

Charakterisierung des *C. pneumoniae* Adhäsins und Invasins Pmp21

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
(Fachbereich Biologie)

vorgelegt von
Eleni Schmidt
geb. Georgoudis
aus Düsseldorf

Düsseldorf 2009

Aus dem Institut für
Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Johannes H. Hegemann

Koreferent: Prof. Dr. Klaus Pfeffer

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 03. 2009

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
ZUSAMMENFASSUNG	10
SUMMARY	12
1 EINLEITUNG.....	13
1.1 Taxonomische Einteilung	13
1.2 Medizinische Bedeutung von Chlamydien	14
1.2.1 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	14
1.2.2 <i>Chlamydia trachomatis</i>	15
1.3 Bakterielle Invasionsmechanismen.....	15
1.4 Biologie der Chlamydien	17
1.4.1 Adhäsion und Internalisierung von Chlamydien.....	18
1.4.2 Differenzierung der Elementarkörperchen zu Retikularkörperchen	21
1.4.3 Replikation und Redifferenzierung der RBs zu EBs	22
1.4.4 Freisetzung der Chlamydien	22
1.5 Der chlamydiale Außenmembrankomplex (cOMC).....	23
1.5.1 Major outer membrane protein (Momp)	23
1.5.2 Outer membrane complex protein B (OmcB).....	24
1.5.3 Die polymorphen Membranproteine (Pmps).....	25
1.6 Mögliche Systeme zur Identifizierung und Analyse von bakteriellen Adhäsionsproteinen.....	33
1.6.1 Bekannte Präsentationssysteme	34
1.6.2 Das Hefe-Oberflächenexpressionssystem	35
1.7 Ziel dieser Arbeit.....	37
2 MATERIAL.....	38
2.1 Gebrauchsartikel	38
2.2 Geräte und Maschinen	38
2.3 Chemikalien	39
2.4 Enzyme.....	41
2.4.1 Nukleasen.....	41
2.4.2 Restriktionsendonukleasen.....	41
2.4.3 Polymerasen.....	41
2.4.4 Andere Enzyme.....	41

2.5	Antikörper	42
2.6	Kits	42
2.7	DNA Längenstandard.....	43
2.8	Proteingrößenstandard.....	43
2.9	Oligonukleotide.....	43
2.9.1	Oligonukleotide zur Amplifikation und Verifikation	43
2.9.2	Sequenzierungsoligonukleotide.....	48
2.10	Plasmide	49
2.11	Zellen und Zelllinien	51
2.11.1	Prokaryotische Zellen / Isolate.....	51
2.11.2	Eukaryotische Zellen / Isolate	52
2.11.3	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i> :.....	52
2.12	Medien und Anzucht	52
2.12.1	Zell- und Chlamydienkulturmedium	52
2.12.2	Mediumzusätze und Waschlösung	53
2.12.3	Medien für <i>Escherichia coli</i>	53
2.12.4	Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
3	METHODEN.....	56
3.1	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
3.1.1	Induktion von Oberflächen-präsentierten Proteinen in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	56
3.1.2	Indirekte Immunfluoreszenz	57
3.1.3	Manipulation von Hefe-Zellen.....	58
3.1.4	Integration von DNA-Fragmenten in einen Vektor über homologe <i>in vivo</i> Rekombination.....	58
3.2	Kultivierung von eukaryotischen Zellen in der Zellkultur	58
3.2.1	Herstellung des Zellkulturmediums für HEP-2 Zellen.....	58
3.2.2	Herstellung aller Stammlösungen für die Zellkultur	59
3.2.3	Auftauen und Aussähen von HEP-2 Zellen.....	59
3.2.4	Trypsin-Behandlung und Ernten von HEP-2 Zellen	60
3.2.5	Passagieren von HEP-2 Zellen.....	60
3.2.6	Passage von HEP-2 Zellen in kleine Zellkulturflaschen (25 cm ²)	60
3.2.7	Einfrieren von eukaryotischen Zellen.....	61
3.2.8	Bestimmung der Zellzahl	61
3.3	Chlamydienkultur.....	61
3.3.1	Herstellung des Chlamydienkulturmediums.....	61
3.3.2	Herstellung der Lösungen für die Chlamydienkultur	61
3.3.3	Herstellung des Einfriermediums für Chlamydien	61
3.3.4	Auftauen von Chlamydien zur Kultivierung	62

3.3.5	<i>Passage von Chlamydien in kleine Zellkulturflaschen (25 cm²)</i>	62
3.3.6	<i>Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien</i>	63
3.3.7	<i>Reinigung von Chlamydien durch Dichtegradientenzentrifugation</i>	63
3.3.8	<i>Titration von Chlamydien suspensionen</i>	63
3.3.9	<i>Stationäre Infektion von Zellen durch Chlamydien</i>	64
3.3.10	<i>Test von Zellkultur- und Chlamydienkultur auf Kontamination durch Mycoplasma sp.</i>	64
3.3.11	<i>Immunologischer Nachweis von Chlamydien mittels Fluoreszenzmikroskopie</i>	65
3.4	Molekularbiologische und biochemische Methoden	67
3.4.1	<i>Gewinnung von chlamydialer DNA für PCR-Reaktionen</i>	67
3.4.2	<i>DNA-Konzentrationsbestimmung</i>	67
3.4.3	<i>Restriktionsenzymanalyse</i>	67
3.4.4	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</i>	67
3.4.5	<i>PCR auf Hefezellen</i>	68
3.4.6	<i>Gelelektrophorese</i>	69
3.4.7	<i>Isolierung und Reinigung von DNA</i>	69
3.4.8	<i>Ligation</i>	69
3.5	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>-Zellen	70
3.5.1	<i>Präparation von Plasmid-DNA</i>	70
3.5.2	<i>Transformation von <i>E. coli</i></i>	70
3.6	Biochemische Methoden	71
3.6.1	<i>Reinigung von cOMCs aus <i>C. pneumoniae</i></i>	71
3.6.2	<i>Induktion der Genexpression in <i>E. coli</i></i>	71
3.6.3	<i>Affinitätschromatografische Aufreinigung von Proteinen</i>	72
3.7	Westernblotanalyse	73
3.7.1	<i>Ansetzen der Induktionskultur</i>	73
3.7.2	<i>Aufarbeitung von Proteinproben für SDS-Polyacrylamidgele</i>	73
3.7.3	<i>Deglykosylierung von Proteinproben durch das Enzym α-Mannosidase</i>	74
3.7.4	<i>Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	74
3.7.5	<i>Färbung eines Proteingels mittels Coomassie-Blau</i>	75
3.7.6	<i>Westernblot-Analyse</i>	76
3.8	Adhäsion	77
3.8.1	<i>Adhäsionstest mit proteinbeschichteten Latexkügelchen</i>	77
3.8.2	<i>Beschichten von Latexkügelchen mit Proteinen</i>	78
3.8.3	<i>Bestimmung der Beschichtungsqualität</i>	78
3.8.4	<i>Adhäsionstest von proteinbeschichteten Latexkügelchen an eukaryotische Zellen</i>	78
3.9	Adhäsionstest mit Hilfe des Hefe- Oberflächenexpressionssystem	79
3.9.1	<i>Auswertung des Adhäsionsassays</i>	79
3.10	Indirekte Immunfluoreszenz (IF)	80
3.10.1	<i>Fixierung und Präparation der Hefezellen</i>	80

3.10.2	<i>Fluoreszenz Markierung</i>	80
3.11	Biotinylierung von Proteinen.....	80
3.12	Internalisierungstest.....	81
3.13	Neutralisation der chlamydialen Infektion mit rekombinantem Pmp21His ₆ -Protein.....	81
3.14	Verifikation der Adhäsion von Chlamydien an eukaryotischen Zellen.....	82
3.14.1	<i>Markierung von Gradienten-gereinigten chlamydialen EBs mit CFSE</i>	82
3.14.2	<i>Bestimmung der Adhäsion chlamydialer Partikel an eukaryotische Zellen mittels Mikroskopie</i> 82	
3.14.3	<i>Bestimmung der Adhäsion chlamydialer Partikel an eukaryotische Zellen mittels FACS</i>	83
3.15	Generierung polyklonaler Pmp216His-Antikörper.....	83
3.15.1	<i>Aufreinigung der polyklonalen Pmp21-D_{6His}-Antikörper</i>	84
3.15.2	<i>Aktivierung der Cnbr-Sepharose 4B Säule</i>	84
3.15.3	<i>Neutralisation der chlamydialen Infektion durch Zugabe von polyklonalen β-lac-Pmp21-D6His-Antikörpern</i>	85
4	ERGEBNISSE	86
4.1	Identifikation der adhäsiven Eigenschaften von Pmp21 an Humanzellen	86
4.1.1	<i>Aga2p-Pmp21-Domänen exprimierende Hefezellen binden an Humanzellen</i>	88
4.1.2	<i>Rekombinante Pmp21-Domänen adhärieren an Humanzellen</i>	89
4.2	Identifizierung der Adhäsion vermittelnden Sequenzen von Pmp21	93
4.2.1	<i>Identifizierung einer minimalen Adhäsionsdomäne von Pmp21</i>	94
4.2.2	<i>Die Adhäsion von Pmp21-D an Humanzellen wird über die repetitiven FxxN Motive vermittelt.</i>	96
4.2.3	<i>Beide Motive GGA (I, L, V) und FxxN sind für die Adhäsion essentiell</i>	99
4.2.4	<i>Ein synthetisches Pmp21 Peptid inhibiert die chlamydiale Infektion</i>	101
4.2.5	<i>Aga2p-Pmp20 exprimierende Hefezellen adhärieren signifikant an Humanzellen</i>	104
4.3	Pmp21 ist auf der chlamydialen Oberfläche lokalisiert.....	105
4.4	Die funktionale Rolle von Pmp21 im Infektionsgeschehen	110
4.4.1	<i>Neutralisation der chlamydialen Infektion mit Pmp21-Antikörpern</i>	111
4.4.2	<i>Neutralisierung der chlamydialen Infektion durch rekombinantes Pmp21</i>	112
4.4.3	<i>Rekombinantes Pmp21 inhibiert die Adhäsion der Chlamydien</i>	116
4.5	Rekombinantes Pmp21 vermittelt die Internalisierung proteinbeschichteter Latexkugeln.....	118
4.5.1	<i>Die repetitiven Motive FxxN und GGA (I,L,V) spielen eine Rolle bei der Internalisierung proteinbeschichteter Latexkügelchen</i>	122
4.5.2	<i>Ein intaktes Aktin-Zytoskelett ist für die Internalisierung der Protein-beschichteten Latexkügelchen notwendig</i>	123

5	DISKUSSION	127
5.1	Das <i>C. pneumoniae</i> Pmp21 Protein adhärert an Humanzellen.....	127
5.1.1	<i>Identifikation der adhäsiven Domänen in Pmp21</i>	<i>127</i>
5.1.2	<i>Die repetitiven Motive vermitteln die Adhäsion des Proteins an die Humanzelle.....</i>	<i>129</i>
5.2	Lokalisation des Pmp21 Proteins auf der chlamydialen Oberfläche	132
5.3	Pmp21 vermittelt die chlamydiale Infektion als Adhäsion und Invasin	135
5.3.1	<i>Pmp21 ist das erste chlamydiale Adhäsion das auch die Internalisierung vermitteln kann</i>	<i>136</i>
6	LITERATURVERZEICHNIS	141
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	153
	DANKSAGUNG	155
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	156

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AD	Adhäsionsdomäne
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum Albumin
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-Phosphat
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CHO	chinese hamster ovarian
cOMC	chlamydia outer membrane complex
deion.	deionisiert
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	Elementarkörper
ELISA	Enzyme linked immunosorbend assay
et al	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	Fötale Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykan
GK	Gewebekulturöhrchen

g	Gramm
h	Stunde
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horse redish peroxidase)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IFU	Inclusion forming units (Einschluss bildende Einheiten)
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LGV	lymphogranuloma vereum
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
MOI	multiplicity of infektion
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
OD	optische Dichte
PBS	physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RB	Retikularkörper
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TRL2	toll like receptor 2
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute

ZUSAMMENFASSUNG

Chlamydien sind Gram-negative, obligat intrazelluläre Bakterien, die sich in einem einzigartigen, biphasischen Lebenszyklus vermehren. Unter den Chlamydien gibt es sowohl Tier-pathogene Arten, wie *C. psittaci* als Verursacher der Psittakose bei Vögeln (und auch beim Menschen), als auch Human-pathogene Arten, u. a. *C. pneumoniae* und *C. trachomatis*. Infektionen mit *C. pneumoniae* führen zu respiratorischen Erkrankungen wie Pneumonien und Bronchitis. Darüber hinaus werden auch chronische Erkrankungen, wie Atherosklerose, Asthma und Alzheimer-Demenz mit diesem Pathogen in Verbindung gebracht. Der kausale Zusammenhang zwischen diesen Erkrankungen und der *C. pneumoniae* Infektion ist jedoch noch ungeklärt. *C. trachomatis* ist ein weltweit verbreiteter Erreger von sexuell übertragbaren Erkrankungen. Neben Infektionen des Urogenital-Trakts, die zur Infertilität führen können, gilt *C. trachomatis* auch als Hauptverursacher von vermeidbarer Blindheit, dem Trachom. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung von chlamydialen Proteinen, die im initialen Prozess der Infektion als Adhäsion oder/und Invasin eine Rolle spielen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Adhäsion des Oberflächen-lokalisierten *C. pneumoniae* Polymorphen Membranproteins (Pmp) 21 mit Hilfe des Hefe-Oberflächenexpressionssystems an humane Zellen untersucht. Pmp21 ist das zweitlängste Protein der Pmp-Familie, die insgesamt 21 Polymorphe Membranproteine enthält. Aufgrund von bioinformatischen Analysen stellen die Pmps putative Autotransporter dar, die aus einer Signalsequenz, einer Passagierdomäne (N-Terminus) und dem C-terminalen β -barrel bestehen. Mit Hilfe des Hefe-Oberflächenexpressionssystems konnte für die gesamte Passagierdomäne von Pmp21 eine signifikante Adhäsion an Humanzellen gezeigt werden. Diese Ergebnisse konnten mit rekombinant hergestellten, affinitätschromatographisch aufgereinigten Proteinen bestätigt werden.

Die folgenden Domänen- und Mutationsanalysen zeigten, dass die für die Pmps charakteristischen Motive GGAI (I, L, V) und FxxN für den chlamydialen Adhäsionsprozess essentiell sind.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass das Pmp21 Protein im Infektionsprozess von *C. pneumoniae* die Adhäsion der Chlamydien an die Humanzelle vermittelt. Die Inhibierung der Pmp21-Funktion durch die Vorbehandlung der chlamydialen Elementarkörperchen mit einem Pmp21-spezifischen Antikörper oder durch die Vorinkubation der Humanzellen mit dem rekombinanten Pmp21 Protein reduzierte signifikant die Infektivität der Chlamydien. Weitere Analysen zeigten, dass die Vorinkubation der Humanzellen mit rekombinantem

Pmp21 Protein die Adhäsion der Chlamydien an die Humanzelle inhibiert, wodurch die reduzierte Infektionsrate resultiert.

Im letzten Abschnitt der Arbeit wurde die Funktion von Pmp21 bei der Internalisierung der Bakterien in die Wirtszelle untersucht. Mit Pmp21-beschichtete Latexkugeln wurden signifikant von der Humanzelle aufgenommen. Dieses Ergebnis suggeriert, dass Pmp21 im Internalisierungsprozess eine wichtige Rolle spielt. In Folgeexperimenten konnte eine Rolle für die repetitiven Motive im Internalisierungsprozess identifiziert werden.

Die vorliegenden Daten belegen, dass das Pmp21 Protein als chlamydiales Adhäsins für die Bindung der Bakterien an die eukaryotische Wirtszelle und ihrer Internalisierung wichtig ist und somit einen chlamydialen Virulenzfaktor darstellt.

SUMMARY

Chlamydiaceae are obligate intracellular Gram-negative bacteria, exhibiting a unique biphasic developmental cycle. They cause a variety of diseases ranging from asymptomatic to serious diseases in humans and animals. For example *C. psittaci* is responsible for psittacosis in birds or cats. *C. trachomatis* is worldwide the major cause of preventable blindness and sexually transmitted disease. *C. pneumoniae* is responsible for acute and chronic respiratory diseases and is widely considered to be a cause of atherosclerosis, asthma and Alzheimer's disease. However the causal correlation between these diseases and the *C. pneumoniae* infection is still open. This work deals with the identification of chlamydial proteins that play a role as adhesin and / or invasin in the initial process of infection.

The adhesion properties of the surface localized polymorphic membrane protein (Pmp) 21 to human cells were examined using the yeast display system. Pmp21 is the second longest member of the Pmp family, consisting of 21 polymorphic membrane proteins. Bioinformatically, the Pmps were predicted as autotransporters, containing a signal sequence, a passenger domain (N-terminus) and the C-terminal β -barrel. By using the yeast display system the whole passenger domain of Pmp21 showed significant adhesion to human cells. We could confirm these results with recombinant, affinity chromatographic purified protein.

Furthermore domain- and mutational analyses indentified the characteristic, repetitive motifs GGA (I, L, V) and FxxN to be essential for the adhesion process.

Next it was demonstrated that Pmp mediates the adhesion itself of the chlamydiae to the eukaryotic cell in the infection process. Although functional inhibition of the Pmp21 protein by preincubation of elementary bodies with a Pmp21-specific antibody or the preincubation of human cells with the recombinant Pmp21 protein led to significant decrease in infectivity. Further analyses showed, that the preincubation of human cells with recombinant Pmp21 protein inhibits the adhesion of chlamydiae to human cells, resulting in a decreased infection rate.

Moreover the function of Pmp21 in the internalization of bacteria into the host cell was examined. Latex beads coated with recombinant Pmp21 were significant uptaken by human cells. This suggests that Pmp21 plays a crucial role in the internalization process. Furthermore we identified the role of the repetitive motifs within the internalization process.

These results demonstrate that Pmp21 is a chlamydial adhesin, important for binding of the bacteria to the eukaryotic host cell and crucial for their internalization. This assumes that Pmp21 depicts a chlamydial virulence factor.

1 EINLEITUNG

1.1 Taxonomische Einteilung

Die obligat intrazellulären Chlamydien zählen zu den Gram-negativen Bakterien. Durch das Fehlen der Peptidoglykanschicht sowie den Besitz eines einzigartigen, biphasischen Lebenszyklus erfolgte ihre Einteilung in eine eigene Ordnung, den *Chlamydiales*. Diese Ordnung besteht aus nur einer Familie, den *Chlamydiaceae*. Deren bis dato einzige Gattung *Chlamydia* wurde 1999 aufgrund von weitergehenden rRNA-Analysen um eine Gattung erweitert, den *Chlamydophila* (Everett, Bush et al. 1999). Zu den *Chlamydia* zählen 3 Arten: *C. trachomatis*, *C. suis* und *C. muridarum*. Die Gattung *Chlamydophila* umfasst 6 Arten, darunter *Chlamydophila pneumoniae* und *Chlamydophila psittaci* (Abbildung 1). Zudem werden heute aufgrund von phylogenetischen Analysen drei weitere Familien den *Chlamydiaceen* zur Seite gestellt, die *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae* (Everett, Bush et al. 1999),(Horn, Fritsche et al. 1999),(Schachter 2001). Da die neue Einteilung noch umstritten ist, wird im Rahmen dieser Arbeit die alte Taxonomie für *Chlamydia pneumoniae* verwendet.

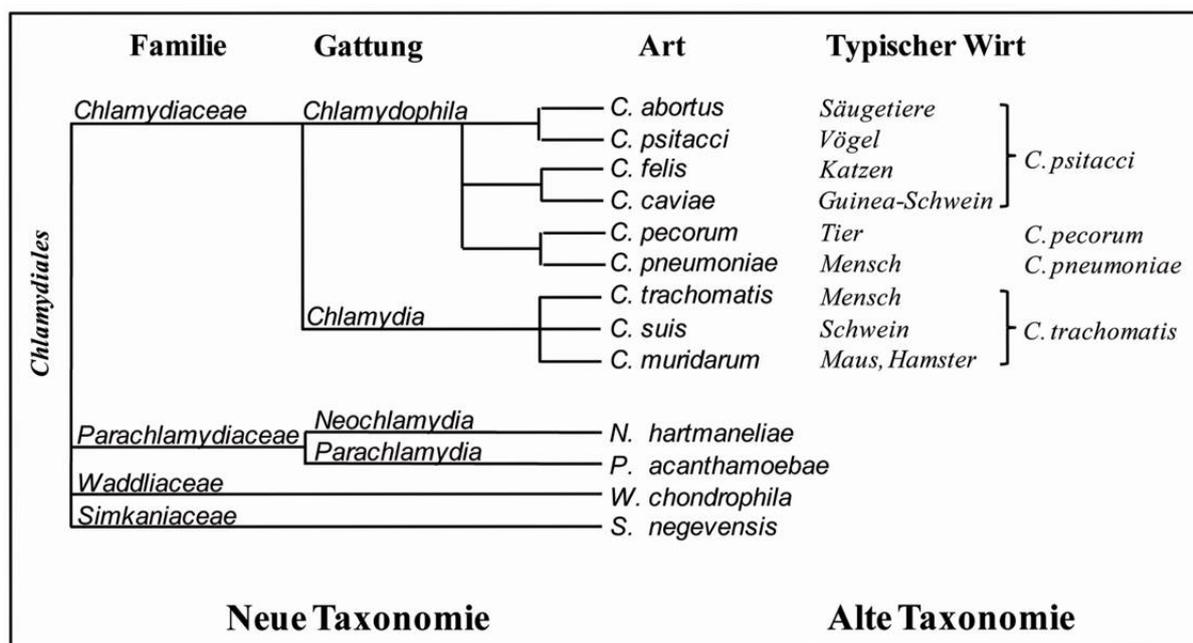


Abbildung 1: Die alternativen Taxonomien der Chlamydiales

Schematische Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse unter den Chlamydien mit Angabe der typischen Wirtsorganismen. Diagramm (modifiziert nach Bush and Everett 2001).

1.2 Medizinische Bedeutung von Chlamydien

Chlamydien sind weltweit verbreitet und kommen sowohl als humanpathogene wie auch als tierpathogene Erreger vor. Als humanpathogene Erreger sind vor allem *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia pneumoniae* bekannt. Auch *C. psittaci* kann als humanpathogener Erreger in Erscheinung treten, wobei diese Art vorrangig Vögel und andere Säugetiere infiziert (Peeling and Brunham 1996), (Hadley, Carrington et al. 1992). *C. abortus* und *C. pecorum* zählen neben *C. psittaci* zu den wichtigsten tierpathogenen Erregern. Sie verursachen neben Pneumonien auch Fehlgeburten und Unfruchtbarkeit bei Rindern und Schafen, was sich jedes Jahr in einem erheblichen wirtschaftlichen Schaden widerspiegelt (Kaltenboeck, Kousoulas et al. 1993), (Aitken, 2000).

1.2.1 *Chlamydia pneumoniae*

C. pneumoniae wurde erst 1989 als eigenständige Art klassifiziert (Grayston 1989). Es ist ein wichtiges humanpathogenes Bakterium, das zu akuten und chronischen Infektionen des respiratorischen Trakts führt. Dabei sind die oberen und unteren Atemwege betroffen, was sich in den verschiedenen Krankheitsbildern Pharyngitis, Sinusitis, Bronchitis und Pneumonien äußert (Grayston 1993), (Kuo, Grayston et al. 1995). Allein 6-10% aller Pneumonien und 5% aller Bronchitiden beruhen auf Infektionen mit *C. pneumoniae*. Seroepidemiologischen Studien zufolge kommt es mit zunehmendem Lebensalter zu einer verstärkten Durchseuchung bei 50% aller 20-jährigen und bei bis zu 75% älterer Menschen (Kuo, Grayston et al. 1995), (Wang and Grayston 1990). Mit einer Antikörperprävalenz von 70-80% ist es somit naheliegend, dass praktisch jeder Mensch im Laufe seines Lebens (vielleicht sogar mehrfach) eine chlamydiale Infektion durchlaufen hat, wobei der Großteil asymptomatisch verlaufen ist (Hahn 2002), (Kleemola, Saikku et al. 1988). *C. pneumoniae* wird seit seiner Entdeckung mit verschiedenen weiteren Krankheiten in Verbindung gebracht. Neben den genannten Atemwegsinfektionen wurden auch andere Manifestationen der akuten *C. pneumoniae* Infektion beschrieben, darunter Fälle von Endokarditis, Myokarditis, Meningitis, Enzephalitis und dem Guillain-Barré-Syndrom (Norton, Schepetiuk et al. 1995), (Wesslen, Pahlson et al. 1992), (Sundelof, Gnarpe et al. 1993), (Fryden, Kihlstrom et al. 1989), (Boschin-Crinquette, Kreisler et al. 2005), (Haidl, Ivarsson et al. 1992). Vor allem in den letzten Jahren hat *C. pneumoniae* an Bedeutung gewonnen, da zunehmend auch chronische Erkrankungen mit diesem Pathogen in Verbindung gebracht werden. So wurde das Pathogen in atheromatösen Plaques und Gefäßen gefunden und konnte aus diesen isoliert und kultiviert werden (Shor, Kuo et al. 1992), (Maass and Gieffers 1997), (Petersen, Boman et al. 1998). Neben Atherosklerose werden auch Asthma, Alzheimer-Demenz oder

Multiple Sklerose mit *C. pneumoniae* Infektionen in Verbindung gebracht (Balin, Gerard et al. 1998), (Sriram, Stratton et al. 1999), (Layh-Schmitt, Bendl et al. 2000). Ungeklärt blieb bisher jedoch die Frage, ob die Gegenwart von *C. pneumoniae* ursächlich für die Entstehung dieser Krankheiten ist, oder ob es sich hier, eventuell zusammen mit anderen Erregern, um eine sekundäre Besiedlung des veränderten Gewebes handelt. Der kausale Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *C. pneumoniae* im geschädigten Gewebe und diesen Erkrankungen konnte bisher noch nicht zweifelsfrei belegt werden.

1.2.2 *Chlamydia trachomatis*

C. trachomatis ist ein weltweit verbreiteter wichtiger Krankheitserreger. Hierbei unterscheidet man zwei für den Menschen bedeutsame Biovare, die sich in weitere Serovarianten unterteilen lassen: Trachoma und Lymphogranuloma venerum (LGV). Gemeinsam sind sie für jährlich 90 Millionen neuer Fälle sexuell übertragener Infektionen und 400-600 Millionen Fälle von Trachoma weltweit verantwortlich (Schachter 1999). Damit ist *C. trachomatis* der häufigste Erreger sexuell übertragener Krankheiten und Hauptverursacher von vermeidbarer Blindheit (Whitcher, Srinivasan et al. 2001), (Peeling and Brunham 1996). Die Serovare D-K verursachen die Urogenitaltraktinfektionen Urethritis, Cervicitis, Salpingitis und Endometritis (Taraktchoglou, Pacey et al. 2001). Außerdem führen Infektionen der Eileiter zur Unfruchtbarkeit von Frauen (Brunham, Zhang et al. 2000), (Igietseme, Black et al. 2002). Die LGV-Serovare L1-L3 verursachen systemische Infektionen und können somit nicht nur Epithelgewebe infizieren, sondern auch in Lymphknoten eindringen (Schachter and Caldwell 1980), (Raulston 1995). Die Trachom-Serovarianten A-C sind für die Ausbildung von Trachomen, die folliculären Bindehautentzündungen, welche bei Nicht-Behandlung Erblindung zur Folge haben, verantwortlich. Für das Jahr 1999 konnte die WHO (Welt-Gesundheits-Organisation) 340 Millionen Infizierte weltweit ermitteln, wobei 146 Millionen Trachome aufwies, von denen ein Großteil die Entwicklungsländer betrifft (WHO, 1999),(Schachter 1988).

1.3 Bakterielle Invasionsmechanismen

Immer auf den eigenen Vorteil bedacht, haben pathogene Bakterien Strategien entwickelt um in die Wirtszelle einzudringen. Durch die Invasion können sie ihr Überleben sichern, die Immunabwehr des Wirts umgehen, sich replizieren und das Wirtszellangebot von Energie und Nährstoffen ausnutzen. Bei der Invasion können sie mehrere Zellschichten durchdringen und so auch tief gelegene Wirtsgewebe und Organe infizieren und schließlich schädigen.

Aufgrund ihrer Eigenschaften können sie in zwei Kategorien eingeteilt werden. Die obligat intrazellulären Bakterien sind von der Wirtszellmaschinerie abhängig und können daher nicht extrazellulär überleben. Hierzu zählen die Chlamydien, Rickettsien und *Mycobacterium leprae*. Die zweite Gruppe bilden die fakultativ intrazellulären Bakterien, welche sowohl intrazellulär als auch extrazellulär überleben können; hierzu zählen Legionellen, Listerien, Salmonellen, Shigellen, Yersinien und verschiedene *E.coli* Stämme. Bei den fakultativ intrazellulären Bakterien wird zudem zwischen professionell- und nicht-professionell-fakultativen Bakterien unterschieden, wobei letztere eine niedrigere Invasionseffizienz aufweisen.

Alle invasiven Bakterien synthetisieren Adhäsions- (Adhäsine) und Invasionsproteine (Invasine) auf ihrer Oberfläche, durch die sie in die Wirtszelle eindringen. Dabei initiiert die Bindung des Invasins an einen Wirtszell-Rezeptor eine Signaltransduktionskaskade, die zur Endozytose der Bakterien führt. Die dafür benötigte lokale Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts der Wirtszelle ermöglicht die Internalisierung der Bakterien in einem Phagosom (Boyle and Finlay 2003). Die Internalisierung kann durch zwei Mechanismen erfolgen, dem Zipper-Mechanismus und dem Trigger-Mechanismus (Cossart and Sansonetti 2004).

Der Zipper-Mechanismus (Reißverschluss-Mechanismus) wird durch engen Pathogen-Wirtskontakt ausgelöst. Die Bakterienzelle bindet mit oberflächenlokalisierten Adhäsinen/ Invasionsproteinen an die Rezeptoren der Wirtszelle, die mit fokaler Aktin-Filament Reorganisation reagiert. Die Wirtszellmembran stülpt sich unter gleichzeitigen, weiteren Invasin-Rezeptor-Interaktionen um die Bakterienzelle, und die gleichzeitig induzierten Zytoskelettreaktionen führen zur vollständigen Aufnahme des Bakteriums in einem sogenannten Phagosom. Auf diese Weise werden viele Pathogene, unter anderem Spezies von Toxoplasmen, Mycobakterium, Staphylokokken oder Leishmania, aufgenommen (Suss-Toby, Zimmerberg et al. 1996), (Lodge and Descoteaux 2005), (Agerer, Lux et al. 2005), (Amer and Swanson 2002).

Shigellen und Salmonellen nutzen den Trigger-Mechanismus (Auslöse-Mechanismus). Hierbei bindet die Bakterienzelle mit einem Adhäsins an die Wirtszelle und injiziert mit einer Mikroinjektionsstruktur (Typ III Sekretionssystem) Invasionsproteine direkt ins Zytoplasma der Wirtszelle (Cossart and Sansonetti 2004). Die dadurch ausgelösten Signaltransduktionskaskaden führen zu Zytoskelettreaktionen mit Bildung von Plasmamembran-Ausstülpungen (Lamellopodien), welche die Bakterienzelle umschließen und endozytieren (Miao, Brittnacher et al. 2003), (Guiney and Lesnick 2005).

Bei einigen Bakterien genügt ein Invasionsprotein (z.B. Invasin von *Y. pseudotuberculosis*), bei anderen Bakterien wie z.B. den Salmonellen (Sip, Salmonellen Invasionsproteine) oder den Chlamydien werden mehrere Proteine benötigt (Dersch and Isberg 1999), (Moelleken and Hegemann 2008).

1.4 Biologie der Chlamydien

Als intrazelluläre Parasiten dringen Chlamydien in eine geeignete Wirtszelle ein und entziehen sich dort der Immunabwehr des Wirtes um ihr Überleben zu sichern. Dafür entwickelten die Chlamydien im Rahmen ihrer Evolution einen einzigartigen, biphasischen Entwicklungszyklus, wobei man zwei morphologisch sehr unterschiedliche Formen unterscheidet: die Elementarkörperchen (EB) und die Retikularkörperchen (RB). Die infektiösen Elementarkörperchen stellen mit durchschnittlich $0,3\ \mu\text{m}$ die Sporen-ähnliche Form der Bakterien dar, welche metabolisch inaktiv ist (Miyashita, Kanamoto et al. 1993), (Grayston 1989) (Abbildung 2). Sie sichern das extrazelluläre Überleben des Bakteriums, bis es wieder in eine Wirtszelle eindringen kann. Die RBs sind mit durchschnittlich $1\ \mu\text{m}$ die weitaus größere Lebensform. Sie sind metabolisch aktiv, nicht-infektiös und sorgen durch binäre Teilung für die Vermehrung der Chlamydien.

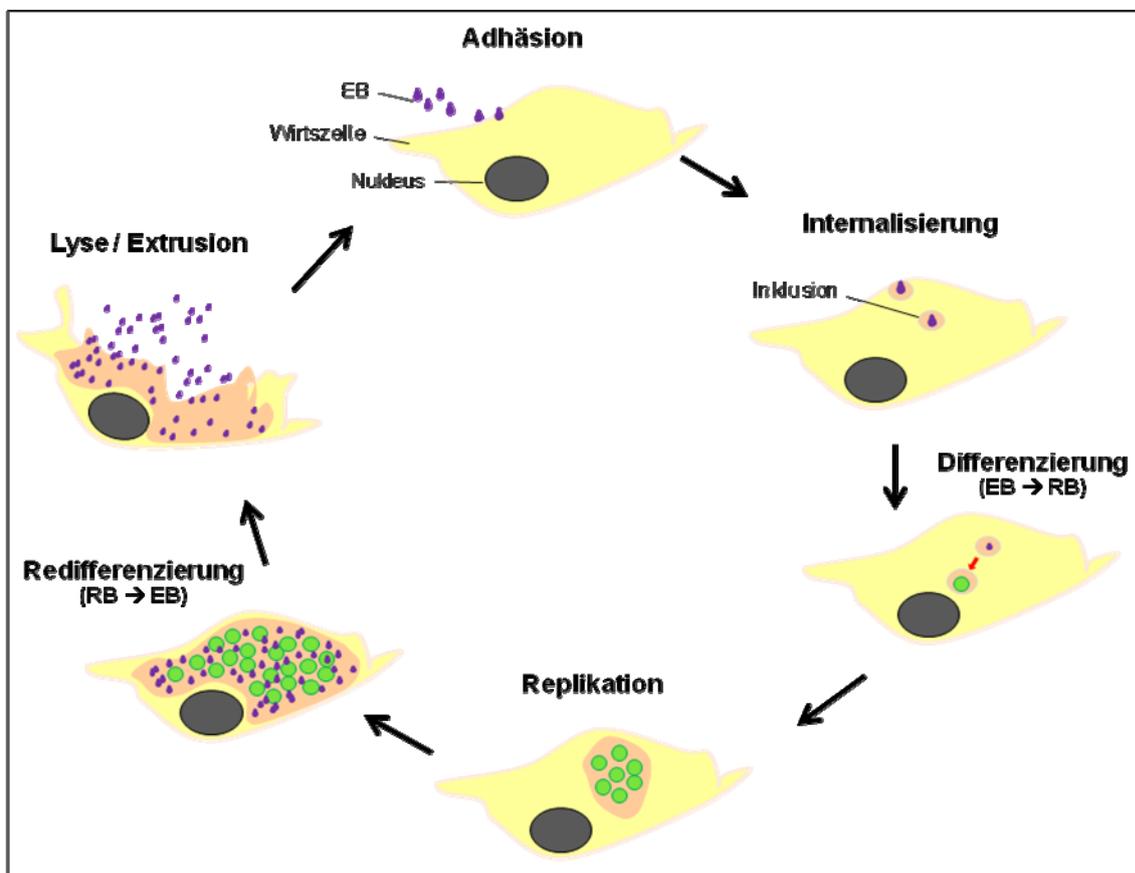


Abbildung 2: Schematische Darstellung des chlamydialen Entwicklungszyklus

Die Adhäsion der EBs an die Wirtszelle leitet den chlamydialen Entwicklungszyklus ein (Abbildung 2). Dabei werden verschiedene Signaltransduktionskaskaden ausgelöst, die vermutlich zur Aufnahme der EBs über Rezeptor-vermittelte Phagozytose in die Wirtszelle führen (Wyrick, Choong et al. 1989), (Zhang and Stephens 1992). Innerhalb der Wirtszelle

liegen die EBs in einem Membran-umschlossenen Phagosom vor, dem sogenannten Einschlusskörper (Inklusion). Innerhalb der Inklusion differenzieren sich die EBs zu den metabolisch aktiven RBs, die mit der Vermehrung beginnen (Wolf, Fischer et al. 2000). Während dieser Teilungsphase nutzen die Chlamydien die Wirtszellmaschinerie aus, um sich so die Zufuhr von genügend Energie (in Form von ATP) und Nährstoffen (Aminosäuren, Nukleotide) zu sichern (McClarty 1994). Anschließend beginnen die RBs mit der Re-Differenzierung zu den EBs, welche den Infektionszyklus durch Lyse oder Extrusion der Wirtszelle beenden und eine neue Infektion einleiten können. Dieser Entwicklungszyklus ist für alle Chlamydien repräsentativ, wobei die Dauer –abhängig von der Spezies- zwischen 72 und 96 Stunden variieren kann (Wolf, Fischer et al. 2000), (Davis and Wyrick 1997).

1.4.1 Adhäsion und Internalisierung von Chlamydien

Die Charakterisierung des Adhäsions- und Invasionsmechanismus der Chlamydien sowie der daran beteiligten Komponenten ist bisher noch nicht gelungen. Es scheinen jedoch mehrere Mechanismen involviert zu sein, bei denen es sich um elektrostatische Interaktionen und Interaktionen chlamydialer Liganden mit ein oder mehreren Wirtszellrezeptoren handelt. Es konnte gezeigt werden, dass positiv geladene Polykationen, wie z.B. poly-L-Lysin, die Adhäsion begünstigen, während negativ geladene Polysaccharide, wie Heparansulfat, die Bindung inhibieren (Kuo, Wang et al. 1972), (Kuo, Wang et al. 1973), (Kuo and Grayston 1976). Für *C. trachomatis* konnten unterschiedliche Effekte für den Einfluss der Polykationen und Polyanionen zwischen den Biovaren und LGV beobachtet werden (Kuo, Wang et al. 1972). Während DEAE-Dextran die Bindung und Aufnahme der Trachoma Biovare verstärkt, ist die LGV Adhäsion unbeeinträchtigt (Kuo and Grayston 1976). Auch zwischen den *C. pneumoniae* Isolaten variiert der Einfluss von DEAE-Dextran oder Heparansulfat auf die Infektion (Kuo and Grayston 1988), (Chen and Stephens 1997), (Wuppermann, Hegemann et al. 2001). Diese inhibitorischen Effekte suggerieren eine Rolle der Glykosaminoglykane (GAG) im Adhäsionsprozess (Zhang and Stephens 1992), (Taraktchoglou, Pacey et al. 2001). Die Involvierung der GAGs im Adhäsionsprozess konnte bereits für andere Bakterien wie *N. gonorrhoeae*, *Leishmania donovani* und auch für Viren (z.B.: das Varicella Zoster Virus) gezeigt werden: sie alle nutzen Heparansulfat als Wirtszellrezeptor (Freissler, Meyer auf der Heyde et al. 2000), (Butcher, Sklar et al. 1992), (Zhu, Gershon et al. 1995). Studien von Zhang und Stephens (1992) schlagen einen tri-molekularen Mechanismus für die Bindung und Aufnahme der EBs in die Wirtszelle vor. Dabei dienen die GAG-ähnlichen Strukturen als Verbindungselement zwischen einem Adhäsins der chlamydialen Oberfläche und dem Wirtszellrezeptor (Zhang and Stephens 1992), (Stephens, Fawaz et al. 2000). Als mögliche Wirtszell-Rezeptoren für die GAGs werden Mannose- und Mannose-6-Phosphat

(M6P) Rezeptoren diskutiert, wobei auch hier Unterschiede zwischen den chlamydialen Spezies bestehen. Während *C. trachomatis* den Mannose-Rezeptor für die Bindung an und Aufnahme in Makrophagen nutzt, scheint es bei *C. pneumoniae* der M6P-Rezeptor zu sein (Kuo, Puolakkainen et al. 2002), (Lin, Campbell et al. 2001), (Lin, Campbell et al. 2000). Auch der Zelltyp spielt dabei eine Rolle; so konnte die *C. pneumoniae* Infektion von Endothelzellen Dosis-abhängig mit Mannose-6-Phosphat inhibiert werden, während die *C. trachomatis* Infektion unbeeinträchtigt blieb (Puolakkainen, Kuo et al. 2005). In Epithelzellen hingegen konnte nur Mannan und nicht Mannose-6-Phosphat eine Inhibition der *C. pneumoniae* Infektion hervorrufen.

Als erstes chlamydiales Adhäsins konnte kürzlich das *C. pneumoniae* OmcB identifiziert und charakterisiert werden (Moelleken and Hegemann 2008). Die enzymatische Entfernung von Heparansulfat-Strukturen auf der Wirtszelloberfläche führte zur Inhibierung der chlamydialen Adhäsion und somit zur Identifikation der Heparin-ähnlichen GAGs als Interaktionspartner von OmcB. Die Inhibierung der OmcB-GAG Interaktion durch Zugabe von rekombinantem OmcB oder OmcB-Antikörpern weist eine Restinfektion von 10% auf; dies deutet auf weitere bisher unbekannte Adhäsins-Rezeptor-Interaktionen hin (Moelleken and Hegemann 2008).

Aufgrund der unterschiedlichen Effekte der GAGs auf die Bindung und Infektiosität für die verschiedenen Chlamydien-Arten scheinen auch GAG-unabhängige Mechanismen involviert zu sein. Dabei scheinen elektrostatische und Ligand- Rezeptor vermittelte Interaktionen eine Rolle zu spielen (Carabeo and Hackstadt 2001). Neben OmcB wurden weitere Proteine des bakteriellen Außenmembrankomplexes wie Momp oder Hsp70 für die Funktion als Adhäsins in Betracht gezogen. Das *C. trachomatis* Momp fungiert als Adhäsins bei elektrostatischen und hydrophoben Interaktionen und bindet scheinbar über seinen Glykanrest an die Heparansulfat-ähnlichen GAGs auf der Wirtszelloberfläche (Su, Watkins et al. 1990), (Swanson and Kuo 1994). Aufgrund der N-Glykosylierung des Proteins wären Interaktionen über den Mannose-6-Phosphat Rezeptor auf der Wirtszelle denkbar (Kuo, Lee et al. 2004), (Puolakkainen, Kuo et al. 2005). Antikörper gegen Hsp70 neutralisieren die chlamydiale Infektion (Danilition, Maclean et al. 1990). Interessanterweise ist Hsp70 nicht oberflächenzugänglich, aber eine partielle Reduktion der EBs durch DTT resultierte in Exposition der Hsp70 Substrat-Binde-Domäne (Raulston, Davis et al. 2002). Die Assoziation des Wirtszellproteins Disulfid Isomerase (PDI), Mitglied des Östrogen-Rezeptor Komplexes, mit den EBs scheint ebenfalls zu einer Reduktion des EB Außenmembrankomplexes zu führen, wodurch die Adhäsionsdomänen von Cystein-reichen Proteinen wie Momp oder OmcB freigelegt werden könnten (Davis, Raulston et al. 2002), (Raulston, Davis et al. 1993) (Conant and Stephens 2007). Somit scheint die Konformation von Oberflächenproteinen der EBs eine Rolle im Adhäsionsprozess zu spielen.

Während der Adhäsion akkumulieren die Chlamydien an der Wirtszelloberfläche in sogenannten Lipid-Mikrodomänen (LM oder „rafts“) (Jutras, Abrami et al. 2003), (Stuart, Webley et al. 2003). Für viele pathogene Bakterien, wie *Mycobakterien*, *Shigella flexneri* oder *E. coli*, konnte gezeigt werden, dass ihre Interaktionen nicht wahllos an der Plasmamembran, sondern an definierten Bereichen, den LM, stattfinden (Lafont, Abrami et al. 2004). Die LM weisen einen hohen Cholesterol- und Glykosphingolipid-Gehalt auf (Brown 1998). Durch die Zerstörung der LM durch Nystatin, welches den Cholesterol-Gehalt verringert, wurde die Aufnahme, aber nicht die Bindung von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* inhibiert; somit spielen die LM auch für die chlamydiale Infektion eine wichtige Rolle (Jutras, Abrami et al. 2003). Ob auch eine Clathrin-abhängige Endozytose besteht, bleibt noch zu untersuchen, da die Ergebnisse dazu kontrovers sind. Eine Clathrin-abhängige Endozytose schien zunächst ausgeschlossen, da dominant-negative Mutanten für Clathrin-vermittelte Endozytose von *C. trachomatis* erfolgreich infiziert wurden (Boleti, Benmerah et al. 1999). Neuere RNA Interferenz-Studien fanden jedoch strukturelle und regulatorische Faktoren, die mit Clathrin-vermittelter Endozytose assoziiert sind, und deuten so auf eine Notwendigkeit von Clathrin für die *C. trachomatis* Internalisierung hin (Hybiske and Stephens 2007). Eine vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) vermittelte Endozytose scheint ausgeschlossen zu sein, da es in elektronenmikroskopischen Analysen nicht an den Eintrittsseiten detektiert werden konnte (Dautry-Varsat, 2004- unpublished data). Möglich wäre auch, dass die Bindung der Chlamydien an die relativ kleinen LM (nur 40 nm im Durchschnitt) zur Koaleszenz der bakteriellen Zellen führt und so die Aufnahme der Chlamydien durch die Wirtszelle begünstigt (Jutras, Abrami et al. 2003).

Die Bindung der Chlamydien führt in Minuten zur Anhäufung der LM und einer schnellen Initiierung der Aktin-Polymerisation (Dautry-Varsat, Balana et al. 2004), (Coombes, Johnson et al. 2002). Eine Aktin-Depolymerisierung, z.B. durch Cytochalasin D, inhibiert die Aufnahme der Chlamydien (Boleti, Benmerah et al. 1999), (Carabeo, Grieshaber et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Chlamydien zur Ausbildung von Mikrovilli auf der Wirtszelle führt und bei *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* von einer Tyrosin-abhängigen Phosphorylierung von Wirtszellproteinen begleitet wird (Birkelund, Johnsen et al. 1994), (Carabeo, Grieshaber et al. 2004), (Krüll, Klucken et al. 1999). Einige der phosphorylierten Proteine sind mit Wirtszell-Zytoskelett-Proteinen assoziiert oder dienen als physikalische Brücke zwischen dem Wirtszell-Rezeptor und dem Aktin-Zytoskelett, wodurch die Internalisierung der Chlamydien begünstigt werden könnte (Dehio, Prevost et al. 1995), (Fawaz, van Ooij et al. 1997), (Swanson, Crane et al. 2007). Das einzige bislang bekannte Aktin-modulierende chlamydiale Effektorprotein ist TARP, das translozierte Aktin rekrutierende Protein, welches unabhängig vom Arp2/3 Komplex agiert und genau wie dieser für die Internalisierung benötigt wird (Carabeo, Grieshaber et al. 2004), (Jewett, Fischer et al.

2006), (Carabeo, Dooley et al. 2007), (Lane, Mutchler et al. 2008). Die Aktin-Remodulierung ist ein Ergebnis der durch TARP induzierten Signale. Über die Signalkaskaden ist nur sehr wenig bekannt. Neben den oben beschriebenen Protein-Phosphorylierungen scheinen zwei verschiedene Signalwege induziert zu werden, welche die Phosphoinositide 3-Kinase (PI-3-Kinase) und MEK-ERK Kinasen involvieren. Die PI-3-Kinase wirkt auf die Ras Superfamilie der GTPasen, die in der Aktin-Polymerisierung involviert sind. Die Inhibierung der PI-3-Kinase und MEK wirkt der von *C. pneumoniae* induzierten Mikrovilli-Bildung entgegen (Coombes, Johnson et al. 2002). Für die Aufnahme von *C. caviae* ist die PI-3-Kinase ebenfalls notwendig, während es für *C. trachomatis* L2 nicht der Fall zu sein scheint (Subtil and Dautry-Varsat 2004), (Carabeo, Grieshaber et al. 2002). Somit führen frühe Wirtssignale zur Aktin-Reorganisation und damit zur bakteriellen Aufnahme. Die involvierten Proteine, Enzyme oder Wege sind noch weitgehend unbekannt und Gegenstand andauernder Studien.

1.4.2 Differenzierung der Elementarkörperchen zu Retikularkörperchen

Nach der Rezeptor-vermittelten Phagozytose liegen die Chlamydien in der Wirtszelle innerhalb des Einschlusses vor. Dabei besitzen die EBs noch ihre charakteristische Größe und eine kondensierte DNA. Es können durch Mehrfach-Infektionen auch mehrere Einschlüsse innerhalb einer Wirtszelle gebildet werden, die miteinander fusionieren können, während die Konversion des Phagosoms zum Lysosom auf bisher noch ungeklärte Weise, vermutlich jedoch durch Einlagerung chlamydialer Proteine in die Inklusionsmembran, aktiv von den Chlamydien verhindert wird (Eissenberg, Wyrick et al. 1983), (Wolf, Fischer et al. 2000), (Fields and Hackstadt 2002), (Scidmore, Fischer et al. 2003). Acht Stunden nach der *C. pneumoniae* Infektion wird die Differenzierung der EBs in RBs eingeleitet, wobei die EB-Hülle an Rigidität verliert, die DNA dekontensiert und eine Größenzunahme stattfindet. Die Auflockerung der EB-Hülle beruht auf der Reduktion der Disulfidbrücken zwischen Cysteinereichen Oberflächenproteinen des cOMCs (Hackstadt, Todd et al. 1985), (Raulston, Davis et al. 2002). Neben Histon-ähnlichen Proteinen, welche die Dekondensation der DNA regulieren, werden noch andere Proteine (Proteine die mit der Inklusionsmembran assoziiert sind (Inc`s) und Proteine des chlamydialen Metabolismus) von den Chlamydien exprimiert, die in die sich vergrößernde Einschlussmembran eingelagert werden und der Nährstoffversorgung der Chlamydien dienen. Der chlamydiale Einschluss wandert zum Golgi-Apparat an die Peripherie des Zellkerns (Clausen, Christiansen et al. 1997). Diese Positionierung ermöglicht es den Chlamydien, die hier entstehenden exozytotischen Vesikel des sekretorischen Stoffwechsels der Wirtszelle abzufangen und den eigenen Bedürfnissen

entsprechend zu verwerten (Wolf and Hackstadt 2001), (Carabeo, Mead et al. 2003). Dieser Einbau birgt einen weiteren Vorteil in sich, nämlich eine Art Maskierung des Einschusses als Sekretionsvesikel, was ebenfalls einer Fusion mit Lysosomen entgegenwirkt (Scidmore, Fischer et al. 2003).

1.4.3 Replikation und Redifferenzierung der RBs zu EBs

Bereits 12 Stunden nach der *C. pneumoniae* Infektion können RBs im Einschluss detektiert werden, und nach 19 Stunden beginnen sie mit der Replikation. Während dessen erfolgt eine stetige Vergrößerung der Inklusion durch die Einlagerung von chlamydialen und Wirtszellproteinen (Taraska, Ward et al. 1996), (Wolf and Hackstadt 2001). Im Zuge der fortlaufenden Entwicklung interagieren die Chlamydien auch weiterhin mit der Wirtszelle. So konnte gezeigt werden, dass sie einen Protease-ähnlichen Faktor (CPAF) in das Wirtszellzytosol sezernieren, der den Abbau von Transkriptionsfaktoren fördert, wodurch die Antigenpräsentation herab reguliert und auch die Entwicklung einer persistenten Infektion begünstigt wird (Zhong, Fan et al. 2001), (Fan, Dong et al. 2002), (Dong, Sharma et al. 2004). Außerdem ist es ihnen möglich die Apoptose infizierter Zellen aktiv zu beeinflussen. So wurde ein Apoptose-aktivierendes Protein (CADD), aber auch die Möglichkeit zur Inhibierung der Apoptose durch Degradation proapoptotischer Faktoren gefunden (Stenner-Liewen, Liewen et al. 2002), (Rajalingam, Al-Younes et al. 2001), (Dong, Pirbhai et al. 2005), (Verbeke, Welter-Stahl et al. 2006).

Nach 48 Stunden wird der chlamydiale Entwicklungszyklus asynchron. Es kommt zu einer Redifferenzierung der RBs zu EBs. Dabei lassen sich auch intermediäre Formen beobachten, welche bereits über eine kondensierte DNA verfügen, aber noch nicht die Größe eines EBs erlangt haben (Wolf, Fischer et al. 2000). Der fortschreitende asynchrone Entwicklungszyklus erhält eine deutliche prozentuale Verschiebung zu Gunsten der EBs. Es werden verstärkt EB-spezifische Proteine produziert, wie die Histon-ähnlichen Proteine (s. 1.3.2) und Proteine des cOMCs, welche vor allem für die Ausbildung der rigiden EB-Hülle benötigt werden und als Adhäsine in der nächsten Infektionsrunde dienen (Wolf, Fischer et al. 2000), (Shaw, Dooley et al. 2000), (Belland, Zhong et al. 2003).

1.4.4 Freisetzung der Chlamydien

Die Dauer des Entwicklungszyklus kann zwischen den verschiedenen Arten variieren. Für *C. pneumoniae* dauert er zwischen 72 und 96 Stunden, während *C. trachomatis* je nach Serovar lediglich 36 bis 48 Stunden benötigt (Wolf, Fischer et al. 2000), (Kuo and Grayston 1976), (Todd and Caldwell 1985).

Die Freisetzung der Chlamydien erfolgt durch Zellyse oder Exozytose (Moulder 1991). Die Chlamydien verlassen die Zelle und können neue Infektionszyklen beginnen. Kürzlich konnte ein weiterer Freisetzungsweg identifiziert werden, die Extrusion (Hybiske and Stephens 2007). Dieser langsame Prozess resultiert in einem Abtrennen der Inklusion oder eines Teiles davon und dessen Ablösung von der Zelle, wobei die Wirtszelle intakt bleibt.

1.5 Der chlamydiale Außenmembrankomplex (cOMC)

Chlamydien gehören zu den Gram-negativen Bakterien und so ähnelt auch der Aufbau ihrer Hülle dem Gram-negativer Bakterien, bestehend aus einer inneren und einer äußeren Membran (Everett and Hatch 1995). Die Besonderheit bei den Chlamydien ist jedoch das fast vollständige Fehlen der Peptidoglykanschicht, welche normalerweise für die Stabilität der Membran verantwortlich ist. Der chlamydiale Außenmembrankomplex (cOMC) besteht aus vielen Proteinen, darunter die Adhäsine und auch cysteinreiche Proteine, die über Disulfidbrücken miteinander vernetzt sind und so die Rigidität der Membran herstellen (Sun, Pal et al. 2007). Es wird vermutet, dass die beiden Hauptproteine des cOMCs, die cysteinreichen Proteine Momp und OmcB, mit OmcA eine supramolekulare Struktur bilden, welche den EBs die Rigidität verleiht (Everett and Hatch 1995), (Fadel and Eley 2007).

Auf der Außenmembran liegt das Genus-spezifische Lipopolysaccharid (LPS) vor, welches wie andere bakterielle LPS-Strukturen endotoxische Aktivität besitzt (Brade, Brade et al. 1987), (Heine, Muller-Loennies et al. 2003).

1.5.1 Major outer membrane protein (Momp)

Momp ist ein 40kDa cysteinreiches Protein und stellt mit 60% das Hauptprotein des cOMCs dar (Everett and Hatch 1995), (Raulston 1995). Es bildet ein Homotrimer, welches durch hydrophobe und elektrostatische Interaktionen zusammengehalten wird und fungiert als Porin, wobei es keine nachgewiesene Transportfunktion besitzt (Sun, Pal et al. 2007), (Wyllie, Ashley et al. 1998), (Wyllie, Longbottom et al. 1999). Die Sequenzierung von Momp aus verschiedenen *C. trachomatis* Serovaren zeigte, dass dieses Protein vier variable Domänen (VD) und fünf konstante Domänen besitzt (Stephens, Sanchez Pescador et al. 1987). Diese Sequenzvariabilität trägt vermutlich zur Unterwanderung der Immunabwehr des Wirtes bei. Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass Momp bei *C. trachomatis* ein starkes Antigen ist und auch ein potentieller Impfstoff-Kandidat sein könnte (de la Maza and Peterson 2002), (Pal, Peterson et al. 2005), (Pal, Bravo et al. 2008), (Srivastava, Gupta et al. 2008).

Bei *C. pneumoniae* ist Momp zwar oberflächenlokalisiert, aber nicht das immunodominanteste Antigen (Campbell, Kuo et al. 1990), (Klein, Kotz et al. 2003), (Bunk, Susnea et al. 2008). Weitere Unterschiede zwischen beiden Chlamydien-Arten zeigten sich auch hinsichtlich der Funktion von Momp. So wurde das Momp des *C. trachomatis* MoPn Stamm als chlamydiales Adhäsins beschrieben. Dabei scheint die Glykosylierung des Proteins für die Adhäsion und Internalisierung von *C. trachomatis* MoPn relevant zu sein (Kuo, Takahashi et al. 1996), (Kuo, Lee et al. 2004), (Puolakkainen, Kuo et al. 2005). Im Gegensatz dazu konnten für das *C. pneumoniae* Momp bisher keine adhäsiven Eigenschaften nachgewiesen werden (Su, Raymond et al. 1996), Mölleken Diss. 2005).

1.5.2 Outer membrane complex protein B (OmcB)

OmcB ist das nach Momp zweithäufigste Protein des cOMCs. Es ist 60 kDa groß und hoch konserviert unter den chlamydialen Arten (Wagels, Rasmussen et al. 1994), (Hatch 1999). In Lokalisationsstudien konnte das Protein im Periplasma von *C. trachomatis*, aber auch auf der *C. pneumoniae* Oberfläche von EBs detektiert werden (Watson, Lamb den et al. 1994), (Everett and Hatch 1995), (Ting, Hsia et al. 1995), (Mygind, Christiansen et al. 1998), (Stephens, Koshiyama et al. 2001). Während einer chlamydialen Infektion induziert OmcB eine starke Antikörper-Antwort, was die Zugänglichkeit für eine humorale Immunantwort und somit auch eine Oberflächenlokalisierung suggeriert (Wagels, Rasmussen et al. 1994), (Mygind, Christiansen et al. 1998), (Cunningham and Ward 2003), (Klein, Kotz et al. 2003), (Portig, Goodall et al. 2003). Analysen zur funktionellen Rolle des *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* OmcBs im Adhäsionsprozess konnten es als Adhäsins identifizieren (Moelleken and Hegemann 2008). Dabei wurden die adhäsiven Eigenschaften von OmcB unter anderem durch Adhäsionsstudien mit OmcB-exprimierenden Hefezellen sowie dem rekombinanten Protein nachgewiesen. Hierbei wird die Bindung über die N-terminale Domäne, welche das Heparin-Bindemotiv enthält, vermittelt. Die Bindung von OmcB an Humanzellen scheint eine generelle Fähigkeit des Proteins zu sein, da auch das OmcB von *C. trachomatis* L1 und Serovar E sowie von *C. caviae* an HEp-2 Zellen bindet. Als humaner Interaktionspartner konnten die Heparin-ähnlichen Glykosaminoglykane identifiziert werden. Interessanterweise ist die Bindung des *C. trachomatis* Serovar E OmcB unabhängig von Heparin. Eine detaillierte Studie des OmcB-Heparin-Binde-Motivs der *C. trachomatis* Serovare E und L1 zeigte jedoch, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure den Unterschied zwischen Heparin-abhängiger und -unabhängiger Bindung ausmacht (Moelleken and Hegemann 2008).

