ ). **(B)** Analyse nekrotischer/apoptotischer KY-2-Zellen während der *C. burnetii*-Infektion (MOI 10, 0-72 hpi) mittels Trypanblau-Färbung. Gezeigt ist der Anteil lebender/toter Zellen aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. **(C)** Western-Blot-Analyse zum Nachweis von coxHSP60 intrazellulär und extrazellulär



(Überstände) aus *C. burnetii* (MOI 10) infizierten KY-2-Kulturen 24 hpi und 72 hpi. Als Kontrolle wurden nicht-infizierte KY-2-Zellen und -Überstände eingesetzt. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von coxHSP60 quantifiziert und auf die mitgeführte Ladekontrolle GAPDH normiert. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse einer Analyse. Die Gesamt-coxHSP60-Signalintensität 24 hpi wurde auf 100 gesetzt.

In Abbildung 4-43 A ist eine durchflusszytometrische Quantifizierung infizierter NK-Zellen im Verlauf einer Coxiellen-Infektion dargestellt. Der relative Anteil infizierter Zellen zeigt 24 hpi ein Maximum mit einer darauffolgenden zeitabhängigen Reduktion Coxiellen-infizierter NK-Zellen (75-80% bei 72 hpi). Um ausschließen zu können, dass diese Reduktion auf den Tod infizierter Wirtszellen zurückzuführen ist, wurde der Anteil lebender und toter NK-Zellen während der Coxiellen-Infektion bestimmt (Abb. 4-43 B). Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten jedoch, dass die Zahl lebender NK-Zellen im Verlauf der Infektion weitgehend konstant blieb, so dass davon auszugehen ist, dass die bisherigen Ergebnisse nicht durch den Tod der infizierten NK-Zellen zu erklären sind. Zur weiteren Klärung wurde eine zeitabhängige Immunblot-Analyse intra- und extrazellulärer Bakterien durchgeführt (Abb. 4-43 C). Erneut wurde 24 hpi ein deutlicher Anstieg der coxHSP60-Signalintensität in intrazellulären Zellextrakten detektiert, diese war 72 hpi jedoch kaum noch nachweisbar. Es ist auszuschließen, dass die Reduktion des Chaperons mit einer Eliminierung der Bakterien zu erklären ist, da zeitgleich mit der Verringerung der Signalintensität in den Zelllysaten ein Anstieg des extrazellulären Signals in den Zellkulturüberständen gemessen werden konnte, wobei die coxHSP60-Gesamtkonzentration über den gesamten Zeitverlauf nahezu konstant blieb. Dies deutet darauf hin, dass hier ein NK-Zell-spezifischer Mechanismus vorliegt, der die intrazelluläre Etablierung und die Replikation der Coxiellen verhindert.



**Abbildung 4-44: Freisetzung von *C. burnetii* im Verlauf der NK-Zell-Infektion**

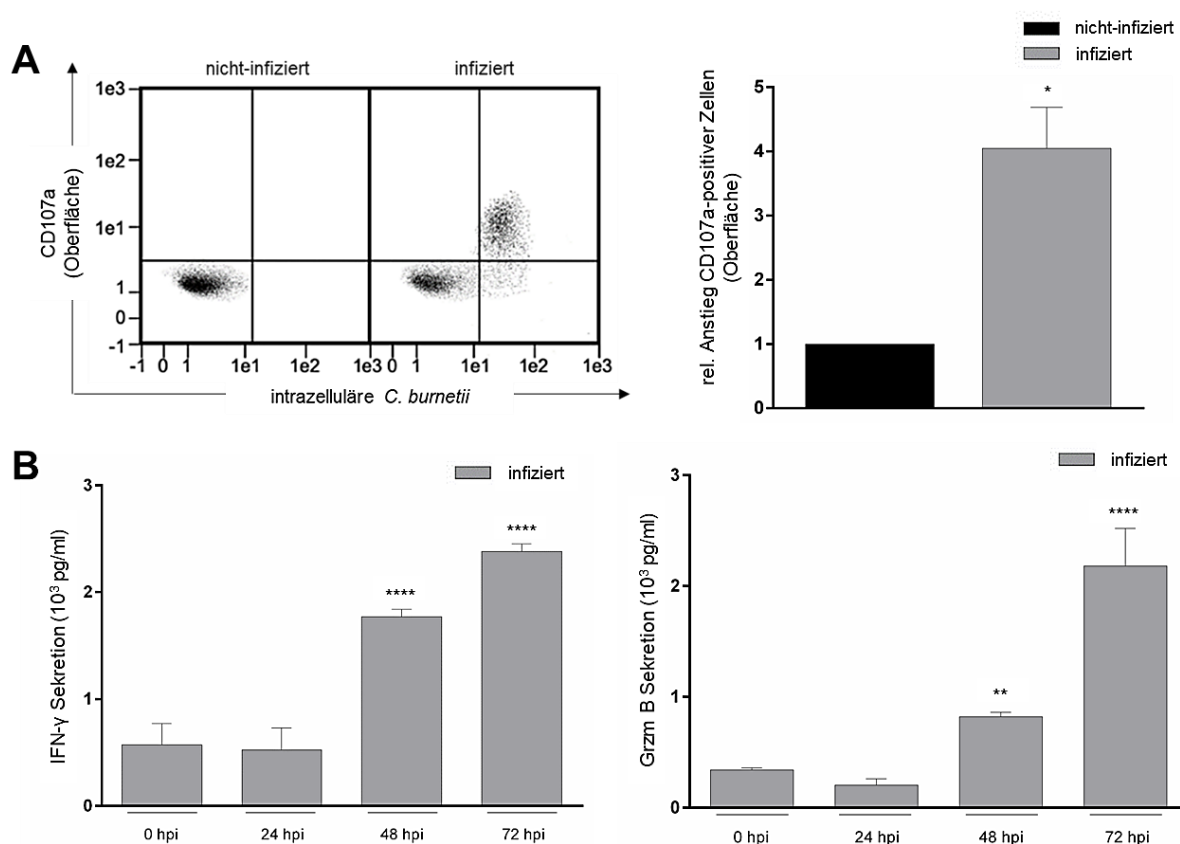
**(A)** Langzeit-Live Cell Imaging-Aufnahme *C. burnetii* (tdTomato, MOI 30, gewaschen 3 hpi, rot)-infizierter KY-2 Zellen ab 24 hpi. Das Bakterientracking wurde bei 37°C durchgeführt und startet gekennzeichnet als 0 Min. ab 24 hpi (oben) und 26 hpi (unten). Die farbigen Linien (grün und magenta) zeigen den Coxiellen-Verlauf innerhalb von 510 Min. (oben) und 800 Min. (unten). **(B)** zeigt eine Kurzzeit-Live Cell Imaging-Aufnahme *C. burnetii* (tdTomato, MOI 30, gewaschen 3 hpi)-infizierter KY-2-Zellen ab 31,5 hpi. Gezeigt ist ein Zeitverlauf von etwa 21,5 Min. anhand von Kurzzeit-Intervallen von ~1,700 ms (35 frames/Min.). Die Bewegungen der Bakterien (grün) wurden bei 37°C und der maximalen z-Projektion des Fluoreszenzkanals (*C. burnetii*, rot) nachverfolgt und mit einer repräsentativen Phasenkontrast-Ebene kombiniert (erste und zweite Reihe). Ausgewählte Detailaufnahmen im Durchlicht (dritte Reihe) und kombiniert mit dem Fluoreszenzkanal (vierte Reihe, *C. burnetii*, rot) sind ergänzend dargestellt.

Um das Phänomen der zellulären Abwehr infizierter NK-Zellen genauer zu analysieren, wurden Live Cell Imaging-Untersuchungen durchgeführt (mit Hilfe von Herrn Luca Zaeck, siehe Material und Methoden, Kapitel 3.3.8). Die Nachverfolgung der Bakterien war anhand einer Langzeit-Aufnahme der Infektion möglich, die in Abbildung 4-44 A dargestellt ist. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Bakterien (rot) zunächst intrazellulär vorlagen und im Verlauf der Infektion (farbige Linien) in den extrazellulären Raum translokalisiert wurden. Um die zeitliche Dimension des Ablaufs genauer bestimmen zu können, wurden Kurzzeit-Aufnahmen dieses Prozesses angeschlossen (Abb. 4-44 B). Dazu wurde eine Zeitraffer-Bilderfassung anhand von kurzen Intervall-Aufnahmen angefertigt, die ergaben, dass der gesamte bakterielle Freisetzungsprozess etwa 15 Min. andauert

und von einem sichtbaren lokalen und konvexen Membranvorsprung auf der Zelloberfläche begleitet wird. Die freigesetzten Coxiellen scheinen noch einige Zeit an der Außenseite der Zellmembran zu verbleiben, bevor sie letztlich freigesetzt werden. Zusammenfassend belegen die bisherigen Studien, dass NK-Zellen von *C. burnetii* infiziert werden, sie jedoch die Etablierung und Replikation der internalisierten Bakterien unterbinden, in dem sie diese in die extrazelluläre Umgebung freisetzen.

#### 4.7.2 Funktionale Reifung und Aktivierung *C. burnetii*-infizierter NK-Zellen

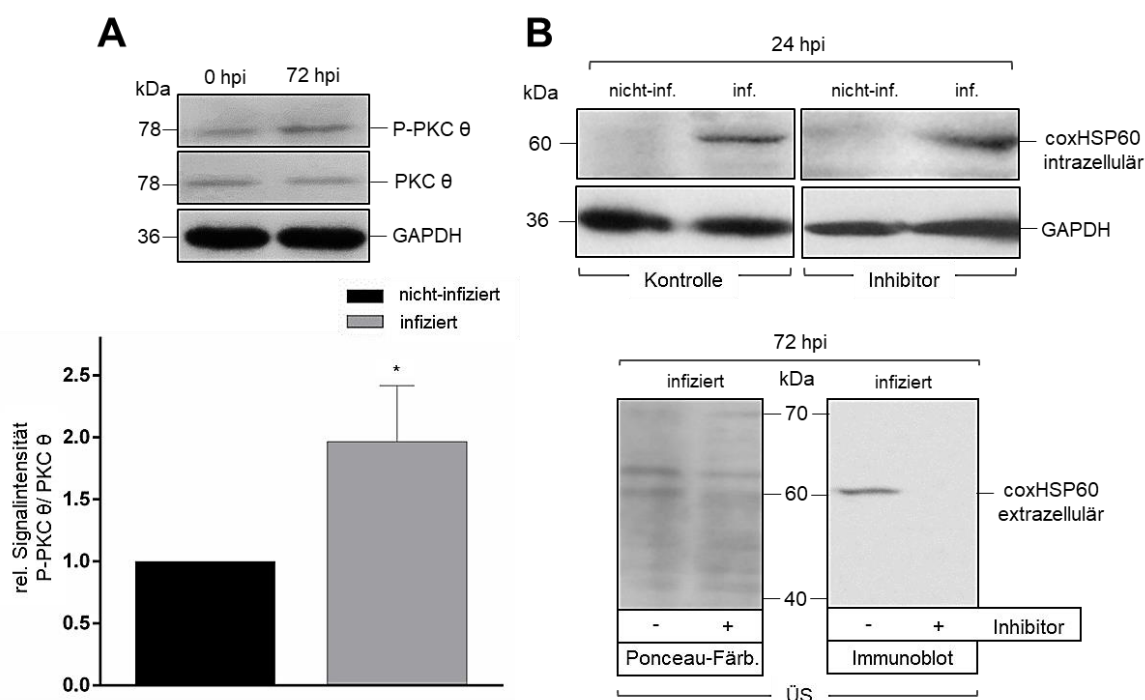
Auf Basis der vorangegangenen Untersuchungen blieb zu klären, wie die transiente Coxiellen-Infektion in NK-Zellen mechanistisch verläuft und ob die Infektion zu einer NK-Zell-Aktivierung führt.



**Abbildung 4-45: Funktionale Reifung von NK-Zellen während der *C. burnetii*-Infektion**

**(A)** Durchflusszytometrie der CD107a (LAMP1)-Expression in nicht-infizierten und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierten KY-2-Zellen 24 hpi. 12 hpi wurde die zelluläre Endozytose mit MDC (200  $\mu$ M) inhibiert, um CD107a auf der Oberfläche zu stabilisieren. Für den Nachweis der Infektion wurden die Zellen außerdem mit dem  $\alpha$ -CoxII angefärbt. Gezeigt ist der relative Anstieg CD107a (Oberfläche)-positiver Zellen, für den die nicht-infizierten Kontrollen auf 1 gesetzt wurden. Dargestellt sind drei unabhängige Experimente  $\pm$  Standardabweichung, für die die statistische Auswertung in Kapitel 3.6 beschrieben ist (\* $p$ <0,05 vs. Kontrolle (nicht-infiziert);  $n$ =3). **(B)** zeigt die IFN- $\gamma$  und Granzym B (Grzm B)-Sekretion im Verlauf einer *C. burnetii*-Infektion in KY-2-Zellen. Mit Hilfe von ELISA Kits wurden die Überstände aus *C. burnetii* (MOI 10)-infizierten KY-2-Kulturen (24-72 hpi) auf sezerniertes IFN- $\gamma$  und Grzm B hin untersucht. Als Negativkontrollen wurden nicht-infizierte Zellen verwendet (0 hpi). Dargestellt sind drei unabhängige Experimente  $\pm$  Standardabweichung, die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.6 dargelegt (\*\* $p$ <0,01 vs. Kontrolle (nicht-infiziert 0 hpi); \*\*\*\* $p$ <0,0001 vs. Kontrolle (nicht-infiziert 0 hpi);  $n$ =3).

Abbildung 4-45 A zeigt die Durchflusszytometrie der Oberflächenexpression von CD107a (LAMP1) infizierter NK-Zellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass nur infizierte NK-Zellen eine signifikante Ausprägung (Faktor 4,5) dieses Degranulierungsmarkers auf der Oberfläche zeigen, was für eine Reifung und Aktivierung der Zellen durch die Coxiellen-Infektion spricht<sup>443</sup>. Darüber hinaus konnte die funktionale Aktivierung der NK-Zellen auch im Verlauf der Infektion anhand der steigenden Ausschüttung von pro-inflammatorischem IFN- $\gamma$  und zytotoxischem Granzym B detektiert werden (Abb. 4-45 B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Coxiellen-Infektion zu einer funktionalen Reifung und Aktivierung der NK-Zellen führt.



**Abbildung 4-46: PKC  $\theta$  Phospho-Aktivierung *C. burnetii*-infizierter NK-Zellen**

(A) Western-Blot-Analyse der PKC  $\theta$  Phospho-Aktivierung *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter KY-2-Zellen 72 hpi. Nicht-infizierte Zellen wurden als Kontrollen mitgeführt. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von P-PKC  $\theta$  und PKC  $\theta$  quantifiziert und auf die mitgeführte Ladekontrolle (GAPDH) normalisiert. Gezeigt sind drei unabhängige Experimente  $\pm$  Standardabweichung als relative Signalintensität, für die die nicht-infizierte Kontrolle (0 hpi) auf 1 gesetzt wurde. Die statistische Auswertung ist in Kapitel 3.6 beschrieben (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (nicht-infiziert);  $n=3$ ). (B) zeigt eine Western-Blot-Analyse nicht-infizierter und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter KY-2-Zellen in An- und Abwesenheit eines PKC  $\theta$ -Inhibitors (Sotrastaurin, 250 nM) 24 hpi (intrazellulär) und 72 hpi (extrazellulär, Überstand). Als Ladekontrollen wurden GAPDH (intrazellulär) und eine Ponceau-S-Färbung (extrazellulär, Überstand) verwendet.

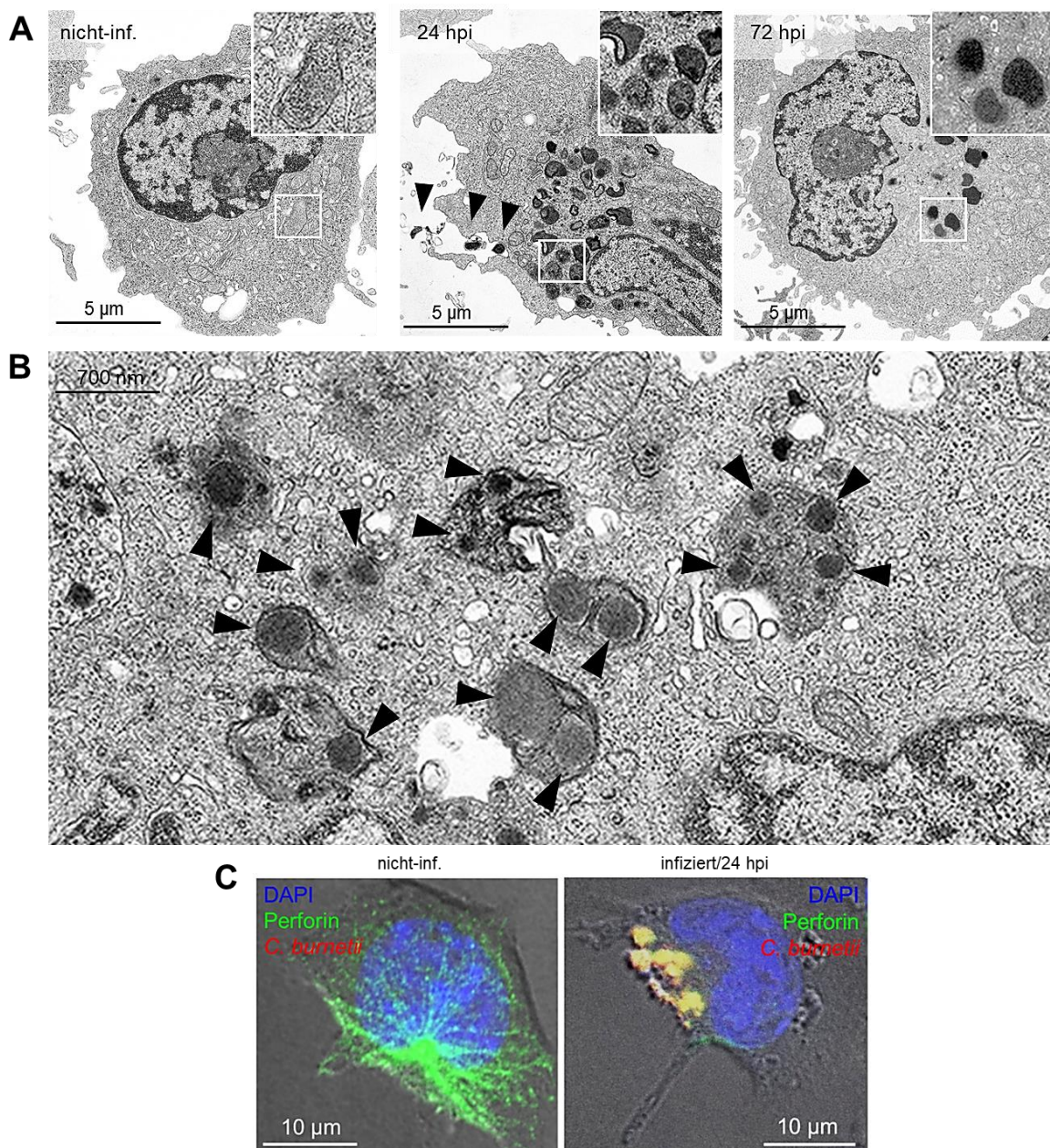
Neben den Aktivierungsmarkern spielt vor allem die Phospho-Aktivierung von PKC  $\theta$  eine entscheidende Rolle für die Signalvermittlung, Initiierung und Aufrechterhaltung spezifischer Effektorfunktionen von NK-Zellen<sup>213</sup>, so dass nachfolgend der Einfluss einer NK-Zell-Infektion auf die PKC  $\theta$  untersucht wurde. Wie die Western-Blot-Analyse in Abbildung 4-46 A zeigt, wurde für infizierte NK-Zellen tatsächlich eine Phospho-Aktivierung von PKC  $\theta$  über den Anstieg der Signalintensität von P-PKC  $\theta$  zu PKC  $\theta$  (Faktor 2-2,5) detektiert. Unter Verwendung des spezifischen Inhibitors Sotrastaurin<sup>345</sup> wurde der Einfluss der PKC  $\theta$  weiter analysiert (Abb. 4-46 B). Dabei wurden 24 hpi keine Unterschiede in der Effizienz der Infektion beobachtet, allerdings wurde die Freisetzung der Bakterien in den Zellkulturüberstand durch die Zugabe des Inhibitors verhindert. Ergänzende Kontrollexperimente (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.3)



konnten in diesem Kontext nachweisen, dass trotz der dauerhaft blockierten Freisetzung weiterhin kein bakterielles Wachstum in NK-Zellen möglich war. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass NK-Zellen offensichtlich keine optimale vakuoläre Umgebung für die intrazelluläre Replikation bieten, wenngleich die Infektion zu einer deutlichen Aktivierung der Zellen führt.

#### 4.7.3 Freisetzung infektiöser Bakterienstrukturen durch Degranulierung infizierter NK-Zellen

Die Aktivierung der PKC  $\Theta$  initiiert insbesondere die zelluläre Degranulierung, eine regulierte Sekretion<sup>444</sup> zytotoxischer Granula mit einer Größe von 0,2-1  $\mu\text{m}$ <sup>445</sup>. Da dieses Volumen die Aufnahme von SCVs ( $\varnothing$  0,2-0,5  $\mu\text{m}$ ) und LCVs ( $\varnothing$  0,5-1  $\mu\text{m}$ ) ermöglicht und gleichzeitig die bakterielle Freisetzung in Abhängigkeit von der PKC  $\Theta$ -Aktivierung erklären könnte, wurden die sekretierten Granula infizierter NK-Zellen auf bakterielle Strukturen hin untersucht.

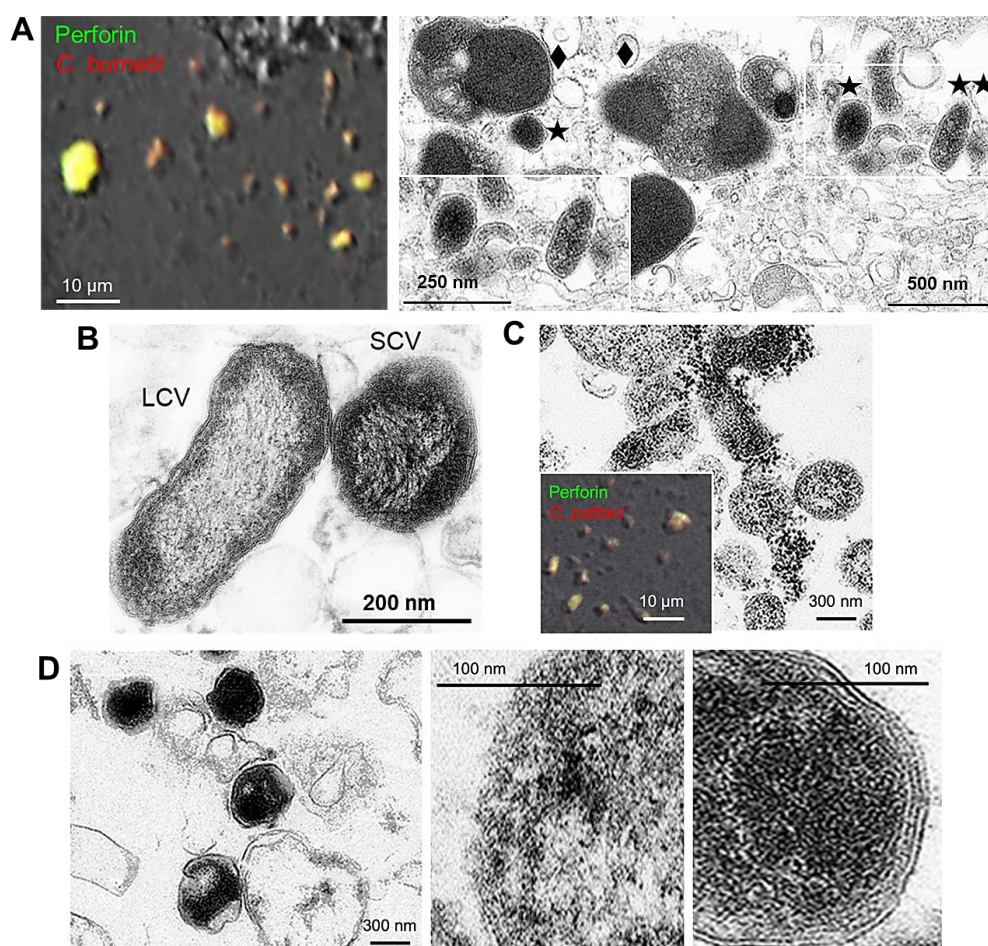


**Abbildung 4-47: Ausschluss eindringender Coxiellen mittels Degranulierung**

**(A)** Elektronenmikroskopie nicht-infizierter und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter KY-2-Zellen 24 hpi und 72 hpi. Die Pfeile weisen auf oberflächenassoziierte bakterielle Strukturen hin. Oben rechts aufgeführt ist jeweils eine vergrößerte Ansicht des weiß-eingerahmten Bildausschnitts. **(B)** zeigt eine Elektronenmikroskopie-Analyse *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter KY-2-Zellen 24 hpi. Mit Pfeilen hervorgehoben sind elektronendichte, intrazelluläre *C. burnetii*-Strukturen, die mit sekretorischen Granula der NK-Zellen assoziiert sind. **(C)** Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von Perforin (grün) in nicht-infizierten und Coxiellen (tdTomato, MOI 10, rot)-infizierten KY-2-Zellen 24 hpi. Die DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt).

Die Elektronenmikroskopie in Abbildung 4-47 A und 4-47 B zeigt *C. burnetii*-infizierte NK-Zellen. In nicht-infizierten Kontrollzellen waren sekretorische Granula als vakuoläre Strukturen des Typs II<sup>446</sup> mit lamellarem und vesikulärem Material nachweisbar. Im Gegensatz dazu war die überwiegende Mehrheit der sekretorischen Granula infizierter NK-Zellen 24 hpi (Abb. 4-47 A mittig und Abb. 4-47 B) mit elektronendichtem Material und großen runden Strukturen ( $\varnothing$  0,2-0,5  $\mu\text{m}$ ) gefüllt, die in ihrer Größe den bakteriellen SCVs oder LCVs entsprachen. Eine kleinere Bakterienfraktion war mit Strukturen der äußeren Zelloberflächenmembran assoziiert, was darauf hindeutet, dass sie unmittelbar ausgeschleust oder bereits freigesetzt wurde. Nach 72 h konnte nur noch ein sehr geringer Anteil bakterieller Strukturen intrazellulär detektiert werden (Abb. 4-47 A rechts). In Übereinstimmung damit zeigt die Immunfluoreszenz in Abbildung 4-47 C *C. burnetii*-Strukturen (rot), die mit Perforin (grün)-positiven Granula kolokalisierten, während das Perforin bei nicht-infizierten Zellen in perinukleären kreisförmigen Strukturen vorlag. Diese Beobachtungen deuten in ihrer Gesamtheit darauf hin, dass das bakterielle Material in physischem Kontakt mit den sekretorischen Granula steht und die Coxiellen-Freisetzung mit der Degranulierung infizierter NK-Zellen verbunden ist.





#### Abbildung 4-48: Charakterisierung von *C. burnetii* und *C. psittaci* nach Freisetzung aus NK-Zellen

(A) zeigt extrazelluläre *C. burnetii*-Strukturen. Links ist eine immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Kolo-kalisation freigesetzter Bakterien (tdTomato, MOI 10, 24 hpi, rot) mit Perforin (grün) zu sehen. Rechts ist eine Elektronenmikroskopie des extrazellulären Materials (MOI 10, 72 hpi) dargestellt. Stern-Markierungen verweisen auf intakte Coxiellen, Diamant-Markierungen zeigen stark deformierte bakterielle Strukturen. Abbildung (B) zeigt im Vergleich kleine Zellvarianten (SCVs) und große Zellvarianten (LCV) aus präparierten *C. burnetii*-Stocks aus L929-Fibroblasten. (C) Analyse freigesetzter chlamydialer Strukturen mittels Elektronenmikroskopie. Der eingefügte Bildausschnitt zeigt die immunfluoreszenzmikroskopische Kolo-kalisation von Perforin (grün) und *C. psittaci* (MOI 10, rot). (D) Elektronenmikroskopische Analyse präparierter Chlamydien aus einem *C. psittaci*-Stock (links) sowie vergleichende Analysen aus KY-2-Zellen freigesetzter (mittig) und präparierter (rechts) Chlamydien.

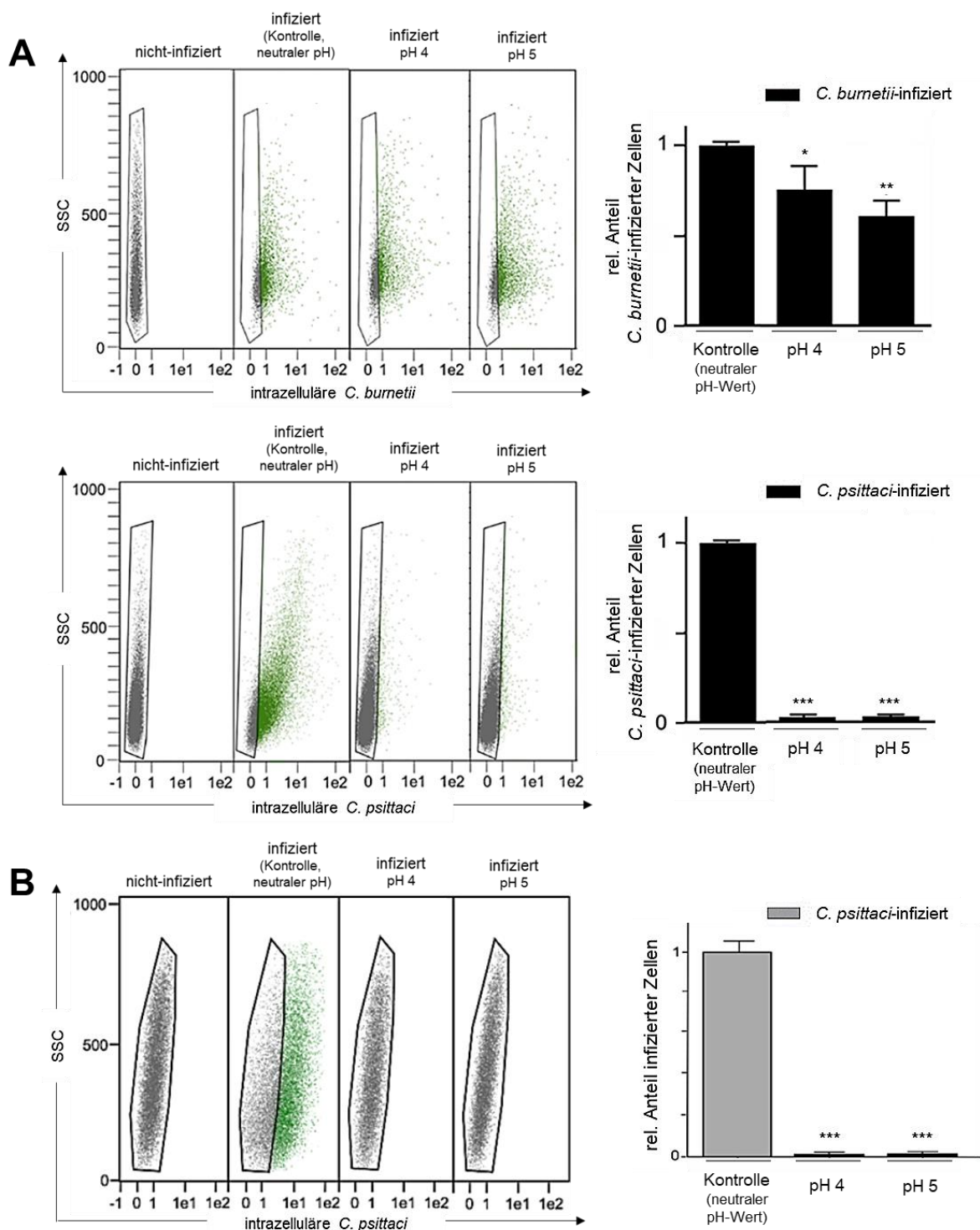
Aufbauend auf der Analyse intrazellulärer Bakterienstrukturen wurden die aus infizierten NK-Zellen freigesetzten Bakterien elektronen- und immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 4-48). Wie in Abbildung 4-48 A gezeigt, sind die extrazellulären Bakterien mit Perforin assoziiert und partiell durch aberrantes, großes elektronendichtes Material gekennzeichnet. Dennoch zeigte ein direkter Vergleich mit *C. burnetii* aus infektiösen Stammkulturen (Abb. 4-48 B), dass in der freigesetzten Erregerfraktion aus NK-Zellen eine nachweisbare Menge intakter Coxiellen (Abb. 4-48 A) vorhanden ist. In Abgrenzung dazu zeigt Abbildung 4-48 C die Analyse bakterieller Strukturen von *C. psittaci*. Der Zustand freigesetzter Chlamydien wurde vorab durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben<sup>202</sup>, so dass diese als Kontrolle einer funktionalen NK-Zell-Abwehr eingesetzt wurden. In diesem Kontext zeigten die freigesetzten Chlamydien ebenfalls eine Perforin-Assoziation (Abb. 4-48 C, Bildausschnitt unten links), im Gegensatz zu den Analysen der Coxiellen schienen sie jedoch strukturell ungeordnet zu sein. Ferner wiesen die Bakterien im Vergleich zu

*C. psittaci* aus infektiösen Chlamydien-Stämmen (vorwiegend Elementarkörperchen) nur eine geringe Elektronendichte und keine nachweisbaren intakten äußeren Membranstrukturen auf (Abb. 4-48 D). Auf Grundlage der Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass die mehrheitlich intakten Coxiellen die Aufnahme in die lytischen Granula und den anschließenden Export durch Degranulierung zu großen Teilen überleben.

#### **4.7.4 Resistenz von *C. burnetii* gegenüber der zellulären Abwehr infizierter NK-Zellen**

Die durch NK-Zellen freigesetzten Chlamydien und Coxiellen scheinen in unterschiedlicher Weise auf die physische Interaktion mit sekretorischen Granula zu reagieren. Verantwortlich dafür könnten Unterschiede der Sensitivität gegenüber den in den Granula enthaltenen Effektormolekülen (wie Perforin und Granzym B<sup>196</sup>) sowie der vorhandenen Azidität dieser Kompartimente<sup>446</sup> sein. Auf Grundlage dieser Überlegungen wurde in nachfolgenden Experimenten untersucht, welche bakteriellen Gegebenheiten die Coxiellen vor der Inaktivierung/Eliminierung durch NK-Zellen schützen.

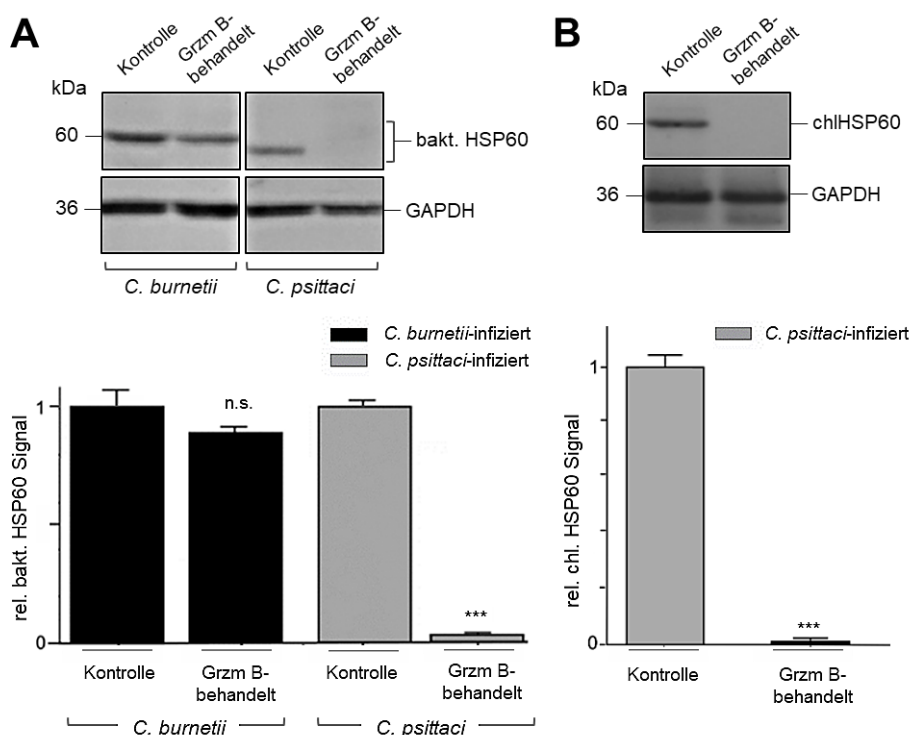




**Abbildung 4-49: pH-Sensitivität von *C. burnetii* und *C. psittaci***

**(A)** Auswirkungen des pH-Wertes auf *C. burnetii* und *C. psittaci*. Die Bakterien wurden mit Citratpuffer (pH 4 und pH 5) sowie Tris-Kontrollpuffer (pH 7, neutral) für 18 h bei 4°C inkubiert. Es folgte die Infektion geeigneter Reporterzellen (Coxiellen: L929-Fibroblasten, MOI 10; Chlamydien: BGM-Zellen, MOI 10). Der Anteil infizierter Zellen wurde 72 hpi durchflusszytometrisch (Coxiellen:  $\alpha$ -CoxII; Chlamydien: *IMAGEN*<sup>TM</sup> *Chlamydia* Kit) bestimmt, wobei die Negativkontrollen (infiziert neutraler pH-Wert) für die relative Darstellung auf 1 gesetzt wurden. Gezeigt sind je drei unabhängige Experimente  $\pm$  Standardabweichung, für die die statistische Auswertung in Kapitel 3.6 beschrieben ist (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (*C. burnetii*, infiziert neutraler pH-Wert); \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (*C. burnetii*, infiziert neutraler pH-Wert); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (*C. psittaci*, infiziert neutraler pH-Wert);  $n=3$ ). **(B)** Auswirkungen des pH-Wertes auf *C. psittaci*. Die Bakterien wurden mit Citratpuffer (pH 4 und pH 5) sowie Tris-Kontrollpuffer (pH 7, neutral) für 18 h bei 4°C inkubiert. Es folgte die Infektion von L929-Reporterzellen (MOI 10). Der Anteil infizierter Zellen wurde 72 hpi durchflusszytometrisch (*IMAGEN*<sup>TM</sup> *Chlamydia* Kit) bestimmt, wobei die Mittelwerte der Negativkontrollen (infiziert neutraler pH-Wert) für die relative Darstellung auf 1 gesetzt wurden. Gezeigt sind je drei unabhängige Experimente  $\pm$  Standardabweichung, für die die statistische Auswertung in Kapitel 3.6 beschrieben ist (\*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (*C. psittaci*, infiziert neutraler pH-Wert);  $n=3$ ).

