

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe eines *in vitro*-Modells ist in Kooperation mit der rheumatologischen Abteilung der Medizinischen Hochschule Hannover die mögliche Beteiligung von Makrophagen an der Pathogenese der Chlamydien-induzierten Arthritis beim Menschen untersucht worden.

Aus dem Blut von gesunden Spendern wurden humane periphere Blutmonozyten (PBMo) gewonnen, kultiviert und mit einem arthritogenen *Chlamydia trachomatis*-Serotyp (C. tr. K) in unterschiedlich hohen Dosen infiziert. Zum Einsatz kam eine MOI (multiplicity of infection) von 0,1, 0,5 und 1. Gegenstand der Untersuchung war die chlamydiale Replikation und die Persistenz der chlamydialen Entwicklungsstadien, ihrer Wandbestandteile LPS (Lipopolysaccharid) und MOMP (major outer membrane protein) sowie ihrer rRNA. Nach der Zellernte (2 Stunden, 2, 5, 7, 10 und 14 Tage p.i.) erfolgte mit immunologischen (Immunfluoreszenz und ELISA), molekularbiologischen (*in vitro* Hybridisation), licht-, transmissions- und immunelektronenmikroskopischen (Immunogold-Methoden im "post-embedding" Verfahren) Verfahren der Nachweis der Chlamydien bzw. ihrer Bestandteile. Die chlamydiale Persistenz in den Zellen der PBMo-Kulturen wurde mit dem Replikationszyklus desselben C. tr.-Serotyps in einer permissiven epithelialen Zelllinie aus einem humanen Laryngokarzinom (HEp-2 Zellen) 24, 36 und 48 Stunden p.i. mit den gleichen Untersuchungsmethoden verglichen.

Obwohl in den PBMo-Kulturen keine Chlamydienreplikation stattfindet, persistieren chlamydiale Strukturelemente. Die chlamydialen Membranwandbestandteile MOMP und LPS sowie die rRNA ist in den mit hohen Dosen infizierten Kulturen über die gesamte Kulturzeit von 14 Tagen p.i. nachweisbar. Transmissionselektronenmikroskopisch sind bis zum 2. Tag p.i. intermediäre Formen nachzuweisen. Außerdem kommen in den Zellen der PBMo-Kul-

turen zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. verschiedene von der typischen Morphologie strukturell abweichende chlamydiale Formen vor. Diese Formen weisen immunelektronenmikroskopisch in den gegen die chlamydialen Membranwandbestandteile LPS und MOMP gerichteten Nachweisverfahren eine positive Reaktion auf. Das LPS-Antigen ist im stärkeren Ausmaß und an mehreren intrazellulären Strukturen nachweisbar als das MOMP-Antigen. Chlamydiale Entwicklungsstadien, Membranwandbestandteile und rRNA sind über die gesamte Kulturdauer nur in den Zellen nachweisbar, die mit einer hohen Dosis infiziert wurden.

Die Befunde stehen mit der Annahme im Einklang, daß Makrophagen an der Erregerausbreitung von der urogenitalen Eintrittspforte in das Gelenk und damit an der Pathogenese der Chlamydien-induzierten Arthritis beim Menschen beteiligt sind.

Außerdem wurden vier neonatale Meerschweinchen untersucht, die spontan an einer **chlamydialen Einschlußkörperkonjunktivitis** erkrankten. Dabei gelang es erstmalig, lichtmikroskopisch das chlamydiale LPS-Antigen mit Hilfe der indirekten Immunperoxidase-Technik und chlamydiale Entwicklungsstadien transmissionselektronenmikroskopisch in der infizierten Konjunktiva darzustellen. Die histologischen Untersuchungen zeigen, daß die, besonders an Semidünnschnitten sichtbaren konjunktivalen Veränderungen eindeutig auf die Chlamydienreplikation in Epithelzellen der Konjunktiva zurückzuführen sind.

## 6. SUMMARY

Nils Ott

Light- and electronmicroscopic investigations on cellcultures and guinea pigs with conjunctivitis after chlamydial-infection

This paper report about an essential aspect of the pathogenesis of chlamydia-induced arthritis in man, using an in vitro-model. The study was conducted in cooperation with the Division of Rheumatology, Medical School, Hannover, FRG.

Human peripheral blood monocytes (PBMo) were extracted from the blood of healthy donors, cultivated and infected with different dosages of an arthritogenous Chlamydia trachomatis-serotype (C. tr. K). A MOI (multiplicity of infection) of 0.1, 0.5 and 1 were used. Having harvested the cells (2 hours, 2, 5, 7, 10 and 14 days post infectionem), the presence of chlamydia was detected using immunological (immunofluorescence and ELISA), molecularbiological (in vitro hybridization), light-, transmission- and immuneelectron microscopical (immunogold-method in the "post-embedding" technique) techniques. The replication of the chlamydia and the persistence of the components of the chlamydial membrane wall LPS (lipopolysaccharide) and MOMP (major outer membrane pro-tein), as well as chlamydial rRNA, were studied. The chlamydial persistence in the cells from the PBMo cultures were compared with the replication cycle of the same C. tr.-serotype in a permissive epithelial cell line from a human laryngocarcinoma (HEp-2 cells). The HEp-2 cells were examined with the same methods 24, 36 and 48 hours p.i..

Results shear that in the PBMo cultures no chlamydial replication took place but chlamydial structural elements persist. The components of the chlamydial membrane wall, LPS and MOMP, as well as the rRNA, could detected throughout the entire culture period of 14 days p.i. in cultures infected with high doses. Using a transmission electron microscope, intermediate forms could be detected until the 2nd day p.i.. In addition,

at different times p.i., various forms of chlamydia differing from the typical morphological structure appeared in the cells of the PBMo cultures. However, by using immunoelectron microscopically methods, these forms could be identified as chlamydia specific membrane wall components. Much more LPS antigene was demonstrable in intercellular structures compared to the MOMP antigene. The detectability of chlamydial structural elements in the cells of the PBMo cultures depended on the infection dose and the culture time. During the whole period of culturing, chlamydial forms of the development cycle, components of membrane walls and rRNA were only apparent in cells infected with high doses. These findings agree to the assumption that macrophages are involved in the spread of chlamydia from the urogenital openings to the joints and thus are involved in the pathogenesis of chlamydia-induced arthritis in man.

Additionally, this Report describes the investigation about four newborn guinea pigs, which spontaneously contracted conjunctivitis. According to the clinical picture and the microbiologically confirmed *Chlamydia psittaci* presence in the conjunctival smear, "guinea pig inclusion conjunctivitis" (GPIC) was diagnosed. The goal of this study was to demonstrate whether using light- and transmission electron microscopical procedures chlamydia or chlamydial antigenes could be demonstrated in histological slide preparations of the conjunctiva of these guinea pigs. For the first time it was possible to show chlamydial LPS antigene in the infected conjunctiva with a light microscope using the indirect immunoperoxidase technique. Additionally, the bacteria causing GPIC were demonstrated in the conjunctival using a transmission electron microscope. The histological studies show that the conjunctival changes are the result of chlamydial replication in the epithelial cells of the conjunctiva.