Rekombinantes OmcB und auch OmcB spezifische Antikörper führen zur Reduktion der Infektion; dies zeigt, dass OmcB als chlamydiales Adhäsins eine entscheidende Rolle für die *C. pneumoniae* Infektion spielt.

1.5.3 Die polymorphen Membranproteine (Pmps)

Durch vergleichende Genomanalysen innerhalb der *Chlamydiaceae* konnte eine neue, einzigartige Familie von Polymorphen Membranproteinen, den Pmps, im cOMC ausfindig gemacht werden.

Die Proteine dieser Familie weisen eine beachtliche Heterogenität bezüglich ihrer Primärsequenz auf, konnten jedoch aufgrund der Anwesenheit von zahlreichen Wiederholungen des Aminosäure-Motivs Gly-Gly-Ala-Iso (GGAI) in eine Familie eingeteilt werden (Grimwood and Stephens 1999). Die Bedeutung der Pmps für die chlamydiale Biologie scheint offensichtlich, denn betrachtet man das gesamte *C. pneumoniae* Genom, so entfallen ca. 4% allein auf die Pmps (Grimwood, Olinger et al. 2001), (Kalman, Mitchell et al. 1999), (Read, Brunham et al. 2000) (Shirai, Hirakawa et al. 2000).

Erstmalig wurden Mitglieder dieser Multiproteinfamilie 1996 von Longbottom aus *C. abortus* isoliert und aufgrund ihrer Lokalisation und ihres Molekulargewichts POMPS bzw. OMP90 genannt (Longbottom, Russell et al. 1996). Fünf dieser Proteine scheinen oberflächenlokalisiert zu sein und wurden als hauptsächliche Antigene mit post-abortem Schafsserum detektiert (Longbottom, Russell et al. 1998), (Souriau, Salinas et al. 1994). Da nicht alle Proteine dieser Familie in der Außenmembran lokalisiert sein müssen wurde ihr Name in Pmps geändert (Stephens, Kalman et al. 1998).

Phylogenetische Analysen ermöglichten die Einteilung der Pmps in sechs Familien: A, B/C, D, E/F, G/I und H, wobei jede dieser Pmp-Familie mindestens einmal in jeder Säuger *Chlamydiaceae* Art vertreten ist (Abbildung 3). Die Anzahl der Familien-Mitglieder ist sehr unterschiedlich; beispielsweise expandiert die Pmp-Familie von 9 Pmps in *C. trachomatis* auf 21 Pmps in *C. pneumoniae*. Hierbei entfallen allein auf die Proteinfamilie PmpG gleich 13 Paraloge in *C. pneumoniae* (Abbildung 3).

Neben den konservierten repetitiven GGA (I- L- V) Motiven konnten auch FxxN Motive in allen Pmps gefunden werden (s. 1.4.3.1). Genau wie die GGA (I, L, V) Motive befinden sich die FxxN Motive hauptsächlich in der N-terminalen Region der Proteine, wobei die beiden Motivtypen meist alternierend auftreten. Der Großteil der Pmps trägt ein N-terminales Signalpeptid, Tryptophanreste innerhalb der carboxyterminalen Hälfte, ist Glycin- und Serinreich und hat einen konservierten Phenylalanin-Rest am C-Terminus, was auf eine Membranlokalisierung hindeutet (Grimwood and Stephens 1999), (Branden, Lindqvist et al. 1991). Die Funktion dieser Proteinfamilie ist ungeklärt.

Bioinformatische Studien legen nahe, dass die Pmps den Autotransportern angehören (Henderson and Lam 2001). Neben den zuvor genannten Gegebenheiten wird diese Vermutung sehr stark durch das Vorhandensein eines β -barrels (im C-Terminus) und die Assoziation der Passagierdomäne (N-Terminus) mit der chlamydialen Oberfläche gestützt (s. auch Kapitel 1.5.3.2). Die Immunogenität einiger Pmps kann auf die Oberflächenlokalisierung der putativen Passagierdomäne zurückgeführt werden (Niessner, Kaun et al. 2003), (Mygind, Vandahl et al. 2004), (Vandahl, Pedersen et al. 2002). So konnte in verschiedenen Zelltypen die Stimulation von proinflammatorischen Cytokinen (darunter IL-6, IL-8, MCP-1) durch Pmp6, 20 und 21 nachgewiesen werden (Mygind, Vandahl et al. 2004), (Niessner, Kaun et al. 2003), (Wehrl, Brinkmann et al. 2004), (Bunk, Susnea et al. 2008).

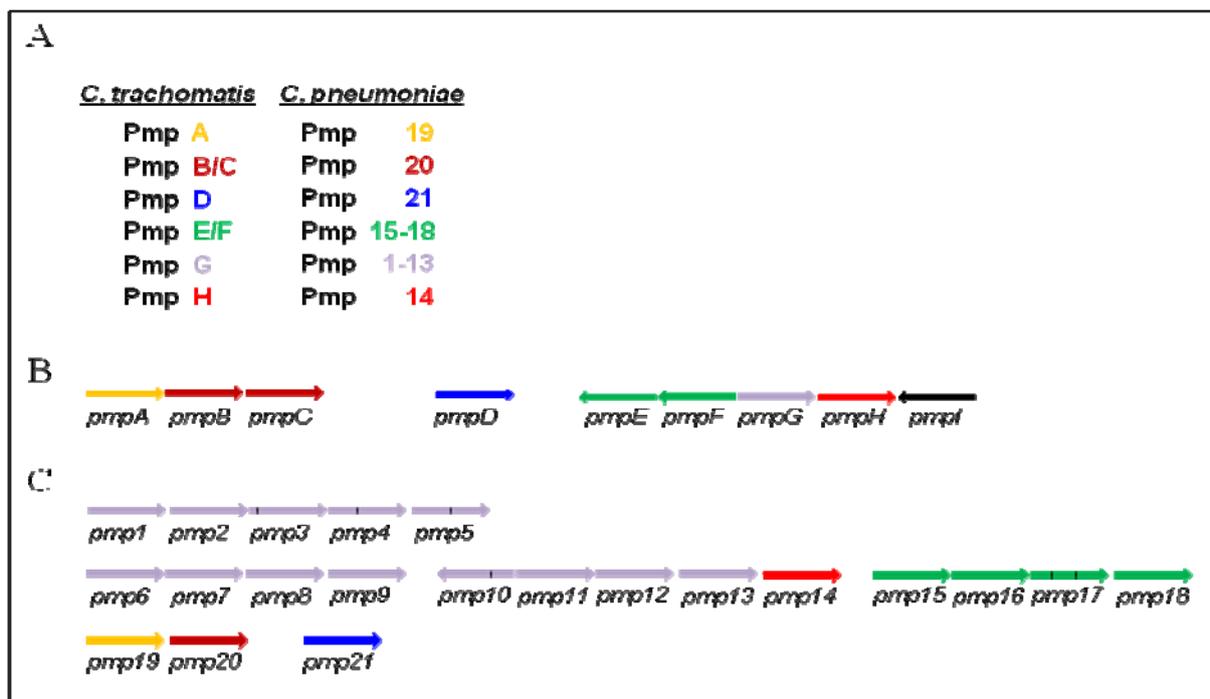


Abbildung 3: Gruppierung der Polymorphen Membranproteine (Pmp) in sechs Familien

A) Gruppierung der Pmps in sechs Familien. Jede *C. trachomatis* Proteinfamilie ist mindestens einmal durch ein orthologes Protein in *C. pneumoniae* vertreten. Schematische Darstellung der für Pmp-codierenden Gencluster (modifiziert nach Grimwood et al., 1999). Für *C. trachomatis* werden die Pmps in drei Genclustern (B), und für *C. pneumoniae* (C) in vier Genclustern gefunden. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung an. Die verschiedenen Farben dienen der Identifizierung gleicher Proteinfamilien. Die schwarzen Linien innerhalb der *C. pn.* Gene deuten auf Leserasterverschiebungen bei den Genen *pmp3*, *4*, *5*, *10* und *17* hin.

In vitro Studien mittels RT-PCR für *pmp* Gene aus *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* zeigten, dass zwar alle *pmps* transkribiert, aber nicht alle auch translatiert werden. So enthalten vier *C. pneumoniae* Gene eine Nonsense-Mutation (*pmp3*, *4*, *5* und *17*) (Lindquist and Stephens, 1998), (Grimwood, Olinger et al. 2001), (Vandahl, Pedersen et al. 2002). Vergleichende Genomanalysen zeigten für vier Gene verschiedene Leseraster-Mutationen, SNPs, Deletionen und Insertionen in verschiedenen Isolaten derselben Art und in

verschiedenen Arten (Gomes, Hsia et al. 2005), (Gomes, Nunes et al. 2006), (Grimwood and Stephens 1999).

So findet man eine unterschiedliche Anzahl von aufeinanderfolgenden Nukleotid-Wiederholungen aber auch Leserasterverschiebungen in *pmp6* und innerhalb einer poly (G)-Kette in *pmp10* (Stothard, Toth et al. 2003), (Christiansen, Boesen et al. 1999), (Pedersen, Christiansen et al. 2001). Daraus können unterschiedliche Expressionsmuster innerhalb derselben Chlamydien-Art resultieren. Beim *C. pneumoniae* CWL029 *pmp10* wurde anstelle einer 14 Nukleotide langen poly-G-Kette nur eine 13 Nukleotide lange poly-G-Kette gefunden, was zu einem Stop-Codon im Gen führte (Kalman, Mitchell et al. 1999). Weitere Studien einer anderen Gruppe konnten keine Pmp10 Expression in *C. pneumoniae* CWL029 nachweisen, während andere Gruppen für Pmp10 verschiedene Expressionen innerhalb des CWL029 Isolats detektierten (Pedersen, Christiansen et al. 2001) (Vandahl, Pedersen et al. 2002). Diese Ergebnisse suggerieren, dass aufgrund der Leserasterverschiebung das verkürzte Genprodukt nicht mehr oder nur verkürzt exprimiert wird (Pedersen, Christiansen et al. 2001), (Juil, Timmerman et al. 2007). Dies mag zu einer unterschiedlichen Epitop-Präsentation des Pmp-Proteins an der Bakterienoberfläche führen und so eine Antigenvariation darstellen (Grimwood, Olinger et al. 2001), (Shirai, Hirakawa et al. 2000). Das Pmp6 und Pmp10 Oberflächen-lokalisiert sind, wurde durch Immunofluoreszenz-Analysen nachgewiesen (Knudsen, Madsen et al. 1999), (Vandahl, Pedersen et al. 2002). Die große Antigenvariation könnte eine Schlüsselrolle der Pmps beim Überleben der Chlamydien im Wirt darstellen, indem sie das Immunsystem unterwandern und somit der Immunantwort entkommen (Grimwood and Stephens 1999), (Read, Brunham et al. 2000), (Daugaard, Christiansen et al. 2001), (Christiansen, Pedersen et al. 2000), (Grimwood, Olinger et al. 2001), (Nunes, Gomes et al. 2007). Ein weiterer möglicher evolutiver Weg könnte sein, dass sich die Diversität, Expression und eventuell Funktion der Pmps als Antwort auf die jeweiligen Wirtsumstände entwickelt.

1.5.3.1 Die charakteristischen Motive der Pmps

Die hohe Variabilität der Proteine hätte die Gruppierung aller Proteine in diese Familie nicht ermöglicht. Die höchste Sequenzidentität zwischen zwei Pmp Proteinen von ähnlicher Größe beläuft sich auf 52,1%, meistens aber liegt sie unter 25% und somit an der Grenze dessen, was eine Vorhersage struktureller oder funktionaler Ähnlichkeiten noch ermöglicht (Sanders and Schneider, 1991). Allein das Vorhandensein des charakteristischen Motivs, dem GGAI, führte ursprünglich zur Gruppierung dieser polymorphen Membranproteine in eine Superfamilie (Abbildung 4) (Stephens, Kalman et al. 1998). Dieses Motiv liegt mit 2-12 Wiederholungen in der N-terminalen Hälfte der Pmps vor; das bedeutet, dass

durchschnittlich 6,5 Motive in einem *C. trachomatis* und 5 in einem *C. pneumoniae* Pmp vorkommen. Das Motiv lässt sich nicht auf DNA-Ebene erkennen, und interessanterweise kommt es nur noch zwei weitere Male im *C. trachomatis* und achtmal im *C. pneumoniae* Proteom vor. Dabei tritt es in allen 10 Fällen nur jeweils einmal pro individuellem Protein auf.

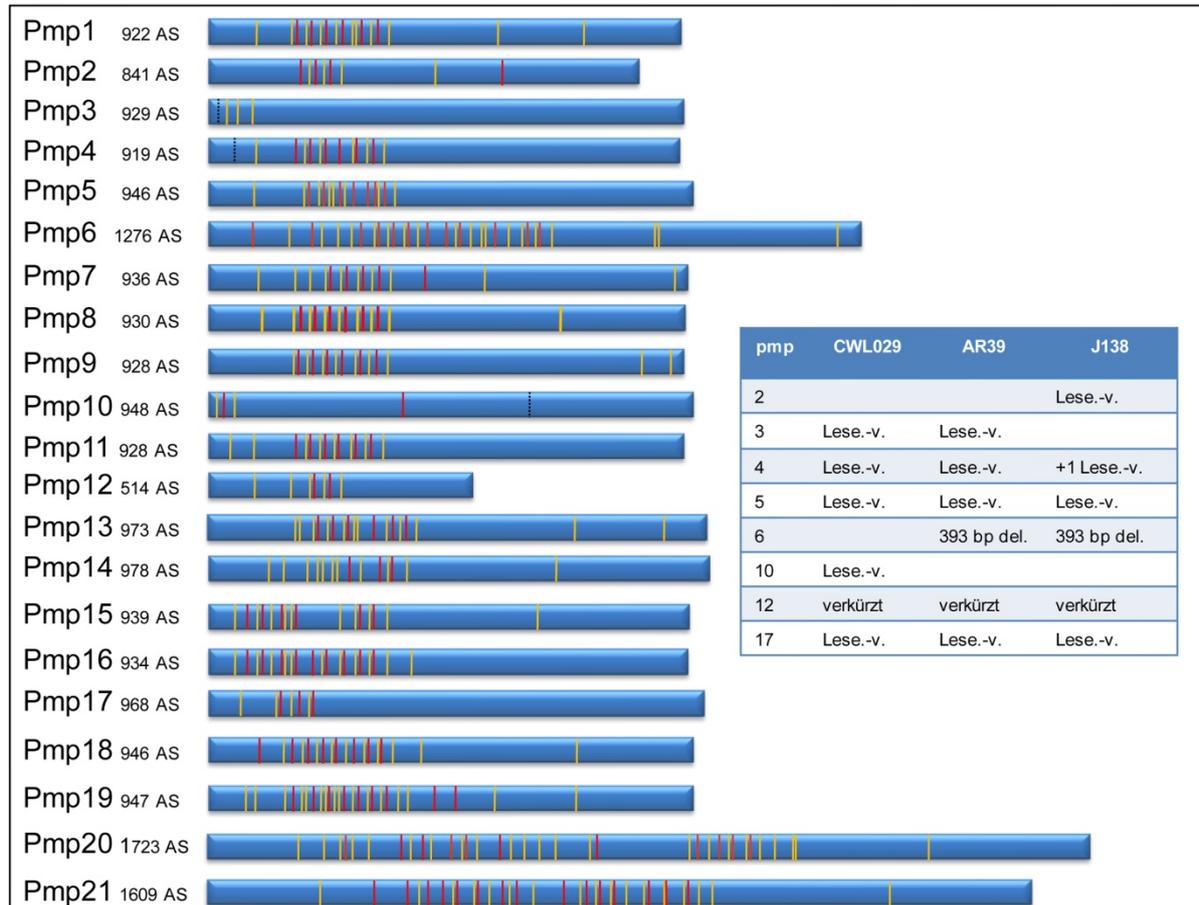


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Pmps von *C. pneumoniae* CWL029
 Illustriert werden die *C. pneumoniae* Pmps. Die Tabelle gibt die jeweiligen Mutationen für die drei *C. pneumoniae* Stämme CWL029; AR39 und J138 an (Lese.-v. = Leserahmenverschiebung, del.= deletiert (nach Vandahl et al., 2004). Die charakteristischen repetitiven Motive sind durch Linien dargestellt, gelb= FxxN, rot=GGAI. Punktierete, schwarze Linien stehen für die Position an der eine Mutation stattgefunden hat.

Obwohl etwas niedriger frequentiert, werden laut statistischen Analysen auch die Motive GGAL und GGAV überrepräsentiert, weshalb die Signatur des Motivs GGA (I, L, V) lautet (Grimwood and Stephens 1999). Neben diesem Motiv tritt ein weiteres Motiv primär in der N-terminalen Proteinhälfte auf, FxxN. Auch für dieses Motiv können zahlreiche Wiederholungen, zwischen 4-23 Mal je nach Protein variierend, gefunden werden (Abbildung 4) (Grimwood and Stephens 1999). Dabei kann X eine beliebige Aminosäure sein, mit Ausnahme von Prolin an der ersten Position und Cystein, Methionin oder Tryptophan an der zweiten X Position. Durchschnittlich kommt das FxxN Motiv 13,6 Mal in *C. trachomatis* und 11,3 Mal in *C. pneumoniae* vor. Die beiden Motive GGA (I,L,V) und FxxN kommen vorwiegend abwechselnd vor, wobei die dazwischenliegenden Aminosäuren in Anzahl und Identität keinem Muster zu folgen scheinen (Grimwood and Stephens 1999).

Bioinformatischen Analysen nach konnte das GGA (I, L, V) Motiv in nur 2,5% der Proteine aller bislang sequenzierten Genome gefunden werden. Davon tragen 97% der Proteine das GGAI-Motiv nur einmal. Abgesehen von den Pmps haben nur zwei weitere bakterielle Proteine und ein eukaryotisches Protein das Motiv mehr als dreimal (Stephens, Kalman et al. 1998). Dabei handelt es sich um das *E. coli* YfaL, das rOmpA aus *Rickettsia conorii* und das eukaryotische Protein Zonadhesin aus der Maus. Beim *E. coli* YfaL Protein kommt das GGAI fünfmal in der N-terminalen Hälfte vor und das FxxN Motiv siebenmal. Für YfaL wird eine Lokalisation in der Außenmembran vorausgesagt, aber die Funktion des Proteins ist noch unbekannt (Grimwood and Stephens 1999), (Marani, Wagner et al. 2006).

Auch für das *R. conorii* rOmpA Protein konnte das GGAI Motiv fünfmal im N-Terminus gefunden werden und das FxxN siebenmal, wobei dessen Lokalisation nicht auf den N-Terminus beschränkt ist. Für zwei weitere *Rickettsia* Spezies konnte das GGAV Motiv zehnmal im rOmpA Protein gefunden werden. Das rOmpA vermittelt die Bindung der *Rickettsien* an die Wirtszelle. Dies konnte durch die Gabe von rekombinantem Protein oder von monoklonalem Antikörper oder durch die enzymatische Entfernung des Proteins von der Oberfläche intakter *Rickettsien* gezeigt werden (Li and Walker 1998). Eine Beteiligung der Motive an dieser Adhäsion von rOmpA wurde nicht untersucht.

Beim Zonadhesin konnte das GGAI Motiv viermal und das FxxN Motiv neunmal im Protein gefunden werden. Hierbei handelt es sich um ein Protein der Spermienmembran, das in Spezies-spezifischer Weise an die extrazelluläre Matrix des Ei's (Zona Pellucida) bindet (Hardy and Garbers 1994), (Gao, Harumi et al. 1997). Es wird eine Rolle der repetitiven GGA (I, L, V) und FxxN Motive bei dieser Adhäsion vermutet, jedoch wurden bisher keine Analysen zur Funktion der Motive durchgeführt.

1.5.3.2 Pmp21

In *C. pneumoniae* ist die Pmp-Familie mit 21 Mitgliedern vertreten. Betrachtet man die Gencluster, erregt *pmp21* besondere Aufmerksamkeit, da es weder in *C. pneumoniae* noch in *C. trachomatis* (*pmpD*) einem Cluster angehört, sondern isoliert vorliegt. Das *C. pneumoniae* Pmp21 ist mit 1609 AS nach Pmp20 (1723 AS) das zweitgrößte Protein der Pmp-Familie. Erste Analysen von Pmp21 zeigten, dass das Protein prozessiert wird. Dabei wurden mittels 2D-PAGE die Schnittstellen zwischen dem C-terminalen Bereich des Proteins, welcher den β -barrel bildet, und der Passagierdomäne, sowie die Signalpeptid-Schnittstelle für das Abspalten der Signalsequenz, identifiziert (s. 1.5.3) (Vandahl, Pedersen et al. 2002). Befunde aus Studien zu Pmp21 deuten auf eine weitere Prozessierung von Pmp21 hin. So konnte über 2D-PAGE Analysen ein Fragment von zirka 70 kDa gefunden werden, welches ausschließlich Peptide der vorderen Hälfte der Passagierdomäne enthält

(Abbildung 5) (Wehrl, Brinkmann et al. 2004), (Vandahl, Pedersen et al. 2002). Zusätzlich fand man ein Fragment, dessen Peptide dem zweiten Teil des N-terminalen Bereichs (zirka 55 kDa) zugeordnet werden konnten, der sich aus der Prozessierung ergeben müsste (Wehrl, Brinkmann et al. 2004).

Mit Hilfe von Antikörpern, welche gegen die gesamte Passagierdomäne (AS 52-AS 1129) oder das 70 kDa Fragment (AS 16-AS 670) gerichtet waren, konnte Pmp21 auf EBs und RBs in Immunfluoreszenzstudien nachgewiesen werden (Vandahl, Pedersen et al. 2002), (Wehrl, Brinkmann et al. 2004). Beim *C. trachomatis* PmpD hingegen konnte das Protein in einer Studie nur auf RBs angefärbt werden, während andere Arbeiten das PmpD auch auf EBs detektierten (Kiselev, Stamm et al. 2007), (Crane, Carlson et al. 2006). Auch die Immunoblot-Analysen brachten unterschiedliche Ergebnisse. So konnte eine Gruppe das Volllängen-Protein in EB-Lysaten detektieren, während andere Studien nur Fragmente (vermutlich die prozessierte Form) detektierten (Kiselev, Stamm et al. 2007), (Crane, Carlson et al. 2006). Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass von EBs isoliertes, natives *C. trachomatis* PmpD oligomerisiert, wobei die Oligomere aus der Volllänge und den zwei proteolytisch prozessierten Formen (73 kDa und 82 kDa) bestehen (Swanson, Taylor et al. 2009). Die Autoren konnten zudem eine Infektions-abhängige proteolytische Prozessierung zeigen, die zu einer löslichen 111 kDa großen Form führt. Diese unterliegt einer weiteren Prozessierung, wobei die resultierende 73 kDa Form ein RGD-Motiv trägt und die hier erstmalig detektierte 30 kDa Form ein Kernlokalisierungssignal (NLS) enthält.

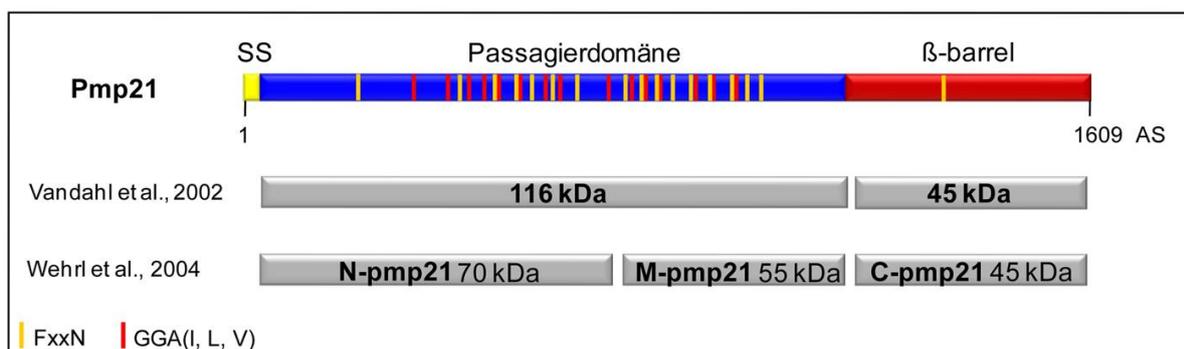


Abbildung 5: Schematische Darstellung von Pmp21

Die für Autotransporter typische Drei-Domänen-Struktur ist farblich markiert, mit Signalsequenz (SS, gelb), Passagierdomäne (blau) und dem C-terminalen β -barrel (rot). Die Linien markieren die repetitiven Motive (gelb= FxxN, rot= GGA(I,L,V)). In grau sind die durch 2D-PAGE gefundenen prozessierten Proteinformen dargestellt (in Anlehnung an Vandahl et al. und Wehrl et al.).

Studien zu *C. trachomatis* PmpD zeigten, dass Antikörper gegen PmpD die Infektion aller *C. trachomatis* Serovare reduzieren können (Crane, Carlson et al. 2006). *PmpD* zeigt die geringste Variabilität unter den *pmps* zwischen den Arten, sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäuren-Ebene, was darauf schließen lässt, dass dieses Gen essentielle Funktionen

besitzt. Auch für das *C. pneumoniae* Pmp21 zeigte ein spezifischer Antikörper eine neutralisierende Wirkung auf die Chlamydien-Infektion, was darauf hindeutet, dass Pmp21 eine Rolle im Infektionsgeschehen zu spielen scheint (Wehrl, Brinkmann et al. 2004). Erste funktionelle Analysen von Pmp21 mit Hilfe des Hefe-Oberflächenexpressionssystems zeigten, dass die gesamte Passagierdomäne (Pmp21-N) sowie zwei Proteindomänen, wobei je eine davon in einer der prozessierten Pmp21-Formen N- und M-pmp21 liegt, an Humanzellen binden (Georgoudis 2004). Somit könnte Pmp21 im chlamydialen Adhäsionsprozess involviert sein.

1.5.3.3 Autotransporter

Die Familie der Autotransporter besteht aus Membranproteinen und sekretierten Proteinen. Seit ihrer Entdeckung in den '80er Jahren ist diese Familie stark expandiert und somit zur größten Gruppe von sekretierten Proteinen in Gram-negativen Bakterien geworden (Desvaux, Parham et al. 2004). Die Existenz von Proteinsekretion per se impliziert zum einen die Existenz von Systemen, die den Transport durch die Zellhülle, also vom Zellinneren nach außen, ermöglichen. Außerdem setzt es voraus, dass die Proteine über die nötigen Informationen verfügen, die ihnen die Translokation durch die zytoplasmatische Membran ermöglichen. Bei grampositiven Bakterien entspricht die Translokation durch die zytoplasmatische Membran der Sekretion, während gramnegative Bakterien sich dann erst im periplasmatischen Raum befinden und noch die Außenmembran durchqueren müssen.

Bisher sind sechs Sekretionsmechanismen für die Sekretion von löslichen Proteinen bekannt, die von I-VI durchnummeriert wurden (Salmond and Reeves 1993), (Henderson, Cappello et al. 2000). Hierbei werden 2 Gruppen von Sekretionssystemen unterschieden, die Sec-unabhängigen und die Sec-abhängigen Systeme.

Bei der Typ I, III und IV Sekretion wird das Protein in einem Schritt durch beide Membranen transportiert. Bei dem Typ II und V Mechanismus handelt es sich um Sec-abhängige Sekretionssysteme, wobei die Proteine in zwei Schritten transportiert werden. Zuerst werden sie mit Hilfe von Signalsequenzen zur Zytoplasmamembran hingeführt und dort mittels der Sec-Maschinerie transloziert, prozessiert und schließlich sekretiert. Beim Typ II Mechanismus wird ein Kanalkomplex in der äußeren Membran gebildet, durch den die Proteine transportiert werden. Beim Typ V Mechanismus handelt es sich um Autotransporter: nach der Sec-abhängigen Translokation über die innere Membran bildet der C-Terminus des Proteins eine Poren-ähnliche Struktur in der Außenmembran aus, durch die der N-Terminus (Passagierdomäne) an die Oberfläche exportiert wird. Das Typ VI System wurde erst kürzlich gefunden und ist noch nicht ganz verstanden. Es besteht aus zirka 15 Genen, die vermutlich

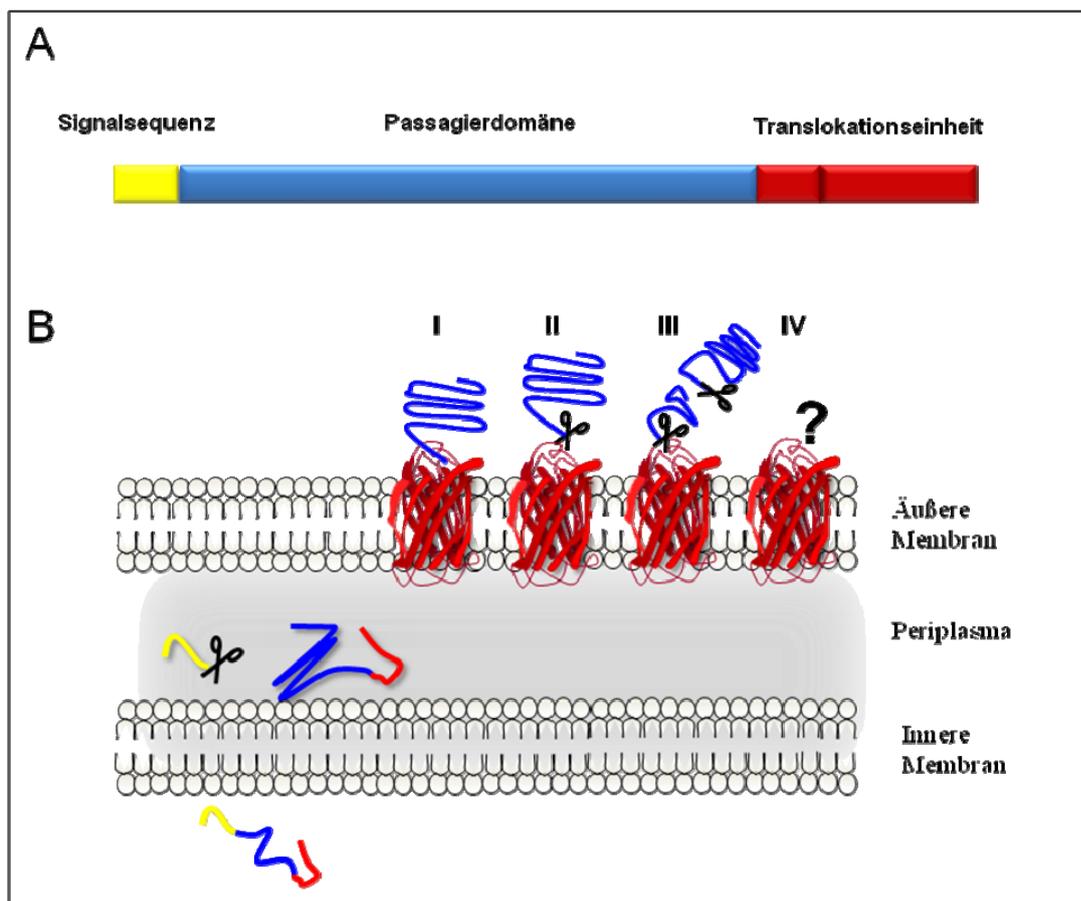
für Komponenten einer Sekretionsmaschinerie und spezifische Effektoren codieren ((Filloux, Hachani et al. 2008).

Der Typ V Sekretionsmechanismus wurde zuerst für die IgA1 Protease von *Neisseria gonorrhoeae* beschrieben (Pohlner, Halter et al. 1987), (Desvaux, Parham et al. 2004). Während der Sekretion unterläuft diese Protease Modifikationen des N- und C-Terminus und wird über autokatalytische Aktivität ins extrazelluläre Milieu freigesetzt. Da dieser Translokationsprozess keine Energie oder akzessorischen Faktoren benötigt, werden die Proteine, die auf diese Weise sekretiert werden, Autotransporter genannt.

Sie alle sind modular aufgebaut und bestehen aus drei Domänen: der Signalsequenz, einer Passagierdomäne und der Translokationseinheit (Abbildung 6) (Henderson, Navarro-Garcia et al. 1998). Die N-terminale Signalsequenz führt das Protein zur inneren Membran für den Export ins Periplasma. Die Passagierdomäne verleiht dem Autotransporter diverse Effektorfunktionen. Der C-terminale Bereich beherbergt die Translokationseinheit, die eine kurze Verbindungsregion mit α -helikaler Sekundärstruktur und eine β -Domäne enthält. Die β -Domäne nimmt eine β -barrel Sekundärstruktur an, sobald sie in der Außenmembran eingebettet wird. Die Autotransporter werden in einer Prä-Pro-Protein-Form im bakteriellen Zytoplasma synthetisiert und als Pro-Protein ins Periplasma freigesetzt. Durch die Translokation über die Außenmembran wird die Sekretion des Proteins vervollständigt, und das Pro-Protein kann nun vom β -barrel abgespalten werden oder daran assoziiert bleiben oder andere post-translationale Modifikationen durchlaufen. Die Passagierdomäne kann so verschiedene virulente Fähigkeiten wie Adhäsion, Autoaggregation, Invasion, Biofilm-Bildung und Zytotoxizität tragen. Viele sekretorische Proteine von Gram-negativen Bakterien konnten als Autotransporter identifiziert werden. So vermitteln das Hap Protein von *Haemophilus influenzae* oder zwei Proteine von *E. coli*, das Antigen 43 und AIDA-I Protein, sowohl Adhäsion als auch Autoaggregation und beide *E. coli* Proteine sind zusätzlich in der Biofilm-Bildung involviert (Fink, Green et al. 2002), (Hendrixson and St Geme 1998), (Benz and Schmidt 1992), (Henderson, Meehan et al. 1997), (Klemm, Hjerrild et al. 2004). Das Rickettsia rOmpA Protein (Adhäsion), das BabA von *Helicobacter pylori* (Adhäsion) und das YadA von *Y. enterocolitica* bzw. *Y. pseudotuberculosis* (Adhäsion, Invasion, Zytotoxizität, Autoaggregation) sind weitere Beispiele für zahlreiche Autotransporter Proteine, die in der Pathogen-Wirtszellsinteraktion eine wichtige Rolle spielen. Es können zwei Varianten der Autotransporter unterschieden werden, die „konventionellen“ und die „trimeren“ Autotransporter (Cotter, Surana et al. 2005). Bei den konventionellen Autotransportern besteht die Translokationseinheit aus ungefähr 300 Aminosäuren. Diese bilden ein wahrscheinlich 12-strängiges β -barrel aus, dem eine α -Helix und die Passagierdomäne vorausgehen.

Es gibt Hinweise, dass die Translokationseinheit bei einigen Autotransportern in der Außenmembran oligomerisieren kann (aber nicht muss), was zu einer Ausbildung eines Rings mit großer zentraler Höhle führt (gezeigt für IgA Protease von *N. gonorrhoeae*) ((Veiga, Sugawara et al. 2002), (Muller, Benz et al. 2005), (Skillman, Barnard et al. 2005)). Bei den trimeren Autotransportern ist die Translokationseinheit viel kürzer und führt zur Ausbildung von nur vier β -Strängen, denen direkt die Passagierdomäne vorangeht. Es konnte gezeigt werden, dass sie Homotrimere ausbilden, wobei der funktionale Translokator ein 12-strängiges β -barrel darstellt und jedes Monomer vier β -Stränge für das gesamte β -barrel beisteuert (Cotter, Surana et al. 2005).

Interessanterweise wurden alle bisher funktionell analysierten trimere Autotransporter als Adhäsine charakterisiert (Cotter, Surana et al. 2005).



1.6 Mögliche Systeme zur Identifizierung und Analyse von

Abbildung 6: Der Typ V Sekretionsmechanismus

A) Schematische Darstellung der charakteristischen Drei-Domänen-Struktur der Autotransporter, bestehend aus einer Signalsequenz (gelb), der Passagierdomäne (blau) und der Translokationseinheit (rot). Die Translokationseinheit ist unterteilt in 2 Regionen, die zur α -helikalen und zur β -barrel Sekundärstruktur führen. B) Der Transportweg des Autotransporters über die bakteriellen Membranen wird durch die Signalsequenz (gelb) eingeleitet, welche im Periplasma prozessiert wird. Der C-terminale Bereich (rot) bildet ein β -barrel aus, durch das die Passagierdomäne (blau) nach außen exportiert wird. An der Zelloberfläche verbleibt die Passagierdomäne mit dem β -barrel verbunden oder kann post-translational modifiziert werden (verschiedene Möglichkeiten I-IV). (modifiziert nach Henderson and Lam 2001)

bakteriellen Adhäsionsproteinen

Um die Funktion von bakteriellen Proteinen zu analysieren, die bei der Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszelle eine wichtige Rolle spielen, benötigt man funktionelle Testsysteme, die den Nachweis der adhäsiven Eigenschaften ermöglichen. Für die Chlamydien ist dies von großer Bedeutung, da diese genetisch nicht manipulierbar sind. Die Voraussetzung für die Auswahl des Systems ist die Möglichkeit zur Analyse unabhängig von Größe und Funktion des Proteins.

1.6.1 Bekannte Präsentationssysteme

Da Chlamydien genetisch nicht manipulierbar sind, muss die funktionelle Analyse möglicher Adhäsine mit Hilfe von heterologen Präsentationssystemen durchgeführt werden.

In der Vergangenheit wurden unterschiedliche Systeme zur Präsentation von Proteinen auf einer Oberfläche verwendet. Die einen basieren auf der Beschichtung von Latexkügelchen mit rekombinant hergestellten Proteinen, die anderen nutzen die Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche heterologer Organismen (Dersch and Isberg 1999), (Lang, Maki et al. 2000), (Dubel, Breitling et al. 1993), (Sternberg and Hoess 1995), (Becker, Theile et al. 2005). Die Verwendung der Latexkügelchen erfordert die Expression und Reinigung der zu testenden Proteine. Für ein weitreichendes „screening“ potentieller Adhäsine eignet sich dieses System somit nicht, da die Aufreinigung vieler Proteine, vor allem Membranproteine, schwierig und zeitaufwendig ist.

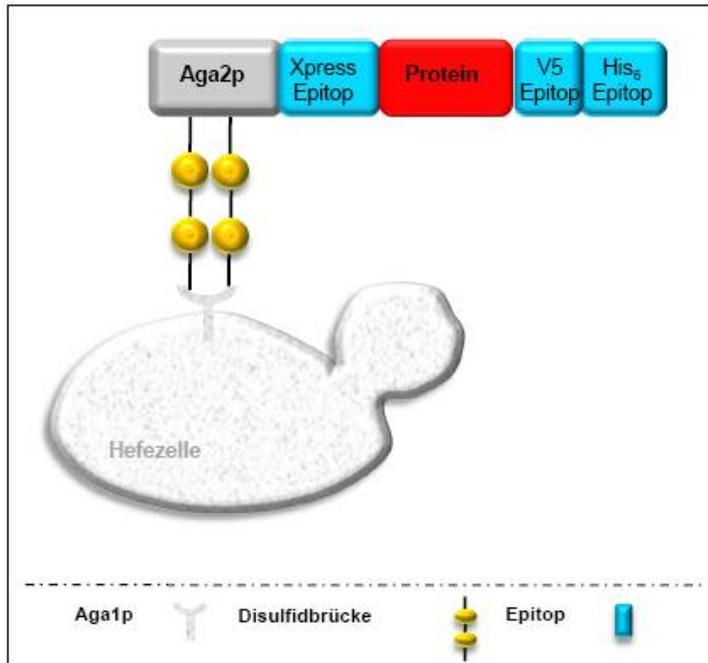
Für die Präsentation von Peptiden wurde das sogenannte „Phagen-Display“ entwickelt, bei dem Peptide, fusioniert an Hüllproteine von filamentösen Phagen, auf der Phagenoberfläche exponiert vorliegen (Chiswell and McCafferty 1992). Auf diese Weise wurden die verschiedensten Interaktionen zwischen Proteinen oder Antikörpern und Liganden nachgewiesen (McCafferty, Griffiths et al. 1990), (Li, Kilpatrick et al. 2000), (Chang, Abdo et al. 2005). Das Phagen-System eignet sich jedoch nicht zur Präsentation ganzer Proteine, weshalb bakterielle Präsentations-Systeme entwickelt wurden. Für Gram-negative Bakterien, wie z.B. *E. coli*, wird die Fusion von heterologen Proteinen an Proteine der bakteriellen Außenmembran oder an Fimbrien- und Flagellenproteine genutzt (Francisco, Stathopoulos et al. 1993); (Klemm and Hedegaard 1990; Newton, Kotb et al. 1991; Francisco and Georgiou 1994). Außerdem wurde ein *E. coli* System entwickelt, welches über die Fusion heterologer Proteine an Domänen eines bakteriellen Autotransporterproteins (AIDA-I) die Translokation auf die Bakterienoberfläche erlaubt (Jose and Handel 2003), (Maurer, Jose et al. 1997). Ein Oberflächen-Präsentationssystem für Gram-positive Bakterien wie z.B. Staphylococci nutzt die Fusion heterologer Proteine an das Zellwandprotein Protein A und

damit ebenfalls die Präsentation auf der Bakterienzellwand (Samuelson, Hansson et al. 1995).

Neben den bakteriellen Systemen wurde auch die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Organismus zur Präsentation von Proteinen verschiedenster Herkunft genutzt (Matsumoto, Fukuda et al. 2002), (Ueda and Tanaka 2000), (Boder and Wittrup 1997). Hefezellen eignen sich besonders gut, da sie sich sehr gut genetisch manipulieren lassen und dabei einfach zu kultivieren sind. Außerdem sind die Funktionen und Komponenten der Sekretionsmaschinerie weitgehend aufgeklärt und können zu einer Verbesserung der Proteinsekretion und Präsentation auf der Hefe positiv verändert werden. Hefen und die auf ihrer Zelloberfläche präsentierten Proteine werden sowohl im Bereich medizinischer Forschung als auch für biotechnologische Zwecke eingesetzt (Wadle, Mischo et al. 2005), (Kondo, Shigechi et al. 2002), (Fujita, Ito et al. 2004).

1.6.2 Das Hefe-Oberflächenexpressionssystem

Zur Charakterisierung der adhäsiven Eigenschaften eines bakteriellen Proteins wurde in unserem Labor erstmalig das Hefe-Oberflächenexpressionssystem verwandt (Boder and Wittrup 1997), (Moelleken and Hegemann 2008). Dafür wird das zu untersuchende Protein an eine Untereinheit des α -Agglutininrezeptors fusioniert. Die α - und α -Agglutininrezeptoren interagieren miteinander und leiten so die für die Hefepaarung benötigte Zell-Zellinteraktion ein, welche dann in der Fusion der α - und α - haploiden Zellen resultiert. Die Untereinheiten des α -Agglutininrezeptors, Aga1p und Aga2p, dienen der Präsentation der Proteine an der Hefeoberfläche. Dabei handelt es sich beim Aga1p Protein um ein stark O-glykosyliertes Mannoprotein, welches über einen GPI-Anker in der Hefezellwand verankert ist (Shen, Wang et al. 2001). Das Aga2p Protein ist ebenfalls stark glykosyliert und wird von einem Expressionsplasmid exprimiert. Nach der Sekretion wird es über zwei Disulfidbrücken kovalent mit dem Aga1p Protein auf der Zelloberfläche verbunden. Mit Hilfe des Hefe-Oberflächenexpressionssystems konnten bereits Studien zur Interaktion von Ligand und Rezeptor durchgeführt werden (Boder and Wittrup 1997), (Kieke, Cho et al. 1997), (Shusta, Holler et al. 2000). Kürzlich konnte das erste chlamydiale Adhäsins OmcB mit Hilfe des Hefe-Oberflächenexpressionssystems identifiziert werden (Moelleken and Hegemann 2008). In dem von unserem Labor modifizierten System unterliegen die *AGA1* und *AGA2* Gene der Kontrolle des Doxzyklin-abhängigen *tetO₇-CYC1*-Promotors (Guldener, Koehler et al. 2004), (Georgoudis 2004).

**Abbildung 7: Hefe- Oberflächenexpressionssystem**

Schematische Darstellung des Hefe-Oberflächenexpressionssystems. Die Hefe trägt das Aga1p auf der Oberfläche und ist mit dem Aga2p über zwei Disulfidbrücken verbunden. Das zu untersuchende Protein wird C-terminal an das Aga2p fusioniert und dabei von 3 Epitopen flankiert: N-terminal vom Xpress-Epitop und C-terminal vom V5-Epitop bzw. dem His₆-Epitop, wodurch die Proteinexpression nachgewiesen und die Aufreinigung durchgeführt werden kann.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das *C. pneumoniae* Polymorphe Membranprotein (Pmp) 21 auf seine Funktion während der initialen Schritte des Infektionszyklus, der Adhäsion und Internalisierung, untersucht und charakterisiert werden. Initiale Ergebnisse mit dem Hefe-Oberflächenexpressionssystem deuteten darauf hin, dass die Passagierdomäne von Pmp21 an Humanzellen adhärert (Georgoudis 2004). Daher sollten zunächst die adhäsiven Eigenschaften des Proteins mit Hilfe des Hefe-Oberflächenexpressionssystems im Detail weiter studiert werden. Zudem sollte rekombinantes Protein generiert werden, um die Rolle des Proteins in Adhäsions- und Internalisierungsstudien sowie durch Neutralisationsversuche zu studieren. Außerdem sollte die Funktion der charakteristischen repetitiven Motive der Pmps durch Mutationsanalysen aufgeklärt werden. In einem weiteren Abschnitt sollte ein Antikörper gegen die bisher nur in 2D Gelen gefundene 55 kDa Domäne innerhalb des N-terminalen Bereichs von Pmp21 generiert und zur Aufklärung der Lokalisation durch Immunofluoreszenz- und Immunoblot Analysen während der chlamydialen Infektion verwendet werden.

2 MATERIAL

2.1 Gebrauchsartikel

Tabelle 1: Verwendete Gebrauchsartikel

Gebrauchsartikel	Hersteller
Schraubverschlussröhrchen 15 ml, 50 ml	Saarstaedt
Glasplättchen für Zellkultur in Wellplatten; Deckgläser, Ø 12 mm	Menzel/Roth
Kulturflaschen: Polystyrol-Flaschen, 25 cm ² (50 ml) und 80 cm ² (260 ml), steril	Nunc
Falkon, 12 ml: PP-Röhrchen, steril	Greiner
Zellschaber 23 cm	Nunc
24-Well Zellkultur-Platten	Corning Incorporated Costar)
96-Well Gewebekulturplatten	Corning Incorporated Costar
4-Well Zellkultur-Platten	Corning Incorporated Costar
Kryo-Röhrchen	Nunc
Dialyseschlauch	Serva
Immobilon-P Membran	Millipore

2.2 Geräte und Maschinen

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Biofuge pico (mit Heraeus Sepatech-Rotor (#3324))	Heraeus
Brutschrank Thermo FormaSterikult 100	Thermo
Rotanta 460R (mit Rotor (#4444) und Einsätzen (#4428))	Hettich
Megafuge 1.0 (mit Tragringrotor (#3360)) und Schwenkbecherrotor (#3471)	Heraeus
PCR-Thermocycler: GeneAmp 9700	Perkin Elmer
Ultraschallstab Sonosplus HD2200	Bandelin
Ultraschallwasserbad RK102H	Bandelin
Photometer DU-800 Spectrophotometer	Beckmann
Schüttler Polymax 2040	Heidolph
Vibrax VXR	IKA
Speed-Vac Vacuum-Concentrator	Savant
Beckman Zentrifuge Avanti J-25	Beckman
Neubauer Zählkammer	Marienfeld

2.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid (Rotiphorese 35)	Roth
Actidione (Cycloheximid)	Sigma
Adenin	Roth
Agar	Difco
Agarose	SeaKem LE
Ammoniumacetat	Fluka
Ammoniumpersulfat	Merck
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Sigmal
Bacto Trypton	Difco
EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin	Pierce
Bradford Reagenz	Biorad
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma
Borsäure	Sigma
Bromphenolblau	Fluka
n-Buthanol	Riedel-deHaën
Calciumchlorid	Roth
Casein Pepton	Difco
CellTrace™CFSE Cell Proliferation Kit	Invitrogen
Coomassie Brilliant Blau	Serva
D(+)- Glucose	Roth
Desoxynukleosid-5'-Tiphosphat (dNTPs);	MBI Fermentas
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylformamid (DMF)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	J.T. Baker
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
Essigsäure	Riedel-deHaën
Ethanol (96 %)	J.T.Baker
Ethidiumbromidlösung 10mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (Na ₂ -EDTA)	Roth
Formaldehyd-Läsung (37%)	J.T.Baker
Galaktose	Roth
Gastrographin	Schering
Glutaminsäure	Serva, Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Harnstoff	J.T. Baker
Hefeextrakt	Difco

Chemikalien	Hersteller
Hefe Stickstoffquelle (YNB)	Difco
Heparin Natriumsalz	Sigma
Isopropanol	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Peqlab
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
λ Phagen DNA	MBI Fermentas
Lachssperma (Carrier) DNA	Sigma
Latex Kügelchen (1,1 µm Durchmesser)	Sigma
Lithiumacetat	Roth
Lysin	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ + 6 H ₂ O)	Fluka
α-Mannosidase	Sigma
Methanol	Riedel-deHaën
Methionin	Roth
Methylenblau	Sigma
Milchpulver	Roth
Natriumacetat (NaOAc)	Roth
Natriumcarbonat	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	J.T.Baker
Natriumdihydrogenphosphat	J.T. Baker
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Serva
Natriumhydroxid	Roth
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma
N-Laurylsarcosin	Sigma
Nickel-NTA Agarose	Qiagen
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Sigma
Proteaseinhibitoren	Roche
Saccharose Monohydrat	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
Schwefelsäure	Merck
Sorbitol	Roth
Streptavidin Qdot (15-20 nm Durchmesser)	Sigma
TEMED	Roth
Turbo TMB (1-step ELISA solution)	Perbio
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Merck
Trypton Pepton	Difco
Tryptophan	Roth
Tween 20	Merck
Vectashield (Anti-fade mounting fluid)	Linaris

2.4 Enzyme

2.4.1 Nukleasen

Tabelle 4: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>DNase</i> I (RNase frei)	Roche
<i>RNase</i> A	Qiagen

2.4.2 Restriktionsendonukleasen

Die hier verwendeten Enzyme wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen, folgende Enzyme wurden verwendet:

*Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hinc*II, *Hind*III, *Not*I, *Pvu*I, *Pvu*II, *Sma*I, *Sty*I, *Xba*I, *Xho*I

2.4.3 Polymerasen

Tabelle 5: Verwendete Polymerasen

Enzym	Hersteller
Taq Polymerase	Eigene Herstellung durch Fr. Volfson
Pfx Polymerase	Invitrogen

2.4.4 Andere Enzyme

Tabelle 6: Verwendete weitere Enzyme

Enzym	Hersteller
Ligase	Fermentas
Lysozym	Sigma
α -Mannosidase	Sigma
Proteinase K	Roche
Trypsin/EDTA	Invitrogen

2.5 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Primär-Antikörper

Primär-Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
DnaK (<i>C.trachomatis</i> L2)	Kaninchen	1:50 Immunfluoreszenz	(Birkelund, Lundemose et al., 1990)
		1: 500 Westernblot	
Momp-Serum	Kaninchen	1:10 Immunfluoreszenz	(Wuppermann, 2001)
GroEL-1	Maus	1:25	(Zhong)
Anti-Xpress Antikörper	Maus	1:500 Immunfluoreszenz	Invitrogen
Penta-His Antikörper	Maus	1:200 Immunfluoreszenz	Qiagen
		1:5000 Westernblot	
Invasin (# 497)	Maus	1:25 Immunfluoreszenz	(Dersch, 1999)
Pathfinder	Maus	1:4 Immunfluoreszenz	Bio-Rad
Pmp21-D Pab14	Kaninchen	pur Westernblot	diese Arbeit
Pmp21-D Pab15	Kaninchen	1:10 Immunfluoreszenz	diese Arbeit
		1:100 Westernblot	
Pmp21-E Pab41	Kaninchen	1:4 Immunfluoreszenz	diese Arbeit
		1:50 Westernblot	
Pmp21-E Pab42	Kaninchen	1:4 Immunfluoreszenz	diese Arbeit
		1:50 Westernblot	

Tabelle 8: Verwendete Sekundär-Antikörper

Sekundär-Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
Cy3-Anti-Maus	Kaninchen	1:200 Immunfluoreszenz	Sigma
Cy3-Anti-Kaninchen	Maus	1:200 Immunfluoreszenz	Sigma
AP-Anti-Maus	Kaninchen	1:7500 Westernblot	Promega
AP-Anti-Kaninchen	Maus	1: 7500 Westernblot	Promega
Qdot [®] Streptavidin conjugates		1:50 Immunfluoreszenz	Invitrogen

2.6 Kits

Tabelle 9: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Nucleo Spin Extract Kit	Macherey &-Nagel
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen
Qiagen Genomic Kit G20	Qiagen
QiaexII Gel Extraction Kit	Qiagen

2.7 DNA Längenstandard

λ -DNA

Herstellung durch Frau Volfson
geschnitten mit *EcoRI/HindIII* unter Erhalt
folgender Fragmentgrößen (in kb): 23100, 21200,
9420, 6560, 5150, 4250, 3540, 2300, 2030,
1910, 1580, 1380, 950, 83, 560, 130

2.8 Proteingrößenstandard

SeeBlue plus 2 (Proteingrößen in kDa: 250,148,98,64,50,36,22,16,6,4) Invitrogen
page ruler (Proteingrößen in kDa: 170,130,95,72,55,43,34,22,17) Invitrogen

2.9 Oligonukleotide

2.9.1 Oligonukleotide zur Amplifikation und Verifikation

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid Nr.	Sequenz (5'-3')	Name
C-247	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTG GTGGAATGGAAAGAAAATCAAGCATTAT	EGpmp21gaghin
C-248	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AGTGTGTATAGATGGCCCCTCC	EGpmp21gagher
C-249	TACGACGATGACGATAAGGTACCAGGATCCAGTGTG GTGGAACACCTCTCAGGTTTAAGGTT	EGpmp21startin
C-250	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AGATAATGCTTGATTTTCTTCCA	EGpmp21starter
C-251	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTG GTGGAACAAAACCTCAAAATTG	EGpmp21hin
C-252	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AGAGCTTTATCTTTATTGGGTGT	EGpmp21stop
C-286	TAGGAGCTCTGTTGCCATAGAAAGAAACGTTCCCTGC ATT	EGpmp21fl
C-291	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AGAGTTTTAGGAGGATAATGATC	EGpmp21sx
C-309	GCAATAACAGAAAATATTGAAAAACAGCGAAGTAAC TGCATGATATCGAATCCGAATTGATCC	Aga2ol3

Oligonukleotid Nr.	Sequenz (5'-3')	Name
C-310	CGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATT AATGCCACACCTCTACCGGCAGATC	pvuIIADH
C-312	GAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCCTCACCGGTC GCGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Aga1hin
C-313	TTGTGAACAGGTAGGTAAAATGAGCGAAAGATAATG TCATGATATCGAATTCGAATTGATCC	Aga1her
C-314	ATTAGAAGCCGCCGAGCGG	Gal1verhin
C-327	GCCTGTTGAACAAGTCTGGA	kanver
C-328	GAAGACTCTCCTCCGTGCGTC	Gal1verNEU
C-329	GCCGAAGCCATTAAGTTCT	VerLEU2hin
C-330	GATACCTGCATCCAAAACCTT	VerLEU2her
C-331	ACGCCAACCTGCCATCAC	Phleohin
C-332	GATGCCTGCAAGCAATTCGT	Phleoher
C-333	TTCGAAAATCATTTAATTGGTGGTGCTGCTATCGATG CTAAACTTCGTATAATGTATGCTAT	LEU2dishin
C-334	TTCAGGCAAGTTCAATGACAATTTCAACATCATTGCA GCAAATAACTTCGTATAGCATAACAT	LEU2disher
C-349	TTCGAAAATCATTTAATTGGTGGTGCTGCTATCGATG CTACAGCTGAAAGCTTCGTACGC	Leu2dishinNEU
C-350	TTCAGGCAAGTTCAATGACAATTTCAACATCATTGCA GCAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Leu2disherNEU
C-376	AGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATA GATTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACTTT GTCAGCAGGCATTGCTTTT	pAC2Pmp21-Nhin
C-377	CCTTCATTAATTTTTAACTCC	pAC2Pmp21-Nforward
C-378	CCAAACCAGCTTTTGATCGAT	pAC2Pmp21-Nback
C-386	AATACAGGAAATCTGAGATT	pAC2Pmp21N-newforw
C-387	GTAGAAGAGGAAGTGCCACC	Pmp21_Ehin05
C-388	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTG GTGGAAGTAGAAGAGGAAGTGCCACC	Pmp21_Ehin05hin1
C-389	CGCAAACCGCCTCTCCCCG	tetO_ver
C-396	CTGATACCGCTCGCCGACG	vertetOher
C-421	TGGCGAAAGGGGGATGTGCT	PAC2verher
C-431	CTGAAGATTATGCTGGTGGGA	pAC2Dperhin
C-432	ACGGGAGCTGTTTCTTGAGGAGCTACATATTTTTGAG CAA	pAC2Dkorher
C-433	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AGTGATTCCACGGGAGCTGTTTC	Pmp21Dshort