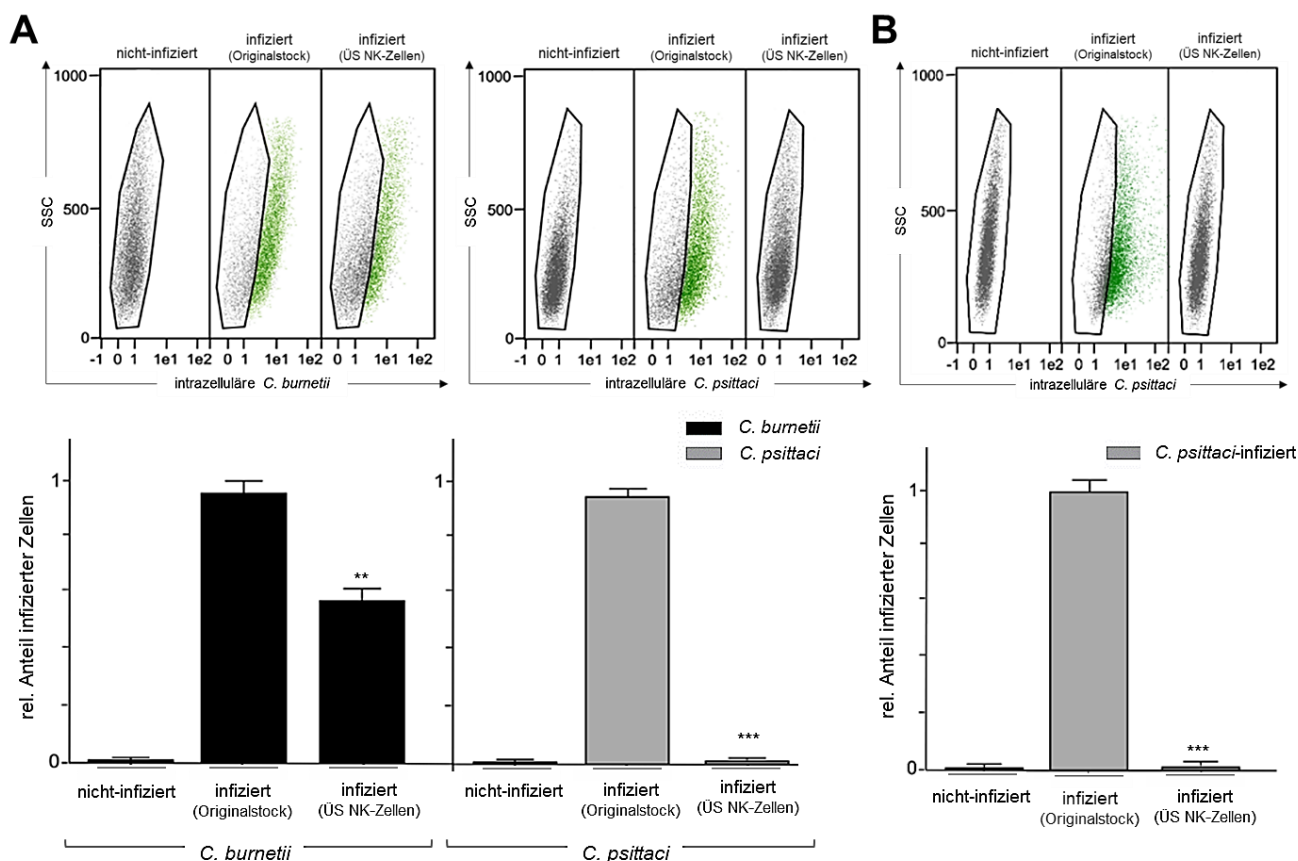
Zunächst wurde die pH-Sensibilität von *C. burnetii* und *C. psittaci* untersucht. Abbildung 4-49 A zeigt die Durchflusszytometrie zur Reinfektiosität der Bakterien nach vorheriger Inkubation in physiologischen Puffern verschiedener Aziditäten (neutral pH 7, pH 5, pH 4). Es konnte gezeigt werden, dass *C. burnetii* äußerst resistent gegenüber den niedrigen pH-Werten war, wohingegen *C. psittaci* die Fähigkeit zur Reinfektion nahezu vollständig verlor. Um ausschließen zu können, dass diese Ergebnisse durch die Variabilität in den Standard-Reporterzellsystemen beeinflusst wurden (Coxiellen: L929-Fibroblasten, Chlamydien: BGM-Zellen), wurde die Reinfektiosität der Chlamydien in beiden Reporterzellsystemen durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4-49 B). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Reinfektiosität unabhängig von dem verwendeten Auslesesystem durch die sauren Bedingungen stark beeinträchtigt wurde. Aus diesen Untersuchungen lässt sich ableiten, dass die lytischen, sauren Granula einen negativen Einfluss auf die pH-sensitiven Chlamydien<sup>447-449</sup> ausüben können, während Coxiellen, die hochresistent gegenüber niedrigen pH-Werten sind<sup>450</sup>, in ihrer Infektiosität nur geringfügig beeinflusst werden.



**Abbildung 4-50: Einfluss von Granzym B auf *C. burnetii* und *C. psittaci***

**(A)** Western-Blot-Analyse zur Bestimmung des Effektes von Granzym B (Grzm B) auf *C. burnetii* und *C. psittaci*. Die Bakterien wurden für 12 h bei RT mit Grzm B (88 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien gewaschen und die Infektiosität in einer Reporterzellinfektion überprüft (Coxiellen: L929-Fibroblasten, MOI 30; Chlamydien: BGM-Zellen, MOI 30; 72 hpi). Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten des bakteriellen (bakt.) HSP60 für *C. burnetii* und *C. psittaci* quantifiziert und auf die Ladekontrolle GAPDH normiert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung, für die die unbehandelten Kontrollen auf 1 gesetzt wurden Die statistische Auswertung ist in Kapitel 3.6 gezeigt (n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle (*C. burnetii*-infiziert, Kontrolle); \*\*\*p<0,001 vs. Kontrolle (*C. psittaci*-infiziert, Kontrolle); n=3). **(B)** zeigt eine Western-Blot-Analyse zur Kontrolle des Effektes von Grzm B auf *C. psittaci* im L929-Reporterzellsystem. Die Bakterien wurden für 12 h bei RT mit Grzm B (88 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien gewaschen und die Infektiosität in einer Reporterzellinfektion überprüft (L929-Fibroblasten, MOI 30; 72 hpi). Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten des chlamydialen (chl.) HSP60 für *C. psittaci* quantifiziert und auf die Ladekontrolle GAPDH normiert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung, für die die unbehandelten Kontrollen auf 1 gesetzt wurden Die statistische Auswertung ist in Kapitel 3.6 gezeigt (\*\*\*p<0,001 vs. Kontrolle (*C. psittaci*-infiziert, Kontrolle); n=3).

Die Auswirkungen der Granula-assoziierten Effektormoleküle auf *C. burnetii* und *C. psittaci* wurden anhand der Lebensfähigkeit der Bakterien in Anwesenheit der bakteriziden Protease Granzym B untersucht. Die Western-Blot-Analyse in Abbildung 4-50 A zeigt, dass eine vorherige Inkubation mit Granzym B keine signifikante Reduktion der bakteriellen HSP60-Signalintensität der Coxiellen im Routine-Auslesesystem hervorruft. Die Untersuchungen unterstützen damit die Annahme, dass die Bakterien resistent gegenüber der Protease sind <sup>451</sup>. Im Gegensatz dazu ist nahezu kein Signal mehr für die Granzym B-behandelten Chlamydien detektierbar. Wie in Abbildung 4-50 B gezeigt, konnte die Verwendung des Standard-Reporterzellensystems als möglicher Einflussfaktor bei der Untersuchung der Chlamydien-Infektion ausgeschlossen werden, da der erhebliche Einfluss des Granzyms in beiden Zellsystemen detektiert werden konnte. Die Ergebnisse aus Abbildung 4-49 und 4-50 deuten somit übereinstimmend darauf hin, dass *C. burnetii* durch die hohe Resistenz gegenüber der Azidität und der bakteriziden Protease vergleichsweise unempfindlich gegenüber der lytischen Granula infizierter NK-Zellen ist, wohingegen die Chlamydien ihre virulenten Eigenschaften nahezu vollständig verlieren.

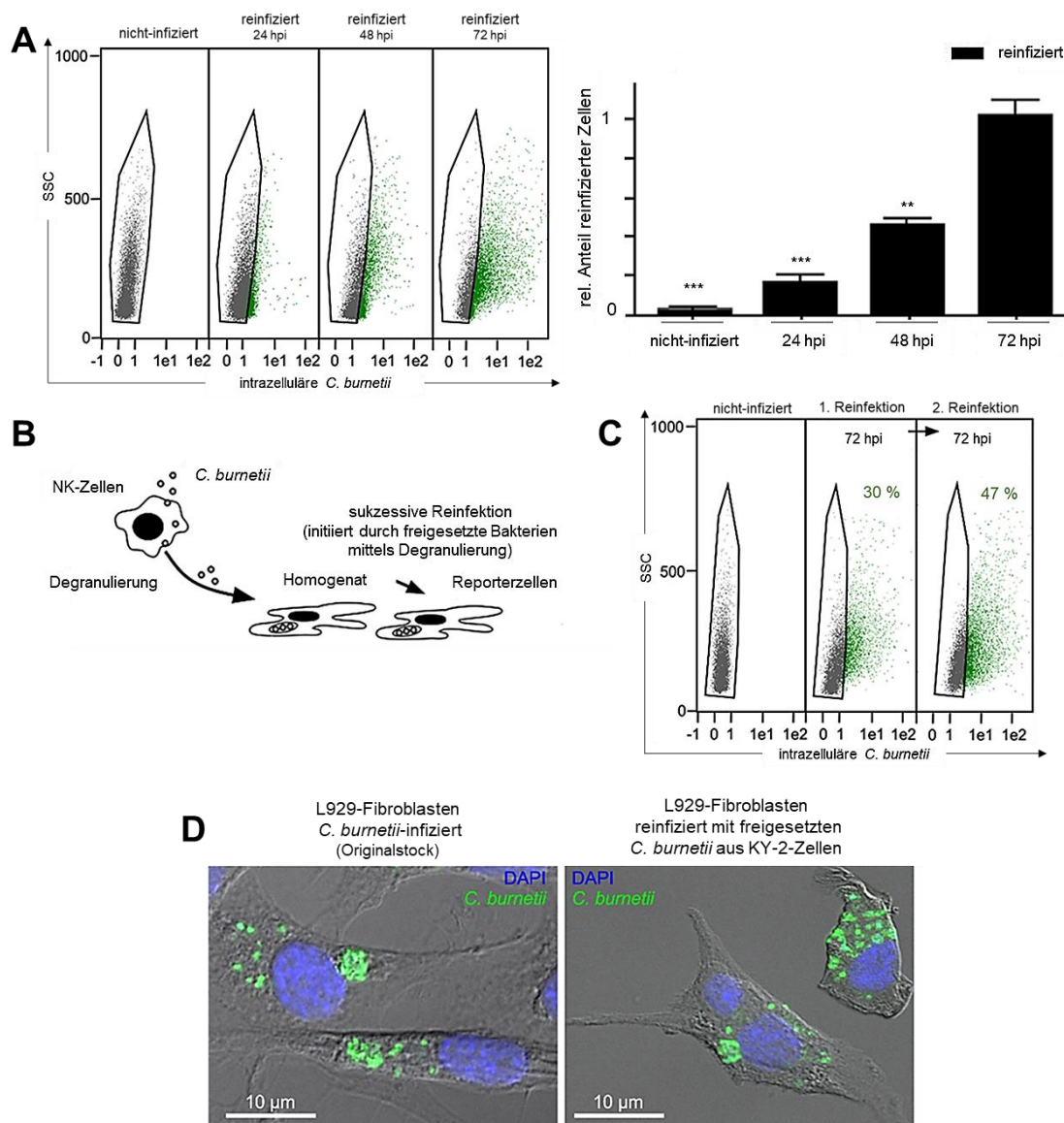


**Abbildung 4-51: Einfluss der zellulären Selbstverteidigung von NK-Zellen auf *C. burnetii* und *C. psittaci***

**(A)** Dargestellt ist die Durchflusszytometrie der Reinfektiosität von *C. burnetii* und *C. psittaci* nach Freisetzung aus infizierten KY-2-Zellen. 72 hpi wurden die Überstände gesammelt, zentrifugiert und die Bakterien für eine Infektion von Reporterzellen (Coxiellen: L929-Fibroblasten, MOI 10; Chlamydien: BGM-Zellen, MOI 10) verwendet. Nach 72 h wurde die Fähigkeit zur Reinfektion durchflusszytometrisch (Coxiellen:  $\alpha$ -CoxII; Chlamydien: *IMAGEN™ Chlamydia Kit*) bestimmt. Nicht-infizierte Reporterzellen sowie Kontrollinfektionen aus den Originalstocks (Coxiellen: MOI 10; Chlamydien: MOI 10; 72 hpi) wurden mitgeführt. Gezeigt ist der relative Anteil infizierter Reporterzellen, bei dem die Werte der Kontrollinfektionen (Originalstock) auf 1 gesetzt wurden. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Aufbereitung erfolgte wie in Kapitel 3.6 beschrieben (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (*C. burnetii*, Originalstock); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (*C. psittaci*, Originalstock);  $n=3$ ). **(B)** Durchflusszytometrie der Reinfektiosität von *C. psittaci* nach Freisetzung aus infizierten KY-2-Zellen im L929-Reporterzellensystem. 72 hpi wurden

die Überstände gesammelt, zentrifugiert und die Bakterien für eine Infektion von Reporterzellen (L929-Fibroblasten, MOI 10) verwendet. Nach 72 h wurde die Fähigkeit zur Reinfektion durchflusszytometrisch mittels *IMAGEN™ Chlamydia Kit* bestimmt. Nicht-infizierte Reporterzellen sowie Kontrollinfektionen aus den Originalstocks (MOI 10; 72 hpi) wurden mitgeführt. Gezeigt ist der relative Anteil infizierter Reporterzellen, bei dem die Mittelwerte der Kontrollinfektionen (Originalstock) auf 1 gesetzt wurden. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.6 (\*\*\*)  $p < 0,001$  vs. Kontrolle (*C. psittaci*, Originalstock);  $n=3$ ).

Die bisherigen Analysen der Arbeit zeigen, dass Coxiellen äußerst widerstandsfähig gegenüber den destruktiven Gegebenheiten lytischer Kompartimente sind. Um den tatsächlichen Einfluss der Degranulierung auf *C. burnetii* zu bestimmen, wurde die Infektiosität freigesetzter Bakterien durchflusszytometrisch bestimmt und mit Originalstocks verglichen (Abb. 4-51 A). Dabei konnte gezeigt werden, dass mehr als die Hälfte der Coxiellen nach dem Export durch Degranulierung infektiös bleibt, wohingegen freigesetzte Chlamydien unabhängig von dem Reporterzellensystem (vgl. Abb. 4-51 B) keine Fähigkeit mehr zur Reinfektiosität aufweisen. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Unempfindlichkeit der Coxiellen gegenüber sekretorischen Granula eine Eigenschaft darstellt, die es den Bakterien ermöglicht, der Eliminierung durch NK-Zellen zu entgehen.



**Abbildung 4-52: Replikationsfähigkeit aus NK-Zellen freigesetzter Coxiellen**

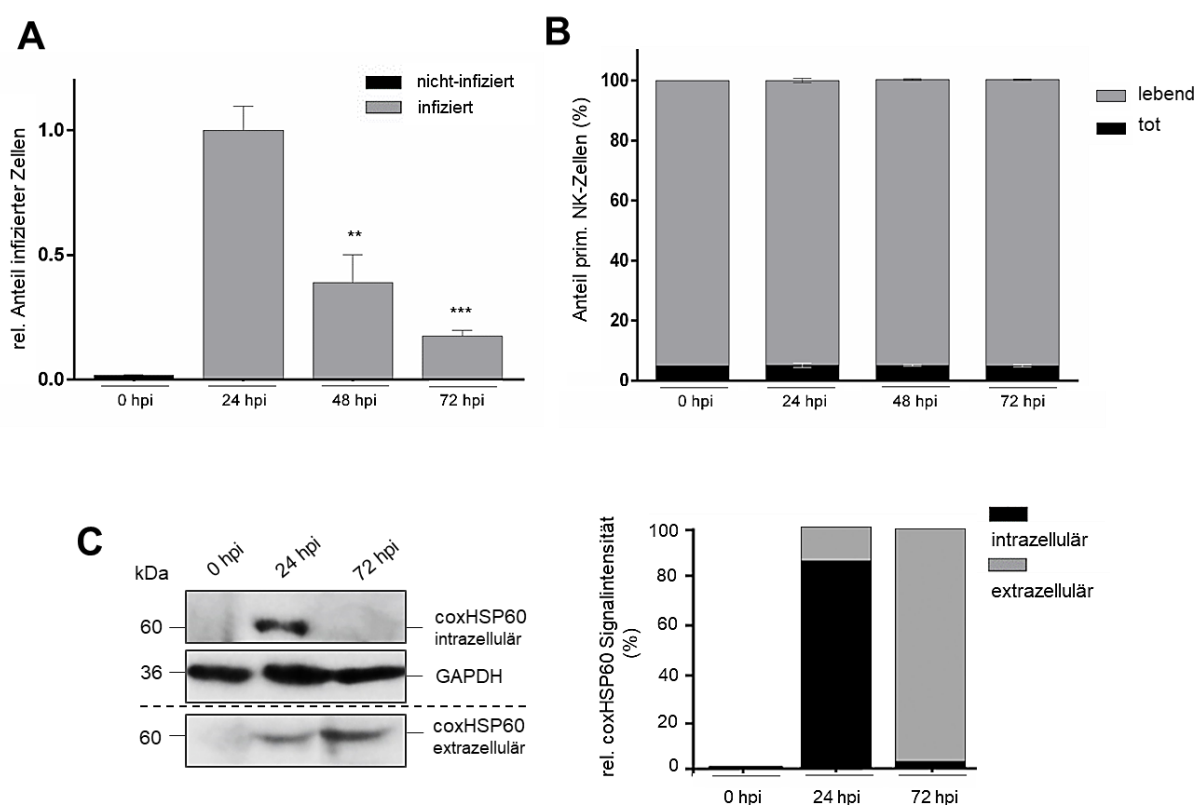
**(A)** Gezeigt ist die Durchflusszytometrie der Reinfektiosität von *C. burnetii* nach Freisetzung aus infizierten KY-2-Zellen. 24-72 hpi wurden die Überstände gesammelt, zentrifugiert und die Bakterien für eine Infektion von Reporterzellen (L929-Fibroblasten, MOI 10) verwendet. Nach 72 h wurde die Fähigkeit zur Reinfektion durchflusszytometrisch über die Anfärbung mit dem  $\alpha$ -CoxII Antikörper nachgewiesen. Nicht-infizierte sowie *C. burnetii* (MOI 10, 72 hpi)-infizierte Reporterzellen wurden als Kontrollen mitgeführt. Gezeigt ist der relative Anteil infizierter Reporterzellen, für den der maximale Mittelwert 72 hpi auf 1 gesetzt wurde. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung, für die die statistische Analyse in Kapitel 3.6 aufgeführt ist (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (reinfiziert, 72 hpi); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (reinfiziert, 72 hpi);  $n=3$ ). **(B)** zeigt eine schematische Abbildung des Versuchsaufbaus zur sukzessiven Reinfektion. NK-Zellen setzen *C. burnetii* mittels Degranulierung frei. Die Bakterien werden gesammelt und für sukzessive Reinfektionen von geeigneten Reporterzellen über zwei Generationen genutzt. **(C)** Durchflusszytometrie der unter (A) beschriebenen Reinfektion mit aus KY-2-Zellen freigesetzten Coxiellen (MOI 10, 72 hpi). Zum Nachweis der Infektion wurde der  $\alpha$ -CoxII Antikörper genutzt. Nicht-infizierte und *C. burnetii* (MOI 10, 72 hpi)-infizierte Reporterzellen (L929-Fibroblasten) wurden als Kontrollen mitgeführt. In Folge der ersten Reinfektion wurden die Reporterzellen mittels *syringe releasing* aufgeschlossen und die Bakterien für eine zweite Reinfektion frischer Reporterzellen (L929-Fibroblasten) genutzt. Aufbau und Analyse folgten dem oben beschriebenen Schema. **(D)** Immunfluoreszenzmikroskopischer Vergleich einer *C. burnetii* (grün)-Infektion in L929-Fibroblasten mit einem Originalstock (MOI 10, 72 hpi, links) und mit freigesetzten Coxiellen aus einer NK-Zell-Infektion (MOI 10, 72 hpi, rechts). DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

Auf Basis bisheriger Experimente stellte sich die Frage, ob die durch NK-Zellen freigesetzten Coxiellen tatsächlich noch in der Lage sind, eine produktive Infektion zu etablieren. Um dies zu adressieren, wurde die Reinfektionsfähigkeit freigesetzter Bakterien durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4-52 A). Tatsächlich konnte ein zeitabhängiger und kontinuierlicher Anstieg (Faktor 5) der zellulären Infektion sowie der Bakterienlast (rel. MFI) Coxiellen-positiver Zellen beobachtet werden. Zur Untermauerung dieses Ergebnisses wurde eine sukzessive Reinfektionsanalyse (Abb. 4-52 B) durchgeführt, bei der eine produktive Infektion über den kontinuierlichen Anstieg der Bakterienlast detektiert wurde (Abb. 4-52 C). Darüber hinaus zeigen die parallel durchgeführten Immunfluoreszenzen in Abbildung 4-52 D eine vergleichbare CCV-Ausbildung in re- und primär-infizierten Reporterzellen. Zusammenfassend verdeutlichen die beschriebenen Untersuchungen, dass freigesetzte Coxiellen nicht nachhaltig durch die Degranulierung beeinflusst werden, sondern weiterhin zur fortlaufenden Infektion von benachbarten Wirtszellen fähig sind.

**4.7.5 Charakterisierung der anti-*C. burnetii* Abwehr in primären NK-Zellen**

Basierend auf den bisherigen Befunden wurde nachfolgend untersucht, ob primäre NK-Zellen Infektionseigenschaften für *C. burnetii* aufweisen, die mit denen der bisher verwendeten NK-Zelllinie vergleichbar sind. Zu diesem Zweck wurden primäre NK-Zellen aus der Milz von C57BL/6-Mäusen ( $\geq 96\%$  Reinheit) isoliert, mit Coxiellen infiziert und entsprechend analysiert.



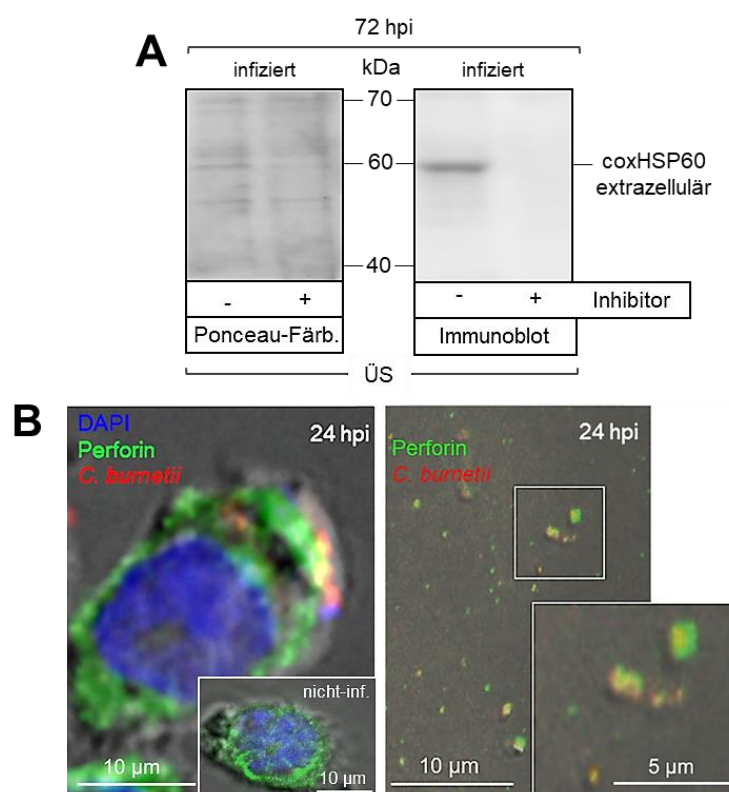


#### Abbildung 4-53: *C. burnetii*-Infektion in primären NK-Zellen

**(A)** Durchflusszytometrie des Infektionsverlaufs in primären NK-Zellen. Die Zellen wurden mit *C. burnetii* (MOI 10) infiziert und die Bakterienlast 24-72 hpi mit dem  $\alpha$ -CoxII Antikörper bestimmt. Als Kontrollen wurden nicht-infizierte Zellen mitgeführt. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Ergebnissen  $\pm$  Standardabweichung. Dargestellt ist der relative Anteil infizierter Zellen, für den der maximale Mittelwert 24 hpi auf 1 gesetzt wurde. Die statistische Auswertung ist in Kapitel 3.6 beschrieben (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (infiziert, 24 hpi); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (infiziert, 24 hpi);  $n=3$ ).

**(B)** Analyse nekrotischer/apoptischer primärer NK-Zellen während der *C. burnetii*-Infektion (MOI 10, 0-72 hpi) mittels Trypanblau-Färbung. Gezeigt ist der Anteil lebender beziehungsweise toter Zellen aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. **(C)** Western-Blot-Analyse zum Nachweis von coxHSP60 intrazellulär und in den Überständen (extrazellulär) aus *C. burnetii* (MOI 10)-infizierten primären NK-Zell-Kulturen 24 hpi und 72 hpi. Als Kontrolle wurden nicht-infizierte Zellen und -Überstände eingesetzt. Für die densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von coxHSP60 quantifiziert und auf die mitgeführte Ladekontrolle GAPDH normalisiert. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse einer Analyse. Die Gesamt-coxHSP60-Signalintensität 24 hpi wurde auf 100 gesetzt.

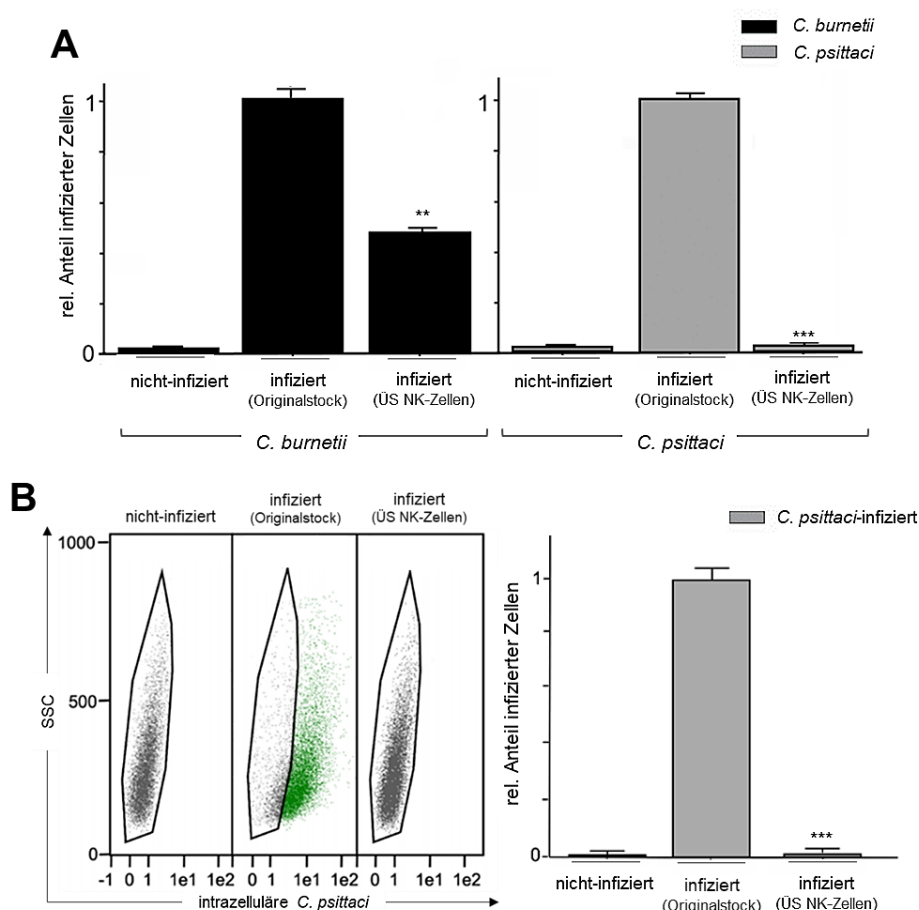
Anhand der durchflusszytometrischen Untersuchung der Coxiellen-Infektion in Abbildung 4-53 A konnte nachgewiesen werden, dass es auch im Verlauf der Infektion primärer NK-Zellen zu einer zeitabhängigen Reduktion (80%) Bakterien-positiver Zellen kommt. Dass diese Reduktion nicht auf den Tod der infizierten Zellen zurückzuführen ist, ließ sich anhand einer Lebend-Tod-Färbung ausschließen (Abb. 4-53 B). Die Immunblot-Analyse in Abbildung 4-53 C zeigt in diesem Zusammenhang, dass die kontinuierliche Verringerung des coxHSP60-Signals in den Zellextrakten mit einem Anstieg des Signals in den Zellüberständen einhergeht. In Übereinstimmung mit den Daten in Abbildung 4-43 deuten diese Ergebnisse somit auf eine effiziente Freisetzung der Bakterien aus infizierten NK-Zellen hin.



**Abbildung 4-54: Aktivierung und Reifung *C. burnetii*-infizierter primärer NK-Zellen**

**(A)** Western-Blot-Analyse nicht-infizierter und *C. burnetii* (MOI 10)-infizierter primärer NK-Zellen in An- und Abwesenheit eines PKC  $\Theta$ -Inhibitors (Sotrastaurin, 250 nM) 72 hpi (extrazellulär, Überstand). Als Ladekontrolle wurde eine Ponceau-S-Färbung verwendet. **(B)** Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse intrazellulärer (links) und extrazellulärer (rechts) bakterieller Strukturen (tdTomato, MOI 10, 24 hpi, rot) und Kolokalisation mit Perforin (grün) nach Infektion primärer NK-Zellen. Der Bildausschnitt links zeigt eine nicht-infizierte Kontrollzelle. Der Bildausschnitt rechts zeigt eine Vergrößerung des weiß-eingerahmten Ausschnitts im obigen Bild.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die auf Basis der NK-Zelllinie erzielt wurden, zeigte die Western-Blot-Analyse in Abbildung 4-54 A, dass die Freisetzung der Coxiellen Sotrastaurin-sensitiv war, so dass in Anwesenheit des PKC  $\Theta$ -Inhibitors keine weitere Ausschüttung der Bakterien detektiert wurde. Die Immunfluoreszenz in Abbildung 4-54 B zeigt, dass es während der Infektion nicht zur Ausbildung perinukleärer CCVs kommt. Stattdessen wurden lediglich peripher-lokalisierte kleine bakterielle Strukturen, die mit Perforin kolokalisierten, innerhalb und außerhalb infizierter Primärzellen detektiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl immortalisierte als auch primäre NK-Zellen während der Coxiellen-Infektion den gleichen zellulären Abwehrmechanismus (Aufnahme in lytische Granula und anschließende Degranulierung) initiieren.

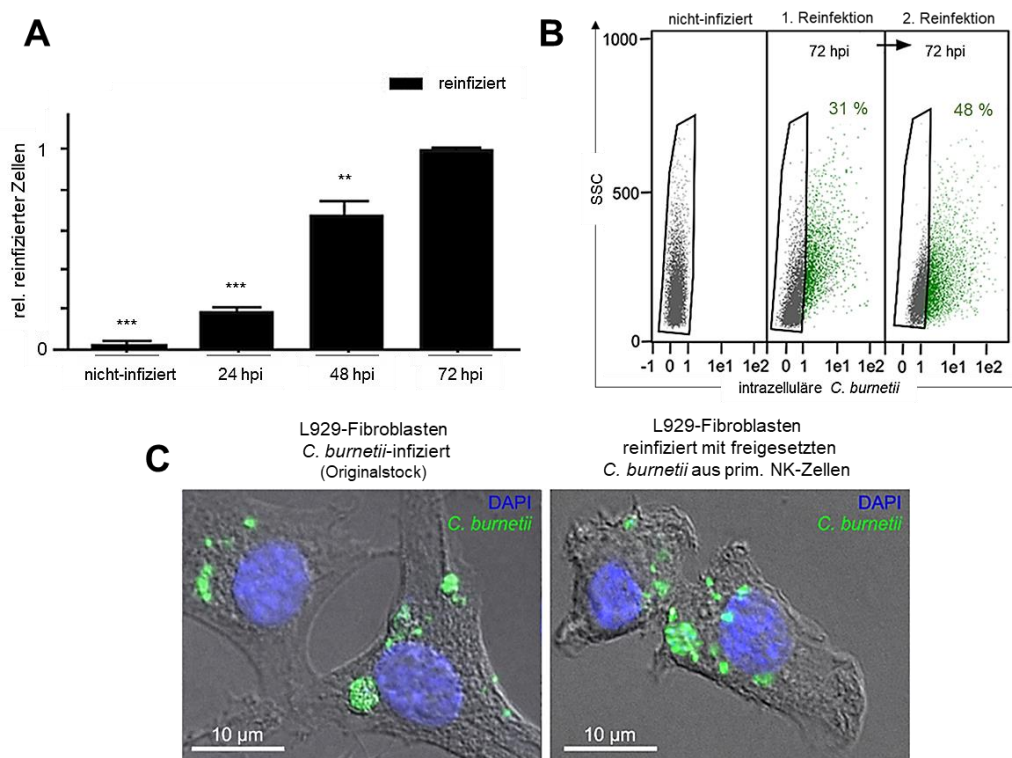


**Abbildung 4-55: Antibakterielle Abwehr infizierter primärer NK-Zellen**

**(A)** Durchflusszytometrie der Reinfektiosität von *C. burnetii* und *C. psittaci* nach Freisetzung aus infizierten primären NK-Zellen. 72 hpi wurden die Überstände gesammelt, zentrifugiert und die Bakterien für eine Infektion von Reporterzellen (Coxiellen: L929-Fibroblasten, MOI 10; Chlamydien: BGM-Zellen, MOI 10) verwendet. Nach 72 h wurde die Fähigkeit zur Reinfektion durchflusszytometrisch (Coxiellen:  $\alpha$ -CoxII; Chlamydien: *IMAGEN™ Chlamydia Kit*) nachgewiesen. Nicht-infizierte Reporterzellen sowie Kontrollinfektionen aus den Originalstocks (Coxiellen: MOI 10; Chlamydien: MOI 10; 72 hpi) wurden mitgeführt. Gezeigt ist der relative Anteil infizierter Reporterzellen, bei dem die Werte der Kontrollinfektionen (Originalstock) auf 1 gesetzt wurden. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.6 dargelegt (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (*C. burnetii*, Originalstock); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (*C. psittaci*, Originalstock);  $n=3$ ). **(B)** zeigt die Durchflusszytometrie der Reinfektiosität von *C. psittaci* nach Freisetzung aus infizierten primären NK-Zellen im L929-Reporterzellensystem. 72 hpi wurden die Überstände gesammelt, zentrifugiert und die Bakterien für eine Infektion von Reporterzellen (L929-Fibroblasten, MOI 10) verwendet. Nach 72 h wurde die Fähigkeit zur Reinfektion durchflusszytometrisch mittels *IMAGEN™ Chlamydia Kit* bestimmt. Nicht-infizierte Reporterzellen sowie Kontrollinfektionen aus den Originalstocks (MOI 10; 72 hpi) wurden mitgeführt. Gezeigt ist der relative Anteil infizierter Reporterzellen, bei dem die Mittelwerte der Kontrollinfektionen (Originalstock) auf 1 gesetzt wurden. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.6 beschrieben (\*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (*C. psittaci*, Originalstock);  $n=3$ ).