Oligonukleotid Nr.	Sequenz (5'-3')	Name
C-434	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AGGGAATCTAGAAGAACATTAT	Pmp21Dshorty
C-439	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTG GTGGAAATGTTTGAGAAGTTCACTAATAG	pEGcpn0437hin
C-440	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AGCTATGATTCCAAGTGAGGGCTAG	pEGcpn0437her
C-444	GTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCG CTGAGGTGGCGGTCATCACCATCACCATCACTGGAAA GAAAATCAAGCATTAT	HK5Pmp21Dhin
C-445	AGAAGCTTCTAGACCATGGATCAGGCGTTGGAGGCCT AGGAGCTTAAGTTTTAGGAGGATAATGATC	HK5Pmp21Dher
C-455	AGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATA GATTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGCA CATTCTTACACAGCTCA	pAC2Pmp21N2hin
C-456	AGTCACGACGTTGTAAAA CGA CGGCCAGTGCCAAGTTAAGCTTATCTTTATTGGGTG	pAC2Pmp21N2her
C-461	GCAACTATGGATGAACGAAAT	SeqpKm17hin
C-462	TTCATCGATAGATCTCGAGAA	SeqpKM17her
C-463	GAGAAGCTTCTAGACCATGGATCAGGCGTTGGAGGCC TAGGATTAGCTTTATCTTTATTGGGTGTA	pKM17Fher
C-464	AGAAGCTTCTAGACCATGGATCAGGCGTTGGAGGCCT AGGAGTTAAGTTTTAGGAGGATAATGATC	pKm17Dher
C-465	AGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATC GCTGAGGTGGCGGTGCATCACCATCACCATCACAAA ACCTCAAAAATTGTAAAGAA	pKM17Fhin
C-466	AGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATC GCTGAGGTGGCGGTGCATCACCATCACCATCACTGGA AAGAAAATCAAGCATTAT	pKM17Dhin
C-467	TTAATATAAATATATAAATT	cenileu
C-468	ATGTCACGCTTACATTCACG	Cyc1term
C-478	GTCGACCCAGCTCCTAGGCCTCCAACGCCTGATCC	pKM17Dhinmcs
	ATGGGTGGCGGTGCATCACCATCACCATCACTGGA	
	AAGAAAATCAAGCATTAT	
C-479	TAGGGATCCGATATCGGTACCGAATTCATCGATAG	pKM17Dhermcs
	ATCTTTAAGTTTTAGGAGGATAATGATC	
C-480	GAAATCAGGGAAACATAGCAT	SeqPmp21pAC2

Oligonukleotid Nr.	Sequenz (5'-3')	Name
C-487	TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGA GCTCCACCGCGG CGCAAACCGCCTCTCCC	pRS315tethin
C-488	CAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACG GTAATGGTGATGGTGATGATGAC	pRS315tether
C-497	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCA	Pmp21-X1hin
	GTGTGGTGGGAAGCACATTCTTACACAGCTC	
C-498	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTA	Pmp21-X1her
	GACTCGAGCAAGGCGGTGTTTCGTTGT	
C-499	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCC	Pmp21-X2hin
	AGTGTGGTGGGAAGTAGAAGAGGAAGTGCCACC	
C-500	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCT	Pmp21-X2her
	AGACTCGAGTGTATAGATGGCCCCTCCACCAA	
C-501	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AG ATTCTGCTTAAAGGCAACTTC	Pmp21-shorty2
C-502	GTCGACCCAGCTCCTAGGCCTCCAACGCCTGATCCAT GGGTGGCGGTGCATCACCATCACCATCAC GCACATTCCTTACACAGCTC	pKM17-Pmp21Nhin
C-503	TAGGGATCCGATATCGGTACCGAATTCATCGATAGAT CTTACTCATGTTAATTTGAACTCCG	pKM17-Pmp21Nher
C-504	ACCCCCATCCATACTCTAGAACTAGTGGATCC ATG GCACATTCCTTACACAGCTC	GFP-35Pmp21Nhin
C-505	GAGGTGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCC TGC CATGTTAATTTGAACTCCGG	GFP-35Pmp21Nher
C-506	ATGGTATGGATGAATTGTACAAATCTAGAACTAGTGG ATCC GCACATTCCTTACACAGCTC	GFP-36Pmp21hin
C-507	AGGTGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCT GCAG TTA CATGTTAATTTGAACTCCGG	GFP-36Pmp21her
C-515	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AGTCCACCTACAAAATCTGTAA	pEGPmp21shorty3her
C-552	AGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATA GATTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGTA GAAGAGGAAGTGCCACC	pAC2_X2hin

Oligonukleotid Nr.	Sequenz (5'-3')	Name
C-553	AGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGTT ATGTATAGATGGCCCCTCCACCAA	pAC2_X2her
C-554	CAGTCACGACGTTGTAAAAC	SeqpRShin
C-555	TCTTCTTTTCTCTAAATATT	SeqpRShin
C-556	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTG GTGGAAATGTCTAAAGGTGAAGAATTAT	pEGGFPhin
C-568	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTG GTGGAAGTAGAGCTTTCTGCTGTCAA	pEG_F1hin
C-569	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AGCATGTTAATTTGAACTCCGGC	pEG_F1her
C-570	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTG GTGGAACTCAGATTGCTGCTATACAA	pEG_F2hin
C-592	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AG GATTTTTGAGTCATTCCCGC	PEG_F3her
C-599	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AGAATTGCATCTTGAAAATAATAT	pEG-F4her
C-600	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AGAGGACTGACATCTTTATCTGG	pEG-F5her
C-601	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AG GCTGTCATCTTGTGGCTTGG	pEG-F6her
C-602	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTG GTGGAAGCCTTTTATAGTAACGAGGCT	Pmp20-hin
C-603	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AG TAGATTGTTTTTAAAGAAAATac	Pmp20-her
C-604	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AG AAGTAAGCACACCATTTC	Pmp20759her
C-605	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTG GTGGAA CTATTTAGCAACAACCTCTGctg	Pmp20936hin
C-606	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTG GTGGAA TCTTTCTATGGCAACAGAGC	Pmp21_F7hin
C-607	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCG AG GATATTCCTTCAAATAAGATA	Pmp21_F7her
C-608	AGCAATCGTTGAAGCCGTAA	Pmp20Nseq1
C-609	AATCCAACAGTGCACGGGAA	Pmp20Nseq2
C-610	GGGGCTTACGTTACTAAAAC	Pmp20flseq3
C-611	TAAAACGGACTGTTCTTTTAC	Pmp20flseq4

Oligonukleotid Nr.	Sequenz (5'-3')	Name
C-612	ACAGGAAACTCTGTTATCAAT	Pmp20flseq5
C-639	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGCTCG GTAGCACATTCCTTACACAGCTC	KM32 Pmp21-Nhin
C-640	GATCTATCAACAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGC TTGGCTGCAGGTCTTA CATGTTAATTTGAACTCCGGC	Km32 Pmp21-Nher
C-641	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGCTCG GTA GTAGAAGAGGAAGTGCCACC	KM32 Pmp21-Ehin
C-642	GATCTATCAACAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGC TTGGCTGCAGGTCTTAAGTTTTAGGAGGATAATGATC	KM32 Pmp21-Gher
C-643	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGCTCG GTA CAAAACCTCAAAATTGTAAAGA	KM32 Pmp21-Dhin
C-648	CCTCCGTCTGCAATTTGGACACCAGCACCCTAGGAG CTCTGTTGCCATAGGAAGAAACGTT	MutFher1f
C-649	AAACAGTTCCTCCGTCTGCAATTTGGACACCAGCACC ACTAGGAGCTCTGACGCCATAGAA	MutFher1n
C-1090	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGCTCG GTA TGGAAAGAAAATCAAGCATTAT	pKM32-Pmp21-Bhin
C-1091	AATCCACCTGCAAGGTTATTTTGCACCTCATGGTTGC GAGCAGTCAAACGAGAAAAATCT	pKM32-Pmp21Adelher
C-1092	GAGAAGATGTAACCTTTATAAGAAAATGCTAAA	pKM32-Pmp21-Amuther

2.9.2 Sequenzierungsoligonukleotide

Tabelle 11: Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung

Oligonukleotid-Nr.	Sequenz (5'-3')	Name
C-192	ATGCAAGGAGTTTTTGAATAT	Aga2-Seq2
C-203	TCAGCGGGTTTAAACTC	Aga2-Seq3
C-266	TTTTGGAGGAGATATCTTAT	SeqPe1050
C-267	CTTGGAGAGCATATAGGGCT	SeqPg1050
C-268	AGAGAACATCAATATTATTG	SeqPg1400
C-269	CTTGTAGTCATGGAGATCAT	SeqPg1780
C-270	AGGAGGAGGTGCTTTGCTTT	SeqPg2000
C-271	GAAGCACATTCCTTACACAG	SeqPs1050
C-272	CCAAAGAGAATAGAAAAGAC	SeqPs1420

Oligonukleotid-Nr.	Sequenz (5'-3')	Name
C-294	AAACAGTTTFAFFAACATTCT	Psx1100
C-295	TCTTCTCAGTCTATCTCTGAA	Psx1609
C-296	CTTGGAGAGCATATAGGGCTT	Px1051
C-298	AAAATATGTAGCTCCTCAAG	Pg1700
C-299	ATGTGTAAAAACACTTCTA	Psx2300
C-308	CCTCGGTCTCGATTCTACGCG	Omp5C2560
C-311	GCGCTATTGAATTTTCAGG	Pmpsx2171

2.10 Plasmide

Tabelle 12: Verwendete Plasmide

Plasmid	Genetische Marker, Konstruktion	Nr. der Laborinternen Plasmidsammlung
pAC2	Culjak, 2001	1070
pYD1	Invitrogen	1104
pKM32	pQE-31 geschnitten mit XbaI/PvuII. Integration von CEN6 ARS URA3 von pAC2 (Oligonukleotide C-613/ C-614)	K. Mülleken
pEG6	pYD1 geschnitten mit PvuII, Integration des tetO7-CYC1-Promotors	1183
pEG10	pEG6 geschnitten mit NotI, Integration des pmp21-D-1-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-501/ C-251 auf GiD <i>C. pn.</i> DNA	1241
pEG11	pEG6 geschnitten mit NotI, Integration des pmp21-D-2-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-515/ C-247 auf GiD <i>C. pn.</i> DNA	1242
pEG12	pEG6 geschnitten mit NotI, Integration des pmp21-A-Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-497/ C-498 auf GiD <i>C. pn.</i> DNA	1243
pEG13	pEG6 geschnitten mit NotI, Integration des pmp21-C-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-499/ C-500 auf GiD <i>C. pn.</i> DNA	1244
pEG14	pKM17 geschnitten mit NotI, Integration des pmp21-D-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-463/ C-465 auf GiD <i>C. pn.</i> DNA	1245
pEG15	pKM17 geschnitten mit NotI, Integration des pmp21-B-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-464/ C-466 auf GiD <i>C. pn.</i> DNA	1246

Plasmid	Genetische Marker, Konstruktion	Nr. der Laborinternen Plasmidsammlung
pEG16	pAC2 geschnitten mit EcoRI/BglIII, Integration des pmp21-N-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-455/ C-456, bp) auf GiD C. pn. DNA	1247
pEG17	pKM11 geschnitten mit SacI, Integration des tetOCycI Promotors, generiert mit den Oligonukleotiden C-312/ C-313 auf pAH3	1331
pEG18	pAC2 geschnitten mit EcoRI/BglIII, Integration des pmp21-D-Fragments generiert mit den Oligonukleotide C-337/ C-338 auf GiD C. pn. DNA	1332
pEG19	pEG6 geschnitten mit NotI, Integration des pmp21-D-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-251/ C-252 auf GiD C. pn. DNA	1333
pEG20	pAC2 geschnitten mit EcoRI/BglIII, Integration des pmp21-C-Fragments, generiert mit den Oligonukleotide C-552/ C-553 auf GiD C. pn. DNA	1334
pEG21	pAC2 geschnitten mit EcoRI/BglIII, Integration des pmp21-N-Fragments in Fusion mit mbp, generiert mit den Oligonukleotiden C-538/ C-539	1335
pEG22	pKM17 geschnitten mit NotI, Integration von His6 , generiert mit den Oligonukleotide C-564/ C-565	1336
pEG23	pKM32 geschnitten mit SmaI, Integration des pmp21-D-Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-643/ C-640 auf GiD C. pn. DNA	1337
pEG24	pEG6 geschnitten mit NotI, Integration des pmp20-N-Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-337/ C-338 auf GiD C. pn. DNA	1338
pEG25	pEG6 geschnitten mit NotI, Integration des pmp20-C-Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-605/ C-603 auf GiD C. pn. DNA	1339
pEG26	pEG6 geschnitten mit NotI, Integration des pmp21-N-Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-252/C-249 auf GiD C. pn. DNA	1340
pEG27	pKM32 geschnitten mit SmaI, Integration des pmp21-E-Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-641/C-640 auf GiD C. pn. DNA	1341
pEG28	pKM32 geschnitten mit SmaI, Integration des pmp21-N-Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-639/ C-640 auf GiD C. pn. DNA	1342
pEG29	pKM32 geschnitten mit SmaI, Integration des pmp21-B -Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-1090/ C-642 auf pEG5. DNA	1600
pEG30	pEG6 geschnitten mit NotI, Integration des pmp21-A-Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-497/C-498 auf pEG5 DNA	1601
pEG31	pKM32 geschnitten mit SmaI, Integration des pmp21-A _{del} -Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-272/ C-1091 auf pEG5. DNA	1602

Plasmid	Genetische Marker, Konstruktion	Nr. der Laborinternen Plasmidsammlung
pEG32	pKM32 geschnitten mit <i>Sma</i> I, Integration des pmp21-Amut -Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-639/ C-1092 auf pEG5. DNA	1603
pEG33	pKM32 geschnitten mit <i>Sma</i> I, Integration des pmp21-A -Fragments, generiert über Ligation, geschnitten aus pEG5 mit <i>Bam</i> HI/ <i>xho</i> I	1604
pEG34	pEG4 geschnitten mit <i>Not</i> I, Integration des pmp21-Dmut1-Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-649/C-192 pEG5 DNA	1605
pEG35	pEG4 geschnitten mit <i>Not</i> I, Integration des pmp21-Dmut2-Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-647/C-192 pEG5 DNA	1606
pEG36	pEG4 geschnitten mit <i>Not</i> I, Integration des pmp21-Dmut3-Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-649/C-192 auf GiD pEG5 DNA	1607
pEG37	pEG6 geschnitten mit <i>Not</i> I, Integration des pmp21-Dmut4-Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-192/C-646 auf GiD pEG5 DNA	1608
pEG38	pKM32 geschnitten mit <i>Sma</i> I, Integration des pmp21-Dmut1 -Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-640/ C-643 auf pEG34 DNA	1609
pEG39	pKM32 geschnitten mit <i>Sma</i> I, Integration des pmp21-Dmut3 -Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-640/ C-643 auf pEG36 DNA	1610
pEG40	pKM32 geschnitten mit <i>Sma</i> I, Integration des pmp21-Dmut4 -Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-640/ C-643 auf pEG37 DNA	1611

2.11 Zellen und Zelllinien

2.11.1 Prokaryotische Zellen / Isolate

2.11.1.1 *Escherichia coli*:

XL₁-blue: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac⁻ [F'proAB lac1^q ΔM15 Tn10(tet^r)]* (Stratagene)

2.11.1.2 *Chlamydia pneumoniae*:

GiD; Herkunft: Giessener Isolat eines Patienten mit akuter Bronchitis (Jantos, Heck et al. 1997)

2.11.1.3 *Chlamydia trachomatis* L2:

(ATCC Nr.: VR-902B)

2.11.2 Eukaryotische Zellen / Isolate

2.11.2.1 HEp-2 Zelllinie (ATCC Nr.: CCL 23)

Larynxkarzinom-Zelllinie mit epithelialer Morphologie, menschlichen Ursprungs, HeLa Morphologie (ECACC NR.: 86030501; ATCC Nr. CCL-23)

2.11.3 *Saccharomyces cerevisiae*:

EBY-100: MATa *ura3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4:HIS3 prb1Δ.6R can1 GAL AGA1::pIU211* (Boder and Wittrup 1997)

CEN.PK 2-1C: MATa *leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3Δ1 MAL2-8^c SUC2* (Entian, Schuster et al. 1999)

YEG2: MATa *ura3-52 trp1 LEU2 his3Δ200 pep4:HIS3 prb1Δ.6R can1 GAL AGA1::pIU211 leu2Δ1::pCM149*. Der *GAL1*- Promotor vor *AGA1* wurde ersetzt gegen den *tetO₇-CYC1*-Promotor. (Gossen und Bujard, 1993; Gari et al., 1997, Georgoudis, 2004)

2.12 Medien und Anzucht

2.12.1 Zell- und Chlamydienkulturmedium

Tabelle 13: Verwendete Zellkulturmedien

Medien	Hersteller
Minimal Essential Medium, with Earle's Salts, mit HEPES, ohne L-Glutamin	Invitrogen
Ham's F12-K Nutrient mixture	Invitrogen

2.12.2 Mediumzusätze und Waschlösung

Tabelle 14: Verwendete Mediumzusätze

Zusätze und Waschlösungen	Hersteller
Cycloheximid (Actidione) Endkonzentration (1,2 µg/ml)	Sigma
Fötales Kälberserum (FKS), dialysiert, hitzeinaktiviert, Endkonzentration (10 %)	Invitrogen
Fungizone (Amphotericin B) Endkonzentration (2,5 µg/ml)	Invitrogen
Gentamycin Endkonzentration (20 µg/ml)	Invitrogen
L-Glutamin Endkonzentration (1 mM)	Invitrogen
Nicht-essentielle Aminosäuren (MEM) Endkonzentration (1 x)	Invitrogen
Vitaminlösung (MEM) Endkonzentration (1 x)	Biochrone
Hanks' Salzlösung (HBSS)	Invitrogen

2.12.3 Medien für *Escherichia coli*

LB Medium:

10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 13,5 g Agar (Nur bei Platten)

in einem Liter deionisierten Wasser lösen, autoklavieren und in 250 ml Flaschen portionieren bzw. Platten gießen. Nach dem Autoklavieren:

Zugabe von Ampicillin, Endkonzentration 50 mg/l.

2.12.4 Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

YPD⁺ Medium:

10 g Hefeextrakt
 20 g Trypton Pepton
 13,5 g Agar (bei Platten)
 2 ml Adeninstocklsg. (2 mg/ ml)
 4 ml Tryptophanstocklsg. (5 mg/ ml)

in 894 ml deion. Wasser lösen und autoklavieren. 20 g Glucose in 100 ml deion. Wasser lösen getrennt autoklavieren.

Alle Zutaten in einem Endvolumen von 1 Liter lösen, in 250 ml Flaschen portionieren und autoklavieren. Gegebenenfalls Platten gießen.

SD- Minimalmedium (SD + 24) (Platten):

20 g Glucose

20 g Agar

1,7 g Hefe Nitrogen Base (YNB)

5 g Ammoniumsulfat

2 g Drop-out mix

In 1000 ml deion. Wasser lösen vor dem Autoklavieren mit 1M NaOH den pH=6 einstellen.

Aminosäure-Mix (Drop out mix):

Der Drop-out mix ist die Kombination aus den folgenden Aminosäuren, Basen und Chemikalien unter Weglassung der entsprechenden Aminosäuren, Basen oder Chemikalien. Der Mix soll mindestens 15 Minuten mit sauberen Mahlkugeln gemischt werden.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Aminosäure- Mixes

Adenin	0,5 g	Leucin	10,0 g
Alanin	2,0 g	Lysin	2,0 g
Arginin	2,0 g	Methionin	2,0 g
Asparagin	2,0 g	para-Aminobenzoesäure	2,0 g
Asparaginsäure	2,0 g	Phenylalanin	2,0 g
Cystein	2,0 g	Prolin	2,0 g
Glutamin	2,0 g	Serin	2,0 g
Glutaminsäure	2,0 g	Threonin	2,0 g
Glycin	2,0 g	Tryptophan	2,0 g
Histidin	2,0 g	Tyrosin	2,0 g
Inositol	2,0 g	Uracil	2,0 g
Isoleucin	2,0 g	Valin	2,0 g

SD-Minimalmedium flüssig:

1,7 g Hefe Stickstoffquelle

5 g Ammoniumsulfat

2 g Drop-out mix

Die entsprechende Aminosäure oder Base für das Minimalmedium weglassen. In 1000 ml deion. Wasser lösen. Die entsprechende Kohlenstoffquelle wird als 20%ige Stocklösung separat autoklaviert und nachträglich dem Medium zugefügt.

3 METHODEN

3.1 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefe *S. cerevisiae* wurde in Fest und Flüssigmedien bei 30 °C kultiviert. Die entsprechenden Medien sind wie unter 2.12.4 beschrieben zusammengesetzt.

3.1.1 Induktion von Oberflächen-präsentierten Proteinen in der Hefe *S. cerevisiae*

3.1.1.1 Ansetzen der Induktionskultur

Um die Genexpression Oberflächen-präsentierter Proteine in der Hefe zu induzieren, müssen die Zellen in Induktionsmedien kultiviert werden. In dem hier verwendeten Hefe-Oberflächenexpressionssystem unterliegen die Gene der Kontrolle des *tetO-CYC1*-Promotors (Georgoudis, 2004). Um die Proteinexpression zu ermöglichen, wird Induktionsmedium 2.12.4 mit Glukose als Kohlenstoffquelle verwendet.

Die selektive Hefeinduktionskultur wird wie folgt angesetzt:

- 5 ml SD-Medium (SD Trp⁻) wird mit einer frischen Hefekolonie beimpft und bei 30 °C unter rotierendem Schütteln über Nacht inkubiert.
- Die OD₆₀₀ wird photometrisch bestimmt und die Zellen können nun den verschiedenen Verwendungszwecken wie Adhäsionstests (s. Abschnitt 3.8) zugeführt werden.

3.1.1.2 Aufarbeitung der Proteinproben für SDS-Polyacrylamidgele

- Zum Nachweis der Proteininduktion wird die OD₆₀₀ von Hefezellen nach 24 Stunden Kultivierung in SD-Medium bestimmt.
- Für Proteinextrakte aus Hefezellen wird eine OD₆₀₀ von 4 an Zellen geerntet und 1 min. bei 13 000 rpm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Das Zellpellet wird in 1 ml ddWasser gewaschen und erneut für 1 min. bei 13 000 rpm zentrifugiert.
- Das Pellet wird in 32,5 µl dest. Wasser resuspendiert.
- Es werden 12,5 µl Ladegelpuffer (4-fach konzentriert) (50 MM Tris/HCL pH:6,9; 2 % SDS; 0,1 % Bromphenolblau; 5 % Glyzerin) zugegeben.
- Es werden 5 µl 1 M DTT zugegeben.

- Die Probe wird 30 min. bei 100 °C gekocht und dann auf Eis abgekühlt.
- Die Probe wird mittels Westernblot analysiert.

3.1.2 Indirekte Immunfluoreszenz

3.1.2.1 Präparation und Fixierung der Hefezellen

- Eine 5 ml Hefe-Induktionskultur wird mit 500 µl frisch angesetztem para-Formaldehyd (3,7%) versetzt und für 5 min. bei RT inkubiert.
- Die Zellen werden 2 min. bei 3500 Upm (Megafuge 1.0) pelletiert.
- Das Pellet wird vorsichtig zweimal mit 5 ml PBS gewaschen.
- Das Zellpellet wird in 1 ml PBS resuspendiert und kann für zirka 3 Tage bei 4°C gelagert werden.

3.1.2.2 Fluoreszenz-Markierung Oberflächen-präsentierter Proteine

- Ein Multiwell-Objektträger wird mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet
- Pro Vertiefung werden 20 µl Poly-L-Lysin (0,5 mg/ml) aufgetragen und für 10 min. bei RT inkubiert.
- Das Poly-L-Lysin wird mit dest. Wasser vom Objektträger abgewaschen und erneut getrocknet.
- Pro Vertiefung werden 20 µl der Hefezellsuspension aus 3.1.2.1 aufgetragen und für 10 min. bei RT in einer feuchten, geschlossenen Kammer inkubiert.
- Die Zellen werden durch 20 µl Blockierungslösung (BSA 1%, Tween 20 0,5%, PBS pH:7,4) ersetzt und für weitere 30 min. in der feuchten Kammer inkubiert.
- Der primäre AK (anti-Xpress) wird 1:500 in Blockierungslösung verdünnt und pro Well werden 20 µl aufgetragen und für 2 Stunden bei RT (oder ÜN bei 4 °) inkubiert.
- Die Vertiefungen werden viermal mit 20 µl Blockierungspuffer gewaschen, und dann durch je 20 µl des sekundären AK (Cy3-Anit-Maus, 1:200) ersetzt.
- 2 Stunden nach der Inkubation werden die Vertiefungen mit je 20 µl Blockierungspuffer gewaschen.
- Die Zellen werden auf den Vertiefungen ca. 5-10 min. bei RT angetrocknet und mit je 1 µl Vectashield beschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und durch Nagellack versiegelt.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann die Fluoreszenz betrachtet werden.

3.1.3 Manipulation von Hefe-Zellen

3.1.3.1 DNA-Isolation aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Isolation der DNA erfolgte über Aufschluss der Hefezellen mittels Glasperlen und unter Verwendung des Prinzips der alkalischen (Fink und Guthrie, 1983).

3.1.3.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Um Plasmide und Integrationskassetten in Hefe zu transformieren, wurde ein hocheffizientes Transformationsprotokoll angewandt (Gietz, Schiestl et al. 1995).

3.1.4 Integration von DNA-Fragmenten in einen Vektor über homologe in vivo Rekombination

Um ein gewünschtes DNA-Fragment in einen Expressionsvektor einzubringen, wird diese DNA über PCR amplifiziert. Für die PCR werden zwei spezifische Oligonukleotide verwendet, die jeweils 40 Nukleotide Homologie zum Zielplasmid, sowie 18-22 Nukleotide Homologie zum Zielgen besitzen. Das erhaltene PCR-Produkt wird zusammen mit dem zuvor linearisierten Plasmid in die Hefe transformiert. In der Hefe wird infolge der homologen Bereiche das amplifizierte Gen über homologe Rekombination in das Plasmid integriert. Für die Integration von DNA-Fragmenten in einen genomischen Locus wird mittels PCR eine sogenannte Integrationskassette generiert, welche die wie oben beschriebenen Homologien besitzt und über diese in den genomischen Locus integriert.

3.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen in der Zellkultur

3.2.1 Herstellung des Zellkulturmediums für HEp-2 Zellen

500 ml Minimal Essential Medium (MEM) + HEPES (25 mM) + „Earle’s salts“; (ohne Glutamin) wird um folgende Zusätze erweitert:

- 50 ml hitzeinaktiviertes FKS (Endkonzentration: 10 %),
- 5 g Glucose (Endkonzentration: 1 x),
- 5 ml Vitamine (Endkonzentration: 1 x),
- 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration: 2 mM),

- 5 ml nicht essentielle Aminosäuren (Endkonzentration: 1 x),
- 5 ml Amphotericin B (Endkonzentration: 2,5 µg/ml),
- 0,5 ml Gentamycin (Endkonzentration: 50 µg/ml).

3.2.2 Herstellung aller Stammlösungen für die Zellkultur

3.2.2.1 Hitzeinaktivierung von fötalem Kälber-Serum (FKS):

- 50 ml FKS werden aus dem -80 Gefrierschrank genommen und bei Raumtemperatur für 90 min. angetaut, so dass sich zwischen Eis und Flaschenglas ein Flüssigkeitsfilm bilden kann.
- Anschließend wird das Serum für 25 min bei 20 °C im Wasserbad erwärmt.
- Es folgt eine Erwärmung für 35 min. bei 37 °C, wobei das FKS vollständig auftaut.
- Die Hitzeinaktivierung erfolgt bei 56 °C für 60 min. im Wasserbad bei gelegentlichem durchmischen des FKS.
- Anschließend wird das FKS in 50 ml Aliquots in Schraubverschlussröhrchen portioniert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.2.2.2 Herstellung einer Glukoselösung:

- 100 g Glukosemonohydrat (w/v) werden unter Rühren und leichtem Erwärmen (max. 40 °C) mit destilliertem Wasser in einem Gesamtvolumen von 100 ml gelöst und anschließend autoklaviert.
- Nach dem Autoklavieren wird die sterile Lösung in je 5 ml Portionen in Falkons bei -20 °C gelagert.

3.2.2.3 Vitamine, Aminosäuren und Antibiotika:

Vitamine, L-Glutamin und Amphotericin werden ebenfalls in 5 ml Portionen bei -20°C gelagert.

3.2.2.4 Herstellung der Trypsinlösung:

Die 10 x Trypsin/EDTA- Gebrauchsfertige Lösung wird ebenfalls als 5 ml Portionen bei -20 °C gelagert und zum Gebrauch mit 95 ml Hank's Lösung (HBSS) 1:20 verdünnt. Die Gebrauchsfertige Lösung (0,5 x Trypsin/EDTA) wird bei 4 °C gelagert.

3.2.3 Auftauen und Aussähen von HEp-2 Zellen

- Das Einfrierröhrchen mit HEp-2 Zellen ($3,5 \times 10^7$) wird aus -70°C im 37°C Inkubationsschrank schnell aufgetaut.
- Wenn das Eis aufgetaut ist, das Röhrchen kurz vortexen.
- Die Zellsuspension wird mit 10 ml Zellkulturmedium gemischt.
- Dann wird die Suspension für 10 min bei 43,3 x g (500 rpm/ Rotanta 460R) zentrifugiert.

- Das Pellet wird in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und eine 25 cm² oder eine 80 cm² Flasche mit 3 ml bzw. mit 5 ml geimpft.

3.2.4 Trypsin-Behandlung und Ernten von HEp-2 Zellen

- Das Zellkulturmedium wird aus einer konfluent mit Zellen bewachsenen Zellkulturflasche (80 cm²) mit einer sterilen Pipette abgenommen.
- Die in der Flasche verbliebenden Zellen werden einmal mit 7 ml Hank's-Lösung (HBSS) vorsichtig gewaschen.
- Die Zugabe von 5 ml Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung führt zum Ablösen der Zellen, welches durch leichtes Schwenken der Flasche gefördert wird.
- Es werden 5 ml Zellkulturmedium dazu pipettiert und die Suspension vorsichtig gemischt.
- Die Suspension wird im 12 ml Schraubverschlussröhrchen 10 min. bei 43,3 x g (500 rpm/ Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgenommen und verworfen.
- Das Sediment wird in 5 ml Zellkulturmedium vorsichtig resuspendiert.

3.2.5 Passagieren von HEp-2 Zellen

Passage von HEp-2 Zellen in 24-Well Platten für den Adhäsionstest

- In die steril geöffnete Wellplatte wird pro Well ein steriles Glasplättchen hineingelegt.
- 1 ml der durch Abtrypsinierung gewonnenen Zellsuspension wird in einem 12 ml Zentrifugenröhrchen mit 9 ml Zellkulturmedium gemischt.
- Die gewünschte Zellzahl wird je 1 ml aufgenommen und in die vorbereiteten Wells pipettiert.
- Es folgt eine Wachstumsperiode von 2-3 Tagen bei 37 °C, 6% CO₂ im Inkubationsschrank.

3.2.6 Passage von HEp-2 Zellen in kleine Zellkulturflaschen (25 cm²)

- In jede Flasche werden 5 ml Zellkulturmedium vorgelegt und 0,5 ml abtrypsinierte Zellen (2×10^5 Zellen) dazu pipettiert.
- Die Flaschen werden kurz geschwenkt und anschließend bei 37 °C, 6 % CO₂ und leicht geöffnetem Deckel für 3-4 Tage im Inkubationsschrank inkubiert.

3.2.6.1 Passage von HEp-2 Zellen in große Zellkulturflaschen (80 cm²)

- In jede Zellkulturflasche werden 15 ml Zellkulturmedium und 1 ml der abtrypsinisierten Zellsuspension (4×10^5 Zellen) pipettiert.
- Die Flaschen werden kurz geschwenkt und anschließend bei 37 °C, 6 % CO₂ und leicht geöffnetem Deckel für 3-4 Tage inkubiert.

3.2.7 Einfrieren von eukaryotischen Zellen

- Aus einer konfluent bewachsenen großen Zellkulturflasche (80cm²) wird das Medium abgenommen.
- Es folgt einmaliges waschen der Zellen mit HBSS-Lösung
- Der Zellrasen wird durch Zugabe von 5 ml Trypsin/EDTA (0,5 x) abtrypsinisiert.
- Die Suspension wird mit 5 ml Zellkulturmedium in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min. bei 43,3 x g zentrifugiert.
- Das Sediment wird in 1ml Einfriermedium (90% FKS, 10% DMSO) resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen überführt.
- Die Zellen werden schonend in einer Isopropanol-Einfrierbox bei -70°C eingefroren.

3.2.8 Bestimmung der Zellzahl

In manchen Experimenten, z.B. Adhäsionstest, muss die Anzahl der einzusetzenden HEp-2 Zellen bestimmt werden. Diese kann mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt werden.

- Nach Abtrypsinierung der Zellen werden diese bei 55 x g für 10 min. zentrifugiert und in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert.
- Einige Mikroliter werden aus der Suspension abgenommen und in der Zählkammer ausgezählt.
- Mit Hilfe des spezifischen Verdünnungsfaktors wird die Zellzahl pro ml berechnet.

3.3 Chlamydienkultur

3.3.1 Herstellung des Chlamydienkulturmediums

Das Medium entspricht dem Zellkulturmedium, enthält aber noch Cycloheximid in einer Konzentration von 1,2 µg/ml.

3.3.2 Herstellung der Lösungen für die Chlamydienkultur

10 mg Cycloheximid (Stocklösung) werden in 100 ml HBSS aufgelöst, steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.3.3 Herstellung des Einfriermediums für Chlamydien

Saccharose-Phosphat-Glutaminsäure-Puffer (SPG-Puffer):

75,0 g	Saccharose
0,52 g	KH ₂ PO ₄
1,53 g	Na ₂ HPO ₄
0,72 g	Glutaminsäure

Die Lösung wird auf 1000 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und autoklaviert. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

3.3.4 Auftauen von Chlamydien zur Kultivierung

- Ein Kryoröhrchen wird aus -80°C entnommen und im Inkubationsschrank bei 37 °C erwärmt.
- Die Chlamydien suspension wird in 10 ml Zellkulturmedium pipettiert und leicht gemischt

Bei hohen Infektionsdosen können 1-4 kleine Zellkulturflaschen infiziert werden.

3.3.5 Passage von Chlamydien in kleine Zellkulturflaschen (25 cm²)

- Eine aufgetaute Chlamydien suspension wird in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen.
- Das Zellkulturmedium einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche (25 cm²) wird abgenommen und die Chlamydien suspension in die Flasche pipettiert.
- Die Flaschen werden 60 min. bei 1560 x g (3000 rpm/ Rotanta 460R) bei 30°C zentrifugiert.
- Anschließend werden die Flaschen 60 min. zur Adsorption bei 37 °C im Inkubationsschrank inkubiert.
- Nach der Inkubation wird das Medium aus jeder Flasche gegen 8 ml Chlamydienmedium ausgetauscht.
- Dann werden die infizierten Zellen bei 37 °C und 6 % CO₂ für 3-5 Tage inkubiert.
- Nach 3-5 Tagen werden die Flaschen im Phasenkontrastmikroskop bei 100-200facher Gesamtvergrößerung nach Einschlusskörpern durchgemustert.
- Lösen sich die Zellen vom Flaschengrund ab, liegt eine starke Infektion vor. Die Chlamydien können bei der nächsten Passage mindestens 1:4 verdünnt werden.
- Die infizierten Zellen werden mit Hilfe eines sterilen Zellschabers vom Flaschengrund gelöst.
- Die Suspension von 5-6 kleinen Flaschen wird in ein Zentrifugenröhrchen (50ml) überführt. Für eine 1:2 Verdünnung wird in ein 50 ml- Zentrifugenröhrchen die entsprechende Menge an Zellkulturmedium vorgelegt und die Zellsuspension dazugegeben.
- Die Suspension wird 45 sek. beschallt und dann für 10 min bei 1560 x g (3000 rpm/ Rotanta 460R) zentrifugiert (Differentialzentrifugation).
- Der Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und die Zentrifugation wird wiederholt.
- Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes wird zur Infektion neuer Zellkulturflaschen verwendet oder eingefroren.

3.3.6 Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien

- Die geerntete differentialzentrifugierte Chlamydien suspension wird in ein steriles Ultrazentrifugenröhrchen überführt und 30 min bei 30000 x g und 4 °C (Avanti J-25, Beckman) zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Pellet vorsichtig in 1 ml SPG-Puffer resuspendiert.
- Die Suspension wird in ein Kryo-Röhrchen überführt und bei -70 °C gelagert.

3.3.7 Reinigung von Chlamydien durch Dichtegradientenzentrifugation

- Um eine Chlamydien suspension frei von eukaryotischen Zelltrümmern zu erhalten, oder auch eine Trennung von RBs und EBs zu erreichen, werden die Chlamydien mittels der Dichtegradientenzentrifugation bzw. einer diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation gereinigt.
- Die differentialzentrifugierten Chlamydien (s.3.3.6) werden bei 15 000 Upm (Hereaus Biofuge Primo R) und 4°C für 30 min. sedimentiert.
- Das Sediment wird mit 1 ml PBS gewaschen.
- Ein Zentrifugenröhrchen wird mit 9 ml 30% Gastrografin in sterilem Wasser vorgelegt. (Für eine Trennung von RBs und EBs werden Gastrografinschichten verschiedener Dichten: 30%, 35%, 40%, 45% verwendet.)
- Die Chlamydien suspension wird vorsichtig darauf pipettiert.
- Es wird für 1 Std. bei 30 000 x g (J2-21, Beckmann) und 4°C zentrifugiert.
- Das Pellet wird einmal mit 10 ml PBS gewaschen, danach in 1 ml PBS resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen überführt, erneut sedimentiert und in 1 ml SPG-Puffer resuspendiert und eingefroren.

3.3.8 Titration von Chlamydien suspensionen

- Um die Infektiosität, also die Menge einschlussbildender EBs pro Milliliter zu ermitteln, werden die Chlamydien suspensionen titriert.
- Eine 96-well-Mikrotiterplatte wird 2 Tage vor der Titration mit HEp-2 Zellen ausgesät, so dass sich ein konfluenter Zellrasen ausbildet.
- Für die Chlamydien suspension wird eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} - 10^{-10} mit Zellkulturmedium hergestellt.
- Für jede Verdünnungsstufe werden vier Vertiefungen mit je 100µl der Chlamydien suspension befüllt.
- Die Platte wird für 60 min. bei 30°C und 1560 rpm (3000 rpm/ Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Danach folgt die Inkubation für 1 Std. im Inkubationsschrank bei 37°C, 6% CO₂.
- Die Suspension wird vorsichtig aus den Vertiefungen abgenommen und durch Chlamydienwachstumsmedium ersetzt.
- Nach zwei Tagen wird die Platte durch ausklopfen vom Medium befreit und die Zellen mit 100 µl Methanol/Vertiefung für mind. 20 min. bei RT fixiert.
- Die infizierten Zellen werden mit einem spezifischen Antikörper (pathfinder) für 45 min. gefärbt.
- Die Einschlüsse je Vertiefung werden gezählt und die Zahl der Einschlussbildenden EBs/ ml in der Ausgangssuspension errechnet.

3.3.9 Stationäre Infektion von Zellen durch Chlamydien

- Für Neutralisations- und Adhäsionsversuche wurde auf das Aufzentrifugieren der chlamydialen EBs auf die Zellen verzichtet.
- Das Zellkulturmedium wird abgenommen und die Zellen werden zweimal mit eiskaltem PBS gespült.
- Die Chlamydien suspension wird auf die Zellen gegeben.
- Die Zellen werden für 2h bei 4°C unter leichtem schwenken inkubiert.
- Die Zellen werden dreimal mit je 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und mit Chlamydienwachstumsmedium inkubiert.
- Nach 2 Tagen werden die infizierten Zellen fixiert und die Einschlusszahlen von mind. 15 Gesichtsfeldern pro Deckgläschen bestimmt.

3.3.10 Test von Zellkultur- und Chlamydienkultur auf Kontamination durch *Mycoplasma sp.*

- *Mycoplasma arginini* und *Mycoplasma hominis* stellen häufige Kontaminationen der Zellkultur dar. Zum Nachweis wurde eine Mycoplasmen-spezifische PCR eingesetzt (Ossewaarde, de Vries et al. 1996). Als Zielsequenz wurde das 16 S *rRNA* Gen ausgewählt. Die Analyse der Zellkultur sollte in regelmäßigen Abständen, mind. einmal pro Monat, durchgeführt werden.
- Die Probe, welche sowohl Zellmaterial als auch Medium beinhaltet, wird 30min. bei 15 000 Upm (HereausBiofuge pico) und 20°C zentrifugiert.
- Das Sediment wird in 100 µl Wasser resuspendiert.
- Die Zugabe von Proteinase K (4mg/ml) erfolgt für 3 Std. bei 55°C.
- Die Hitzeinaktivierung findet anschliessend für 25 min. bei 98°C statt.
- Als Matrizen-DNA werden 5 µl je 50 µl PCR-Ansatz verwendet.

PCR-Bedingungen:

- 1 µl Oligonukleotid GPO3 [50pmol]
- 1 µl Oligonukleotid MGSO [50pmol]
- 10 µl MgCl₂ [2,5mM]
- 10 µl dNTP+dUTP [200µM]
- 10 µl PCR-Puffer
- 0,3 µl Taq
- 5 µl Matrizen-DNA
- Auf 50 µl mit destilliertem Wasser auffüllen

Programm:

- Denaturierung 2 min 94°C
- 40 Zyklen mit folgenden Bedingungen:
 - a) Denaturieren 1 min 94°C
 - b) Annealing 1 min 60°C
 - c) Elongation 1 min 72°C
- Finale Elongation 10 min 72°C

10 µl des PCR-Produkts werden mit 5 µl Blaumarker gemischt und mittels eines EtBr-gefärbten Agarosegels (2%) analysiert. Das erwartete Fragment ist 270bp groß.

3.3.11 Immunologischer Nachweis von Chlamydien mittels Fluoreszenzmikroskopie

3.3.11.1 Fixierung von *C. pneumoniae* infizierten eukaryotischen Zellen

Methanol-Fixierung:

- Die infizierten Zellen wurden nach den angegebenen Zeiten dreimal mit PBS gewaschen und für mind. 20 min. mit Methanol fixiert.
- Die fixierten Zellen können bei 4°C mehrere Wochen gelagert werden, wobei hierbei die Fixierungslösung durch PBS ersetzt werden sollte.

Formaldehyd-Fixierung:

- Die infizierten Zellen wurden nach den angegebenen Zeiten dreimal mit PBS gewaschen und für mind. 30 min. mit 3,7 % Formaldehyd/PBS fixiert.
- Die fixierten Zellen können bei 4°C mehrere Wochen gelagert werden, wobei hierbei die Fixierungslösung durch PBS ersetzt werden sollte.
- Für die Färbung werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 5 min. mit 0,2 % TritonX-100 permeabilisiert. Die Chlamydien werden hierdurch nicht permeabilisiert.

Fluoreszenzmarkierung von Chlamydien

- Eine gereinigte Chlamydien suspension wird für 30 min. bei 15 000 Upm (HereausBiofuge pico) bei 4°C zentrifugiert.
- Das Pellet wird in 1 ml PBS resuspendiert.
- 10 mM Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) werden hinzugegeben, gemischt und für 1 Std bei 37°C inkubiert.
- Die Chlamydien suspension wird für 30 min. bei 15000 Upm (HereausBiofuge pico) bei 4°C pelletiert und einmal mit PBS gewaschen.
- Das Sediment wird in 500µl SPG-Puffer resuspendiert.
- Die gefärbten Chlamydien können so für mehrere Monate bei -80°C gelagert werden.

3.3.11.2 Direkte Immunfluoreszenz

- Dieser Nachweis identifiziert chlamydien spezifische Lipopolysaccharid-Komponenten mit einem FITC-konjugierten, monoklonalen Antikörper.
- Die fixierten Zellen werden dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen.
- Das Glasplättchen wird vorsichtig aus der Vertiefung einer 24-Well-Platte in eine neue, sterile Gewebekulturplatte transferiert.
- Die Zellen auf dem Glasplättchen werden mit 25 µl Antikörper (Pathfinder, genuspezifischer FITC-konjugierter *Chlamydia* spezifischer Antikörper 1:4 in PBS verdünnt) vollkommen überschichtet.
- Die Glasplättchen werden für mindestens 30 min. bei 37°C inkubiert.

- Der Antikörper wird durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen auf dem Glasplättchen luftgetrocknet.
- Ein Objektträger wird mit einem Tropfen Vectashield (anti-bleaching Lösung) versehen, und das Glasplättchen mit dem Zellrasen zum Tropfen gerichtet aufgelegt.
- Der Rand des Plättchens wird mit Hilfe von Nagellack fixiert und versiegelt.
- Im Fluoreszenzmikroskop erscheinen die chlamydialen Einschlüsse innerhalb der Zellen grün.
- Eine Lagerung der Präparate ist so bis zu einer Woche im Dunkeln möglich.

3.3.11.3 Indirekter Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz erfolgt über die Verwendung von *Chlamydia* spezifischen Primär-Antikörpern in Kombination mit Fluoreszenz-konjugierten Sekundär-Antikörpern.

- Die fixierten Zellen werden dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen.
- Das Glasplättchen wird vorsichtig aus der Vertiefung einer 24-Well-Platte in eine neue, sterile Gewebekulturplatte transferiert.
- Die Zellen auf dem Glasplättchen werden mit 25 µl des Primär-Antikörpers (verdünnt in PBS) beschichtet und für 45 min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert (Austrocknen vermeiden).
- Es folgt dreimaliges Waschen mit PBS.
- 25 µl des Sekundär-Antikörpers werden auf das Glasplättchen pipettiert und für 45 min. bei 37°C inkubiert (Austrocknen vermeiden).
- Der Antikörper wird durch zweimaliges waschen mit PBS entfernt und die Zellen auf dem Glasplättchen luftgetrocknet.
- Ein Objektträger wird mit einem Tropfen Vectashield (anti-bleaching Lösung) versehen und das Glasplättchen mit dem Zellrasen zum Tropfen gerichtet aufgelegt.
- Das Plättchen wird mit Hilfe von Nagellack fixiert und versiegelt und kann so für eine Woche bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

3.3.11.4 Mikroimmunfluoreszenz (MIF)

- 20 µl Gradienten-gereinigte Chlamydien (3.3.7) werden auf eine Vertiefung eines Multiwell-Objektträgers pipettiert und bei 37°C getrocknet.
- Die chlamydialen Partikel werden mit 20 µl Primär-Antikörper (verdünnt in PBS) für 45 min. bei 37°C, 6% CO₂ im Inkubationsschrank inkubiert.
- Durch vorsichtiges, dreimaliges Waschen der Chlamydien mit jeweils 20 µl PBS wird der ungebundene Antikörper entfernt.
- 20 µl des Sekundär- Antikörpers (Fluoreszenz-gekoppelt, in PBS verdünnt) wird auf die Zellen gegeben und erneut für 45 min. bei 37°C inkubiert.
- Es erfolgt vorsichtiges, dreimaliges Waschen mit PBS.
- Auf jede Vertiefung wird 1 µl Vectashield pipettiert, bevor sie mit einem Deckgläschen verschlossen und mit Nagellack versiegelt werden.
- Das Präparat kann nun mikroskopiert oder für einige Tage (im Dunkel) bei 4°C gelagert werden.

3.4 Molekularbiologische und biochemische Methoden

3.4.1 Gewinnung von chlamydialer DNA für PCR-Reaktionen

Genomische chlamydiale DNA wurde unter Verwendung der Genomic Kit G20 Qiagen aus Gradienten gereinigten Chlamydien isoliert. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.4.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Messung des DNA-Gehalts einer Probe wurde mit einem Beckman Spektrophotometer durchgeführt. Um die DNA photometrisch bestimmen zu können, wird sie laut den Herstellerangaben 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Die DNA-Konzentration wird in ng/ml angegeben.

3.4.3 Restriktionsenzymanalyse

Um die Größe eines Plasmids überprüfen zu können, wurden Restriktionsendonukleasen eingesetzt mit deren Hilfe die DNA an spezifischen Erkennungssequenzen hydrolytisch gespalten wird und Fragmente von definierter Größe entstehen.

Ansatz eines Restriktionsenzymverdaus:

20 µl Ansätze: ca. 200 ng DNA
0,1 Unit Enzym
2 µl Puffer 10x
16,9 µl Wasser

Für 1-1,5 Std. bei 37°C inkubieren (falls nicht anders angegeben vom Hersteller).

3.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR-Methode können viele Kopien eines bestimmten DNA-Fragments gezielt hergestellt werden.

Die folgenden Bedingungen wurden für die PCR verwendet, wobei für die Verifikations-PCRs immer die Taq-Polymerase verwendet wurde, während für die Klonierungen die Proof-reading Polymerase (Pfx) genutzt wurde, da sie eine geringere Fehlerrate hat.

Tabelle 16: PCR- Bedingungen

	1. Ansatz	2. Ansatz
1. Erste Denaturierung	94°C – 5 min.	94°C – 5 min
2. Denaturierung	94°C – 1 min.	94°C – 1 min
3. Annealing	48-50°C – 1 min.	48-50°C – 1 min
4. Elongation	72°C – 1-3 min.	68°C – 1-3 min
5. Letzte Elongation	72°C – 7 min.	68°C – 7 min
Zyklen (von 2-4)	35	35
Polymerase	Taq	Pfx

Tabelle 17: PCR- Reaktionsansatz

	Konzentration
Template DNA	1-10 ng
Oligonukleotide	50 pmol/ µl
dNTP's (N= A/C/T/G)	je dNTP 200 µM
MgCl ₂ (MgSo ₄ für Pfx)	2,5 mM (0,75 mM)
10x PCR-Puffer	1x
Polymerase	1-2 U / 50 µl

Für jeden Ansatz wird die entsprechende ddH₂O-Menge vorgelegt, typischerweise wurden 50 µl Ansätze verwendet.

Gegebenenfalls kann der Ansatz noch Enhancer (1 µl, Teil des Pfx-Kits) enthalten, um die Bindung der Polymerase zu verstärken.

3.4.5 PCR auf Hefezellen

Die PCR kann auch auf Hefezellen durchgeführt werden. Hierfür werden als Template DNA ungefähr 1×10^5 Zellen eines frisch gewachsenen Hefestammes mit einer Mikropipettenspitze abgenommen und dem PCR-Ansatz zugefügt. Die PCR-Reaktion wird wie unter 3.4.4 beschrieben durchgeführt.

3.4.5.1 Generierung von Einzelbasenpaar-Austauschen mittels Mutagenese-PCR

Um gezielt einzelne Basenpaare in einem DNA-Fragment auszutauschen, wurden die Oligonukleotide so konstruiert, dass die gewünschten Austausche in der Mitte des Oligonukleotids liegen.

3.4.6 Gelelektrophorese

Zur Darstellung der DNA wurde die jeweilige Probe auf ein 0,7-1,0%iges Agarosegel aufgetragen und bei 80-120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid wird die DNA unter UV-Licht sichtbar. Die Längenbestimmung dienten die Längenmarker pUC19 Sau3A oder λ -DNA (2.8).

3.4.7 Isolierung und Reinigung von DNA

Für viele experimentelle Ansätze (Restriktionsverdauung, Sequenzierungen) wird saubere DNA in ausreichenden Mengen benötigt. Um eine möglichst reine DNA einsetzen zu können, die frei von Nukleasen, Proteinresten, Salzen u.a. ist, muss sie gereinigt und präzipitiert werden. Im Folgenden werden zwei Methoden beschrieben:

3.4.7.1 DNA- Fällung

- Die DNA-haltige Lösung (100 μ l) wird in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert.
- Der Lösung werden 10 μ l NaAc 3M (entspricht 1/10 des Volumens der DNA-Lösung) zupipettiert und mit der dreifachen Menge Ethanol (96%) aufgefüllt.
- Die Probe wird gevortext und für 30 min. bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Der Überstand wird möglichst vollständig entnommen und verworfen.
- Das Präzipitat wird mit 1ml eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen.
- Es wird 10 min. bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- Die DNA wird 10 min. im Vakuum-Konzentrator getrocknet und in mindestens 20 μ l ddH₂O resuspendiert.

3.4.7.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Für die Isolation von DNA aus Agarosegelen wird das Nucleo Spin Extract Kit der Firma Macherey und Nagel verwendet. Die DNA-Fragmente werden aus dem Gel ausgeschnitten und gemäß den Herstellerangaben aufgearbeitet. Das Elutionsvolumen beträgt 50 μ l.

3.4.8 Ligation

Um DNA-Fragmente in einen Vektor zu integrieren kann eine Ligation durchgeführt werden. Hierfür werden etwa 50-200 ng Vektor-DNA und 5-100 ng Insert eingesetzt. Das molare Mengenverhältnis von Vektor zu Insert sollte dabei so gewählt werden, dass das Insert im 3-10fachen Überschuss vorliegt. Eine Abschätzung der DNA-Mengen kann dabei durch ein mit

Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel vorgenommen werden. Das Reaktionsvolumen für eine Ligation sollte 15-20 µl betragen. Für die Ligation werden die vom Ligase-Hersteller mitgelieferten Puffer und angegebenen Reaktionsbedingungen gewählt. Die Reaktionsdauer beträgt 3-4 Stunden bei Raumtemperatur.

3.5 Arbeiten mit *Escherichia coli*-Zellen

3.5.1 Präparation von Plasmid-DNA

3.5.1.1 Plasmidminipräparation aus *Escherichia coli*

Die Extraktion der Plasmid-DNA wurde nach der Methode der alkalischen Lyse nach Maniatis (Sambrook, Maniatis et al. 1989) durchgeführt.

3.5.1.2 Plasmidmidipräparation aus *Escherichia coli*

Um die Sequenz eines Plasmids überprüfen zu können, wurde die Plasmid-DNA Präparierung mit Hilfe des Plasmid-Midi Kit der Firma Qiagen durchgeführt.

3.5.2 Transformation von *E. coli*

3.5.2.1 Ein-Minuten-Transformation

Um eine Plasmid-DNA in *E.coli* zu transformieren, wurde eine 1-Minuten-Transformation durchgeführt. Sie geht sehr schnell, ist aber aufgrund der niedrigen Effizienz nur für die Transformation von zirkulärer Plasmid-DNA geeignet.

- 7 µl DMSO kompetente Zellen (Hergestellt durch die Arbeitsgruppen Hegemann und Fleig) werden auf Eis aufgetaut.
- Die Zellen werden mit 1 µl DNA (1-100 ng) auf Eis gemischt.
- Der Ansatz wird für 1 min. bei 42 °C erhitzt.
- Sofort wird die Probe in 100 µl LB aufgenommen und auf einer LB+ Amp Platte ausplattiert.
- Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.5.2.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Diese Methode wurde wie von Maniatis (Sambrook, Maniatis et al. 1989) beschrieben angewandt. Die elektrokompententen *E. coli* XL₁-blue Zellen (Hergestellt durch die Arbeitsgruppen Hegemann und Fleig) wurden für die Transformation eingesetzt.

3.6 Biochemische Methoden

3.6.1 Reinigung von cOMCs aus *C. pneumoniae*

Für die Isolierung von chlamydialen Proteinen aus dem Außenmembrankomplex (cOMC) werden Gradienten-gereinigte Chlamydien (1×10^9 IFU/ml) benötigt.

- Nach der Gradientenreinigung, wie unter Abschnitt 3.2.6 beschrieben, werden die chlamydialen Partikel für 30 min. bei 15000 Upm (Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C sedimentiert.
- Das Pellet wird in 50 µl PBS im Ultraschallbad resuspendiert.
- Es werden 150 µl Sarkosylpuffer (2% Sarkosyl, 1.5 mM EDTA) zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.
- Die Suspension wird 1 Stunde bei 100000 x g (42000Upm, Ultrazentrifuge, TLA45 Rotor) ultrazentrifugiert.
- Das Pellet wird zweimal mit jeweils 100 µl Sarkosylpuffer gewaschen.
- Das Pellet wird mit 100 µl DNase-Puffer überschichtet und mit 200 Units DNase I und 5 µl Puffer P1 (mit 100µg/ml RNase I) für zwei Stunden bei 37°C inkubiert.
- Die Suspension wird erneut bei 100000 x g zentrifugiert und das Pellet im Anschluss zweimal mit PBS gewaschen.
- Das Pellet enthält alle Bestandteile des cOMCs und wird für Westernblot-Analysen mit Ladegelpuffer und DTT aufbereitet.

3.6.2 Induktion der Genexpression in *E. coli*

Zur Expression von Fusionsproteinen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors wird der *E. coli* Kultur bei einer OD₆₀₀ von 0,5 IPTG zugesetzt, so dass die Endkonzentration 1 mM IPTG im Medium entspricht. Die Induktion der Genexpression wird durch Aufarbeitung von Proteinproben und deren gelelektrophoretische Analyse auf einem SDS-Gel überwacht.

- Präparative Kulturen (1 l Kulturmedium) werden nach Zugabe von IPTG (1mM Endkonzentration) für 4 Stunden weiter bei 37 °C inkubiert.
- Die *E. coli* Zellen werden geerntet indem sie für 10 min. bei 5000 Upm und 4 °C (Beckmann J2-21) abzentrifugiert werden.
- Das Pellet wird mit 30 ml PBS Puffer gewaschen und 5 min. bei 6000 Upm und 4 °C (Megafuge 1.0) erneut zentrifugiert.
- Das Nassgewicht des Zellpellets wird bestimmt und die Zellen können nun bis zur Weiterverarbeitung in 1-2 ml PBS resuspendiert und bei -20°C gelagert werden.

3.6.3 Affinitätschromatografische Aufreinigung von Proteinen

Mittels der Affinitätschromatografie können spezifische Moleküle aufgereinigt werden. Proteine werden aufgrund ihrer Affinität zu einem gewissen Material gebunden, während die übrigen Proteine eines Extraktes nicht gebunden werden und auf diese Weise durch Waschen entfernt werden können.

3.6.3.1 Reinigung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen

Das hier verwendete System basiert auf der Affinität von Oligohistidinen zu einem Säulenmaterial aus Ni-NTA Agarose. (modifiziert nach dem Protokoll von Qiagen)

- Es wird eine Säule mit einem Durchmesser von etwa 1 cm verwendet, die unten durch eine Klemme verschlossen wird. Innen befindet sich ein Gazestopfen, der die Ni-NTA Agarose daran hindert durchzulaufen.
- Das Zellpellet einer induzierten 1 l Kultur wird vorsichtig aufgetaut und in 5 ml pro Gramm Nassgewicht Puffer B (8 M Harnstoff; 0,1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0) resuspendiert.
- Die Zellen werden 60 min. auf einem Rad gemischt (150 Upm, 20 °C) und auf diese Weise lysiert.
- Das Lysat wird 20 min. bei 10000 x g (Avanti J-25) und 20 °C zentrifugiert.
- Der geklärte Überstand wird weiter verwendet.
- Es wird zu dem klaren Lysat (etwa 30 ml) 3 ml Ni-NTA Agarose zugegeben und 2 Stunden weiter gemischt (150 Upm, 20 °C).
- Die leere Säule wird mit diesem Material durch Einschwemmen beladen. Die Flussrate sollte etwa 2 ml/min. betragen.
- Die Säule wird anschließend mit 15 ml Puffer B (2 ml/min) gewaschen.
- Die Säule wird mit 15 ml Puffer C (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl, pH 6.3, 10 mM Imidazol) gewaschen.
- Das 6 x Histidin-markierte Protein wird mit 10 ml Puffer C (+ 250 mM Imidazol) eluiert. Dazu wird die Säule mit dem Elutionspuffer beladen und 5 min inkubiert. Dann werden die einzelnen Fraktionen von je 2 ml aufgefangen.
- Es erfolgt eine Totalelution von der Säule mit 5 ml Puffer C (+ 500 mM Imidazol). Alle Fraktionen werden in 2 ml Portionen aufgefangen und mittels einer Gelelektrophorese auf einem SDS-Gel analysiert.