Um festzustellen, ob die vermutete Abwehrstrategie auch mit einer vergleichbaren Effizienz einhergeht, wurde die Infektiosität der freigesetzten Bakterien bestimmt (Abb. 4-55 A). Chlamydien wurden erneut als Positivkontrolle für eine funktionale NK-Zell-Abwehr eingesetzt. Die durchflusszytometrische Untersuchung ergab, dass die freigesetzten Chlamydien aus infizierten Primärzellen ihre Infektiosität in beiden Reporterzellensystemen (vgl. Abb. 4-55 B) nahezu vollständig einbüßten, wohingegen die freigesetzten Coxiellen einen Großteil ihrer Infektiosität (nahezu 50%) erhalten konnten. Die Untersuchungen zeigen, dass auch primäre NK-Zellen eine funktionale zelluläre Selbstverteidigung aufweisen, *C. burnetii* jedoch mehrheitlich resistent gegenüber sekretorischen Granula und der Degranulierung primärer NK-Zellen ist.





**Abbildung 4-56: Replikationsfähigkeit aus primären NK-Zellen freigesetzter Coxiellen**

(A) zeigt die Durchflusszytometrie der Reinfektiosität von *C. burnetii* nach Freisetzung aus infizierten primären NK-Zellen. 24-72 hpi wurden die Überstände gesammelt, zentrifugiert und die Bakterien für eine Infektion von Reporterzellen (L929-Fibroblasten, MOI 10) verwendet. Nach 72 h wurde die Fähigkeit zur Reinfektion durchflusszytometrisch über die Anfärbung mit dem  $\alpha$ -CoxII Antikörper bestimmt. Nicht-infizierte sowie *C. burnetii* (MOI 10, 72 hpi)-infizierte Reporterzellen wurden als Kontrollen mitgeführt. Gezeigt ist der relative Anteil infizierter Reporterzellen, für den der maximale Mittelwert 72 hpi auf 1 gesetzt wurde. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung, für die die statistische Analyse entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.6 durchgeführt wurde (\*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (reinfiziert, 72 hpi); \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (reinfiziert, 72 hpi);  $n=3$ ). (B) Durchflusszytometrie einer sukzessiven Reinfektion (siehe Abbildung 4-51) mit aus primären NK-Zellen freigesetzten Coxiellen (MOI 10, 72 hpi). Zum Nachweis der Infektion wurde der  $\alpha$ -CoxII Antikörper genutzt. Nicht-infizierte und *C. burnetii* (MOI 10, 72 hpi)-infizierte Reporterzellen (L929-Fibroblasten) wurden als Kontrollen mitgeführt. In Folge der ersten Reinfektion wurden die Reporterzellen mittels *syringe releasing* aufgeschlossen und die Bakterien für eine zweite Reinfektion frischer Reporterzellen (L929-Fibroblasten) genutzt. (C) Immunfluoreszenzmikroskopischer Vergleich einer *C. burnetii* (grün)-Infektion in L929-Fibroblasten mit einem Originalstock (MOI 10, 72 hpi, links) und mit freigesetzten Coxiellen aus einer primären NK-Zell-Infektion (MOI 10, 72 hpi, rechts). DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

Für den Nachweis der nachhaltigen Replikationsfähigkeit der aus primären NK-Zellen freigesetzten Coxiellen wurde eine durchflusszytometrische Untersuchung der Reinfektiosität durchgeführt (Abb. 4-56 A). Es konnte hier gezeigt werden, dass es im Zeitverlauf zu einem kontinuierlichen Anstieg der Reporterzellinfektion kommt. Damit übereinstimmend wurde auch im Rahmen der sukzessiven Reinfektion eine zunehmende Infektiosität detektiert (Abb. 4-56 B). Ferner zeigten die aus primären NK-Zellen freigesetzten Coxiellen in der Immunfluoreszenz (Abb. 4-56 C) morphologisch gleichartige CCVs im Vergleich zur Kontrollinfektion. Zusammenfassend lässt sich daher daraus schließen, dass immortalisierte und primäre NK-Zellen eine vergleichbare zelluläre Abwehr- und Eliminierungsstrategie besitzen, der Coxiellen jedoch durch ihre resistenten Eigenschaften gegenüber saurem pH und vakuolären Proteasen in effizienter Weise entgehen können. Dies könnte eine wichtige Achillesferse der angeborenen Immunantwort gegen Coxiellen darstellen und somit für die frühen Schritte einer systematischen Ausbreitung der Infektion mitentscheidend sein.

## 5. Diskussion

### 5.1 Mechanismen der Immunsuppression *C. burnetii*-infizierter DCs

Neben Monozyten und Makrophagen dienen auch DCs *C. burnetii* als geeignete Wirtszellen. DCs gehören zu den Immunzellen der *first-line-of-defense* des angeborenen Immunsystems und treten während einer Coxiellen-Infektion früh mit dem bakteriellen Pathogen in Kontakt. Durch Antigenpräsentation infizierter DCs wird die für die anti-Coxiellen Abwehr maßgebliche T-Zell-Immunität initialisiert. Untersuchungen zu *C. burnetii*-Infektionen in verschiedenen Wirtsorganismen zeigen eine frühe Reaktion gegen Ph II- und spätere Immunantwort gegen Ph I-Coxiellen<sup>252,452,453</sup>. Dies wirft die wichtige Frage auf, ob es unter *in vivo*-Bedingungen tatsächlich zu einem Phasenwechsel der Coxiellen von frühen avirulenten Ph II- zu späteren virulenten Ph I-Organismen kommt. Schon 1961 berichtete Genig über die Isolierung eines Coxiellen-Stamms, der als M-44 bezeichnet wurde und eine deutlich reduzierte Virulenz besaß<sup>454</sup>, wengleich keine größere DNA-Deletion detektiert wurde<sup>455</sup>. Untersuchungen seiner immunogenen Eigenschaften führten letztlich zur Entwicklung eines experimentellen Ph II-Lebendimpfstoffs für den humanen Einsatz. Verschiedene Arbeitsgruppen<sup>456-459</sup> stellten fest, dass der entwickelte M-44-Impfstoff eine sehr gute Immunisierung bewirkte. Robinson und Hasty<sup>460</sup> reduzierten die Virulenzeigenschaften von M-44 weiter und zeigten, dass die Vakzine guten Schutz sowohl gegen Ph II aber interessanterweise auch Ph I bot. Da es sich hierbei um einen Ph II-Lebendimpfstoff handelt, kann das Auftauchen von nachweisbaren Ph I-Antigenen im Verlauf der Immunantwort als direkter Hinweis auf einen Ph II/Ph I-Wechsel mit zunehmender Virulenz gewertet werden<sup>461,462</sup>. Dass der Ph II-Stamm M-44 tatsächlich ein entsprechendes Ph I-Potenzial besitzt, belegten zudem weitere Untersuchungen von Genig<sup>463</sup>, der in seinen Experimenten nachweisen konnte, dass nach seriellen Mehrfach-Passagen in Meerschweinchen und Mäusen M-44-Organismen mit Ph I-Antigeneigenschaften auftraten. Es wird diskutiert, dass die beobachtete initiale Ph II-Antwort, die nachweislich nicht-protektiv ist<sup>41</sup>, als gezielte immunologische Evasionstaktik von Coxiellen fungieren könnte, um Immunreaktionen gegen Ph I-Bakterien zeitlich zu verzögern<sup>79</sup>. Bisher ist jedoch völlig unklar, welche funktionale Bedeutung eine frühe anti-Ph II Antwort für die Wechselwirkung zwischen Immunzellen und Coxiellen hat. Weitere detaillierte Studien hierzu sind daher für ein wesentlich besseres Verständnis der *C. burnetii*-Infektion sowie der initialen Schritte der anti-Coxiellen Antwort entscheidend.

Die Untersuchungen der vorliegenden Promotionsarbeit belegen erstmalig eine produktive Ph II-*C. burnetii*-Infektion in DCs, die mit einer Reifungsblockierung der infizierten Immunzellen einhergeht (Abb. 4-2, -4, -5). Als hierfür ursächlich zeigte sich die  $\alpha V\beta 8$ -Integrin-vermittelte autokrine TGF- $\beta$ -Sekretion, die sowohl die MHC I-Antigenpräsentation als auch die zelluläre Coxiellen-Abwehr durch iNOS/NO unterbindet (Abb. 4-6, -19). Eine effiziente (Re)Aktivierung der zellautonomen Selbstverteidigung ließ sich durch die Anwesenheit von IFN- $\gamma$  erreichen (Abb. 4-8, -9, -14). Für die Eliminierung der Coxiellen ist die iNOS-induzierte Synthese des bakteriziden NO (Abb. 4-18), das

vermutlich parasitophore Vakuolen (Abb. 4-28) und die bakterielle Atmungskette als Ziel hat (Abb. 4-30), entscheidend. Während infizierte DCs eine metabolische Umprogrammierung durchlaufen, um sich vor selbstproduziertem NO zu schützen (Abb. 4-29), zeigt sich parallel eine bakterielle Gegenwehr durch Expressionsinduktion radikalentgiftender Enzyme und Cytochrom *bd* (Abb. 4-30). Darüber hinaus zeigte sich, dass die DotA-Komponente des T4SS von Coxiellen eine entscheidende Rolle für die Wirksamkeit des IFN- $\gamma$ -vermittelten iNOS/NO-Abwehrsystems spielt (Abb. 4-31, -32). Dies lässt vermuten, dass ein intaktes bakterielles Sekretionssystem und/oder seine Substrate/Effektoren möglicherweise einen positiven Einfluss auf den NO-Angriff der Wirtszellen haben beziehungsweise entscheidende Angriffsziele für das Radikal bieten. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die NO-vermittelte S-Nitrosylierung bakterielle Sekretionssystem-Effektoren attackieren kann <sup>464</sup>. Da zahlreiche bakterielle Proteine unterschiedlicher Funktion anfällig für eine wirtszellvermittelte S-Nitrosylierung sind <sup>465</sup>, werden weitere zellbiologische und biochemische Studien notwendig sein, um die genaue Bedeutung des Coxiellen-T4SS für die Wirkung des iNOS/NO-Systems aufzuklären.

Die vorliegenden Untersuchungen infizierter DCs widmen sich im Schwerpunkt der bisher unklaren Bedeutung von Ph II-Bakterien im beobachteten LPS-Phasenwechsel einer Coxiellen-Infektion <sup>64,65</sup>. In frühen Studien zu *C. burnetii* wurde zunächst vermutet, dass sich Ph I- und Ph II-Coxiellen bezüglich ihres LPS nicht unterscheiden <sup>466</sup>, während die Gruppe von Hackstadt bereits 1985 darauf verwies, dass die LPS-Strukturen von Ph I- und II-Coxiellen sehr unterschiedlich zu betrachten sind <sup>467-469</sup>. Zur Untersuchung des Coxiellen-LPS auf molekularer Ebene wurden zunächst chemische Aufarbeitungs-/Extraktionsmethoden angewandt, durch die ein schrittweiser Abbau des vollständigen Ph I erreicht wurde <sup>470</sup>. Da jedoch von Schramek et al. <sup>470</sup> nicht das natürlich vorkommende Ph II-LPS des Coxiellen-Phasenwechsels analysiert/eingesetzt wurde, sind die gewonnenen Ergebnisse nur bedingt aussagekräftig für die distinkten Eigenschaften der beiden LPS-Formen. So wurde bei vormaligen Ph I-Infektionsexperimenten mit murinen DCs nicht mit Ph II-Varianten, sondern mit solchen Bakterien, die eine fehlende LPS-Struktur aufwiesen, verglichen <sup>471</sup>. Da Ph II- im Vergleich zu Ph I-LPS lediglich das O-Antigen fehlt, lassen die zuvor gemachten Studien von Wei et al. <sup>471</sup> zwar Aussagen zur An- und Abwesenheit von Ph I-LPS, jedoch nicht zum immunologischen Einfluss von Ph II-Coxiellen zu. Dieser wichtige Punkt wurde in einer Studie von Shannon et al. <sup>41</sup> aufgegriffen. Hier wurden in entsprechenden Infektionsexperimenten mit humanen DCs Ph I- und Ph II-Coxiellen miteinander verglichen. Die Analysen der Arbeitsgruppe weisen auf einen Reifungsblock Ph I-infizierter DCs hin, während interessanterweise eine entsprechende DC-Reifung nach Infektion mit Ph II-Bakterien zu beobachten war <sup>41</sup>. Auf dieser Grundlage wurde von den Autoren die Arbeitshypothese aufgestellt, dass ausschließlich das Ph I-LPS eine Immunsabversion der DCs induziert, indem es die auf der Zelloberfläche vorhandenen TLR4 maskiert und hierdurch Rezeptorbindung/-aktivierung und nachfolgende DC-Aktivierung blockiert. Die Annahme, dass Ph II-Coxiellen keinen negativen Einfluss auf die Reifung infizierter DCs haben, konnte im Rahmen der Experimente dieser Promotionsarbeit nicht bestätigt werden (Abb. 4-12). In Übereinstimmung hiermit zeigen auch Analysen anderer Arbeitsgruppen kaum detektierbare Unterschiede in der Blockierung der APC-Reifung nach Infektion mit Ph I- und Ph II-

Coxiellen<sup>40</sup>. Im Gegensatz zu den Schlussfolgerungen von Shannon et al.,<sup>41</sup> jedoch in Übereinstimmung mit den in dieser Promotionsarbeit gemachten Beobachtungen, zeigen zudem die Arbeiten von Zamboni et al.<sup>472</sup>, dass aufgereinigtes Lipid A aus Ph I- oder Ph II-LPS weder eine funktionale Aktivierung von TLR2 noch TLR4 bewirkt, sondern beide bakteriellen Moleküle als molekulare Antagonisten einen eher suppressiven Einfluss auf das aktivierte TLR4-*signaling* von Makrophagen zeigen, was vermuten lässt, dass sich die beiden Phasenvarianten von *C. burnetii* nicht grundsätzlich in ihrer TLR4-Beeinträchtigung unterscheiden. Somit scheinen Ph II-Coxiellen immunsubversive Eigenschaften zu besitzen, die offensichtlich LPS-ab- und -unabhängig durch TLR4-Blockierung<sup>472</sup> und/oder autokrine TGF- $\beta$ -Ausschüttung (Abb. 4-6) auf immunologische Prozesse infizierter Zellen einwirken. In der Tat wird die funktionale Immunregulation von DCs maßgeblich durch TGF- $\beta$  bestimmt<sup>473</sup>. In Übereinstimmung hiermit konnten Benoit et al.<sup>245</sup> einen ähnlichen Phänotyp für *C. burnetii*-infizierte Makrophagen zeigen. So wiesen infizierte Makrophagen eine M2-Polarisierung mit Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine auf. Dabei wurden insbesondere erhöhte Level von IL-10 und TGF- $\beta$  für das Ausbleiben zellulärer Abwehrmechanismen verantwortlich gemacht. Es ist bekannt, dass IL-4 und TGF- $\beta$  antagonistisch wirken<sup>474,475</sup> und IL-4 einen negativen Einfluss auf die Expression von TGF- $\beta$  und den TGF- $\beta$ -Rezeptor hat<sup>476</sup>. Da Shannon et al.<sup>41</sup> ihre Coxiellen-Infektionsstudien an DCs in Anwesenheit von IL-4 durchführten, ist naheliegend, dass in dem von den Autoren untersuchten humanen DC-Modellsystem eine durch Ph II-vermittelte autokrine TGF- $\beta$ -Sekretion IL-4-bedingt blockiert wurde<sup>476</sup> und daher die in dieser Promotionsarbeit beobachtete MHC I-Immunsuppression über TGF- $\beta$  nicht detektiert werden konnte.

Der immunmodulatorische Einfluss von TGF- $\beta$  wird über eine gesteigerte Integrin-Expression (bei DCs das  $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrin<sup>383,386,387</sup>) vermittelt<sup>383</sup>. Als aktivierende Komponente dissoziiert  $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrin den inaktiven Komplex aus TGF- $\beta$  und LAP, was letztlich eine Rezeptorbindung des freigesetzten aktiven TGF- $\beta$  ermöglicht<sup>384,385</sup>. Vorangegangene Untersuchungen konnten zeigen, dass die MyD88-vermittelte  $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrin-Expression von DCs durch PRR-Liganden gesteigert wird und so eine erhöhte TGF- $\beta$ -Aktivität induziert<sup>387</sup>. Somit ist anzunehmen, dass der beobachtete TGF- $\beta$ -Effekt Ph II-infizierter DCs (Abb. 4-6) maßgeblich auf eine infektionsbedingte Hochregulation der  $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrin-Expression zurückzuführen ist (Abb. 4-7). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass dem immunsuppressiven TGF- $\beta$  vermutlich auch eine wichtige Rolle im chronischen Verlauf einer Coxiellen-Infektion zukommt. So ergaben die Untersuchungen von Patienten mit einer Q-Fieber-assoziierten Endokarditis<sup>477</sup>, dass mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) neben erhöhter IL-10- auch eine erhöhte TGF- $\beta$ -Produktion aufwiesen<sup>477</sup>. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit unterstreicht dies die funktionale Relevanz immunsuppressiver Zytokine sowohl im frühen/akuten als auch späten/chronischen Verlauf einer *C. burnetii*-Infektion.

## 5.2 Aktivierung zellulärer Selbstverteidigung *C. burnetii*-infizierter DCs

Die vorliegenden Resultate der Dissertation zeigen, dass IFN- $\gamma$  die TGF- $\beta$ / $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrinbedingte Immunsuppression Ph II-infizierter DCs (Abb. 4-6, -19) aufhebt (Abb. 4-8, -9, -14). IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  weisen eine antagonistische Beziehung auf<sup>478</sup>, bei der TGF- $\beta$ /Smad- und der IFN- $\gamma$ /JAK-STAT-Signalweg in engem Austausch miteinander stehen<sup>479-481</sup>. Untersuchungen vorausgegangener Studien weisen darauf hin, dass IFN- $\gamma$  den TGF- $\beta$ -Signalweg supprimiert, indem die Expression des Negativ-Regulators Smad7 induziert und infolgedessen TGF- $\beta$  blockiert wird<sup>479,480</sup>. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Aktivierung von Smad auf Transkriptebeine über eine STAT1-abhängige Sequestrierung des Kofaktors p300 verhindert wird<sup>481</sup>. Des Weiteren wird bei DCs die TGF- $\beta$ -Aktivierung in strikter Weise durch die Oberflächenexpression von  $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrin reguliert, welche durch IFN- $\gamma$ -Anwesenheit negativ beeinflusst wird (Abb. 4-9)<sup>386</sup>. Es ist somit denkbar, dass entsprechende Mechanismen auch in Coxiellen-infizierten DCs eine Rolle spielen und entscheidend für die Aufhebung der TGF- $\beta$ -abhängigen Suppression infizierter DCs sind. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die antagonistische Beziehung zwischen IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  nicht nur die funktionale Reifung, sondern auch die Höhe der zu beobachtenden Bakterienlast infizierter DCs bestimmt. So zeigt sich eine deutliche Verringerung der intrazellulären Infektion sowohl durch die Zugabe von IFN- $\gamma$  (Abb. 4-10) als auch Anwesenheit eines TGF- $\beta$ -neutralisierenden Antikörpers (Abb. 4-19). Dies ist vor allem durch die entgegengesetzte funktionale Wirkung von IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  auf die Regulation des iNOS/NO-Systems<sup>416,482</sup> in Coxiellen-infizierten DCs zu erklären.

Ein weiterer möglicherweise sehr wichtiger Aspekt der IFN- $\gamma$ -vermittelten Reaktivierung Coxiellen-infizierter DCs betrifft die Aufhebung auftretender LPS-Toleranz infizierter APCs, indem eine TLR-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung der betroffenen Zellen wiederhergestellt wird<sup>483</sup>. Da die postulierte TLR4-Blockierung durch Coxiellen-LPS<sup>74,472</sup> in APCs möglicherweise einen LPS-Toleranz-ähnlichen Zustand generiert, bei dem ebenfalls die TLR-Stimulation und die nachfolgende DC-Reifung unterbunden werden, wäre denkbar, dass IFN- $\gamma$  auch bei einer Ph I-Infektion einen positiven Einfluss auf die funktionale Reaktivierung infizierter APCs nimmt. Dies wird durch Untersuchungen gestützt, die zeigen, dass IFN- $\gamma$  ebenfalls die Eliminierung virulenter Ph I-Coxiellen, insbesondere durch funktionale Reifung infizierter APCs, unterstützt<sup>484</sup>. In der Tat basiert die für die Bekämpfung von Coxiellen erforderliche T<sub>H</sub>1-vermittelte zelluläre Immunität größtenteils auf IFN- $\gamma$ . So zeigte sich, dass bei eingeschränkter oder ausbleibender IFN- $\gamma$ -Produktion die Mortalitätsrate infizierter Versuchstiere erhöht ist<sup>257</sup>. IFN- $\gamma$  moduliert eine Vielzahl verschiedener Gene/Signalwege<sup>485</sup> und induziert unterschiedliche Mechanismen der zellulären Selbstverteidigung im Rahmen zellautonomer Abwehr<sup>275</sup>, die auch für die intrazelluläre Coxiellen-Eliminierung von entscheidender Bedeutung zu sein scheinen (Abb. 4-25). Insbesondere das iNOS/NO-System nimmt für infizierte DCs eine Schlüsselrolle ein (vgl. Abb. 4-14 und -13, -26). Neben dem LPS dienen eine Reihe anderer bakterieller Oberflächenstrukturen (PAMPs, wie Peptidoglykane und Lipoproteine<sup>486,487</sup>) der TLR2 und/oder 4-vermittelten iNOS-Induktion in infizierten Zellen<sup>486</sup>. In der Tat belegen die Untersuchungen dieser Arbeit, dass iNOS in gewissem Maße bereits durch eine Coxiellen-Infektion

(und vorhandene PAMPs) induziert werden kann. Voraussetzung dafür ist jedoch eine Neutralisation des iNOS-supprimierenden TGF- $\beta$ -Effekts (Abb. 4-19).

Es kann angenommen werden, dass Coxiellen die durch sie ausgelöste autokrine TGF- $\beta$ -Sekretion infizierter DCs in mehrfacher Weise für sich nutzen. Zum einen wird die durch PAMPs-induzierte iNOS/NO-Abwehr beeinträchtigt und zum anderen die funktionale Reifung und Antigenpräsentation infizierter DCs unterdrückt. Die Regulation von iNOS/NO durch TGF- $\beta$  wurde durch verschiedene Studien belegt<sup>416,488</sup> und scheint durch unterschiedliche zelluläre Mechanismen kontrolliert zu werden. So kann die Modulation der iNOS-Transkription auf Ebene des Promotors<sup>416</sup> und/oder iNOS-mRNA-Stabilität erfolgen<sup>488-490</sup>, während auf post-transkriptioneller Ebene iNOS entweder über seine Translation oder -degradation reguliert wird<sup>488,490-492</sup>. Eine pathogenvermittelte Aushebelung des iNOS/NO-Systems wurde auch für andere intrazelluläre Erreger (wie *Leishmania* spp.) beschrieben<sup>493</sup>. Durch Eingriff in die TGF- $\beta$ -Regulation<sup>494</sup> und die Aktivierung der Arginase verschiebt sich der L-Argininstoffwechsel infizierter Wirtszellen in Richtung der L-Ornithin-Produktion<sup>495,496</sup>. Diese führt letztlich zu einer Abnahme der NO-Ausschüttung, was das intrazelluläre Wachstum des Pathogens begünstigt<sup>497</sup>.

Im Falle der Coxiellen wurde bereits früh vermutet, dass der Einfluss von IFN- $\gamma$  auf *C. burnetii*<sup>498</sup> in verschiedenen Zellsystemen auf der Induktion von iNOS/NO beruht<sup>260,261,267,484,499,500</sup>. Für die Reduktion der zellulären Coxiellen-Infektion wurden bisher maßgeblich zwei Abwehrmechanismen beschrieben. Zum einen die Beeinträchtigung der Ausbildung und Reifung parasitophorer Vakuolen in Fibroblasten und Makrophagen<sup>260,261,267</sup> sowie zum anderen die Interferon-bedingte Bakterieneliminierung durch Apoptoseinduktion in THP-1 Monozyten<sup>484,499,500</sup>. Dellacasagrande et al. beschreiben, dass die Effizienz der zellautonomen Abwehr von THP-1-Monozyten stark durch die jeweilige Applikationsstrategie des IFN- $\gamma$  bedingt ist. Während eine IFN- $\gamma$ -Vorbehandlung lediglich einen bakteriostatischen Effekt hat, zeigt sich bei Zugabe nach vorheriger Infektion eine starke bakterizide Abwehr der Monozyten<sup>499</sup>. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation ließen sich keine entsprechenden Unterschiede bei der IFN- $\gamma$ -Vor- und Nachbehandlung für die zelluläre Abwehr infizierter DCs beobachten (Abb. 4-14). Auch die Annahme, dass eine postinfektiöse IFN- $\gamma$ -Behandlung von Makrophagen für die zelluläre Coxiellen-Abwehr nicht wirksam ist<sup>499,501</sup>, ließ sich durch die Ergebnisse der Promotionsarbeit (Abb. 4-34) und die Untersuchungen anderer Zelllinien oder Primärzellen<sup>261</sup> nicht bestätigen. Die unterschiedlichen Befunde der Arbeitsgruppen lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass es in den verschiedenen untersuchten Wirtszellen in Abhängigkeit des jeweiligen Stoffwechsels zeitliche und/oder strukturelle Unterschiede im Ablauf des Vermehrungszyklus der Coxiellen (zwischen 3 und 7 Tagen<sup>502</sup>) gibt, welche insbesondere eine postinfektiöse IFN- $\gamma$ -Intervention beeinflussen. Die für THP-1-Zellen beschriebene Coxiellen-Abwehr mittels Apoptoseinduktion spiegelt höchstwahrscheinlich eine zelllinienspezifische Eigenschaft wider. So ist zum einen bekannt, dass IFN- $\gamma$  auch bei nicht-infizierten THP-1 Zellen in effizienter Weise Apoptose induziert<sup>503</sup> und zum anderen handelt es sich um eine leukämische Zelllinie, die, obwohl p53-defekt<sup>504</sup>, für ihre ATP-Produktion stärker auf mitochondriale OXPHOS als auf zytosolische Glykolyse angewiesen ist<sup>505</sup>. Obschon auch OXPHOS-abhängige THP1-Monozyten in einem gewissen Maß zur aeroben

Glykolyse fähig sind<sup>506</sup>, könnte das durch IFN- $\gamma$  induzierte iNOS/NO-System über einen starken mitotoxischen Effekt zur Apoptose der infizierten Wirtszellen führen<sup>507</sup>. Für die in dieser Promotion untersuchten infizierten murinen DCs konnte trotz zellulärem Stress (Abb. 4-15) und dem Verlust funktionaler Mitochondrien keine entsprechende Zunahme eines apoptotischen Zelltods in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  festgestellt werden (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.3). Im Gegensatz zu Coxiellen-infizierten THP-1-Monozyten<sup>484,499,500</sup>, scheinen sich die infizierten murinen DCs über einen effizienten metabolischen OXPHOS/Glykolyse-Wechsel (Abb. 4-29) vor mitotoxischer NO-Wirkung und Apoptose zu schützen und so während der intrazellulären Coxiellen-Eliminierung ihr Überleben zu sichern. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien in Fibroblasten und Makrophagen<sup>260,261,267</sup> konnte auch für DCs ein deutlicher Einfluss des IFN- $\gamma$  auf die Ausbildung der CCVs und Coxiellen-Vermehrung (Abb. 4-10 und -25) beobachtet werden. Im Falle der infizierten DCs lässt sich der Interferon-Effekt zu fast 80% auf die Induktion und Wirkung des iNOS/NO-Systems zurückführen (Abb. 4-14, -25, -28). Dies deckt sich mit Beobachtungen, die im Kontext eines *in vivo*-Infektionsmodells mit Ph I-Coxiellen gemacht wurden<sup>261</sup>. Somit scheint iNOS/NO in phasenunabhängiger Weise für die immunologische Kontrolle und Bekämpfung von Coxiellen-Infektion bedeutsam zu sein. Tatsächlich besitzt das iNOS/NO-System eine zentrale Schlüsselfunktion nicht nur für die zelluläre Selbstverteidigung gegen Coxiellen, sondern auch für verschiedene andere Bakterienpathogene, wie zum Beispiel für *Mycobacterium tuberculosis*<sup>508,509</sup> oder *Franciella tularensis*<sup>510</sup>. Bei der Beurteilung der Wirksamkeit des IFN- $\gamma$ -induzierten iNOS/NO-Systems muss berücksichtigt werden, dass sich seine Gewichtung in humanen und murinen Organismen unterschiedlich darstellt. Verschiedene Forschungsarbeiten deuten darauf hin, dass die IFN- $\gamma$ -vermittelte GBP-Induktion im murinen und humanen System nahezu gleichbedeutend ist, das iNOS-System jedoch eine größere Bedeutung im murinen System einnimmt, während jedoch beim Menschen das Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)-System eine wichtige Rolle spielt<sup>279,511,512</sup>. Zudem lassen die Studien von Ganesan und Roy vermuten, dass die IFN- $\gamma$ -vermittelte Coxiellen-Abwehr im humanen System auf der IDO-vermittelten Restriktion zellulären Tryptophans beruht, durch die die Coxiellen, die auxotroph für Tryptophan sind<sup>513</sup>, in ihrer Replikation limitiert werden können<sup>514</sup>. Auch für Makrophagen unterschiedlicher Wiederkäuer wurde beschrieben, dass das iNOS/NO-System distinkte Bedeutung besitzt<sup>515</sup>. Während für bovine Makrophagen das iNOS/NO-System essenziell für die Abwehr intrazellulärer Bakterien zu sein scheint<sup>516</sup>, zeigen Ziegen-Makrophagen keine entsprechende iNOS-vermittelte NO-Produktion<sup>515</sup>. Dennoch lässt die Identifizierung von humanen TNF- $\alpha$ /iNOS-produzierenden Tip-DCs auf eine wichtige immunologische Bedeutung von iNOS/NO auch im Menschen schließen<sup>517</sup>. Diese myeloide CD11b/c<sup>+</sup> DC-Subpopulation, die große funktionale Ähnlichkeit mit den in der Promotionsarbeit verwendeten JAWS II-DCs<sup>151</sup> aufweist und sowohl in murinen, ruminaten wie auch humanen Systemen vorkommt<sup>518,519</sup>, spielt eine kritische Rolle bei der Pathogeneliminierung und hat einen wichtigen Einfluss auf die Polarisierung der nachgeschalteten T-Zell-Antwort. Tip-DCs erweisen sich als entscheidend für die immunologische Klärung von Bakterieninfektionen, da die Abwesenheit der Tip-DCs zu einer unkontrollierten Bakterienreplikation und letztlich zum Wirtstod (wie im Falle von *Listeria monocytogenes*) führen kann<sup>150</sup>. Weitere Analysen konnten unter anderem nachweisen,

dass Tip-DCs ebenfalls an der Eliminierung von Influenza A-Viren<sup>520</sup> und an der Abwehr von *Leishmania major*<sup>521</sup> beteiligt sind. Darüber hinaus wird postuliert, dass die funktionale Differenzierung von Monozyten zu Tip-DCs durch IFN- $\gamma$  gefördert wird<sup>522</sup>. Da Tip-DCs an der Bekämpfung sehr unterschiedlicher Infektionen beteiligt sind<sup>523</sup>, ist es durchaus naheliegend, dass auch im Falle einer *in vivo*-Coxiellen-Infektion IFN- $\gamma$ -aktivierte Tip-DCs funktional involviert sind. Da Tip-DCs zweifelsfrei eine Schlüsselrolle bei der Initiation und Orchestrierung der Immunabwehr spielen, ist es notwendig, nun weitere speziesvergleichende Infektionsstudien (*in vitro* und *in vivo*) durchzuführen, um die immunologische Bedeutung von Tip-DCs bei *C. burnetii*-Infektionen aufzuklären.

Es wurde gezeigt, dass die Ausschüttung bestimmter Zyto-/Chemokine durch NO bestimmt wird<sup>417</sup>. Verschiedene Arbeitsgruppen belegen, dass ein funktionaler iNOS/NO-Weg (Umsetzung von L-Arginin bis zum Radikal) bei Stimulation einen positiven Effekt auf die Sekretion von RANTES und MCP-1 hat<sup>524-526</sup>. Wird die Radikal-Synthese hingegen blockiert, akkumuliert das zur Verfügung stehende L-Arginin und inhibiert die NO-abhängige Induktion von RANTES<sup>524</sup>. In Übereinstimmung und Ergänzung zeigt diese Dissertation eine spezifische Induktion iNOS/NO-assoziiierter Zyto-/Chemokine (MCP-1, MIP-1 $\alpha$  und RANTES) IFN- $\gamma$ -behandelter DCs (Abb. 4-27). Zudem lassen die Ergebnisse vermuten, dass die verwendeten murinen DCs eine NO-bedingte biphasische Regulation der Zytokinexpression über NF- $\kappa$ B aufweisen, wie sie bereits durch verschiedene Gruppen beschrieben wurde<sup>418,419</sup>. Für diesen Mechanismus wird postuliert, dass das Radikal zu frühen Zeitpunkten und/oder in geringen Konzentrationen über eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung zur Induktion von Zyto-/Chemokinen führt, während höhere Konzentrationen zu späten Zeitpunkten eine Inhibition des Transkriptionsfaktors und damit eine Suppression der Botenstoffsynthese hervorrufen<sup>418,419</sup>. Für die in dieser Arbeit untersuchten murinen DCs kann angenommen werden, dass die gesteigerte MCP-1-, MIP-1 $\alpha$ - und RANTES-Sekretion IFN- $\gamma$ -stimulierter DCs durch eine iNOS/NO-bedingte Regulation von NF- $\kappa$ B erfolgt, da sie bei iNOS-Defizienz gänzlich ausbleibt (Abb. 4-27). Kobayashi et al. vermuten, dass dieser Prozess zelltypspezifisch variieren kann<sup>417</sup>. Es ist daher denkbar, dass es sich bei der NO-vermittelten Chemo-/Zytokininduktion um ein DC-charakteristisches Phänomen handelt, während entsprechende Botenstoffe in Monozyten/Makrophagen mittels NO herunterreguliert werden<sup>417,527,528</sup>. Bei den Analysen der Dissertation zeigte sich, dass IFN- $\gamma$ -stimulierte DCs eine spezifische Hochregulation von MCP-1, MIP-1 $\alpha$  und RANTES aufwiesen, während die MIP-1 $\alpha$ -Induktion bei gleichzeitiger Coxiellen-Infektion ausblieb (Abb. 4-27). Interessanterweise wurde auch in Patienten mit akutem Q-Fieber ein reduzierter MIP-1 $\alpha$ -Level gefunden<sup>529</sup>. Da MIP-1 $\alpha$  als wichtiges Chemoattraktant für die Rekrutierung weiterer Immunzellen (wie Monozyten, T-Zellen, Basophile und Eosinophile<sup>530-532</sup>) verantwortlich ist, kann für die beobachtete Coxiellen-abhängige MIP1 $\alpha$ -Suppression eine gezielte bakterielle Subversion vermutet werden. Auch andere intrazelluläre Pathogene (wie *Salmonella enterica*, *Chlamydia trachomatis* und *Leishmania major*) besitzen eine ähnliche Strategie, um der Eliminierung durch infizierte Wirte zu entgehen<sup>420,533</sup>. Im Verlauf der Leishmaniose wird zum Beispiel die Funktionalität von CXCL10 (IP10) durch die proteolytische Aktivität einer Parasitenprotease (Glykoprotein-63) unterbunden<sup>533</sup>. Da eine Vielzahl Coxiellen-kodierter Proteine funktional nicht abschließend charakterisiert ist<sup>534</sup>, ist



es durchaus denkbar, dass möglicherweise eine pathogene Protease bei der beobachteten MIP-1 $\alpha$ -Reduktion beteiligt sein könnte. Weiterhin wäre eine auf *microRNA* (miRNA)-basierende Suppression möglich. Die konservierten, nicht-codierenden RNAs modulieren die Genregulation auf post-transkriptioneller Ebene<sup>535</sup>. Ein entsprechender Regulationsmechanismus der Zyto-/Chemokin-Sekretion konnte bei infizierten Zellen für Mykobakterien<sup>536</sup> und Streptokokken<sup>537</sup> beobachtet werden. Hier vermittelten die intrazellulären Bakterien die Induktion zellulärer miRNA, welche zur Suppression der MIP-1 $\alpha$ -Ausschüttung führt und so die Rekrutierung von Makrophagen, Monozyten und T-Zellen beeinträchtigt<sup>536,537</sup>. Die Arbeiten von Millar et al. konnten zudem nachweisen, dass auch Coxiellen Einfluss auf die zelluläre miRNA-Regulation nehmen und dadurch Einfluss auf Wirtszellprozesse infizierter THP-1-Monozyten nehmen<sup>538</sup>. Somit kann spekuliert werden, dass die beobachtete MIP-1 $\alpha$ -Suppression infizierter DCs möglicherweise auch über einen miRNA-regulierten Prozess der Coxiellen kontrolliert werden könnte.

Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit zeigen, dass iNOS einen wichtigen und notwendigen Faktor der IFN- $\gamma$ -induzierten zellulären Selbstverteidigung infizierter DCs gegen Coxiellen darstellt (Abb. 4-14, -25). Interessanterweise wiesen die Untersuchungen des NOX2/ROS (Abb. 4-13)- und des GBP1 (Abb. 4-26)-Systems nicht auf eine zusätzliche Beteiligung an der anti-*C. burnetii* Abwehr hin, obschon das NOX/ROS-System infizierter Makrophagen einen essenziellen Beitrag bei der anti-Coxiellen Abwehr leistet<sup>261</sup>. Da die Generierung von Sauerstoffradikalen in DCs im Vergleich zu Makrophagen<sup>539</sup> oder Neutrophilen<sup>540</sup> deutlich reduziert stattfindet und mehrheitlich für die Kreuzpräsentation<sup>541,542</sup> genutzt wird, erscheint es durchaus plausibel, dass das NOX2/ROS-System bei der Coxiellen-Bekämpfung in DCs eine eher untergeordnete Rolle spielt (Abb. 4-13). Das IFN- $\gamma$ -induzierte GBP-System wurde in der vorliegenden Arbeit für GBP1 untersucht, das als zentraler Faktor zellautonomer Immunität bei verschiedenen zellulären Infektionen aktivierenden Einfluss auf auto-/xenophagische Abwehrprozesse hat<sup>276,277,279,297-299</sup>. Der autophagische Kompartiment-Tropismus intrazellulärer Coxiellen ermöglicht den Bakterien ihr vakuoläres Überleben sowie eine effiziente Replikation<sup>49,543</sup>. In Übereinstimmung hiermit zeigte sich, dass in infizierten iNOS-defizienten DCs der siRNA-vermittelte *knock down* von GBP1 eine detektierbar nachteilige Auswirkung auf die intrazelluläre Bakterienlast hat (Abb. 4-26). Hier muss erwähnt werden, dass das iNOS/NO- im Gegensatz zum GBP-System einen negativen Einfluss auf intrazelluläre Autophagie-Mechanismen nimmt<sup>421,544-546</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass diese Beeinträchtigung in IFN- $\gamma$ -behandelten DCs durch deutliche Reduktion intrazellulär vorhandener Autophagosomen charakterisiert ist (Abb. 4-28 und -32), welche vermutlich auf reduzierter Kompartimentbiogenese durch JNK1-Inhibition<sup>421,544</sup> und mTORC1-Induktion<sup>421</sup> beruht. Somit scheint der negative Einfluss des IFN- $\gamma$ -induzierten iNOS/NO-Systems auf die Autophagie Coxiellen-infizierter DCs den möglicherweise gleichzeitig auftretenden positiven autophagischen Effekt durch GBP1 zu dominieren und eine übergeordnete Rolle in den IFN- $\gamma$ -behandelten Wirtszellen einzunehmen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Untersuchungen, die vermuten lassen, dass das induzierbare GBP-System keinen restriktiven Einfluss auf die Coxiellen-Infektion in Wirtszellen nimmt<sup>514,547</sup>. Ergänzend zur Hauptabwehr infizierter DCs durch iNOS ( $\leq 80\%$ ) sind möglicherweise weitere Interferon-vermittelte Abwehrprozesse beteiligt.

Denkbar wäre ein IFN- $\gamma$ -Einfluss auf die Eisenversorgung des bakteriellen Pathogens, wie er bereits für *Salmonella typhimurium* gezeigt wurde<sup>548</sup>. Die Genomsequenz von *C. burnetii* weist auf den Eisentransporter FeoAB (CBU1766-1767) hin<sup>549</sup>, welcher in Legionellen den Transport von Fe<sup>2+</sup> vermittelt<sup>550</sup>. Gemeinsam mit der Beobachtung, dass Coxiellen die Expression des Transferrin-Rezeptors (CD71) von Makrophagen induzieren und damit eine Anreicherung von intrazellulärem Eisen erreichen<sup>551</sup>, kann vermutet werden, dass seine Verfügbarkeit einen positiven Einfluss auf die Bakterienvermehrung ausübt. In der Tat weisen kürzlich veröffentlichte Untersuchungen darauf hin, dass Coxiellen intrazelluläres Eisen für das Überleben und die Replikation benötigen<sup>549</sup>. Es kann also durchaus angenommen werden, dass eine IFN- $\gamma$ -bedingte Eisenreduktion<sup>548</sup> Einfluss auf die Vitalität der Coxiellen nimmt und die Wirkung des iNOS/NO-Systems in der anti-Coxiellen Abwehr funktional ergänzt. Da IFN- $\gamma$  die Expression von etwa 200 Genen moduliert<sup>274</sup>, sind vermutlich noch weitere zelluläre Faktoren an der Abwehr infizierter DCs beteiligt. So kann davon ausgegangen werden, dass das IFN- $\gamma$  seinen negativen Einfluss auf Coxiellen zusätzlich noch über die Modulation der Phago-/Lysosomenreifung geltend macht<sup>552,553</sup>, die für die intrazelluläre Etablierung und Vermehrung der Coxiellen wichtig sind. Dies macht deutlich, dass weiterer Forschungsbedarf besteht, um die IFN- $\gamma$ -vermittelte anti-Coxiellen Abwehr infizierter APCs in ihrer komplexen Aufstellung und Kooperation zu erfassen.

### 5.3 Bakterielle Gegenstrategien und hypoxischer Einfluss auf die zelluläre Selbstverteidigung *C. burnetii*-infizierter DCs

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnten auch Strategien einer pathogenen Gegenwehr durch Coxiellen aufgezeigt werden. So belegen die Untersuchungen, dass *C. burnetii* dem iNOS/NO-Angriff nach IFN- $\gamma$ -vermittelter Induktion mit einer verstärkten Expression antioxidativer Enzyme (Katalase, SODs) sowie Cytochrom *bd* entgegentreten (Abb. 4-30). Vormalige Untersuchungen postulierten, dass die entgiftende Katalase- und SOD-Aktivität das intrazelluläre Überleben der Bakterien sichern kann<sup>427</sup>. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass Bakterien (wie zum Beispiel *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus*) dem NO-Stress durch erhöhte Cytochrom *bd*-Expression begegnen<sup>554-557</sup>. Für Coxiellen konnte dies bisher noch nicht experimentell gezeigt werden<sup>100</sup>.

Cytochrom *bd*-Oxidasen sind endständige Quinol:O<sub>2</sub>-Oxidoreduktasen, die sich auf die Domäne der Prokaryonten beschränken und durch ihre hohe O<sub>2</sub>-Affinität (insbesondere auch unter Hypoxie) und ihre Resistenz gegen NO-Hemmung auszeichnen<sup>558</sup>. Untersuchungen zu Cytochrom *bd* und seiner Reaktivität gegenüber NO führten zur Beobachtung, dass das Enzym, welches im Gegensatz zu anderen Häm-Proteinen eine relativ schnelle/effiziente NO-Dissoziationsrate im aktiven Zentrum besitzt, einen wichtigen bakteriellen Abwehrmechanismus gegen wirtsgeneriertes NO darstellt<sup>558</sup>. Die Untersuchungen dieser Promotionsarbeit weisen nun erstmals darauf hin, dass auch *C. burnetii* dem wirtszellproduzierten NO mittels Cytochrom *bd*-Induktion entgegentritt (Abb. 4-30). Trotz der Coxiellen-Gegenwehr (mit veränderter Genexpression) zeigt sich eine deutliche Reduktion der bakteriellen Last IFN- $\gamma$ -behandelter DCs (Abb. 4-25, -30). Somit scheint die Verteidigung von *C. burnetii* den iNOS/NO-Angriff nur bedingt abwehren zu können. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass bei infizierten DCs die eingedrungenen Coxiellen in sehr vielen kleinen Vesikeln über das Zytosol verteilt vorliegen (Abb. 4-10) und sich nicht durch Vakuolenfusion zu einer großen CCV (mit vorteilhaftem Oberflächen/Volumen-Verhältnis) vor dem Radikalangriff durch eine Art kooperative Abschirmung schützen können.

Nach initialer Aufnahme durch kontaminierte Aerosole finden sich Coxiellen auch in distalen Organen (wie Leber und Niere)<sup>19,20</sup> mit teilweise sauerstoffreduziertem Gewebscharakter<sup>559</sup>, so dass sich die Frage nach der Bedeutung einer hypoxischen Umgebung für Coxiellen-Etablierung/-Wachstum und zelluläre Abwehr stellt. Das iNOS/NO-System erweist sich unter Normoxie als effektiver Abwehrmechanismus *C. burnetii*-infizierter DCs (Abb. 4-25). Es wird angenommen, dass eine iNOS-vermittelte NO-Produktion unter hypoxischen Bedingungen nicht stattfindet<sup>560-562</sup>, obschon durch Hypoxie eine gesteigerte Expression, Stabilisierung und Aktivität von iNOS durch HIF-1 $\alpha$  zu beobachten ist<sup>563-568</sup>. Die Annahme, dass iNOS unter Hypoxie kein NO synthetisiert, beruht maßgeblich auf einem fehlenden Stickoxid-Nachweis in sauerstoffreduzierter Umgebung<sup>560-562</sup>. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass als NO-Nachweismethode in entsprechenden Untersuchungen ein Griess-Assay verwendet wurde, obschon sein zugrundeliegendes Prinzip auf einem Nitrit/Nitrat (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-Nachweis beruht und damit strikt normoxische Synthese- und Detektionsbedingungen voraussetzt ( $2\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_2$ ;  $2\text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+$ )<sup>437,438</sup>.

Zudem ist anzumerken, dass der Griess-Assay eine sehr hohe NO-Nachweisgrenze von 1-2  $\mu\text{M}$  besitzt<sup>569</sup> und somit nur entsprechend große Mengen an  $\text{O}_2$ -oxidiertem NO als Nitrit und Nitrat nachweisen kann. Da es jedoch bei reduzierter Sauerstoffkonzentration nicht zur notwendigen  $\text{NO}_2$ -Stabilisierung des NO-Radikals kommt, kann weder genügend Nitrit noch Nitrat als notwendiges Griess-Assay-Substrat entstehen<sup>437,438</sup>. Untersuchungen in Makrophagen weisen darauf hin, dass ein reduzierter Sauerstoffgehalt substratlimitierenden, jedoch keinesfalls blockierenden Einfluss auf die iNOS-vermittelte NO-Synthese hat<sup>570</sup>. Daher müssen alternative Analysemethoden zum Nachweis der NO-Synthese hypoxischer Zellsysteme angewandt werden. Um festzustellen, ob der verbliebene  $\text{O}_2$ -Gehalt hypoxischer DCs ausreichend ist, um iNOS-vermitteltes NO zu synthetisieren und nachzuweisen, wurde in dieser Promotionsarbeit eine 5,6-Diaminofluoresceindiacetat (DAF-2 DA)-basierte NO-Nachweismethode eingesetzt, die eine direkte intrazelluläre Detektion in DCs ermöglicht<sup>571</sup> und mit ihrer sehr geringen NO-Nachweisgrenze von  $\leq 5 \text{ nM}$ <sup>572</sup> um 2-3 Log-Stufen sensitiver als der Griess-Assay ist. In der Tat konnte mit Hilfe dieser Analysemethode eine intrazelluläre NO-Synthese nachgewiesen werden, die sowohl IFN- $\gamma$ -ab- als auch unabhängig abläuft (Abb. 4-37). Das unter Hypoxie erhöhte NO-Grundniveau kann durch verschiedene Phänomene erklärt werden. So wird postuliert, dass die NO-Basissynthese in Zellen bei Sauerstoffmangel, bedingt durch die Freisetzung aus Depotformen (wie S-Nitrosothiole), eine vermehrte Nitrit-Reduktion ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ ) oder eine reduzierte Aktivität der Cytochrom c-Oxidase, erhöht ist<sup>567</sup>. Die in der Promotionsarbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass der reduzierte Sauerstoffgehalt hypoxischer DCs die Interferon-vermittelte NO-Synthese nicht außer Kraft setzt, sondern lediglich limitiert. Es findet sich wie unter normoxischen Bedingungen eine IFN- $\gamma$ -abhängige Erhöhung des zellulären NO-Gehalts, jedoch wird das normoxische Niveau der iNOS-vermittelten NO-Synthese nicht erreicht, obschon eine erhöhte iNOS-Expression unter hypoxischen IFN- $\gamma$ -Bedingungen vorliegt (Abb. 4-37, -38). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen<sup>563-568</sup> kann also auch in sauerstoffreduzierten Zellen/Geweben/Organen von einer induzierten NO-Synthese ausgegangen werden. Die Untersuchungen dieser Dissertationsarbeit zeigen eine wesentlich verringerte zelluläre Bakterienlast unter hyp- als unter normoxischen Bedingungen. Interessanterweise ergaben sich jedoch keine Hinweise für eine Reduktion der Pathogenvitalität/-infektiosität in hypoxischer IFN- $\gamma$ -Umgebung (Abb. 4-39, -40). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit weisen andere Studien auf eine reduzierte bakterielle Replikation unter sauerstoffreduzierten Bedingungen hin<sup>237</sup>, so dass angenommen werden kann, dass sich Coxiellen in sauerstoffreduzierten Wirtszellen nicht vermehren, sondern eher teilungsinaktiv verharren. Bereits früh wurde beschrieben, dass Coxiellen unter ungünstigen Vermehrungsbedingungen eine widerstandsfähige sporenähnliche (SLP)-Variante innerhalb der Wirtszelle bilden können<sup>37</sup>, die ein Überleben des Pathogens unter widrigen Konditionen ermöglicht<sup>573</sup>. Um zu überprüfen, ob dies auch für Coxiellen in hypoxischen DCs gilt, wurden entsprechende elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt. Tatsächlich konnten hier elektronendichte SLP-ähnliche Bakterienstrukturen nachgewiesen werden (Abb. 4-40), was vermuten lässt, dass die beobachtete Widerstandsfähigkeit der Coxiellen gegenüber Hypoxie und verbliebener Abwehr auf die SLP-Bildung zurückgeführt werden kann. Interessanterweise finden

sich hypoxische nicht-replizierende intrazelluläre Erregerstadien auch bei anderen intrazellulären Bakterien (wie zum Beispiel *Mycobacterium tuberculosis* oder *Pseudomonas aeruginosa*)<sup>431,574</sup>. Bis heute ist die wichtige Frage nach der Infektiosität von Coxiellen-SLPs ungeklärt<sup>36,60</sup>. Die Experimente der Dissertation belegen erstmalig, dass hypoxische SLPs, gemessen an ihrer zellulären Bakterienlast, ein ausgeprägtes Infektionspotential besitzen (Abb. 4-39). Es kann also postuliert werden, dass ausgelöst durch sauerstoffreduzierte Umgebung, Coxiellen hypoxische SLPs bilden (Abb. 4-40) und dieses widerstandsfähige und infektiöse Stadium zur effektiven Unterwanderung des Immunsystems nutzen. Tatsächlich konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Cytochrom *bd* der Coxiellen nicht nur der ETC-Abwehr des NO-Radikals dient (Abb. 4-30), sondern auch unter Hypoxie stark induziert wird (Abb. 4-41). Somit lässt sich annehmen, dass Cytochrom *bd* für das hypoxische Überleben der Erreger genutzt wird. Dies deckt sich mit der Annahme, dass das Cytochrom *bd* mit seiner hohen O<sub>2</sub>-Affinität<sup>558</sup> von Coxiellen unter Hypoxie induziert wird, um die Funktionalität der bakteriellen ETC zu sichern<sup>100</sup>. Dies bietet einen interessanten Ansatz für persistente Coxiellen-Infektionen<sup>14,32</sup>, die möglicherweise durch das Auftreten hypoxischer Coxiellen-SLPs charakterisiert sind und eine immunologische Infektionsklärung deutlich erschweren. Zukünftige Studien müssen nun klären, ob und in welchem Umfang sich hypoxische SLPs auch *in vivo* nachweisen lassen und sich zu SCVs/LCVs reaktivieren, wenn sich die Sauerstoffversorgung betroffener Wirtszellen ändert.

In ihrer Gesamtheit zeigen die hier durchgeführten Studien zu *C. burnetii*-infizierten DCs, dass die möglicherweise früh auftretenden Ph II-Coxiellen eine vielschichtige Immunsabversion initiieren (Fig. 5-1), die über  $\alpha V\beta 8$ -Integrin-aktiviertes TGF- $\beta$  zur Blockierung der DC-Reifung und Antigenpräsentation infizierter Zellen führt. Die Anwesenheit von IFN- $\gamma$  hebt diese Inhibition auf und induziert parallel eine iNOS/NO-vermittelte Eliminierung der Coxiellen (Fig. 5-1), die wiederum ihrerseits durch eine entsprechende Gegenwehr reagieren (Fig. 5-1). Im weiteren Infektionsverlauf können die immunologischen Abwehrprozesse durch auftretende Hypoxie eingeschränkt und die Eliminierung intrazellulärer Coxiellen dadurch erschwert sein (Fig. 5-1). Weitere Studien werden notwendig sein, um diesen interessanten Aspekt im komplexen Wechselspiel zwischen *C. burnetii* und dem Immunsystem im Detail aufzuklären und neue Ansätze immunbasierter Therapiemöglichkeiten zu finden.

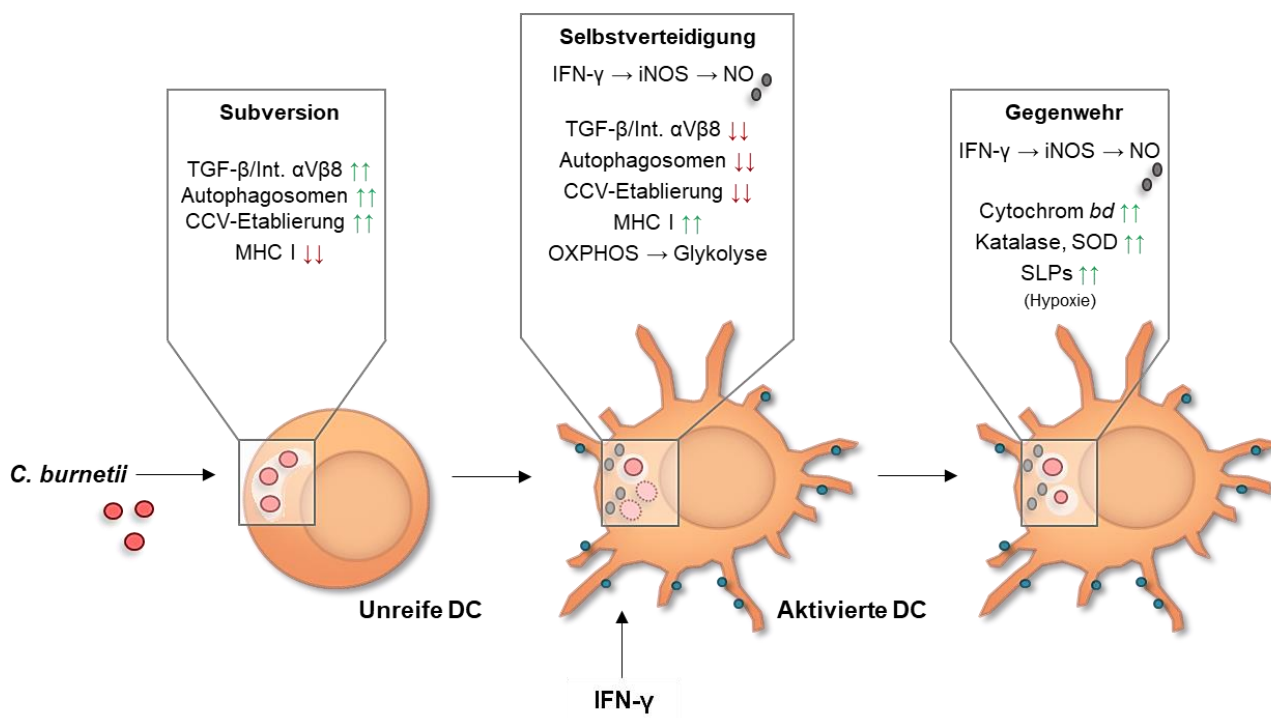


Abbildung 5-1: Postuliertes Arbeitsmodell zur anti-*C. burnetii* Abwehr infizierter DCs

## 5.4 Funktion von NK-Zellen in der anti-*C. burnetii* Abwehr

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe zeigte sich, dass NK-Zellen durch eine Chlamydien-Infektion funktionell aktiviert werden<sup>202</sup>. Während dieses zellulären Selbstverteidigungsprozesses werden intrazelluläre Bakterien in lytische Granula überführt und dann von infizierten NK-Zellen mittels Degranulierung in einer inaktivierten, nicht mehr infektiösen Form freigesetzt<sup>202</sup>. Die Eliminierung der Chlamydien ist dabei durch die saure/proteolytische Umgebung der lytischen Granula bedingt, die auf die Chlamydien bakterizid wirkt<sup>202</sup>.

Die Untersuchungen dieser Doktorarbeit konnten im Verlauf einer *C. burnetii*-Infektion von NK-Zellen eine entsprechende Pathogenaufnahme in lytische Granula und nachfolgende NK-Zellaktivierung zeigen. Im Gegensatz zu Chlamydien behalten jedoch die durch Degranulierung freigesetzten Coxiellen ihre Infektiosität (Abb. 4-51, -52, -55 und -56). Hierfür scheint auch der unterschiedliche Kompartimenttropismus der verschiedenen intrazellulären Bakterien verantwortlich zu sein. Im Gegensatz zu Chlamydien vermehrt sich *C. burnetii* in sauren Vakuolen mit (auto)phagolysosomalen Eigenschaften<sup>36</sup>. Lysosomale Membranmarker, aber auch Enzyme und Proteine des endosomalen Weges finden sich in und auf CCVs<sup>36</sup>. Darüber hinaus fusionieren Coxiellen-haltige Vakuolen auch mit Kompartimenten des phago-/endosomalen Systems<sup>575-577</sup>. Saure Lysosomen enthalten eine Vielzahl von Hydrolasen und bilden dadurch eine äußerst effiziente Abwehr gegen phagozytierte Bakterien. Coxiellen sind allerdings durch ihren biphasischen Lebenszyklus an diese Umgebung angepasst und replizieren unter diesen Bedingungen ohne Einschränkung<sup>60</sup>. Die durchgeführten Experimente dieser Arbeit zeigen, dass *C. burnetii* nach 18-stündiger Inkubation bei pH 4-5 weiterhin lebensfähig und infektiös bleibt, während Chlamydien, wenn überhaupt, nur eine sehr geringe pH-Stabilität aufweisen (Abb. 4-49). Tatsächlich ist das saure Milieu essenziell für die Replikation von *C. burnetii*, da eine Erhöhung des lysosomalen pH-Wertes mit lysosomotropen Amininen oder Protonenpumpen(V-ATPase)-Inhibitoren das Wachstum des Bakteriums reduziert<sup>578,579</sup>. Somit stellen die verschiedenen Kompartimente, die von Coxiellen und Chlamydien besetzt werden, hinsichtlich ihrer Eigenschaften "diametrale Pole" innerhalb des Spektrums intrazellulärer Vakuolen-Systeme dar. Während der zellulären Infektion gelangt *C. burnetii* über Clathrin-vermittelte Endozytose in NK-Zellen (Abb. 4-42), was an die Coxiellen-Aufnahme von Epithelzellen und/oder mononukleäre Phagozyten erinnert<sup>93,580</sup>. Es ist daher zu vermuten, dass die Überführung der Bakterien in lytische Granula über den konventionellen endo-/lysosomalen Transport von *C. burnetii* in saure Kompartimente erfolgt. Lytische Granula stellen saure sekretorische Lysosomen dar, die ihre degradierenden Eigenschaften mit der Fähigkeit zur regulierten Exozytose verknüpfen<sup>196</sup>. Nach dem Eindringen in NK-Zellen interagiert *C. burnetii* mit der endo-/lysosomalen Transportmaschinerie des Wirts, so dass die primären Bakterienvakuolen mit sekretorischen anstelle von konventionellen Lysosomen fusionieren. Jedoch besitzen die intrazellulären LCVs von *C. burnetii* eine ausgeprägte Widerstandsfähigkeit gegenüber niedrigem pH und der proteolytischen Degradationsmaschinerie lysosomaler Kompartimente infizierter Zellen (Abb. 4-49)<sup>37,49</sup>. Es scheint jedoch, dass *C. burnetii* die Lysosomenfunktion nicht in aktiver Weise hemmt. Stattdessen widersetzen sich die Bakterien in ihrer intrazellulären Überlebensstrategie dem

lysosomalen Abbau durch die Wirtszelle<sup>73</sup>. Die sauren Kompartimente, in denen Coxiellen replizieren, sind proteolytisch aktiv und enthalten diverse lysosomale Proteasen, die auch in lytischen Granula von NK-Zellen vorhanden sind<sup>73,581,582</sup>. Wie genau *C. burnetii* dem niedrigen pH-Wert und dem proteolytischen Milieu innerhalb lysosomaler Kompartimente widersteht, ist noch weitgehend ungeklärt. Die Widerstandsfähigkeit von *C. burnetii* erfordert jedoch keinen aktiven Erregerstoffwechsel, da beobachtet wurde, dass Chloramphenicol-behandelte Coxiellen in ihren sauren Vakuolen über längere Zeit lebensfähig bleiben<sup>61</sup>. Darüber hinaus zeigte sich, dass Coxiellen-LPS nicht maßgeblich zur intrazellulären Resistenz der Bakterien beiträgt<sup>73</sup>. Es wird hingegen angenommen, dass die Bakterien der lysosomalen Umgebung durch ihre proteaseresistenten Peptidoglykane entgegenwirken<sup>583</sup>. Aktuelle Studien zeigen, dass *C. burnetii* in der Lage ist, die endo-/lysosomale Reifung zu modulieren, um die Anzahl der proteolytisch aktiven Lysosomen zu reduzieren, die für die Fusion mit CCVs zur Verfügung stehen. Vermutlich dient dies als Mechanismus zur Regulierung des pH-Wertes bakterieller Kompartimente<sup>584</sup>. Eine entsprechende Strategie könnte von Coxiellen auch dazu verwendet werden, den pH-Wert und das proteolytische Milieu lytischer Granula so zu verändern, dass trotz Einschränkung des bakteriellen Wachstums in infizierten NK-Zellen ihr Überleben und ihre Infektiosität (Abb. 4-49 und -51) während der Freisetzung (Abb. 4-44, -47, -48), gewährleistet bleiben. Für Chlamydien ist eine entsprechende Subversionsstrategie bisher nicht bekannt, da sie schon früh vom endozytotischen Signalweg abweichen und ihre Vakuolen so modifizieren, dass sie exozytotischen Vesikeln ähneln<sup>585</sup>.

Im Gegensatz zu B- und T-Zellen, die eine *C. burnetii*-Infektionen effizient bekämpfen<sup>80,257-259</sup>, ist über die funktionelle Rolle der NK-Zellen bei der Immunantwort gegenüber Coxiellen sehr wenig bekannt. Obschon Defizienz und/oder Reduktion von NK-Zellen zu einer verstärkten Histopathologie während einer *C. burnetii*-Infektion führen, scheint es, dass NK-Zellen nur einen geringen Einfluss auf die Eliminierung des Pathogens nehmen<sup>257</sup>. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich annehmen, dass Coxiellen-infizierte NK-Zellen durch erhöhte IFN- $\gamma$ -Freisetzung in einem gewissen Maß sowohl zur antibakteriellen Immunantwort als auch Infektionskontrolle beitragen (Abb. 4-45). Sie verhindern jedoch nicht die Zell-Zell-Ausbreitung der Infektion durch eine intrazelluläre Abtötung des Erregers, da von NK-Zellen freigesetzte *C. burnetii* weitgehend infektiös bleiben (Abb. 4-51, -52, -55 und -56).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass NK-Zellen während der *C. burnetii*-Infektion aktiviert werden (Abb. 4-45 und -46), möglicherweise als Folge einer PRR-abhängigen Bakterienerkennung<sup>209</sup>. In Übereinstimmung hiermit zeigen weitere Experimente, dass Coxiellen-infizierte NK-Zellen eine Phospho-Aktivierung von PKC  $\Theta$  aufweisen (Abb. 4-46). Diese Kinase fungiert als Signalvermittler entsprechender Oberflächenrezeptoren des PKC-Signalwegs<sup>586</sup> und ist maßgeblich an Aktivierungs-/Degranulierungsprozessen beteiligt<sup>587, 588</sup>. Dementsprechend blockiert der PKC  $\Theta$ -Inhibitor Sotrastaurin<sup>345</sup> die Coxiellen-Freisetzung durch Degranulierung (Abb. 4-46 B). Die PRRs NOD2 und TLR2, die maßgeblich die Immunantwort gegen *C. burnetii* initiieren<sup>246,589</sup>, sind auch an der pathogenvermittelten Aktivierung von NK-Zellen beteiligt<sup>590</sup>, was vermuten lässt, dass sie die entsprechenden Signalwege in *C. burnetii*-infizierten NK-Zellen



auslösen. Während dieses Aktivierungsprozesses fusionieren bakterielle Strukturen mit lytischen Granula, die dann mittels Degranulierung 24 hpi freigesetzt werden (Abb. 4-44). Der Freisetzungsprozess ist wesentlich kürzer als der reguläre intrazelluläre Entwicklungszyklus von *C. burnetii* (6-7 Tage). Es ist daher unwahrscheinlich, dass sich die Bakterien von infektiösen SCVs in replikative LCVs differenziert haben. Zusammen mit intakten Coxiellen werden auch aberrante bakterielle Strukturen freigesetzt (Abb. 4-47 und -48). Dies unterstützt die Annahme, dass die bakteriellen Erreger vor der Freisetzung durch NK-Zellen ihren normalen intrazellulären Entwicklungszyklus nicht abgeschlossen haben. Jedoch hat die Mehrheit intrazellulärer Coxiellen den transienten Aufenthalt in den lytischen Granula infizierter NK-Zellen überlebt und nach entsprechender Degranulierung ihre Infektiosität behalten (Abb. 4-51, -52, -55 und -56).

Bei der untersuchten Sensitivität gegenüber Granzym B besteht ein deutlicher Unterschied zwischen Coxiellen und Chlamydien (Abb. 4-50), was auf einen Unterschied in der proteolytischen Angreifbarkeit beider Pathogene hindeutet. In der Tat ist bekannt, dass chlamydiale Oberflächenproteine eine Protease-Empfindlichkeit aufweisen<sup>591</sup>. Darüber hinaus vermeiden die Chlamydien jeglichen Kontakt zur proteolytischen Lysosomenmaschinerie, die dazu dient, eingedrungene Erreger zu eliminieren. Für *C. psittaci* und *C. trachomatis* konnte nachgewiesen werden, dass die Protease-Sensitivität ihrer Oberflächenproteine negative Auswirkungen auf die Wirtszellanheftung hat<sup>592-594</sup>. Im Gegensatz hierzu scheint *C. burnetii* jeglichem proteolytischen Angriff durch Wirtszellproteasen zu widerstehen<sup>61,73</sup>. Ferner wurde gezeigt, dass Granzym B-defiziente Mäuse keine veränderte Anfälligkeit für eine *C. burnetii*-Infektion aufweisen, was darauf hindeutet, dass die Granula-Protease nicht zur Kontrolle von Coxiellen-Infektionen beiträgt<sup>372</sup>. Eine mögliche Abwehrstrategie von *C. burnetii* könnte die Anwesenheit Protease-resistenter Oberflächenpolypeptide sein<sup>583</sup>, die sich in direkter Weise dem proteolytischen Angriff durch Granzym B entziehen und so die intrazellulären Bakterien abschirmen.

Bei nicht-infizierten NK-Zellen liegen Perforin-haltige Granula häufig in radialer perinukleär-zentrierter Anordnung vor (Abb. 4-47 und -54). Im Gegensatz dazu werden diese charakteristischen intrazellulären Strukturen bei Coxiellen-infizierten NK-Zellen während der Degranulierung neu angeordnet und die Perforin-haltigen Granula kolokalisieren mit den Bakterien unterhalb der Zelloberfläche (Abb. 4-47 und -54). Dies ähnelt dem beschriebenen Granula-Export in Rezeptor-aktivierten NK-Zellen<sup>196</sup>. Lytische Granula werden zunächst entlang der Mikrotubuli rekrutiert, die dann in Richtung des Mikrotubuli-Organisationszentrums (*microtubule organizing center*, MTOC) der perinukleären Region wandern. Bei Erkennung einer Zielzelle werden NK-Zellen aktiviert und das Zytoskelett reorganisiert. Letztlich positionieren sich die Granula unterhalb der Zelloberfläche, verschmelzen mit der Plasmamembran und geben ihren lytischen Inhalt (Perforin und Granzyme) in die Umgebung zwischen NK- und Zielzellen ab. Es lässt sich vermuten, dass sich die Degranulierung infizierter und Rezeptor-aktivierter NK-Zellen nur darin unterscheidet, dass der Freisetzungsprozess in infizierten NK-Zellen vermutlich ohne Ausrichtung auf ein extrazelluläres Ziel stattfindet. Eine bemerkenswerte Beobachtung ist, dass Perforin an freigesetzte extrazelluläre Bakterien gebunden ist (Abb. 4-48 und -54). Dies könnte für die Pathogene eine wichtige funktionelle Bedeutung haben, da Perforin die Clathrin-abhängige Endozytose aktiviert<sup>595</sup>, die für die Aufnahme

von Coxiellen durch die jeweiligen Zielzellen erforderlich ist<sup>580</sup>. Es ist daher denkbar, dass dies die Ausbreitung von Bakterien von infizierten NK-Zellen auf benachbarte Zielzellen unterstützt und so eine kritische Rolle in der frühen *C. burnetii*-Ausbreitung spielt. In diesem Kontext ist interessant, dass *C. burnetii* auch Neutrophile infizieren kann<sup>596</sup>. Ähnlich einer NK-Zell-Infektion sind die Bakterien in Neutrophilen lebensfähig, obwohl sie sich nicht vermehren. Nehmen Makrophagen Coxiellen-infizierte Neutrophile über Phagozytose auf, infiziert und vermehrt sich das Pathogen in den Makrophagen, was darauf hindeutet, dass Neutrophile nicht in der Lage sind, die Bakterien abzutöten, und Coxiellen die Infektion von Neutrophilen als eine Art "Ausweichstrategie" zur Infektion von Makrophagen nutzen<sup>596</sup>. Tatsächlich könnte dies eine Überlebensstrategie von *C. burnetii* darstellen, um von einer feindlichen intrazellulären Situation in Neutrophilen in eine förderliche Umgebung in Makrophagen zu gelangen<sup>596</sup>.

In Zusammenfassung der Ergebnisse zu infizierten NK-Zellen kann hier festgehalten werden, dass sich Coxiellen im Gegensatz zu Chlamydien der zellulären Selbstverteidigung und Eliminierung durch NK-Zellen entziehen (Abb. 5-2). Obschon dies einerseits eine Art Achillesferse der angeborenen Immunantwort gegen *C. burnetii* darstellt, zeigt sich andererseits auch eine funktionale Aktivierung infizierter NK-Zellen, die über IFN- $\gamma$ -Freisetzung vermutlich direkten Einfluss auf die zelluläre Selbstverteidigung infizierter DCs und nachgeschalteter adaptiver Abwehrprozesse nimmt (Abb. 5-2). Auf Grundlage der hier gemachten Beobachtungen werden sich zukünftige Studien darauf konzentrieren können, die Konsequenzen dieser frühen Kooperation zwischen infizierten NK-Zellen und DCs bei natürlichen Coxiellen-Infektionen im Detail zu untersuchen.

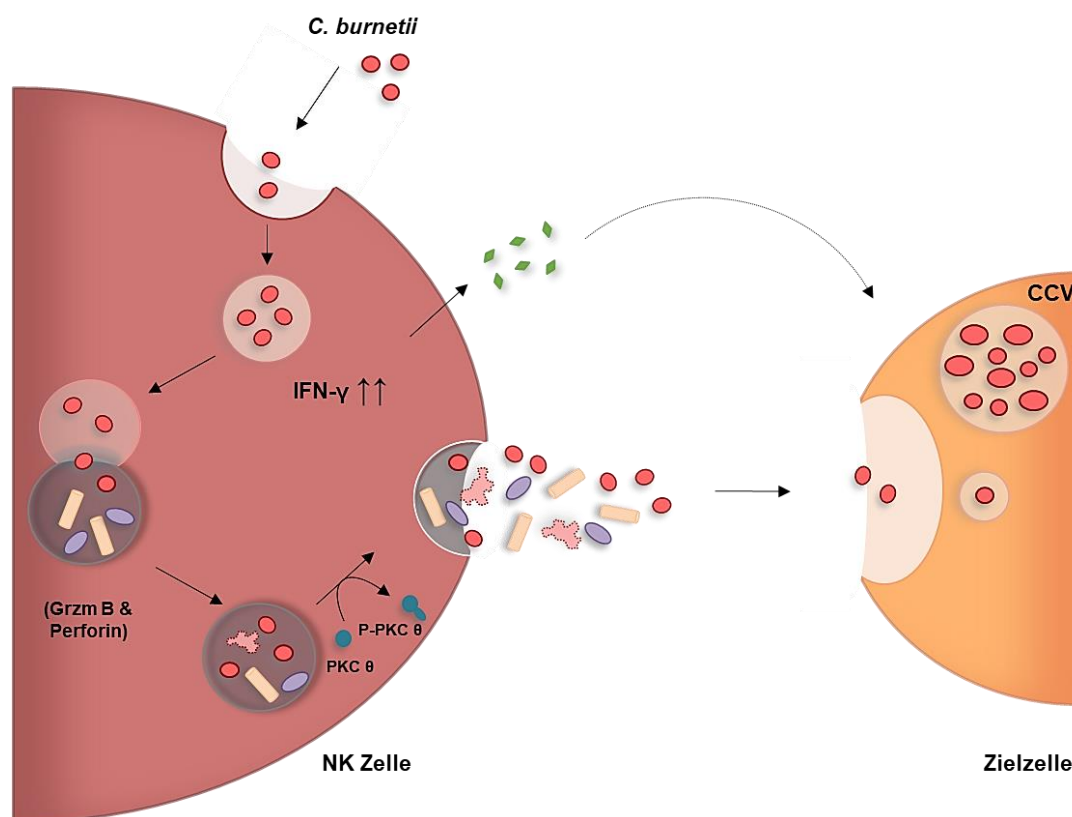


Abbildung 5-2: Postuliertes Arbeitsmodell zur funktionellen Aufgabe der NK-Zellen bei der anti-*C. burnetii* Abwehr

## 5.5 Übersichtsmodell zur funktionalen Kooperation von DCs und NK-Zellen in der frühen Abwehr von *C. burnetii*

Auf Basis der erzielten Ergebnisse dieser Promotionsarbeit wird in Zusammenfassung und zum Abschluss der Diskussion für die wechselseitige Kooperation zwischen infizierten DCs und NK-Zellen während der frühen Immunabwehr gegen *C. burnetii* das in Abbildung 5-3 dargestellte Übersichtsmodell postuliert.

Während die Coxiellen in infizierten DCs zunächst über autokrine TGF- $\beta$ -Ausschüttung eine Subversion der DC-Reifung bewirken, bei der sowohl die iNOS/NO-vermittelte Abwehr als auch die MHC I-Antigenpräsentation beeinträchtigt sind, folgt der Coxiellen-Infektion von NK-Zellen eine funktionale Reifung und Aktivierung (Abb. 5-3). Obschon die Aufnahme der Bakterien in NK-Zell-Granula und deren anschließende Freisetzung nicht zur Eliminierung des Pathogens führen, nimmt die IFN- $\gamma$ -Ausschüttung aktivierter NK-Zellen Einfluss auf die zelluläre Selbstverteidigung infizierter DCs und unterstützt die *first-line-of-defense* (Abb. 5-3). Durch IFN- $\gamma$ -Einfluss wird die Oberflächenexpression des  $\alpha\text{V}\beta 8$ -Integrins reduziert, was die autokrine TGF- $\beta$ -Aktivierung mindert und durch weitere IFN- $\gamma$ -Induktion die Aktivierung, MHC I-Präsentation und zelluläre *C. burnetii*-Abwehr über iNOS/NO bewirkt. Parallel hierzu wird ein metabolischer Wechsel von OXPHOS zur Glykolyse eingeleitet (Abb. 5-3). Dies garantiert einen zellulären Selbstschutz infizierter DCs vor der mitotoxischen NO-Wirkung, während das Radikal parallel eine effektive Coxiellen-Eliminierung bewirkt. Die Prozesse im frühen Infektionsverlauf beruhen auf einer engen funktionalen Kooperation/Abhängigkeit zwischen NK-Zellen und DCs, da aktivierte NK-Zellen selbst keine effiziente Coxiellen-Eliminierung erreichen und DCs ausschließlich unter IFN- $\gamma$  eine MHC-Antigenpräsentation sowie effektive Eindämmung infektiöser Coxiellen bewirken.

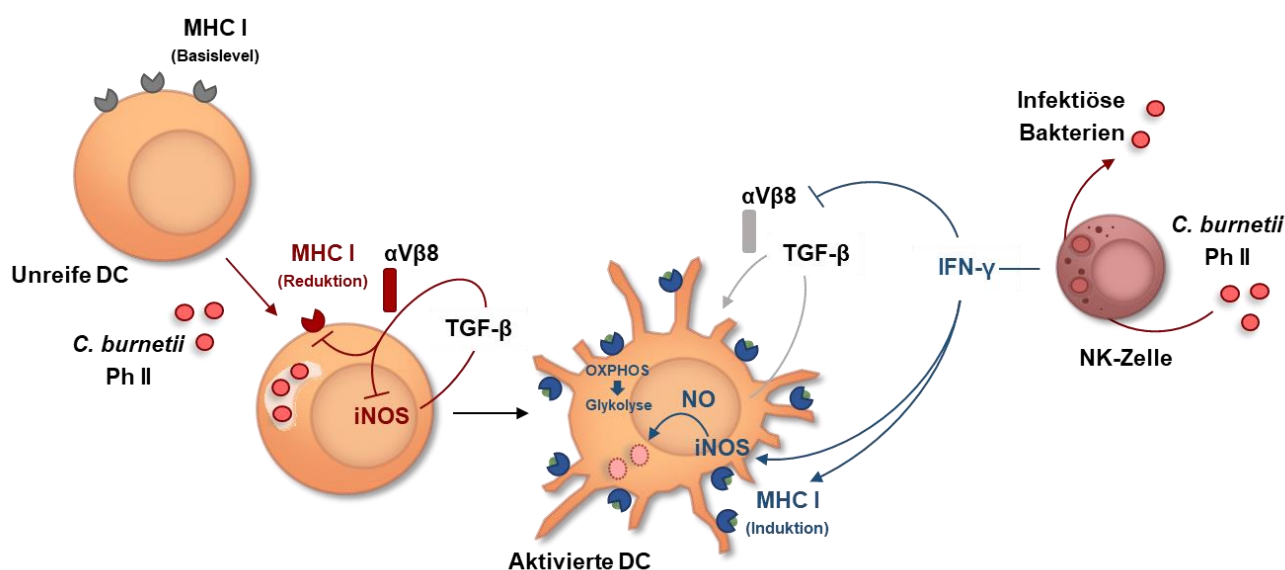


Abbildung 5-3: Postuliertes Arbeitsmodell zur funktionalen Wechselwirkung zwischen DCs und NK-Zellen bei der anti-*C. burnetii* Abwehr

## 5.6 Ausblick für weiterführende Untersuchungen

Es gibt zwei verschiedene LPS-Varianten auf der Oberfläche von *C. burnetii*. Der Erreger durchläuft einen biphasischen Phasenwechsel, der durch virulentes Ph I- und avirulentes Ph II-LPS charakterisiert ist. Die Mechanismen, die für den gefundenen Unterschied in der Virulenz zwischen Ph I und Ph II verantwortlich sind, konnten bisher nicht eindeutig geklärt werden. Im Allgemeinen ist eine frühe/akute *C. burnetii*-Infektion durch einen Anstieg von Ph II-Antikörpern gekennzeichnet<sup>250-253</sup>. Dagegen ist eine späte/persistierende Infektion mit erhöhten Ph I-Antikörpern verbunden<sup>250,252,253</sup>. Weitere intensive Studien sind hier notwendig, um den Virulenzunterschied zwischen Ph I- und Ph II-LPS im Detail aufzuklären. Ph II-Antigene sind möglicherweise strukturell für entsprechende Antikörper zugänglicher als Ph I-Antigene und daher während der humoralen Antwort wesentlich immunogener. Dies unterstützen vormalige Studien, die zeigen, dass die komplexe Struktur von Ph I-LPS im Gegensatz zu Ph II-LPS Zugang, Erkennung und Bindung von Antikörpern sterisch beeinflusst<sup>469</sup>. Möglicherweise besitzt der beobachtete LPS-Phasenwechsel eine wichtige *in vivo*-Relevanz, da gezeigt wurde, dass LPS-Variationen von *C. burnetii* nicht nur auf Basis chromosomaler Deletionen zu finden sind<sup>455,597</sup>. Es wird daher angenommen, dass die Phasenvariation des Coxiella-LPS die Immunerkennung von Coxiellen in der Art beeinflusst, dass Ph II-LPS als ein Ablenkungsmanöver die protektive immunologische Reaktion gegen Ph I-Coxiellen zeitlich verzögert<sup>79</sup>. Im Kontext gewonnener Erkenntnisse zur TGF- $\beta$ / $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrin-vermittelten Subversion Coxiellen-infizierter DCs ist es nun sehr wichtig, zu klären, welche Bedeutung Ph I- und Ph II-Varianten für den Infektionsverlauf infizierter Tiere und Menschen besitzen und welchen Einfluss ein möglicherweise sukzessiver Phasenwechsel<sup>79,597,598</sup> unter *in vivo*-Infektionsbedingungen auf die Abwehrreaktionen angeborener und adaptiver Immunität besitzt.

Die Beobachtung, dass Ph II-Coxiellen die Funktion infizierter DCs beeinträchtigen, wirft eine Reihe wichtiger Fragen auf, die in zukünftigen experimentellen Studien untersucht werden sollten. Zunächst bleibt zu klären, ob TGF- $\beta$  möglicherweise auch an der LPS-vermittelten Subversion von Ph I-Coxiellen beteiligt ist. Da Studien belegen, dass TGF- $\beta$  (mit)verantwortlich für ein reduziertes LPS-Reaktionsverhalten sein kann<sup>599,600</sup>, wäre es interessant zu sehen, ob virulente Ph I-Coxiellen ebenfalls eine gesteigerte TGF- $\beta$ -Sekretion in infizierten DCs induzieren, die in Kooperation mit ihrem *full-length* LPS DC-Reifung und -Funktionen unterdrücken. Auch die Fortführung der Untersuchungen zum iNOS/NO-System in DCs im Kontext von Ph I-Coxiellen wäre angebracht, da die bisherige Datenlage limitiert und auf Makrophagen als zelluläres Modellsystem beschränkt ist. Gleichmaßen könnte die Charakterisierung verschiedener zellulärer Infektionssysteme dazu beitragen, die Bedeutung von iNOS/NO bei der zellulären Selbstverteidigung gegen Bakterieninfektionen besser zu verstehen. Denkbar wären in diesem Kontext unter anderem vergleichende Analysen humaner, muriner und ruminater Tip-DCs, aber auch eine Ausweitung auf die Immunzellen der *first-line-of-defense* (wie zum Beispiel Makrophagen und NK-Zellen) aus Schaf, Ziege und Rind. Dies könnte aufzeigen, ob und welche Unterschiede/Ähnlichkeiten in den zellulären Infektionsverläufen sowie der Bedeutung des IFN- $\gamma$  bestehen.

Das durch IFN- $\gamma$ -induzierte iNOS/NO-System hat unter Normoxie große funktionale Bedeutung für die Pathogenbekämpfung infizierter DCs, während es unter Hypoxie nahezu wirkungslos erscheint. Unter Hypoxie weisen Coxiellen eine Widerstandsfähigkeit gegenüber IFN- $\gamma$  auf, so dass von Interesse ist, diese neuen interessanten Befunde weiter zu vertiefen. Eine entsprechende Aufreinigung der Coxiellen aus hypoxischen Wirtszellen bietet die Möglichkeit, SLPs im Vergleich zu SCVs und LSCs sowohl auf Protein- als auch Transkriptebene im Detail zu analysieren. Zudem wäre es durchaus aufschlussreich, hypoxische Studien mit entsprechenden primären Zielzellen aus Hauptreservoirwirten (wie zum Beispiel Schafs-Trophoblasten) durchzuführen. So könnte unter anderem adressiert werden, ob und wie sich die intrazelluläre Coxiellen-Infektion/-Etablierung von etablierten Laborstämmen und auch unterschiedlichen Wildisolaten unter norm- und hypoxischen Bedingungen bei diesen Zellen verändert.

Coxiellen-infizierte NK-Zellen scheinen über ihre IFN- $\gamma$ -Ausschüttung eine wichtige Rolle für die Induktion des iNOS/NO-Systems infizierter DCs zu spielen. Auch für NK-Zellen wäre es von großer Wichtigkeit zu sehen, welchen modifizierten Verlauf eine Coxiellen-Infektion unter sauerstoffreduzierten Bedingungen nimmt und ob die typische IFN- $\gamma$ -Sekretion infizierter NK-Zellen hier ebenfalls zu beobachten ist. Ebenso ist noch unklar, ob und wie sich eine Infektion mit Ph I-Coxiellen auf NK-Zellen auswirkt. So könnten sich zukünftige Studien damit beschäftigen herauszufinden, ob auch diese NK-Zell-Infektion zu einer Aktivierung mit IFN- $\gamma$ -Ausschüttung und Degranulierung infektiöser Erreger führt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente weisen auf eine immunologische Kooperation zwischen NK-Zellen und DCs bei der anti-Coxiellen Abwehr hin. Basierend auf vorhergehenden Studien zur Generierung infektionsbedingter DEX und deren aktivierende Wirkung auf NK-Zellen<sup>172</sup>, würden sich durch Kokultivierungsansätze tiefere Einblicke in die wechselseitige Interaktion/Stimulierung der beiden innaten Immunzelltypen in Anwesenheit von Coxiellen ergeben.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich interessante Unterschiede zwischen Coxiellen- und Chlamydien-infizierten NK-Zellen. Es wird somit von großem Interesse sein zu untersuchen, ob es Differenzen in der Zusammensetzung/Aktivität der Granula Coxiellen- und Chlamydien-infizierter NK-Zellen gibt. Zudem bleibt zu klären, wie genau die Coxiellen-Resistenz gegenüber den NK-Zell-Granula gewährleistet wird und über welchen Aufnahmemechanismus benachbarte Zielzellen von ausgeschütteten Coxiellen infiziert werden.

## Literaturverzeichnis

- 1 Derrick, E. H. Q fever: A new fever entity. Clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Med. J. Aust* 2, 281-299 (1937).
- 2 Derrick, E. H. The query fever. The Elkington oration. *Queensland Health* 1, 1-20 (1964).
- 3 Burnet, F. M. & Freeman, M. Experimental studies on the virus of "Q" fever. *Med. J. Aust* 2, 299-305 (1937).
- 4 Davis, G. & Cox, H. R. A filter-passing infectious agent isolated from ticks: isolation from *Dermacentor andersoni*, reaction in animals, and filtration experiments. *Public Health Rep* 53, 2259-2267 (1938).
- 5 Cox, H. R. Cultivation of Rickettsiae of the Rocky Mountain Spotted Fever, Typhus and Q Fever Groups in the Embryonic Tissues of Developing Chicks. *Science* 94, 399-403, doi:10.1126/science.94.2444.399 (1941).
- 6 Weisburg, W. G. et al. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J Bacteriol* 171, 4202-4206, doi:10.1128/jb.171.8.4202-4206.1989 (1989).
- 7 Stein, A., Saunders, N. A., Taylor, A. G. & Raoult, D. Phylogenetic homogeneity of *Coxiella burnetii* strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing. *FEMS Microbiol Lett* 113, 339-344, doi:10.1111/j.1574-6968.1993.tb06537.x (1993).
- 8 Seshadri, R. et al. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5455-5460, doi:10.1073/pnas.0931379100 (2003).
- 9 Tan, C. K. & Owens, L. Infectivity, transmission and 16S rRNA sequencing of a rickettsia, *Coxiella cheraxi* sp. nov., from the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Dis Aquat Organ* 41, 115-122, doi:10.3354/dao041115 (2000).
- 10 Gottlieb, Y., Lalar, I. & Klasson, L. Distinctive Genome Reduction Rates Revealed by Genomic Analyses of Two *Coxiella*-Like Endosymbionts in Ticks. *Genome Biol Evol* 7, 1779-1796, doi:10.1093/gbe/evv108 (2015).
- 11 Angelakis, E. et al. Candidatus *Coxiella massiliensis* Infection. *Emerg Infect Dis* 22, 285-288, doi:10.3201/eid2202.150106 (2016).
- 12 Shivaprasad, H. L. et al. *Coxiella*-like infection in psittacines and a toucan. *Avian Dis* 52, 426-432, doi:10.1637/8192-120707-Reg (2008).
- 13 Chmielewski, T. & Tylewska-Wierzbanska, S. Q fever at the turn of the century. *Pol J Microbiol* 61, 81-93 (2012).
- 14 Maurin, M. & Raoult, D. Q fever. *Clin Microbiol Rev* 12, 518-553 (1999).
- 15 Reusken, C., van der Plaats, R., Opsteegh, M., de Bruin, A. & Swart, A. *Coxiella burnetii* (Q fever) in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus* at livestock farms and urban locations in the Netherlands; could *Rattus* spp. represent reservoirs for (re)introduction? *Prev Vet Med* 101, 124-130, doi:10.1016/j.prevetmed.2011.05.003 (2011).
- 16 Kloppert, B. et al. [*Coxiella burnetii* as zoonotic pathogen with special regard to food hygiene]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 111, 321-323 (2004).
- 17 Korner, S. et al. Uptake and fecal excretion of *Coxiella burnetii* by *Ixodes ricinus* and *Dermacentor marginatus* ticks. *Parasit Vectors* 13, 75, doi:10.1186/s13071-020-3956-z (2020).
- 18 Angelakis, E. & Raoult, D. Q Fever. *Vet Microbiol* 140, 297-309, doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.016 (2010).
- 19 Fournier, P. E., Marrie, T. J. & Raoult, D. Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol* 36, 1823-1834, doi:10.1128/JCM.36.7.1823-1834.1998 (1998).
- 20 Ben Amara, A. et al. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, replicates within trophoblasts and induces a unique transcriptional response. *PLoS One* 5, e15315, doi:10.1371/journal.pone.0015315 (2010).
- 21 Benenson, A. S. & Tigertt, W. D. Studies on Q fever in man. *Trans Assoc Am Physicians* 69, 98-104 (1956).

- 22 Hawker, J. I. et al. A large outbreak of Q fever in the West Midlands: windborne spread into a metropolitan area? *Commun Dis Public Health* 1, 180-187 (1998).
- 23 Gilsdorf, A. et al. Large Q fever outbreak due to sheep farming near residential areas, Germany, 2005. *Epidemiol Infect* 136, 1084-1087, doi:10.1017/S0950268807009533 (2008).
- 24 Tissot-Dupont, H., Torres, S., Nezri, M. & Raoult, D. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. *Am J Epidemiol* 150, 67-74, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009920 (1999).
- 25 Ormsbee, R., Peacock, M., Gerloff, R., Tallent, G. & Wike, D. Limits of rickettsial infectivity. *Infect Immun* 19, 239-245, doi:10.1128/IAI.19.1.239-245.1978 (1978).
- 26 Kampschreur, L. M. et al. Identification of risk factors for chronic Q fever, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 18, 563-570, doi:10.3201/eid1804.111478 (2012).
- 27 Tissot-Dupont, H. & Raoult, D. Q fever. *Infect Dis Clin North Am* 22, 505-514, ix, doi:10.1016/j.idc.2008.03.002 (2008).
- 28 Carcopino, X., Raoult, D., Bretelle, F., Boubli, L. & Stein, A. Q Fever during pregnancy: a cause of poor fetal and maternal outcome. *Ann N Y Acad Sci* 1166, 79-89, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04519.x (2009).
- 29 Madariaga, M. G., Rezai, K., Trenholme, G. M. & Weinstein, R. A. Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis* 3, 709-721, doi:10.1016/s1473-3099(03)00804-1 (2003).
- 30 Robert-Koch-Institut. *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018*. 198-200 (2019).
- 31 Yeaman, M. R., Mitscher, L. A. & Baca, O. G. In vitro susceptibility of *Coxiella burnetii* to antibiotics, including several quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 31, 1079-1084, doi:10.1128/aac.31.7.1079 (1987).
- 32 Raoult, D. et al. Treatment of Q fever endocarditis: comparison of 2 regimens containing doxycycline and ofloxacin or hydroxychloroquine. *Arch Intern Med* 159, 167-173, doi:10.1001/archinte.159.2.167 (1999).
- 33 Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A. & Beaudreau, F. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine* 26, 4320-4328, doi:10.1016/j.vaccine.2008.06.023 (2008).
- 34 Schulze, L. S., Borchardt, S., Ouellet, V. & Heuwieser, W. Effect of a phase I *Coxiella burnetii* inactivated vaccine on body temperature and milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci* 99, 541-550, doi:10.3168/jds.2015-9628 (2016).
- 35 Marmion, B. P. et al. Vaccine prophylaxis of abattoir-associated Q fever: eight years' experience in Australian abattoirs. *Epidemiol Infect* 104, 275-287, doi:10.1017/s0950268800059458 (1990).
- 36 Heinzen, R. A., Hackstadt, T. & Samuel, J. E. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol* 7, 149-154, doi:10.1016/s0966-842x(99)01475-4 (1999).
- 37 McCaul, T. F. & Williams, J. C. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J Bacteriol* 147, 1063-1076, doi:10.1128/JB.147.3.1063-1076.1981 (1981).
- 38 Wiebe, M. E., Burton, P. R. & Shankel, D. M. Isolation and characterization of two cell types of *Coxiella burnetii* phase I. *J Bacteriol* 110, 368-377, doi:10.1128/JB.110.1.368-377.1972 (1972).
- 39 Russell-Lodrigue, K. E., Zhang, G. Q., McMurray, D. N. & Samuel, J. E. Clinical and pathologic changes in a guinea pig aerosol challenge model of acute Q fever. *Infect Immun* 74, 6085-6091, doi:10.1128/IAI.00763-06 (2006).
- 40 Sobotta, K. et al. *Coxiella burnetii* Infects Primary Bovine Macrophages and Limits Their Host Cell Response. *Infect Immun* 84, 1722-1734, doi:10.1128/IAI.01208-15 (2016).
- 41 Shannon, J. G., Howe, D. & Heinzen, R. A. Virulent *Coxiella burnetii* does not activate human dendritic cells: role of lipopolysaccharide as a shielding molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8722-8727, doi:10.1073/pnas.0501863102 (2005).
- 42 Roest, H. J. et al. Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. *PLoS One* 7, e48949, doi:10.1371/journal.pone.0048949 (2012).
- 43 van Moll, P., Baumgartner, W., Eskens, U. & Hanichen, T. Immunocytochemical demonstration of *Coxiella burnetii* antigen in the fetal placenta of naturally infected sheep and cattle. *J Comp Pathol* 109, 295-301, doi:10.1016/s0021-9975(08)80254-x (1993).

- 44 Capo, C. et al. Subversion of monocyte functions by *Coxiella burnetii*: impairment of the cross-talk between  $\alpha$ 3 integrin and CR3. *J Immunol* 163, 6078-6085 (1999).
- 45 Martinez, E., Cantet, F., Fava, L., Norville, I. & Bonazzi, M. Identification of OmpA, a *Coxiella burnetii* protein involved in host cell invasion, by multi-phenotypic high-content screening. *PLoS Pathog* 10, e1004013, doi:10.1371/journal.ppat.1004013 (2014).
- 46 Meconi, S. et al. *Coxiella burnetii* induces reorganization of the actin cytoskeleton in human monocytes. *Infect Immun* 66, 5527-5533, doi:10.1128/IAI.66.11.5527-5533.1998 (1998).
- 47 Aguilera, M. et al. Actin dynamics and Rho GTPases regulate the size and formation of parasitophorous vacuoles containing *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 77, 4609-4620, doi:10.1128/IAI.00301-09 (2009).
- 48 Romano, P. S., Gutierrez, M. G., Beron, W., Rabinovitch, M. & Colombo, M. I. The autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently replicate in the host cell. *Cell Microbiol* 9, 891-909, doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00838.x (2007).
- 49 Voth, D. E. & Heinzen, R. A. Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cell Microbiol* 9, 829-840, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00901.x (2007).
- 50 Schulze-Luehrmann, J. et al. LAMP proteins account for the maturation delay during the establishment of the *Coxiella burnetii*-containing vacuole. *Cell Microbiol* 18, 181-194, doi:10.1111/cmi.12494 (2016).
- 51 Schafer, W. et al. Nuclear trafficking of the anti-apoptotic *Coxiella burnetii* effector protein AnkG requires binding to p32 and Importin- $\alpha$ 1. *Cell Microbiol* 19, doi:10.1111/cmi.12634 (2017).
- 52 Colombo, M. I., Gutierrez, M. G. & Romano, P. S. The two faces of autophagy: *Coxiella* and *Mycobacterium*. *Autophagy* 2, 162-164 (2006).
- 53 Vallejo Esquerro, E., Yang, H., Sanchez, S. E. & Omsland, A. Physicochemical and Nutritional Requirements for Axenic Replication Suggest Physiological Basis for *Coxiella burnetii* Niche Restriction. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 190, doi:10.3389/fcimb.2017.00190 (2017).
- 54 Maurin, M., Benoliel, A. M., Bongrand, P. & Raoult, D. Phagolysosomes of *Coxiella burnetii*-infected cell lines maintain an acidic pH during persistent infection. *Infect Immun* 60, 5013-5016, doi:10.1128/IAI.60.12.5013-5016.1992 (1992).
- 55 Mansilla Pareja, M. E., Bongiovanni, A., Lafont, F. & Colombo, M. I. Alterations of the *Coxiella burnetii* Replicative Vacuole Membrane Integrity and Interplay with the Autophagy Pathway. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 112, doi:10.3389/fcimb.2017.00112 (2017).
- 56 Campoy, E. M., Mansilla, M. E. & Colombo, M. I. Endocytic SNAREs are involved in optimal *Coxiella burnetii* vacuole development. *Cell Microbiol* 15, 922-941, doi:10.1111/cmi.12087 (2013).
- 57 McDonough, J. A. et al. Host pathways important for *Coxiella burnetii* infection revealed by genome-wide RNA interference screening. *mBio* 4, e00606-00612, doi:10.1128/mBio.00606-12 (2013).
- 58 Campoy, E. M., Zoppino, F. C. & Colombo, M. I. The early secretory pathway contributes to the growth of the *Coxiella*-replicative niche. *Infect Immun* 79, 402-413, doi:10.1128/IAI.00688-10 (2011).
- 59 Howe, D., Melnicakova, J., Barak, I. & Heinzen, R. A. Fusogenicity of the *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole. *Ann N Y Acad Sci* 990, 556-562, doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07426.x (2003).
- 60 Coleman, S. A., Fischer, E. R., Howe, D., Mead, D. J. & Heinzen, R. A. Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. *J Bacteriol* 186, 7344-7352, doi:10.1128/JB.186.21.7344-7352.2004 (2004).
- 61 Howe, D., Melnicakova, J., Barak, I. & Heinzen, R. A. Maturation of the *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole requires bacterial protein synthesis but not replication. *Cell Microbiol* 5, 469-480, doi:10.1046/j.1462-5822.2003.00293.x (2003).
- 62 Omsland, A. et al. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4430-4434, doi:10.1073/pnas.0812074106 (2009).
- 63 Omsland, A. Axenic growth of *Coxiella burnetii*. *Adv Exp Med Biol* 984, 215-229, doi:10.1007/978-94-007-4315-1\_11 (2012).



- 64 Amano, K., Williams, J. C., Missler, S. R. & Reinhold, V. N. Structure and biological relationships of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 262, 4740-4747 (1987).
- 65 Hoover, T. A., Culp, D. W., Vodkin, M. H., Williams, J. C. & Thompson, H. A. Chromosomal DNA deletions explain phenotypic characteristics of two antigenic variants, phase II and RSA 514 (crazy), of the *Coxiella burnetii* nine mile strain. *Infect Immun* 70, 6726-6733, doi:10.1128/iai.70.12.6726-2733.2002 (2002).
- 66 Stoker, M. G. & Fiset, P. Phase variation of the Nine Mile and other strains of *Rickettsia burneti*. *Can J Microbiol* 2, 310-321, doi:10.1139/m56-036 (1956).
- 67 Toman, R., Skultety, L. & Ihnatko, R. *Coxiella burnetii* glycomics and proteomics--tools for linking structure to function. *Ann N Y Acad Sci* 1166, 67-78, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04512.x (2009).
- 68 Hackstadt, T., Peacock, M. G., Hitchcock, P. J. & Cole, R. L. Lipopolysaccharide variation in *Coxiella burnetii*: intrastrain heterogeneity in structure and antigenicity. *Infect Immun* 48, 359-365, doi:10.1128/IAI.48.2.359-365.1985 (1985).
- 69 Moos, A. & Hackstadt, T. Comparative virulence of intra- and interstrain lipopolysaccharide variants of *Coxiella burnetii* in the guinea pig model. *Infect Immun* 55, 1144-1150, doi:10.1128/IAI.55.5.1144-1150.1987 (1987).
- 70 Capo, C. et al. *Coxiella burnetii* avoids macrophage phagocytosis by interfering with spatial distribution of complement receptor 3. *J Immunol* 170, 4217-4225, doi:10.4049/jimmunol.170.8.4217 (2003).
- 71 Abnave, P., Muracciole, X. & Ghigo, E. *Coxiella burnetii* Lipopolysaccharide: What Do We Know? *Int J Mol Sci* 18, doi:10.3390/ijms18122509 (2017).
- 72 Vishwanath, S. & Hackstadt, T. Lipopolysaccharide phase variation determines the complement-mediated serum susceptibility of *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 56, 40-44, doi:10.1128/IAI.56.1.40-44.1988 (1988).
- 73 Howe, D., Shannon, J. G., Winfree, S., Dorward, D. W. & Heinzen, R. A. *Coxiella burnetii* phase I and II variants replicate with similar kinetics in degradative phagolysosome-like compartments of human macrophages. *Infect Immun* 78, 3465-3474, doi:10.1128/IAI.00406-10 (2010).
- 74 Shannon, J. G., Howe, D. & Heinzen, R. A. Lack of dendritic cell maturation following infection by *Coxiella burnetii* synthesizing different lipopolysaccharide chemotypes. *Ann N Y Acad Sci* 1063, 154-160, doi:10.1196/annals.1355.024 (2005).
- 75 Topping, N. H., Shepard, C. C. & Irons, J. V. Q fever in the United States; epidemiologic studies of an outbreak among stock handlers and slaughterhouse workers. *J Am Med Assoc* 133, 813-815, doi:10.1001/jama.1947.02880120001001 (1947).
- 76 del Fresno, C. et al. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol* 182, 6494-6507, doi:10.4049/jimmunol.0803350 (2009).
- 77 Seeley, J. J. & Ghosh, S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukoc Biol* 101, 107-119, doi:10.1189/jlb.3MR0316-118RR (2017).
- 78 Winkler, M. S. et al. Human leucocyte antigen (HLA-DR) gene expression is reduced in sepsis and correlates with impaired TNFalpha response: A diagnostic tool for immunosuppression? *PLoS One* 12, e0182427, doi:10.1371/journal.pone.0182427 (2017).
- 79 Kuley, R. et al. Major differential gene regulation in *Coxiella burnetii* between in vivo and in vitro cultivation models. *BMC Genomics* 16, 953, doi:10.1186/s12864-015-2143-7 (2015).
- 80 Islam, A., Lockhart, M., Stenos, J. & Graves, S. The attenuated nine mile phase II clone 4/RSA439 strain of *Coxiella burnetii* is highly virulent for severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Am J Trop Med Hyg* 89, 800-803, doi:10.4269/ajtmh.12-0653 (2013).
- 81 Larson, C. L. et al. Right on Q: genetics begin to unravel *Coxiella burnetii* host cell interactions. *Future Microbiol* 11, 919-939, doi:10.2217/fmb-2016-0044 (2016).
- 82 Weber, M. M. et al. Identification of *Coxiella burnetii* type IV secretion substrates required for intracellular replication and *Coxiella*-containing vacuole formation. *J Bacteriol* 195, 3914-3924, doi:10.1128/JB.00071-13 (2013).

- 83 Juhas, M., Crook, D. W. & Hood, D. W. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol* 10, 2377-2386, doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01187.x (2008).
- 84 Sexton, J. A. & Vogel, J. P. Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic* 3, 178-185, doi:10.1034/j.1600-0854.2002.030303.x (2002).
- 85 Zamboni, D. S., McGrath, S., Rabinovitch, M. & Roy, C. R. Coxiella burnetii express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the Legionella pneumophila Dot/Icm system. *Mol Microbiol* 49, 965-976, doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03626.x (2003).
- 86 Segal, G., Feldman, M. & Zusman, T. The Icm/Dot type-IV secretion systems of Legionella pneumophila and Coxiella burnetii. *FEMS Microbiol Rev* 29, 65-81, doi:10.1016/j.femsre.2004.07.001 (2005).
- 87 Zusman, T. et al. The response regulator PmrA is a major regulator of the icm/dot type IV secretion system in Legionella pneumophila and Coxiella burnetii. *Mol Microbiol* 63, 1508-1523, doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05604.x (2007).
- 88 Nagai, H. & Kubori, T. Type IVB Secretion Systems of Legionella and Other Gram-Negative Bacteria. *Front Microbiol* 2, 136, doi:10.3389/fmicb.2011.00136 (2011).
- 89 Carey, K. L., Newton, H. J., Luhrmann, A. & Roy, C. R. The Coxiella burnetii Dot/Icm system delivers a unique repertoire of type IV effectors into host cells and is required for intracellular replication. *PLoS Pathog* 7, e1002056, doi:10.1371/journal.ppat.1002056 (2011).
- 90 Newton, H. J. & Roy, C. R. The Coxiella burnetii Dot/Icm system creates a comfortable home through lysosomal renovation. *mBio* 2, doi:10.1128/mBio.00226-11 (2011).
- 91 Beare, P. A. et al. Dot/Icm type IVB secretion system requirements for Coxiella burnetii growth in human macrophages. *mBio* 2, e00175-00111, doi:10.1128/mBio.00175-11 (2011).
- 92 Beare, P. A. Genetic manipulation of Coxiella burnetii. *Adv Exp Med Biol* 984, 249-271, doi:10.1007/978-94-007-4315-1\_13 (2012).
- 93 Larson, C. L., Beare, P. A., Howe, D. & Heinzen, R. A. Coxiella burnetii effector protein subverts clathrin-mediated vesicular trafficking for pathogen vacuole biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E4770-4779, doi:10.1073/pnas.1309195110 (2013).
- 94 Latomanski, E. A., Newton, P., Khoo, C. A. & Newton, H. J. The Effector Cig57 Hijacks FCHO-Mediated Vesicular Trafficking to Facilitate Intracellular Replication of Coxiella burnetii. *PLoS Pathog* 12, e1006101, doi:10.1371/journal.ppat.1006101 (2016).
- 95 Moffatt, J. H., Newton, P. & Newton, H. J. Coxiella burnetii: turning hostility into a home. *Cell Microbiol* 17, 621-631, doi:10.1111/cmi.12432 (2015).
- 96 Newton, H. J. et al. A screen of Coxiella burnetii mutants reveals important roles for Dot/Icm effectors and host autophagy in vacuole biogenesis. *PLoS Pathog* 10, e1004286, doi:10.1371/journal.ppat.1004286 (2014).
- 97 Lopez de Armentia, M. M., Amaya, C. & Colombo, M. I. Rab GTPases and the Autophagy Pathway: Bacterial Targets for a Suitable Biogenesis and Trafficking of Their Own Vacuoles. *Cells* 5, doi:10.3390/cells5010011 (2016).
- 98 Heinzen, R. A., Frazier, M. E. & Mallavia, L. P. Coxiella burnetii superoxide dismutase gene: cloning, sequencing, and expression in Escherichia coli. *Infect Immun* 60, 3814-3823, doi:10.1128/IAI.60.9.3814-3823.1992 (1992).
- 99 Baca, O. G. et al. Acid phosphatase activity in Coxiella burnetii: a possible virulence factor. *Infect Immun* 61, 4232-4239, doi:10.1128/IAI.61.10.4232-4239.1993 (1993).
- 100 Omsland, A. & Heinzen, R. A. Life on the outside: the rescue of Coxiella burnetii from its host cell. *Annu Rev Microbiol* 65, 111-128, doi:10.1146/annurev-micro-090110-102927 (2011).
- 101 Mason, M. G. et al. Cytochrome bd confers nitric oxide resistance to Escherichia coli. *Nat Chem Biol* 5, 94-96, doi:10.1038/nchembio.135 (2009).
- 102 Belenky, P. et al. Bactericidal Antibiotics Induce Toxic Metabolic Perturbations that Lead to Cellular Damage. *Cell Rep* 13, 968-980, doi:10.1016/j.celrep.2015.09.059 (2015).
- 103 Dwyer, D. J., Collins, J. J. & Walker, G. C. Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55, 313-332, doi:10.1146/annurev-pharmtox-010814-124712 (2015).