3.6.3.2 Dialyse von denaturierten Proteinen

- Der in 10 cm lange Abschnitte geteilte Dialyseschlauch wird 10 min. in deion. Wasser bei 100°C erhitzt.
- Die Proteinsuspension (2 ml) wird mittels einer sterilen Pipette in einen Dialyseschlauch-Abschnitt gefüllt, der durch eine sterile Klemme an einem Ende verschlossen wurde.
- Der Dialyseschlauch wird am verbleibenden Ende mit einer weiteren Klammer Luftblasen-frei verschlossen.

- Die Proteinsuspension wird dreimal gegen 2 l PBS für 10-12 h unter leichtem Rühren bei 4 °C dialysiert.
- Die Suspension wird aus der Dialysekammer mittels einer sterilen Pipette entnommen. Es wird eine Proteinmengenbestimmung durchgeführt und die Proteinlösungen werden auf Proteingelen weiter analysiert.

3.7 Westernblotanalyse

3.7.1 Ansetzen der Induktionskultur

In dem hier genutzten Hefe-Expressionssystem unterliegt das Gen der Kontrolle des *GAL1*-Promotors (Boder and Wittrup 1997). Um die Proteinexpression zu ermöglichen, wird Induktionsmedium mit der Kohlenstoffquelle Galaktose verwendet. Die selektive Hefeinduktionskultur wird wie folgt angesetzt:

- Eine 5 ml Minimalmedium –Kultur (SD Trp⁻, Raffinose (2 %)) wird mit einer frischen Hefekultur beimpft und über Nacht bei 30°C im Rad inkubiert. Damit der *GAL1*-Promotor nicht reprimiert wird, muss das Induktionsmedium frei von Glukose sein.
- Die OD₆₀₀ der Kultur wird nach ca. 12 Std bestimmt und auf eine OD₆₀₀ von 0,3 in 5 ml Minimalmedium (SD Trp⁻, Galaktose (2 %)) übergeimpft.
- Die Kultur wird für weitere 24 Std. bei 30°C im Rad inkubiert. Danach wird die OD₆₀₀ bestimmt und die Zellen stehen den verschiedenen Anwendungen wie dem Adhäsionstest zur Verfügung.

Für den tetO7-Promotor genügt das Ansetzen einer Hefe-Kultur in SD Trp⁻ Medium über Nacht (Georgoudis, 2004).

3.7.2 Aufarbeitung von Proteinproben für SDS-Polyacrylamidgele

Proteinproben müssen denaturiert werden, um sie der Größe nach über ein denaturierendes Polyacrylamidgel zu separieren. Für Proteinextrakte aus Hefezellen wird eine OD₆₀₀ von 4, für Proteinextrakte aus *E. coli* Kulturen wird OD₆₀₀ von 1 aufgearbeitet.

- Die Zellsuspension wird für 1 min. bei 13000 Upm (HeraeusBiofuge pico) zentrifugiert.
- Das Pellet wird in 32,5 µl dest. Wasser aufgenommen und resuspendiert.
- Es werden 12,5 µl Ladegelpuffer (4fach konzentriert) (50 mM Tris/HCL pH 6,9; 2 % SDS; 0,1 % Bromphenolblau; 5 % Glycerin) zugegeben.
- Es werden 5 µl 1 M DTT zugegeben.
- Die Probe wird 10 min. bei 100 °C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt.
- Die Probe kann so mittels Westernblot analysiert werden.

3.7.3 Deglykosylierung von Proteinproben durch das Enzym α -Mannosidase

Der Westernblot ermöglicht es Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Das Aga2p des Hefe-Oberflächenexpressionssystem unterliegt einer starken O-Glykosylierung (Shen et al., 2001), weshalb sich in Westernblot-Analysen Abweichungen zwischen dem erwarteten und dem apparenten Laufverhalten zeigen. Durch spezifische Enzyme wie der α -Mannosidase ist es möglich, die Glykosylierungen weitgehend zu entfernen und somit eine Proteinbande in Höhe des erwarteten Molekulargewichts zu erreichen.

- Eine Hefekultur wird mit einer OD_{600} von 10 geerntet und für 1 min. bei 13000 Upm zentrifugiert.
- Das erhaltene Zellsediment wird mit 150 μ l 1x PBS und 50 μ l Proteaseinhibitoren-Cocktail versetzt.
- 2/3 des Probenvolumens werden als Glasperlen zugefügt und der Zellaufschluss erfolgt bei 4°C für 20 min. auf dem Vibrax.
- Der Überstand wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min. bei 13000 Upm bei 4°C zentrifugiert.
- Der klare Überstand wird abgenommen und mit 1 U α -Mannosidase versetzt.
- Die Probe wird für mind. 2 Std. bei 37°C inkubiert.
- Es werden 20 μ l SDS-Probenpuffer und 10 μ l 1 M DTT zugegeben.
- Die Probe wird 10 min. bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und kann dann geladen werden.

3.7.4 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Analyse von Proteinen wurden 10 %ige und 12 %ige Polyacrylamidgele verwendet. Die Glasplatten und Abstandhalter werden sorgfältig mit 70 %igen Ethanol und dest. Wasser gereinigt und getrocknet.

3.7.4.1 Herstellung des Trenngeles

Im Trenngel werden die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe separiert.

Tabelle 18: Trenngele

Prozentualität des Trenngels	Acrylamidlösung (30:0,8)	4x-Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4% SDS)	Ammoniumpersulfat (10 %ige Stocklösung)	TEMED	ddH ₂ O
10%	13,3 ml	10 ml	200 μ l	50 μ l	16,5 ml
12%	16,0 ml	10 ml	200 μ l	50 μ l	13,8 ml

- Die Zutaten werden zusammen pipettiert und gut gemischt.
- Als letztes werden TEMED und Ammoniumpersulfat (10 %ige Stocklösung) hinzugegeben.
- Die Gelmasse wird zügig ohne Blasenbildung zwischen die zwei Glasplatten bis 1,5 cm unter den oberen Rand der Glasplatte gegossen.
- Das Gel wird mit Isopropanol überschichtet.
- Nach dem Auspolymerisieren wird der Isopropanol abgenommen und das Gel vorsichtig mehrfach mit dest. Wasser gespült.

3.7.4.2 Herstellung des Sammelgels

Das Sammelgel dient dazu, die Proteine im Gel zu fokussieren und somit eine bessere und saubere Bandenbildung der Proteine zu erreichen.

Tabelle 19: Sammelgel

Acrylamidlösung (30:0,8)	4x-Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4 % SDS)	Ammonium-persulfat (10 %ige Stocklösung)	TEMED	ddH ₂ O
1,5 ml	2,5 ml	200µl	20µl	6 ml

- Das Sammelgel wird auf das Trenngel gegossen, wobei sich keine Luftblasen bilden dürfen.
- Der Kamm wird in das Sammelgel gesteckt, so dass sich Ladetaschen bilden können.
- Nach dem Auspolymerisieren wird der Kamm gezogen und die Ladetaschen mehrfach vorsichtig mit Laufpuffer gespült.

3.7.4.3 SDS-Gelelektrophorese

- Das Gel wird in die Apparatur eingespannt und beide Kammern mit Laufpuffer (0,05 M Tris/HCL pH 8,3; 0,2 M Glycin; 0,1 % SDS) soweit gefüllt, dass das Gel Kontakt zum Laufpuffer hat.
- Die Proben (max. 20 µl/ Ladetasche) werden aufgetragen.
- Der Strom wird angelegt (max. 100 V bei etwa 20 mA) für ca. 1,5 Std.

3.7.5 Färbung eines Proteingels mittels Coomassie-Blau

3.7.5.1 Herstellung der Coomassie-Färbelösung

- 0,25 g Coomassie Brilliant Blau (R250) werden in 90 ml Wasser : Methanol (1:1 v/v) und 10 ml konz. Essigsäure gelöst.
- Die Lösung wird durch einen Faltenfilter gefiltert und kann direkt zur Färbung von Proteingelen verwendet werden.

3.7.5.2 Färbung und Entfärbung von Proteingelen

- Das Proteingel wird in der Färbelösung für mindestens 1 Std. unter leichtem Schwenken inkubiert.
- Die Färbelösung wird vorsichtig abgenommen.
- Das Gel wird mit einer Entfärbelösung (40 % Methanol, 10 % Eisessig, 50 % dest. Wasser) für 1 – 3 Std. unter leichtem Schwenken inkubiert. Dabei wird die Lösung zwei- bis dreimal erneuert.

3.7.6 Westernblot-Analyse

Das Verfahren beruht auf dem Transfer von Proteinen aus einem Acrylamidgel auf eine Membran, wodurch diese immobilisiert werden. Auf dieser Membran können dann spezifische Proteine mittels Antikörper nachgewiesen werden.

3.7.6.1 Aufbau der Blotapparatur

- Es werden 6 Filterpapiere zurechtgeschnitten; die Maße betragen 7 cm x 9 cm.
- Es wird ein Stück PVDF-Membran (7 cm x 9 cm) in 60 % Methanol für 2-5 min. inkubiert.
- Die Membran wird mit dest. Wasser gespült und anschließend für 10 min. in Transferpuffer (48 mM Tris/HCl, 39 mM Glycin, 0,037 % (v/v) SDS, 20 % Methanol) inkubiert.
- Die Filterpapiere werden ebenfalls 2-5 min. in Transferpuffer inkubiert.
- 3 Filterpapiere werden sorgfältig gestapelt, auf die Graphitplatte der Blotapparatur gelegt und alle Luftblasen entfernt.
- Die Membran wird aufgelegt und es wird sichergestellt, dass sich keine Luftblasen zwischen Membran und Filterpapier befinden.
- Die Gelapparatur wird auseinandergebaut und die Abstandhalter vorsichtig entfernt.
- Das Gel wird durch Unterspülen mittels dest. Wasser von der Glasplatte gelöst.
- Der Stapel aus Filterpapieren und Membran wird angehoben und so auf das Gel gelegt, dass die Membran das Gel bedeckt und keine Luftblasen sich zwischen Gel und Membran befinden.
- Der Stapel wird einschließlich des Gels zurück auf die Graphitplatte gelegt und mit den restlichen 3 Filterpapieren bedeckt.
- Luftblasen werden durch vorsichtiges Auswalzen mittels einer sterilen Glaspipette entfernt.
- Die zweite Graphitplatte wird auf den Stapel gelegt und die Kontakte an das Stromgerät angeschlossen. Ein Gewicht von etwa 1 kg wird auf die Apparatur gestellt, um den Transfer zu begünstigen.
- Bei 300 mA findet der Transfer der Proteine auf die Membran für 1 Stunde statt.

3.7.6.2 Abbau der Blotapparatur

- Der Strom wird abgeschaltet und die Apparatur wieder abgebaut.
- Die Filterpapiere werden verworfen und die Membran wird mittels einer sterilen Pinzette in ein sauberes Gefäß transferiert. Dort wird sie in Blockierungslösung (3% Milchpulver, 0,05% Tween20 in 1 x PBS) bei 4 °C über Nacht (mind. 1 Std.) inkubiert.

3.7.6.3 Antikörperreaktion auf der PVDF-Membran

Um spezifische Proteine auf der PVDF-Membran zu detektieren, werden verschiedene Antikörper eingesetzt.

- Die Membran wird mit dem Primärantikörper (5-10 ml), welcher das spezifische Protein erkennt inkubiert. Die Verdünnung des Antikörpers in der Blockierungslösung geschieht nach Herstellerangaben.
- Die PVDF-Membran wird mind. 2 Std. bei Raumtemperatur mit der Antikörperlösung unter leichtem Schwenken inkubiert.
- Die Antikörperlösung wird abgezogen und die Membran dreimal mit je 100 ml PBS bei RT für jeweils 10 min. gewaschen.
- Es folgt die Inkubation der Membran für 1 Std. bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper, welcher mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Die Verwendung des Zweitantikörpers richtet sich nach der Herkunft des Erstantikörpers. Die Zweitantikörper (Anti-Kaninchen bzw. Anti-Maus) wurden 1:7500 in Blockierungspuffer verdünnt.
- Die Membran wird dreimal je 5 min. mit je 100 ml PBS gewaschen.

3.7.6.4 Farb-Entwicklung des Blots mittels NBT und BCIP

- Die Membran wird für 5 min. in Detektionspuffer (0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5) inkubiert.
- Die Membran wird in der Farbsubstrat-Lösung (20 ml Detektionspuffer +33 µl BCIP-Lösung (0,5 g BCIP in 10 ml DMF) + 66 µl NBT-Lösung (0,5 g NBT in 10 ml 70 %igem DMF) für mindestens 5 min. bis zu 45 min. inkubiert.
- Die Farbreaktion wird abgestoppt durch Inkubation in Wasser für 5 min., anschließend wird die Membran getrocknet.

3.8 Adhäsion

3.8.1 Adhäsionstest mit proteinbeschichteten Latexkügelchen

Mit Hilfe von Latexkügelchen können die Adhäsionseigenschaften von verschiedenen Proteinen an eukaryotische Zellen untersucht werden. Hierzu werden Latexkügelchen mit

definierten Proteinkonzentrationen beschichtet und anschließend mit den Zellen inkubiert. Gebundene Latexkügelchen können durch mikroskopische Analyse dokumentiert werden. Es werden dazu 1000 eukaryotische Zellen gezählt und ebenso die daran gebundenen Kügelchen.

3.8.2 Beschichten von Latexkügelchen mit Proteinen

- Es werden zu 1 ml PBS 20 µl Latexkügelchen (Durchmesser 1,1 µm, 10¹¹ Kügelchen/ml) pipettiert und anschließend bei 12000 Upm (HeraeusBiofuge pico) für 5 min. zentrifugiert.
- Die Latexkügelchen werden mit 1 ml Bindungspuffer (0,2 M NaHCO₃, pH8,6; 0,5 M NaCl) gewaschen und erneut bei 12000 Upm (HeraeusBiofuge pico) für 5 min. zentrifugiert.
- Die Latexkügelchen werden in 100 µl Bindungspuffer resuspendiert
- Die bestimmte Proteinkonzentration (10-200 µg/ml) wird zugegeben, so dass das Volumen 150 µl nicht überschreitet.
- Es folgt eine Inkubation von 1 Std. bei 37°C
- Es werden 500 µl Bindungspuffer zupipettiert und für 3-5 min. im Ultraschallwasserbad sonifiziert.
- Zu der Suspension werden 500 µl BSA (40 mg/ml in Bindungspuffer) gegeben, kurz gemischt und erneut 1 Std. bei 37°C inkubiert.
- Die proteinbeschichteten Latexkügelchen werden einmal mit 1 ml PBS /BSA (1 mg/ml) gewaschen, und danach in 1 ml PBS/BSA (0,2 mg/ml) bei 4°C gelagert.
- Die Lagerung ist für maximal 1 Woche möglich.

3.8.3 Bestimmung der Beschichtungsqualität

Zur Bestimmung der Beschichtungsqualität wird ein Aliquot der beschichteten Latexkügelchen mittels Westernblot analysiert.

- 150 µl der Protein-Kügelchen-Suspension wird bei 13000 Upm für 5 min. (HeraeusBiofuge pico) sedimentiert.
- Der Überstand wird abgenommen und die Latexkügelchen werden mit 32,5 µl dest. Wasser, 12,5 µl Ladegelpuffer und 5 µl DTT resuspendiert.
- Die Suspension wird für 10 min bei 100°C erhitzt und kann dann mittels Westernblot analysiert werden.

3.8.4 Adhäsionstest von proteinbeschichteten Latexkügelchen an eukaryotische Zellen

- Eine 24 Well-Platte wird mit Deckgläschen bestückt.
- Pro Deckgläschen werden 1x10⁵ HEp-2 Zellen ausgesät.
- Die Konzentrationsbestimmung der Latexkügelchen/ml erfolgt durch die Verdünnung eines Aliquots 1:100 und dessen Auszählen in einer Zählkammer.

- Die Latexkügelchen werden in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Das Zell zu Kügelchen Verhältnis sollte 1:10 betragen.
- Die Zellen werden 5 min. bei 43,3 x g zentrifugiert.
- Danach erfolgt eine Inkubation von 1 Std. bei 37°C im Brutschrank.
- Die Suspension wird vorsichtig von den Zellen abgezogen und die Zellen werden dreimal mit 1 ml PBS gewaschen.
- Die HEp-2 Zellen und gebundenen Latexkügelchen werden mit 3,7 % Paraformaldehyd/PBS fixiert und können mikroskopisch analysiert werden.

3.9 Adhäsionstest mit Hilfe des Hefe-Oberflächenexpressionssystem

Durch den Hefeadhäsionstest kann die Bindung chlamydialer Oberflächenproteine an eukaryotische Epithelzellen untersucht werden. Um ihre Rolle während des ersten Schritts zur Infektion, der Bindung der Chlamydien an die Wirtszelle zu analysieren.

- Eine 24 Well-Platte wird mit Deckgläschen bestückt.
- Pro Deckgläschen werden 1×10^5 HEp-2 Zellen ausgesät.
- Die Well-Platte wird für 48 Std. im Inkubationsschrank bei 37 °C inkubiert.
- Am selben Tag werden die Hefeinduktionskulturen mit den zu testenden Stämmen angesetzt.
- Nach 24 Std. werden die Hefestämme in Galaktose-Medium umgeimpft.
- Nach weiteren 24 Std. wird die Hefe-Zellzahl mikroskopisch bestimmt.
- Von jedem Hefestamm werden 5×10^5 (MOI=5) oder 10×10^5 (MOI=10) Zellen in jeweils 1 ml PBS gegeben.
- Das Zellkulturmedium wird verworfen und die Hep-2 Zellen werden mit 1ml PBS gewaschen.
- Die HEp-2 Zellsuspensionen werden in die Vertiefungen gegeben.
- Die HEp-2- und Hefezellen werden für eine Std. unter leichtem Schwenken im 4°-Raum inkubiert.
- Die nicht gebundenen Hefezellen werden abgenommen. Um ausschließlich adhärierende Hefezellen auszuzählen, erfolgen 3 Waschschriffe mit 1x PBS, bis die Flächen zwischen den HEp-2 Zellen auf dem Deckgläschen von ungebundenen Hefezellen befreit sind.
- Die Hefezellen werden mit 3,7% Formaldehyd/PBS für mindestens eine Std. fixiert, und können dann in PBS bis zu drei Monate bei 4 °C gelagert werden.

(Vektoren, wie pEG6, deren Protein-Expression nicht dem *Gal1*-Promotor unterliegen, konnten nur über Nacht in *SD-trp* inkubiert werden.s. (Diplomarbeit, E. Georgoudis 2004)

3.9.1 Auswertung des Adhäsionsassays

- Die Fixierungslösung wird abgenommen und verworfen.
- Die an der Oberseite des Deckgläschens haftenden HEp-2- und Hefezellen werden bei geringem Luftdruck getrocknet.
- Auf einen Objektträger werden ca. 10 µl Glycerin/PBS-Lösung (1:9) gegeben.
- Der Objektträger wird mit der Oberseite auf der die Zellen liegen auf diese Lösung gelegt und mikroskopisch ausgezählt.

- Es werden so viele Gesichtsfelder ausgewertet bis 1000 HEp-2 Zellen gezählt wurden. Die Anzahl der Hefen, die an den Zellen adhäreren werden ebenfalls gezählt, um so das Verhältnis von Hefen pro 1000 HEp-2 Zellen zu ermitteln.

3.10 Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

3.10.1 Fixierung und Präparation der Hefezellen

- Eine 5 ml Hefe-Induktionskultur (aufbereitet nach Kapitel 3.7.1) wird mit 500 µl PFA-Puffer (37 %) versetzt, und für 5 min. bei RT inkubiert.
- Die Zellen werden 2 min. bei 3000 Upm bei RT abzentrifugiert.
- Das Pellet wird vorsichtig mit 1 ml PBS und danach mit 1 ml SP-Puffer (40 mM KPO₄, 0,5 mM MgCl₂, 1,2 M Sorbitol) gewaschen.
- Das Präzipitat wird in 1-3 ml SP-Puffer resuspendiert und kann bei 4 °C etwa 2 Tage gelagert werden.

3.10.2 Fluoreszenz Markierung

- Ein multi-well Objektträger (12-wells) wird mit Wasser gewaschen.
- Pro Vertiefung werden 20 µl Polylysin (0,5 mg/ml Konzentration) aufgetragen und für 10 min. bei RT inkubiert.
- Das Polylysin wird mit dest. Wasser abgewaschen und getrocknet.
- Pro Vertiefung werden 20 µl Hefezellen aufgetragen und für 10 min. bei RT in einer feuchten, geschlossenen Box inkubiert.
- Vom primären Antikörper (Anti-Xpress Antikörper 1:500) werden 10-20 µl pro Well aufgetragen und 1 Std. bei RT (oder ÜN bei 4°C) inkubiert.
- Es wird vier mal mit je 20 µl BSA-Puffer (BSA 1 %, Tween 0,5 %, PBS pH 7,4) gewaschen.
- Vom sekundären Antikörper (Cy3-Anti-Maus, 1:200) werden 10-20 µl pro Well aufgetragen und 1 Std. bei RT inkubiert.
- Es wird vier mal mit BSA-Puffer gewaschen.
- Die Zellen werden nun mit einem Tropfen Vectashield beschichtet und mit einem Deckglas durch Nagellack versiegelt.
- Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann die Fluoreszenz betrachtet werden.

3.11 Biotinylierung von Proteinen

Die Biotinylierung von Proteinen fand hier Anwendung für den Internalisierungstest. Dabei wurde Bitoin EZ-Link[™] Sulfo-NHS-Biotin der Firma Pierce verwendet. Die Biotinylierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

3.12 Internalisierungstest

Dieser Versuch dient der Identifizierung von Proteinen, welche die Aufnahme in die Humanzelle vermitteln. (Die Proteine ggf. wurden vor der Beschichtung der Latexkügelchen biotinyliert.)

- Hierfür werden 5×10^4 Zellen auf Deckgläschen ausgesät und für 1-2 Tage inkubiert.
- Die Zellen werden einmal mit 1 ml PBS gewaschen.
- Es Latexkügelchen werden mit einem Zellüberschuss von 100 eingesetzt.
- Die 5×10^6 proteinbeschichteten Latexkügelchen werden in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen, gut gemischt und auf die Zellen gegeben.
- Die Zellen werden für 5 min. bei 30°C und 1000 Upm zentrifugiert.
- Danach erfolgt eine Inkubation von 1 Std. bei 37°C im Brutschrank.
- Die nicht gebundenen Latexkügelchen werden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt.
- Die Zellen werden für mind. 20 min. mit 3,7 % Paraformaldehyd fixiert.
- Es folgen drei Waschschrte mit je 1 ml PBS.
- Die Zellen werden mit dem spezifischen Antikörper (oder einer Streptavidin/PBS (10nM) Lösung) für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert.
- Es folgt dreimal waschen mit PBS.
- Die Zellen werden mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei 37°C inkubiert.
- Es erfolgt dreimal waschen mit PBS.
- Die Zellen werden Luftgetrocknet und auf einen Objektträger der zuvor mit Vectashield versehen wurde gegeben und mit Nagellack versiegelt.

Die Präparate können so ein paar Tage bei 4°C gelagert werden.

Die Auswertung erfolgt durch Phasenkontrast-, sowie Immunofluoreszenz-Mikroskopie. Die Bestimmung aller gebundenen Latexkügelchen erfolgt im Phasenkontrast ohne Differenzierung zwischen Internalisierten und gebundenen Kügelchen. Die Immunofluoreszenz detektiert die außen, gebundenen Latexkügelchen. Durch Subtraktion dieser gebundenen, von allen Latexkügelchen resultiert die Zahl der internalisierten Kügelchen.

3.12.1.1 Cytochalasin D Behandlung von eukaryotischen Zellen

Die Humanzellen werden eine halbe Stunde mit Cytochalasin D (2 µg/ml Endkonzentration) im Zellkulturmedium vorinkubiert.

3.13 Neutralisation der chlamydialen Infektion mit rekombinantem Pmp21_{His6}-Protein

Um den Einfluss von Pmp21 bei der chlamydialen Infektion zu untersuchen, wurden HEp-2 Zellen infiziert, die zuvor mit rekombinantem Pmp21_{His6}-Proteinfragmenten vorbehandelt wurden. Zur Durchführung dieses Experimentes werden Gradienten-gereinigte chlamydiale Partikel sowie rekombinant hergestelltes und affinitätsgereinigtes Protein benötigt.

- HEp-2 Zellen werden auf ein Deckgläschen ausgesät und zwei bis drei Tage im Brutschrank inkubiert bis sich ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hat.
- Das Wachstumsmedium wird von den Zellen abgenommen und durch 250 µl Proteinsuspension ersetzt. Dazu wird rekombinant hergestelltes Protein in PBS (20-200 µg/ml) mit Medium versetzt.
- Kontrollen des Experimentes sind Medium mit BSA als unspezifisches Protein, sowie Medium mit PBS ohne Proteinzusatz.
- Die Zellen werden für 2 Std. bei 37°C mit der Proteinsuspension inkubiert.
- Anschließend wird 50 µl Chlamydien suspension (gereinigte Chlamydien in SPG-Puffer, MOI=100) der Zell-Proteinsuspension zugesetzt und erneut bei 37°C für 1 Std. inkubiert.
- Die Suspension wird abgenommen und die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml Chlamydienkulturmedium überschichtet.
- Das Chlamydienwachstum erfolgt für 48 Std. bei 37°C im Brutschrank, dann werden die Zellen mit Methanol fixiert.
- Wie unter Abschnitt 3.12 beschrieben werden die Einschlüsse mittels direkter Immunfluoreszenz angefärbt. Mikroskopisch werden fünfzehn Gesichtsfelder ausgewertet und die Anzahl der Einschlüsse gezählt.

3.14 Verifikation der Adhäsion von Chlamydien an eukaryotischen Zellen

3.14.1 Markierung von Gradienten-gereinigten chlamydialen EBs mit CFSE

- Der in SPG-Puffer gelagerte Chlamydiengradient wird für 30 min. bei 15 000 rpm (Hereaus Biofuge Primo R) zentrifugiert.
- Das Pellet wird in 1ml PBS/BSA (0,1%) aufgenommen.
- 5µl der CFSE-Lösung (in DMSO aufgenommen, laut Herstellerangaben) werden zugegeben, gevortext und für 1,5 Std. bei 37°C inkubiert.
- es wird 30 min. bei 15 000 rpm (Hereaus Biofuge Primo R) zentrifugiert.
- das Pellet wird in 1 ml PBS/BSA (0,1%) gewaschen, für 30min bei 15 000 rpm (Hereaus Biofuge Primo R) zentrifugiert.
- Das Pellet wird in 1 ml PBS aufgenommen und kann bei -20°C gelagert.

3.14.2 Bestimmung der Adhäsion chlamydialer Partikel an eukaryotische Zellen mittels Mikroskopie

Die Adhäsion chlamydialer Partikel an HEp-2 Zellen kann mittels CFSE-markierten Chlamydien nachgewiesen werden.

- Dazu werden Zellen mit verschiedenen Proteinsuspensionen [200µg/ml] vorinkubiert, bevor 20 µl CFSE- markierte Chlamydien suspension (MOI=100) unbehandelt oder zusammen mit Heparin (~500µg/ml) zu der Proteinsuspension zugesetzt werden.

- Es folgt eine Inkubation von 1 Std. bei 37°C.
- Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 1 ml PBS mit 3.7% Formaldehyd für 20 min. fixiert.
- Das Formaldehyd wird durch dreimaliges waschen mit PBS entfernt.
- Das Deckgläschen wird mit dem Zellrasen nach unten auf ein mit Vectashield versehenen Objektträger gelegt und mit Nagellack versiegelt.
- Im Mikroskop kann die Menge der gebundenen Chlamydien abgeschätzt werden.

3.14.3 Bestimmung der Adhäsion chlamydialer Partikel an eukaryotische Zellen mittels FACS

- Eine 24-Well-Gewebekulturplatte wird mit HEp-2 Zellen ausgesät und für 48 Std. im Brutschrank inkubiert bis sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hat.
- Die Zellen werden mit einer Proteinsuspension [200 µg/ml] verdünnt in Medium für 2 Std. bei 37°C inkubiert.
- 20 µl CFSE-markierter Chlamydien werden unbehandelt oder mit Heparin (ca. 600 µg/ml) vorbehandelt der Proteinsuspension zugesetzt.
- Es folgt eine Inkubation von 1 Std. bei 37°C.
- Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen.
- Auf jede Vertiefung werden 300 µl Trypsin/EDTA-Lösung gegeben und 5-10 min. bei 37°C inkubiert.
- Es werden weitere 700 µl Medium je Vertiefung gegeben und die Suspension wird in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.
- Es wird für 30-45 sek. bei 2000 Upm (HereausBiofuge pico) zentrifugiert.
- Der Überstand wird vorsichtig abgenommen.
- Die Zellen werden in 1 ml 3,7 % Formaldehyd gemischt und für 10 min. bei Raumtemperatur fixiert.
- Es wird erneut für 30 sek. bei 2000 Upm (HereausBiofuge pico) zentrifugiert
- Das Sediment wird in 1 ml PBS resuspendiert und kann nun im FACS analysiert werden.

3.15 Generierung polyklonaler Pmp216His-Antikörper

Für die Immunisierungen von Kaninchen wurde β -lactamase-Pmp21-D_{6His} Fusionsprotein (Pmp21-D) wie unter Abschnitt 3.8.3 beschrieben unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und anschließend gegen PBS dialysiert.

600 µg Protein wurden über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Lösung angefärbt. Das Fusionsprotein wurde aus dem Gel ausgeschnitten und der Firma Eurogentec zugesandt. Das Protein wurde zwei Kaninchen injiziert, um polyklonale Antikörper gegen das Pmp21-D_{6His} -Fusionsprotein zu generieren. Generiert wurden die Pmp21-D_{His6} Antikörper #1214 sowie #1215 (siehe Tabelle 2.5). Vor der Verwendung des Antikörpers in experimentellen Ansätzen wie Immunfluoreszenz oder Westernblot-Analysen sowie Neutralisations-Experimenten, wurde das Serum 1:25 in PBS bzw. PBS + Milchpulver

verdünnt und für 72 Std. bei 4°C auf HEp-2 Zellen oder dreimal auf HEp-2 Zellextrakten (Westernblot) voradsorbiert.

3.15.1 Aufreinigung der polyklonalen Pmp21-D_{6His}-Antikörper

Um die Spezifität und Reinheit des Antikörpers zu erhöhen erfolgte die Isolation der Gesamt IgG-Fraktion mit Protein A über eine Affinitätschromatographie und über eine Cnbr-Sepharose 4B rPmp21-N gekoppelten Säule wurden alle Antikörper gereinigt, die das Protein erkennen. (Diese Methoden erfolgten nach „Using Antibodies: A Laboratory Manual“, E. Harlow, D. Lane 1999, bzw. nach Herstellerangaben).

3.15.2 Aktivierung der Cnbr-Sepharose 4B Säule

- 1,5 ml werden in eine Säule pipettiert.
- Die Säule wird mit 20 ml Salzsäure (1 mM) gewaschen.
- Es wird nochmal mit 10 ml Bindepuffer gewaschen.
- Eine Proteinlösung (2 mg) wird mit Bindepuffer im Verhältnis 1 : 1 gemischt.
- Die Sepharose-Säule wird unten verschlossen. Die Proteinsuspension wird auf die Sepharose-Säule gegeben, oben verschlossen und bei 4°C über Nacht auf dem Rad inkubiert.
- Die Säulenprobe wird aufgefangen.
- Es werden 4 ml Blockierungspuffer (0,5 M Triethanolamin/ 0,1 M Tris pH:8) dazugegeben und 4 Std auf Eis inkubiert (gelegentlich mischen).
- Es wird dreimal mit Tris/PBS (0,1 M, pH:8) und dreimal mit Acetat (0,1 M)/NaCl (0,5 M) im Wechsel gewaschen.
- 2 ml des Antikörperserums werden mit 8 ml Tris/PBS (0,1 M, pH:8) gemischt und anschließend auf die Säule gegeben und für 1 Std. bei 4°C auf dem Rad inkubiert .
- (Die Suspension kann aufgefangen werden).
- Die Säule wird mit 20 ml Tris/PBS (10 mM, pH:7,5) und mit 20 ml NaCl(0,5 M)/ Tris (10 mM, pH:7,5) gewaschen.
- Elution des Antikörpers:
 - a) Es erfolgt zuerst eine saure Elution mit 10 ml Glycin (0,1 M, pH: 2,5), diese werden in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Tris/PBS (1 M, pH:8) aufgefangen.
 - b) Sekundär erfolgt die basische Elution mit 10 ml Triethanolamin (0,1 M, pH: 11,5), diese Fraktion wird ebenfalls in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit 1m Tris/PBS (0,1 M, pH:8) aufgefangen.

Der reaktive Pmp21-D_{6His}-Antikörper befand sich in der sauren Elutionsfraktion.

3.15.3 Neutralisation der chlamydialen Infektion durch Zugabe von polyklonalen β -lac-Pmp21-D6His-Antikörpern

Um den Einfluss von Pmp21 bei der chlamydialen Infektion weiter zu untersuchen werden Chlamydien, die zuvor mit dem polyklonalen Pmp21-Antikörper vorbehandelt wurden, in Infektionsversuchen mit HEp-2 Zellen eingesetzt. Zur Durchführung dieses Experimentes werden Gradienten-gereinigte chlamydiale Partikel sowie gegen HEp-2 Zellen voradsorbierte Pmp21-D6His-Antikörper benötigt.

- Für die Neutralisation der chlamydialen Infektion werden HEp-2 Zellen auf ein Deckgläschen ausgesät und zwei bis drei Tage im Brutschrank inkubiert bis sich ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hat.
- 50 μ l Chlamydien suspension (gereinigte Chlamydien in SPG-Puffer, MOI=100) werden zu 500 μ l Antikörperlösung (voradsorbierter Antikörper, pur) gegeben und 1 Std. bei 4 °C unter leichtem schwenken inkubiert.
- Kontrollen für dieses Experiment sind Chlamydien, die nur in PBS oder in PBS mit Prä-Immunsereum vorinkubiert wurden.
- Das Wachstumsmedium wird von den Zellen abgenommen und die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen. Pro Deckgläschen werden 500 μ l Chlamydien in Antikörpersuspension zu den Zellen gegeben und für 1 Std. bei 37°C unter leichtem Schwenken inkubiert.
- Die Suspension wird entfernt und die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen bevor sie mit 1 ml Chlamydienwachstumsmedium überschichtet werden.
- Das Chlamydienwachstum erfolgt für 48 Std. bei 37°C im Brutschrank, dann werden die Zellen mit Methanol fixiert.
- Wie unter Abschnitt 3.5.3 beschrieben werden die Einschlüsse mittels direkter Immunfluoreszenz angefärbt. Mikroskopisch werden fünfzehn Gesichtsfelder ausgewertet und die Anzahl der gebildeten Einschlüsse gezählt.

4 ERGEBNISSE

Charakterisierung und Identifikation der funktionellen Rolle des Pmp21 Proteins von *C. pneumoniae* während des Infektionszyklus

In frühen Studien konnte gezeigt werden, dass der chlamydiale Außenmembrankomplex (cOMC) an eukaryotische Zellen binden kann (Eisenberg, Wyrick et al. 1983). Bei Untersuchungen der darin enthaltenen Proteinkomponenten konnten für das *C. pneumoniae* Momp Protein keine adhäsiven Eigenschaften festgestellt werden, während OmcB als chlamydiales Adhäsins identifiziert wurde (Moelleken and Hegemann 2008). Auf der Suche nach weiteren chlamydialen Adhäsinen wurden die Polymorphen Membranproteine (Pmps) näher studiert. Die Pmps Pmp6, -8, -10, -11, -21 sind oberflächenlokalisiert und können eukaryotische Zellen stimulieren (Vandahl, Pedersen et al. 2002), (Niessner, Kaun et al. 2003), (Mygind, Vandahl et al. 2004), (Bunk, Susnea et al. 2008). Für Pmp21 zeigten vorangegangene Studien, dass es an Humanzellen binden kann (Georgoudis 2004). Aufbauend auf diese ersten Befunde sollte hier die funktionelle Rolle von Pmp21 für das Infektionsgeschehen der Chlamydien aufgeklärt werden.

4.1 Identifikation der adhäsiven Eigenschaften von Pmp21 an Humanzellen

Die adhäsiven Eigenschaften der Pmp21-Passagierdomäne (Pmp21-N) sowie der beiden Proteindomänen Pmp21-B und Pmp21-D konnten mit Hilfe des Hefe-Adhäsions-Systems bereits in der Diplomarbeit identifiziert werden (Abbildung 8; Georgoudis 2004). Im Folgenden sollte diese Adhäsionsstudie um die fehlenden Proteindomänen Pmp21-A und Pmp21-C erweitert werden (Abbildung 8). Für den Hefe-Adhäsionstest wird das zu untersuchende Gen mittels homologer *in vivo* Rekombination in Hefe in den Expressionsvektor pEG6 kloniert. Dieser Vektor trägt die AGA2 Untereinheit des Hefe-a-Agglutininrezeptors unter der Kontrolle des *tetO₇-CYC1*-Promotors (Georgoudis 2004).

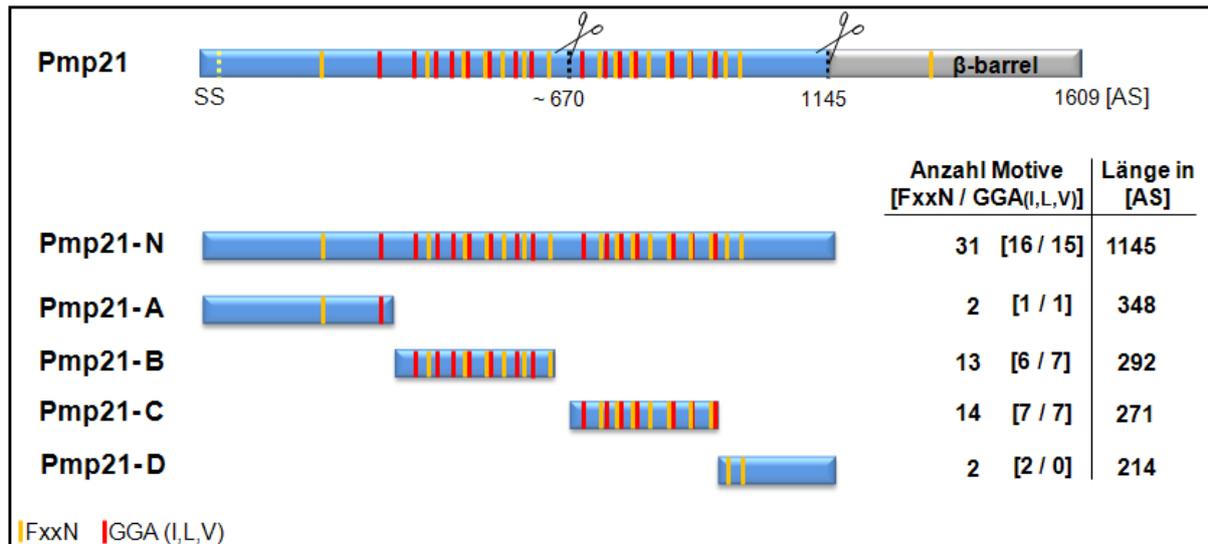


Abbildung 8: Schematische Darstellung von Pmp21

Das chlamydiale Pmp21 Protein weist eine Drei-Domänen-Struktur auf: Eine N-terminale Signalsequenz (SS, 1-30 AS), die Passagierdomäne (31-1145 AS) und der β -barrel im C-Terminus (1146-1609 AS).

Die Einteilung des Proteins erfolgte in die dargestellten fünf Domänen: Pmp21-N (AS1-AS1145), Pmp21-A (AS31-AS385), Pmp21-B (AS379-AS670), Pmp21-C (AS671-AS941) und Pmp21-D (AS942-AS1145). Die Tabelle gibt die Anzahl der repetitiven Motive der jeweiligen Proteindomäne sowie deren Länge in Aminosäuren an. SS= Signalsequenz, AS= Aminosäure; Scheren markieren identifizierte Prozessierungsstellen (Vandahl et al., 2004), (Wehl et al., 2004).

Das Aga2p Protein wird nach Sekretion aus der Hefezelle über zwei Disulfidbrückenbindungen an das Aga1p Protein in der Hefezellwand gebunden (s. Einleitung 1.5.2). In Abwesenheit von Doxzyklin ist der Promotor aktiv und Aga2p wird exprimiert und auf der Hefeoberfläche präsentiert.

Die Expression der so generierten Pmp21-N-Passagierdomäne (Pmp21-N) wurde mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen. Hierbei konnte für Pmp21-N (Aga2p-Pmp21-N) eine starke Proteinlaufbande zwischen 148 und 250 kDa und ein breites Bandenmuster zwischen 22-50 kDa detektiert werden (Abbildung 9, A, Spur 2). Für die Kontrolle Aga2p wurde ein breites Bandenmuster im Bereich von 22-50 kDa detektiert (Abbildung 9, A, Spur 1). Das theoretisch berechnete Molekulargewicht beträgt für die Kontrolle Aga2p 17 kDa, für das Fusionsprotein Aga2p-Pmp21-N 133 kDa. Die Unterschiede im Laufverhalten beruhen auf der starken O-Glykosylierung des Aga2p (Shen, Wang et al. 2001). Durch indirekte Immunfluoreszenz konnte die Oberflächenlokalisation der exprimierten Proteine Aga2p sowie Aga2p-Pmp21-N auf den fixierten, jedoch nicht permeabilisierten Hefezellen direkt nachgewiesen werden (Abbildung 9, D, F).

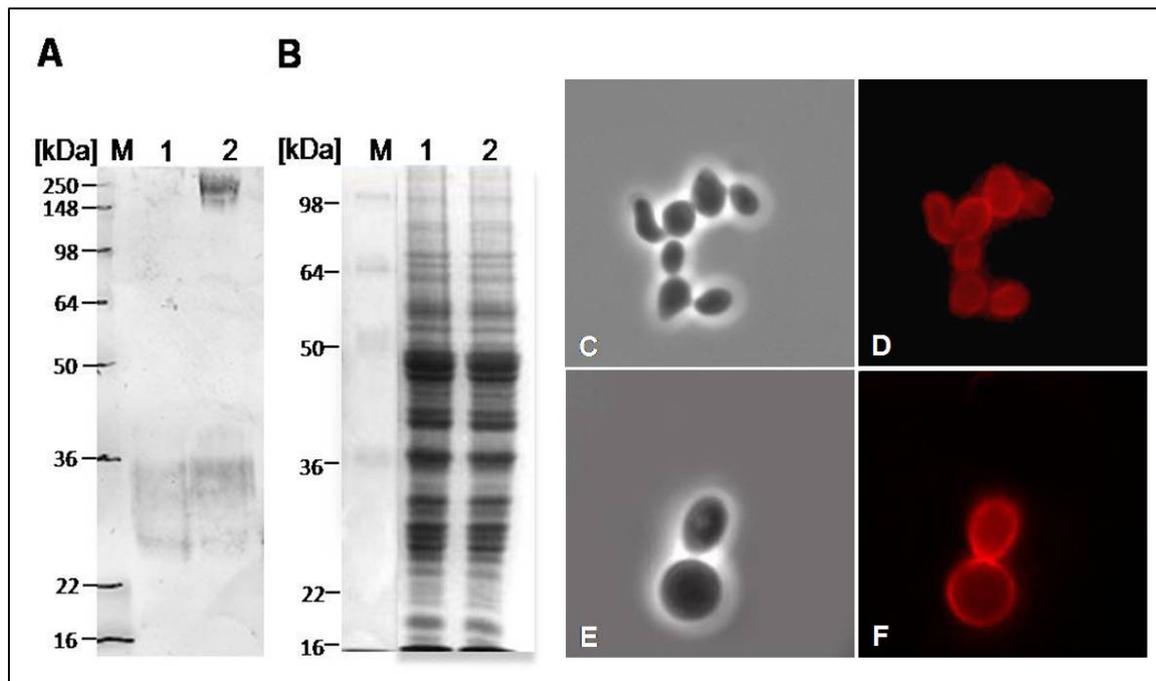


Abbildung 9: Expression des Aga2p-Pmp21-N-Fusionsproteins

A) Westernblot-Analyse. Detektion der His-markierten Aga2p und Aga2p-Pmp21-N Fusionsproteine mit dem Anti-penta His Antikörper und dem alkalische Phosphatase-konjugierten Anti-Maus Antikörper. M: Größenstandard; B) Ladungskontrolle, Proteinextrakte von Hefezellen, die Aga2p (Spur 1) oder Aga2p-Pmp21-N (Spur 2) exprimieren, Coomassie-gefärbtes 10 %iges SDS-Gel. C-F) Immunfluoreszenzaufnahmen (63-fache Objektiv-Vergrößerung): Hefezellen die Aga2p (C, D) oder Aga2p-Pmp21-N (E, F) exprimieren. Die Detektion der Proteinexpression auf der Hefeoberfläche erfolgte durch die Verwendung des Anti-Xpress Antikörpers und des Cy3-konjugierten Anti-Maus Antikörpers.

4.1.1 Aga2p-Pmp21-Domänen exprimierende Hefezellen binden an Humanzellen

Zur Untersuchung der adhäsiven Eigenschaften der Pmp21-Passagierdomäne sollte ein Hefe-Adhäsionstest durchgeführt werden. Zuvor wurde die Proteinexpression der Aga2p-Pmp21-A,-B,-C und -D Fusionsproteine mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 10, A). Dabei konnte für das Aga2p-Pmp21-A Fusionsprotein eine Proteinbande über der 64 kDa Markerbande und für das Aga2p-Pmp21-B Fusionsproteins unterhalb von 64 kDa detektiert werden. Für Aga2p-Pmp21-C wurde eine Laufbande zwischen 50 und 64 kDa und für Aga2p-Pmp21-D auf Höhe von 50 kDa nachgewiesen.

Die Protein-exprimierenden Hefen wurden in einem fünf-fachen Überschuss zu konfluent angewachsenen HEp-2 Zellen gegeben. Nach einer einstündigen Inkubationsphase bei 4°C wurden die ungebundenen Hefezellen durch mehrfaches Waschen mit PBS entfernt und wie in Methoden (siehe Abschnitt 3.9) beschrieben ausgewertet. Als Positivkontrolle wurde das bekannte Adhäsins von *Y. pseudotuberculosis*, Invasin, verwendet. Dieses Protein enthält im C-Terminus eine 194 Aminosäuren lange Adhäsionsdomäne, welche auch die

Internalisierung in eukaryotische Wirtszellen vermittelt und somit eine geeignete Positivkontrolle für den Hefe-Adhäsionstest darstellt (Dersch and Isberg 1999), (Moelleken and Hegemann 2008). Die Zahl der gebundenen Hefezellen wird im Folgenden immer auf 1000 HEp-2 Zellen bezogen. Während Aga2p exprimierende Hefezellen eine Adhäsion von 90 Hefezellen auf 1000 HEp-2 Zellen aufwiesen (Negativkontrolle), zeigten Aga2p-Invasin exprimierende Hefezellen eine relative Adhäsion von 500 Hefezellen (Positivkontrolle). Für die Aga2p-Pmp21-N exprimierenden Hefezellen konnte eine Adhäsion von 900 Hefezellen, für Aga2p-Pmp21-B 580 Hefezellen und für Aga2p-Pmp21-D 650 Hefezellen detektiert werden (Abbildung 10). Für Aga2p-Pmp21-A wurden 450 gebundene Hefezellen detektiert, während 550 Aga2p-Pmp21-C exprimierende Hefezellen pro 1000 HEp-2 Zellen gebunden werden.

Erstaunlicherweise adhären somit alle getesteten Pmp21-Proteindomänen an HEp-2 Zellen.

4.1.2 Rekombinante Pmp21-Domänen adhären an Humanzellen

Alle fünf Pmp21-Proteindomänen (Pmp21-A bis -D und -N) zeigten im Hefe-Adhäsionstest eine signifikante Adhäsion an Humanzellen. Diese Ergebnisse sollten durch Adhäsionsstudien mit rekombinantem Protein verifiziert werden. Dazu wurden Pmp21-N sowie die vier weiteren Pmp21-Proteindomänen A-D rekombinant als His₆-markiertes Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und affinitätschromatographisch über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Mit Hilfe von Coomassie-gefärbten SDS-Gelen wurde die Reinheit der Proteinproben überprüft. Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel konnte für rekombinantes Pmp21-N eine Proteinbande auf einer Laufhöhe von zirka 120 kDa detektiert werden (theoretisches Molekulargewicht: 116,7 kDa) (Abbildung 11, A). Die zusätzlich auftretenden Nebenbanden konnten in Westernblot-Analysen als Degradationsbanden identifiziert werden.

Für rPmp21-A zeigte sich eine Laufbande oberhalb der 50 kDa Markerbande (theoretisches MG: 36,1 kDa). Die Proteinbande von rPmp21-B konnte bei zirka 30 kDa nachgewiesen werden (theoretisches MG: 29,8 kDa).

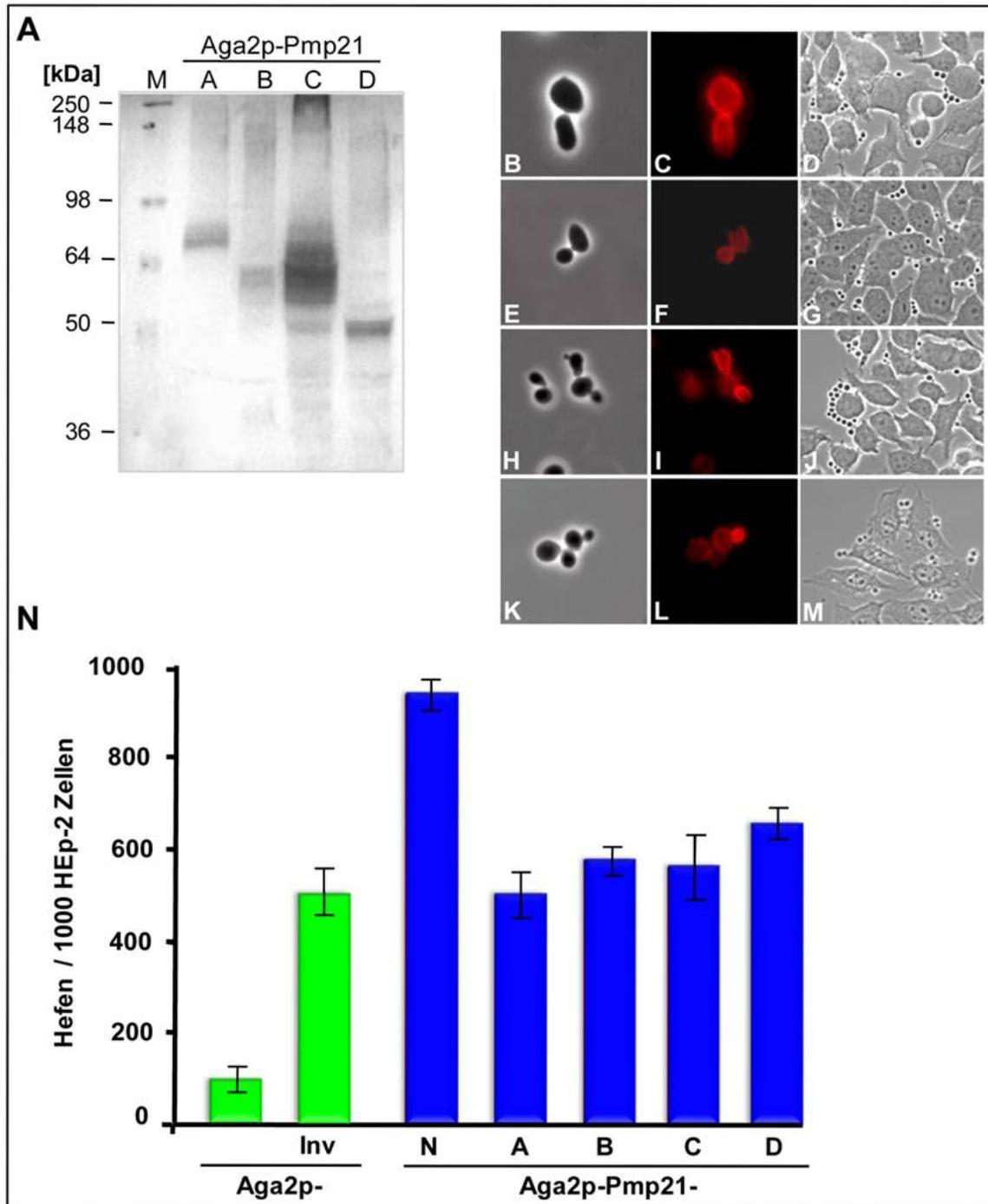


Abbildung 10: Aga2p-Pmp21-Domänen exprimierende Hefezellen binden an Humanzellen

A) Westernblot-Analyse. Detektion der His₆-markierten Aga2p-Pmp21-Domänen (Pmp21-A bis Pmp21-D) mit dem Anti-penta His Antikörper (1:2500 verd.) und dem AP-konjugierten Anti-Maus Antikörper (1:7500). M= Größenstandard; B-M) Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen (63-fache Vergrößerung) der Protein-exprimierenden Hefen. D, G, J, M) Bindung der Hefen an die Humanzellen unter Verwendung von 1×10^5 HEp-2 Zellen und einem 5-fachen Überschuss (MOI 5) an Hefezellen; N) Quantifizierung des Hefeadhäsionstests. (n=4)

Die Laufhöhe der rPmp21-C-Proteinbande lag bei zirka 60 kDa (theoretisches MG: 27,7 kDa) und die Proteinbande von rPmp21-D konnte bei zirka 30 kDa detektiert werden (theoretisches MG: 21 kDa) (Abbildung 11, B bis E).

Für die Proteindomänen wurden in Westernblot-Analysen spezifische Proteinbanden auf gleicher Laufhöhe wie schon im Coomassie-gefärbten SDS-Gel detektiert. Zudem zeigten sich bei Pmp21-N, -A und -E weitere Nebenbanden (Abbildung 11, A, B, D). Zur Analyse ihrer adhäsiven Eigenschaften wurden Latexkügelchen mit gleichen Proteinkonzentrationen (200 µg/ml) rekombinanten Pmp21-N oder den jeweiligen anderen rekombinanten Proteindomänen beschichtet und mit HEp-2 Zellen inkubiert. Die ungebundenen Partikel wurden durch mehrfaches Waschen mit PBS entfernt und die zellassoziierten Latexkügelchen durch Formaldehyd auf den Humanzellen fixiert (Abbildung 12, D). Die quantitative Auswertung des Bindungstests ergab, dass insgesamt 254 BSA-beschichtete Latexkügelchen an 1000 HEp-2 Zellen adhärten, während von den mit rPmp21-N beladenen Latexkügelchen durchschnittlich zirka 1243 an die HEp-2 Zellen adhärten. Für die rPmp21-A-Domäne ergab sich eine relative Adhäsion von zirka 803 Latexkügelchen, während 1073 der mit rPmp21-B beschichteten Latexkügelchen an Humanzellen adhärten. Der Einsatz von rPmp21-C resultierte in einer relativen Adhäsion von 1050 Latexkügelchen und der von rPmp21-D von zirka 1697 Partikeln an HEp-2 Zellen (Abbildung 12, D).

Somit adhärten alle Pmp21- Proteindomänen an Humanzellen, wobei quantitative Unterschiede im Bindeverhalten zwischen den Protein-exprimierenden Hefezellen und den rekombinanten Proteinen beobachtet werden konnten. Im Hefe-Adhäsionstest wurde für die Aga2p-Pmp21-N exprimierenden Hefen die stärkste Adhäsion nachgewiesen, gefolgt von Aga2p-Pmp21-D. Beim rekombinanten Proteintest zeigte die Pmp21-D Domäne die stärksten adhäsiven Eigenschaften. Dennoch bestätigen beide Adhäsionstests eine signifikante Adhäsion für alle Pmp21-Domänen an Humanzellen. Bei anderen bisher identifizierten Adhäsinen beruht die Bindung auf bestimmte Motive, so dass nur ein spezifischer Bereich des Proteins die adhäsiven Eigenschaften vermittelt. Bei Pmp21 ist der gesamte N-Terminus in der Bindung involviert.

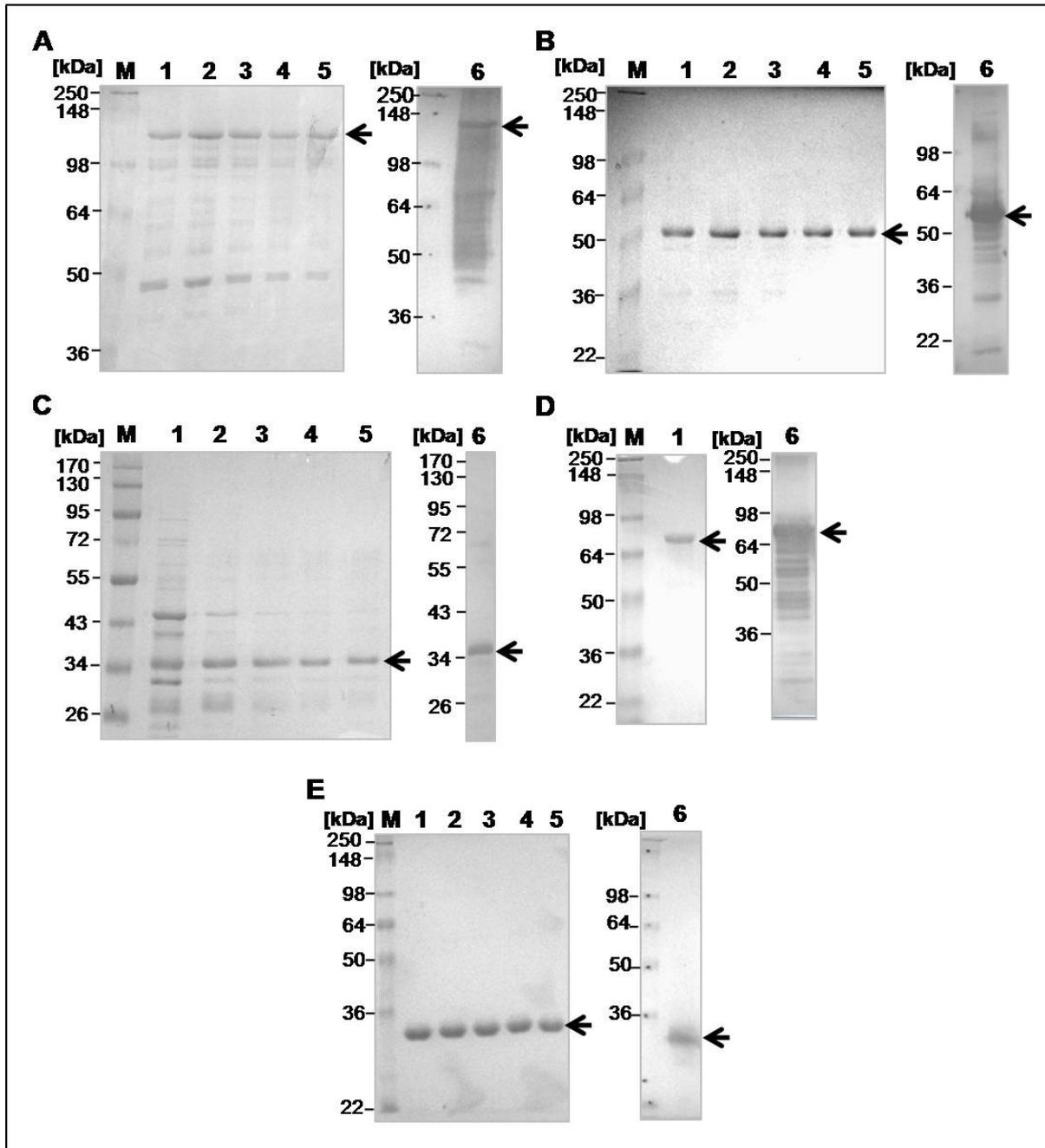


Abbildung 11: Aufreinigung von Pmp21-Domänen aus *E. coli*

Coomassie-gefärbte 10%ige SDS-Gele; M= Größenstandard; Analyse der Elutionsfraktionen (E.) der affinitätschromatographischen Proteinreinigung von Pmp21-N (A, 1-5 E.), Pmp21-A (B, 1-5 E.); Pmp21-B (C, 1-5 E.), Pmp21-C (D, 1 E.) und Pmp21-D (E, 1-5 E.). Die Detektion der Proteine im Westernblot erfolgte mit dem Antipenta His-AK (1:2500 verd.) und ist jeweils neben dem Coomassie-Gel dargestellt (Spur 6). Die Pfeile markieren die jeweiligen Vollängen Proteinbanden.

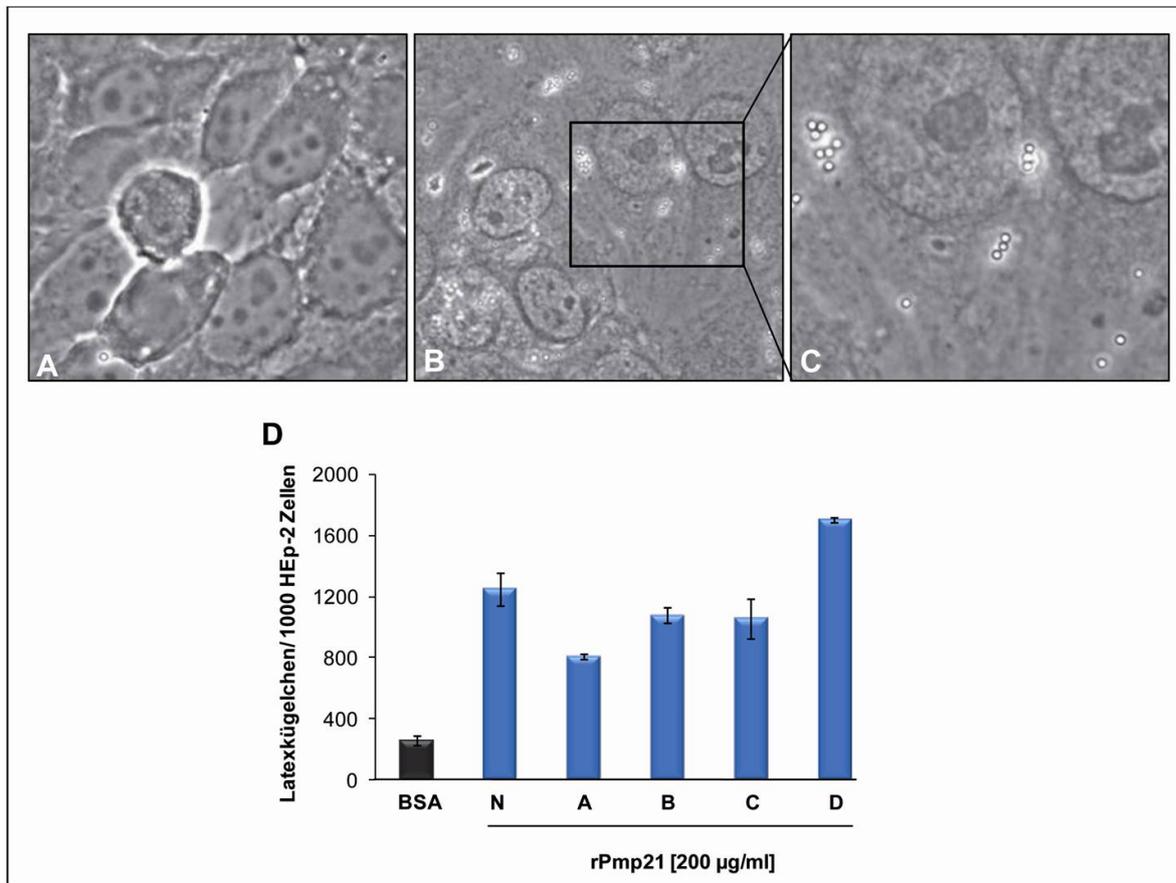


Abbildung 12: Die rekombinanten Pmp21-Proteindomänen A bis D sowie N adhären an Humanzellen
 1×10^5 HEp-2 Zellen wurden mit proteinbeschichteten Latexkügelchen (MOI 100) für eine Stunde bei 37°C inkubiert und das Adhäsionsvermögen mikroskopisch ausgewertet (A-C). Phasenkontrastaufnahmen (63-fache Objektiv-Vergrößerung) der mit BSA (A) und Pmp21-N (B) beschichteten zellassozierten Latexkügelchen.(C) Ausschnittsvergrößerung aus B. D) Quantitative Auswertung des Bindungstests. (n=3)

4.2 Identifizierung der Adhäsion vermittelnden Sequenzen von Pmp21

Für Pmp21 konnte gezeigt werden, dass eine zweite Spaltung des Proteins innerhalb der Passagierdomäne erfolgt, die in zwei prozessierte Proteinformen N-pmp21(70kDa) und M-pmp21 (55kDa) resultiert (Wehrl et al., 2004). N-pmp21 konnte auf der Oberfläche von EBs und RBs nachgewiesen werden, während für M-pmp21 keine weiteren Studien durchgeführt wurden (Wehrl et al., 2004). Die Pmp21-Domänen Pmp21-A und -B liegen innerhalb der 70 kDa Proteinform und Pmp21-C sowie Pmp21-D in der 55 kDa Form. Aufgrund der adhäsiven Eigenschaften aller Pmp21-Proteindomänen kann für die prozessierten Pmp21-Formen eine Funktion im Adhäsionsprozess postuliert werden. Zur weiteren Einengung der identifizierten Adhäsionsdomänen wurden zwei Proteindomänen (Pmp21-B und -D) analysiert, die jeweils auf einer der prozessierten Pmp21-Proteinformen liegen und sich

bezüglich der Verteilung und Anzahl ihrer repetitiven Motive stark unterscheiden (Abbildung 13, A).

4.2.1 Identifizierung einer minimalen Adhäsionsdomäne von Pmp21

Um die Bindeeigenschaften dieser Proteindomänen zu studieren, wurden sie sukzessive vom C- bzw. N-Terminus aus verkürzt und im Hefe-Adhäsionstest analysiert (Abbildung 13, A, B). Aga2p-Pmp21-B Δ 1 wurde auf 200 Aminosäuren verkürzt und zeigte eine stärkere Adhäsion mit 450 Hefezellen an 1000 HEP-2 Zellen als Aga2p-Pmp21-B exprimierende Hefen (250 Hefen) (Abbildung 13, B). Die Aga2p-Pmp21-B Δ 2 Deletionsvariante mit 50 Aminosäuren Länge zeigte mit 300 Hefezellen an 1000 HEP-2 Zellen ebenfalls eine Adhäsion vergleichbar zur Ausgangsdomäne Pmp21-B. Im Gegensatz dazu zeigten die verkürzten Aga2p-Pmp21-D Deletionsdomänen eine massive Reduktion der Adhäsion. Für die Ausgangsdomäne Aga2p-Pmp21-D konnte eine Adhäsion von 350 Hefezellen an 1000 HEP-2 Zellen detektiert werden. Dagegen lag die Adhäsion für Aga2p-Pmp21-D Δ 1 mit 100 Hefen nur um den Faktor 2 höher als die Kontrolle (50 Hefen). Die Adhäsion für Aga2p-Pmp21-D Δ 2 exprimierende Hefezellen lag mit 80 Hefezellen an 1000 HEP-2 Zellen nur schwach über der Aga2p-Kontrolle (Abbildung 13, B).

Durch die Deletion von Pmp21-B fand keine Reduktion der adhäsiven Eigenschaften statt, sogar die 50 Aminosäuren kurze Proteindomäne Pmp21-B Δ 2, mit noch drei repetitiven Motiven, adhärte an Humanzellen. Die getesteten Deletionsvarianten von Aga2-Pmp21-D, die keine repetitiven Motive mehr enthalten, verloren ihre Bindeeigenschaften im Zuge der Verkürzung des N-Terminalen Proteinteils. Dies deutet auf die Anwesenheit einer Adhäsionsdomäne innerhalb des deletierten Proteinteils hin (Abbildung 13, A).

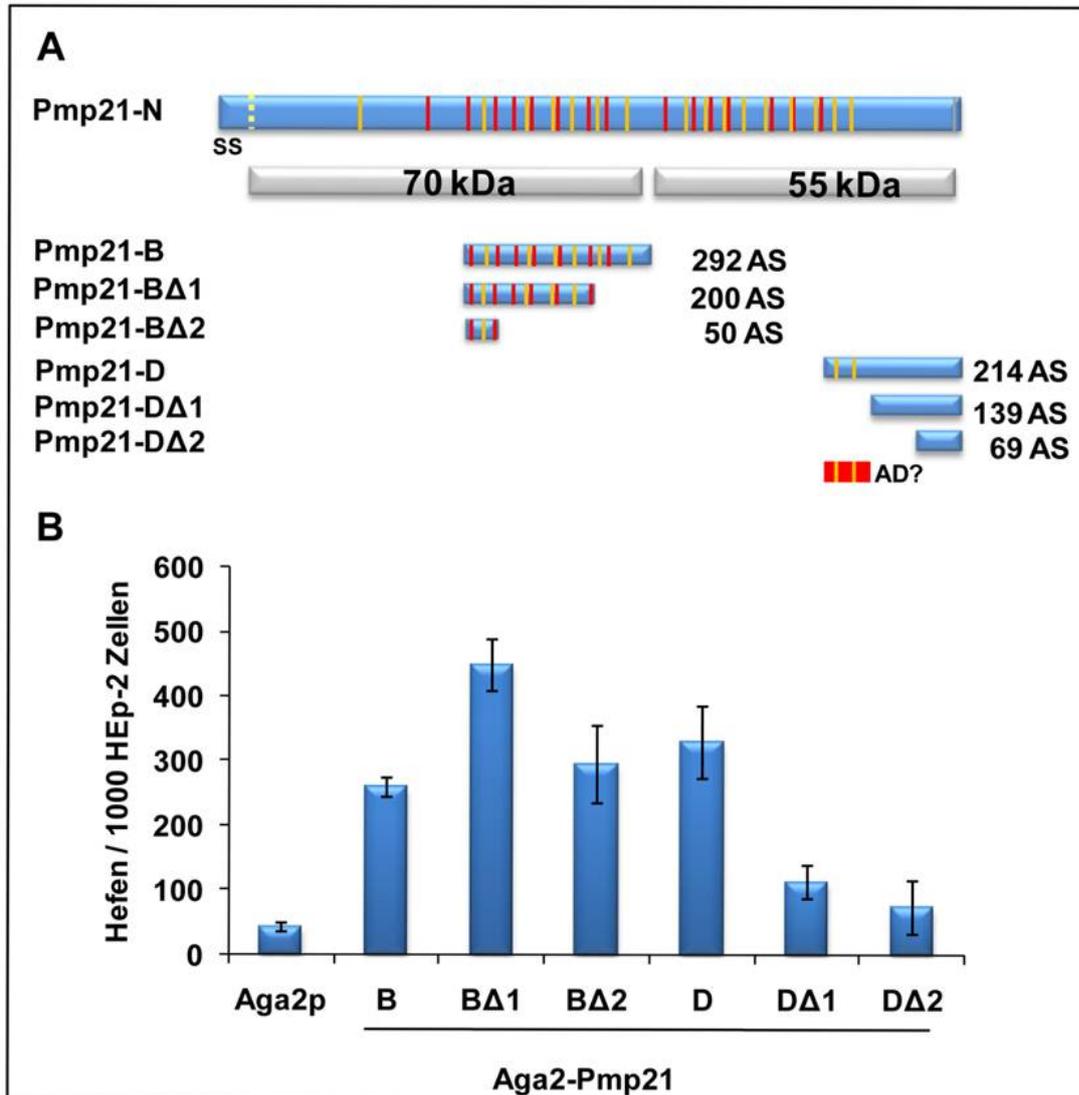


Abbildung 13: Minimierung von Pmp21-Adhäsionsdomänen

A) Darstellung von Pmp21-N und den Deletionsproteinen. gelb: FxxN, rot GGA (I,L,V). Die Pmp21-Domänen Pmp21-B und Pmp21-D und ihre Deletionsvarianten liegen jeweils in einer der prozessierten Pmp21-Proteinformen vor: 70 kDa (N-pmp21) bzw. 55 kDa (M-pmp21). Die Länge der jeweiligen Proteindomäne ist in Aminosäuren (AS) angegeben. AD= Adhäsionsdomäne. B) Quantitative Auswertung des Hefe-Adhäsionstests für die Aga2p-Pmp21-Fusionsproteine.

4.2.2 Die Adhäsion von Pmp21-D an Humanzellen wird über die repetitiven FxxN Motive vermittelt

Die unterschiedlichen Bindeeigenschaften der Domänen Pmp21-B und Pmp21-D und ihrer verkürzten Versionen könnten auf der An- bzw. Abwesenheit der für die Pmps charakteristischen repetitiven Motive FxxN und GGAI beruhen (s. Abschnitt 1.4.4). Bisher ist die Funktion dieser Motive vollkommen ungeklärt. Bei Aga2-Pmp21-B besitzt jede der beiden getesteten Deletionsdomänen noch mehrere der repetitiven Motive. Im Gegensatz dazu tragen die Deletionsvarianten Pmp21-D Δ 1 und Pmp21-D Δ 2 diese Motive nicht mehr. Der Verlust der Bindeeigenschaften von Aga2p-Pmp21-D Δ 1/2 könnte somit auf den Verlust der beiden in Pmp21-D lokalisierten FxxN Motive beruhen (Abbildung 13, B). Um dies zu überprüfen sollten weitere Mutationsanalysen an der Pmp21-D Proteindomäne durchgeführt werden. Es wurden vier verschiedene Punktmutanten generiert, in denen die Aminosäuren Phenylalanin (F) und Asparagin (N) in den beiden FxxN Motiven sukzessiv gegen Aminosäuren mit entgegengesetzten chemischen Eigenschaften [Serin (S) und Valin (V)] ersetzt wurden (Abbildung 14, B). In der ersten Mutante wurde das Asparagin des ersten Motivs ausgetauscht (Pmp21-D_{mut1}). Bei der zweiten Mutante Pmp21-D_{mut2} wurde das zweite Motiv mutiert (Abbildung 14, B). Die dritte Mutante bildet eine Kombination der ersten beiden Mutanten (Pmp21-D_{mut3}). Bei der vierten Mutante wurden beide Motive mutiert (Pmp21-D_{mut4}). Diese Mutanten wurden mittels homologer *in vivo* Rekombination in den Hefeexpressions-Vektor kloniert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte über Westernblot-Analyse, wobei für die Kontrolle Aga2p nach α -Mannosidase Behandlung der Proteinextrakte eine Laufbande unterhalb von 26 kDa (theoretisches MG: 17 kDa) und für alle Pmp21-D Mutationsdomänen eine Laufbande unterhalb von 55 kDa detektiert werden konnte (theoretisches MG: 38 kDa; Abbildung 15, B). Mit Hilfe des Hefoberflächenexpressionssystems wurden die adhäsiven Eigenschaften untersucht (Abbildung 15, A). Für die Negativkontrolle Aga2p konnten ca. 90 gebundene Hefezellen pro 1000 HEp-2 Zellen detektiert werden. Die wildtypische Positivkontrolle Aga2p-Pmp21-D zeigte eine Adhäsion von 442 Hefezellen, die gleich 100% gesetzt wurde. Im Vergleich hierzu zeigte sich für Pmp21-D_{mut1}, welche ein intaktes zweites Motiv trägt, eine starke Reduktion der Adhäsion um zirka 50%. Bei der Mutante Pmp21-D_{mut2}, die ebenfalls ein intaktes Motiv trägt, wurde das gesamte zweite FxxN Motiv mutiert, resultierend in einer Reduktion um zirka 74%. Die partielle Mutagenese beider Motive erhöhte die Reduktion nur geringfügig (zirka 75%, Pmp21-D_{mut3}), während die Mutation beider Motive zugleich eine Reduktion von zirka 56% aufwies (Abbildung 15, A). Die Ergebnisse zeigen, dass die Mutagenese der Motive in Pmp21-D zu einer starken Reduktion der Bindeeigenschaften der Domäne führte, was eine funktionelle Rolle der repetitiven Motive im Adhäsionsprozess suggeriert.

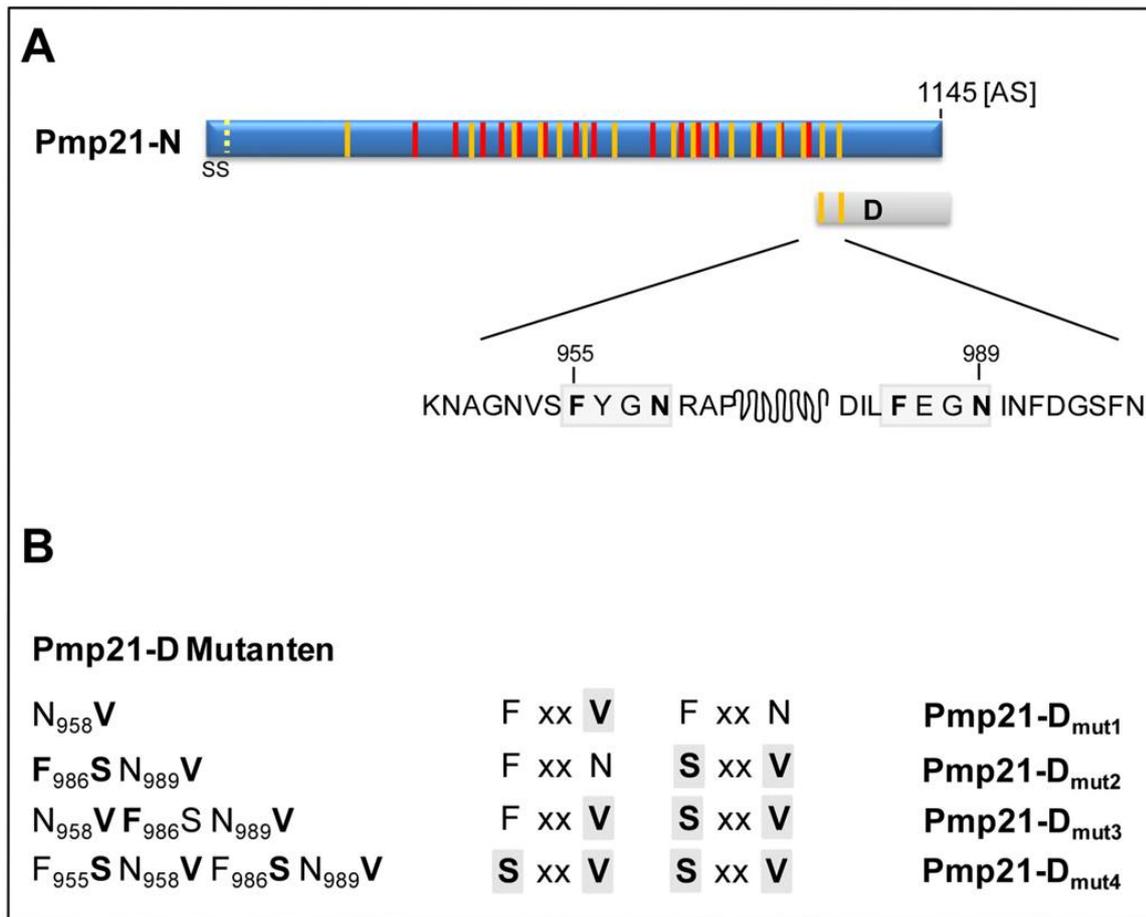


Abbildung 14: Mutationsanalyse der FxxN-Motive in Pmp21-D

A) Darstellung der repetitiven Motive in Pmp21-N und Pmp21-D. Die Balken entsprechen je einem Motiv (gelb= FxxN, rot= GGA (I,L,V)). B) Gerichtete Mutagenese der beiden FxxN Motive.

Zur Bestätigung der Hefe-Adhäsionsdaten wurden als nächstes drei dieser Mutanten rekombinant hergestellt (Abbildung 15, A).

Die Reinheit der Proben wurde mit Hilfe von Coomassie-gefärbten SDS-Gelen überprüft. Für die drei rPmp21-D-Mutanten (-D_{mut1} (Spur 1), -D_{mut3} (Spur 2), -D_{mut4} (Spur 3)) zeigte sich jeweils eine Bande zwischen 26 kDa und 34 kDa (theoretisches MG: 21 kDa) (Abbildung 15, D). Pmp21-D_{mut4} zeigte unterhalb und oberhalb der spezifischen Proteinbande dünne Zusatzbanden (Abbildung 15, D, Spur 3).

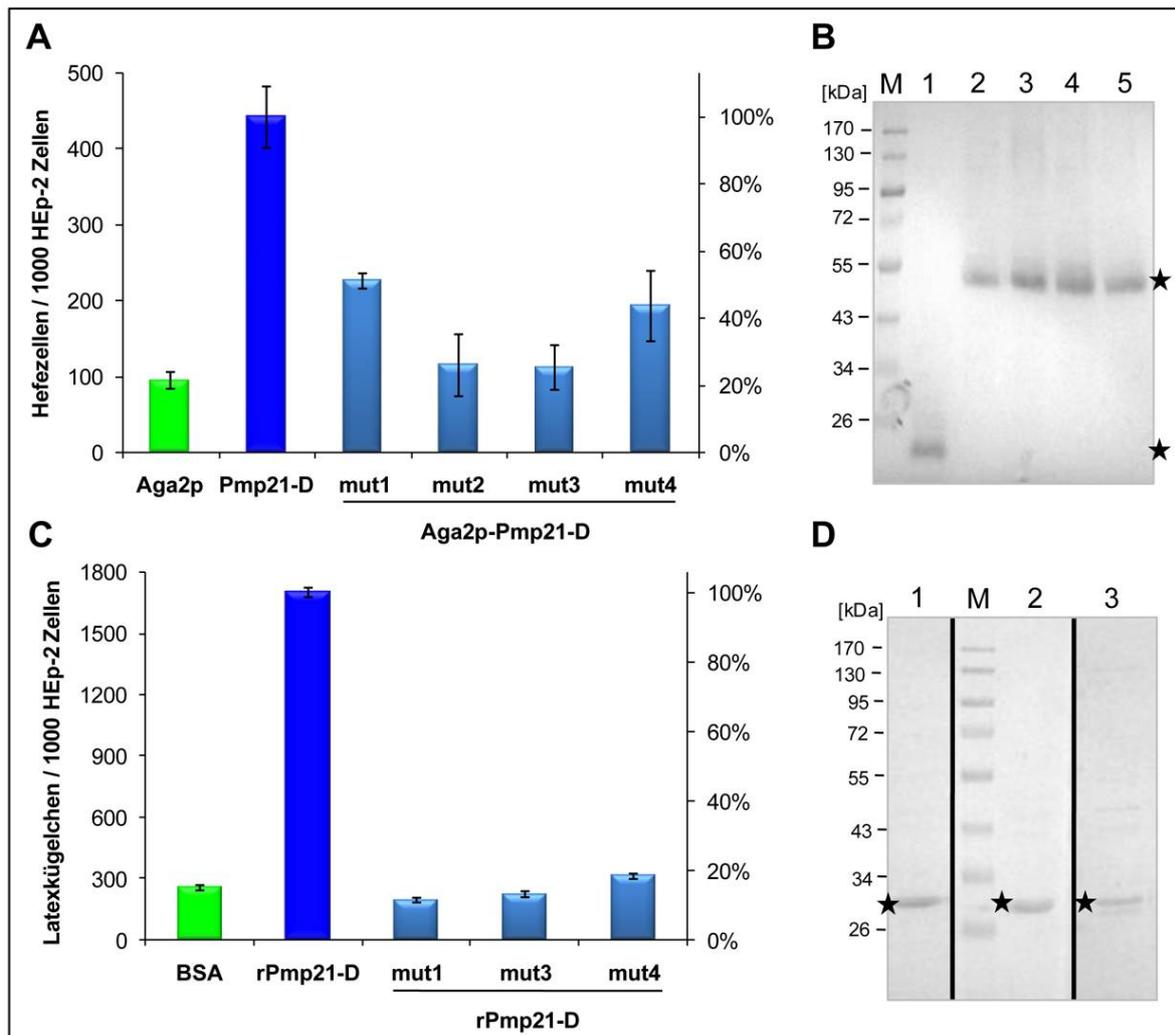


Abbildung 15: Adhäsionstests mit den Pmp21-D Mutanten

A) Quantitative Auswertung des Hefe-Adhäsionstests. 1×10^5 HEp-2 Zellen wurden mit Protein-exprimierenden Hefezellen in einem 10-fachen Überschuss für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Ungebundene Hefezellen wurden durch Waschen entfernt und die Zahl der gebundenen Hefezellen pro 1000 HEp-2 Zellen bestimmt.

B) Westernblot-Analyse der α -Mannosidase behandelten Proteinextrakte von Aga2p (Spur 1), Aga2p-Pmp21-D_{mut1} (Spur 2), -D_{mut2} (Spur 3), -D_{mut3} (Spur 4,) und -D_{mut4} (Spur 5) exprimierenden Hefezellen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit den Anti-Penta-His und sekundären AP-konjugierten Anti-Maus Antikörpern. C) Quantitative Auswertung des Adhäsionstests mit rekombinanten Protein. 1×10^5 HEp-2 Zellen wurden mit proteinbeschichteten Latexkugelchen (MOI 10) für eine Stunde inkubiert. D) Coomassie-gefärbte 10%ige SDS-Gele der affinitätschromatographischen Proteinreinigung von Pmp21-D_{mut1} (Spur 1), -D_{mut3} (Spur 2) und -D_{mut4} (Spur 3). M= Größenstandard. Stern markiert die spezifische Proteinbande.

Die Latexkugelchen wurden mit den rekombinanten Proteinen beschichtet und für den Adhäsionstest eingesetzt (Abbildung 15, C). Im Vergleich zur Negativkontrolle BSA (zirka 250 Kugelchen pro 1000 HEp-2 Zellen) und Positivkontrolle Pmp21-D (zirka 1650 gebundene Latexkugelchen) konnte mit nur 200 gebundenen Latexkugeln für Pmp21-D_{mut1} und 220 für Pmp21-D_{mut3} ein vollständiger Verlust der adhäsiven Eigenschaften detektiert werden (Abbildung 15, B). Auch für Pmp21-D_{mut4} ergab sich eine starke Reduktion der Adhäsion mit nur zirka 300 gebundenen Kugelchen pro 1000 HEp-2 Zellen.

Durch den Hefe-Adhäsionstest sowie dem Adhäsionstest mit rekombinantem Pmp21-D und dessen Mutationsvarianten konnte eine starke Reduktion bzw. sogar ein vollständiger Verlust der Adhäsion nachgewiesen werden. Dabei konnten quantitative Unterschiede im Bindeverhalten für die Pmp21-D_{mut1/2} Mutationsdomänen zwischen dem Hefe-Adhäsionstest, in dem die Proteindomänen als Aga2p-Fusionsproteine vorliegen, und dem Einsatz von His-markierten rekombinantem Protein beobachtet werden.

Aufgrund dieser Studien konnte damit erstmalig Evidenz für eine adhäsive Funktion der repetitiven FxxN Motive erbracht werden.

4.2.3 Beide Motive GGA (I, L, V) und FxxN sind für die Adhäsion essentiell

Die Einteilung der Pmps in eine Proteinfamilie erfolgte aufgrund ihrer zwei charakteristischen Motive (s. Einleitung 1.4.3). Durch die Analyse von Pmp21-D konnten dem FxxN Motiv adhäsive Eigenschaften zugeordnet werden. Um zu untersuchen, ob auch dem GGA (I, L, V) Motiv eine adhäsive Funktion zugeordnet werden kann, wurde eine weitere Studie an der Pmp21-A Proteindomäne durchgeführt. Die Pmp21-A Domäne enthält jeweils einmal die repetitiven Motive FxxN und GGAV. Es wurde eine Mutante generiert, bei der nur das FxxN Motiv mutiert wurde. Die zweite Mutante ist eine Deletionsmutante, bei der das GGAV Motiv deletiert wurde, während das FxxN Motiv intakt blieb (Abbildung 16, A). Zur Überprüfung der adhäsiven Eigenschaften wurde rekombinantes Protein von Pmp21-A und den generierten Mutanten hergestellt. Für rPmp21-A, -A_{mut} und -A_Δ konnten im Coomassie-gefärbten SDS-Gel Proteinbanden auf Höhe von 50 kDa detektiert werden (Abbildung 16, C). Für den Adhäsionstest wurden proteinbeschichtete Latexkügelchen eingesetzt (Abbildung 16, B). Die Adhäsion der wildtypischen Pmp21-A Domäne mit zirka 650 Hefezellen pro 1000 HEp-2 Zellen wurde dabei auf 100% gesetzt. Für die Negativkontrolle BSA konnte eine Adhäsion von zirka 20% detektiert werden. Im Vergleich hierzu zeigte die Mutante Pmp21-A_{mut}, welche nur noch ein intaktes GGAV Motiv enthielt, mit nur zirka 15% einen kompletten Verlust der adhäsiven Eigenschaften.

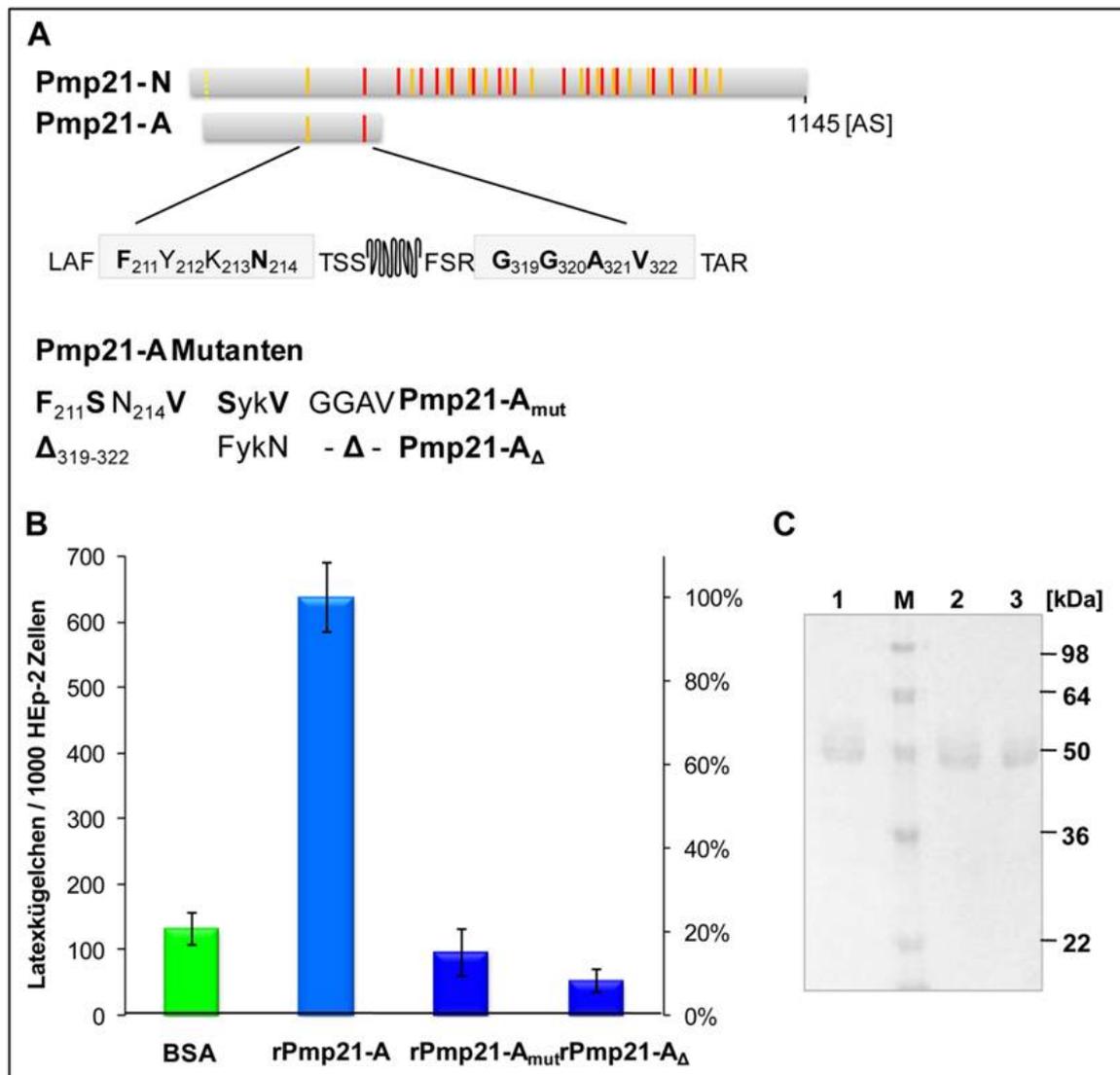


Abbildung 16: Mutagenese von Pmp21-A

A) Darstellung der Mutationen in Pmp21-A. B) Quantitative Auswertung des Adhäsionstests mit proteinbeschichteten Latexkugeln. Hierfür wurden die Latexkugeln mit rekombinantem Protein [200µg/ml] beschichtet und für eine Stunde bei 37°C (MOI 5) mit HEp-2 Zellen inkubiert. Durch mehrfaches Waschen mit PBS wurden ungebundene Partikel entfernt und die gebundenen Latexkugeln pro 1000 HEp-2 Zellen ausgewertet. (n=3) C) Coomassie-gefärbtes 10%iges SDS-Gel. Analyse der affinitätschromatographischen Proteinreinigung von Pmp21-A (Spur 1), Pmp21-A_{mut} (Spur 2) und Pmp21-A_Δ (Spur 3). M= Größenstandard

Auch die Deletionsmutante (Pmp21-A_Δ) wies trotz vorhandenem FxxN Motiv keine adhäsiven Eigenschaften mehr auf (zirka 8%). Die Ergebnisse zeigen, dass beide repetitiven Motivtypen für die Bindung von Pmp21 notwendig sind und ein einzelnes Motiv nicht für die Adhäsion ausreicht.

4.2.4 Ein synthetisches Pmp21 Peptid inhibiert die chlamydiale Infektion

Aufgrund der Adhäsionsdaten sollte im Folgenden die Relevanz der Motive für die Infektion mit einem synthetischen Peptid untersucht werden. Bei der Auswahl des Peptids wurde folgendes berücksichtigt: Pmp21 enthält insgesamt 31 repetitive Motive im N-Terminus, dabei kommt das GGA (I, L, V) 15 mal und das FxxN Motiv 16 mal vor (Abbildung 17). Die Motive treten größtenteils alternierend auf, wobei die Anzahl der dazwischenliegenden Aminosäuren ohne erkennbares Muster von 5 Aminosäuren bis 29 Aminosäuren variiert. Für die Peptid-Generierung wurde daher ein Bereich gewählt, der beide Motive enthält, eine durchschnittlich geringe Anzahl von 8 dazwischenliegenden Aminosäuren aufweist und in einer der beiden prozessierten Pmp21-Proteinformen (N-pmp21 und M-pmp21) vorliegt (Abbildung 18, A). Zudem sollte eine mögliche Proteinfaltung begünstigt werden, weshalb die Motive um die jeweils acht angrenzenden Aminosäuren verlängert wurden.

Pmp21-N-Terminus												
1	mvakktvrsy	rssfshsviv	ailsagiafe	ahslhsseld	lgvfinkqfee							
51	hsahveeaqt	svlkgdvpvn	psqkesekvl	ytqvpltqgs	sgesldlada							
101	nflehfhqhf	eettvfgidq	klvwsdlldr	nfsqptqepd	tsnavsekis							
151	sdtkenrkd	etedpskksq	lkevssdlpk	spetavaais	edleisenis							
201	ardplqglaf	fykntssqsi	sekdsffggi	ifsgsgansg	lgfenlkapk							
251	sgaavysdrd	ivfenlvkgl	sfiscesled	gsaagvnivv	thcgdvtltd							
301	catgldleal	rlvkdfsr	gg avftarnhev	qnnlaggils	vvgnkgaiiv							
351	eknsaeksng	gafacgsfvy	snnentalwk	enqals	ggai ssasdidiqg							
401	ncsaiefsgn	qslialgehi	gltdfvg	ggai laaaggtltrl	nnavvqcvkn							
451	tskth	ggai l	agtvdlneti	seva	fkqnta alt	ggai san	dkviiannfg					
501	eil	feqnevr	nh	ggai	ycgc	rsnpkleqkd	sgeniniign	sgait	flknk			
551	asvlevmtqa	edyad	ggai l	w	ghnvlldsns	gni	qfignig	gstfwigeyv				
601	ggai l	lstdr	vtisnnsqdv	v	fkgnkqcl	aqkyvapqet	apvesdasst					
651	nkdekslnac	shgdhyppkt	veeevppsll	eehpvvsstd	ir	ggai l	laq					
701	hifitdntgn	lrfsgnl	ggg	eesstvgdla	iv	ggai l	lst	nevnvcsnqn				
751	vvf	sdnvt	sn	gcds	ggai l	la	kkvdisanhs	ve	fvsngsgk	f	ggai	calne
801	svnitdngsa	vs	fsknr	trl	ggagvaapqg	svticgnqgn	ia	fken	fvfg			
851	senqrsg	ggai	lianssvniq	dnagdil	fvs	nstg	sy	ggai	fv	gslvaseg		
901	snprtltitg	nsgdil	fakn	stqtaaslse	kdsf	ggai	y	tqnlkivkna				
951	gnvs	fynra	psgagvqiad	ggtvcleafg	gdil	fegn	in	fdgsfnaihl				
1001	cgndskivel	savqdkniif	qdaityeent	irglpdkdvs	plsapslifn							
1051	skpqddsagh	hegtirfsrg	vskipqiaai	qegtllalsqn	aelwlaglkq							
1101	etgssivlsa	gsilrifdsq	vdssaplpte	nkeetlvsag	vqinm							

Abbildung 17: Auswahl des Pmp21-Peptids

Darstellung der Aminosäuresequenz der Passagierdomäne von Pmp21 (1145 AS). Die repetitiven Motive sind in gelb (FxxN) und rot (GGA (I, L, V)) unterlegt. Die ausgewählte Aminosäuresequenz des synthetischen Peptids ist grau unterlegt (AS 745- AS 776).

So konnte ein Peptid von insgesamt 32 Aminosäuren Länge aus Pmp21-C generiert werden (Abbildung 18, A).

Um den Einfluss der Motive auf die Infektion zu untersuchen, sollte ein Protein-Neutralisationstest durchgeführt werden. Hierfür wurden HEp-2 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Peptids bei 37°C inkubiert, bevor Chlamydien zugegeben wurden. Durch die Absättigung der Interaktionspartner auf der Humanzelle sollte die chlamydiale Infektion inhibiert werden. Die Anzahl der gebildeten chlamydialen Einschlüsse wurde ausgewertet und ist Äquivalent zum inhibitorischen Effekt des Peptids (Abbildung 18, B).

Als Kontrolle dienten PBS behandelte Humanzellen, die auf 100% gesetzt wurden, und das denaturierte Peptid. Für das denaturierte Peptid zeigte sich eine schwache Reduktion der Infektion von 14 %. Für die ersten beiden Konzentrationen (0,15 µg/ml und 1 µg/ml) konnte keine weitere Reduktion der Infektion im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Dagegen zeigte sich für 6 µg/ml eingesetztes Peptid eine 22%ige Infektionsreduktion, für 36 µg/ml eine 25%ige Reduktion und für 72 µg/ml eine Reduktion der Infektion um 27% (Abbildung 18, B).

Somit wies das synthetische Peptid einen inhibitorischen Effekt auf die chlamydiale Infektion auf. Mit den letzten beiden Peptid-Konzentrationen scheint mit zirka 25% bzw. 27% Reduktion eine Saturierung des inhibitorischen Effekts erreicht worden zu sein (Abbildung 18, B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die repetitiven Motive eine Funktion im Adhäsionsprozess erfüllen und für die chlamydiale Infektion relevant sind. Zur Bestätigung dieser Daten müssen zukünftig noch Neutralisationsstudien mit Kontrollpeptiden durchgeführt werden, deren Motive mutiert sind.

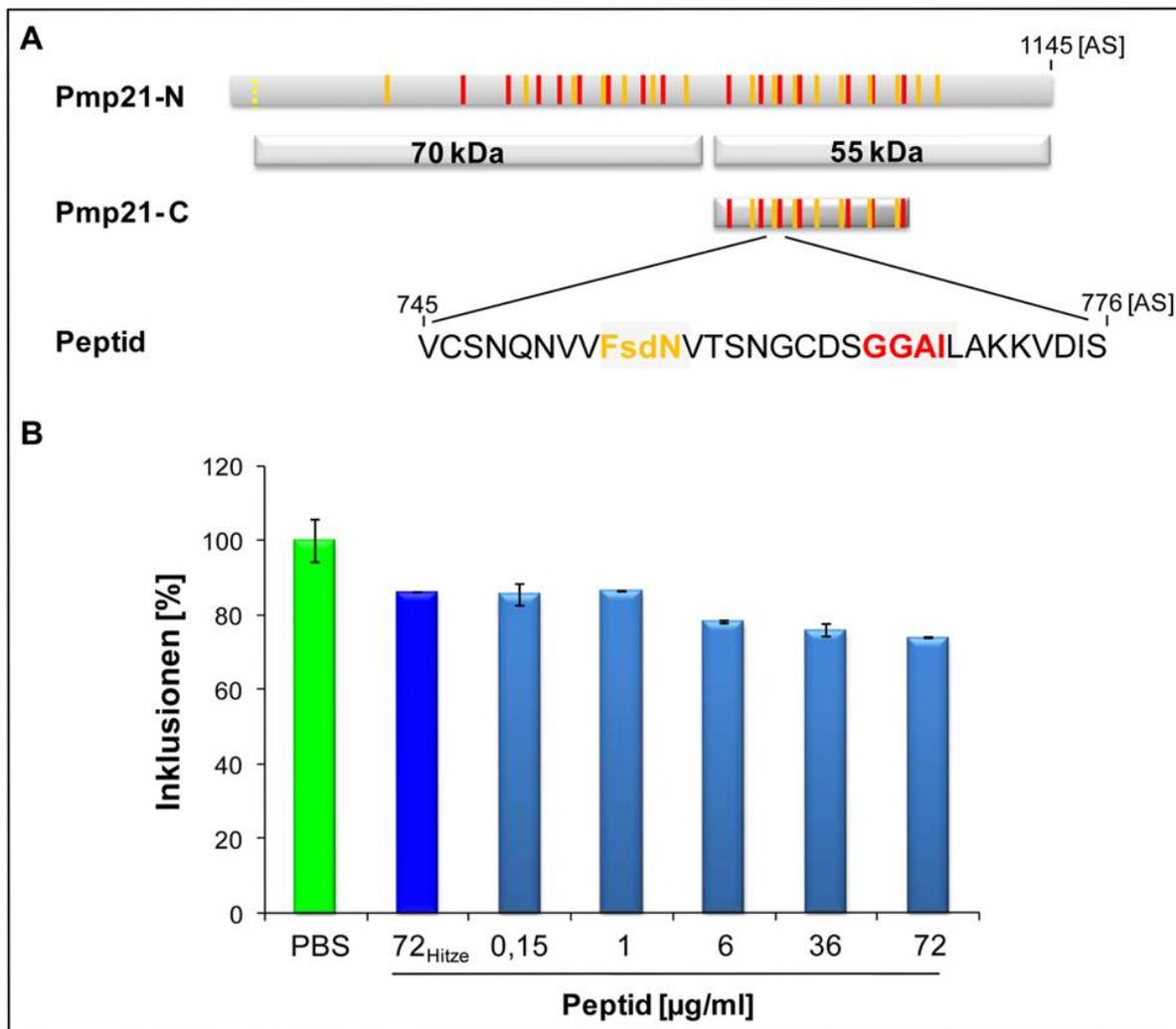


Abbildung 18: Das Peptid aus Pmp21 reduziert die Infektion

A) Darstellung des Peptids aus Pmp21 sowie den prozessierten Proteinformen N-pmp21 (70 kDa) und M-pmp21 (55 kDa). B) Protein-Neutralisationstest mit dem generierten Peptid (32 AS). HEp-2 Zellen wurden mit PBS, Hitze-inaktiviertem Peptid (72_{Hitze}) oder unterschiedlichen Konzentrationen des Peptids (wie angegeben) für vier Stunden bei 37°C inkubiert, bevor Gradienten-gereinigte Chlamydien (MOI 100) zugegeben wurden. 48 Stunden nach der Infektion wurden die infizierten Zellen mit Methanol fixiert und die gebildeten Einschlüsse unter Verwendung des Pathfinder-Antikörpers ausgewertet.

4.2.5 Aga2p-Pmp20 exprimierende Hefezellen adhärieren signifikant an Humanzellen

Da die repetitiven Motive in allen Pmps wiederzufinden sind, sollten theoretisch alle Pmps an Humanzellen binden. Zur Überprüfung dieser Annahme sollte ein weiteres Mitglied dieser Proteinfamilie untersucht werden. Pmp20 ist mit 1723 AA das längste Protein der Pmp-Familie. Obwohl Pmp20 bisher nicht auf der Oberfläche von Chlamydien nachgewiesen werden konnte, stimuliert es eine Zytokin-Antwort in eukaryotischen Zellen (Vandahl, Pedersen et al. 2002), (Christiansen, Pedersen et al. 2000), (Niessner, Kaun et al. 2003).

Für die Adhäsionsstudie wurde eine Domäne aus dem N-Terminus von Pmp20 (künftig als Pmp20-Adhäsionsdomäne, Pmp20-AD, bezeichnet) mittels homologer *in vivo* Rekombination

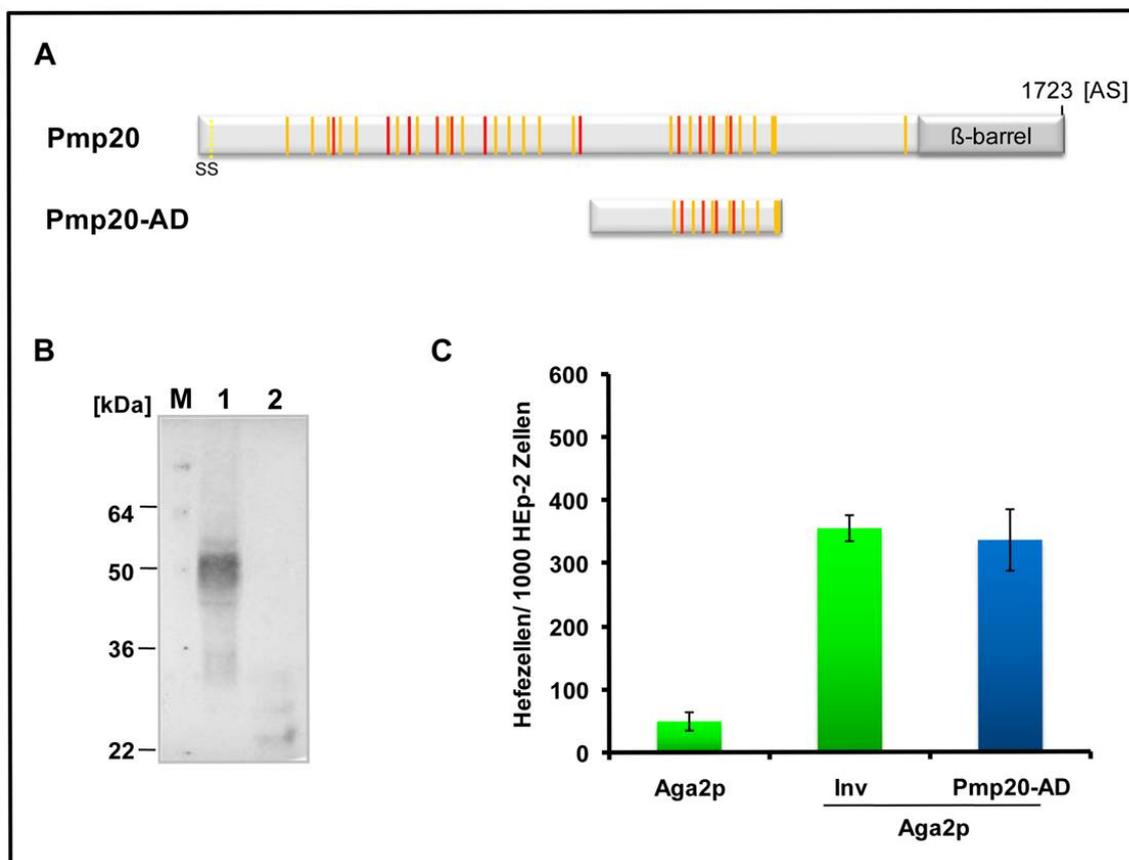


Abbildung 19: Pmp20 bindet an Humanzellen

A) Darstellung von Pmp20 und der getesteten Domäne. Rote Balken entsprechen dem GGA (I,L,V) Motiv und gelbe Balken dem FxxN Motiv. B) Westernblot-Analyse der α -Mannosidase behandelten Proteinextrakte von Pmp20-AD (Spur 1) und Aga2p (Spur 2) exprimierenden Hefen. Die Detektion der Proteine erfolgte unter Verwendung des Anti-Penta-His Antikörpers und dem AP-konjugierten Anti-Maus Antikörper. C) Quantitative Auswertung des Hefe-Adhäsionstests für Aga2p, Aga2p-Inv und Aga2p-Pmp20-AD präsentierende Hefen.

in den Hefeexpressionsvektor kloniert (Abbildung 19). Diese Domäne trägt zwölf der repetitiven Motive (4 x GGA (I, L, V), 8 x FxxN Motiv). Die Expression von Pmp20-AD in der Hefe wurde mittels Westernblot-Analyse überprüft (Abbildung 19, B). Wegen der Glykosylierung von Aga2p wurden die Proteinextrakte mit α -Mannosidase behandelt, um eine möglichst distinkte Proteinbande zu detektieren. Für die Kontrolle Aga2p konnte eine Proteinbande oberhalb von 22 kDa detektiert werden (theoretisch berechnetes Molekulargewicht beträgt 17 kDa). Für Aga2p-Pmp20-AD zeigte sich eine starke Proteinbande in Höhe von 50 kDa (theoretisch berechnet waren 44,2kDa). Nach der erfolgreichen Proteinexpression wurde ein Hefe-Adhäsionstest durchgeführt. Die Kontrolle Aga2p zeigte mit 50 Hefezellen pro 1000 HEp-2 Zellen eine schwache Adhäsion, während die Positivkontrolle, Aga2p-Invasin exprimierende Hefezellen, mit 350 Hefezellen an 1000 HEp-2 Zellen stark adhärierte. Für Aga2p-Pmp20-AD konnte ebenfalls eine starke Adhäsion von 320 Hefezellen an 1000 Humanzellen nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass Pmp20 adhäsive Eigenschaften besitzt. Diese Ergebnisse suggerieren eine Rolle von Pmp20 und, aufgrund der Anwesenheit der repetitiven Motive, vielleicht sogar aller Pmps im Adhäsionsprozess.

4.3 Pmp21 ist auf der chlamydialen Oberfläche lokalisiert

In früheren Studien konnten durch Proteomanalysen unterschiedlich große Proteinformen von Pmp21 identifiziert werden, die auf eine Prozessierung des Proteins hinweisen. Dabei handelt es sich um den C-terminalen sogenannten β -barrel (C-pmp21), die Passagierdomäne und den aus ihrer Prozessierung resultierenden Proteinformen N-pmp21 und M-pmp21 (Vandahl, Pedersen et al. 2002), (Wehrl, Brinkmann et al. 2004). In Immunofluoreszenz- und Westernblot-Analysen mit Antikörpern, die gegen die Passagierdomäne oder die N-terminale Proteinform N-pmp21 gerichtet waren, konnte Pmp21 auf der chlamydialen Oberfläche von EBs und RBs detektiert werden (Vandahl et al., 2002, Wehrl et al., 2004). Aber obgleich der gegen die Passagierdomäne (AS 52-AS 1129) gerichtete Antikörper auch Epitope gegen die M-pmp21 Domäne enthalten müsste, konnte diese nicht nachgewiesen werden (Vandahl, Pedersen et al. 2002). Um die Lokalisation der M-pmp21-Proteinform zu studieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Antikörper generiert, welche gegen die Pmp21-D Domäne oder gegen die Pmp21-E Domäne gerichtet waren. Pmp21-E erstreckt sich von AS 671 bis AS 1145 und ist somit fast identisch zu der prozessierten M-pmp21 Form, die in 2D-Gelen nachgewiesen worden war, deren Beginn und Ende jedoch nicht präzise bekannt sind (Wehrl, Brinkmann et al. 2004). Um die Spezifität der

Antikörper zu überprüfen, wurden Westernblot- und Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Zunächst wurden die Antikörper gegen das rekombinante Pmp21-E Protein getestet. Hier konnte eine Proteinbande unterhalb von 64 kDa detektiert werden (Abbildung 20, B, Spur 1).

Für nicht infizierte HEp-2 Zelleextrakte blieb die Bande auf Höhe von 55 kDa aus, aber es wurde eine unspezifische Bande detektiert (für α -Pmp21-D Serum bei 64 kDa, für α -Pmp21-E AK unterhalb von 64 kDa, Spur 2). Im Gegensatz dazu zeigte sich für Proteinextrakte aus infizierten Humanzellen ebenfalls eine Proteinlaufbande bei zirka 55 kDa (unterhalb von 64 kDa, Spur 3), genauso auch für Gradienten-gereinigte Chlamydien (Spur 4). Die Westernblot-Analyse zeigt somit, dass beide Antikörper eine Proteinbande bei 55 kDa detektieren, welche der prozessierten M-pmp21 Form entsprechen müsste. Die Tatsache, dass keine weiteren Proteinbanden auf Höhe des Vollängen Pmp21 (zirka 160,9 kDa) oder der gesamten Passagierdomäne (zirka 116 kDa) detektiert werden konnten, bestätigt die Befunde, dass Pmp21 in prozessierter Form vorliegt (Wehrl, Brinkmann et al. 2004).

Für die Immunfluoreszenz-Studien wurden HEp-2 Zellen für 48 Std. mit *C. pneumoniae* infiziert. Die Verwendung des Pmp21-Präimmunserums zeigte keine spezifische Färbung des chlamydialen Einschlusses (Abbildung 20, C). Durch Einsatz des α -Pmp21-D AK und α -Pmp21-E AK konnten die Chlamydien-gefüllten Einschlüsse nach Methanol-Fixierung detektiert werden. Die Analysen zeigten, dass das Pmp21-Serum spezifisch mit dem chlamydialen Pmp21 Protein reagiert.

Zur detaillierteren Analyse der Lokalisierung von Pmp21 wurden weitere Immunfluoreszenzexperimente durchgeführt (Abbildung 21). Bei der differentiellen Fixierungsmethode werden mit Methanol die eukaryotische Membran, die chlamydialen Einschlussmembranen und die bakteriellen Membranen permeabilisiert, weshalb alle Antigene zugänglich sind, während durch die Formaldehyd-Fixierung die Chlamydienmembran nicht durchlässig wird.

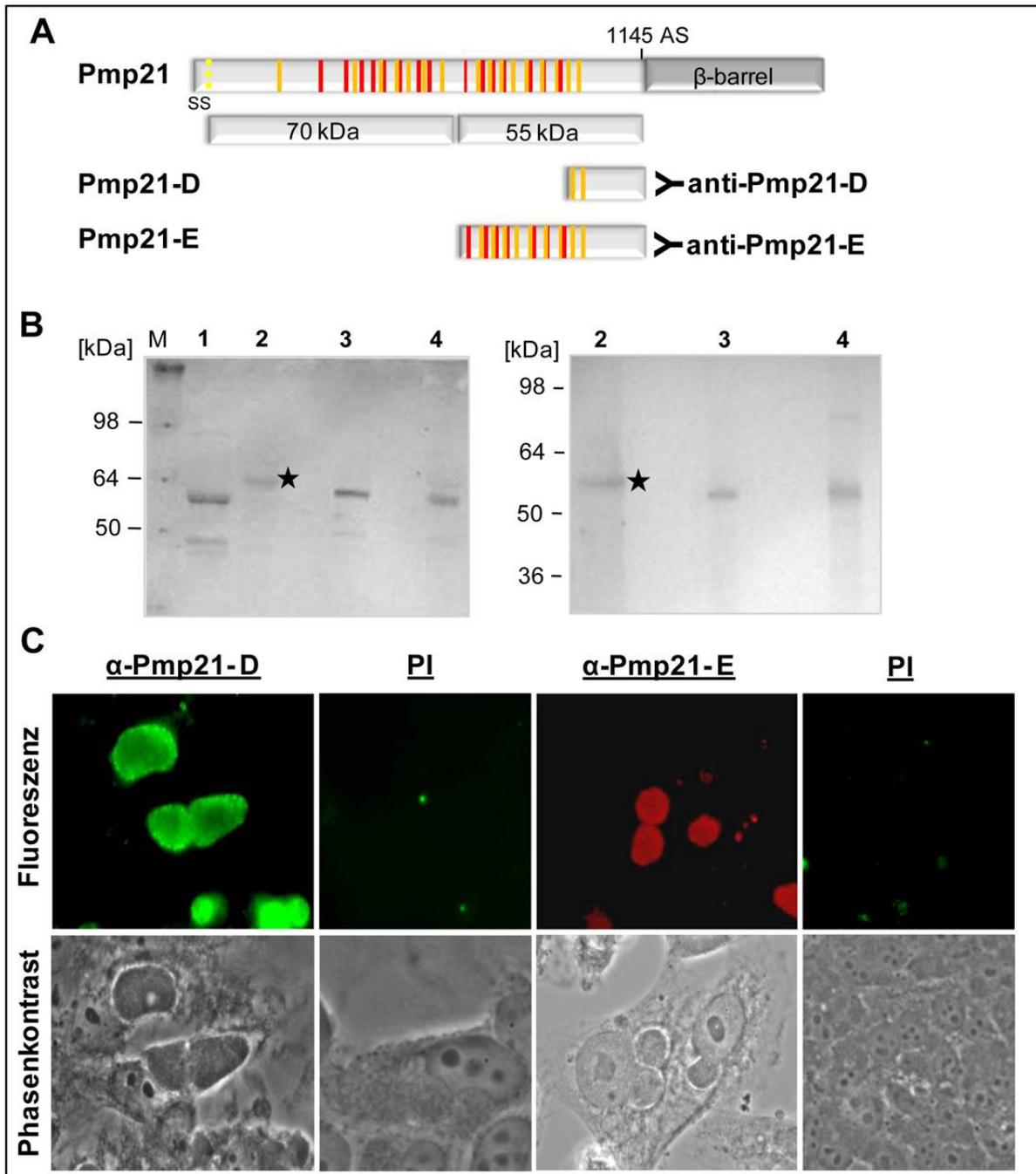


Abbildung 20 :Lokalisation des Pmp21 Proteins auf Chlamydien

A) Darstellung der Pmp21-Domänen (D und E) gegen die der Antikörper gerichtet wurde. Beide Pmp21-Domänen liegen innerhalb der prozessierten Form M-pmp21 (55 kDa; N-pmp21 entspricht der 70 kDa Domäne) vor. B) Westernblot-Analyse eines 10%igen SDS-Gels. Detektion von Pmp21 mit dem polyklonalen Pmp21-D Serum (1:100 verd.; links) und α -Pmp21-E Serum (Antigen gereinigt, 1:100 verd.; rechts), und dem AP-konjugierten Anti-Kaninchen Antikörper (1:7500 verd.). Geladen wurde rPmp21-E (Spur 1), nicht infizierte HEp-2 Zellen (Spur 2), infizierte HEp-2 Zellen (Spur 3) und Gradienten-gereinigte Chlamydien (Spur 4). Sternchen= unspezifische Bande in HEp-2 Zellextrakten. C) Phasenkontrast- und Immunfluoreszenz-Aufnahmen von infizierten HEp-2 Zellen. Die HEp-2 Zellen wurden nach einer 48 Std. *C. pneumoniae* Infektion mit Methanol fixiert. Die Detektion von Pmp21 erfolgte durch Verwendung des Pmp21-D resp. des Pmp21-E Serums (1:10 verd.) und der jeweiligen Präimmunsere (PI).