- 104 Rada, B. et al. Role of Nox2 in elimination of microorganisms. *Semin Immunopathol* 30, 237-253, doi:10.1007/s00281-008-0126-3 (2008).
- 105 Mertens, K., Lantsheer, L. & Samuel, J. E. A minimal set of DNA repair genes is sufficient for survival of *Coxiella burnetii* under oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 1063, 73-75, doi:10.1196/annals.1355.009 (2005).
- 106 Mertens, K., Lantsheer, L., Ennis, D. G. & Samuel, J. E. Constitutive SOS expression and damage-inducible AddAB-mediated recombinational repair systems for *Coxiella burnetii* as potential adaptations for survival within macrophages. *Mol Microbiol* 69, 1411-1426, doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06373.x (2008).
- 107 Parkin, J. & Cohen, B. An overview of the immune system. *Lancet* 357, 1777-1789, doi:10.1016/S0140-6736(00)04904-7 (2001).
- 108 Ahmed, R. & Gray, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272, 54-60, doi:10.1126/science.272.5258.54 (1996).
- 109 Janeway, C. A., Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 3, 1167-1171, doi:10.1016/s1286-4579(01)01477-0 (2001).
- 110 Turvey, S. E. & Broide, D. H. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125, S24-32, doi:10.1016/j.jaci.2009.07.016 (2010).
- 111 Tomlinson, S. Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol* 5, 83-89, doi:10.1016/0952-7915(93)90085-7 (1993).
- 112 Bell, J. K. et al. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* 24, 528-533, doi:10.1016/s1471-4906(03)00242-4 (2003).
- 113 Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81, 1-5, doi:10.1189/jlb.0306164 (2007).
- 114 Bogdan, C., Rollinghoff, M. & Diefenbach, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12, 64-76, doi:10.1016/s0952-7915(99)00052-7 (2000).
- 115 Luster, A. D., Alon, R. & von Andrian, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6, 1182-1190, doi:10.1038/ni1275 (2005).
- 116 Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17, 189-220, doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.189 (1999).
- 117 Netea, M. G., Latz, E., Mills, K. H. & O'Neill, L. A. Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense. *Nat Immunol* 16, 675-679, doi:10.1038/ni.3178 (2015).
- 118 Netea, M. G. et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* 352, aaf1098, doi:10.1126/science.aaf1098 (2016).
- 119 Netea, M. G. et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol* 20, 375-388, doi:10.1038/s41577-020-0285-6 (2020).
- 120 Cooper, M. D. & Alder, M. N. The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 124, 815-822, doi:10.1016/j.cell.2006.02.001 (2006).
- 121 Loder, F. et al. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med* 190, 75-89, doi:10.1084/jem.190.1.75 (1999).
- 122 Arpin, C. et al. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 268, 720-722, doi:10.1126/science.7537388 (1995).
- 123 Bonilla, F. A. & Oettgen, H. C. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125, S33-40, doi:10.1016/j.jaci.2009.09.017 (2010).
- 124 Rajewsky, K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758, doi:10.1038/381751a0 (1996).
- 125 Davis, M. M. & Bjorkman, P. J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402, doi:10.1038/334395a0 (1988).
- 126 Chambers, C. A. & Allison, J. P. Co-stimulation in T cell responses. *Curr Opin Immunol* 9, 396-404, doi:10.1016/s0952-7915(97)80087-8 (1997).
- 127 Noelle, R. & Snow, E. C. T helper cells. *Curr Opin Immunol* 4, 333-337, doi:10.1016/0952-7915(92)90085-s (1992).

- 128 Szabo, S. J. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669, doi:10.1016/s0092-8674(00)80702-3 (2000).
- 129 Paul, W. E. & Seder, R. A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241-251, doi:10.1016/0092-8674(94)90332-8 (1994).
- 130 Shresta, S., Pham, C. T., Thomas, D. A., Graubert, T. A. & Ley, T. J. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 10, 581-587, doi:10.1016/s0952-7915(98)80227-6 (1998).
- 131 Barry, M. & Bleackley, R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2, 401-409, doi:10.1038/nri819 (2002).
- 132 Stout, R. D. & Bottomly, K. Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages. *J Immunol* 142, 760-765 (1989).
- 133 Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3, 984-993, doi:10.1038/nri1246 (2003).
- 134 Banchereau, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811, doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767 (2000).
- 135 Figdor, C. G., van Kooyk, Y. & Adema, G. J. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2, 77-84, doi:10.1038/nri723 (2002).
- 136 Kaisho, T. Pathogen sensors and chemokine receptors in dendritic cell subsets. *Vaccine* 30, 7652-7657, doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.043 (2012).
- 137 Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-296, doi:10.1146/annurev.iy.09.040191.001415 (1991).
- 138 Saeki, H., Moore, A. M., Brown, M. J. & Hwang, S. T. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 162, 2472-2475 (1999).
- 139 Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106, 263-266, doi:10.1016/s0092-8674(01)00455-x (2001).
- 140 Goldberg, A. L. & Rock, K. L. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 357, 375-379, doi:10.1038/357375a0 (1992).
- 141 Gruenberg, J. & van der Goot, F. G. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 495-504, doi:10.1038/nrm1959 (2006).
- 142 Watts, C. Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol* 13, 26-31, doi:10.1016/s0952-7915(00)00177-1 (2001).
- 143 Bryant, P. & Ploegh, H. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr Opin Immunol* 16, 96-102, doi:10.1016/j.coi.2003.11.011 (2004).
- 144 Berard, F. et al. Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* 192, 1535-1544, doi:10.1084/jem.192.11.1535 (2000).
- 145 Satpathy, A. T., Wu, X., Albring, J. C. & Murphy, K. M. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13, 1145-1154, doi:10.1038/ni.2467 (2012).
- 146 Mellman, I. & Steinman, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-258, doi:10.1016/s0092-8674(01)00449-4 (2001).
- 147 Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5, 1219-1226, doi:10.1038/ni1141 (2004).
- 148 Igyarto, B. Z. & Kaplan, D. H. Antigen presentation by Langerhans cells. *Curr Opin Immunol* 25, 115-119, doi:10.1016/j.coi.2012.11.007 (2013).
- 149 Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118, doi:10.1084/jem.179.4.1109 (1994).
- 150 Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A. & Pamer, E. G. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19, 59-70, doi:10.1016/s1074-7613(03)00171-7 (2003).

- 151 Jiang, X., Shen, C., Rey-Ladino, J., Yu, H. & Brunham, R. C. Characterization of murine dendritic cell line JAWS II and primary bone marrow-derived dendritic cells in *Chlamydia muridarum* antigen presentation and induction of protective immunity. *Infect Immun* 76, 2392-2401, doi:10.1128/IAI.01584-07 (2008).
- 152 Jorgensen, T. N., Haase, C. & Michelsen, B. K. Treatment of an immortalized APC cell line with both cytokines and LPS ensures effective T-cell activation in vitro. *Scand J Immunol* 56, 492-503, doi:10.1046/j.1365-3083.2002.01166.x (2002).
- 153 Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2, 907-916, doi:10.1038/ni1001-907 (2001).
- 154 Michel, T. & Feron, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 100, 2146-2152, doi:10.1172/JCI119750 (1997).
- 155 Diefenbach, A., Schindler, H., Rollinghoff, M., Yokoyama, W. M. & Bogdan, C. Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity. *Science* 284, 951-955, doi:10.1126/science.284.5416.951 (1999).
- 156 Juretic, A. et al. Generation of lymphokine-activated killer activity in rodents but not in humans is nitric oxide dependent. *Cell Immunol* 157, 462-477, doi:10.1006/cimm.1994.1242 (1994).
- 157 Xiao, L., Eneroth, P. H. & Qureshi, G. A. Nitric oxide synthase pathway may mediate human natural killer cell cytotoxicity. *Scand J Immunol* 42, 505-511, doi:10.1111/j.1365-3083.1995.tb03687.x (1995).
- 158 Xie, Q. W. et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256, 225-228, doi:10.1126/science.1373522 (1992).
- 159 Park, K. G., Hayes, P. D., Garlick, P. J., Sewell, H. & Eremin, O. Stimulation of lymphocyte natural cytotoxicity by L-arginine. *Lancet* 337, 645-646, doi:10.1016/0140-6736(91)92456-c (1991).
- 160 Cifone, M. G. et al. Induction of the nitric oxide-synthesizing pathway in fresh and interleukin 2-cultured rat natural killer cells. *Cell Immunol* 157, 181-194, doi:10.1006/cimm.1994.1215 (1994).
- 161 Nathan, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 100, 2417-2423, doi:10.1172/JCI119782 (1997).
- 162 Cifone, M. G., Ulisse, S. & Santoni, A. Natural killer cells and nitric oxide. *Int Immunopharmacol* 1, 1513-1524, doi:10.1016/s1567-5769(01)00095-9 (2001).
- 163 Bang, C. & Thum, T. Exosomes: new players in cell-cell communication. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 2060-2064, doi:10.1016/j.biocel.2012.08.007 (2012).
- 164 Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200, 373-383, doi:10.1083/jcb.201211138 (2013).
- 165 Kowal, J. et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E968-977, doi:10.1073/pnas.1521230113 (2016).
- 166 Blanchard, N. et al. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol* 168, 3235-3241, doi:10.4049/jimmunol.168.7.3235 (2002).
- 167 Saunderson, S. C. et al. Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. *J Immunol* 180, 8146-8152, doi:10.4049/jimmunol.180.12.8146 (2008).
- 168 Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F. J. & Schorey, J. S. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* 110, 3234-3244, doi:10.1182/blood-2007-03-079152 (2007).
- 169 Zitvogel, L. et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4, 594-600, doi:10.1038/nm0598-594 (1998).
- 170 Munich, S., Sobo-Vujanovic, A., Buchser, W. J., Beer-Stolz, D. & Vujanovic, N. L. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology* 1, 1074-1083, doi:10.4161/onci.20897 (2012).
- 171 Reiners, K. S., Dassler, J., Coch, C. & Pogge von Strandmann, E. Role of Exosomes Released by Dendritic Cells and/or by Tumor Targets: Regulation of NK Cell Plasticity. *Front Immunol* 5, 91, doi:10.3389/fimmu.2014.00091 (2014).

- 172 Radomski, N. et al. Chlamydia psittaci-Infected Dendritic Cells Communicate with NK Cells via Exosomes To Activate Antibacterial Immunity. *Infect Immun* 88, doi:10.1128/IAI.00541-19 (2019).
- 173 Simhadri, V. R. et al. Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS One* 3, e3377, doi:10.1371/journal.pone.0003377 (2008).
- 174 Viaud, S. et al. Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15 $\alpha$ . *PLoS One* 4, e4942, doi:10.1371/journal.pone.0004942 (2009).
- 175 Thery, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9, 581-593, doi:10.1038/nri2567 (2009).
- 176 Gleimer, M. & Parham, P. Stress management: MHC class I and class I-like molecules as reporters of cellular stress. *Immunity* 19, 469-477, doi:10.1016/s1074-7613(03)00272-3 (2003).
- 177 Rock, K. L., Farfan-Arribas, D. J. & Shen, L. Proteases in MHC class I presentation and cross-presentation. *J Immunol* 184, 9-15, doi:10.4049/jimmunol.0903399 (2010).
- 178 Gromme, M. & Neefjes, J. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 39, 181-202, doi:10.1016/s0161-5890(02)00101-3 (2002).
- 179 Jones, E. Y. MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol* 9, 75-79, doi:10.1016/s0952-7915(97)80162-8 (1997).
- 180 Raghavan, M., Del Cid, N., Rizvi, S. M. & Peters, L. R. MHC class I assembly: out and about. *Trends Immunol* 29, 436-443, doi:10.1016/j.it.2008.06.004 (2008).
- 181 Bouvier, M. & Wiley, D. C. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science* 265, 398-402, doi:10.1126/science.8023162 (1994).
- 182 Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. & Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296, doi:10.1038/351290a0 (1991).
- 183 Rock, K. L. et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771, doi:10.1016/s0092-8674(94)90462-6 (1994).
- 184 Uebel, S. & Tampe, R. Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr Opin Immunol* 11, 203-208, doi:10.1016/s0952-7915(99)80034-x (1999).
- 185 Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T. & Diedrich, G. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev* 172, 21-28, doi:10.1111/j.1600-065x.1999.tb01353.x (1999).
- 186 Rufer, E., Leonhardt, R. M. & Knittler, M. R. Molecular architecture of the TAP-associated MHC class I peptide-loading complex. *J Immunol* 179, 5717-5727, doi:10.4049/jimmunol.179.9.5717 (2007).
- 187 Williams, A. P., Peh, C. A., Purcell, A. W., McCluskey, J. & Elliott, T. Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. *Immunity* 16, 509-520, doi:10.1016/s1074-7613(02)00304-7 (2002).
- 188 Jackson, M. R., Cohen-Doyle, M. F., Peterson, P. A. & Williams, D. B. Regulation of MHC class I transport by the molecular chaperone, calnexin (p88, IP90). *Science* 263, 384-387, doi:10.1126/science.8278813 (1994).
- 189 Cruz, F. M., Colbert, J. D., Merino, E., Kriegsman, B. A. & Rock, K. L. The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu Rev Immunol* 35, 149-176, doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055254 (2017).
- 190 Heath, W. R. et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199, 9-26, doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00142.x (2004).
- 191 Neefjes, J. & Sadaka, C. Into the intracellular logistics of cross-presentation. *Front Immunol* 3, 31, doi:10.3389/fimmu.2012.00031 (2012).
- 192 Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 12, 557-569, doi:10.1038/nri3254 (2012).

- 193 Rock, K. L. Exiting the outside world for cross-presentation. *Immunity* 25, 523-525, doi:10.1016/j.immuni.2006.09.003 (2006).
- 194 Shen, L., Sigal, L. J., Boes, M. & Rock, K. L. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21, 155-165, doi:10.1016/j.immuni.2004.07.004 (2004).
- 195 Rock, K. L. & Shen, L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 207, 166-183, doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00301.x (2005).
- 196 Topham, N. J. & Hewitt, E. W. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology* 128, 7-15, doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03123.x (2009).
- 197 Pegram, H. J., Andrews, D. M., Smyth, M. J., Darcy, P. K. & Kershaw, M. H. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol* 89, 216-224, doi:10.1038/icb.2010.78 (2011).
- 198 Tseng, C. T. & Rank, R. G. Role of NK cells in early host response to chlamydial genital infection. *Infect Immun* 66, 5867-5875, doi:10.1128/IAI.66.12.5867-5875.1998 (1998).
- 199 Horowitz, A., Stegmann, K. A. & Riley, E. M. Activation of natural killer cells during microbial infections. *Front Immunol* 2, 88, doi:10.3389/fimmu.2011.00088 (2011).
- 200 Jiao, L. et al. NK cells promote type 1 T cell immunity through modulating the function of dendritic cells during intracellular bacterial infection. *J Immunol* 187, 401-411, doi:10.4049/jimmunol.1002519 (2011).
- 201 Li, J. et al. Natural killer cells regulate Th1/Treg and Th17/Treg balance in chlamydial lung infection. *J Cell Mol Med* 20, 1339-1351, doi:10.1111/jcmm.12821 (2016).
- 202 Radomski, N., Franzke, K., Matthiesen, S., Karger, A. & Knittler, M. R. NK Cell-Mediated Processing Of Chlamydia psittaci Drives Potent Anti-Bacterial Th1 Immunity. *Sci Rep* 9, 4799, doi:10.1038/s41598-019-41264-4 (2019).
- 203 Watzl, C., Urlaub, D., Fasbender, F. & Claus, M. Natural killer cell regulation - beyond the receptors. *F1000Prime Rep* 6, 87, doi:10.12703/P6-87 (2014).
- 204 Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9, 503-510, doi:10.1038/ni1582 (2008).
- 205 Lanier, L. L. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res* 3, 575-582, doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0098 (2015).
- 206 Ferlazzo, G. & Morandi, B. Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Front Immunol* 5, 159, doi:10.3389/fimmu.2014.00159 (2014).
- 207 Bertzbach, L. D., van Haarlem, D. A., Hartle, S., Kaufer, B. B. & Jansen, C. A. Marek's Disease Virus Infection of Natural Killer Cells. *Microorganisms* 7, doi:10.3390/microorganisms7120588 (2019).
- 208 Chalifour, A. et al. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 104, 1778-1783, doi:10.1182/blood-2003-08-2820 (2004).
- 209 Marcenaro, E., Ferranti, B., Falco, M., Moretta, L. & Moretta, A. Human NK cells directly recognize *Mycobacterium bovis* via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC. *Int Immunol* 20, 1155-1167, doi:10.1093/intimm/dxn073 (2008).
- 210 Lindemann, R. A. Bacterial activation of human natural killer cells: role of cell surface lipopolysaccharide. *Infect Immun* 56, 1301-1308, doi:10.1128/IAI.56.5.1301-1308.1988 (1988).
- 211 Hart, O. M., Athie-Morales, V., O'Connor, G. M. & Gardiner, C. M. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol* 175, 1636-1642, doi:10.4049/jimmunol.175.3.1636 (2005).
- 212 Qiu, F., Maniar, A., Diaz, M. Q., Chapoval, A. I. & Medvedev, A. E. Activation of cytokine-producing and antitumor activities of natural killer cells and macrophages by engagement of Toll-like and NOD-like receptors. *Innate Immun* 17, 375-387, doi:10.1177/1753425910372000 (2011).
- 213 Anel, A. et al. Protein Kinase C-theta (PKC-theta) in Natural Killer Cell Function and Anti-Tumor Immunity. *Front Immunol* 3, 187, doi:10.3389/fimmu.2012.00187 (2012).

- 214 Paul, S. & Lal, G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 8, 1124, doi:10.3389/fimmu.2017.01124 (2017).
- 215 Trapani, J. A. & Smyth, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2, 735-747, doi:10.1038/nri911 (2002).
- 216 Seidel, U. J., Schlegel, P. & Lang, P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol* 4, 76, doi:10.3389/fimmu.2013.00076 (2013).
- 217 Warren, H. S. & Smyth, M. J. NK cells and apoptosis. *Immunol Cell Biol* 77, 64-75, doi:10.1046/j.1440-1711.1999.00790.x (1999).
- 218 Robertson, M. J. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 71, 173-183 (2002).
- 219 Parker, B. S., Rautela, J. & Hertzog, P. J. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 16, 131-144, doi:10.1038/nrc.2016.14 (2016).
- 220 Belardelli, F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS* 103, 161-179, doi:10.1111/j.1699-0463.1995.tb01092.x (1995).
- 221 Goldszmid, R. S. et al. NK cell-derived interferon-gamma orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* 36, 1047-1059, doi:10.1016/j.immuni.2012.03.026 (2012).
- 222 Sitkovsky, M. & Lukashev, D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol* 5, 712-721, doi:10.1038/nri1685 (2005).
- 223 Naldini, A. et al. Hypoxia affects dendritic cell survival: role of the hypoxia-inducible factor-1alpha and lipopolysaccharide. *J Cell Physiol* 227, 587-595, doi:10.1002/jcp.22761 (2012).
- 224 Winning, S. & Fandrey, J. Dendritic Cells under Hypoxia: How Oxygen Shortage Affects the Linkage between Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol Res* 2016, 5134329, doi:10.1155/2016/5134329 (2016).
- 225 McKeown, S. R. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br J Radiol* 87, 20130676, doi:10.1259/bjr.20130676 (2014).
- 226 Krzywinska, E. & Stockmann, C. Hypoxia, Metabolism and Immune Cell Function. *Biomedicines* 6, doi:10.3390/biomedicines6020056 (2018).
- 227 Palazon, A., Goldrath, A. W., Nizet, V. & Johnson, R. S. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* 41, 518-528, doi:10.1016/j.immuni.2014.09.008 (2014).
- 228 Devraj, G., Beerlage, C., Brune, B. & Kempf, V. A. Hypoxia and HIF-1 activation in bacterial infections. *Microbes Infect* 19, 144-156, doi:10.1016/j.micinf.2016.11.003 (2017).
- 229 Blouin, C. C., Page, E. L., Soucy, G. M. & Richard, D. E. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood* 103, 1124-1130, doi:10.1182/blood-2003-07-2427 (2004).
- 230 Albina, J. E. et al. HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1alpha induction in primary inflammatory cells by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1971-1977, doi:10.1152/ajpcell.2001.281.6.C1971 (2001).
- 231 Shatrov, V. A., Sumbayev, V. V., Zhou, J. & Brune, B. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) triggers hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) accumulation via redox-dependent mechanisms. *Blood* 101, 4847-4849, doi:10.1182/blood-2002-09-2711 (2003).
- 232 Taylor, C. T. & Colgan, S. P. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. *Nat Rev Immunol* 17, 774-785, doi:10.1038/nri.2017.103 (2017).
- 233 Mateo, J., Garcia-Lecea, M., Cadenas, S., Hernandez, C. & Moncada, S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem J* 376, 537-544, doi:10.1042/BJ20031155 (2003).
- 234 Hagen, T., Taylor, C. T., Lam, F. & Moncada, S. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science* 302, 1975-1978, doi:10.1126/science.1088805 (2003).
- 235 Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314, doi:10.1126/science.123.3191.309 (1956).
- 236 Cramer, T. et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112, 645-657, doi:10.1016/s0092-8674(03)00154-5 (2003).



- 237 Hayek, I. et al. Limitation of TCA Cycle Intermediates Represents an Oxygen-Independent Nutritional Antibacterial Effector Mechanism of Macrophages. *Cell Rep* 26, 3502-3510 e3506, doi:10.1016/j.celrep.2019.02.103 (2019).
- 238 Jantsch, J. et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J Immunol* 180, 4697-4705, doi:10.4049/jimmunol.180.7.4697 (2008).
- 239 Mancino, A. et al. Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions. *Blood* 112, 3723-3734, doi:10.1182/blood-2008-02-142091 (2008).
- 240 Kohler, T., Reizis, B., Johnson, R. S., Weighardt, H. & Forster, I. Influence of hypoxia-inducible factor 1alpha on dendritic cell differentiation and migration. *Eur J Immunol* 42, 1226-1236, doi:10.1002/eji.201142053 (2012).
- 241 Gomez, J. E. & McKinney, J. D. M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis (Edinb)* 84, 29-44, doi:10.1016/j.tube.2003.08.003 (2004).
- 242 Schaible, B., Taylor, C. T. & Schaffer, K. Hypoxia increases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* through altering the composition of multidrug efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 2114-2118, doi:10.1128/AAC.05574-11 (2012).
- 243 Khavkin, T. & Tabibzadeh, S. S. Histologic, immunofluorescence, and electron microscopic study of infectious process in mouse lung after intranasal challenge with *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 56, 1792-1799, doi:10.1128/IAI.56.7.1792-1799.1988 (1988).
- 244 Stein, A. et al. Q fever pneumonia: virulence of *Coxiella burnetii* pathovars in a murine model of aerosol infection. *Infect Immun* 73, 2469-2477, doi:10.1128/IAI.73.4.2469-2477.2005 (2005).
- 245 Benoit, M., Barbarat, B., Bernard, A., Olive, D. & Mege, J. L. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, stimulates an atypical M2 activation program in human macrophages. *Eur J Immunol* 38, 1065-1070, doi:10.1002/eji.200738067 (2008).
- 246 Ammerdorffer, A. et al. Recognition of *Coxiella burnetii* by toll-like receptors and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors. *J Infect Dis* 211, 978-987, doi:10.1093/infdis/jiu526 (2015).
- 247 Ramstead, A. G. et al. Roles of Toll-Like Receptor 2 (TLR2), TLR4, and MyD88 during Pulmonary *Coxiella burnetii* Infection. *Infect Immun* 84, 940-949, doi:10.1128/IAI.00898-15 (2016).
- 248 Schoffelen, T. et al. Genetic Variation in Pattern Recognition Receptors and Adaptor Proteins Associated With Development of Chronic Q Fever. *J Infect Dis* 212, 818-829, doi:10.1093/infdis/jiv113 (2015).
- 249 Schromm, A. B. et al. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur J Biochem* 267, 2008-2013, doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01204.x (2000).
- 250 van Wijk, M. J., Hogema, B. M., Maas, D. W. & Bokhorst, A. G. A Q Fever Outbreak in the Netherlands: Consequences for Tissue Banking. *Transfus Med Hemother* 38, 357-364, doi:10.1159/000334599 (2011).
- 251 Fournier, P. E. & Raoult, D. Predominant immunoglobulin A response to phase II antigen of *Coxiella burnetii* in acute Q fever. *Clin Diagn Lab Immunol* 6, 173-177 (1999).
- 252 Roest, H. I., Post, J., van Gelderen, B., van Zijderveld, F. G. & Rebel, J. M. Q fever in pregnant goats: humoral and cellular immune responses. *Vet Res* 44, 67, doi:10.1186/1297-9716-44-67 (2013).
- 253 Sting, R. et al. Quantitative real-time PCR and phase specific serology are mutually supportive in Q fever diagnostics in goats. *Vet Microbiol* 167, 600-608, doi:10.1016/j.vetmic.2013.09.015 (2013).
- 254 Schoffelen, T. et al. Limited humoral and cellular responses to Q fever vaccination in older adults with risk factors for chronic Q fever. *J Infect* 67, 565-573, doi:10.1016/j.jinf.2013.08.008 (2013).
- 255 Hackstadt, T. Steric hindrance of antibody binding to surface proteins of *Coxiella burnetii* by phase I lipopolysaccharide. *Infect Immun* 56, 802-807, doi:10.1128/IAI.56.4.802-807.1988 (1988).

- 256 Beare, P. A., Jeffrey, B. M., Long, C. M., Martens, C. M. & Heinzen, R. A. Genetic mechanisms of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharide phase variation. *PLoS Pathog* 14, e1006922, doi:10.1371/journal.ppat.1006922 (2018).
- 257 Andoh, M. et al. T cells are essential for bacterial clearance, and gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and B cells are crucial for disease development in *Coxiella burnetii* infection in mice. *Infect Immun* 75, 3245-3255, doi:10.1128/IAI.01767-06 (2007).
- 258 Kishimoto, R. A., Rozmiarek, H. & Larson, E. W. Experimental Q fever infection in congenitally athymic nude mice. *Infect Immun* 22, 69-71 (1978).
- 259 Read, A. J., Erickson, S. & Harmsen, A. G. Role of CD4+ and CD8+ T cells in clearance of primary pulmonary infection with *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 78, 3019-3026, doi:10.1128/IAI.00101-10 (2010).
- 260 Howe, D., Barrows, L. F., Lindstrom, N. M. & Heinzen, R. A. Nitric oxide inhibits *Coxiella burnetii* replication and parasitophorous vacuole maturation. *Infect Immun* 70, 5140-5147, doi:10.1128/iai.70.9.5140-5147.2002 (2002).
- 261 Brennan, R. E., Russell, K., Zhang, G. & Samuel, J. E. Both inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase contribute to the control of virulent phase I *Coxiella burnetii* infections. *Infect Immun* 72, 6666-6675, doi:10.1128/IAI.72.11.6666-6675.2004 (2004).
- 262 van Schaik, E. J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M. M. & Samuel, J. E. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat Rev Microbiol* 11, 561-573, doi:10.1038/nrmicro3049 (2013).
- 263 Hill, J. & Samuel, J. E. *Coxiella burnetii* acid phosphatase inhibits the release of reactive oxygen intermediates in polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 79, 414-420, doi:10.1128/IAI.01011-10 (2011).
- 264 Siemsen, D. W., Kirpotina, L. N., Jutila, M. A. & Quinn, M. T. Inhibition of the human neutrophil NADPH oxidase by *Coxiella burnetii*. *Microbes Infect* 11, 671-679, doi:10.1016/j.micinf.2009.04.005 (2009).
- 265 Deng, S. et al. Toll-Like Receptor 4 Promotes NO Synthesis by Upregulating GCHI Expression under Oxidative Stress Conditions in Sheep Monocytes/Macrophages. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 359315, doi:10.1155/2015/359315 (2015).
- 266 Vila-del Sol, V., Diaz-Munoz, M. D. & Fresno, M. Requirement of tumor necrosis factor alpha and nuclear factor-kappaB in the induction by IFN-gamma of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *J Leukoc Biol* 81, 272-283, doi:10.1189/jlb.0905529 (2007).
- 267 Zamboni, D. S. & Rabinovitch, M. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect Immun* 71, 1225-1233, doi:10.1128/iai.71.3.1225-1233.2003 (2003).
- 268 Zhang, G. et al. Mechanisms of vaccine-induced protective immunity against *Coxiella burnetii* infection in BALB/c mice. *J Immunol* 179, 8372-8380, doi:10.4049/jimmunol.179.12.8372 (2007).
- 269 Peacock, M. G., Fiset, P., Ormsbee, R. A. & Wisseman, C. L., Jr. Antibody response in man following a small intradermal inoculation with *Coxiella burnetii* phase I vaccine. *Acta Virol* 23, 73-81 (1979).
- 270 Guigno, D. et al. Primary humoral antibody response to *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever. *J Clin Microbiol* 30, 1958-1967, doi:10.1128/JCM.30.8.1958-1967.1992 (1992).
- 271 Behymer, D. E., Biberstein, E. L., Riemann, H. P., Franti, C. E. & Sawyer, M. Q fever (*Coxiella burnetii*) investigations in dairy cattle: persistence of antibodies after vaccination. *Am J Vet Res* 36, 781-784 (1975).
- 272 Worswick, D. & Marmion, B. P. Antibody responses in acute and chronic Q fever and in subjects vaccinated against Q fever. *J Med Microbiol* 19, 281-296, doi:10.1099/00222615-19-3-281 (1985).
- 273 Vestal, D. J. The guanylate-binding proteins (GBPs): proinflammatory cytokine-induced members of the dynamin superfamily with unique GTPase activity. *J Interferon Cytokine Res* 25, 435-443, doi:10.1089/jir.2005.25.435 (2005).
- 274 Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15, 749-795, doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.749 (1997).

- 275 MacMicking, J. D. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* 12, 367-382, doi:10.1038/nri3210 (2012).
- 276 Al-Zeer, M. A., Al-Younes, H. M., Braun, P. R., Zerrahn, J. & Meyer, T. F. IFN-gamma-inducible Irga6 mediates host resistance against *Chlamydia trachomatis* via autophagy. *PLoS One* 4, e4588, doi:10.1371/journal.pone.0004588 (2009).
- 277 Fiegl, D. et al. Amphisomal route of MHC class I cross-presentation in bacteria-infected dendritic cells. *J Immunol* 190, 2791-2806, doi:10.4049/jimmunol.1202741 (2013).
- 278 Degrandi, D. et al. Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *J Immunol* 179, 7729-7740, doi:10.4049/jimmunol.179.11.7729 (2007).
- 279 Praefcke, G. J. K. Regulation of innate immune functions by guanylate-binding proteins. *Int J Med Microbiol* 308, 237-245, doi:10.1016/j.ijmm.2017.10.013 (2018).
- 280 Bekpen, C. et al. The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol* 6, R92, doi:10.1186/gb-2005-6-11-r92 (2005).
- 281 Klamp, T., Boehm, U., Schenk, D., Pfeffer, K. & Howard, J. C. A giant GTPase, very large inducible GTPase-1, is inducible by IFNs. *J Immunol* 171, 1255-1265, doi:10.4049/jimmunol.171.3.1255 (2003).
- 282 Kim, B. H. et al. A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science* 332, 717-721, doi:10.1126/science.1201711 (2011).
- 283 Kresse, A. et al. Analyses of murine GBP homology clusters based on in silico, in vitro and in vivo studies. *BMC Genomics* 9, 158, doi:10.1186/1471-2164-9-158 (2008).
- 284 Kim, B. H., Shenoy, A. R., Kumar, P., Bradfield, C. J. & MacMicking, J. D. IFN-inducible GTPases in host cell defense. *Cell Host Microbe* 12, 432-444, doi:10.1016/j.chom.2012.09.007 (2012).
- 285 Haller, O. & Kochs, G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 3, 710-717, doi:10.1034/j.1600-0854.2002.31003.x (2002).
- 286 Staeheli, P., Haller, O., Boll, W., Lindenmann, J. & Weissmann, C. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* 44, 147-158, doi:10.1016/0092-8674(86)90493-9 (1986).
- 287 Taylor, G. A., Feng, C. G. & Sher, A. p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* 4, 100-109, doi:10.1038/nri1270 (2004).
- 288 Hunn, J. P., Feng, C. G., Sher, A. & Howard, J. C. The immunity-related GTPases in mammals: a fast-evolving cell-autonomous resistance system against intracellular pathogens. *Mamm Genome* 22, 43-54, doi:10.1007/s00335-010-9293-3 (2011).
- 289 MacMicking, J. D., Taylor, G. A. & McKinney, J. D. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* 302, 654-659, doi:10.1126/science.1088063 (2003).
- 290 MacMicking, J. D. IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends Immunol* 25, 601-609, doi:10.1016/j.it.2004.08.010 (2004).
- 291 Tiwari, S., Choi, H. P., Matsuzawa, T., Pypaert, M. & MacMicking, J. D. Targeting of the GTPase Irgm1 to the phagosomal membrane via PtdIns(3,4)P(2) and PtdIns(3,4,5)P(3) promotes immunity to mycobacteria. *Nat Immunol* 10, 907-917, doi:10.1038/ni.1759 (2009).
- 292 Singh, S. B., Davis, A. S., Taylor, G. A. & Deretic, V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 313, 1438-1441, doi:10.1126/science.1129577 (2006).
- 293 Nelson, D. E. et al. Chlamydial IFN-gamma immune evasion is linked to host infection tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10658-10663, doi:10.1073/pnas.0504198102 (2005).
- 294 Bernstein-Hanley, I. et al. The p47 GTPases Igtg and Irgb10 map to the *Chlamydia trachomatis* susceptibility locus Ctrq-3 and mediate cellular resistance in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14092-14097, doi:10.1073/pnas.0603338103 (2006).
- 295 Nguyen, T. T., Hu, Y., Widney, D. P., Mar, R. A. & Smith, J. B. Murine GBP-5, a new member of the murine guanylate-binding protein family, is coordinately regulated with other GBPs in vivo and in vitro. *J Interferon Cytokine Res* 22, 899-909, doi:10.1089/107999002760274926 (2002).

- 296 Boehm, U. et al. Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J Immunol* 161, 6715-6723 (1998).
- 297 Fisch, D. et al. Human GBP1 is a microbe-specific gatekeeper of macrophage apoptosis and pyroptosis. *EMBO J* 38, e100926, doi:10.15252/embj.2018100926 (2019).
- 298 Fisch, D. et al. Human GBP1 Differentially Targets Salmonella and Toxoplasma to License Recognition of Microbial Ligands and Caspase-Mediated Death. *Cell Rep* 32, 108008, doi:10.1016/j.celrep.2020.108008 (2020).
- 299 Selleck, E. M. et al. Guanylate-binding protein 1 (Gbp1) contributes to cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 9, e1003320, doi:10.1371/journal.ppat.1003320 (2013).
- 300 Gardet, A. et al. LRRK2 is involved in the IFN-gamma response and host response to pathogens. *J Immunol* 185, 5577-5585, doi:10.4049/jimmunol.1000548 (2010).
- 301 Halliwell, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem Sci* 31, 509-515, doi:10.1016/j.tibs.2006.07.005 (2006).
- 302 DeLeo, F. R., Allen, L. A., Apicella, M. & Nauseef, W. M. NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J Immunol* 163, 6732-6740 (1999).
- 303 Diebold, B. A. & Bokoch, G. M. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol* 2, 211-215, doi:10.1038/85259 (2001).
- 304 Lapouge, K., Smith, S. J., Groemping, Y. & Rittinger, K. Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem* 277, 10121-10128, doi:10.1074/jbc.M112065200 (2002).
- 305 Zhao, T., Benard, V., Bohl, B. P. & Bokoch, G. M. The molecular basis for adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils. *J Clin Invest* 112, 1732-1740, doi:10.1172/JCI19108 (2003).
- 306 Bissonnette, S. A. et al. Phosphatidylinositol 3-phosphate-dependent and -independent functions of p40phox in activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* 283, 2108-2119, doi:10.1074/jbc.M706639200 (2008).
- 307 Cooper, A. M., Segal, B. H., Frank, A. A., Holland, S. M. & Orme, I. M. Transient loss of resistance to pulmonary tuberculosis in p47(phox<sup>-/-</sup>) mice. *Infect Immun* 68, 1231-1234, doi:10.1128/iai.68.3.1231-1234.2000 (2000).
- 308 Yang, C. T. et al. Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages. *Cell Host Microbe* 12, 301-312, doi:10.1016/j.chom.2012.07.009 (2012).
- 309 Mantegazza, A. R. et al. NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood* 112, 4712-4722, doi:10.1182/blood-2008-01-134791 (2008).
- 310 Dingjan, I. et al. VAMP8-mediated NOX2 recruitment to endosomes is necessary for antigen release. *Eur J Cell Biol* 96, 705-714, doi:10.1016/j.ejcb.2017.06.007 (2017).
- 311 Dingjan, I. et al. Lipid peroxidation causes endosomal antigen release for cross-presentation. *Sci Rep* 6, 22064, doi:10.1038/srep22064 (2016).
- 312 Alderton, W. K., Cooper, C. E. & Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593-615, doi:10.1042/0264-6021:3570593 (2001).
- 313 Knowles, R. G. & Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298 ( Pt 2), 249-258, doi:10.1042/bj2980249 (1994).
- 314 Nathan, C. & Xie, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269, 13725-13728 (1994).
- 315 Mayer, B. & Hemmens, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 22, 477-481, doi:10.1016/s0968-0004(97)01147-x (1997).
- 316 Liu, J., Garcia-Cardena, G. & Sessa, W. C. Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. *Biochemistry* 34, 12333-12340, doi:10.1021/bi00038a029 (1995).
- 317 Murphy, M. P. Nitric oxide and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1411, 401-414, doi:10.1016/s0005-2728(99)00029-8 (1999).