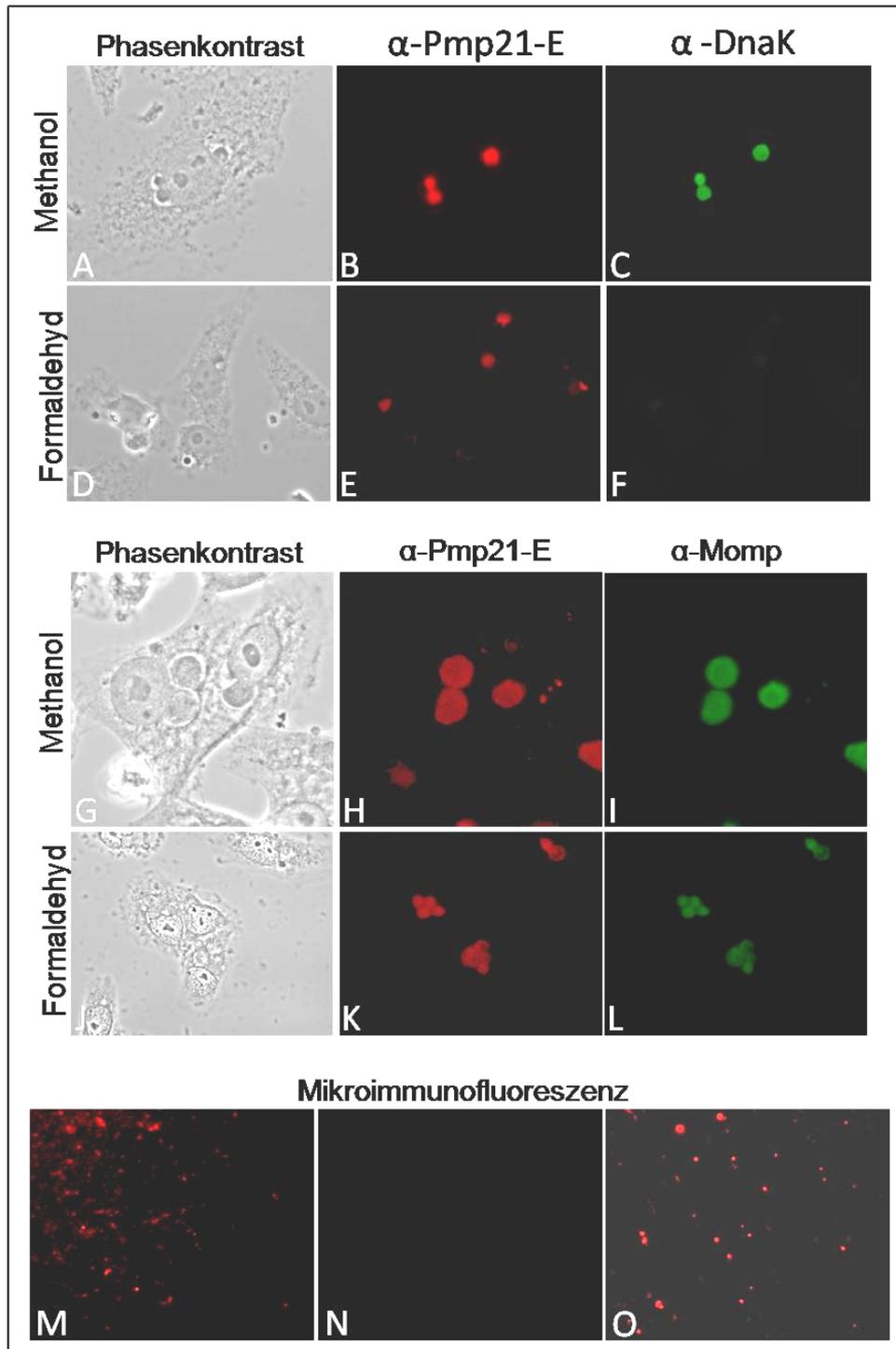


Abbildung 21: Lokalisierung von Pmp21 im chlamydialen Einschluss und auf der Bakterienoberfläche
 Infizierte HEp-2 Zellen wurden nach 48 Stunden mit Methanol bzw. Formaldehyd fixiert. Für die indirekte Immunofluoreszenz (63-fache Objektiv-Vergrößerung) wurden Doppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen das intrachlamydiale Protein DnaK (C,F), das oberflächenpräsentierte Momp (I,L,), und Pmp21-E (B,E,H,K) durchgeführt. Der Nachweis von Pmp21 bzw. M-pmp21 erfolgte zusätzlich durch das Anfärben intakter, nicht-fixierter chlamydialer Partikel mit spezifischen Antikörpern gegen Pmp21-E (O), Pmp21-E-Präimmunsereum (N) und Momp (M) (Mikroimmunofluoreszenz).

Die differentielle Fixierung ermöglicht somit die Unterscheidung zwischen intra- und extrachlamydialen Epitopen. Das DnaK diene als ein intrachlamydiales Protein zur Kontrolle für die Fixierung. Wie erwartet konnte unter Verwendung des spezifischen DnaK Antikörpers das DnaK-Protein in Methanol-fixierten infizierten Zellen, nicht jedoch in Formaldehyd-fixierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 21, C,F). Das bekannte Außenmembranprotein Momp ist das häufigste Protein des cOMCs und wurde hier als Kontrolle für extrachlamydiale Proteine verwendet. In der Immunfärbung mit dem spezifischen Momp-Antikörper konnte das Protein sowohl in Methanol- als auch in Formaldehyd-fixierte Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 21, I, L). Beide Pmp21-Antikörper detektierten in Methanol- und Formaldehyd-fixierten infizierten Zellen Pmp21, wobei punktierte Strukturen detektiert werden konnten (Abbildung 21, B; Abbildung 20, C). Zudem konnten Pmp21 und Momp auf intakten, nicht fixierten EBs mit den spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden, während das Präimmunserum nicht reagierte (Abbildung 21, M-O). Pmp21 ist somit auf der chlamydialen Oberfläche von EBs lokalisiert. Die Unterscheidung, ob es sich dabei um die vollständige Passagierdomäne, oder M-pmp21 alleine handelt, ist nicht möglich, da M-pmp21 einem Teil der Passagierdomäne entspricht und somit der Antikörper nicht nur die prozessierte Pmp21 Form, sondern auch das gesamte Pmp21 detektieren würde.

Mit Hilfe des polyklonalen Pmp21-D Antikörpers wurde außerdem eine Proteinexpressionskinetik durchgeführt. Hierfür wurden infizierte HEp-2 Zellen nach definierten Zeitpunkten geerntet und die Proteinexpression von M-pmp21 im Immunoblot mittels des spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Dabei detektierte der Pmp21-D Antikörper eine Proteinbande auf Höhe von 55 kDa von 36 bis 96 Stunden nach der Infektion. Eine schwache Bande ist auch bei 12 und 18 Stunden nach der Infektion zu erkennen (gleiche Ergebnisse wurden mit dem Pmp21-E Antikörper erzielt) (Abbildung 22, A). Übereinstimmend hiermit konnte auch in Proteinlysaten von Gradienten-gereinigten RBs sowie EBs ein Proteinbande von 55 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 22, B). Um eine möglichst große Anreicherung von RBs zu erzielen, wurden diese Proben nach 36 Stunden geerntet und über einen Gastrografen-Gradienten gereinigt, während EBs nach 72 Stunden geerntet und gereinigt wurden. Die Expressionsbande für M-pmp21 erscheint bei den RBs schwächer als bei den EBs. Dies ist wohl aber einer höheren Bakterienzahl zu zuordnen, wie der Vergleich zur Ladekontrolle DnaK verdeutlicht. In der Immunofluoreszenzanalyse konnte Pmp21 ebenfalls 24, 48 und 72 Stunden nach der Infektion mit dem Pmp21-D Antikörper detektiert werden (Abbildung 22, C-H). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass M-pmp21 auf der Oberfläche von *C. pneumoniae* EBs und RBs lokalisiert ist.

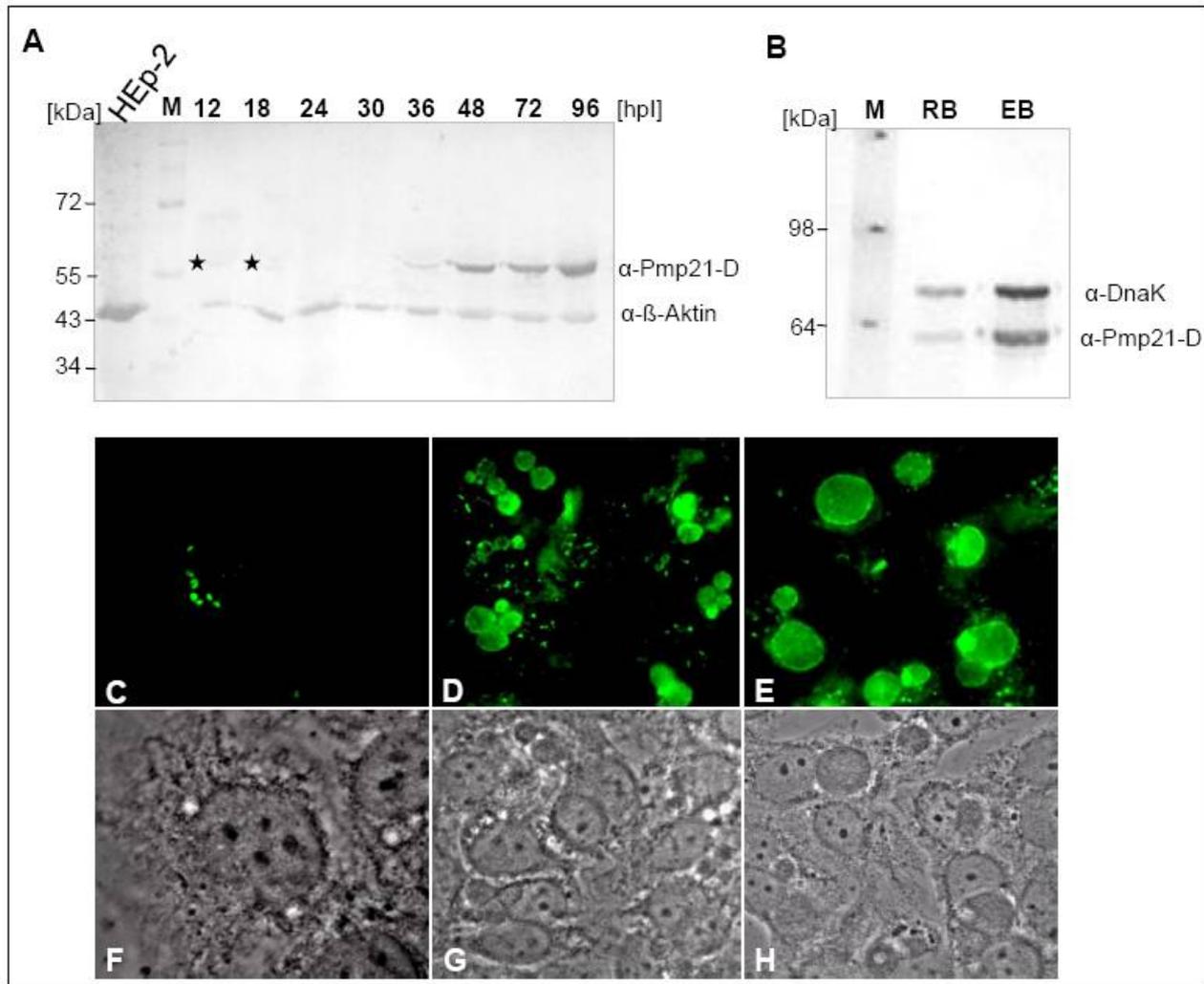


Abbildung 22: Nachweis von Pmp21 während des Infektionszyklus

A) Zeitkinetik der M-pmp21 Proteinexpression während des Infektionszyklus mittels Westernblot-Analyse. Infizierte HEp-2 Zellen (MOI 1) wurden nach definierten Zeitpunkten geerntet und für die Westernblot-Analyse aufgearbeitet. Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit α -Pmp21-D AK, der α - β -Aktin AK diente als Ladekontrolle. Sterne markieren die mit α -Pmp21-D detektierten Proteinbanden. B) Westernblot-Analyse von Urografin-Gradienten gereinigten Chlamydien, Die RBs wurden nach 36 Std. und die EBs 72 Stunden nach der Infektion geerntet. Die Proteinextrakte wurden im 10% SDS-Gel aufgetrennt, danach geblottet und mit affinitätsgereinigtem α -Pmp21-D AK (1:50 verd.) oder mit α -DnaK-AK (1: 500 verd.) detektiert. C-H) Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen von *C. pneumoniae* infizierten Humanzellen 24 Std. (C,F), 48 Std. (D,G) und 72 Std. nach der Infektion.

4.4 Die funktionale Rolle von Pmp21 im Infektionsgeschehen

Im Folgenden sollte die Relevanz von Pmp21 als chlamydiales Adhäsins während der Infektion genauer charakterisiert werden. In den bisherigen Analysen konnten die Oberflächenlokalisierung des Proteins und die adhäsiven Eigenschaften mit Hilfe des Hefe-Adhäsionstest sowie mit rekombinantem Pmp21 nachgewiesen werden. Deshalb wurde eine Rezeptor-Ligand-Interaktion für Pmp21 mit der Humanzelle postuliert. Wenn Pmp21 mit

einem Rezeptor auf der Wirtszelloberfläche interagiert, sollte der gegen Pmp21-E gerichtete Antikörper das Pmp21 Protein auf der EB-Oberfläche blockieren und so die Infektion neutralisieren können. Äquivalent hierzu sollte der Einsatz von rekombinantem Pmp21 den postulierten Rezeptor auf der Humanzelloberfläche absättigen und so ebenfalls in einer Reduktion der Infektion resultieren.

4.4.1 Neutralisation der chlamydialen Infektion mit Pmp21-Antikörpern

Um den Einfluss des Antikörpers auf die chlamydiale Infektion zu überprüfen, wurden die infektiösen EBs eine Stunde vor der Infektion mit verschiedenen Konzentrationen des Antikörperserums bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden sie mit PBS oder dem Präimmunserum (PI) behandelt. Die so vorbehandelten EBs wurden zur Infektion von HEp-2 Zellen eingesetzt und 48 Stunden nach der Infektion wurden die entstandenen Einschlüsse mikroskopisch quantifiziert. Nach der Behandlung mit Präimmunserum (200µl) zeigte sich eine Infektion von 65% relativ zur PBS-Kontrolle, welche auf 100% gesetzt worden war. Wurden 25µl des Pmp21-E Antikörpers eingesetzt, ergab sich eine Reduktion der Infektion um 25%. Die Verdopplung der Antikörpermenge zeigte eine Reduktion um 50%. Durch die Vorbehandlung mit 100µl α-Pmp21-E AK konnte der Effekt der Reduktion der Infektion auf 70%, bzw. auf 78% (für 200 µl) verstärkt werden (Abbildung 23). Die Störung der Rezeptor-Ligand Interaktion durch den Antikörper führt somit zu einer Konzentrations-abhängigen Inhibierung der Infektion und zeigt, dass Pmp21 eine wichtige Rolle im Infektionsprozess spielt. Die gebildeten Einschlüsse wiesen keine morphologisch erkennbaren Unterschiede im Vergleich zur PBS-Kontrolle auf. Dies könnte bedeuten, dass nicht die Entwicklung der Chlamydien innerhalb der Wirtszelle durch die Antikörpervorbehandlung beeinträchtigt wird, sondern bereits ihre Aufnahme in die Humanzelle.

4.4.2 Neutralisierung der chlamydialen Infektion durch rekombinantes Pmp21

Durch den Einsatz des α -Pmp21-E Antikörpers konnte die Infektion der Chlamydien stark reduziert werden. Zur Bestätigung dieser Daten, sollte ein Neutralisationstest mit dem rekombinanten rPmp21-N sowie den Einzeldomänen rPmp21-A bis G durchgeführt werden (Abbildung 24, A). Dies sollte zu einer Absättigung der verfügbaren Rezeptoren auf der Humanzelloberfläche führen, was sich in einer Reduktion der Infektion widerspiegeln müsste.

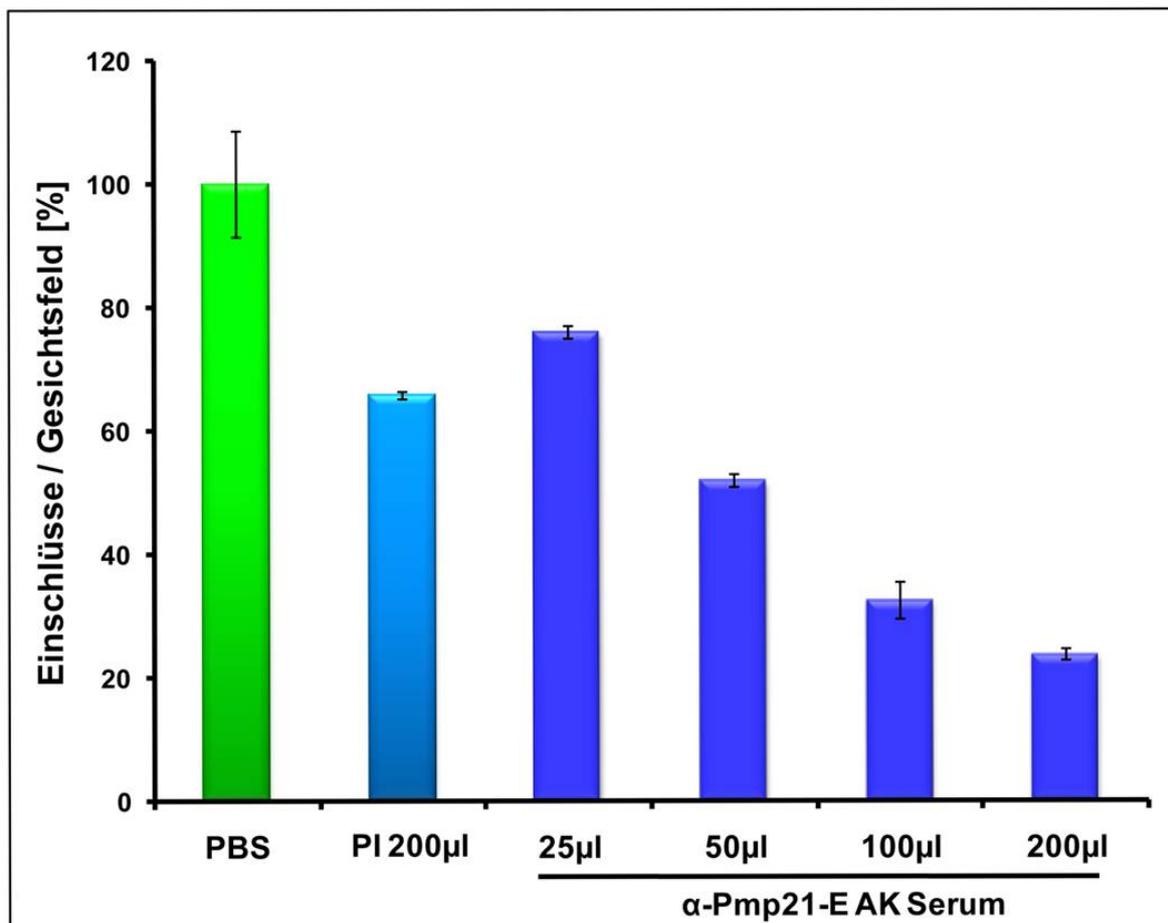


Abbildung 23: Neutralisierung der Infektivität durch Pmp21-E Antikörper

Gradienten-gereinigte EBs wurden mit PBS, Präimmenserum (PI, unverdünnt) oder verschiedenen Mengen des Pmp21-E Antikörperserums (unverdünnt) für eine Stunde bei 37°C inkubiert, bevor sie mit einem 100-fachen Überschuss zur Infektion der HEp-2 Zellen eingesetzt wurden. Die Bestimmung der chlamydialen Einschlüsse erfolgte 48 Std. nach der Infektion mittels Pathfinder Färbung.

Die Humanzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen rekombinantem Pmp21 vorinkubiert und anschließend mit Gradienten-gereinigten *C. pneumoniae* EBs infiziert. Als Kontrollen dienten mit PBS und BSA (200 µg/ml) vorbehandelte HEp-2 Zellen. Um mögliche Konzentrations-bedingte Unterschiede auf die Infektion nachzuweisen, wurden die sechs

Proteindomänen mit jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen (100 µg/ml und 200 µg/ml) in den Protein-Neutralisationstest eingesetzt (Abbildung 24, B).

Die Kontrolle PBS, deren Einschlusszahlen auf 100% gesetzt wurden, unterschied sich nicht signifikant in der Zahl der Einschlüsse von den mit BSA vorbehandelten Zellen. Im Gegensatz dazu konnte bei Vorbehandlung der Zellen mit 100 µg/ml rPmp21-N die Infektion um 80% und mit 200 µg/ml rPmp21-N um 90% reduziert werden. Die Vorbehandlung mit rPmp21-G führte zu einer Reduktion um zirka 43% für 100 µg/ml bzw. um zirka 60% für 200 µg/ml (Abbildung 24, B). Für rPmp21-E zeigte sich ebenfalls eine starke Reduktion von zirka 40% für 100 µg/ml rPmp21-E, welche durch den Einsatz von 200 µg/ml rPmp21-E auf zirka 64% verstärkt werden konnte.

Um zu sehen, welchen Beitrag die weiteren Domänen für die Infektion leisten und ob es hier Unterschiede gibt, wurden auch rPmp21-A, rPmp21-B, rPmp21-C und rPmp21-D getestet. Für rPmp21-A konnte im Vergleich zur Kontrolle (PBS) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei rPmp21-B zeigte sich für 100 µg/ml ebenfalls kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle, aber für 200 µg/ml rPmp21-B konnte eine Reduktion um 15% gezeigt werden. rPmp21-C zeigte eine Reduktion der Infektion um 10% (100 µg/ml) bzw. 18% für 200 µg/ml rPmp21-C. Die Vorbehandlung mit dem rPmp21-D Protein führte zu einer Reduktion der Infektion um 22% (100 µg/ml) bzw. um 32% (200 µg/ml) (Abbildung 24, B).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass rekombinantes Pmp21-N einen starken Dosis-abhängigen inhibitorischen Effekt auf die *C. pneumoniae* Infektion ausübt. Die Detailstudie der verschiedenen Proteindomänen Pmp21-A bis -G zeigte, dass hier starke Unterschiede bestehen. Den stärksten inhibitorischen Effekt erzielten dabei die Pmp21-G und Pmp21-E Domänen, welche ungefähr den beiden natürlicherweise gefundenen prozessierten Proteinformen N- und M-pmp21 entsprechen. Rekombinantes Pmp21-A zeigte keinen Einfluss auf die Infektion, während die anderen Domänen Pmp21-B bis -D in unterschiedlichem Maß inhibierend auf die Infektion wirkten.

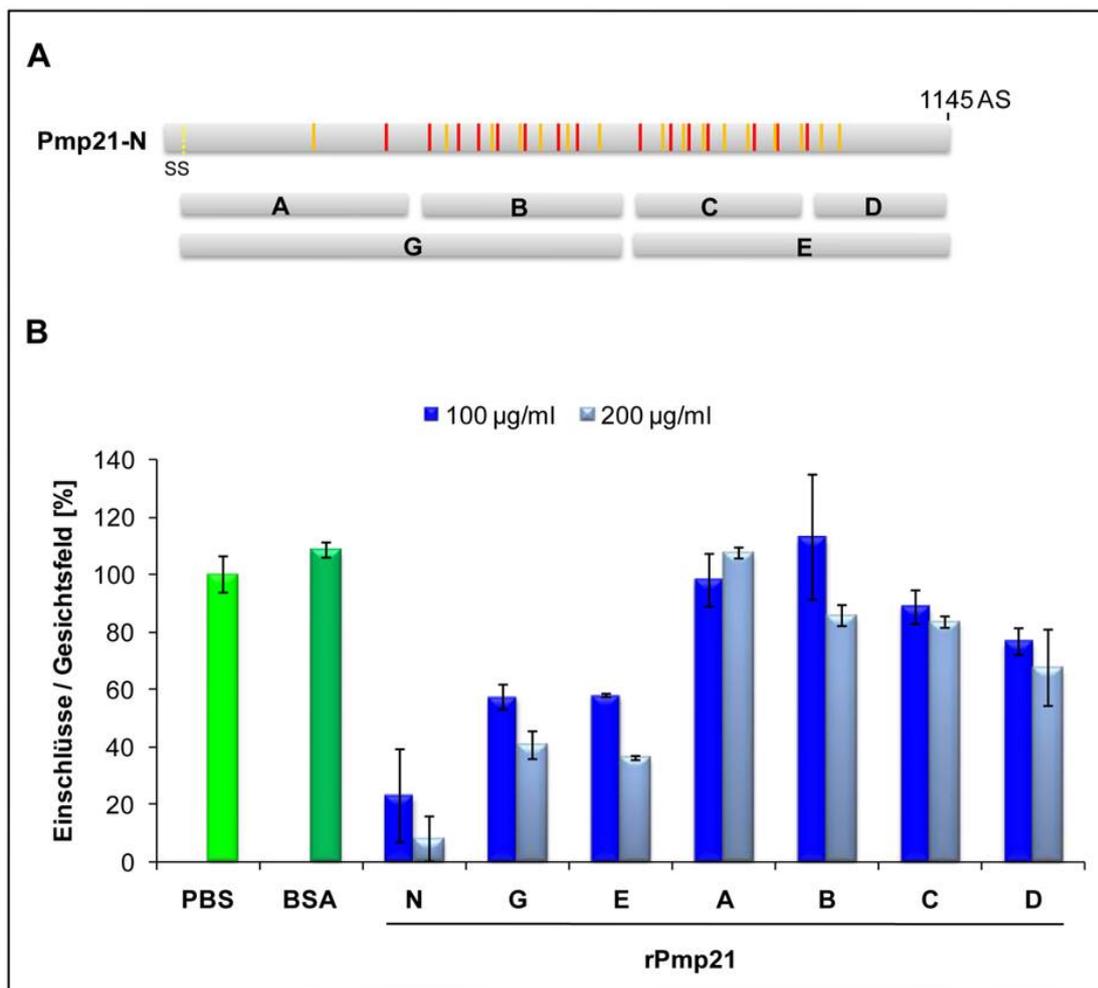


Abbildung 24: Reduktion der *C. pneumoniae* Infektion nach Vorbehandlung mit rekombinantem Pmp21 Protein

A) Darstellung der hier studierten Pmp21-Domänen. B) Quantifizierung des Protein-Neutralisations-Experiments. HEp-2 Zellen wurden mit PBS, BSA (200µg/ml) oder mit rekombinantem Protein (100µg/ml, 200µg/ml) inkubiert und anschließend mit Gradienten-gereinigten EBs (MOI100) infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die infizierten Zellen mit Methanol fixiert und die Zahl der gebildeten Einschlüsse unter Verwendung des Pathfinder-Antikörpers bestimmt. (n=3)

Mit Hilfe des Pmp21-Antikörpers konnte die chlamydiale Oberfläche neutralisiert und somit eine Infektion reduziert werden. Andererseits wurde durch die Vorinkubation der Humanzellen mit Pmp21 Protein die Wirtszelloberfläche neutralisiert, was ebenfalls in einer Reduktion der Infektion resultierte. Bei beiden Ansätzen konnten keine morphologischen Veränderungen der verbliebenen Einschlüsse beobachtet werden. Daher konnte spekuliert werden, dass Pmp21 direkt in der Adhäsion und Internalisierung involviert ist.

4.4.2.1 *C. pneumoniae* Pmp21-N inhibiert nicht die *C. trachomatis* Infektion

Das *C. pneumoniae* Pmp21 ist 34,74% identisch zum *C. trachomatis* Homolog PmpD. Vergleichbar zum Pmp21 konnten für PmpD mehrere prozessierte Proteinformen gefunden und auch die Oberflächenlokalisierung des Proteins auf EBs und RBs nachgewiesen werden (Crane, Carlson et al. 2006), (Kiselev, Stamm et al. 2007), (Swanson, Taylor et al. 2009). Aufgrund dieser Ähnlichkeit wäre die Nutzung desselben humanen Wirtszellrezeptors durchaus denkbar. Daher sollte untersucht werden, ob die Gabe von rekombinantem Pmp21 und die daraus resultierende Absättigung des Wirtszellrezeptors auch in einer Reduktion der *C. trachomatis* Infektion resultiert.

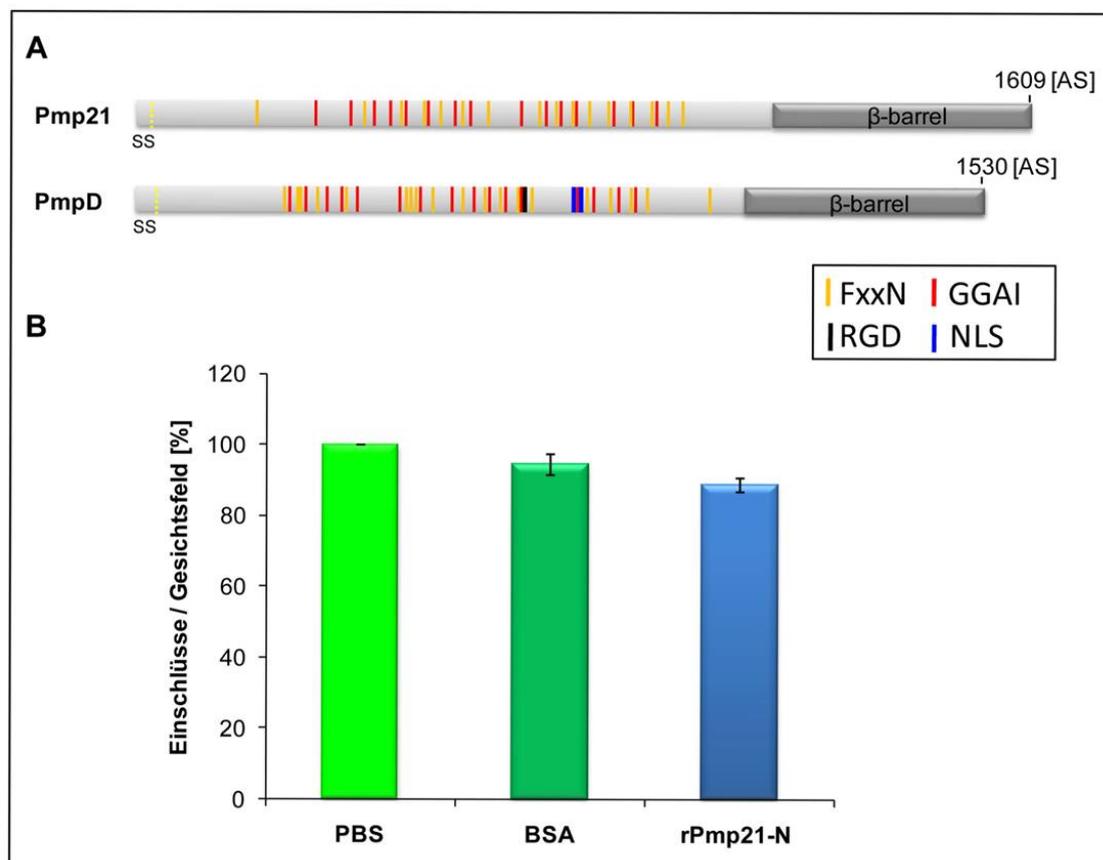


Abbildung 25: Neutralisationsversuch der *C. trachomatis* L2 Infektion durch rekombinantes Pmp21 Protein

A) Schematische Darstellung des *C. pneumoniae* Pmp21 und des *C. trachomatis* L2 Homologs PmpD. Die repetitiven Motive sind durch Balken (gelb=FxxN, rot= GGA (I,L,V) dargestellt. Das *C. tr.* PmpD enthält zudem ein RGD- Motiv, sowie ein Kernlokalisierungssignal (NLS) im N-Terminus. B) Quantitative Auswertung des Protein-Neutralisations-Experiments. HEp-2 Zellen wurden mit PBS, BSA (200 μ g/ml) oder rPmp21-N (200 μ g/ml) inkubiert und anschließend mit Gradienten-gereinigten *C. trachomatis* L2 EBs (MOI 50) infiziert. 30 Stunden nach der Infektion wurden die infizierten Zellen mit Methanol fixiert und die Zahl der gebildeten Einschlüsse unter Verwendung des Pathfinder-Antikörpers bestimmt. (n=3)

Für das Neutralisationsexperiment wurden Humanzellen mit rekombinantem Pmp21-N Protein (200 μ g/ml) vorinkubiert und anschließend mit Gradienten-gereinigten *C. trachomatis* L2 EBs infiziert. Als Kontrolle dienten PBS und BSA (200 μ g/ml) vorbehandelte HEp-2

Zellen. Die Einschusszahlen der Kontrolle PBS wurden auf 100% gesetzt. Die Zahl der Einschlüsse von den mit BSA (94%) und den mit rPmp21-N (89%) behandelten Zellen unterschied sich nur wenig von der Kontrolle PBS (Abbildung 25, B). Somit konnte für rekombinantes *C. pneumoniae* Pmp21, trotz der Ähnlichkeit zum *C. trachomatis* PmpD, kein inhibitorischer Effekt auf die *C. trachomatis* Serovar L2 Infektion nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Pmp21 und sein homolog PmpD unterschiedliche Rezeptoren oder Interaktionspartner auf der Humanzelloberfläche erkennen.

4.4.3 Rekombinantes Pmp21 inhibiert die Adhäsion der Chlamydien

Pmp21 zeigte Adhäsion an Humanzellen und die Vorbehandlung der Humanzellen mit rekombinantem Protein führte zu einer signifikanten Reduktion der Infektion. Diese inhibitorische Wirkung könnte auf die Interaktion des rekombinanten Pmp21 mit seinem humanen Rezeptor und dessen Absättigung beruhen, so dass dieser für das native Pmp21 auf der EB-Oberfläche nicht mehr zur Verfügung steht. Diese Hypothese sollte im Folgenden untersucht werden.

Gereinigte Chlamydien wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE lebend markiert, um ihre Bindung an Humanzellen anhand der Fluoreszenz im FACS direkt detektieren zu können (Schnitger, Njau et al. 2007). Um den Einfluss von Pmp21 auf die Bindung der Chlamydien an die Humanzellen zu untersuchen, wurden die HEp-2 Zellen mit verschiedenen Proteinkonzentrationen rekombinantem Pmp21-N vorbehandelt, bevor sie mit CFSE-markierten Chlamydien für eine Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Da Heparin die Bindung der Chlamydien zu zirka 90% neutralisiert, wurde es hier als Positivkontrolle verwendet (Wuppermann et al., 2001; Mölleken und Hegemann, 2008). Die Eigenfluoreszenz von HEp-2 Zellen, welche bei zirka 80 relativen Fluoreszenzeinheiten liegt, wird um ein Vielfaches gesteigert, sobald CFSE-markierte EBs an diese binden (relative Fluoreszenz von zirka 7500, PBS behandelte EBs) (Abbildung 26, A). Diese Fluoreszenz wurde gleich 100% gesetzt (Abbildung 26). Bei einer Vorinkubation der Humanzellen mit BSA zeigte sich eine relative Bindung der Chlamydien von ca. 92%, während die Zugabe von 500 µg/ml Heparin die Bindung fast vollständig neutralisierte (ca.4%). Die Zugabe von 12,5 µg/ml rPmp21-N führte mit 97% Bindung zu keinem inhibitorischen Effekt im Vergleich zu den Kontrollen, während die Zugabe der doppelten Proteinkonzentration (25 µg/ml) eine Reduktion um 20% ergab (Abbildung 26, B). Durch steigende rPmp21-N Proteinkonzentrationen auf 50, 100 und 200 µg/ml konnte die relative Bindung der Chlamydien auf 40%, 23% und 10% reduziert werden.

Diese Konzentrationskinetik zeigt, dass das rekombinante Pmp21-N einen humanen Rezeptor dosisabhängig blockieren und dadurch die EB- Bindung inhibieren kann. Die reduzierte Bindung der EBs ist somit die Ursache für die verminderte Infektiösität für die in Abschnitt 4.4.1 und 4.4.2 vorgestellten Neutralisationsexperimente.

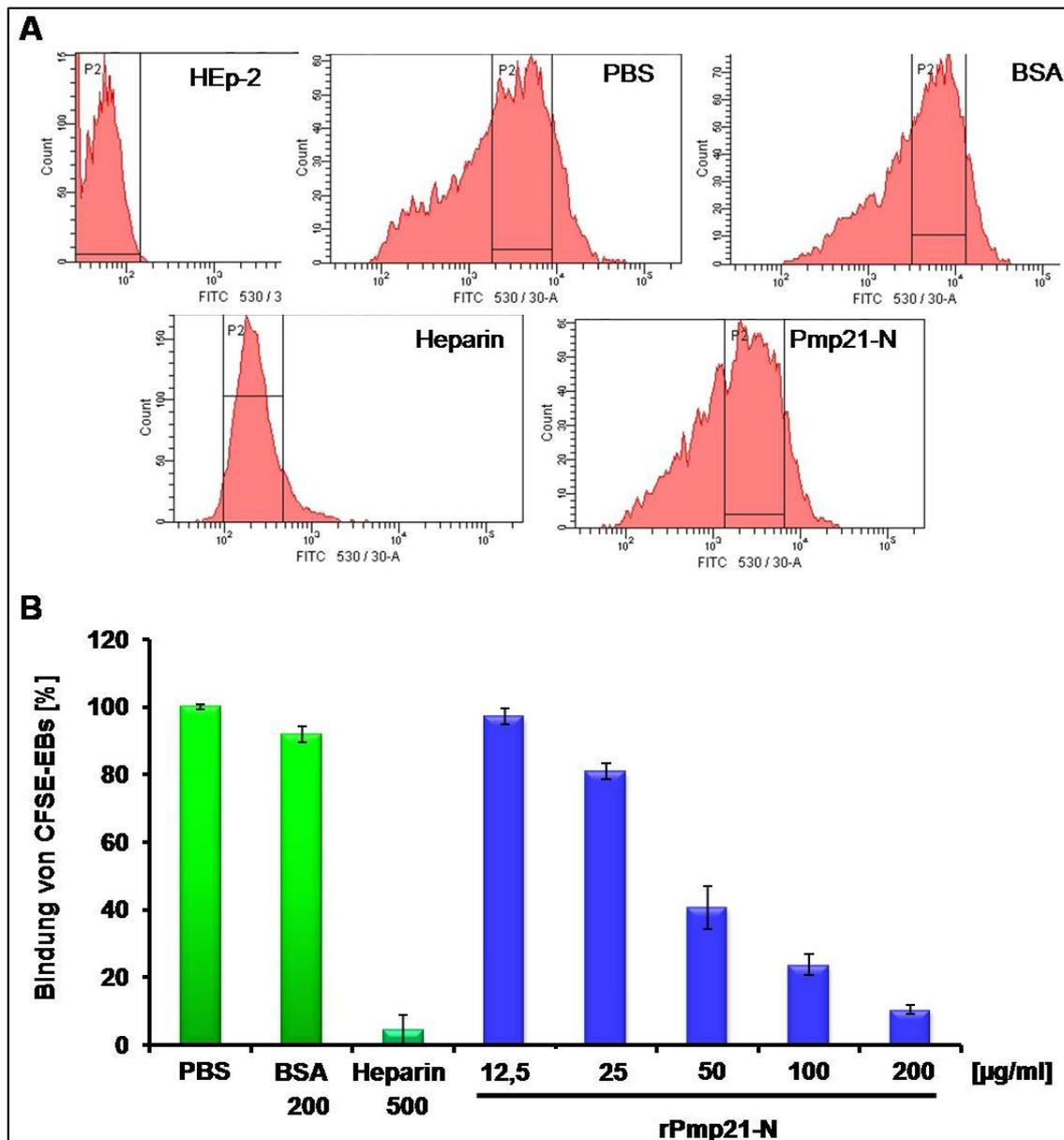


Abbildung 26: Der Einfluss von rPmp21-N auf die Adhäsion von *C. pneumoniae* an HEp-2 Zellen

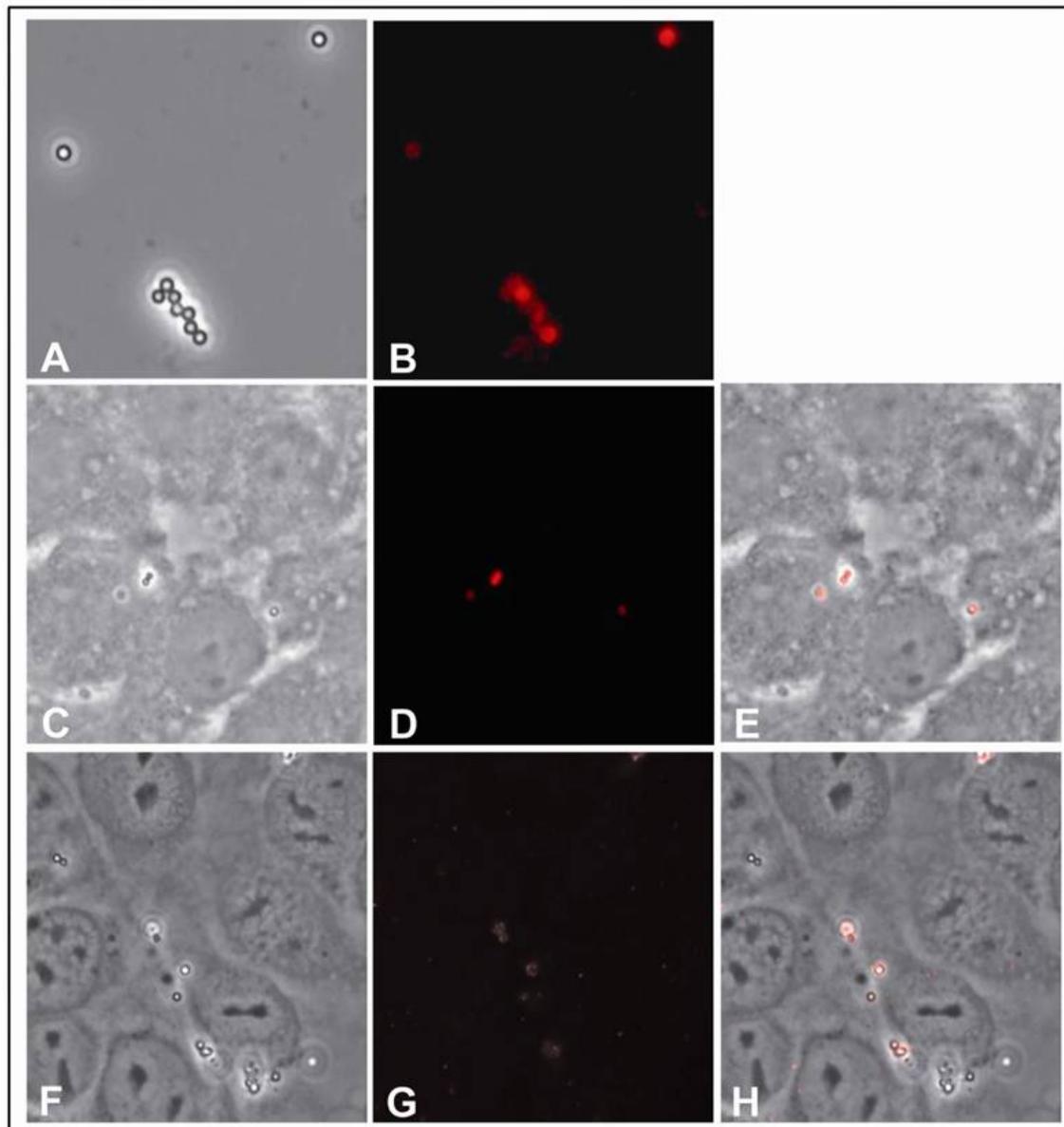
A) FACS-Histogramme für die relative Fluoreszenz der CFSE-EB gebundenen HEp-2 Zellen. HEp-2 Zellen wurden mit PBS, BSA oder rPmp21-N vier Stunden vorinkubiert, bevor sie mit CFSE-markierten Chlamydien im 100-fachen Überschuss (MOI 100) oder unter Zugabe von Heparin für eine Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Die Chlamydien-HEp-2 Zellsuspension wurde durch Waschen mit PBS von ungebundenen Chlamydien gereinigt, mit Formaldehyd (3,7%) fixiert und mittels FACS ausgewertet. Dargestellt sind unbehandelte HEp-2 Zellen (HEp-2), PBS (PBS), BSA (BSA) und Heparin [500 µg/ml] (Heparin) behandelte HEp-2 Zellen als Kontrollen sowie die an HEp-2 Zellen gebundenen CFSE-EBs nach rPmp21-N [100µg/ml] (Pmp21-N) Behandlung. B) Quantifizierung der Fluoreszenz der HEp-2 Zellen mit den gebundenen Chlamydien.

4.5 Rekombinantes Pmp21 vermittelt die Internalisierung proteinbeschichteter Latexkügelchen

Pmp21 spielt eine wichtige Rolle als chlamydiales Adhäsins. Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob es darüber hinaus auch eine Funktion bei der Internalisierung des Bakteriums in die Wirtszelle erfüllt. In Studien für andere Organismen, wie z.B. *Y. pseudotuberculosis*, konnte das Invasin als Adhäsins identifiziert werden, welches zudem auch die Internalisierung des Bakteriums in die Wirtszelle vermittelt (Dersch and Isberg 1999). Um zu untersuchen, ob Pmp21 möglicherweise ebenfalls diese Funktion vermittelt, sollten Latexkügelchen mit dem rekombinanten Protein beschichtet und mit HEp-2 Zellen inkubiert werden. Die Latexkügelchen wurden jeweils mit 200 µg/ml biotinylierten BSA, rInvasin oder rPmp21-N beschichtet. Die erfolgreiche Beschichtung der Kügelchen wurde mittels Westernblot-Analyse und indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abbildung 27). Nach einer einstündigen Inkubation der HEp-2 Zellen bei 37°C mit einem 100-fachen Überschuss von Latexkügelchen wurden die Zellen mit Formaldehyd jedoch ohne Detergenz fixiert. Diese Fixierung ermöglicht die Unterscheidung von internalisierten Kügelchen, deren Antigene für den Antikörper nicht zugänglich sind, von extern gebundenen und somit Antikörper-zugänglichen Latexkügelchen. Für die Kontrolle BSA konnten nur wenige zellassoziierte Latexkügelchen gefunden werden und es zeigte sich eine geringe Internalisierung von 5%. Für Invasin-beschichtete Latexkügelchen konnte eine 58%ige Internalisierung beobachtet werden (Abbildung 27, F-H ; Abbildung 28).

Für die Pmp21-N-beschichteten Latexkügelchen konnte eine signifikante Internalisierung von 45% nachgewiesen werden (Abbildung 27 A, I-T; Abbildung 28).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Pmp21 nicht nur die Adhäsion der Chlamydien an die Wirtszelle vermittelt, sondern auch an der Aufnahme der Chlamydien in die Wirtszelle beteiligt sein könnte.

**Abbildung 27: Internalisierung von Protein-beschichteten Latexkugeln**

Protein-beschichtete Latexkugeln (200µg/ml) wurden mit HEp-2 Zellen inkubiert und anschließend mit Formaldehyd fixiert. Exemplarisch sind die mit rPmp21-N-beschichteten Latexkugeln dargestellt, die mit dem gereinigten α -Pmp21-E Antikörper und anschließend mit dem sekundären α -Kaninchen-Cy3 AK detektiert wurden (A, B). Untersucht wurde die Internalisierung von BSA (C, D, E) und rInvasin (F, G, H) beschichteten Kugeln. Die Bestimmung der gesamten Zell-assoziierten Latexkugeln erfolgte durch Phasenkontrast-Mikroskopie, während die internalisierten Kugeln durch Immunofluoreszenz der nicht-permeabilisierten Zellen identifiziert wurden (rot). Die Phasenkontrast-Aufnahme sind in A, C, F, dargestellt. Die Immunofluoreszenz-Aufnahme der externen Kugeln sind in B, D, G, und die Überlagerung der beiden jeweils in E und H gezeigt

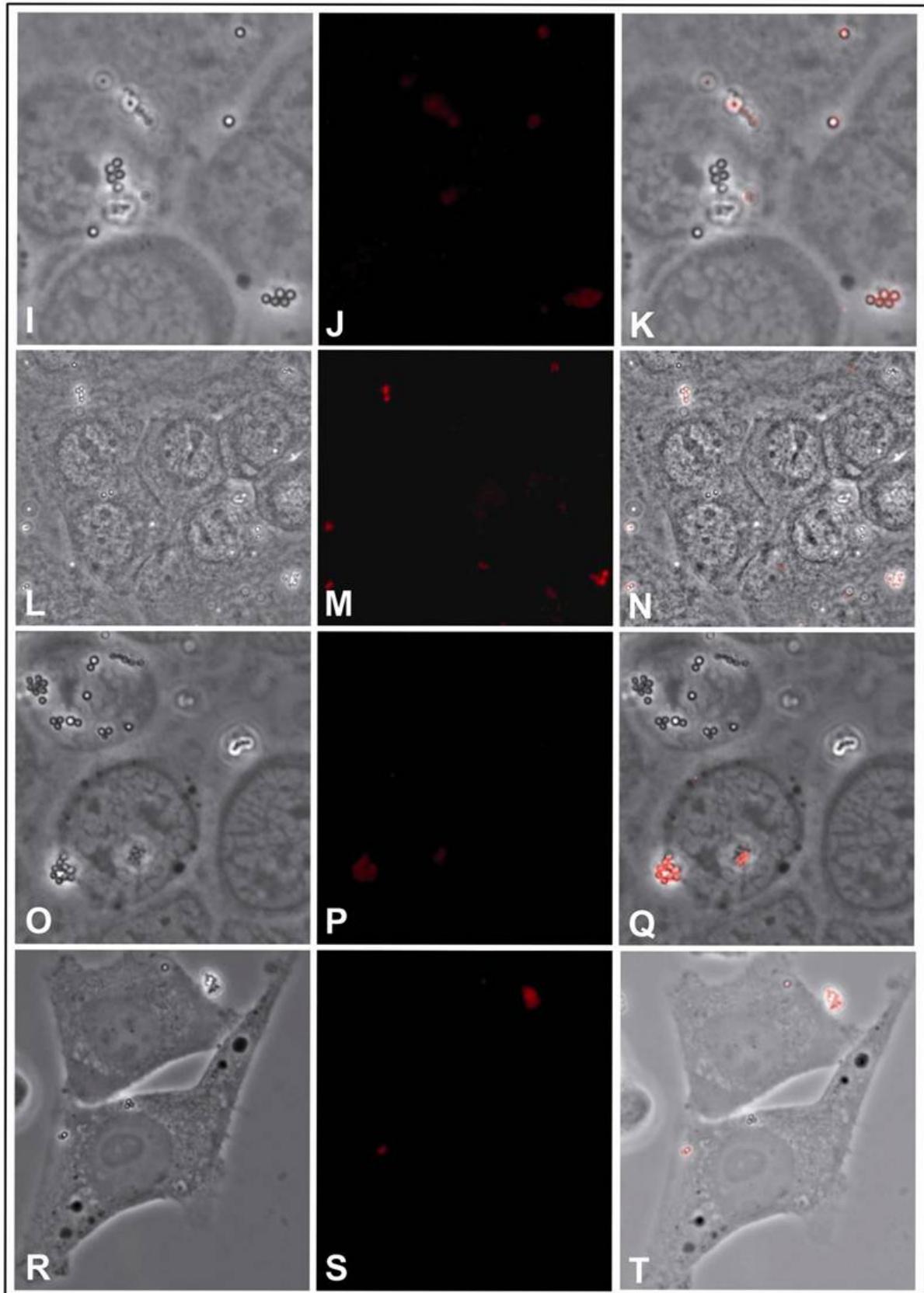


Abbildung 27 a: Internalisierung von Protein-beschichteten Latexkugeln

In Anlehnung an Abbildung 27 ist hier die Internalisierung von rPmp21-N (I-T) beschichteten Kugeln dargestellt. Die Phasenkontrast- Aufnahme sind in I,L,O,R, und die Immunofluoreszenz- Aufnahme der externen Kugeln sind in J,M,P,S dargestellt. Die jeweiligen Überlagerungsbilder entsprechen K,N,Q,T.

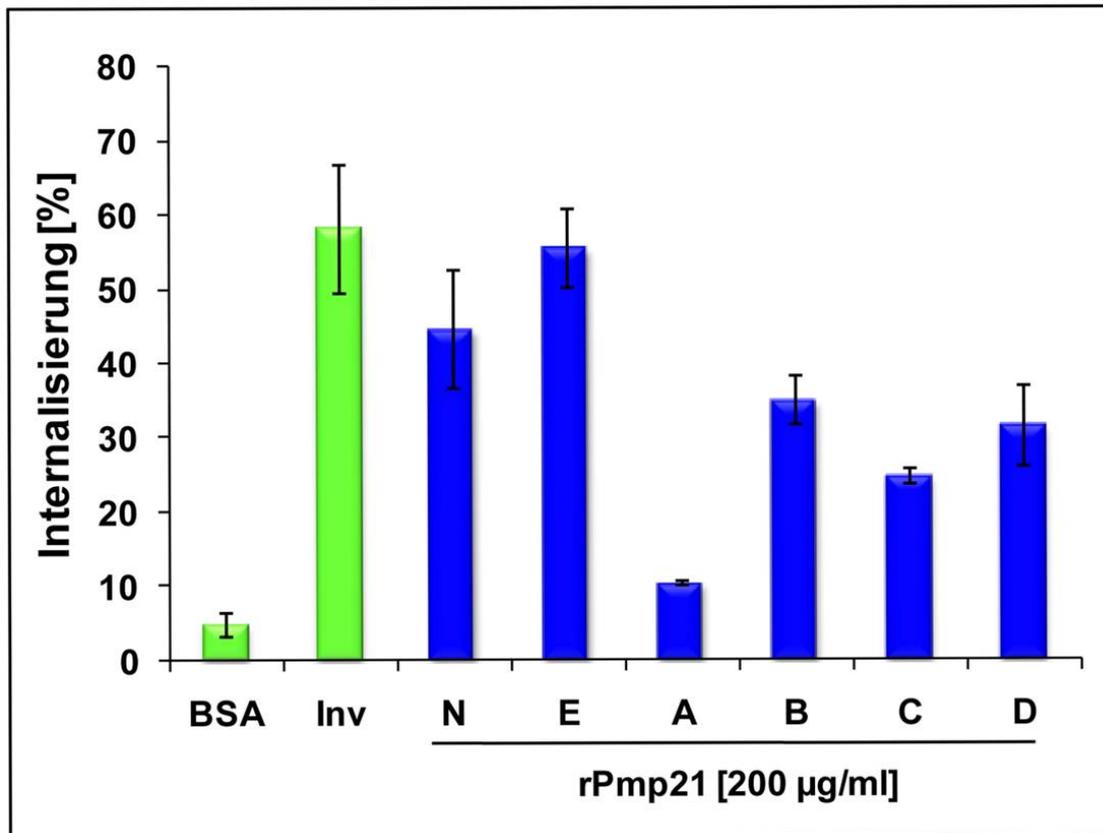


Abbildung 28: Quantifizierung der internalisierten Protein-beschichteten Latexkugeln

Latexkugeln wurden mit biotinylierten Proteinen beschichtet, je 200 µg/ml BSA, rInvasin (Inv) und den rPmp21-Domänen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der HEP-2 Zellen mit einem 100-fachen Überschuss von Latexkugeln. Die Bestimmung der gesamten Zell-assoziierten Latexkugeln erfolgte durch Phasenkontrast-Mikroskopie. Die gebundenen, nicht internalisierten Kugeln wurden durch Immunfluoreszenz detektiert. Zur Bestimmung der internalisierten Latexkugeln wurde die Zahl der externen Kugeln von der Gesamtzahl (interne und externe) Latexkugeln abgezogen. Die Detektion der Protein-beschichteten Latexkugeln erfolgte über Streptavidin-konjugierte Qdots (s. Methoden 3.12). (n=4)

Um zu klären, welcher Proteinabschnitt die Internalisierung vermittelt, wurde das Internalisierungsexperiment um die Pmp21-Domänen erweitert.

Es ergab sich für die rPmp21-E beschichteten Latexkugeln eine deutliche Internalisierung von 55%. Im Gegensatz hierzu zeigte sich für die Pmp21-A-Domäne eine schwache Internalisierung von 10%. Die Pmp21-B-Domäne konnte eine Internalisierung von 35% vermitteln, während Pmp21-C 24% und Pmp21-D 32% Internalisierung aufwies.

Somit vermitteln tatsächlich alle getesteten Pmp21-Domänen mit quantitativen Unterschieden die Internalisierung von Protein-beschichteten Latexkugeln. Da alle Domänen die repetitiven Motive tragen, wäre eine funktionelle Rolle für diese im Internalisierungsprozess denkbar.

4.5.1 Die repetitiven Motive FxxN und GGA (I,L,V) spielen eine Rolle bei der Internalisierung proteinbeschichteter Latexkügelchen

Da die repetitiven Motive eine Rolle in der Adhäsion des Proteins an Humanzellen spielen, sollte im Folgenden geklärt werden, ob sie darüber hinaus im Internalisierungsprozess involviert sind. Dazu wurde der Internalisierungstest mit der mutierten Domäne Pmp21-D_{mut3} durchgeführt. Zum direkten Vergleich diente das wildtypische Pmp21-D, das mit 203 Latexkügelchen an 1000 Humanzellen adhärierte und gleich 100% gesetzt wurde (Abbildung 29). Für die mit rPmp21-D beschichteten Kügelchen zeigte sich eine Internalisierung von zirka 30%, somit wurde fast ein Drittel der mit rPmp21-D-beschichteten Kügelchen internalisiert. Die rPmp21-D_{mut3} Mutante adhärierte zu zirka 40% an die Humanzellen, wobei nur 5% der proteinbeschichteten Latexkügelchen internalisiert wurden. Somit ist die Internalisierung aller mit rPmp21-D_{mut3}-beschichteten Zellassozierten Latexkügelchen um den Faktor 8 reduziert.

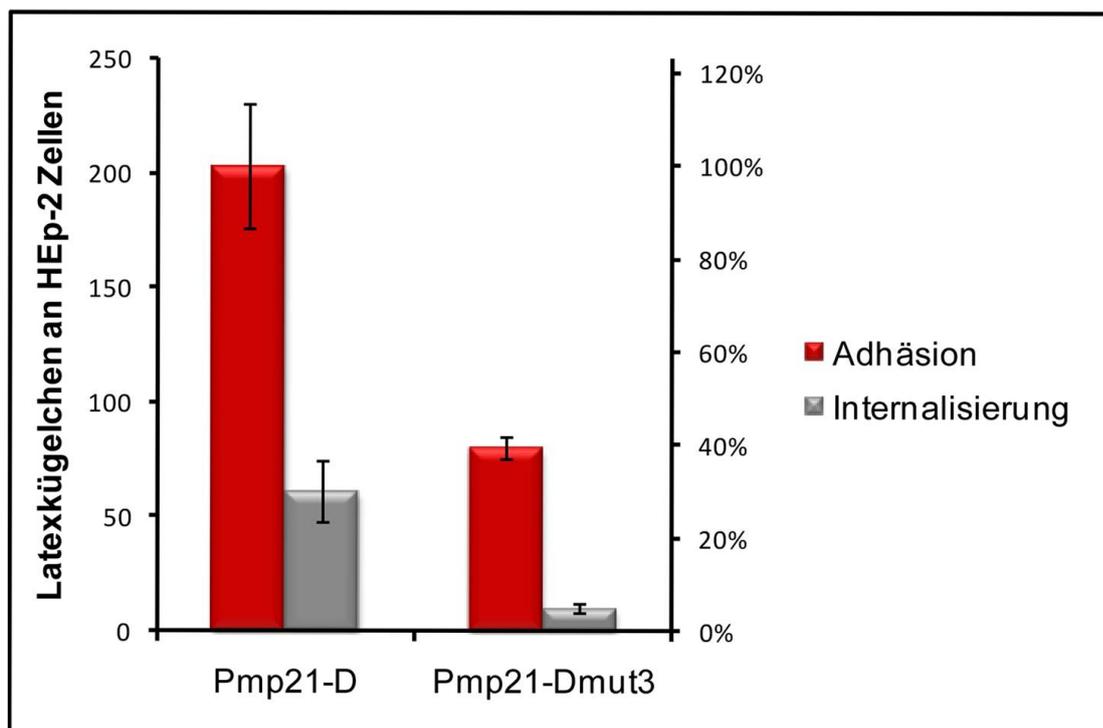


Abbildung 29: Analyse des Einflusses der repetitiven Motive auf die Internalisierung

Latexkügelchen wurden mit rPmp21-D bzw. rPmp21-D_{mut3} beschichtet und in einem 100-fachen Überschuss mit Humanzellen inkubiert. Die Adhäsion (roter Balken) und Internalisierung (grauer Balken) wurden durch Phasenkontrast-Mikroskopie und Immunofluoreszenz bestimmt. Zur Detektion der externen, nicht gebundenen Latexkügelchen wurde der affinitätsgereinigte α -Pmp21-E AK (1:10 verd.), und der sekundäre α -Kaninchen-Cy3 AK (1:200 verd.) verwendet.

Beim Vergleich der adhäsiven Eigenschaften von Pmp21-D und Pmp21-D_{mut3} konnte wie bereits gezeigt eine starke Reduktion der Adhäsion einhergehend mit dem Verlust der repetitiven Motive nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des Internalisierungstest zeigen,

dass die Mutante rPmp21-D_{mut3} um den Faktor 8 reduziert aufgenommen wird, während die wildtypische Pmp21-D Domäne um den Faktor 3 reduziert internalisiert. Dies suggeriert das die repetitiven Motive von Pmp21-D auch im Internalisierungsprozess involviert sind.

4.5.2 Ein intaktes Aktin-Zytoskelett ist für die Internalisierung der Protein-beschichteten Latexkügelchen notwendig

Die Internalisierung der Chlamydien geschieht wahrscheinlich durch Rezeptor vermittelte Endozytose, an der das Aktin- Zytoskelett beteiligt ist (Carabeo et al., 2002; Carabeo und Hackstadt, 2000; Boleti et al., 1999; Schramm und Wyrick, 1995). Wenn das Aktin-Zytoskelett zerstört ist, wird die Internalisierung der Chlamydien zu mehr als 90% inhibiert (Boleti, Benmerah et al. 1999). Es konnte daher spekuliert werden, dass die Internalisierung der mit rPmp21-beschichteten Latexkügelchen ebenfalls Aktin-abhängig ist.

Die Humanzellen werden vor dem eigentlichen Internalisierungstest kurzzeitig mit Cytochalasin D vorbehandelt. Cytochalasin D zerstört die Aktin-Mikrofilamente und wirkt als Inhibitor der Aktinpolymerisation (Abbildung 30).

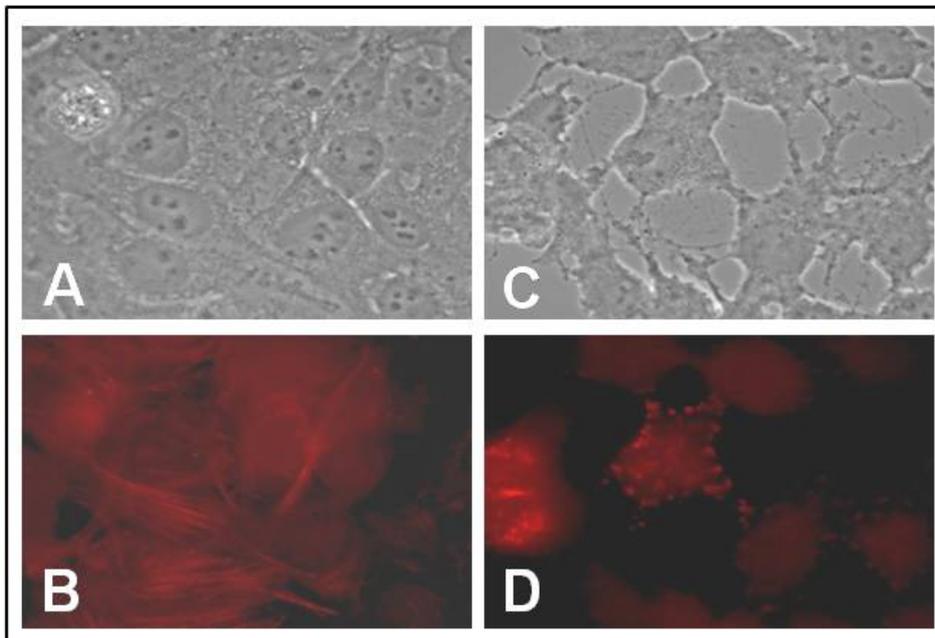


Abbildung 30: Cytochalasin D Behandlung von HEp-2 Zellen

Darstellung der HEp-2 Zellen ohne (A, B) und mit Cytochalasin D Behandlung. Die unbehandelten Zellen zeigen lange, intakte Aktinfilamente (B). Bei den Cytochalasin D behandelten HEp-2 sind die Aktinfilamente zerstört und ein punktiertes Aktinmuster tritt auf (D). Die Färbung für die Immunofluoreszenz erfolgte mit dem Phalloidin.

In der Immunofluoreszenz- Mikroskopie konnte die Auswirkungen der Cytochalasin D Behandlung auf die HEp-2 Zellen beobachtet werden. Die unbehandelten HEp-2 Zellen

zeigen morphologisch keine Auffälligkeiten und weisen ein intaktes Aktin- Zytoskelett auf, mit normalen Aktin-Fasern (Abbildung 30, A,B). Dagegen zeigen die Cytochalasin D behandelte HEP-2 Zellen eine poröse Morphologie und ein abnormales Aktin- Zytoskelett, sogenannte Aktin-patches (Abbildung 30, C,D).

Die HEP-2 Zellen wurden 30 min vor Zugabe der proteinbeschichteten Latexkügelchen mit Cytochalasin D (2 µg/ml) vorbehandelt und anschließend wie im Internalisierungstest (aber in Anwesenheit von Cytochalasin D) mit Latexkügelchen inkubiert. Die Bindung der proteinbeschichteten Latexkügelchen an die Humanzellen wurde durch die Zugabe von Cytochalasin D nicht gestört (Abbildung 31, Abbildung 32). Die quantitative Auswertung zeigte, dass von den mit zirka 16% adhärierenden BSA- beschichteten Kügelchen zirka 2% internalisiert wurden (Abbildung 32). Für Invasin konnte eine Adhäsion von zirka 75% und eine Internalisierung von zirka 10% nachgewiesen werden. Die mit rPmp21-N beschichteten Kügelchen adhärten mit zirka 87% an die Cytochalasin D behandelten HEP-2 Zellen und zeigten mit zirka 1% keine signifikante Internalisierung.

Dieser modifizierte Internalisierungstest suggeriert, dass das Aktin-Zytoskelett im Pmp21 Internalisierungsprozess involviert ist.

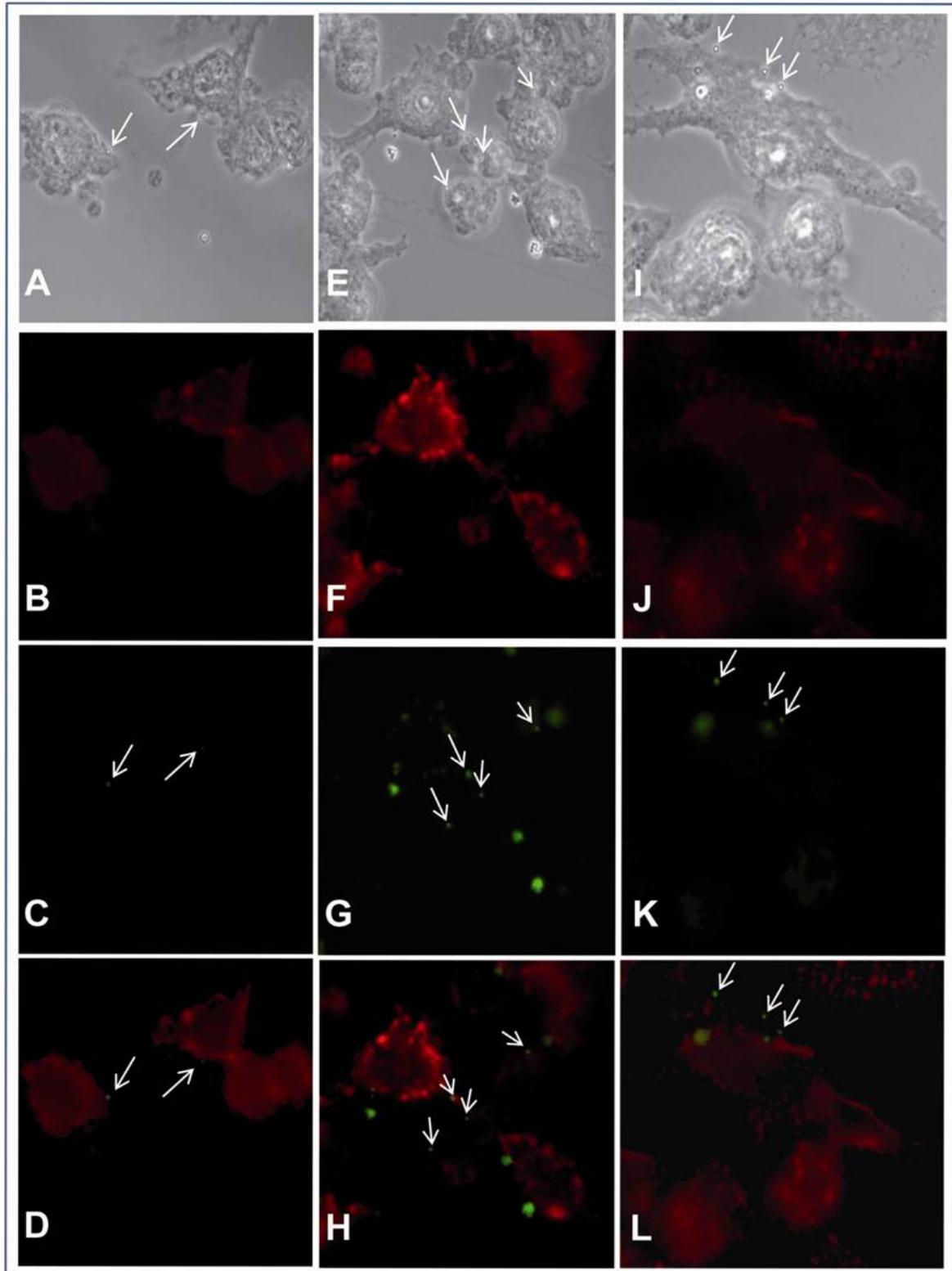


Abbildung 31: Einfluss von Cytochalasin D auf die Internalisierung

Internalisierungstest für Protein-beschichtete Latexkügelchen unter Einwirkung von Cytochalasin D. Die HEp-2 Zellen wurden mit Cytochalasin D (2 µg/ml) 30 min. inkubiert bevor die mit rBSA (A-D), rPmp21-N (E-H) und rInvasin- (I-L) beschichteten Kügelchen für den Internalisierungstest eingesetzt wurden. Für die Immunfluoreszenz wurde das Aktin- Zytoskelett mit Phalloidin angefärbt (B, F, J) und die Latexkügelchen mit den spezifischen AK (C, G, K) (s. Methoden 3.12). Eine Überlagerung der Fluoreszenz-Aufnahmen ist in D, H und L dargestellt.

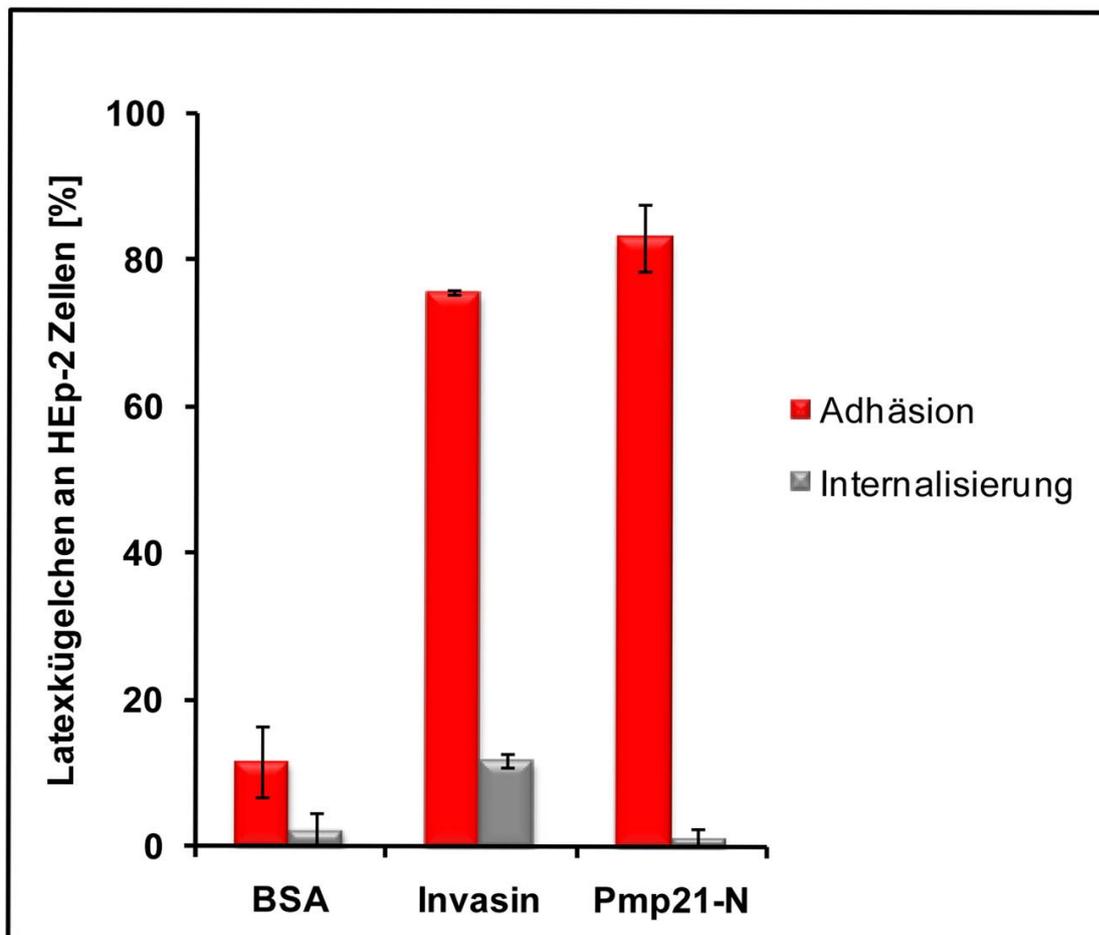


Abbildung 32: Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf die Internalisierung

Der Internalisierungstest wurde unter Zugabe des Aktin-Polymerisierungs-Inhibitors Cytochalasin D durchgeführt. Die quantitative Auswertung der internalisierten Latexkugelchen (mit 200 µg/ml rBSA, rInvasin und rPmp21-N beschichtet) erfolgte mittels Phasenkontrast- und Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit Phalloidin angefärbt. (Es wurden jeweils 70 Zellen ausgewertet)

5 DISKUSSION

Die Adhäsion ist der essentielle primäre Schritt zur Etablierung einer Infektion von eukaryotischen Zellen durch *Chlamydia pneumoniae*. Kürzlich gelang die Identifikation des ersten *C. pneumoniae* Adhäsins OmcB, welches über das Heparin-Bindemotiv an die Glykosaminoglykane (GAG) auf der Wirtszelloberfläche bindet (Moelleken and Hegemann 2008). Die Inhibition dieser OmcB-GAG Interaktion führte zu keiner vollständigen Neutralisation der Infektion, so dass weitere chlamydiale Adhäsine postuliert werden mussten. In der vorliegenden Arbeit sollte der putative Autotransporter Pmp21 näher untersucht werden. Die Analyse des Adhäsionsvermögens von Pmp21 mit Hilfe des Hefe-Oberflächenexpressions-systems sowie Untersuchungen mit rekombinantem Pmp21-Protein identifizierten Pmp21 als ein Adhäsins von *C. pneumoniae*. Eine detaillierte Studie der Passagierdomäne führte zur Identifikation der Funktion der für die Pmps charakteristischen repetitiven Motive GGA (I, L, V) und FxxN im Adhäsionsprozess.

Die Untersuchungen zeigen darüber hinaus, dass rekombinantes Pmp21 die Aufnahme von Latexkügeln vermittelt. Dadurch gelang hier erstmalig die Identifikation eines *C. pneumoniae* Adhäsins, welches auch als Invasin fungiert.

5.1 Das *C. pneumoniae* Pmp21 Protein adhärirt an Humanzellen

5.1.1 Identifikation der adhäsiven Domänen in Pmp21

Mit 21 Vertretern in *C. pneumoniae* (resp. 9 in *C. trachomatis*) stellen die Pmps die größte chlamydiale Proteinfamilie mit sehr heterogenen Proteinen dar. Aufgrund von bioinformatischen Studien werden die Pmps den Autotransportern zugeordnet. Die Funktion der Pmps konnte bisher nicht aufgeklärt werden. In Vorarbeiten konnten erste Hinweise auf eine Funktion von Pmp21 in der bakteriellen Adhäsion an Humanzellen gefunden werden (Georgoudis 2004). Dabei waren für die gesamte Passagierdomäne von Pmp21 sowie für die zwei kleineren Pmp21-Domänen Pmp21-B und Pmp21-D adhäsive Eigenschaften mit Hilfe des Hefe-Oberflächenexpressionssysteme identifiziert worden.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden in Hefe-Adhäsionstests die adhäsiven Eigenschaften der fehlenden Pmp21-Domänen Pmp21-A und Pmp21-C analysiert. Aga2p-Pmp21-A Hefezellen zeigten dabei eine relative Adhäsion von 45% bezogen auf 1000 HEP-2 Zellen und Aga2p-Pmp21-C Hefezellen 55% (Abbildung 10, Ergebnisse). Die von Aga2p-Pmp21-A und Aga2p-

Pmp21–C vermittelte Adhäsion ist somit ähnlich stark wie die von Aga2p-Inv exprimierenden Hefezellen (50%). Dass die Adhäsion der Hefezellen durch Pmp21 vermittelt wird, konnte durch Adhäsionsstudien mit rekombinantem Protein aller Pmp21-Domänen bestätigt werden (Abbildung 12, Ergebnisse). Ein Vergleich der beiden Adhäsionstests zeigte, dass die Stärke der Adhäsion zwischen den einzelnen Pmp21-Domänen variiert. So zeigte beim Hefe-Adhäsionstest die vollständige Passagierdomäne Pmp21-N die stärkste Adhäsion, während beim Adhäsionstest mit rekombinantem Protein für Pmp21-D die stärkste Adhäsion detektiert wurde. Diese quantitativen Unterschiede könnten auf unterschiedlichen Proteinmengen beruhen. Während Latexkügelchen mit jeweils 200 µg/ml rekombinantem Protein beschichtet wurden, wurde die genaue Proteinmenge auf der Hefe-Oberfläche nicht bestimmt.

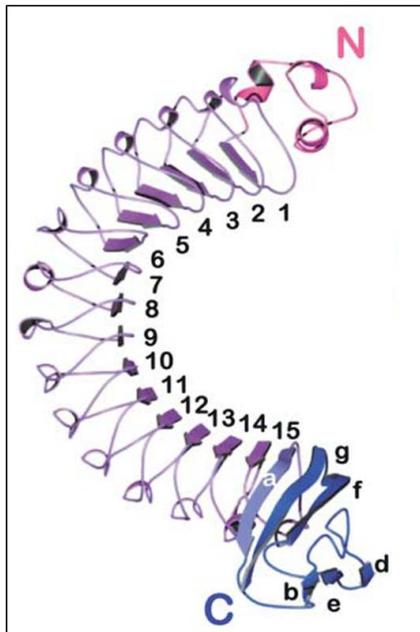


Abbildung 33: Struktur des Internalin A von *Listeria monocytogenes*

Das InIA besteht aus einer N-terminalen Kappe (pink), den LRR-Domänen (violett) und der Interrepeat Region (IR, blau). Die β -Stränge der LRRs sind nummeriert, die der IR-Region werden durch Buchstaben angezeigt. (In Anlehnung an (Schubert, Urbanke et al. 2002).

Bei den Listerien konnten Internaline identifiziert werden, deren Leucin-reiche Wiederholungen (LRR) für die Adhäsion und Internalisierung verantwortlich sind (Lecuit, Ohayon et al. 1997), (Marino, Braun et al. 1999), (Schubert, Urbanke et al. 2002), (Bierne, Sabet et al. 2007). Die LRR Domänen sind im N-terminus lokalisiert (flankiert von einer N-terminalen Kappe und einer C-terminalen Interrepeat Region (IR)), bestehen aus 22 Aminosäuren und kommen in InIA 15 mal und in InIB 7 mal vor. Die LRRs bilden ein rechts-händiges Solenoid aus, wobei jedes LRR eine helikale Windung zufügt (Abbildung 33). Für jede LRR Wiederholung sind ein konserviertes Muster aliphatischer, hydrophober Reste und ein Asparagin charakteristisch, die zum Solenoid-Kern ausgerichtet sind. Die von den LRRs gebildeten β -Stränge vereinen sich zu einem parallelen β -Blatt, welches insgesamt eine Sichel-förmige Struktur annimmt und es so zu einer spezifischen Rezeptor-Erkennung kommt. Die Internaline unterscheiden sich in der Wirtsspezifität.

Die Adhäsionsanalysen führten zu der überraschenden Erkenntnis, dass sowohl die vollständige Passagierdomäne von Pmp21 wie auch die vier Teildomänen starke Adhäsion an humane Epithelzellen zeigen. Dieses Verhalten ist untypisch für Adhäsine anderer Pathogene, welche zumeist über ein wohl definiertes Adhäsionsmotiv definierter Größe innerhalb des Proteins an Humanzellen adhären. So vermittelt das RGD Motiv im Invasin Protein von *Y. pseudotuberculosis* und *B. pertussis* oder das Heparin-Bindemotiv vom OmcB bei *C. pneumoniae* adhäsive Eigenschaften (Dersch and Isberg 1999), (Leininger, Roberts et al. 1991), (Moelleken and Hegemann 2008).

Während InIA über die LRRs und Bindung an E-Cadherin die Aufnahme in Darm-Epithelzellen und die Überquerung der intestinalen Barriere vermittelt, adhärnt InIB an eine Vielzahl von Zelltypen (Linden, Bierne et al. 2008), (Lecuit, Vandormael-Pournin et al. 2001), (Parida, Domann et al. 1998). Dafür ist das Fehlen einer Aminosäure im sechsten LRR von InIA verantwortlich, wodurch es zur Verkürzung des β -Faltblatts kommt, die eine spezifische Rezeptor Erkennung ermöglicht und wodurch schließlich eine Spezies-spezifische Listerien-Infektion determiniert werden kann (Niemann, Schubert et al. 2004).

Auch die Pmps verfügen über multiple repetitive Motive, die ähnlich zu den LRRs von *L. monocytogenes* zur Ausbildung einer spezifischen Struktur führen könnten, wodurch der Rezeptor dann Pmp21 erkennt. Die repetitiven Motive könnten für die Unterschiede in der Rezeptor-Erkennung der Pmps verantwortlich sein. Dies suggeriert, dass im Protein-Neutralisationstest das *C. pneumoniae* Pmp21 Protein aufgrund des strukturellen Unterschieds nicht mit dem *C. trachomatis* PmpD Rezeptor interagieren konnte und somit keine Reduktion der *C. trachomatis* Infektion zeigte.

5.1.2 Die repetitiven Motive vermitteln die Adhäsion des Proteins an die Humanzelle

Die vollständige Passagierdomäne Pmp21-N trägt 16 Mal das FxxN und 15 Mal das GGA (I, L, V) Motiv, während die vier Domänen Pmp21-A bis -D zwischen 2 und 14 Wiederholungen der beiden Motive tragen (Abbildung 8, Ergebnisse). Dies suggeriert, dass die repetitiven Motive eine Rolle in der Adhäsion spielen könnten. Zur Charakterisierung einer minimalen Adhäsionsdomäne wurden daher die beiden Domänen Pmp21-B und Pmp21-D ausgewählt, die vergleichbare Adhäsion, aber sehr unterschiedliche Motivzahlen aufweisen.

Zunächst wurden die Proteindomänen Pmp21-B und Pmp21-D sukzessive verkürzt und auf ihre adhäsiven Eigenschaften hin analysiert. Für die sukzessiv C-terminal verkürzten Pmp21-B Deletionsdomänen konnte kein Verlust der adhäsiven Eigenschaften festgestellt werden (Abbildung 13, Ergebnisse). Hingegen führte die N-terminale Verkürzung der Pmp21-D Domäne zu einer starken Reduktion und letztlich auch zum vollständigen Verlust der adhäsiven Eigenschaften. Beiden Pmp21-D-Deletionsdomänen fehlten die Motive vollständig, wobei auch die kürzeste Pmp21-B-Deletionsdomäne noch drei repetitive Motive enthielt. Diese Ergebnisse deuteten auf eine mögliche Rolle der repetitiven Motive in der Adhäsion hin, was durch Mutagenese der Motive in Pmp21-D weiter untersucht wurde.

In der Analyse von Aga2p-Pmp21-D-Mutanten, welche Aminosäureaustausche in beiden FxxN Motiven tragen, konnte eine starke Reduktion bzw. ein Verlust der adhäsiven Eigenschaften verglichen zur Kontrolle Aga2p-Pmp21-D festgestellt werden. Diese

Ergebnisse wurden durch rekombinante Pmp21-D-Mutanten bestätigt, die alle eine mit der Negativkontrolle vergleichbar geringe Adhäsion zeigten (Abbildung 15, Ergebnisse). Somit sind die FxxN Motive tatsächlich in der Adhäsion involviert. Dass beide repetitiven Motive (GGA (I,L,V) und FxxN) in der Adhäsion involviert sind, konnte durch die zusätzliche Mutationsanalyse von zwei Motiven (FxxN und GGAV) in Pmp21-A gezeigt werden. Wurde das FxxN Motiv mutiert oder das GGAV Motiv deletiert, so ging die Adhäsionsfähigkeit verloren. Beide Motive sind somit im Adhäsionsprozess involviert und schon die Mutation eines der beiden Motive führte dabei zum Verlust der Adhäsionsfähigkeit. Für die Adhäsion werden demnach mindestens zwei Motiven benötigt, wobei es sich hierbei um zwei gleiche (wie in Pmp21-D) oder auch ungleiche Motive (s. Pmp21-A und Pmp21-Peptid) handeln kann.

Ob beide Motive mit denselben Rezeptoren interagieren bleibt noch zu klären. Der Rezeptor für das Pertaktin-Adhäsins von *B. pertussis* ist nicht bekannt, obwohl dieses genau wie das Invasin über ein RGD Motiv verfügt, welches bei letzterem mit Integrin interagiert (Dersch and Isberg 1999), (Leininger, Roberts et al. 1991), (Everest, Li et al. 1996). Neben dem RGD Motiv trägt das Pertaktin auch eine Prolin-reiche Wiederholung (PRR). Möglich wäre somit auch, dass nicht das RGD, sondern das PRR Motiv die Adhäsion vermittelt (Emsley, Charles et al. 1996), (Remaut and Waksman 2004). Auch die Internaline A und B von *L. monocytogenes*, welche beide die LRRs nutzen, interagieren mit unterschiedlichen Rezeptoren. So bindet das InIA an E-cadherin, während die LRRs von InIB an c-Met binden (Mengaud, Lecuit et al. 1996), (Shen et al., 2000). Bei Pmp21 (sowie vermutlich bei allen Pmps) sind gleich zwei Motive für die Adhäsion verantwortlich und unterschiedliche oder weitere Funktionen für eines der Motive wären somit durchaus vorstellbar.

Mit Hilfe des chemisch synthetisierten Pmp21-Peptids konnte gezeigt werden, dass die repetitiven Motive vermutlich auch für die Infektion relevant sind (Abbildung 17). Die Vorinkubation der Humanzellen mit dem Pmp21-Peptid führte zu einer Reduktion der chlamydialen Infektion um 27%. Überraschenderweise zeigte das denaturierte Peptid ebenfalls einen schwachen inhibitorischen Effekt auf die Infektion. Möglicherweise hat sich das Hitze-denaturierte Peptid während der 4-stündigen Inkubationsphase auf Humanzellen partiell zurück gefaltet und so den Wirtszellrezeptor abgesättigt. Eine andere Kontrolle, z.B. ein enzymatisch verdautes Peptid, oder ein Peptid, das eine zufällige Anordnung der Aminosäuren enthält oder dessen repetitive Motive zerstört oder mutiert wären, sollte keinen Einfluss auf die Infektion ausüben. Diese Experimente stehen noch aus.

Das Pmp21 Protein enthält insgesamt 31 repetitive Motive beider Typen im N-Terminus, während das Pmp21-Peptid von jedem Motiv nur eine Kopie trägt. Es könnte sein, dass die Motive eine strukturelle Rolle spielen, eine einzigartige Proteinfaltung induzieren oder auch die Präsentation und Ausbildung von Modifikationsseiten begünstigen oder gar erst

ermöglichen. Beachtlich ist, dass das Peptid ähnlich stark die chlamydiale Infektion neutralisierte wie die Pmp21-C oder auch Pmp21-D Domäne. Auch die vergleichsweise geringe Anzahl von nur zwei Motiven scheint keinen limitierenden Faktor darzustellen, denn die Pmp21-C-Domäne trägt 14 Motive und inhibiert nicht so stark wie Pmp21-D oder das Peptid mit je nur 2 Motiven.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit den repetitiven Motiven erstmalig eine adhäsive Funktion zugeordnet werden. Bis dato dienten sie nur als Charakteristikum zur Einordnung der heterogenen Proteine in die Pmp-Familie (Grimwood and Stephens 1999). Wie bereits erwähnt, alternieren die Motive in den Pmp Proteinen häufig, so dass einem GGA (I, L, V) Motiv oft ein FxxN Motiv folgt (Abs. 1.4.3, Einleitung; Abbildung 5). Die Aminosäuren-Anzahl zwischen den Motiven ist dabei sehr variabel, was möglicherweise strukturelle Hintergründe hat und dazu führen mag, dass jedes Protein eine einzigartige Oberflächenstruktur besitzt. Für das Peptid wurde ein Bereich ausgewählt, in dem beide Motive FxxN und GGAI vorkommen und die Aminosäuren dazwischen einer durchschnittlich geringen Anzahl von 8 entsprechen (Abbildung 17, Ergebnisse). Künftige Studien mit weiteren synthetischen Peptiden, wie oben beschrieben, könnten wichtige Informationen über die Funktion der Motive beitragen.

Kürzlich publizierte Studien über das Pmp21 *C. trachomatis* Homolog PmpD zeigen, dass von EBs isoliertes PmpD oligomerisiert (Swanson, Taylor et al. 2009). Möglicherweise spielen die Motive während dieser Oligomerisierung eine Rolle. Sie könnten an bestimmten Positionen innerhalb der für PmpD beschriebenen „flower-like structure“ exponiert werden und so mit dem Rezeptor interagieren, oder bei der Strukturbildung selbst eine Rolle spielen, ähnlich zu den LRRs der Listerien. In diesem Fall könnten Peptide mit mehr als zwei Motiven oder verschiedene Motivkombinationen die Oligomerisierung begünstigen, was in einer massiven Steigerung des inhibitorischen Effekts auf die chlamydiale Infektion resultieren könnte. Ob Pmp21 wie sein PmpD Homolog oligomerisiert bleibt noch zu untersuchen. Vielleicht führt ein anderer Aminosäureabschnitt zu einem verstärkten inhibitorischen Effekt. Da Peptide nur relativ kurze Sequenzbereiche abdecken, wäre der Einsatz einer Kombination verschiedener Peptide im Infektionsneutralisationstest im Hinblick auf die Rezeptor-Absättigung interessant.

Die Genexpression der 21 *C. pneumoniae* Pmps unterliegt vermutlich einer internen Kontrolle, da sie in vier Operons transkribiert werden (Grimwood and Stephens 1999), (Vandahl, Pedersen et al. 2002), (Vandahl, Birkelund et al. 2004). Dies könnte gemeinsame oder ähnliche Funktionen für diese Pmps implizieren. Denkbar wäre aufgrund der repetitiven Motive in allen Pmps eine generelle Rolle im Adhäsionsprozess, sofern sie oberflächenlokalisiert sind. Mit der Adhäsionsstudie einer willkürlich gewählten Domäne aus

Pmp20 konnte diese Hypothese unterstützt werden (Abbildung 18, Ergebnisse). Aga2-Pmp20-AD exprimierende Hefezellen zeigten Adhäsion an HEp-2 Zellen, die mit ca. 32% nur unwesentlich geringer ist als die der Aga2p-Inv Hefezellen (35%). Die Expression unterschiedlicher Pmps könnte zur Selektion der zu infizierenden Humanzellen dienen, was die beobachteten Unterschiede im Adhäsionsverhalten verschiedener chlamydialer Spezies an verschiedenen Zelltypen erklären könnte (Hackstadt 1999), (Davis, Raulston et al. 2002), (Kuo, Lee et al. 2004).

Neben der Adhäsion könnten die Pmps auch andere Funktionen erfüllen. So besitzen zwei der insgesamt 30 Pmps (*C. trachomatis* PmpA und *C. pneumoniae* Pmp16) keine voraussagbare Signalsequenz zum Sek-abhängigen Transport durch die Zytoplasmamembran (Grimwood and Stephens 1999). Sie könnten daher innerhalb der Bakterien lokalisiert sein oder einem anderen Sekretionsmechanismus unterliegen. Von den Pmps werden nicht alle Proteine exprimiert, und die Expression von Pmp10 variiert innerhalb einer *C. pneumoniae* Spezies (Grimwood, Olinger et al. 2001), (Pedersen, Christiansen et al. 2001), (Vandahl, Pedersen et al. 2002). Möglicherweise dienen nicht exprimierte Gene zusammen mit den mutierten *pmps* als Reservoir für Rekombinationsereignisse (Stothard, Toth et al. 2003), (Gomes, Bruno et al. 2004). Für einige *pmp*-Gene konnten extensive Polymorphismen gefunden werden, aufgrund derer eine Unterscheidung der okularen, urogenitalen und LGV Krankheitsgruppen möglich ist (Gomes, Nunes et al. 2006). Da die Pmps auf der bakteriellen Oberfläche exprimiert werden, könnten sie aufgrund ihrer Polymorphismen in der Antigenvariation involviert sein und auch bei der Erkennung verschiedener Rezeptoren und verschiedener Zelltypen fungieren (Gomes, Nunes et al. 2006), (Nunes, Gomes et al. 2007).

5.2 Lokalisation des Pmp21 Proteins auf der chlamydialen Oberfläche

Unter Verwendung der generierten anti-Pmp21-D und anti-Pmp21-E Antikörper wurden Lokalisationsstudien durchgeführt, durch die Pmp21 auf der chlamydialen Oberfläche von EBs und RBs nachgewiesen werden konnte. Zudem konnte die Oberflächen-Lokalisierung des Pmp21-Proteins auch auf nicht-fixierten chlamydialen Partikeln nachgewiesen werden (Abbildung 20, Ergebnisse).

In vorangegangenen Studien wurden sowohl biochemische als auch Immunofluoreszenz-Verfahren zur Detektion von Pmp21 eingesetzt (Vandahl, Pedersen et al. 2002), (Wehrl, Brinkmann et al. 2004). Dabei wurden unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Lokalisation erzielt. Für Pmp21 konnte in biochemischen Analysen mit einem Antikörper

gegen ein rekombinantes Pmp21 Proteinfragment (AS 52-1129) nur eine N-terminale Form von 66 kDa nachgewiesen werden (Vandahl, Pedersen et al. 2002). Hingegen führte ein Antikörper gegen das Volllänge Pmp21 (ohne Signalsequenz) zur Detektion einer 47 kDa prozessierten Form, welche dem C-Terminus (C-pmp21) entspricht (Vandahl et al., 2001, Montigiani et al., 2001). Ein Antikörper gegen ein rPmp21-Fragment (AS 16-670) führte zur Detektion des gesamten Pmp21-Proteins (zirka 170 kDa), der Passagierdomäne (120-130 kDa) und einer aus ihrer Prozessierung resultierenden Proteinform von 70 kDa (N-pmp21) in Zelllysaten infizierter Humanzellen 2 bis 4 Tage nach der Infektion (Abbildung 34, A) (Wehrl, Brinkmann et al. 2004). Aus der Prozessierung der Passagierdomäne entsteht neben N-pmp21 als weitere Proteinform M-pmp21 (55 kDa); ihre Anwesenheit wurde über 2D-Gelen nachgewiesen (Abbildung 34) (Wehrl, Brinkmann et al. 2004). Bei der 66 kDa und der 70 kDa Proteinform handelt es sich wahrscheinlich um ein und dieselbe prozessierte Form (N-pmp21), während die 55kDa Form (M-pmp21) bislang nur von Wehrl et al. beschrieben wurde (Wehrl, Brinkmann et al. 2004).

Mit allen Pmp21-spezifischen Antikörpern konnten in Immunofluoreszenz-Analysen infizierter Zellen Pmp21 an der chlamydialen Oberfläche detektieren (Montigiani, Falugi et al. 2002), (Vandahl, Pedersen et al. 2002), (Wehrl, Brinkmann et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit gelang der biochemische Nachweis der 55 kDa Proteinform (auf RBs und EBs) und ebenfalls die Detektion des Pmp21 Proteins auf der chlamydialen Oberfläche. Für das Pmp21 Homolog von *C. trachomatis*, PmpD, konnte ebenfalls eine Oberflächenlokalisation auf *C. trachomatis* EBs nachgewiesen werden (Crane, Carlson et al. 2006). Zudem wurden ebenfalls Unterschiede in biochemischen Analysen beobachtet. Dabei gelang einmal die Detektion des Volllänge PmpD Proteins mit zirka 157 kDa und der zwei Proteinformen von zirka 120 kDa (Passagierdomäne) und zirka 65 kDa (verkürzte Passagierdomäne) im Westernblot durch spezifische PmpD-Antikörper (Kiselev, Stamm et al. 2007). Hingegen reagiert der Antikörper gegen das gesamte PmpD Protein nur mit den prozessierten Proteinformen von zirka 80 kDa und 42 kDa in EB-Lysaten (Crane, Carlson et al. 2006). In Expressionsanalysen konnten mit Antikörpern gegen PmpD-Peptide unterschiedliche Proteinformen detektiert werden. Daher postulieren die Autoren eine zeitabhängige Zwei-Schritt Prozessierung, resultierend in drei Membran-assoziierten Proteinformen p155 (155 kDa, Volllänge PmpD), p73 (73 kDa, Passagierdomäne) und p82 (82 kDa, Translokationseinheit) (Swanson, Taylor et al. 2009). Im späten Infektionszyklus entstehen dann die löslichen Proteinformen p111, p73 und p30, wobei p111 der verlängerten Passagierdomäne entspricht, welche ähnlich zum *C. pneumoniae* Pmp21 einer weiteren Prozessierung unterliegt, resultierend in den zwei kleineren Formen p73 und p30 (Abbildung 34, B) (Swanson, Taylor et al. 2009).

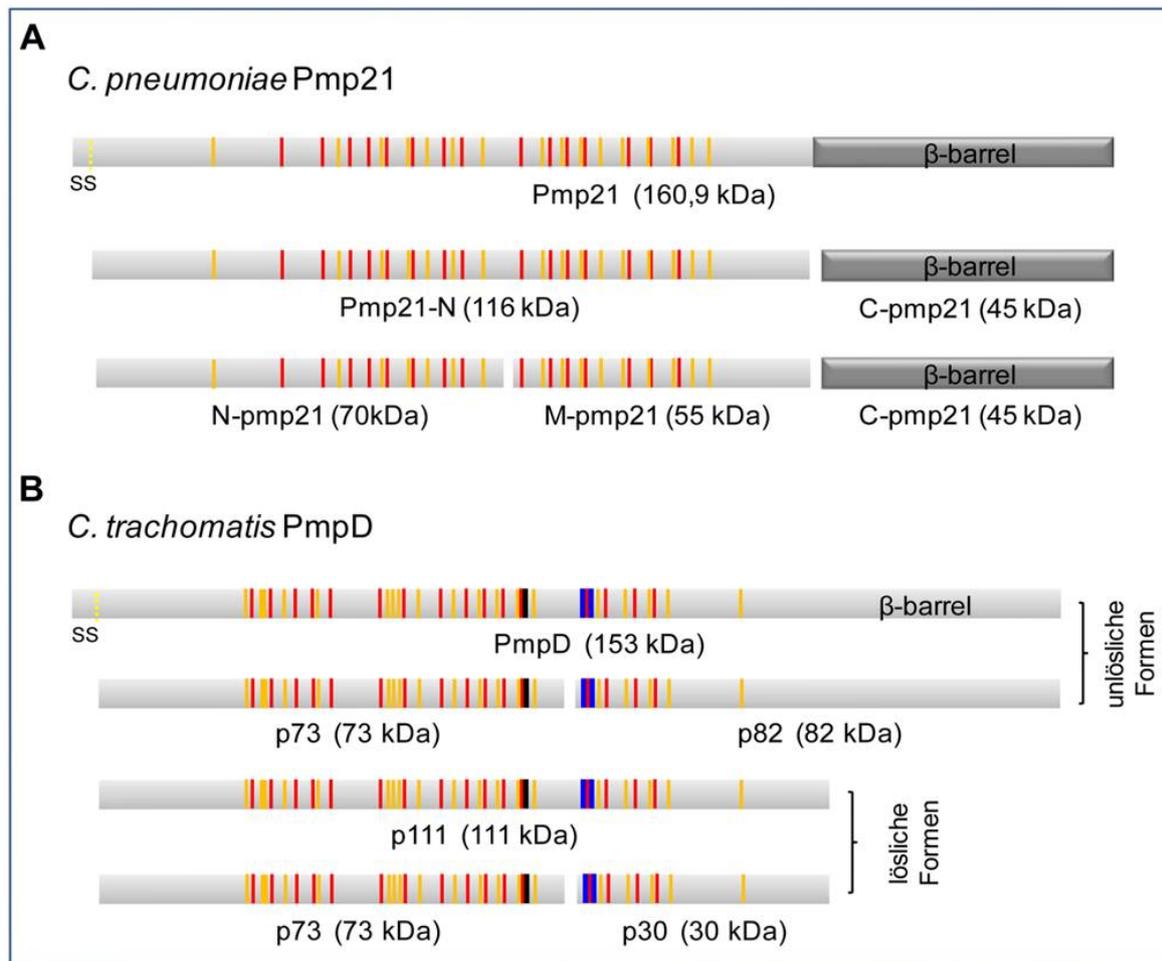


Abbildung 34: Die proteolysierten Proteinformen von Pmp21 und dem *C. trachomatis* Homolog PmpD

A) Schematische Darstellung des Pmp21 Proteins und den proteolysierten Proteinformen (in Anlehnung an Vandahl et al., 2002 und Wehrl et al., 2004). B) Schematische Darstellung des *C. trachomatis* Homolog PmpD und den proteolysierten Proteinformen (in Anlehnung an Swanson, Taylor et al. 2009).

Trotz der Unterschiede in den biochemischen Analysen konnte in Immunfluoreszenz-Analysen mit allen Antikörpern eine Detektion von Pmp21 an der chlamydialen Oberfläche nachgewiesen werden. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern, die spezifisch gegen die Pmp21-E Domäne gerichtet sind, konnte so erstmalig die Anwesenheit von M-pmp21 auf der chlamydialen Oberfläche von EBs und RBs gezeigt werden. Dabei bleibt die Prozessierung der Passagierdomäne zu berücksichtigen, da die Antikörper keine Differenzierung zwischen dem Volllängen Pmp21 Protein und den proteolysierten Formen zulassen. Gemäß der Immunfluoreszenz-Daten und den Ergebnissen der Westernblot-Analysen sollte es sich jedoch um M-pmp21 handeln. Die Anwesenheit der proteolysierten Pmp21-Formen auf der chlamydialen Oberfläche und ihre adhäsiven Eigenschaften könnte auf ihre Rolle bei der spezifischen Rezeptor Erkennung und/oder der Infektion hinweisen.

5.3 Pmp21 vermittelt die chlamydiale Infektion als Adhäsion und Invasin

Um die Relevanz von Pmp21 im Infektionsprozess nachzuweisen, wurden verschiedene experimentelle Strategien angewandt. Dabei sollte gezeigt werden, dass die Suppression der Pmp21 Funktion, also die ausbleibende Adhäsion an die Wirtszelle, eine Reduktion der Infektion zur Folge hat. Die Interaktion zwischen dem chlamydialen Pmp21 Protein und einem unbekanntem humanen Rezeptor wurde zum einen durch Vorinkubation von *C. pneumoniae* EBs mit dem α -Pmp21-E Antikörper und zum anderen durch Vorbehandlung der HEp-2 Zellen mit dem rekombinanten Pmp21 Protein verhindert. Durch die Vorinkubation der EBs mit dem Antikörper werden die auf den Chlamydien zugänglichen Pmp21-Epitope gebunden, während das rekombinante Protein die Rezeptor-Bindestellen auf der Wirtszelloberfläche besetzt. Die Vorinkubation mit dem reinen Pmp21-E Antikörperserum brachte dabei eine Reduktion der Infektion in konzentrationsabhängiger Weise um bis zu 78% (Abbildung 21, Ergebnisse). Überraschenderweise zeigte das Präimmunserum eine Reduktion um 35%, wobei das Präimmunserum weder in Westernblot-Analysen noch in Immunofluoreszenzstudien reagierte. Somit scheint der Einfluss des Präimmunserums nicht auf einer spezifischen Interaktion mit Pmp21 zu beruhen, sondern eine andere, unbekannte Auswirkung auf die chlamydiale Funktion zu haben. Wehrl et al. (2004) konnten mit dem gegen die 70 kDa N-pmp21 Form gerichteten Antikörper die Infektion um bis zu 95% reduzieren. Dabei zeigten ihre Negativkontrollen mit monoklonalen Antikörpern gegen Momp oder LPS wider Erwarten eine Erhöhung der Infektivität auf zirka 200% (Momp) bzw. 300% (LPS). Weshalb der N-pmp21 Antikörper im Vergleich zu den hier eingesetzten Antikörpern einen stärkeren inhibitorischen Effekt ausübt ist unklar, aber die erwähnten Negativkontrollen relativieren das ganze Experiment (Wehrl, Brinkmann et al. 2004).

In *C. trachomatis* konnte mit einem Antikörper gegen das vollständige PmpD eine Reduktion der Infektion von mindestens 50% nachgewiesen werden (Crane, Carlson et al. 2006). Die inhibitorische Wirkung des Antikörpers war auf alle getesteten *C. trachomatis* Serovare übertragbar, aber eine Reaktion des Antikörpers mit *C. muridarum*, *C. pneumoniae* oder *C. caviae* fand nicht statt. Da PmpD und Pmp21 nur zu zirka 34% identisch sind, ist ein Einfluss des Antikörpers auf das homologe Protein der anderen Spezies nicht zu erwarten.

Auch für andere chlamydiale Außenmembranproteine, die möglicherweise eine Rolle in der Adhäsion spielen, konnte die neutralisierende Wirkung von Antikörpern gezeigt werden (Caldwell and Perry 1982), (Su, Watkins et al. 1990), (Rasmussen-Lathrop, Koshiyama et al. 2000), (Mamelak, Mylvaganam et al. 2001), (Kawa and Stephens 2002). So führte die Verwendung eines Antikörpers gegen das immunodominante Momp Protein von *C. trachomatis* zu einer Reduktion der Infektion, ohne jedoch die Aufnahme der Chlamydien in

die Wirtszelle, sondern ihre Entwicklung innerhalb der Wirtszelle zu beeinflussen (Caldwell and Perry 1982). Auch für *C. pneumoniae* konnte die Infektion mit einem monoklonalen Momp Antikörper reduziert werden (Wolf, Fischer et al. 2000). Da das *C. pneumoniae* Momp im Hefeadhäsionstest jedoch keine Adhäsivität zeigte, bleibt die Funktion von Momp bei *C. pneumoniae* unklar (Moelleken and Hegemann 2008). Für das PorB Protein von *C. trachomatis* führte der spezifische AK ebenfalls zur Reduktion der Infektion (Kubo and Stephens 2000), (Kawa and Stephens 2002). Kürzlich konnte auch für das erste identifizierte *C. pneumoniae* Adhäsins OmcB gezeigt werden, dass der OmcB-Antikörper die Infektion um 60% reduziert (Moelleken and Hegemann 2008). Außerdem zeigten Antikörper, die gegen chlamydiales LPS gerichtet waren, eine Reduktion der chlamydialen Infektion (Crane, Carlson et al. 2006), (Brade, Schramek et al. 1986). Die neutralisierende Wirkung des α -Pmp21-Antikörpers auf die chlamydiale Infektion wurde durch ein Neutralisations-Experiment mit rekombinant hergestelltem Pmp21 Protein bestätigt. Durch die Vorbehandlung der HEp-2 Zellen mit dem rekombinanten Pmp21-N reduzierte sich die Infektion Dosis-abhängig um bis zu 90%. Für die Proteinfragmente Pmp21-G und Pmp21-E konnte ein inhibitorischer Effekt von bis zu 65% nachgewiesen werden (Abbildung 22, Ergebnisse). Die einzelnen Pmp21-Domänen (A-D) zeigten keine so starken inhibitorischen Effekte. Interessanterweise zeigten die Pmp21-A und Pmp21-B Domäne einzeln fast keine Reduktion der Infektion, während beide zusammen (entspricht Pmp21-G) inhibitorisch wirkten. Ähnliches wurde auch für Pmp21-C und Pmp21-D (entspricht Pmp21-E) beobachtet. Die einzelnen Effekte wurden bei weitem verstärkt, wenn sie für die Vorinkubation in Form von Pmp21-E eingesetzt wurden. Pmp21-E und -G entsprechen fast vollständig den biologisch prozessierten N- und M-pmp21 Formen. Somit könnten diese Daten ein Hinweis auf die Relevanz der prozessierten Formen in der Infektion sein. Die prozessierten Proteinformen präsentieren womöglich eine spezifische Struktur auf der chlamydialen Oberfläche, welche für die optimale Wirtszellinteraktionen gebraucht wird. Außerdem scheinen sie beide für die Infektion gleichermaßen relevant zu sein, da im Gegensatz zu den Antikörpern nur minimale Unterschiede in den neutralisierenden Eigenschaften der beiden Pmp21 Fragmente (G und E) detektiert werden konnten.

5.3.1 Pmp21 ist das erste chlamydiale Adhäsins das auch die Internalisierung vermitteln kann

Mit den Neutralisationsanalysen war keine Differenzierung zwischen einer Inhibition der chlamydialen Bindung und der Aufnahme der Chlamydien und/oder einem negativen Effekt des Antikörpers auf die chlamydiale Entwicklung selbst nach Eintritt in die Wirtszelle möglich.

Um direkt zu überprüfen, ob das Pmp21 Protein für die Adhäsion von *C. pneumoniae* an die humane Zelle verantwortlich ist, wurden HEp-2 Zellen mit rekombinantem Pmp21-N Protein vorinkubiert, bevor CFSE-markierte EBs zugegeben wurden. Die Anwesenheit des rekombinanten Pmp21 führte in konzentrationsabhängiger Weise zu einer bis zu 90%igen Reduktion der EB Bindung (für 200 µg/ml, bzw. ca. 2 nmol rPmp21-N) an Humanzellen (Abbildung 26, Ergebnisse). Daraus kann geschlossen werden, dass das rekombinante Pmp21 Protein die Rezeptor-Bindestellen auf der Humanzelle absättigt und so die Bindung der EBs und die nachfolgende Infektion inhibiert.

Auch für das andere bis dato charakterisierte Adhäsin OmcB konnten durch den Einsatz von rekombinantem Protein inhibitorische Effekte auf die Infektion beobachtet werden. So führte eine Vorbehandlung mit OmcB (200 µg) zu einer Reduktion der EB Bindung um 91% (Moelleken and Hegemann 2008). Auch Antikörper gegen das Invasin von *Yersinia pseudotuberculosis*, welches im Rahmen dieser Arbeit als Kontrolle diente, zeigten eine starke Reduktion der Infektion auf, wobei hier verschiedene Antikörper generiert wurden, welche zur Identifikation des Bindemotivs beitrugen (Leong, Fournier et al. 1990). Das Invasin vermittelt über die Interaktion seines RGD-Motivs mit dem $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-Rezeptor nicht nur die Bindung der Yersinien an Humanzellen, sondern induziert so auch die Ausbildung von Pseudopoden, die das Bakterium umhüllen und aufnehmen (Isberg, Voorhis et al. 1987), (Isberg and Leong 1990), (Dersch and Isberg 1999). Für *Listeria monocytogenes* konnten zwei Proteine einer großen Familie von Oberflächenproteinen, den Internalinen, als Adhäsine und Invasine identifiziert werden (s.o.) (Dramsi, Levi et al. 1998). Im Gegensatz zu Pmp21 verfügt das Homolog PmpD von *C. trachomatis* über ein RGD Motiv (Swanson, Taylor et al. 2009). Bisher wurde allerdings kein Rezeptor ausfindig gemacht und Untersuchungen zu den adhäsiven Eigenschaften stehen noch aus. Aufgrund der Anwesenheit des RGD-Motivs innerhalb der 73 kDa PmpD-Form (p73) wird eine Rolle des PmpD Proteins bei der Wirtszellinteraktion postuliert (analog zum Invasin von *Y. pseudotuberculosis* oder Pertaktin von *B. pertussis*). Für die zweite prozessierte PmpD Form (p30) könnte hingegen eine andere Effektor Funktion in Betracht kommen. Dieses Fragment besitzt eine NLS (nuclear localisation signal) und könnte somit zum Wirtszell-Nukleus gelangen, ähnlich wie das α -Protein der Neisseria IgA Protease (Pohlner, Langenberg et al. 1995). Dennoch gelang bisher kein cytosolischer oder Zellkern-assoziiertes Nachweis eines PmpD-Fragments in der Wirtszelle, genauso wenig wie für Pmp21, was jedoch auf zu geringen Mengen der löslichen Formen beruhen könnte. Aufgrund dieser Befunde wird eine mögliche wichtige Rolle von PmpD für die chlamydiale Infektion immer offensichtlicher.

Das *C. pneumoniae* Pmp21 verfügt über kein RGD Motiv, die adhäsiven Eigenschaften werden hier nachweislich entscheidend über die repetitiven Motive vermittelt (Abs.4.3; Ergebnisse).

Adhäsine können gleichzeitig neben der Adhäsion auch für den Eintritt der Bakterien in die Wirtszelle eine Rolle spielen, wie es für die Internaline von *L. monocytogenes* gezeigt werden konnte. Ob Pmp21 als Invasin fungiert, wurde mit Hilfe des Internalisierungstest untersucht (Abbildung 28, Ergebnisse). Dafür wurden Latexkügelchen mit den unterschiedlichen Pmp21-Domänen beschichtet und ihre Internalisierungseigenschaften detektiert. Die Passagierdomäne von Pmp21 zeigte dabei eine ähnlich starke Internalisierungseffizienz wie die Positivkontrolle Invasin. Aufgrund dieser Ergebnisse kann für Pmp21 neben seiner Funktion als *C. pneumoniae* Adhäsion auch die Funktion als Invasin im chlamydialen Infektionszyklus postuliert werden.