- 318 Ignarro, L. J. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. *Biochem Soc Trans* 20, 465-469, doi:10.1042/bst0200465 (1992).
- 319 Aktan, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 75, 639-653, doi:10.1016/j.lfs.2003.10.042 (2004).
- 320 Xie, Q. & Nathan, C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol* 56, 576-582, doi:10.1002/jlb.56.5.576 (1994).
- 321 Elfering, S. L., Sarkela, T. M. & Giulivi, C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 277, 38079-38086, doi:10.1074/jbc.M205256200 (2002).
- 322 Ghafourifar, P., Schenk, U., Klein, S. D. & Richter, C. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem* 274, 31185-31188, doi:10.1074/jbc.274.44.31185 (1999).
- 323 Giulivi, C., Poderoso, J. J. & Boveris, A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* 273, 11038-11043, doi:10.1074/jbc.273.18.11038 (1998).
- 324 Brown, G. C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1504, 46-57, doi:10.1016/s0005-2728(00)00238-3 (2001).
- 325 Stuehr, D. J. et al. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* 266, 6259-6263 (1991).
- 326 Weitzberg, E. & Lundberg, J. O. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide* 2, 1-7, doi:10.1006/niox.1997.0162 (1998).
- 327 Zweier, J. L., Wang, P., Samouilov, A. & Kuppusamy, P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med* 1, 804-809, doi:10.1038/nm0895-804 (1995).
- 328 Zweier, J. L., Samouilov, A. & Kuppusamy, P. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim Biophys Acta* 1411, 250-262, doi:10.1016/s0005-2728(99)00018-3 (1999).
- 329 Murad, F. Nitric oxide: the coming of the second messenger. *Rambam Maimonides Med J* 2, e0038, doi:10.5041/RMMJ.10038 (2011).
- 330 Everts, B. et al. Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. *Blood* 120, 1422-1431, doi:10.1182/blood-2012-03-419747 (2012).
- 331 Thwe, P. M. & Amiel, E. The role of nitric oxide in metabolic regulation of Dendritic cell immune function. *Cancer Lett* 412, 236-242, doi:10.1016/j.canlet.2017.10.032 (2018).
- 332 Kelly, B. & O'Neill, L. A. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res* 25, 771-784, doi:10.1038/cr.2015.68 (2015).
- 333 Evans, T. G., Thai, L., Granger, D. L. & Hibbs, J. B., Jr. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J Immunol* 151, 907-915 (1993).
- 334 Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M. & Moncada, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 144, 4794-4797 (1990).
- 335 Stamler, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78, 931-936, doi:10.1016/0092-8674(94)90269-0 (1994).
- 336 Kroncke, K. D., Fehsel, K. & Kolb-Bachofen, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where? *Nitric Oxide* 1, 107-120, doi:10.1006/niox.1997.0118 (1997).
- 337 Ismail, N., Olano, J. P., Feng, H. M. & Walker, D. H. Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 207, 111-120, doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11038.x (2002).
- 338 Grisham, M. B., Jourdain, D. & Wink, D. A. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 276, G315-321, doi:10.1152/ajpgi.1999.276.2.G315 (1999).
- 339 Drexler, H. G. & Uphoff, C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 39, 75-90, doi:10.1023/A:1022913015916 (2002).
- 340 Wang, G. L. & Semenza, G. L. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 82, 3610-3615 (1993).

- 341 Burton, P. R., Stueckemann, J., Welsh, R. M. & Paretsky, D. Some ultrastructural effects of persistent infections by the rickettsia *Coxiella burnetii* in mouse L cells and green monkey kidney (Vero) cells. *Infect Immun* 21, 556-566, doi:10.1128/IAI.21.2.556-566.1978 (1978).
- 342 Baca, O. G. et al. Fate of phase I and phase II *Coxiella burnetii* in several macrophage-like tumor cell lines. *Infect Immun* 33, 258-266, doi:10.1128/IAI.33.1.258-266.1981 (1981).
- 343 Baca, O. G., Scott, T. O., Akporiaye, E. T., DeBlassie, R. & Crissman, H. A. Cell cycle distribution patterns and generation times of L929 fibroblast cells persistently infected with *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 47, 366-369, doi:10.1128/IAI.47.2.366-369.1985 (1985).
- 344 Rebbig, A., Matthiesen, S., Luhrmann, A. & Knittler, M. R. Flow cytometry as a new complementary tool to study *Coxiella burnetii* in cell cultures. *J Microbiol Methods* 151, 39-43, doi:10.1016/j.mimet.2018.05.022 (2018).
- 345 Evenou, J. P. et al. The potent protein kinase C-selective inhibitor AEB071 (sotrastaurin) represents a new class of immunosuppressive agents affecting early T-cell activation. *J Pharmacol Exp Ther* 330, 792-801, doi:10.1124/jpet.109.153205 (2009).
- 346 Klupp, B. G., Granzow, H. & Mettenleiter, T. C. Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product. *J Virol* 74, 10063-10073, doi:10.1128/jvi.74.21.10063-10073.2000 (2000).
- 347 Biederbick, A., Kern, H. F. & Elsasser, H. P. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol* 66, 3-14 (1995).
- 348 Munafo, D. B. & Colombo, M. I. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci* 114, 3619-3629 (2001).
- 349 Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, doi:10.1038/227680a0 (1970).
- 350 Lanoix, J. et al. Comparison of the MHC I Immunopeptidome Repertoire of B-Cell Lymphoblasts Using Two Isolation Methods. *Proteomics* 18, e1700251, doi:10.1002/pmic.201700251 (2018).
- 351 Sun, J., Zhang, X., Broderick, M. & Fein, H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors* 3, 276-284 (2003).
- 352 Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823, doi:10.1126/science.1231143 (2013).
- 353 Hubner, A. et al. Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L). *Sci Rep* 8, 1449, doi:10.1038/s41598-018-19626-1 (2018).
- 354 Wegdam-Blans, M. C. et al. Chronic Q fever: review of the literature and a proposal of new diagnostic criteria. *J Infect* 64, 247-259, doi:10.1016/j.jinf.2011.12.014 (2012).
- 355 Anderson, A. et al. Diagnosis and management of Q fever--United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *MMWR Recomm Rep* 62, 1-30 (2013).
- 356 Muleme, M. et al. A longitudinal study of serological responses to *Coxiella burnetii* and shedding at kidding among intensively-managed goats supports early use of vaccines. *Vet Res* 48, 50, doi:10.1186/s13567-017-0452-3 (2017).
- 357 Zilberman, Y. et al. Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *J Cell Sci* 122, 3531-3541, doi:10.1242/jcs.046813 (2009).
- 358 Moreno-Gonzalo, O. et al. HDAC6 controls innate immune and autophagy responses to TLR-mediated signalling by the intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* 13, e1006799, doi:10.1371/journal.ppat.1006799 (2017).
- 359 Kashyap, A. S. et al. GEF-H1 Signaling upon Microtubule Destabilization Is Required for Dendritic Cell Activation and Specific Anti-tumor Responses. *Cell Rep* 28, 3367-3380 e3368, doi:10.1016/j.celrep.2019.08.057 (2019).
- 360 Kopf, A. et al. Microtubules control cellular shape and coherence in amoeboid migrating cells. *J Cell Biol* 219, doi:10.1083/jcb.201907154 (2020).
- 361 Peachman, K. K. et al. Functional microtubules are required for antigen processing by macrophages and dendritic cells. *Immunol Lett* 95, 13-24, doi:10.1016/j.imlet.2004.05.013 (2004).

- 362 Thomas-Rudolph, D., Du Clos, T. W., Snapper, C. M. & Mold, C. C-reactive protein enhances immunity to *Streptococcus pneumoniae* by targeting uptake to Fc gamma R on dendritic cells. *J Immunol* 178, 7283-7291, doi:10.4049/jimmunol.178.11.7283 (2007).
- 363 Joller, N., Weber, S. S. & Oxenius, A. Antibody-Fc receptor interactions in protection against intracellular pathogens. *Eur J Immunol* 41, 889-897, doi:10.1002/eji.201041340 (2011).
- 364 Jungi, T. W., Peterhans, E., Pfister, H. & Fey, H. The interaction of ruminant IgG with receptor type II for IgG on human phagocytes. *Immunology* 66, 143-148 (1989).
- 365 Shen, W. C. & Ryser, H. J. Selective killing of Fc-receptor-bearing tumor cells through endocytosis of a drug-carrying immune complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1445-1447, doi:10.1073/pnas.81.5.1445 (1984).
- 366 Peng, Y., Schoenlaub, L., Elliott, A., Mitchell, W. J. & Zhang, G. Characterization of a lipopolysaccharide-targeted monoclonal antibody and its variable fragments as candidates for prophylaxis against the obligate intracellular bacterial pathogen *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 82, 4530-4541, doi:10.1128/IAI.01695-14 (2014).
- 367 Krawczyk, C. M. et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* 115, 4742-4749, doi:10.1182/blood-2009-10-249540 (2010).
- 368 Pantel, A. et al. Direct type I IFN but not MDA5/TLR3 activation of dendritic cells is required for maturation and metabolic shift to glycolysis after poly IC stimulation. *PLoS Biol* 12, e1001759, doi:10.1371/journal.pbio.1001759 (2014).
- 369 Witkowska, A. M. & Borawska, M. H. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw* 15, 91-98 (2004).
- 370 Liu, M. et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev* 22, 121-130, doi:10.1016/j.cytogfr.2011.06.001 (2011).
- 371 TeSlaa, T. & Teitell, M. A. Techniques to monitor glycolysis. *Methods Enzymol* 542, 91-114, doi:10.1016/B978-0-12-416618-9.00005-4 (2014).
- 372 Buttrum, L. et al. Both Major Histocompatibility Complex Class I (MHC-I) and MHC-II Molecules Are Required, while MHC-I Appears To Play a Critical Role in Host Defense against Primary *Coxiella burnetii* Infection. *Infect Immun* 86, doi:10.1128/IAI.00602-17 (2018).
- 373 Kägebein, D. et al. *Chlamydia trachomatis*-infected epithelial cells and fibroblasts retain the ability to express surface-presented major histocompatibility complex class I molecules. *Infect Immun* 82, 993-1006, doi:10.1128/IAI.01473-13 (2014).
- 374 Radomski, N., Einenkel, R., Muller, A. & Knittler, M. R. *Chlamydia*-host cell interaction not only from a bird's eye view: some lessons from *Chlamydia psittaci*. *FEBS Lett* 590, 3920-3940, doi:10.1002/1873-3468.12295 (2016).
- 375 Yang, L., Pang, Y. & Moses, H. L. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 31, 220-227, doi:10.1016/j.it.2010.04.002 (2010).
- 376 Yamaguchi, Y., Tsumura, H., Miwa, M. & Inaba, K. Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells* 15, 144-153, doi:10.1002/stem.150144 (1997).
- 377 Geissmann, F. et al. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* 162, 4567-4575 (1999).
- 378 Reed, S. G. TGF-beta in infections and infectious diseases. *Microbes Infect* 1, 1313-1325, doi:10.1016/s1286-4579(99)00252-x (1999).
- 379 Denis, M. & Ghadirian, E. Transforming growth factor beta (TGF-b1) plays a detrimental role in the progression of experimental *Mycobacterium avium* infection; in vivo and in vitro evidence. *Microb Pathog* 11, 367-372, doi:10.1016/0882-4010(91)90022-3 (1991).
- 380 Hirsch, C. S., Yoneda, T., Averill, L., Ellner, J. J. & Toossi, Z. Enhancement of intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor-beta 1. *J Infect Dis* 170, 1229-1237, doi:10.1093/infdis/170.5.1229 (1994).
- 381 Williams, D. M., Grubbs, B. G., Park-Snyder, S., Rank, R. G. & Bonewald, L. F. Activation of latent transforming growth factor beta during *Chlamydia trachomatis*-induced murine pneumonia. *Res Microbiol* 147, 251-262, doi:10.1016/0923-2508(96)81385-4 (1996).

- 382 Strobl, H. & Knapp, W. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect* 1, 1283-1290, doi:10.1016/s1286-4579(99)00256-7 (1999).
- 383 Worthington, J. J., Fenton, T. M., Czajkowska, B. I., Klementowicz, J. E. & Travis, M. A. Regulation of TGFbeta in the immune system: an emerging role for integrins and dendritic cells. *Immunobiology* 217, 1259-1265, doi:10.1016/j.imbio.2012.06.009 (2012).
- 384 Munger, J. S. & Sheppard, D. Cross talk among TGF-beta signaling pathways, integrins, and the extracellular matrix. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a005017, doi:10.1101/cshperspect.a005017 (2011).
- 385 Robertson, I. B. & Rifkin, D. B. Regulation of the Bioavailability of TGF-beta and TGF-beta-Related Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, doi:10.1101/cshperspect.a021907 (2016).
- 386 Boucard-Jourdin, M. et al. beta8 Integrin Expression and Activation of TGF-beta by Intestinal Dendritic Cells Are Determined by Both Tissue Microenvironment and Cell Lineage. *J Immunol* 197, 1968-1978, doi:10.4049/jimmunol.1600244 (2016).
- 387 Fenton, T. M. et al. Inflammatory cues enhance TGFbeta activation by distinct subsets of human intestinal dendritic cells via integrin alphavbeta8. *Mucosal Immunol* 10, 624-634, doi:10.1038/mi.2016.94 (2017).
- 388 Matsuzawa, T., Fujiwara, E. & Washi, Y. Autophagy activation by interferon-gamma via the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway is involved in macrophage bactericidal activity. *Immunology* 141, 61-69, doi:10.1111/imm.12168 (2014).
- 389 Ramana, C. V. et al. Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6674-6679, doi:10.1073/pnas.111164198 (2001).
- 390 Pfeffer, L. M. The role of nuclear factor kappaB in the interferon response. *J Interferon Cytokine Res* 31, 553-559, doi:10.1089/jir.2011.0028 (2011).
- 391 Kägebein, D. Untersuchungen zur MHC Klasse I-vermittelten Präsentation chlamydialer Peptidantigene in Dendritischen Zellen. Doktorarbeit (2014).
- 392 Pilon, G. et al. Endotoxin mediated-iNOS induction causes insulin resistance via ONOO(-) induced tyrosine nitration of IRS-1 in skeletal muscle. *PLoS One* 5, e15912, doi:10.1371/journal.pone.0015912 (2010).
- 393 Koide, N. et al. Lipopolysaccharide enhances interferon-gamma-induced nitric oxide (NO) production in murine vascular endothelial cells via augmentation of interferon regulatory factor-1 activation. *J Endotoxin Res* 13, 167-175, doi:10.1177/0968051907080894 (2007).
- 394 Cullen, S. J., Fatemie, S. & Ladiges, W. Breast tumor cells primed by endoplasmic reticulum stress remodel macrophage phenotype. *Am J Cancer Res* 3, 196-210 (2013).
- 395 Du, L. et al. eNOS/iNOS and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placentas of patients with preeclampsia. *J Hum Hypertens* 31, 49-55, doi:10.1038/jhh.2016.17 (2017).
- 396 Jiang, M. et al. Endoplasmic reticulum stress-dependent activation of iNOS/NO-NF-kappaB signaling and NLRP3 inflammasome contributes to endothelial inflammation and apoptosis associated with microgravity. *FASEB J* 34, 10835-10849, doi:10.1096/fj.202000734R (2020).
- 397 Shima, K. et al. The role of endoplasmic reticulum-related BiP/GRP78 in interferon gamma-induced persistent Chlamydia pneumoniae infection. *Cell Microbiol* 17, 923-934, doi:10.1111/cmi.12416 (2015).
- 398 Olivenza, R. et al. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem* 74, 785-791, doi:10.1046/j.1471-4159.2000.740785.x (2000).
- 399 Watanabe, Y., Suzuki, O., Haruyama, T. & Akaike, T. Interferon-gamma induces reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress at the hepatic apoptosis. *J Cell Biochem* 89, 244-253, doi:10.1002/jcb.10501 (2003).
- 400 Brann, K. R., Fullerton, M. S. & Voth, D. E. Coxiella burnetii Requires Host Eukaryotic Initiation Factor 2alpha Activity for Efficient Intracellular Replication. *Infect Immun* 88, doi:10.1128/IAI.00096-20 (2020).
- 401 Xie, Q. W., Kashiwabara, Y. & Nathan, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269, 4705-4708 (1994).
- 402 Goldring, C. E., Narayanan, R., Lagadec, P. & Jeannin, J. F. Transcriptional inhibition of the inducible nitric oxide synthase gene by competitive binding of NF-kappa B/Rel proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 209, 73-79, doi:10.1006/bbrc.1995.1472 (1995).



- 403 Kim, Y. M., Lee, B. S., Yi, K. Y. & Paik, S. G. Upstream NF-kappaB site is required for the maximal expression of mouse inducible nitric oxide synthase gene in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 655-660, doi:10.1006/bbrc.1997.7031 (1997).
- 404 Taylor, B. S. et al. Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 273, 15148-15156, doi:10.1074/jbc.273.24.15148 (1998).
- 405 Chen, C. C. & Wang, J. K. p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol Pharmacol* 55, 481-488 (1999).
- 406 Chan, E. D. & Riches, D. W. IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C441-450, doi:10.1152/ajpcell.2001.280.3.C441 (2001).
- 407 Caivano, M. Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transporters and nitric oxide synthetase in RAW264 macrophages. *FEBS Lett* 429, 249-253, doi:10.1016/s0014-5793(98)00578-x (1998).
- 408 Bogdan, C., Rollingshoff, M. & Diefenbach, A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 173, 17-26, doi:10.1034/j.1600-065x.2000.917307.x (2000).
- 409 Lechner, M., Lirk, P. & Rieder, J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol* 15, 277-289, doi:10.1016/j.semcancer.2005.04.004 (2005).
- 410 Jin, H. K. et al. Rapamycin down-regulates inducible nitric oxide synthase by inducing proteasomal degradation. *Biol Pharm Bull* 32, 988-992, doi:10.1248/bpb.32.988 (2009).
- 411 Tsou, H. K. et al. Integrin-linked kinase is involved in TNF-alpha-induced inducible nitric-oxide synthase expression in myoblasts. *J Cell Biochem* 109, 1244-1253, doi:10.1002/jcb.22508 (2010).
- 412 Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484, doi:10.1016/j.cell.2006.01.016 (2006).
- 413 Wang, J. et al. iNOS Interacts with Autophagy Receptor p62 and is Degraded by Autophagy in Macrophages. *Cells* 8, doi:10.3390/cells8101255 (2019).
- 414 Thomas, D. R., Newton, P., Lau, N. & Newton, H. J. Interfering with Autophagy: The Opposing Strategies Deployed by Legionella pneumophila and Coxiella burnetii Effector Proteins. *Front Cell Infect Microbiol*, doi: 10.3389 (2020).
- 415 Takaki, H. et al. TGF-beta1 suppresses IFN-gamma-induced NO production in macrophages by suppressing STAT1 activation and accelerating iNOS protein degradation. *Genes Cells* 11, 871-882, doi:10.1111/j.1365-2443.2006.00988.x (2006).
- 416 Berg, D. T. et al. Negative regulation of inducible nitric-oxide synthase expression mediated through transforming growth factor-beta-dependent modulation of transcription factor TCF11. *J Biol Chem* 282, 36837-36844, doi:10.1074/jbc.M706909200 (2007).
- 417 Kobayashi, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 88, 1157-1162, doi:10.1189/jlb.0310149 (2010).
- 418 Connelly, L., Palacios-Callender, M., Ameixa, C., Moncada, S. & Hobbs, A. J. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol* 166, 3873-3881, doi:10.4049/jimmunol.166.6.3873 (2001).
- 419 Shibata, T., Nagata, K. & Kobayashi, Y. A suppressive role of nitric oxide in MIP-2 production by macrophages upon coculturing with apoptotic cells. *J Leukoc Biol* 80, 744-752, doi:10.1189/jlb.0106012 (2006).
- 420 Teixeira, M. J., Teixeira, C. R., Andrade, B. B., Barral-Netto, M. & Barral, A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 22, 32-40, doi:10.1016/j.pt.2005.11.010 (2006).
- 421 Sarkar, S. et al. Complex inhibitory effects of nitric oxide on autophagy. *Mol Cell* 43, 19-32, doi:10.1016/j.molcel.2011.04.029 (2011).

- 422 Brown, G. C. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* 1411, 351-369, doi:10.1016/s0005-2728(99)00025-0 (1999).
- 423 Shiva, S. Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. *Nitric Oxide* 22, 64-74, doi:10.1016/j.niox.2009.09.002 (2010).
- 424 Giuffre, A., Borisov, V. B., Arese, M., Sarti, P. & Forte, E. Cytochrome bd oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress. *Biochim Biophys Acta* 1837, 1178-1187, doi:10.1016/j.bbabi.2014.01.016 (2014).
- 425 Jones-Carson, J., Husain, M., Liu, L., Orlicky, D. J. & Vazquez-Torres, A. Cytochrome bd-Dependent Bioenergetics and Antinitrosative Defenses in Salmonella Pathogenesis. *mBio* 7, doi:10.1128/mBio.02052-16 (2016).
- 426 Pacher, P., Beckman, J. S. & Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87, 315-424, doi:10.1152/physrev.00029.2006 (2007).
- 427 Akporiaye, E. T. & Baca, O. G. Superoxide anion production and superoxide dismutase and catalase activities in *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol* 154, 520-523, doi:10.1128/JB.154.1.520-523.1983 (1983).
- 428 Staerck, C. et al. Microbial antioxidant defense enzymes. *Microb Pathog* 110, 56-65, doi:10.1016/j.micpath.2017.06.015 (2017).
- 429 Winchell, C. G., Graham, J. G., Kurten, R. C. & Voth, D. E. *Coxiella burnetii* type IV secretion-dependent recruitment of macrophage autophagosomes. *Infect Immun* 82, 2229-2238, doi:10.1128/IAI.01236-13 (2014).
- 430 Singh, N. et al. Antimycobacterial effect of IFNG (interferon gamma)-induced autophagy depends on HMOX1 (heme oxygenase 1)-mediated increase in intracellular calcium levels and modulation of PPP3/calcineurin-TFEB (transcription factor EB) axis. *Autophagy* 14, 972-991, doi:10.1080/15548627.2018.1436936 (2018).
- 431 Schaffer, K. & Taylor, C. T. The impact of hypoxia on bacterial infection. *FEBS J* 282, 2260-2266, doi:10.1111/febs.13270 (2015).
- 432 Sethumadhavan, S. et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor (HIF) downregulate antigen-presenting MHC class I molecules limiting tumor cell recognition by T cells. *PLoS One* 12, e0187314, doi:10.1371/journal.pone.0187314 (2017).
- 433 Garziera, M., Scarabel, L. & Toffoli, G. Hypoxic Modulation of HLA-G Expression through the Metabolic Sensor HIF-1 in Human Cancer Cells. *J Immunol Res* 2017, 4587520, doi:10.1155/2017/4587520 (2017).
- 434 Murthy, A., Gerber, S. A., Koch, C. J. & Lord, E. M. Intratumoral Hypoxia Reduces IFN-gamma-Mediated Immunity and MHC Class I Induction in a Preclinical Tumor Model. *Immunohorizons* 3, 149-160, doi:10.4049/immunohorizons.1900017 (2019).
- 435 Vito, A., El-Sayes, N. & Mossman, K. Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment. *Cells* 9, doi:10.3390/cells9040992 (2020).
- 436 Matrone, C. et al. HIF-1 $\alpha$  reveals a binding activity to the promoter of iNOS gene after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Neurochem* 90, 368-378, doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02483.x (2004).
- 437 Bryan, N. S. & Grisham, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med* 43, 645-657, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026 (2007).
- 438 Chen, B., Keshive, M. & Deen, W. M. Diffusion and reaction of nitric oxide in suspension cell cultures. *Biophys J* 75, 745-754, doi:10.1016/S0006-3495(98)77564-2 (1998).
- 439 Hielscher, A. & Gerecht, S. Hypoxia and free radicals: role in tumor progression and the use of engineering-based platforms to address these relationships. *Free Radic Biol Med* 79, 281-291, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.015 (2015).
- 440 Smith, K. A., Waypa, G. B. & Schumacker, P. T. Redox signaling during hypoxia in mammalian cells. *Redox Biol* 13, 228-234, doi:10.1016/j.redox.2017.05.020 (2017).
- 441 Mah, A. Y. & Cooper, M. A. Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN-gamma Production. *Crit Rev Immunol* 36, 131-147, doi:10.1615/CritRevImmunol.2016017387 (2016).
- 442 Schoffelen, T. et al. Intact interferon-gamma response against *Coxiella burnetii* by peripheral blood mononuclear cells in chronic Q fever. *Clin Microbiol Infect* 23, 209 e209-209 e215, doi:10.1016/j.cmi.2016.11.008 (2017).

- 443 Alter, G., Malenfant, J. M. & Altfeld, M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294, 15-22, doi:10.1016/j.jim.2004.08.008 (2004).
- 444 Krzewski, K. & Coligan, J. E. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol* 3, 335, doi:10.3389/fimmu.2012.00335 (2012).
- 445 Rak, G. D., Mace, E. M., Banerjee, P. P., Svitkina, T. & Orange, J. S. Natural killer cell lytic granule secretion occurs through a pervasive actin network at the immune synapse. *PLoS Biol* 9, e1001151, doi:10.1371/journal.pbio.1001151 (2011).
- 446 Burkhardt, J. K., Hester, S., Lapham, C. K. & Argon, Y. The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *J Cell Biol* 111, 2327-2340, doi:10.1083/jcb.111.6.2327 (1990).
- 447 Mahmoud, E. A., Svensson, L. O., Olsson, S. E. & Mardh, P. A. Antichlamydial activity of vaginal secretion. *Am J Obstet Gynecol* 172, 1268-1272, doi:10.1016/0002-9378(95)91491-9 (1995).
- 448 Schramm, N., Bagnell, C. R. & Wyrick, P. B. Vesicles containing *Chlamydia trachomatis* serovar L2 remain above pH 6 within HEC-1B cells. *Infect Immun* 64, 1208-1214, doi:10.1128/IAI.64.4.1208-1214.1996 (1996).
- 449 Yasin, B., Pang, M., Wagar, E. A. & Lehrer, R. I. Examination of *Chlamydia trachomatis* infection in environments mimicking normal and abnormal vaginal pH. *Sex Transm Dis* 29, 514-519, doi:10.1097/00007435-200209000-00004 (2002).
- 450 Samanta, D. & Gilk, S. D. Measuring pH of the *Coxiella burnetii* Parasitophorous Vacuole. *Curr Protoc Microbiol* 47, 6C 3 1-6C 3 11, doi:10.1002/cpmc.38 (2017).
- 451 Dotiwala, F. et al. Granzyme B Disrupts Central Metabolism and Protein Synthesis in Bacteria to Promote an Immune Cell Death Program. *Cell* 171, 1125-1137 e1111, doi:10.1016/j.cell.2017.10.004 (2017).
- 452 Dupuis, G., Peter, O., Peacock, M., Burgdorfer, W. & Haller, E. Immunoglobulin responses in acute Q fever. *J Clin Microbiol* 22, 484-487, doi:10.1128/JCM.22.4.484-487.1985 (1985).
- 453 Williams, J. C., Thomas, L. A. & Peacock, M. G. Humoral immune response to Q fever: enzyme-linked immunosorbent assay antibody response to *Coxiella burnetii* in experimentally infected guinea pigs. *J Clin Microbiol* 24, 935-939, doi:10.1128/JCM.24.6.935-939.1986 (1986).
- 454 Genig, V. A. [Attenuated variant "M" of *Rickettsia burneti* as a possible live vaccine against Q-fever]. *Vestn Akad Med Nauk SSSR* 15(2), 46-57 (1960).
- 455 Thompson, H. A., Hoover, T. A., Vodkin, M. H. & Shaw, E. I. Do chromosomal deletions in the lipopolysaccharide biosynthetic regions explain all cases of phase variation in *Coxiella burnetii* strains? An update. *Ann N Y Acad Sci* 990, 664-670, doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07441.x (2003).
- 456 Genig, V. A., Kniazeva, E. N., Tsel'nikov, P. S. & Miroshnichenko, M. M. [Result of the mass immunization of the human population with the M-44 vaccine against Q fever. I. Subcutaneous method of immunization]. *Vopr Virusol* 10, 319-323 (1965).
- 457 Sterkhova, A. N. [Immunization of man with the live M-44 Q-fever vaccine]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 42, 48-52 (1965).
- 458 Zdrovovskii, P. F. & Genig, V. A. [The problem of a live vaccine against Q fever]. *Vopr Virusol* 7, 355-358 (1962).
- 459 Johnson, J. W., Eddy, G. A. & Pedersen, C. E., Jr. Biological properties of the M-44 strain of *Coxiella burnetii*. *J Infect Dis* 133, 334-338, doi:10.1093/infdis/133.3.334 (1976).
- 460 Robinson, D. M. & Hastly, S. E. Production of a potent vaccine from the attenuated M-44 strain of *Coxiella burnetii*. *Appl Microbiol* 27, 777-783 (1974).
- 461 Brezina, R. A change in the virulence of the Henzerling strain of *Coxiella burnetii* during passage in white mice. *Acta Virol* 2, 220-227 (1958).
- 462 Denison, A. M., Massung, R. F. & Thompson, H. A. Analysis of the O-antigen biosynthesis regions of phase II isolates of *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Lett* 267, 102-107, doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00544.x (2007).

- 463 Genig, V. A. A live vaccine 1-M-44 against Q-fever for oral use. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 12, 265-273 (1968).
- 464 Romero-Puertas, M. C. et al. S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* 19, 4120-4130, doi:10.1105/tpc.107.055061 (2007).
- 465 Urbano, R. et al. Host Nitric Oxide Disrupts Microbial Cell-to-Cell Communication to Inhibit Staphylococcal Virulence. *Cell Host Microbe* 23, 594-606 e597, doi:10.1016/j.chom.2018.04.001 (2018).
- 466 Baca, O. G., Martinez, I. L., Aragon, A. S. & Klassen, D. Isolation and partial characterization of lipopolysaccharide from phase II *Coxiella burnetii*. *Can J Microbiol* 26, 819-825 (1980).
- 467 Schramek, S., Brezina, R. & Visacka, E. Different antigenic properties of lipopolysaccharides isolated from *Coxiella burnetii* in phase I and pure phase II. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* 255, 356-360 (1983).
- 468 Hackstadt, T., Peacock, M. G., Hitchcock, P. J. & Cole, R. L. Lipopolysaccharide Variation in *Coxiella burnetii*: Intrastrain Heterogeneity in Structure and Antigenicity. *Infect Immun* 48, 359-365 (1985).
- 469 Hackstadt, T. Steric Hindrance of Antibody Binding to Surface Proteins of *Coxiella burnetii* by Phase I Lipopolysaccharide. *Infect Immun* 56, 802-807 (1988).
- 470 Schramek, S., Brezina, R. & Kazár, J. Influence of mild acid hydrolysis on the antigenic properties of phase I *Coxiella burnetii*. *Acta Virol* 22, 302-308 (1978).
- 471 Wei, Y., Wang, X., Xiong, X. & Wen, B. *Coxiella burnetii* antigen-stimulated dendritic cells mediated protection against *Coxiella burnetii* in BALB/c mice. *J Infect Dis* 203, 283-291, doi:10.1093/infdis/jiq037 (2011).
- 472 Zamboni, D. S. et al. Stimulation of toll-like receptor 2 by *Coxiella burnetii* is required for macrophage production of pro-inflammatory cytokines and resistance to infection. *J Biol Chem* 279, 54405-54415, doi:M410340200 [pii] 10.1074/jbc.M410340200 (2004).
- 473 Jin, Y., Wi, H. J., Choi, M. H., Hong, S. T. & Bae, Y. M. Regulation of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF-beta in mouse dendritic cells through treatment with *Clonorchis sinensis* crude antigen. *Exp Mol Med* 46, e74, doi:10.1038/emm.2013.144 (2014).
- 474 Guironnet, G. et al. Antagonistic effects of IL-4 and TGF-beta1 on Langerhans cell-related antigen expression by human monocytes. *J Leukoc Biol* 71, 845-853 (2002).
- 475 Macey, M. R. et al. IL-4 and TGF-beta 1 counterbalance one another while regulating mast cell homeostasis. *J Immunol* 184, 4688-4695, doi:10.4049/jimmunol.0903477 (2010).
- 476 Miller-Graziano, C. L., Zhu, D. & Kodys, K. Differential induction of human monocyte transforming growth factor beta 1 production and its regulation by interleukin 4. *J Clin Immunol* 14, 61-72, doi:10.1007/BF01541176 (1994).
- 477 Capo, C. et al. Production of interleukin-10 and transforming growth factor beta by peripheral blood mononuclear cells in Q fever endocarditis. *Infect Immun* 64, 4143-4147, doi:10.1128/IAI.64.10.4143-4147.1996 (1996).
- 478 Yoshimura, A., Wakabayashi, Y. & Mori, T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J Biochem* 147, 781-792, doi:10.1093/jb/mvq043 (2010).
- 479 Ulloa, L., Doody, J. & Massague, J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 397, 710-713, doi:10.1038/17826 (1999).
- 480 Eickelberg, O. et al. Molecular mechanisms of TGF-(beta) antagonism by interferon (gamma) and cyclosporine A in lung fibroblasts. *FASEB J* 15, 797-806, doi:10.1096/fj.00-0233com (2001).
- 481 Ghosh, A. K., Yuan, W., Mori, Y., Chen, S. & Varga, J. Antagonistic regulation of type I collagen gene expression by interferon-gamma and transforming growth factor-beta. Integration at the level of p300/CBP transcriptional coactivators. *J Biol Chem* 276, 11041-11048, doi:10.1074/jbc.M004709200 (2001).
- 482 Remy, M. M. et al. Interferon-gamma-Driven iNOS: A Molecular Pathway to Terminal Shock in Arenavirus Hemorrhagic Fever. *Cell Host Microbe* 22, 354-365 e355, doi:10.1016/j.chom.2017.07.008 (2017).

- 483 Chen, J. & Ivashkiv, L. B. IFN-gamma abrogates endotoxin tolerance by facilitating Toll-like receptor-induced chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19438-19443, doi:10.1073/pnas.1007816107 (2010).
- 484 Ghigo, E. et al. Coxiella burnetii survival in THP-1 monocytes involves the impairment of phagosome maturation: IFN-gamma mediates its restoration and bacterial killing. *J Immunol* 169, 4488-4495, doi:10.4049/jimmunol.169.8.4488 (2002).
- 485 Hertzog, P., Forster, S. & Samarajiwa, S. Systems biology of interferon responses. *J Interferon Cytokine Res* 31, 5-11, doi:10.1089/jir.2010.0126 (2011).
- 486 De Kimpe, S. J., Kengatharan, M., Thiemermann, C. & Vane, J. R. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10359-10363, doi:10.1073/pnas.92.22.10359 (1995).
- 487 Battisti, J. M., Hicks, L. D. & Minnick, M. F. A unique Coxiella burnetii lipoprotein involved in metal binding (LimB). *Microbiology (Reading)* 157, 966-976, doi:10.1099/mic.0.046649-0 (2011).
- 488 Vodovotz, Y., Bogdan, C., Paik, J., Xie, Q. W. & Nathan, C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 178, 605-613, doi:10.1084/jem.178.2.605 (1993).
- 489 Gilbert, R. S. & Herschman, H. R. Transforming growth factor beta differentially modulates the inducible nitric oxide synthase gene in distinct cell types. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 380-384, doi:10.1006/bbrc.1993.2054 (1993).
- 490 Wang, B. F. et al. Interferon-gamma-induced insufficient autophagy contributes to p62-dependent apoptosis of epithelial cells in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy* 72, 1384-1397, doi:10.1111/all.13153 (2017).
- 491 Ding, A. et al. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *J Immunol* 145, 940-944 (1990).
- 492 Finder, J. et al. TGF-beta regulates production of NO in pulmonary artery smooth muscle cells by inhibiting expression of NOS. *Am J Physiol* 268, L862-867, doi:10.1152/ajplung.1995.268.5.L862 (1995).
- 493 Cecilio, P. et al. Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. *Front Immunol* 5, 480, doi:10.3389/fimmu.2014.00480 (2014).
- 494 Ganttt, K. R. et al. Activation of TGF-beta by Leishmania chagasi: importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol* 170, 2613-2620, doi:10.4049/jimmunol.170.5.2613 (2003).
- 495 Modolell, M., Corraliza, I. M., Link, F., Soler, G. & Eichmann, K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 25, 1101-1104, doi:10.1002/eji.1830250436 (1995).
- 496 Boutard, V. et al. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J Immunol* 155, 2077-2084 (1995).
- 497 Iñiesta, V. et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular Leishmania parasites. *Parasite Immunol* 24, 113-118, doi:10.1046/j.1365-3024.2002.00444.x (2002).
- 498 Turco, J., Thompson, H. A. & Winkler, H. H. Interferon-gamma inhibits growth of Coxiella burnetii in mouse fibroblasts. *Infect Immun* 45, 781-783, doi:10.1128/IAI.45.3.781-783.1984 (1984).
- 499 Dellacasagrande, J., Capo, C., Raoult, D. & Mege, J. L. IFN-gamma-mediated control of Coxiella burnetii survival in monocytes: the role of cell apoptosis and TNF. *J Immunol* 162, 2259-2265 (1999).
- 500 Dellacasagrande, J., Ghigo, E., Raoult, D., Capo, C. & Mege, J. L. IFN-gamma-induced apoptosis and microbicidal activity in monocytes harboring the intracellular bacterium Coxiella burnetii require membrane TNF and homotypic cell adherence. *J Immunol* 169, 6309-6315, doi:10.4049/jimmunol.169.11.6309 (2002).