Neben der adhäsiven Funktion der repetitiven Motive scheinen die Motive auch im Internalisierungsprozess eine Rolle zu spielen (Abbildung 29, Ergebnisse). Dabei zeigte die rPmp21-D_{mut3} Mutante eine nur sehr schwache Adhäsion an die Humanzellen und eine um 60% niedriger Internalisierungseffizienz als die wildtypisch internalisierten rPmp21-D-Latexkügelchen. Die Mutante war demnach nur sehr bedingt in der Lage, an den Rezeptor zu binden, und konnte relativ zur wt-Kontrolle nur eine sehr geringe Internalisierung auslösen.

Um erste Hinweise auf den Mechanismus der Internalisierung zu erhalten, wurde die Rolle des Aktin-Zytoskeletts für die Aufnahme der Latexkügelchen untersucht. Dafür wurde der Internalisierungstest in Anwesenheit des Aktin-Polymerisations-Inhibitors Cytochalasin D durchgeführt (Abbildung 31, Abbildung 32). Die ausbleibende Internalisierung der mit rekombinantem Pmp21-N beschichteten Latexkügelchen deutet auf eine Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts hin. Dies unterstützt die Hypothese einer Pmp21-Rezeptor Interaktion, da bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts stattfindet, welche mit der Aufnahme der Bakterien endet (Carabeo, Grieshaber et al. 2002).

Ursprünglich scheinen Autotransporter nicht mit anderen bakteriellen Sekretionssystemen verwandt zu sein, da sie alle nötigen Elemente für ihre Translokation über die Außenmembran in ihrer Sequenz enthalten (Henderson, Navarro-Garcia et al. 1998), (Henderson, Cappello et al. 2000). Aufgrund der Studien der IgA1-Protease (IgAP) von *N. gonorrhoeae* wurde ein Modell der Autotransporter Sekretion entwickelt, wobei der β -barrel einer monomeren C-Domäne einen zentralen hydrophilen Kanal bildet durch den die Passagierdomäne transloziert wird (Klauser, Pohlner et al. 1990), (Klauser, Kramer et al. 1993). Neben den konventionellen monomeren Autotransportern werden auch oligomere Autotransporter beschrieben (Veiga, Sugawara et al. 2002), (Muller, Benz et al. 2005), (Skillman, Barnard et al. 2005). Weitere Studien der IgAP-C-terminalen Domäne von *N. gonorrhoeae* zeigten, dass diese sich in einem Ring-ähnlichen oligomeren Komplex sammelt, dessen zentrale hydrophile Pore einen Durchmesser von 2 nm aufweist (Veiga,

Sugawara et al. 2002). In neueren Untersuchungen konnte das *C. trachomatis* PmpD als ein Oligomer identifiziert werden (Swanson, Taylor et al. 2009). Die Oligomere bestehen dabei aus dem Volllängen-Protein (p155), der prozessierten Passagierdomäne (p73) sowie der Translokationseinheit (p82) und sind aufgrund ihrer Blumen-ähnlichen Struktur und der asymmetrischen Lokalisation auf den EBs den Oberflächen-Projektionen, welche Matsumoto et al. beschrieb, sehr ähnlich (Swanson, Taylor et al. 2009), (Matsumoto 1982).

Mit den Erkenntnissen aus den vorangegangenen *C. trachomatis* PmpD und *C. pneumoniae* Pmp21 Studien sowie den hier erzielten Ergebnissen über die funktionelle Rolle von Pmp21 kann folgendes Modell postuliert werden (Abbildung 35): Die N-terminale Signalsequenz wird nach Überquerung der inneren Membran im Periplasma abgespalten. Die Passagierdomäne von Pmp21 wird durch eine hydrophile Pore in der Außenmembran an die Oberfläche transloziert. Die Pore könnte von einer monomeren C-Domäne gebildet werden, oder Pmp21 könnte einen oligomeren Komplex bilden, ähnlich zu PmpD (Swanson, Taylor et al. 2009). Der Vergleich von Pmp21 mit PmpD zeigt, dass die Passagierdomänen beider Proteine in zwei Proteinformen prozessiert werden (Abbildung 34). Die Prozessierung von Pmp21 könnte stattfinden, während die Chlamydien durch elektrostatische Wechselwirkungen und der OmcB-GAG Interaktion an die Wirtszelle binden. Die GAG vermittelte Bindung wurde für *C. trachomatis* LGV Infektionen von mutierten CHO-Zelllinien als reversibler Schritt beschrieben, welcher von einem irreversiblen Schritt, die Bindung an den potentiellen Rezeptor gefolgt wird, der die Aufnahme vermittelt (Carabeo and Hackstadt 2001). Durch Entfernung der GAGs oder den Einsatz von rekombinantem OmcB oder eines OmcB Antikörpers konnte die Infektion um 90% reduziert werden. Die verbleibenden 10% stützen die Hypothese des zweiten irreversiblen Schritts, die Rezeptor-vermittelte Adhäsion bzw. Internalisierung (Wuppermann, Hegemann et al. 2001), (Moelleken and Hegemann 2008). Pmp21 stellt einen guten Kandidaten für diese Interaktion dar. Beide prozessierten Pmp21-Proteinformen nehmen vermutlich eine spezifische Konformation ein, wodurch die repetitiven Motive GGA (I, L, V) und FxxN mit den spezifischen Wirtszellrezeptoren interagieren können. So verstärken oder stabilisieren sie die Adhäsion der Chlamydien an die Wirtszelle und leiten die Internalisierung ein, wobei sie die metabolische Aktivität der Wirtszelle stimulieren (Niessner, Kaun et al. 2003), (Wehrl, Brinkmann et al. 2004) (Daten nicht gezeigt) (Abbildung 35).

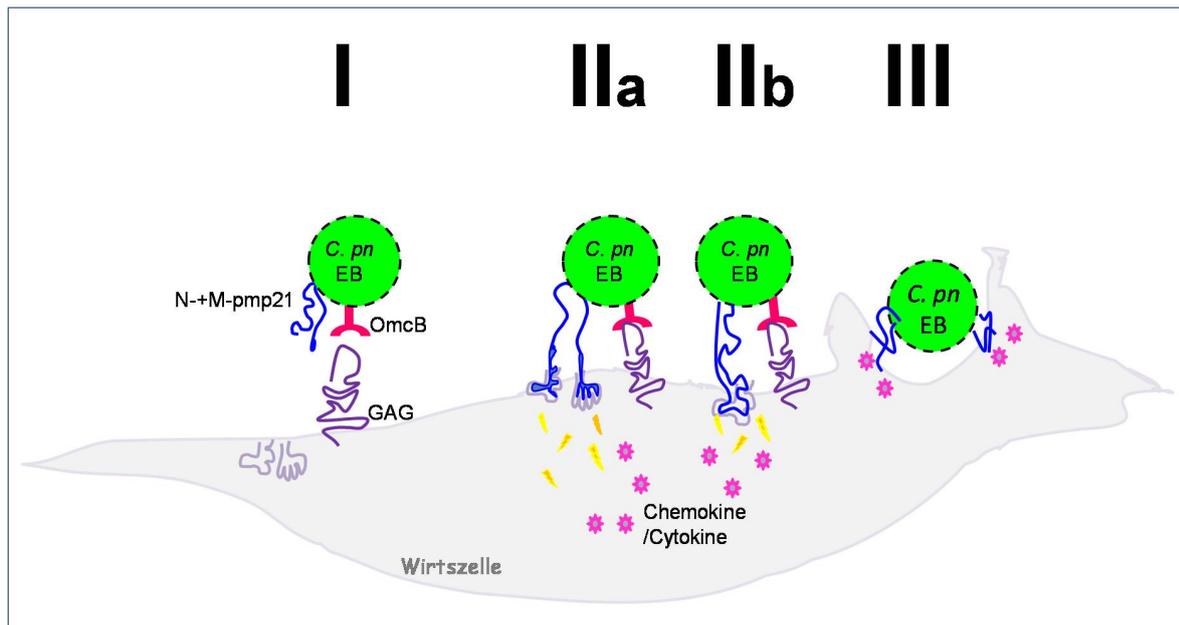


Abbildung 35: Modell der Pmp21 vermittelten Adhäsion und Internalisierung

Schematische Darstellung des durch Pmp21 vermittelten Adhäsions- und Internalisierungsprozesses von *C. pneumoniae*. (I) Die erste Bindung findet durch elektrostatische Wechselwirkungen und der Interaktion von OmcB mit den Glykosaminoglykanen (GAG) statt. (II) Anschließend binden die prozessierten Pmp21-Fragmente (N-pmp21 und M-pmp21) an ihren (ihre) bisher unbekannt(e)n Rezeptor(en) und initiieren die Internalisierung. Darüber hinaus stimulieren sie die Humanzellantwort. (III) Pmp21 vermittelt die Internalisierung der chlamydialen EBs in die Wirtszelle.

Ein derartiges Modell konnte für das Varicella-Zoster Virus (VZV) bereits gezeigt werden. Das VZV bindet mit einem Glykoprotein (gE) an die Wirtszelle über die Interaktion mit dem Heparansulfat Proteoglykan (Lowry, Solem et al. 1992), (Wu and Forghani 1997) (Olson, Bishop et al. 1997). Dadurch wird die Virus-Wirtszellinteraktion stabilisiert, und die nachfolgende Interaktion mit dem Mannose-6-Phosphat/ Insulin-like growth factor-2 Rezeptor (M6P/IGF2R) führt zur Aufnahme des Virus (Zhu, Gershon et al. 1995).

Pmp21 stimuliert die Immunantwort der Wirtszelle, und dies könnte zur Sicherung des chlamydialen Überlebens innerhalb der Inklusion dienen (Niessner, Kaun et al. 2003), (Mygind, Vandahl et al. 2004). Pmp21 erfüllt als Adhäsion und wahrscheinlich als Invasin eine entscheidende Rolle für die Etablierung einer erfolgreichen chlamydialen Infektion. Die inhibierende Wirkung der Antikörper auf die Infektion identifizieren Pmp21 als guten Kandidaten für mögliche Vakzinierungsansätze. Mit dem rekombinanten Protein und mit einem Peptid lässt sich bereits die erste Kontaktaufnahme, die Adhäsion, vereiteln. Genau hier könnte ein Vakzin greifen und frühzeitig die chlamydiale Infektion unterbinden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Agerer, F., S. Lux, et al. (2005). "Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation." J Cell Sci **118**(Pt 10): 2189-200.
- Aitken, ID. Chlamydial abortion. In: Martin WB, Aitken ID, eds. Diseases of Sheep, Chap. 12. Oxford: Blackwell Science, 2000.
- Amer, A. O. and M. S. Swanson (2002). "A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage." Curr Opin Microbiol **5**(1): 56-61.
- Balin, B. J., H. C. Gerard, et al. (1998). "Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain." Med Microbiol Immunol (Berl) **187**(1): 23-42.
- Becker, S., S. Theile, et al. (2005). "A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes." FEBS Lett **579**(5): 1177-82.
- Belland, R. J., G. Zhong, et al. (2003). "Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8478-83.
- Benz, I. and M. A. Schmidt (1992). "AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule." Mol Microbiol **6**(11): 1539-46.
- Bierne, H., C. Sabet, et al. (2007). "Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*." Microbes Infect **9**(10): 1156-66.
- Birkelund, S., H. Johnsen, et al. (1994). "*Chlamydia trachomatis* serovar L2 induces protein tyrosine phosphorylation during uptake by HeLa cells." Infect Immun **62**(11): 4900-8.
- Boder, E. T. and K. D. Wittrup (1997). "Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries." Nat Biotechnol **15**(6): 553-7.
- Boleti, H., A. Benmerah, et al. (1999). "*Chlamydia* infection of epithelial cells expressing dynamin and Eps15 mutants: clathrin-independent entry into cells and dynamin-dependent productive growth." J Cell Sci **112**(Pt 10): 1487-96.
- Boschin-Crinquette, C., A. Kreisler, et al. (2005). "[Can meningoencephalitis be caused by *Chlamydiae pneumoniae*?]." Rev Neurol (Paris) **161**(10): 979-83.
- Boyle, E. C. and B. B. Finlay (2003). "Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 633-9.
- Brade, H., L. Brade, et al. (1987). "Chemical and serological investigations on the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(8): 2508-12.
- Brade, L., S. Schramek, et al. (1986). "Chemical, biological, and immunochemical properties of the *Chlamydia psittaci* lipopolysaccharide." Infect Immun **54**(2): 568-74.
- Branden, C. I., Y. Lindqvist, et al. (1991). "Protein engineering of Rubisco." Acta Crystallogr B **47 (Pt 6)**: 824-35.
- Brown, R. E. (1998). "Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal." J Cell Sci **111 (Pt 1)**: 1-9.
- Brunham, R. C., D. J. Zhang, et al. (2000). "The potential for vaccine development against chlamydial infection and disease." J Infect Dis **181 Suppl 3**: S538-43.
- Bunk, S., I. Susnea, et al. (2008). "Immunoproteomic identification and serological responses to novel *Chlamydia pneumoniae* antigens that are associated with persistent *C. pneumoniae* infections." J Immunol **180**(8): 5490-8.
- Bush, R. M. and K. D. Everett (2001). "Molecular evolution of the Chlamydiaceae." Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 1): 203-20.
- Butcher, B. A., L. A. Sklar, et al. (1992). "Heparin enhances the interaction of infective *Leishmania donovani* promastigotes with mouse peritoneal macrophages. A fluorescence flow cytometric analysis." J Immunol **148**(9): 2879-86.
- Caldwell, H. D. and L. J. Perry (1982). "Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to the major outer membrane protein." Infect Immun **38**(2): 745-54.

- Campbell, L. A., C. C. Kuo, et al. (1990). "Structural and antigenic analysis of Chlamydia pneumoniae." Infect Immun **58**(1): 93-7.
- Carabeo, R. A., C. A. Dooley, et al. (2007). "Rac interacts with Abi-1 and WAVE2 to promote an Arp2/3-dependent actin recruitment during chlamydial invasion." Cell Microbiol **9**(9): 2278-88.
- Carabeo, R. A., S. S. Grieshaber, et al. (2002). "Chlamydia trachomatis induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells." Infect Immun **70**(7): 3793-803.
- Carabeo, R. A., S. S. Grieshaber, et al. (2004). "Requirement for the Rac GTPase in Chlamydia trachomatis invasion of non-phagocytic cells." Traffic **5**(6): 418-25.
- Carabeo, R. A. and T. Hackstadt (2001). "Isolation and characterization of a mutant Chinese hamster ovary cell line that is resistant to Chlamydia trachomatis infection at a novel step in the attachment process." Infect Immun **69**(9): 5899-904.
- Carabeo, R. A., D. J. Mead, et al. (2003). "Golgi-dependent transport of cholesterol to the Chlamydia trachomatis inclusion." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6771-6.
- Chang, C. Y., J. Abdo, et al. (2005). "Development of peptide antagonists for the androgen receptor using combinatorial peptide phage display." Mol Endocrinol **19**(10): 2478-90.
- Chen, J. C. R. and R. S. Stephens (1997). "Chlamydia Trachomatis Glycosaminoglycan Dependent and Independent Attachment to Eukaryotic Cells." Microbial Pathogenesis **22** (1): 23-30.
- Chiswell, D. J. and J. McCafferty (1992). "Phage antibodies: will new 'coliclonal' antibodies replace monoclonal antibodies?" Trends Biotechnol **10**(3): 80-4.
- Christiansen, G., T. Boesen, et al. (1999). "Molecular biology of Chlamydia pneumoniae surface proteins and their role in immunopathogenicity." Am Heart J **138**(5 Pt 2): S491-5.
- Christiansen, G., A. S. Pedersen, et al. (2000). "Potential relevance of Chlamydia pneumoniae surface proteins to an effective vaccine." J Infect Dis **181** Suppl 3: S528-37.
- Clausen, J. D., G. Christiansen, et al. (1997). "Chlamydia trachomatis utilizes the host cell microtubule network during early events of infection." Mol Microbiol **25**(3): 441-9.
- Conant, C. G. and R. S. Stephens (2007). "Chlamydia attachment to mammalian cells requires protein disulfide isomerase." Cell Microbiol **9**(1): 222-32.
- Coombes, B. K., D. L. Johnson, et al. (2002). "Strategic targeting of essential host-pathogen interactions in chlamydial disease." Curr Drug Targets Infect Disord **2**(3): 201-16.
- Cossart, P. and P. J. Sansonetti (2004). "Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens." Science **304**(5668): 242-8.
- Cotter, S. E., N. K. Surana, et al. (2005). "Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins." Trends Microbiol **13**(5): 199-205.
- Crane, D. D., J. H. Carlson, et al. (2006). "Chlamydia trachomatis polymorphic membrane protein D is a species-common pan-neutralizing antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(6): 1894-9.
- Cunningham, A. F. and M. E. Ward (2003). "Characterization of human humoral responses to the major outer membrane protein and OMP2 of Chlamydia pneumoniae." FEMS Microbiol Lett **227**(1): 73-9.
- Danilition, S. L., I. W. Maclean, et al. (1990). "The 75-kilodalton protein of Chlamydia trachomatis: a member of the heat shock protein 70 family?" Infect Immun **58**(1): 189-96.
- Daugaard, L., G. Christiansen, et al. (2001). "Characterization of a hypervariable region in the genome of Chlamydia pneumoniae." FEMS Microbiol Lett **203**(2): 241-8.
- Dautry-Varsat, A., M. E. Balana, et al. (2004). "Chlamydia--host cell interactions: recent advances on bacterial entry and intracellular development." Traffic **5**(8): 561-70.
- Davis, C. H., J. E. Raulston, et al. (2002). "Protein disulfide isomerase, a component of the estrogen receptor complex, is associated with Chlamydia trachomatis serovar E attached to human endometrial epithelial cells." Infect Immun **70**(7): 3413-8.

- Davis, C. H. and P. B. Wyrick (1997). "Differences in the association of *Chlamydia trachomatis* serovar E and serovar L2 with epithelial cells in vitro may reflect biological differences in vivo." *Infect Immun* **65**(7): 2914-24.
- de la Maza, L. M. and E. M. Peterson (2002). "Vaccines for *Chlamydia trachomatis* infections." *Curr Opin Investig Drugs* **3**(7): 980-6.
- Dehio, C., M. C. Prevost, et al. (1995). "Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60c-src-mediated signalling pathway." *Embo J* **14**(11): 2471-82.
- Dersch, P. and R. R. Isberg (1999). "A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association." *Embo J* **18**(5): 1199-213.
- Desvaux, M., N. J. Parham, et al. (2004). "The autotransporter secretion system." *Res Microbiol* **155**(2): 53-60.
- Desvaux, M., N. J. Parham, et al. (2004). "Type V protein secretion: simplicity gone awry?" *Curr Issues Mol Biol* **6**(2): 111-24.
- Dong, F., M. Pirbhai, et al. (2005). "Degradation of the proapoptotic proteins Bik, Puma, and Bim with Bcl-2 domain 3 homology in *Chlamydia trachomatis*-infected cells." *Infect Immun* **73**(3): 1861-4.
- Dong, F., J. Sharma, et al. (2004). "Intramolecular dimerization is required for the chlamydia-secreted protease CPAF to degrade host transcriptional factors." *Infect Immun* **72**(7): 3869-75.
- Dramsi, S., S. Levi, et al. (1998). "Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study." *Infect Immun* **66**(9): 4461-8.
- Dubel, S., F. Breitling, et al. (1993). "A family of vectors for surface display and production of antibodies." *Gene* **128**(1): 97-101.
- Eisenberg, L. G., P. B. Wyrick, et al. (1983). "*Chlamydia psittaci* elementary body envelopes: ingestion and inhibition of phagolysosome fusion." *Infect Immun* **40**(2): 741-51.
- Emsley, P., I. G. Charles, et al. (1996). "Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin." *Nature* **381**(6577): 90-2.
- Everest, P., J. Li, et al. (1996). "Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells." *Microbiology* **142** (Pt 11): 3261-8.
- Everett, K. D., R. M. Bush, et al. (1999). "Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms." *Int J Syst Bacteriol* **49** Pt 2: 415-40.
- Everett, K. D. and T. P. Hatch (1995). "Architecture of the cell envelope of *Chlamydia psittaci* 6BC." *J Bacteriol* **177**(4): 877-82.
- Fadel, S. and A. Eley (2007). "*Chlamydia trachomatis* OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin." *J Med Microbiol* **56**(Pt 1): 15-22.
- Fan, P., F. Dong, et al. (2002). "*Chlamydia pneumoniae* secretion of a protease-like activity factor for degrading host cell transcription factors required for [correction of factors is required for] major histocompatibility complex antigen expression." *Infect Immun* **70**(1): 345-9.
- Fawaz, F. S., C. van Ooij, et al. (1997). "Infection with *Chlamydia trachomatis* alters the tyrosine phosphorylation and/or localization of several host cell proteins including cortactin." *Infect Immun* **65**(12): 5301-8.
- Fields, K. A. and T. Hackstadt (2002). "The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway." *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 221-45.
- Filloux, A., A. Hachani, et al. (2008). "The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes." *Microbiology* **154**(Pt 6): 1570-83.
- Fink, D. L., B. A. Green, et al. (2002). "The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV." *Infect Immun* **70**(9): 4902-7.

- Francisco, J. A. and G. Georgiou (1994). "The expression of recombinant proteins on the external surface of Escherichia coli. Biotechnological applications." Ann N Y Acad Sci **745**: 372-82.
- Francisco, J. A., C. Stathopoulos, et al. (1993). "Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact Escherichia coli expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains." Biotechnology (N Y) **11**(4): 491-5.
- Freissler, E., A. Meyer auf der Heyde, et al. (2000). "Syndecan-1 and syndecan-4 can mediate the invasion of OpaHSPG-expressing Neisseria gonorrhoeae into epithelial cells." Cell Microbiol **2**(1): 69-82.
- Fryden, A., E. Kihlstrom, et al. (1989). "A clinical and epidemiological study of "ornithosis" caused by Chlamydia psittaci and Chlamydia pneumoniae (strain TWAR)." Scand J Infect Dis **21**(6): 681-91.
- Fujita, Y., J. Ito, et al. (2004). "Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme." Appl Environ Microbiol **70**(2): 1207-12.
- Gao, Z., T. Harumi, et al. (1997). "Chromosome localization of the mouse zonadhesin gene and the human zonadhesin gene (ZAN)." Genomics **41**(1): 119-22.
- Georgoudis, E. (2004). Identifizierung und Charakterisierung von Adhäsionsproteinen aus Chlamydia pneumoniae. Institut für Mikrobiologie. Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität.
- Gietz, R. D., R. H. Schiestl, et al. (1995). "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure." Yeast **11**(4): 355-60.
- Gomes, J. P., W. J. Bruno, et al. (2004). "Recombination in the genome of Chlamydia trachomatis involving the polymorphic membrane protein C gene relative to ompA and evidence for horizontal gene transfer." J Bacteriol **186**(13): 4295-306.
- Gomes, J. P., R. C. Hsia, et al. (2005). "Immunoreactivity and differential developmental expression of known and putative Chlamydia trachomatis membrane proteins for biologically variant serovars representing distinct disease groups." Microbes Infect **7**(3): 410-20.
- Gomes, J. P., A. Nunes, et al. (2006). "Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of Chlamydia trachomatis across all serovars: evidence for serovar Da recombination and correlation with tissue tropism." J Bacteriol **188**(1): 275-86.
- Grayston, J. T. (1989). "Chlamydia pneumoniae, strain TWAR." Chest **95**(3): 664-9.
- Grayston, J. T. (1993). "Chlamydia in atherosclerosis [editorial; comment]." Circulation **87**(4): 1408-9.
- Grimwood, J., L. Olinger, et al. (2001). "Expression of Chlamydia pneumoniae polymorphic membrane protein family genes." Infect Immun **69**(4): 2383-9.
- Grimwood, J. and R. S. Stephens (1999). "Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of Chlamydia trachomatis and Chlamydia pneumoniae." Microb Comp Genomics **4**(3): 187-201.
- Guiney, D. G. and M. Lesnick (2005). "Targeting of the actin cytoskeleton during infection by Salmonella strains." Clin Immunol **114**(3): 248-55.
- Guldener, U., G. J. Koehler, et al. (2004). "Characterization of the Saccharomyces cerevisiae Fol1 protein: starvation for C1 carrier induces pseudohyphal growth." Mol Biol Cell **15**(8): 3811-28.
- Hackstadt, t. (1999). Cell Biology. Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. R. S. Stephens. Washington, D.C., ASM Press: 101-38.
- Hackstadt, T., W. J. Todd, et al. (1985). "Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae?" J Bacteriol **161**(1): 25-31.
- Hadley, K. M., D. Carrington, et al. (1992). "Ovine chlamydiosis in an abattoir worker." J Infect **25 Suppl 1**: 105-9.
- Hahn, D. L. (2002). "Chlamydia pneumoniae and the "Dutch Hypothesis"." Chest **122**(5): 1510-2.
- Haidl, S., S. Ivarsson, et al. (1992). "Guillain-Barre syndrome after Chlamydia pneumoniae infection [letter]." N Engl J Med **326**(8): 576-7.

- Hardy, D. M. and D. L. Garbers (1994). "Species-specific binding of sperm proteins to the extracellular matrix (zona pellucida) of the egg." J Biol Chem **269**(29): 19000-4.
- Hatch, T. P. (1999). Developmental Biology. Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. R. S. Stephens. Washington, D.C., ASM Press: 26-67.
- Heine, H., S. Muller-Loennies, et al. (2003). "Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from *Chlamydia trachomatis* serotypes E and L2 and *Chlamydophila psittaci* 6BC." Eur J Biochem **270**(3): 440-50.
- Henderson, I. R., R. Cappello, et al. (2000). "Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion." Trends Microbiol **8**(12): 529-32.
- Henderson, I. R. and A. C. Lam (2001). "Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp.-- autotransporters beyond the Proteobacteria." Trends Microbiol **9**(12): 573-8.
- Henderson, I. R., M. Meehan, et al. (1997). "Antigen 43, a phase-variable bipartite outer membrane protein, determines colony morphology and autoaggregation in *Escherichia coli* K-12." FEMS Microbiol Lett **149**(1): 115-20.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, et al. (1998). "The great escape: structure and function of the autotransporter proteins." Trends Microbiol **6**(9): 370-8.
- Hendrixson, D. R. and J. W. St Geme, 3rd (1998). "The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein." Mol Cell **2**(6): 841-50.
- Horn, M., T. R. Fritsche, et al. (1999). "Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*." Environ Microbiol **1**(4): 357-67.
- Hybiske, K. and R. S. Stephens (2007). "Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(27): 11430-5.
- Igietseme, J. U., C. M. Black, et al. (2002). "Chlamydia vaccines: strategies and status." BioDrugs **16**(1): 19-35.
- Isberg, R. R. and J. M. Leong (1990). "Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells." Cell **60**(5): 861-71.
- Isberg, R. R., D. L. Voorhis, et al. (1987). "Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells." Cell **50**(5): 769-78.
- Jantos, C. A., S. Heck, et al. (1997). "Antigenic and molecular analyses of different *Chlamydia pneumoniae* strains." J. Clin. Microbiol. **35**: 620-623.
- Jewett, T. J., E. R. Fischer, et al. (2006). "Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(42): 15599-604.
- Jose, J. and S. Handel (2003). "Monitoring the cellular surface display of recombinant proteins by cysteine labeling and flow cytometry." Chembiochem **4**(5): 396-405.
- Jutras, I., L. Abrami, et al. (2003). "Entry of the lymphogranuloma venereum strain of *Chlamydia trachomatis* into host cells involves cholesterol-rich membrane domains." Infect Immun **71**(1): 260-6.
- Juul, N., E. Timmerman, et al. (2007). "Proteolytic cleavage of the *Chlamydia pneumoniae* major outer membrane protein in the absence of Pmp10." Proteomics **7**(24): 4477-87.
- Kalman, S., W. Mitchell, et al. (1999). "Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*." Nat Genet **21**(4): 385-9.
- Kaltenboeck, B., K. G. Kousoulas, et al. (1993). "Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (ompA) genes of the four chlamydial species." J Bacteriol **175**(2): 487-502.
- Kawa, D. E. and R. S. Stephens (2002). "Antigenic topology of chlamydial PorB protein and identification of targets for immune neutralization of infectivity." J Immunol **168**(10): 5184-91.
- Kieke, M. C., B. K. Cho, et al. (1997). "Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display." Protein Eng **10**(11): 1303-10.
- Kiselev, A. O., W. E. Stamm, et al. (2007). "Expression, processing, and localization of PmpD of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 during the chlamydial developmental cycle." PLoS ONE **2**(6): e568.

- Klauser, T., J. Kramer, et al. (1993). "Characterization of the Neisseria Iga beta-core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion." J Mol Biol **234**(3): 579-93.
- Klauser, T., J. Pohlner, et al. (1990). "Extracellular transport of cholera toxin B subunit using Neisseria IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation." Embo J **9**(6): 1991-9.
- Kleemola, M., P. Saikku, et al. (1988). "Epidemics of pneumonia caused by TWAR, a new Chlamydia organism, in military trainees in Finland." J Infect Dis **157**(2): 230-6.
- Klein, M., A. Kotz, et al. (2003). "Detection of Chlamydia pneumoniae-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the major outer membrane protein." J Clin Microbiol **41**(5): 1957-62.
- Klemm, P. and L. Hedegaard (1990). "Fimbriae of Escherichia coli as carriers of heterologous antigenic sequences." Res Microbiol **141**(7-8): 1013-7.
- Klemm, P., L. Hjerrild, et al. (2004). "Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from Escherichia coli." Mol Microbiol **51**(1): 283-96.
- Knudsen, K., A. S. Madsen, et al. (1999). "Identification of two novel genes encoding 97- to 99-kilodalton outer membrane proteins of Chlamydia pneumoniae." Infect Immun **67**(1): 375-83.
- Kondo, A., H. Shigechi, et al. (2002). "High-level ethanol production from starch by a flocculent Saccharomyces cerevisiae strain displaying cell-surface glucoamylase." Appl Microbiol Biotechnol **58**(3): 291-6.
- Krüll, M., A. C. Klucken, et al. (1999). "Signal Transduction Pathways Activated in Endothelial Cells Following Infection with Chlamydia pneumoniae." J Immunol **162**(8): 4834-4841.
- Kubo, A. and R. S. Stephens (2000). "Characterization and functional analysis of PorB, a Chlamydia porin and neutralizing target." Mol Microbiol **38**(4): 772-80.
- Kuo, C., S. Wang, et al. (1972). "Differentiation of TRIC and LGV organisms based on enhancement of infectivity by DEAE-dextran in cell culture." J Infect Dis **125**(3): 313-7.
- Kuo, C. C. and J. T. Grayston (1988). "Factors affecting viability and growth in HeLa 229 cells of Chlamydia sp. strain TWAR." J Clin Microbiol **26**(5): 812-5.
- Kuo, C. C., J. T. Grayston, et al. (1995). "Chlamydia pneumoniae (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old)." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 6911-4.
- Kuo, C. C. and T. Grayston (1976). "Interaction of Chlamydia trachomatis organisms and HeLa 229 cells." Infect Immun **13**(4): 1103-9.
- Kuo, C. C., A. Lee, et al. (2004). "Cleavage of the N-linked oligosaccharide from the surfaces of Chlamydia species affects attachment and infectivity of the organisms in human epithelial and endothelial cells." Infect Immun **72**(11): 6699-701.
- Kuo, C. C., M. Puolakkainen, et al. (2002). "Mannose-receptor positive and negative mouse macrophages differ in their susceptibility to infection by Chlamydia species." Microb Pathog **32**(1): 43-8.
- Kuo, C. C., N. Takahashi, et al. (1996). "An N Linked High Mannose Type Oligosaccharide, Expressed At the Major Outer Membrane Protein of Chlamydia Trachomatis, Mediates Attachment and Infectivity of the Microorganism to Hela Cells." Journal of Clinical Investigation **98** (12): 2813-2818.
- Kuo, C. C., S. P. Wang, et al. (1973). "Effect of polycations, polyanions and neuraminidase on the infectivity of trachoma-inclusion conjunctivitis and lymphogranuloma venereum organisms HeLa cells: sialic acid residues as possible receptors for trachoma-inclusion conjunction." Infect Immun **8**(1): 74-9.
- Lafont, F., L. Abrami, et al. (2004). "Bacterial subversion of lipid rafts." Curr Opin Microbiol **7**(1): 4-10.
- Lane, B. J., C. Mutchler, et al. (2008). "Chlamydial entry involves TARP binding of guanine nucleotide exchange factors." PLoS Pathog **4**(3): e1000014.
- Lang, H., M. Maki, et al. (2000). "Characterization of adhesive epitopes with the OmpS display system." Eur J Biochem **267**(1): 163-70.

- Layh-Schmitt, G., C. Bendl, et al. (2000). "Evidence for infection with *Chlamydia pneumoniae* in a subgroup of patients with multiple sclerosis." Ann Neurol **47**(5): 652-5.
- Lecuit, M., H. Ohayon, et al. (1997). "Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization." Infect Immun **65**(12): 5309-19.
- Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, et al. (2001). "A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier." Science **292**(5522): 1722-5.
- Leininger, E., M. Roberts, et al. (1991). "Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(2): 345-9.
- Leong, J. M., R. S. Fournier, et al. (1990). "Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein." Embo J **9**(6): 1979-89.
- Li, H. and D. H. Walker (1998). "rOmpA is a critical protein for the adhesion of *Rickettsia rickettsii* to host cells." Microb Pathog **24**(5): 289-98.
- Li, Y., J. Kilpatrick, et al. (2000). "Sheep monoclonal antibody fragments generated using a phage display system." J Immunol Methods **236**(1-2): 133-46.
- Lin, T. M., L. A. Campbell, et al. (2000). "Monocyte-endothelial cell coculture enhances infection of endothelial cells with *Chlamydia pneumoniae*." J Infect Dis **181**(3): 1096-100.
- Lin, T. M., L. A. Campbell, et al. (2001). "Human monocyte-derived insulin-like growth factor-2 enhances the infection of human arterial endothelial cells by *Chlamydia pneumoniae*." J Infect Dis **183**(9): 1368-72.
- Linden, S. K., H. Bierne, et al. (2008). "*Listeria monocytogenes* internalins bind to the human intestinal mucin MUC2." Arch Microbiol **190**(1): 101-4.
- Lindquist, E.A., and Stephens, R.S. (1998). Transcriptional activity of a sequence variable protein family in *C. trachomatis*. In Proceedings of the Ninth International Symposium on Human Chlamydial Infection. R.S. Stephens et al., eds. (International Chlamydial Symposium, San Francisco), pp 259-262.
- Lodge, R. and A. Descoteaux (2005). "Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*." Clin Immunol **114**(3): 256-65.
- Longbottom, D., M. Russell, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of the genes coding for the highly immunogenic cluster of 90-kilodalton envelope proteins from the *Chlamydia psittaci* subtype that causes abortion in sheep." Infect Immun **66**(4): 1317-24.
- Longbottom, D., M. Russell, et al. (1996). "Identification of a multigene family coding for the 90 kDa proteins of the ovine abortion subtype of *Chlamydia psittaci*." FEMS Microbiol Lett **142**(2-3): 277-81.
- Lowry, P. W., S. Solem, et al. (1992). "Immunity in strain 2 guinea-pigs inoculated with vaccinia virus recombinants expressing varicella-zoster virus glycoproteins I, IV, V or the protein product of the immediate early gene 62." J Gen Virol **73** (Pt 4): 811-9.
- Maass, M. and J. Gieffers (1997). "Cardiovascular disease risk from prior *Chlamydia pneumoniae* infection can be related to certain antigens recognized in the immunoblot profile." J Infect **35**(2): 171-6.
- Mamelak, D., M. Mylvaganam, et al. (2001). "Hsp70s contain a specific sulfogalactolipid binding site. Differential aglycone influence on sulfogalactosyl ceramide binding by recombinant prokaryotic and eukaryotic hsp70 family members." Biochemistry **40**(12): 3572-82.
- Marani, P., S. Wagner, et al. (2006). "New *Escherichia coli* outer membrane proteins identified through prediction and experimental verification." Protein Sci **15**(4): 884-9.
- Marino, M., L. Braun, et al. (1999). "Structure of the InlB leucine-rich repeats, a domain that triggers host cell invasion by the bacterial pathogen *L. monocytogenes*." Mol Cell **4**(6): 1063-72.
- Matsumoto, A. (1982). "Surface projections of *Chlamydia psittaci* elementary bodies as revealed by freeze-deep-etching." J Bacteriol **151**(2): 1040-2.

- Matsumoto, T., H. Fukuda, et al. (2002). "Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain." *Appl Environ Microbiol* **68**(9): 4517-22.
- Maurer, J., J. Jose, et al. (1997). "Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **179**(3): 794-804.
- McCafferty, J., A. D. Griffiths, et al. (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." *Nature* **348**(6301): 552-4.
- McClarty, G. (1994). "Chlamydiae and the biochemistry of intracellular parasitism." *Trends Microbiol* **2**(5): 157-64.
- Mengaud, J., M. Lecuit, et al. (1996). "Antibodies to the leucine-rich repeat region of internalin block entry of *Listeria monocytogenes* into cells expressing E-cadherin." *Infect Immun* **64**(12): 5430-3.
- Miao, E. A., M. Brittnacher, et al. (2003). "Salmonella effectors translocated across the vacuolar membrane interact with the actin cytoskeleton." *Mol Microbiol* **48**(2): 401-15.
- Miyashita, N., Y. Kanamoto, et al. (1993). "The morphology of *Chlamydia pneumoniae*." *J Med Microbiol* **38**(6): 418-25.
- Moelleken, K. and J. H. Hegemann (2008). "The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding." *Mol Microbiol* **67**(2): 403-19.
- Montigiani, S., F. Falugi, et al. (2002). "Genomic approach for analysis of surface proteins in *Chlamydia pneumoniae*." *Infect Immun* **70**(1): 368-79.
- Moulder, J. W. (1991). "Interaction of chlamydiae and host cells in vitro." *Microbiol Rev* **55**(1): 143-90.
- Muller, D., I. Benz, et al. (2005). "Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface." *Infect Immun* **73**(7): 3851-9.
- Mygind, P., G. Christiansen, et al. (1998). "Topological analysis of *Chlamydia trachomatis* L2 outer membrane protein 2." *J Bacteriol* **180**(21): 5784-7.
- Mygind, T., B. Vandahl, et al. (2004). "Identification of an in vivo CD4+ T cell-mediated response to polymorphic membrane proteins of *Chlamydia pneumoniae* during experimental infection." *FEMS Immunol Med Microbiol* **40**(2): 129-37.
- Newton, S. M., M. Kotb, et al. (1991). "Expression and immunogenicity of a streptococcal M protein epitope inserted in *Salmonella* flagellin." *Infect Immun* **59**(6): 2158-65.
- Niemann, H. H., W. D. Schubert, et al. (2004). "Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view." *Microbes Infect* **6**(1): 101-12.
- Niessner, A., C. Kaun, et al. (2003). "Polymorphic membrane protein (PMP) 20 and PMP 21 of *Chlamydia pneumoniae* induce proinflammatory mediators in human endothelial cells in vitro by activation of the nuclear factor-kappaB pathway." *J Infect Dis* **188**(1): 108-13.
- Norton, R., S. Schepetiuk, et al. (1995). "*Chlamydia pneumoniae* pneumonia with endocarditis." *Lancet* **345**(8961): 1376-7.
- Nunes, A., J. P. Gomes, et al. (2007). "Comparative expression profiling of the *Chlamydia trachomatis* pmp gene family for clinical and reference strains." *PLoS ONE* **2**(9): e878.
- Olson, J. K., G. A. Bishop, et al. (1997). "Varicella-zoster virus Fc receptor gE glycoprotein: serine/threonine and tyrosine phosphorylation of monomeric and dimeric forms." *J Virol* **71**(1): 110-9.
- Pal, S., J. Bravo, et al. (2008). "Protection of wild-type and severe combined immunodeficiency mice against an intranasal challenge by passive immunization with monoclonal antibodies to the *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis major outer membrane protein." *Infect Immun* **76**(12): 5581-7.
- Pal, S., E. M. Peterson, et al. (2005). "Vaccination with the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein can elicit an immune response as protective as that resulting from inoculation with live bacteria." *Infect Immun* **73**(12): 8153-60.

- Parida, S. K., E. Domann, et al. (1998). "Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells." Mol Microbiol **28**(1): 81-93.
- Pedersen, A. S., G. Christiansen, et al. (2001). "Differential expression of Pmp10 in cell culture infected with *Chlamydia pneumoniae* CWL029." FEMS Microbiol Lett **203**(2): 153-9.
- Peeling, R. W. and R. C. Brunham (1996). "Chlamydiae as pathogens: new species and new issues." Emerg Infect Dis **2**(4): 307-19.
- Petersen, E., J. Boman, et al. (1998). "Chlamydia pneumoniae in human abdominal aortic aneurysms." Eur J Vasc Endovasc Surg **15**(2): 138-42.
- Pohlner, J., R. Halter, et al. (1987). "Neisseria gonorrhoeae IgA protease. Secretion and implications for pathogenesis." Antonie Van Leeuwenhoek **53**(6): 479-84.
- Pohlner, J., U. Langenberg, et al. (1995). "Uptake and nuclear transport of Neisseria IgA1 protease-associated alpha-proteins in human cells." Mol Microbiol **17**(6): 1073-83.
- Portig, I., J. C. Goodall, et al. (2003). "Characterization of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2 in chlamydial infection." Clin Diagn Lab Immunol **10**(1): 103-7.
- Puolakkainen, M., C. C. Kuo, et al. (2005). "Chlamydia pneumoniae uses the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor for infection of endothelial cells." Infect Immun **73**(8): 4620-5.
- Rajalingam, K., H. Al-Younes, et al. (2001). "Epithelial cells infected with Chlamydia pneumoniae (*Chlamydia pneumoniae*) are resistant to apoptosis." Infect Immun **69**(12): 7880-8.
- Rasmussen-Lathrop, S. J., K. Koshiyama, et al. (2000). "Chlamydia-dependent biosynthesis of a heparan sulphate-like compound in eukaryotic cells." Cell Microbiol **2**(2): 137-44.
- Raulston, J. E. (1995). "Chlamydial envelope components and pathogen-host cell interactions." Mol Microbiol **15**(4): 607-16.
- Raulston, J. E., C. H. Davis, et al. (2002). "Surface accessibility of the 70-kilodalton Chlamydia trachomatis heat shock protein following reduction of outer membrane protein disulfide bonds." Infect Immun **70**(2): 535-43.
- Raulston, J. E., C. H. Davis, et al. (1993). "Molecular characterization and outer membrane association of a Chlamydia trachomatis protein related to the hsp70 family of proteins." J Biol Chem **268**(31): 23139-47.
- Read, T. D., R. C. Brunham, et al. (2000). "Genome sequences of Chlamydia trachomatis MoPn and Chlamydia pneumoniae AR39." Nucleic Acids Res **28**(6): 1397-406.
- Remaut, H. and G. Waksman (2004). "Structural biology of bacterial pathogenesis." Curr Opin Struct Biol **14**(2): 161-70.
- Salmond, G. P. and P. J. Reeves (1993). "Membrane traffic wardens and protein secretion in gram-negative bacteria." Trends Biochem Sci **18**(1): 7-12.
- Sambrook, J., T. Maniatis, et al. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor laboratory.
- Samuelson, P., M. Hansson, et al. (1995). "Cell surface display of recombinant proteins on *Staphylococcus carnosus*." J Bacteriol **177**(6): 1470-6.
- Sanders, C., and Schneider, R. (1991). Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins* **9**, 56-58.
- Schachter, J. (1988). "The prevention of blindness from trachoma." Int Ophthalmol **12**(1): 3-4.
- Schachter, J. (1999). Infection and Disease Epidemiology. Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. R. S. Stephens. Washington, D.C., ASM Press: 139-69.
- Schachter, J. (2001). "NAATs to diagnose Chlamydia trachomatis genital infection: a promise still unfulfilled." Expert Rev Mol Diagn **1**(2): 137-44.
- Schachter, J. and H. D. Caldwell (1980). "Chlamydiae." Annu Rev Microbiol **34**: 285-309.
- Schnitger, K., F. Njau, et al. (2007). "Staining of Chlamydia trachomatis elementary bodies: a suitable method for identifying infected human monocytes by flow cytometry." J Microbiol Methods **69**(1): 116-21.

- Schubert, W. D., C. Urbanke, et al. (2002). "Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin." Cell **111**(6): 825-36.
- Scidmore, M. A., E. R. Fischer, et al. (2003). "Restricted fusion of *Chlamydia trachomatis* vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection." Infect Immun **71**(2): 973-84.
- Shaw, E. I., C. A. Dooley, et al. (2000). "Three temporal classes of gene expression during the *Chlamydia trachomatis* developmental cycle." Mol Microbiol **37**(4): 913-25.
- Shen, Z. M., L. Wang, et al. (2001). "Delineation of functional regions within the subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion molecule a-agglutinin." J Biol Chem **276**(19): 15768-75.
- Shirai, M., H. Hirakawa, et al. (2000). "Comparison of whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* J138 from Japan and CWL029 from USA." Nucleic Acids Res **28**(12): 2311-4.
- Shirai, M., H. Hirakawa, et al. (2000). "Comparison of outer membrane protein genes omp and pmp in the whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* isolates from Japan and the United States." J Infect Dis **181** Suppl 3: S524-7.
- Shor, A., C. C. Kuo, et al. (1992). "Detection of *Chlamydia pneumoniae* in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques." S Afr Med J **82**(3): 158-61.
- Shusta, E. V., P. D. Holler, et al. (2000). "Directed evolution of a stable scaffold for T-cell receptor engineering." Nat Biotechnol **18**(7): 754-9.
- Skillman, K. M., T. J. Barnard, et al. (2005). "Efficient secretion of a folded protein domain by a monomeric bacterial autotransporter." Mol Microbiol **58**(4): 945-58.
- Souriau, A., J. Salinas, et al. (1994). "Identification of subspecies- and serotype 1-specific epitopes on the 80- to 90-kilodalton protein region of *Chlamydia psittaci* that may be useful for diagnosis of chlamydial induced abortion." Am J Vet Res **55**(4): 510-4.
- Sriram, S., C. W. Stratton, et al. (1999). "*Chlamydia pneumoniae* infection of the central nervous system in multiple sclerosis." Ann Neurol **46**(1): 6-14.
- Srivastava, P., R. Gupta, et al. (2008). "Serovar-specific immune responses to peptides of variable regions of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein in serovar D-infected women." Clin Exp Med **8**(4): 207-15.
- Stenner-Liewen, F., H. Liewen, et al. (2002). "CADD, a *Chlamydia* protein that interacts with death receptors." J Biol Chem **277**(12): 9633-6.
- Stephens, R. S., F. S. Fawaz, et al. (2000). "Eukaryotic cell uptake of heparin-coated microspheres: a model of host cell invasion by *Chlamydia trachomatis*." Infect Immun **68**(3): 1080-5.
- Stephens, R. S., S. Kalman, et al. (1998). "Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *chlamydia trachomatis*." Science **282**(5389): 754-9.
- Stephens, R. S., K. Koshiyama, et al. (2001). "Heparin-binding outer membrane protein of *chlamydiae*." Mol Microbiol **40**(3): 691-9.
- Stephens, R. S., R. Sanchez Pescador, et al. (1987). "Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes." J Bacteriol **169**(9): 3879-85.
- Sternberg, N. and R. H. Hoess (1995). "Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1609-13.
- Stothard, D. R., G. A. Toth, et al. (2003). "Polymorphic membrane protein H has evolved in parallel with the three disease-causing groups of *Chlamydia trachomatis*." Infect Immun **71**(3): 1200-8.
- Stuart, E. S., W. C. Webley, et al. (2003). "Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by *Chlamydiae* into host cells." Exp Cell Res **287**(1): 67-78.
- Su, H., L. Raymond, et al. (1996). "A Recombinant *Chlamydia Trachomatis* Major Outer Membrane Protein Binds to Heparan Sulfate Receptors On Epithelial Cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93** (20): 11143-11148.
- Su, H., N. G. Watkins, et al. (1990). "*Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin." Infect Immun **58**(4): 1017-25.

- Subtil, A. and A. Dautry-Varsat (2004). "Chlamydia: five years A.G. (after genome)." Curr Opin Microbiol **7**(1): 85-92.
- Sun, G., S. Pal, et al. (2007). "Structural and functional analyses of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis." J Bacteriol **189**(17): 6222-35.
- Sundelof, B., H. Gnarpe, et al. (1993). "An unusual manifestation of Chlamydia pneumoniae infection: meningitis, hepatitis, iritis and atypical erythema nodosum." Scand J Infect Dis **25**(2): 259-61.
- Suss-Toby, E., J. Zimmerberg, et al. (1996). "Toxoplasma invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8413-8.
- Swanson, A. F. and C. C. Kuo (1994). "Binding of the glycan of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis to HeLa cells." Infect Immun **62**(1): 24-8.
- Swanson, K. A., D. D. Crane, et al. (2007). "Chlamydia trachomatis species-specific induction of ezrin tyrosine phosphorylation functions in pathogen entry." Infect Immun **75**(12): 5669-77.
- Swanson, K. A., L. D. Taylor, et al. (2009). "Chlamydia trachomatis polymorphic membrane protein D is an oligomeric autotransporter with a higher-order structure." Infect Immun **77**(1): 508-16.
- Taraktchoglou, M., A. A. Pacey, et al. (2001). "Infectivity of Chlamydia trachomatis serovar LGV but not E is dependent on host cell heparan sulfate." Infect Immun **69**(2): 968-76.
- Taraska, T., D. M. Ward, et al. (1996). "The late chlamydial inclusion membrane is not derived from the endocytic pathway and is relatively deficient in host proteins." Infect Immun **64**(9): 3713-27.
- Ting, L. M., R. C. Hsia, et al. (1995). "Interaction of outer envelope proteins of Chlamydia psittaci GPIC with the HeLa cell surface." Infect Immun **63**(9): 3600-8.
- Todd, W. J. and H. D. Caldwell (1985). "The interaction of Chlamydia trachomatis with host cells: ultrastructural studies of the mechanism of release of a biovar II strain from HeLa 229 cells." J Infect Dis **151**(6): 1037-44.
- Ueda, M. and A. Tanaka (2000). "Cell surface engineering of yeast: construction of arming yeast with biocatalyst." J Biosci Bioeng **90**(2): 125-36.
- Vandahl, B. B., S. Birkelund, et al. (2004). "Genome and proteome analysis of Chlamydia." Proteomics **4**(10): 2831-42.
- Vandahl, B. B., A. S. Pedersen, et al. (2002). "The expression, processing and localization of polymorphic membrane proteins in Chlamydia pneumoniae strain CWL029." BMC Microbiol **2**(1): 36.
- Veiga, E., E. Sugawara, et al. (2002). "Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains." Embo J **21**(9): 2122-31.
- Verbeke, P., L. Welter-Stahl, et al. (2006). "Recruitment of BAD by the Chlamydia trachomatis vacuole correlates with host-cell survival." PLoS Pathog **2**(5): e45.
- Wadle, A., A. Mischo, et al. (2005). "Serological identification of breast cancer-related antigens from a Saccharomyces cerevisiae surface display library." Int J Cancer **117**(1): 104-13.
- Wagels, G., S. Rasmussen, et al. (1994). "Comparison of Chlamydia pneumoniae isolates by western blot (immunoblot) analysis and DNA sequencing of the omp 2 gene." J Clin Microbiol **32**(11): 2820-3.
- Wang, S. P. and J. T. Grayston (1990). Population prevalence antibody to *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR. Chlamydial infections. Proceedings of the Seventh International Symposium on Human Chlamydial Infections. H. D. C. W. R. Bowie, R. P. Jones, P.-A. Mardh, G. L. Ridgway, J. Schachter, W. E. Stamm, M. E. Ward. Cambridge, Cambridge University press: 402-405.
- Watson, M. W., P. R. Lambden, et al. (1994). "Immunoreactivity of the 60 kDa cysteine-rich proteins of Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci and Chlamydia pneumoniae expressed in Escherichia coli." Microbiology **140**(Pt 8): 2003-11.

- Wehrl, W., V. Brinkmann, et al. (2004). "From the inside out--processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells." Mol Microbiol **51**(2): 319-34.
- Wesslen, L., C. Pahlson, et al. (1992). "Myocarditis caused by Chlamydia pneumoniae (TWAR) and sudden unexpected death in a Swedish elite orienteer [letter]." Lancet **340**(8816): 427-8.
- Whitcher, J. P., M. Srinivasan, et al. (2001). "Corneal blindness: a global perspective." Bull World Health Organ **79**(3): 214-21.
- Wolf, K., E. Fischer, et al. (2000). "Ultrastructural analysis of developmental events in Chlamydia pneumoniae-infected cells." Infect Immun **68**(4): 2379-85.
- Wolf, K. and T. Hackstadt (2001). "Sphingomyelin trafficking in Chlamydia pneumoniae-infected cells." Cell Microbiol **3**(3): 145-52.
- Wu, L. and B. Forghani (1997). "Characterization of neutralizing domains on varicella-zoster virus glycoprotein E defined by monoclonal antibodies." Arch Virol **142**(2): 349-62.
- Wuppermann, F. N., J. H. Hegemann, et al. (2001). "Heparan Sulfate-like Glycosaminoglycan Is a Cellular Receptor for Chlamydia pneumoniae." J Infect Dis **184**(2): 181-7.
- Wyllie, S., R. H. Ashley, et al. (1998). "The major outer membrane protein of Chlamydia psittaci functions as a porin-like ion channel." Infect Immun **66**(11): 5202-7.
- Wyllie, S., D. Longbottom, et al. (1999). "Single channel analysis of recombinant major outer membrane protein porins from Chlamydia psittaci and Chlamydia pneumoniae." FEBS Lett **445**(1): 192-6.
- Wyrick, P. B., J. Choong, et al. (1989). "Entry of genital Chlamydia trachomatis into polarized human epithelial cells." Infect Immun **57**(8): 2378-89.
- Zhang, J. P. and R. S. Stephens (1992). "Mechanism of C. trachomatis attachment to eukaryotic host cells." Cell **69**(5): 861-9.
- Zhong, G., P. Fan, et al. (2001). "Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors." J Exp Med **193**(8): 935-42.
- Zhu, Z., M. D. Gershon, et al. (1995). "Infection of cells by varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose 6-phosphate and heparin." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(8): 3546-50.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die alternativen Taxonomien der Chlamydiales	13
Abbildung 2: Schematische Darstellung des chlamydialen Entwicklungszyklus	17
Abbildung 3: Gruppierung der Polymorphen Membranproteine (Pmp) in sechs Familien	26
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Pmps von <i>C. pneumoniae</i> CWL029	28
Abbildung 5: Schematische Darstellung von Pmp21	30
Abbildung 6: Der Typ V Sekretionsmechanismus	33
Abbildung 7: Hefe- Oberflächenexpressionssystem	36
Abbildung 8: Schematische Darstellung von Pmp21	87
Abbildung 9: Expression des Aga2p-Pmp21-N-Fusionsproteins	88
Abbildung 10: Aga2p-Pmp21-Domänen exprimierende Hefezellen binden an Humanzellen	90
Abbildung 11: Aufreinigung von Pmp21-Domänen aus <i>E. coli</i>	92
Abbildung 12: Die rekombinanten Pmp21-Proteindomänen A bis D sowie N adhärieren an Humanzellen	93
Abbildung 13: Minimierung von Pmp21-Adhäsionsdomänen	95
Abbildung 14: Mutationsanalyse der FxxN-Motive in Pmp21-D	97
Abbildung 15: Adhäsionstests mit den Pmp21-D Mutanten	98
Abbildung 16: Mutagenese von Pmp21-A	100
Abbildung 17: Auswahl des Pmp21-Peptids	101
Abbildung 18: Das Peptid aus Pmp21 reduziert die Infektion	103
Abbildung 19: Pmp20 bindet an Humanzellen	
Abbildung 20 :Lokalisation des Pmp21 Proteins auf Chlamydien	107
Abbildung 21: Lokalisierung von Pmp21 im chlamydialen Einschluss und auf der Bakterienoberfläche	108
Abbildung 22: Nachweis von Pmp21 während des Infektionszyklus	110
Abbildung 23: Neutralisierung der Infektivität durch Pmp21-E Antikörper	112
Abbildung 24: Reduktion der <i>C. pneumoniae</i> Infektion nach Vorbehandlung mit rekombinantem	114
Abbildung 25: Neutralisationsversuch der <i>C. trachomatis</i> L2 Infektion durch rekombinantes Pmp21 Protein	115
Abbildung 26: Der Einfluss von rPmp21-N auf die Adhäsion von <i>C. pneumoniae</i> an HEp-2 Zellen	117
Abbildung 27: Internalisierung von Protein-beschichteten Latexkügelchen	119

Abbildung 28: Quantifizierung der internalisierten Protein-beschichteten Latexkügelchen	121
Abbildung 29: Analyse des Einflusses der repetitiven Motive auf die Internalisierung	122
Abbildung 30: Cytochalasin D Behandlung von HEp-2 Zellen	123
Abbildung 31: Einfluss von Cytochalasin D auf die Internalisierung	125
Abbildung 32: Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf die Internalisierung	126
Abbildung 33: Struktur des Internalin A von <i>Listeria monocytogenes</i>	128
Abbildung 34: Die prozessierten Proteinformen von Pmp21 und dem <i>C. trachomatis</i> Homolog PmpD	134
Abbildung 35: Modell der Pmp21 vermittelten Adhäsion und Internalisierung	140

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit auf unterschiedlicher Art und Weise unterstützt haben:

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. J.H. Hegemann für die Überlassung des Themas bedanken. In vielen Gesprächen über Ergebnisse, experimentelle Ansätze und Probleme hat er mich mit immer neuen Ideen und einer ständigen Diskussionsbereitschaft zum wissenschaftlichen Arbeiten angeleitet.

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Prof. Dr. K. Pfeffer für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Frau Dr. Katja Mölleken danke ich für ihre fachliche Kompetenz und Diskussionsbereitschaft über die Chlamydien, sowie ihre weibliche Unterstützung im Männer dominierten Chlamydien-Labor.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die lustigen Unternehmungen neben der Arbeit (Ihr seid wirklich „klasse“).

Meiner Freundin Dipl. Biol. Carolin Sydlik gilt mein besonderer Dank für ihre moralische Unterstützung, das unermüdliche Korrekturlesen meiner Arbeit und ihre große Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Gabrielle Köhler und Herrn Dr. Jens Klabunde für die aufmunternden Gespräche und das Korrekturlesen.

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner Familie, die immer fest an mich geglaubt hat. Meinen Schwiegereltern danke ich von Herzen für ihren Beistand, ihr Verständnis und ihre Aufmunterungen. Vor allem möchte ich mich bei meinem Ehemann Thorsten für seine grenzenlose Unterstützung bedanken. Deine Hilfe, Liebe und Geduld sind meine ständigen Begleiter. Danke, dass du immer an mich glaubst.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde und dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die aus anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend übernommen wurden, habe ich mit Quellenangaben kenntlich gemacht.

Eleni Schmidt