- 501 Reiner, N. E. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol Today* 15, 374-381, doi:10.1016/0167-5699(94)90176-7 (1994).
- 502 Minnick, M. F. & Raghavan, R. Genetics of *Coxiella burnetii*: on the path of specialization. *Future Microbiol* 6, 1297-1314, doi:10.2217/fmb.11.116 (2011).
- 503 Inagaki, Y. et al. Interferon-gamma-induced apoptosis and activation of THP-1 macrophages. *Life Sci* 71, 2499-2508, doi:10.1016/s0024-3205(02)02042-8 (2002).
- 504 Sugimoto, K. et al. Frequent mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines. *Blood* 79, 2378-2383 (1992).
- 505 Sukanuma, K. et al. Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leuk Lymphoma* 51, 2112-2119, doi:10.3109/10428194.2010.512966 (2010).
- 506 Eisenreich, W., Rudel, T., Heesemann, J. & Goebel, W. How Viral and Intracellular Bacterial Pathogens Reprogram the Metabolism of Host Cells to Allow Their Intracellular Replication. *Front Cell Infect Microbiol* 9, 42, doi:10.3389/fcimb.2019.00042 (2019).
- 507 Brown, G. C. & Borutaite, V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life* 52, 189-195, doi:10.1080/15216540152845993 (2001).
- 508 Rich, E. A. et al. Mycobacterium tuberculosis (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. *Tuber Lung Dis* 78, 247-255, doi:10.1016/s0962-8479(97)90005-8 (1997).
- 509 Braverman, J. & Stanley, S. A. Nitric Oxide Modulates Macrophage Responses to Mycobacterium tuberculosis Infection through Activation of HIF-1alpha and Repression of NF-kappaB. *J Immunol* 199, 1805-1816, doi:10.4049/jimmunol.1700515 (2017).
- 510 Anthony, L. S., Morrissey, P. J. & Nano, F. E. Growth inhibition of *Francisella tularensis* live vaccine strain by IFN-gamma-activated macrophages is mediated by reactive nitrogen intermediates derived from L-arginine metabolism. *J Immunol* 148, 1829-1834 (1992).
- 511 Roshick, C., Wood, H., Caldwell, H. D. & McClarty, G. Comparison of gamma interferon-mediated antichlamydial defense mechanisms in human and mouse cells. *Infect Immun* 74, 225-238, doi:10.1128/IAI.74.1.225-238.2006 (2006).
- 512 Ren, G. et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 27, 1954-1962, doi:10.1002/stem.118 (2009).
- 513 Sandoz, K. M., Beare, P. A., Cockrell, D. C. & Heinzen, R. A. Complementation of Arginine Auxotrophy for Genetic Transformation of *Coxiella burnetii* by Use of a Defined Axenic Medium. *Appl Environ Microbiol* 82, 3042-3051, doi:10.1128/AEM.00261-16 (2016).
- 514 Ganesan, S. & Roy, C. R. Host cell depletion of tryptophan by IFN-gamma-induced indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibits lysosomal replication of *Coxiella burnetii*. *PLoS Pathog* 15, e1007955, doi:10.1371/journal.ppat.1007955 (2019).
- 515 Adler, H. et al. Differential regulation of inducible nitric oxide synthase production in bovine and caprine macrophages. *J Infect Dis* 173, 971-978, doi:10.1093/infdis/173.4.971 (1996).
- 516 Esquivel-Solis, H. et al. Nitric oxide not apoptosis mediates differential killing of *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages. *PLoS One* 8, e63464, doi:10.1371/journal.pone.0063464 (2013).
- 517 Wilsmann-Theis, D. et al. Generation and functional analysis of human TNF-alpha/iNOS-producing dendritic cells (Tip-DC). *Allergy* 68, 890-898, doi:10.1111/all.12172 (2013).
- 518 Buckland, J. DCs 'Tip' off the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 3, doi:doi.org/10.1038/nri1186 (2003).
- 519 Mirkovitch, J. et al. Single-cell analysis divides bovine monocyte-derived dendritic cells into subsets expressing either high or low levels of inducible nitric oxide synthase. *Vet Immunol Immunopathol* 114, 1-14, doi:10.1016/j.vetimm.2006.06.004 (2006).
- 520 Aldridge, J. R., Jr. et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5306-5311, doi:10.1073/pnas.0900655106 (2009).

- 521 Diefenbach, A. et al. Type 1 interferon (IFN $\alpha$ / $\beta$ ) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* 8, 77-87, doi:10.1016/s1074-7613(00)80460-4 (1998).
- 522 Chong, S. Z. et al. Human CD8(+) T cells drive Th1 responses through the differentiation of TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Eur J Immunol* 41, 1639-1651, doi:10.1002/eji.201041022 (2011).
- 523 Engel, D. et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$ - and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells are rapidly recruited to the bladder in urinary tract infection but are dispensable for bacterial clearance. *Infect Immun* 74, 6100-6107, doi:10.1128/IAI.00881-06 (2006).
- 524 Haberstroh, U. et al. L-arginine suppresses lipopolysaccharide-induced expression of RANTES in glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 9, 203-210 (1998).
- 525 Trifilieff, A. et al. Inducible nitric oxide synthase inhibitors suppress airway inflammation in mice through down-regulation of chemokine expression. *J Immunol* 165, 1526-1533, doi:10.4049/jimmunol.165.3.1526 (2000).
- 526 Arima, K. et al. Effects of lipopolysaccharide and cytokines on production of RANTES by cultured human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 6, 246-251, doi:10.1093/molehr/6.3.246 (2000).
- 527 Tsao, P. S., Wang, B., Buitrago, R., Shyy, J. Y. & Cooke, J. P. Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation* 96, 934-940, doi:10.1161/01.cir.96.3.934 (1997).
- 528 Jacobs, A. T. & Ignarro, L. J. Nuclear factor- $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinases mediate nitric oxide-enhanced transcriptional expression of interferon- $\beta$ . *J Biol Chem* 278, 8018-8027, doi:10.1074/jbc.M211642200 (2003).
- 529 Pennings, J. L. et al. Dysregulation of serum gamma interferon levels in vascular chronic Q Fever patients provides insights into disease pathogenesis. *Clin Vaccine Immunol* 22, 664-671, doi:10.1128/CVI.00078-15 (2015).
- 530 Schall, T. J., Bacon, K., Camp, R. D., Kaspari, J. W. & Goeddel, D. V. Human macrophage inflammatory protein  $\alpha$  (MIP-1  $\alpha$ ) and MIP-1  $\beta$  chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med* 177, 1821-1826, doi:10.1084/jem.177.6.1821 (1993).
- 531 Kunstfeld, R., Lechleitner, S., Wolff, K. & Petzelbauer, P. MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  are most efficient in recruiting T cells into the skin in vivo. *J Invest Dermatol* 111, 1040-1044, doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00410.x (1998).
- 532 Diab, A. et al. Neutralization of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and MIP-1 $\alpha$  attenuates neutrophil recruitment in the central nervous system during experimental bacterial meningitis. *Infect Immun* 67, 2590-2601, doi:10.1128/IAI.67.5.2590-2601.1999 (1999).
- 533 Antonia, A. L. et al. Pathogen Evasion of Chemokine Response Through Suppression of CXCL10. *Front Cell Infect Microbiol* 9, 280, doi:10.3389/fcimb.2019.00280 (2019).
- 534 Fielden, L. F. et al. Proteomic identification of *Coxiella burnetii* effector proteins targeted to the host cell mitochondria during infection. *Mol Cell Proteomics*, doi:10.1074/mcp.RA120.002370 (2020).
- 535 Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597-610, doi:10.1038/nrg2843 (2010).
- 536 Dorhoi, A. et al. MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. *J Clin Invest* 123, 4836-4848, doi:10.1172/JCI67604 (2013).
- 537 Deny, M., Romano, M., Denis, O., Casimir, G. & Chamekh, M. Progressive Control of *Streptococcus agalactiae*-Induced Innate Inflammatory Response Is Associated with Time Course Expression of MicroRNA-223 by Neutrophils. *Infect Immun* 88, doi:10.1128/IAI.00563-20 (2020).
- 538 Millar, J. A. et al. *Coxiella burnetii* and *Leishmania mexicana* residing within similar parasitophorous vacuoles elicit disparate host responses. *Front Microbiol* 6, 794, doi:10.3389/fmicb.2015.00794 (2015).
- 539 VanderVen, B. C., Yates, R. M. & Russell, D. G. Intraphagosomal measurement of the magnitude and duration of the oxidative burst. *Traffic* 10, 372-378, doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00877.x (2009).

- 540 Winterbourn, C. C. & Kettle, A. J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal* 18, 642-660, doi:10.1089/ars.2012.4827 (2013).
- 541 Savina, A. et al. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 126, 205-218, doi:10.1016/j.cell.2006.05.035 (2006).
- 542 Paardekoooper, L. M. et al. Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Produce Millimolar Concentrations of ROS in Phagosomes Per Second. *Front Immunol* 10, 1216, doi:10.3389/fimmu.2019.01216 (2019).
- 543 Redd, T. & Thompson, H. A. Secretion of proteins by *Coxiella burnetii*. *Microbiology (Reading)* 141 ( Pt 2), 363-369, doi:10.1099/13500872-141-2-363 (1995).
- 544 Shen, C., Yan, J., Erkocak, O. F., Zheng, X. F. & Chen, X. D. Nitric oxide inhibits autophagy via suppression of JNK in meniscal cells. *Rheumatology (Oxford)* 53, 1022-1033, doi:10.1093/rheumatology/ket471 (2014).
- 545 Zhang, X. et al. Nitric oxide inhibits autophagy and promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 110, 1054-1063, doi:10.1111/cas.13945 (2019).
- 546 Zhu, L., Zhang, C. & Liu, Q. PTEN S-nitrosylation by NOS1 inhibits autophagy in NPC cells. *Cell Death Dis* 10, 306, doi:10.1038/s41419-019-1542-0 (2019).
- 547 Bradley, W. P. Innate Immune Response to *Coxiella Burnetii*. Dissertation (2015).
- 548 Nairz, M. et al. Interferon-gamma limits the availability of iron for intramacrophage *Salmonella typhimurium*. *Eur J Immunol* 38, 1923-1936, doi:10.1002/eji.200738056 (2008).
- 549 Sanchez, S. E. & Omsland, A. Critical Role for Molecular Iron in *Coxiella burnetii* Replication and Viability. *mSphere* 5, doi:10.1128/mSphere.00458-20 (2020).
- 550 Robey, M. & Cianciotto, N. P. *Legionella pneumophila* feoAB promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infect Immun* 70, 5659-5669, doi:10.1128/iai.70.10.5659-5669.2002 (2002).
- 551 Howe, D. & Mallavia, L. P. *Coxiella burnetii* infection increases transferrin receptors on J774A.1 cells. *Infect Immun* 67, 3236-3241, doi:10.1128/IAI.67.7.3236-3241.1999 (1999).
- 552 Via, L. E. et al. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J Cell Sci* 111 ( Pt 7), 897-905 (1998).
- 553 Jutras, I. et al. Modulation of the phagosome proteome by interferon-gamma. *Mol Cell Proteomics* 7, 697-715, doi:10.1074/mcp.M700267-MCP200 (2008).
- 554 Endley, S., McMurray, D. & Ficht, T. A. Interruption of the *cydB* locus in *Brucella abortus* attenuates intracellular survival and virulence in the mouse model of infection. *J Bacteriol* 183, 2454-2462, doi:10.1128/JB.183.8.2454-2462.2001 (2001).
- 555 Shi, L. et al. Changes in energy metabolism of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lung and under in vitro conditions affecting aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15629-15634, doi:10.1073/pnas.0507850102 (2005).
- 556 Moore, C. M., Nakano, M. M., Wang, T., Ye, R. W. & Helmann, J. D. Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. *J Bacteriol* 186, 4655-4664, doi:10.1128/JB.186.14.4655-4664.2004 (2004).
- 557 Richardson, A. R., Dunman, P. M. & Fang, F. C. The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity. *Mol Microbiol* 61, 927-939, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05290.x (2006).
- 558 Borisov, V. B., Gennis, R. B., Hemp, J. & Verkhovskiy, M. I. The cytochrome bd respiratory oxygen reductases. *Biochim Biophys Acta* 1807, 1398-1413, doi:10.1016/j.bbabi.2011.06.016 (2011).
- 559 Wenger, R. H., Kurtcuoglu, V., Scholz, C. C., Marti, H. H. & Hoogewijs, D. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia (Auckl)* 3, 35-43, doi:10.2147/HP.S92198 (2015).
- 560 Yin, J. H., Yang, D. I., Ku, G. & Hsu, C. Y. iNOS expression inhibits hypoxia-inducible factor-1 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 30-34, doi:10.1006/bbrc.2000.3896 (2000).
- 561 Hong, Y. et al. Effect of hypoxia on nitric oxide production and its synthase gene expression in rat smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 329-332, doi:10.1006/bbrc.2000.2140 (2000).



- 562 Daniliuc, S. et al. Hypoxia inactivates inducible nitric oxide synthase in mouse macrophages by disrupting its interaction with alpha-actinin 4. *J Immunol* 171, 3225-3232, doi:10.4049/jimmunol.171.6.3225 (2003).
- 563 Ferreiro, C. R. et al. Influence of hypoxia on nitric oxide synthase activity and gene expression in children with congenital heart disease: a novel pathophysiological adaptive mechanism. *Circulation* 103, 2272-2276, doi:10.1161/01.cir.103.18.2272 (2001).
- 564 Metzen, E., Zhou, J., Jelkmann, W., Fandrey, J. & Brune, B. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell* 14, 3470-3481, doi:10.1091/mbc.e02-12-0791 (2003).
- 565 Dweik, R. A. Nitric oxide, hypoxia, and superoxide: the good, the bad, and the ugly! *Thorax* 60, 265-267, doi:10.1136/thx.2004.038471 (2005).
- 566 Rhee, K., Gwon, S.-Y. & Lee, S. Hypoxia Enhances Nitric Oxide Synthesis by Upregulation of Inducible Nitric Oxide Synthase in Endothelial Cells. *J Exp Biomed Sci*, 180-187 (2013).
- 567 Umbrello, M., Dyson, A., Feelisch, M. & Singer, M. The key role of nitric oxide in hypoxia: hypoxic vasodilation and energy supply-demand matching. *Antioxid Redox Signal* 19, 1690-1710, doi:10.1089/ars.2012.4979 (2013).
- 568 Lee, M. et al. Expression of human inducible nitric oxide synthase in response to cytokines is regulated by hypoxia-inducible factor-1. *Free Radic Biol Med* 130, 278-287, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.441 (2019).
- 569 Bellavia, L., Kim-Shapiro, D. B. & King, S. B. Detecting and monitoring NO, SNO and nitrite in vivo. *Future Sci OA* 1, doi:10.4155/fso.15.36 (2015).
- 570 McCormick, C. C., Li, W. P. & Calero, M. Oxygen tension limits nitric oxide synthesis by activated macrophages. *Biochem J* 350 Pt 3, 709-716 (2000).
- 571 Strijdom, H., Muller, C. & Lochner, A. Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *J Mol Cell Cardiol* 37, 897-902, doi:10.1016/j.yjmcc.2004.05.018 (2004).
- 572 Baeumle, M. Sensor Dyes. *BioFiles* 2011 6.3 23 (2011).
- 573 La Scola, B. & Raoult, D. Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clin Microbiol Infect* 7, 75-79, doi:10.1046/j.1469-0691.2001.00193.x (2001).
- 574 Jakkala, K. & Ajitkumar, P. Hypoxic Non-replicating Persistent *Mycobacterium tuberculosis* Develops Thickened Outer Layer That Helps in Restricting Rifampicin Entry. *Front Microbiol* 10, 2339, doi:10.3389/fmicb.2019.02339 (2019).
- 575 Gomes, M. S. et al. Survival of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* in acidified vacuoles of murine macrophages. *Infect Immun* 67, 3199-3206, doi:10.1128/IAI.67.7.3199-3206.1999 (1999).
- 576 Veras, P. S. et al. Fusion between large phagocytic vesicles: targeting of yeast and other particulates to phagolysosomes that shelter the bacterium *Coxiella burnetii* or the protozoan *Leishmania amazonensis* in Chinese hamster ovary cells. *J Cell Sci* 107 ( Pt 11), 3065-3076 (1994).
- 577 Veras, P. S. et al. Entry and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes within phagolysosome-like vacuoles that shelter *Coxiella burnetii* in Chinese hamster ovary cells. *Infect Immun* 63, 3502-3506, doi:10.1128/IAI.63.9.3502-3506.1995 (1995).
- 578 Hackstadt, T. & Williams, J. C. Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 3240-3244, doi:10.1073/pnas.78.5.3240 (1981).
- 579 Heinzen, R. A., Scidmore, M. A., Rockey, D. D. & Hackstadt, T. Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 64, 796-809, doi:10.1128/IAI.64.3.796-809.1996 (1996).
- 580 Latomanski, E. A. & Newton, H. J. Interaction between autophagic vesicles and the *Coxiella*-containing vacuole requires CLTC (clathrin heavy chain). *Autophagy* 14, 1710-1725, doi:10.1080/15548627.2018.1483806 (2018).
- 581 Ginsburg, I. et al. The effect of leukocyte hydrolases on bacteria : IV. The role played by artificial enzyme "cocktails" and tissue enzymes in bacteriolysis. *Inflammation* 1, 41-56, doi:10.1007/BF00918058 (1975).

- 582 Bangalore, N., Travis, J., Onunka, V. C., Pohl, J. & Shafer, W. M. Identification of the primary antimicrobial domains in human neutrophil cathepsin G. *J Biol Chem* 265, 13584-13588 (1990).
- 583 Amano, K., Williams, J. C., McCaul, T. F. & Peacock, M. G. Biochemical and immunological properties of *Coxiella burnetii* cell wall and peptidoglycan-protein complex fractions. *J Bacteriol* 160, 982-988, doi:10.1128/JB.160.3.982-988.1984 (1984).
- 584 Samanta, D., Clemente, T. M., Schuler, B. E. & Gilk, S. D. *Coxiella burnetii* Type 4B Secretion System-dependent manipulation of endolysosomal maturation is required for bacterial growth. *PLoS Pathog* 15, e1007855, doi:10.1371/journal.ppat.1007855 (2019).
- 585 Case, E. D. R. & Samuel, J. E. Contrasting Lifestyles Within the Host Cell. *Microbiol Spectr* 4, doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0014-2015 (2016).
- 586 Tassi, I. et al. NK cell-activating receptors require PKC-theta for sustained signaling, transcriptional activation, and IFN-gamma secretion. *Blood* 112, 4109-4116, doi:10.1182/blood-2008-02-139527 (2008).
- 587 Bonnema, J. D. et al. Cytokine-enhanced NK cell-mediated cytotoxicity. Positive modulatory effects of IL-2 and IL-12 on stimulus-dependent granule exocytosis. *J Immunol* 152, 2098-2104 (1994).
- 588 Aguilo, J. I., Garaude, J., Pardo, J., Villalba, M. & Anel, A. Protein kinase C-theta is required for NK cell activation and in vivo control of tumor progression. *J Immunol* 182, 1972-1981, doi:10.4049/jimmunol.0801820 (2009).
- 589 Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. Direct TLR2 signaling is critical for NK cell activation and function in response to vaccinia viral infection. *PLoS Pathog* 6, e1000811, doi:10.1371/journal.ppat.1000811 (2010).
- 590 Athie-Morales, V., O'Connor, G. M. & Gardiner, C. M. Activation of human NK cells by the bacterial pathogen-associated molecular pattern muramyl dipeptide. *J Immunol* 180, 4082-4089, doi:10.4049/jimmunol.180.6.4082 (2008).
- 591 Hackstadt, T. & Caldwell, H. D. Effect of proteolytic cleavage of surface-exposed proteins on infectivity of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 48, 546-551, doi:10.1128/IAI.48.2.546-551.1985 (1985).
- 592 Su, H., Watkins, N. G., Zhang, Y. X. & Caldwell, H. D. *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infect Immun* 58, 1017-1025, doi:10.1128/IAI.58.4.1017-1025.1990 (1990).
- 593 Ting, L. M., Hsia, R. C., Haidaris, C. G. & Bavoil, P. M. Interaction of outer envelope proteins of *Chlamydia psittaci* GPIC with the HeLa cell surface. *Infect Immun* 63, 3600-3608, doi:10.1128/IAI.63.9.3600-3608.1995 (1995).
- 594 Gutierrez-Martin, C. B. et al. Heparin-mediated inhibition of *Chlamydia psittaci* adherence to HeLa cells. *Microb Pathog* 22, 47-57, doi:10.1006/mpat.1996.0090 (1997).
- 595 Thiery, J. et al. Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood* 115, 1582-1593, doi:10.1182/blood-2009-10-246116 (2010).
- 596 Elliott, A., Peng, Y. & Zhang, G. *Coxiella burnetii* interaction with neutrophils and macrophages in vitro and in SCID mice following aerosol infection. *Infect Immun* 81, 4604-4614, doi:10.1128/IAI.00973-13 (2013).
- 597 Beare, P. A. et al. Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J Bacteriol* 188, 2309-2324, doi:10.1128/JB.188.7.2309-2324.2006 (2006).
- 598 Kuley, R. Characterization of *Coxiella burnetii* outbreak strains. Dissertation (2017).
- 599 Randow, F. et al. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med* 181, 1887-1892, doi:10.1084/jem.181.5.1887 (1995).
- 600 Schroder, M. et al. Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization. *J Immunol* 170, 5260-5267, doi:10.4049/jimmunol.170.10.5260 (2003).

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Biphasischer Lebenszyklus von <i>C. burnetii</i> (modifiziert nach Minnick und Raghavan 2012) .....	12
Abbildung 1-2: Zusammenspiel dendritischer Zellen und NK-Zellen im Rahmen der angeborenen Immunität .....	22
Abbildung 1-3: IFN- $\gamma$ -regulierte, zellautonome Immunitätsmechanismen in APCs .....	27
Abbildung 3-1: Etablierung von hypoxischen Zellkulturbedingungen auf Basis einer FLI-Dienstleistung von PD Dr. Michael R. Knittler (HypoxyCell).....	45
Abbildung 4-1: <i>C. burnetii</i> -Strukturen in infizierten Fibroblasten sowie humanen und murinen DCs .....	74
Abbildung 4-2: Charakterisierung der Infektiosität <i>C. burnetii</i> -infizierter DCs.....	75
Abbildung 4-3: Zelluläre Aufnahme von <i>C. burnetii</i> durch DCs.....	76
Abbildung 4-4: Zyto-/Chemokinprofil und Stoffwechselaktivität von <i>C. burnetii</i> -infizierten DCs.....	78
Abbildung 4-5: MHC I-Ausprägung in und auf <i>C. burnetii</i> -infizierten DCs.....	80
Abbildung 4-6: TGF- $\beta$ vermittelte MHC I-Suppression in <i>C. burnetii</i> -infizierten DCs.....	81
Abbildung 4-7: $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrin als aktivierender Mittler der TGF- $\beta$ -abhängigen Immunsuppression .	83
Abbildung 4-8: Interferon-vermittelte MHC I-Induktion <i>C. burnetii</i> -infizierter DCs .....	84
Abbildung 4-9: Auswirkungen der IFN- $\gamma$ -Anwesenheit auf die Antigenpräsentation und $\alpha$ V $\beta$ 8-Integrin-Expression <i>C. burnetii</i> -infizierter DCs.....	86
Abbildung 4-10: Charakterisierung der <i>C. burnetii</i> -Infektion in Anwesenheit von IFN- $\gamma$ .....	88
Abbildung 4-11: Einfluss von IFN- $\gamma$ auf die Reinfektiosität von <i>C. burnetii</i> .....	89
Abbildung 4-12: Einfluss von Phase I- und II-Coxiellen-LPS auf nicht-infizierte und infizierte DCs	91
Abbildung 4-13: Auswirkungen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf die <i>C. burnetii</i> -Infektion in DCs.....	94
Abbildung 4-14: Auswirkungen reaktiver Stickstoffspezies (NO) auf die <i>C. burnetii</i> -Infektion in DCs .....	95
Abbildung 4-15: Effekt von IFN- $\gamma$ und LPS auf die iNOS-Induktion in nicht-infizierten und infizierten DCs.....	97
Abbildung 4-16: Signalvermittlung des iNOS-Effektes in <i>C. burnetii</i> -infizierten DCs.....	98
Abbildung 4-17: Stabilität und Abbau von iNOS während der <i>C. burnetii</i> -Infektion in DCs .....	99
Abbildung 4-18: Antibakterielle Effekte von NO auf <i>C. burnetii</i> .....	101
Abbildung 4-19: TGF- $\beta$ -vermittelte Subversion von iNOS in <i>C. burnetii</i> -infizierten DCs .....	103
Abbildung 4-20: <i>C. burnetii</i> -Infektion in primären DCs.....	104
Abbildung 4-21: iNOS-vermittelte Abwehr in <i>C. burnetii</i> -infizierten primären DCs .....	105
Abbildung 4-22: NO-abhängige antibakterielle Effekte auf <i>C. burnetii</i> in infizierten primären DCs .....	106

Abbildung 4-23: siRNA-vermitteltes iNOS <i>silencing</i> in <i>C. burnetii</i> -infizierten DCs .....	107
Abbildung 4-24: Etablierung eines NOS2 <i>knock out</i> in JAWS II-DCs .....	109
Abbildung 4-25: Auswirkungen des NOS2 <i>knock out</i> auf die IFN- $\gamma$ -regulierte Selbstverteidigung <i>C. burnetii</i> - infizierter DCs.....	110
Abbildung 4-26: Einfluss von IFN- $\gamma$ induziertem GBP1 auf die <i>C. burnetii</i> -Abwehr von DCs .....	112
Abbildung 4-27: Untersuchung des Zyto-/Chemokinprofils der NOS2(KO)-DCs.....	113
Abbildung 4-28: NO-abhängige Reduktion von Autophagosomen in DCs .....	116
Abbildung 4-29: Zellulärer Selbstschutz von DCs gegenüber mitotoxischem NO.....	118
Abbildung 4-30: <i>C. burnetii</i> -spezifische Abwehrmechanismen gegenüber bakteriotoxischem NO .....	119
Abbildung 4-31: Bedeutung der <i>C. burnetii</i> T4SS-Komponente DotA während der Infektion von DCs.....	121
Abbildung 4-32: DotA als limitierender Faktor gegenüber der IFN- $\gamma$ -induzierten Abwehr <i>C. burnetii</i> - infizierter DCs .....	123
Abbildung 4-33: Charakterisierung der <i>C. burnetii</i> -Infektion in WT- und -NOS2(KO)-Makrophagen .....	125
Abbildung 4-34: Einfluss von iNOS auf <i>C. burnetii</i> während der Makrophagen-Infektion.....	126
Abbildung 4-35: Bedeutung der Autophagosomen in der anti- <i>C. burnetii</i> Abwehr infizierter Makrophagen.....	129
Abbildung 4-36: Kultivierung von DCs unter hypoxischen Bedingungen .....	130
Abbildung 4-37: Einfluss hypoxischer Bedingungen auf immunologische Funktionen von DCs...	131
Abbildung 4-38: Die Rolle der Hypoxie während der <i>C. burnetii</i> -Infektion in DCs.....	133
Abbildung 4-39: Auswirkungen norm- und hypoxischer Bedingungen auf die Infektiosität von <i>C. burnetii</i> .....	134
Abbildung 4-40: Ausbildung von SLPs in <i>C. burnetii</i> -infizierten DCs unter Hypoxie.....	136
Abbildung 4-41: Expressionsregulation bakterieller ETC und antioxidativer Enzyme unter Normoxie und Hypoxie.....	137
Abbildung 4-42: <i>C. burnetii</i> -Infektion in NK-Zellen.....	139
Abbildung 4-43: Bakterienreduktion im Verlauf der NK-Zell-Infektion .....	140
Abbildung 4-44: Freisetzung von <i>C. burnetii</i> im Verlauf der NK-Zell-Infektion .....	142
Abbildung 4-45: Funktionale Reifung von NK-Zellen während der <i>C. burnetii</i> -Infektion.....	143
Abbildung 4-46: PKC $\Theta$ Phospho-Aktivierung <i>C. burnetii</i> -infizierter NK-Zellen .....	144
Abbildung 4-47: Ausschluss eindringender Coxiellen mittels Degranulierung.....	146
Abbildung 4-48: Charakterisierung von <i>C. burnetii</i> und <i>C. psittaci</i> nach Freisetzung aus NK-Zellen .....	147
Abbildung 4-49: pH-Sensitivität von <i>C. burnetii</i> und <i>C. psittaci</i> .....	149
Abbildung 4-50: Einfluss von Granzym B auf <i>C. burnetii</i> und <i>C. psittaci</i> .....	150

---

Abbildung 4-51: Einfluss der zellulären Selbstverteidigung von NK-Zellen auf <i>C. burnetii</i> und <i>C. psittaci</i> .....	151
Abbildung 4-52: Replikationsfähigkeit aus NK-Zellen freigesetzter Coxiellen .....	153
Abbildung 4-53: <i>C. burnetii</i> -Infektion in primären NK-Zellen.....	154
Abbildung 4-54: Aktivierung und Reifung <i>C. burnetii</i> -infizierter primärer NK-Zellen .....	155
Abbildung 4-55: Antibakterielle Abwehr infizierter primärer NK-Zellen.....	156
Abbildung 4-56: Replikationsfähigkeit aus primären NK-Zellen freigesetzter Coxiellen .....	157
Abbildung 5-1: Postuliertes Arbeitsmodell zur anti- <i>C. burnetii</i> Abwehr infizierter DCs.....	170
Abbildung 5-2: Postuliertes Arbeitsmodell zur funktionellen Aufgabe der NK-Zellen bei der anti- <i>C. burnetii</i> Abwehr .....	174
Abbildung 5-3: Postuliertes Arbeitsmodell zur funktionalen Wechselwirkung zwischen DCs und NK-Zellen bei der anti- <i>C. burnetii</i> Abwehr .....	175

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Verwendete Bakterienstämme.....	32
Tabelle 2.2	Verwendete Zellen und Zelllinien.....	32
Tabelle 2.3	Verwendete Medien und Medienzusätze .....	32
Tabelle 2.4	Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	33
Tabelle 2.5	Verwendete Primärantikörper .....	35
Tabelle 2.6	Verwendete Sekundärantikörper .....	35
Tabelle 2.7	Verwendete Neutralisierende Antikörper .....	36
Tabelle 2.8	Verwendete Inhibitoren und Induktoren .....	36
Tabelle 2.9	Verwendete Primersequenzen.....	37
Tabelle 2.10	Verwendete siRNA-Sequenzen .....	37
Tabelle 2.11	Verwendete Primersequenzen für gRNA .....	38
Tabelle 2.12	Verwendete Kits .....	38
Tabelle 2.13	Verwendete Glaswaren .....	38
Tabelle 2.14	Verwendete Plastikwaren .....	38
Tabelle 2.15	Verwendetes Verbrauchsmaterial.....	39
Tabelle 2.16	Verwendete Geräte .....	39
Tabelle 2.17	Verwendete wissenschaftliche Software.....	40
Tabelle 3.1	Verwendete Kulturmedien .....	41
Tabelle 3.2	Verwendete Trypsin-EDTA-Lösungen .....	43
Tabelle 3.3	Verwendete Einfriermedien .....	43
Tabelle 3.4	Zusammensetzung des Mykoplasmen-PCR-Ansatzes .....	44
Tabelle 3.5	Temperaturprofil der PCR zur Mykoplasmenkontrolle.....	44
Tabelle 3.6	Zusammensetzung eines 1% Agarose-Gels.....	44
Tabelle 3.7	Für hypoxische Arbeiten verwendete Puffer .....	46
Tabelle 3.8	Ansatz für die RT-PCR zur Titerbestimmung.....	48
Tabelle 3.9	Temperaturprofil der RT-PCR zur Titerbestimmung.....	48
Tabelle 3.10	Verwendete MOI zur Infektion der verschiedenen Zelllinien und Primärzellen .....	50
Tabelle 3.11	Verwendete Puffer für die Immunfluoreszenz .....	53
Tabelle 3.12	Verwendete Puffer und Lösungen für die Transmissionselektronenmikroskopie.....	54
Tabelle 3.13	Verwendete Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie.....	55
Tabelle 3.14	Verwendete Puffer für die Herstellung von Zelllysaten.....	61
Tabelle 3.15	Zusammensetzung der verwendeten Acrylamid-Gele.....	61
Tabelle 3.16	Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die SDS-PAGE .....	62
Tabelle 3.17	Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen für die Western-Blot-Analyse.....	63
Tabelle 3.18	Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen für die Massenspektrometrie.....	65
Tabelle 3.19	Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen für den Griess-Assay ....	66
Tabelle 3.20	Ansatz für die Reverse Transkription-Reaktion.....	68
Tabelle 3.21	Temperaturprofil für die Reverse Transkription-Reaktion.....	68
Tabelle 3.22	Ansatz für die semiquantitative PCR.....	69

Tabelle 3.23 Temperaturprofil für die semiquantitative PCR .....	<b>69</b>
Tabelle 3.24 Ansatz für die RT-PCR .....	<b>70</b>
Tabelle 3.25 Temperaturprofil der RT-PCR.....	<b>70</b>
Tabelle 3.26 Verwendete Lösungen für die siRNA-Transfektion .....	<b>71</b>
Tabelle 4-1: Identifizierte MHC I -Peptidantigene aus <i>C. burnetii</i> .....	<b>87</b>

## Publikationen und Kongressbeiträge

### Publikationen

» **Flow cytometry as a new complementary tool to study *Coxiella burnetii* in cell cultures** «

Rebbig A, Matthiesen S, Lührmann A, Knittler MR; Journal of Microbiological Methods, 08/2018

» **NK cell-mediated processing of chlamydia drives potent anti-bacterial Th1 immunity** «

Radomski N, Franzke K, Matthiesen S, Karger A, Knittler MR, Scientific Reports, 03/2019

» **Chlamydia-infected dendritic cells communicate with NK cells via exosomes to activate anti-bacterial immunity** «

Radomski N, Karger A, Franzke K, Liebler-Tenorio E, Jahnke R, Matthiesen S, Knittler MR; Infection and Immunity, 12/2019

» **Epidemiologie und Kontrolle von Q-Fieber bei kleinen Wiederkäuern in Deutschland - Epidemiology and Control of Q fever in Small Ruminants in Germany** «

Bauer B, Runge M, Campe A, Henning K, Mertens-Scholz K, Boden K, Sobotta K, Frangoulidis D, Knittler MR, Matthiesen S, Berens C, Lührmann A, Fischer SF, Ulbert S, Makert GR, Ganter M; Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 04/2020

» ***Coxiella burnetii* escapes cellular self-defense of infected NK cells** «

Matthiesen S, Zaeck L, Franzke K, Jahnke R, Fricke C, Mauermeir M, Finke S, Lührmann A, Knittler MR; Infection and Immunity, 10/2020

» **Humoral immune response to Q fever vaccination of three sheep flocks naturally pre-infected with *Coxiella burnetii*** «

Bauer B, Knittler MR, Prüfer TL, Wolf A, Matthiesen S, Runge M, Ganter M; Vaccine, 03/21

» **A Straightforward Hypoxic Cell Culture Method Suitable for Standard Incubators** «

Matthiesen S, Jahnke, R, Knittler MR; Methods Protoc, 04/21



## Kongressbeiträge

» **How Interferon- $\gamma$  affects *Coxiella burnetii* infection in dendritic cells** «

Poster, 7. Nachwuchswissenschaftler Symposium, Greifswald/Insel Riems, 09/2018

» **Flow cytometry as a new complementary tool to study *Coxiella burnetii* in cell cultures** «

Poster, National Symposium on Zoonoses Research 2018, Berlin, 10/2018

» **Molecular and Cell Biological Characterization of the Mutual Interplay between *Coxiella burnetii*, APCs and NK cells** «

Vortrag, 4. Q-GAPS Meeting, Ruthe/Hannover, 04/2019

» ***Coxiella burnetii* escapes cellular self-defense of infected NK cells** «

Vortrag, 8. Nachwuchswissenschaftler Symposium, Jena, 09/2019

» ***Coxiella burnetii* escapes cellular self-defense of infected NK cells** «

Vortrag, 5. Q-GAPS Meeting, Leipzig, 10/2019

» ***Coxiella burnetii* escapes cellular self-defense of infected NK cells** «

Vortrag, National Symposium on Zoonoses Research 2019, Berlin, 10/2019

» **Cellular self-defense of infected NK cells against gram-negative bacteria** «

Poster/Poster-Slam, National Symposium on Zoonoses Research 2020, Berlin, 10/2020